

Tesis de Posgrado

Caracterización a nivel molecular de uno de los genes inducibles por cicloheximida en *Neurospora crassa*

Attar, Ricardo Marcos

1989

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:

Attar, Ricardo Marcos. (1989). Caracterización a nivel molecular de uno de los genes inducibles por cicloheximida en *Neurospora crassa*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2224_Attar.pdf

Cita tipo Chicago:

Attar, Ricardo Marcos. "Caracterización a nivel molecular de uno de los genes inducibles por cicloheximida en *Neurospora crassa*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2224_Attar.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización a nivel molecular de uno de los genes inducibles
por cicloheximida en *Neurospora crassa*

Ricardo Marcos Attar

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Héctor N. Torres

Co-director: Dr. Norberto D. Judewicz

1989

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)

CONICET

- 2224 -

y.2

a Lily

a Malena y a Nahuel

a mi madre

a la memoria de mi padre

a Mily y a Jacky

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Héctor N. Torres, por la confianza que depositó en mí y por su apoyo ante cualquier inquietud que tuve.

Al Dr. Norberto D. Judewicz, por haber permitido mi incorporación en su línea de trabajo

A mis entrañables amigos Raúl Andino, Daniel Altschuller, Gabriel Aisemberg, Marta Blumenfeld, Daniel Mendelson, Alejandra Mandel, Daniel Boscoboinik, por haber compartido juntos una amistad que traspasó los límites del laboratorio.

A mis compañeros del 211, Erich Grotewold y Guillermo Taccioli, por haber recibido su apoyo en los buenos y malos momentos.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por su invaluable ayuda e incesante empuje

Al Dr. Alberto R. Kornblihtt, por su afecto y su preocupación demostrados en los trances difíciles.

A los Dres. Alejandro Mentaberry, Mariano Levin, Gerardo Glikin, Alejandro Paladini(h), María T. Téllez-Iñón, por el interés y el apoyo brindados durante esta etapa.

A mis compañeros del Ingebi Gabriela Levitus, Patricia Levy-Yeyati, Jorge Muschietti, Leonardo Erijman, Andrés Muro, Mercedes Goin, Viviana Bernath, Javier Cáceres, Facundo Batista, Graciela Bianchini, Betina Orman, Fernando Bravo,

Horacio Martinetto, María Laura Gómez, Omar Coso, Alejandro Shijman, Clarita Rubinstein, Rosana Celnik, Rita Ulloa y Laura Moratinos, por haber compartido tantos gratos momentos.

A Adriana Urman, por su cálido apoyo, su profesionalismo, y su excelente desempeño en el armado de esta Tesis.

A Norberto Malarini, por su amistad, su maravillosa "locura" y su profesionalismo demostrado en la confección de los gráficos de esta Tesis.

A mi mujer, porque de no contar con su apoyo y su sacrificio, la realización de esta Tesis hubiera sido imposible.

A mis hijos, aunque más que agradecimiento es una disculpa por haber estado tan poco tiempo al lado de ellos.

A mi padres, mi hermana, mi cuñado y mi suegra, porque el apoyo que recibí de ellos, fue fundamental para llegar a esta meta.

A María Julia Alvarez, Mariano Rodríguez, Leonor Acevedo y Gabriel Paissán, por su excelente trabajo técnico.

I N D I C E

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	4
3. INTRODUCCION.....	7
3.1. <i>Neurospora crassa</i>	8
3.1.1. Características generales.....	8
3.1.2. Característica del genoma de <i>Neurospora crassa</i>	12
3.2. RESPUESTA A DISTINTAS SITUACIONES DE STRESS.....	13
3.2.1. Respuesta al shock térmico.....	13
3.2.1.1. Características de la respuesta al shock térmico.....	15
3.2.1.2. Principales proteínas inducidas por shock térmico.....	18
3.2.1.3. Respuesta al shock térmico en <i>Neurospora crassa</i>	21
3.2.2. Respuesta al ayuno.....	22
3.2.2.1. Deprivación de glucosa.....	22
3.2.2.2. Respuesta al ayuno en <i>Neurospora crassa</i>	23
3.2.3. Familia de proteínas de stress de 70 kD.....	24
3.2.4. Respuesta a diversos agentes químicos.....	26
3.2.4.1. Características generales del citocromo P450.....	27
3.2.5. Respuesta a la cicloheximida.....	33
3.2.5.1. Efecto de la cicloheximida sobre <i>Neurospora crassa</i> ...	35
3.2.5.2. Características del gen CI-1.....	39
3.3. OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....	42
4. MATERIALES Y METODOS.....	43
4.1. REACTIVOS.....	44
4.2. USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICADORAS.....	46
4.2.1. Enzimas de restricción.....	46
4.2.2. Enzimas modificadoras.....	48
4.2.2.1. Fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP).....	48
4.2.2.2. T4-DNA ligasa.....	49
4.2.2.3. DNA polimerasa I (Fragmento de Klenow).....	49
4.3. CEPAS DE <i>Neurospora crassa</i> Y CONDICIONES DE CULTIVO..	49
4.3.1. Cepas de <i>Neurospora crassa</i>	49
4.3.2. Condiciones de cultivo.....	50
4.3.3. Inducción por cicloheximida.....	50

4.3.4.	Ayuno de aminoácidos aromáticos.....	50
4.4.	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	51
4.4.1.	Preparación de <i>Escherichia coli</i> MC1061 competentes y transformación de las mismas.....	51
4.4.1.1.	Preparación de <i>E. coli</i> MC1061 competentes.....	51
4.4.1.2.	Transformación de <i>E. coli</i> MC1061 con plásmidos.....	52
4.4.2.	Preparación de <i>E. coli</i> JM101 competentes y transformación de las mismas.....	52
4.4.2.1.	Preparación de <i>E. coli</i> JM101 competentes.....	52
4.4.2.2.	Transformación de <i>E. coli</i> JM101 con DNA doble cadena de fago M13.....	53
4.4.3.	Infección de <i>E. coli</i> Y1090 con fago <i>gt11</i>	53
4.5.	PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....	54
4.5.1.	Purificación de DNA plasmídico.....	54
4.5.1.1.	Purificación en pequeña escala (miniprep).....	54
4.5.1.2.	Purificación en gran escala (maxiprep).....	55
4.5.2.	Purificación de DNA simple cadena de fagos M13 recombinantes.....	55
4.5.3.	Purificación de DNA de fagos λ <i>gt11</i> recombinantes.....	57
4.5.4.	Purificación de RNA de <i>Neurospora crassa</i>	58
4.5.4.1.	Purificación de RNA total.....	58
4.5.4.2.	Purificación de mRNA (polyA+).....	60
4.6.	CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....	61
4.6.1.	Cuantificación de RNA.....	61
4.6.2.	Cuantificación de DNA.....	61
4.7.	ANALISIS DE COMPLEMENTARIEDAD DE CLONES SIMPLE CADENA DEL FAGO M13 RECOMBINANTE (<i>C-Test</i>).....	62
4.8.	SEPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA.....	63
4.8.1.	Electroforesis de DNA y transferencia a membranas (<i>Southern blot</i>).....	63
4.8.2.	Purificación de fragmentos de DNA por electrofo- resis en geles de agarosa preparativos.....	64
4.8.3.	Electroforesis de RNA y transferencia a membranas (<i>Northern blot</i>).....	65
4.8.4.	Electroforesis en geles de agarosa alcalinos.....	66
4.9.	PREPARACION DE SONDAS RADIOACTIVAS.....	66
4.9.1.	Marcado de DNA doble cadena.....	66
4.9.2.	Síntesis de DNA simple cadena marcado con [³² P].....	67
4.9.3.	Marcación con [³² P] de DNA en extremos 5' protruyentes.....	67
4.9.4.	Marcado de oligonucleótidos con γ ³² P ATP.....	68
4.10.	MAPEO DE RNA CON NUCLEASA S ₁	68
4.10.1.	Mapeo con S ₁ (Berk y Sharp).....	69

4.10.2.	Mapeo con S ₁ modificado en el laboratorio.....	70
4.11.	CLONADO DEL DNA COPIA (cDNA) DEL GEN CI-1.....	71
4.12.	CONDICIONES DE HIBRIDACION.....	72
4.12.1.	Condiciones de hibridación para sondas con alta homología.....	73
4.12.2.	Condiciones de hibridación para sondas con baja homología.....	73
4.13.	ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	73
4.13.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida analíticos.....	73
4.13.2.	Extracción de fragmentos de geles de poliacrilamida.....	74
4.14.	SECUENCIACION.....	74
4.14.1.	Subclonado de fragmentos para su secuenciación.....	74
4.14.2.	Secuenciación de DNA y de cDNA.....	78
4.14.3.	Secuenciación de RNA.....	78
4.14.3.1.	Síntesis del oligonucleótido.....	78
4.14.3.2.	Síntesis del cDNA de CI-1 utilizando el oligonucleótido de 21b como <i>primer</i>	79
4.14.3.3.	Secuenciación del cDNA sintetizado a partir del oligonucleótido de 21 b.....	80
4.14.4.	Programa de computadora utilizado en el análisis de los datos de secuencias.....	80
5.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	81
5.1.	SECUENCIACION DEL GEN CI-1.....	82
5.1.1.	Estrategia de secuenciación del gen CI-1.....	82
5.1.2.	Análisis de los datos de la secuenciación del DNA genómico del gen CI-1.....	83
5.2.	ANALISIS DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL GEN CI-1.....	83
5.2.1.	<i>Northern blot</i> utilizando como sondas distintos fragmentos del pGEM230A.....	91
5.2.2.	Protección contra la nucleasa S ₁ del fragmento AvaI-PstI.....	93
5.2.3.	Protección contra la nucleasa S ₁ del fragmento PstI-SacI.....	93
5.2.4.	Protección contra la nucleasa S ₁ del fragmento ClaI-AvaI.....	95
5.2.5.	Protección contra la nucleasa S ₁ del fragmento PstI-PstI.....	97

5.2.6.	Ensayo modificado de protección contra la nucleasa S1.....	100
5.2.7.	Estructura del gen CI-1 de acuerdo a los resultados de mapeos por S1.....	103
5.3.1.	Análisis de una genoteca de cDNA de <i>Neurospora crassa</i>	106
5.3.2.	Análisis de clones de cDNA y caracterización de los mismos.....	106
5.3.3.	Mapeo de restricción del clon pGEM2-CI-1cD12B.....	107
5.3.4.	Secuenciación del cDNA del gen CI-1.....	109
5.4.	ANALISIS DEL EXTREMO 3' DEL mRNA DEL GEN CI-1.....	109
5.5.	ANALISIS DEL EXTREMO 5' DEL mRNA DEL GEN CI-1.....	123
5.5.1.	Secuenciación del RNA del gen CI-1.....	123
5.5.2.	Putativo sitio de iniciación de la traducción.....	126
5.6.	ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DEL GEN CI-1.....	129
5.6.1.	Distribución de intrones.....	129
5.6.2.	Secuencias consenso de <i>splicing</i>	130
5.7.	ANALISIS DE LA <i>cip70</i> DEDUCIDA A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL mRNA DEL GEN CI-1.....	132
5.7.1.1.	Homología del mRNA de CI-1 con integrantes de la superfamilia del Citocromo P-450.....	132
5.7.1.2.	Conservación en el mRNA del gen CI-1 del sitio activo de los citocromos P450.....	137
5.8.	Perfil de inducción de mRNAs en la cepa M246 deprivada de aminoácidos aromáticos.....	140
6.	CONCLUSIONES.....	143
	BIBLIOGRAFIA.....	147

APENDICE

1. RESUMEN

Resumen

En *Neurospora crassa* la inhibición de la síntesis de proteínas producida por cicloheximida a concentraciones subletales, determina la inducción a nivel transcripcional de varios genes, entre ellos el CI-1. El producto de este gen (*cip70*) es una proteína de 70 kD.

El incremento en la expresión de este gen no es una consecuencia directa de la inhibición de la síntesis proteica. En este sentido la inhibición determinada en una cepa deficiente en una enzima clave en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, privada de los mismos, no muestra tener niveles incrementados del mRNA del gen CI-1. Por el contrario la inducción de otros genes de *Neurospora crassa* por la cicloheximida parecería ser una consecuencia directa de la inhibición de la síntesis proteica.

El DNA genómico correspondiente al gen CI-1 y su respectivo cDNA fueron secuenciados, comprobándose que el gen estaría estructurado al menos por 4 exones y 3 intrones.

Por otro lado, la secuencia primaria de la proteína deducida a partir de la correspondiente secuencia nucleotídica del cDNA, presentó a nivel de la región carboxilo terminal una alta homología con tres integrantes de la superfamilia de genes del citocromo P450.

Una de las características principales que presentan todos los citocromos P450 hasta ahora estudiados, es la conservación de una secuencia que contiene el sitio activo de este tipo de monooxigenasas. Dicha secuencia también se encuentra presente en la *cip70*.

Hasta el momento, sólo se ha reportado un gen de eucariotes inferiores que codifica para un citocromo P450, el gen *lan* de levaduras.

Resumen

Estos resultados indican por primera vez en *Neurospora crassa* la posible participación del citocromo P-450 en los mecanismos de detoxificación ante la agresión provocada por un agente químico, en este caso la cicloheximida.

2. ABBREVIATURAS EMPLEADAS

Abreviaturas Empleadas

Las abreviaturas que han sido empleadas se explicitan a continuación:

b.....	bases
bc.....	buffer de carga
bisacrilamida.....	N,N'-metilen-bis-acrilamida
BPB.....	azul de bromofenol
BS.....	buffer de siembra
BSA.....	seroalbúmina bovina
CA.....	cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
cDNA.....	DNA copia
Ci.....	Curies (1Ci=2,2x10 ¹² dpm)
cm.....	centímetros
cpm.....	cuentas por minuto
dATP.....	deoxiadenosina trifosfato
dCTP.....	deoxicitosina trifosfato
dGTP.....	deoxiguanosina trifosfato
DMF.....	dimetilformamida
DNA.....	ácido deoxiribonucleico
dsDNA.....	DNA doble cadena
DTE.....	ditrioeritritol
DTT.....	ditiotreititol
dTTP.....	deoxitimidina trifosfato
EDTA.....	etilendiamino tetraacetato de sodio
EtBr.....	bromuro de etidio
HCl.....	ácido clorhídrico
h.....	hora
IPTG.....	isopropil tiogalactósido
Kb.....	Kilobase
Kpb.....	Kilo pares de bases
min.....	minutos
ml.....	mililitro

Abreviaturas Empleadas

MOPS.....	ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico
mRNA.....	ácido ribonucleico mensajero
NaAcO.....	acetato de sodio
ng.....	nanogramo
oligodT.....	ácido oligodeoxitimídico
pb.....	pares de bases
PCA.....	fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
PEG.....	polietilénglicol
PIPES.....	ácido piperazin-N,N'-bis(zetán-sulfónico)
pmol.....	picomol
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
SSC 1X.....	NaCl 150mM-citrato de sodio 15mM, ajustado a pH 7,0)
ssDNA.....	DNA simple cadena
T ₄ DNA ligasa.....	DNA ligasa del fago T ₄
Tris.....	Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA.....	ácido ribonucleico de transferencia
ufp.....	unidades formadoras de placa
U.....	unidades de actividad enzimática
X-gal.....	5bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactopiranosido
μg.....	microgramo
μl.....	microlitro

3. INTRODUCCION

3.1. Neurospora crassa

3.1.1. Características generales

Neurospora crassa es un hongo perteneciente a la clase Ascomycetes que se encuentra en forma natural sobre árboles o restos vegetales de áreas tropicales o subtropicales (Shear y Dodge, 1927).

El hecho de ser un eucariote inferior, con las consiguientes ventajas concernientes a su fácil manipulación y cultivo, su menor complejidad genómica y el amplio conocimiento bioquímico y genético de su metabolismo (Badle y Tatum, 1945), lo han convertido en un interesante modelo para el desarrollo de estudios en Biología Molecular.

El micelio vegetativo contiene hifas ramificadas divididas por septos que, a través de poros centrales, permiten el flujo de una célula a otra de citoplasma, núcleos, mitocondrias y demás inclusiones. Estas células constituyentes de las hifas son multinucleadas, variando el número de núcleos entre 3 y 100 por célula. Presentan por fuera de su membrana, una pared celular compuesta por glucano, quitina y poligalactosamina y, en menor proporción, proteínas y lípidos (Työrinoja *et al*, 1974). El crecimiento se produce por extensión del extremo de las hifas y por ramificación de las mismas.

El crecimiento vegetativo de *Neurospora crassa* es óptimo entre 28°C y 34°C, y se puede dar a máxima velocidad (tiempo promedio aproximado de 3 h por cada división celular), utilizando como única fuente de carbono ya sea acetato, succinato, glicerol, glucosa, manosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa y polisacáridos. Como fuente de nitrógeno, puede utili-

Introducción

zar nitrato, nitrito, amonio o aminoácidos. Requiere además, oligoelementos como sales de zinc, manganeso, cobalto, etc., y una única vitamina (biotina).

En el ciclo de crecimiento vegetativo la *Neurospora crassa* forma dos tipos de esporas asexuales, las **macroconidias** y las **microconidias**. En el ciclo de vida sexual forma un solo tipo de espora denominada **ascospora**.

Las **macroconidias** son de color naranja, ricas en carotenoides y se producen por gemación en el extremo de hifas especializadas de crecimiento aéreo (**conidiosporo**), poseen paredes celulares gruesas, sin poros. Son esporas durmientes multinucleadas (Huebschman, 1952), resistentes a la desecación (Goata, 1962), al calor, al congelamiento (Strauss, 1958), y a la acidez (Graham, 1967). Cuando se encuentran en medio adecuado, las **macroconidias** germinan entre 2 y 5 hs, restaurando el crecimiento vegetativo. Por tales razones estas esporas son utilizadas como inóculo de cultivos (ver Materiales y Métodos), y sirven como "células" fertilizantes (masculinas) en los cruzamientos.

Las **microconidias** se producen a partir de células no especializadas del micelio en la fase estacionaria del cultivo, son uninucleadas y de escasa viabilidad, por lo cual prácticamente no son utilizadas en el laboratorio.

Cuando *Neurospora crassa* crece en un medio nutritivo deficiente, conteniendo nitrato como única fuente de nitrógeno, desarrolla estructuras femeninas, los **protoperitecios** (Westergaard y Mitchell, 1947), formados por una capa de hifas estériles cuya función es proteger a una hifa especializada, la **ascogonia**. Esta, por medio de un extremo proyectado hacia el exterior del protoperitecio, el **tricógino**, es la responsable de la captación de las "gametas" masculinas.

Introducción

El ciclo sexual de *N. crassa* (figura 1), se da cuando una "gameta" masculina entra en contacto con el tricógino, tras lo cual el núcleo masculino es transportado hasta el interior de la ascogonia, donde se encuentra el núcleo femenino.

Es importante destacar que durante la mayor parte de su ciclo biológico la *N. crassa* es haploide. La única célula diploide en su ciclo de vida es el cigoto. Es además hermafrodita puesto que una cepa salvaje puede producir tanto macro y microconidias como ascogonias. Es también heterotálica; esto significa que las macro o microconidias de un tipo de cruzamiento sólo pueden fecundar a la ascogonia del otro tipo de cruzamiento. En este sentido es importante destacar que en *Neurospora crassa* existen dos tipos de cruzamientos A y a, determinados por un solo par de alelos y fenotípicamente indistinguibles. Los loci correspondientes a los dos tipos de cruzamiento de *N. crassa* han sido clonados y utilizados para restaurar, por ensayos de transformación de cepas estériles, la capacidad de cruzarse con cepas del tipo de cruzamiento opuesto, de las mismas (Glass *et al*, 1988).

Antes de la fusión nuclear, que ha de dar lugar al cigoto, ambos núcleos parentales sufren varias divisiones mitóticas formando las llamadas **hifas ascógenas**, y es en los extremos de éstas, donde se produce la fusión de los núcleos de los dos tipos de cruzamiento. El núcleo diploide formado sufrirá luego una división meiótica seguida de dos divisiones mitóticas, que dan como resultado cuatro pares de **ascosporas** o esporas sexuales, de color negro, ricas en melanina, que se alojan en una bolsa rígida denominada **asco**. Estas ascosporas son expulsadas al exterior a través del cuello del peritecio y pueden permanecer en estado de latencia por años sin perder viabilidad, resistiendo perfectamente la desecación, el congelamiento y el calor, etc. Las **ascosporas** pueden germinar en un medio adecuado sólo si son sometidas previamente a un shock térmico de 60°C.

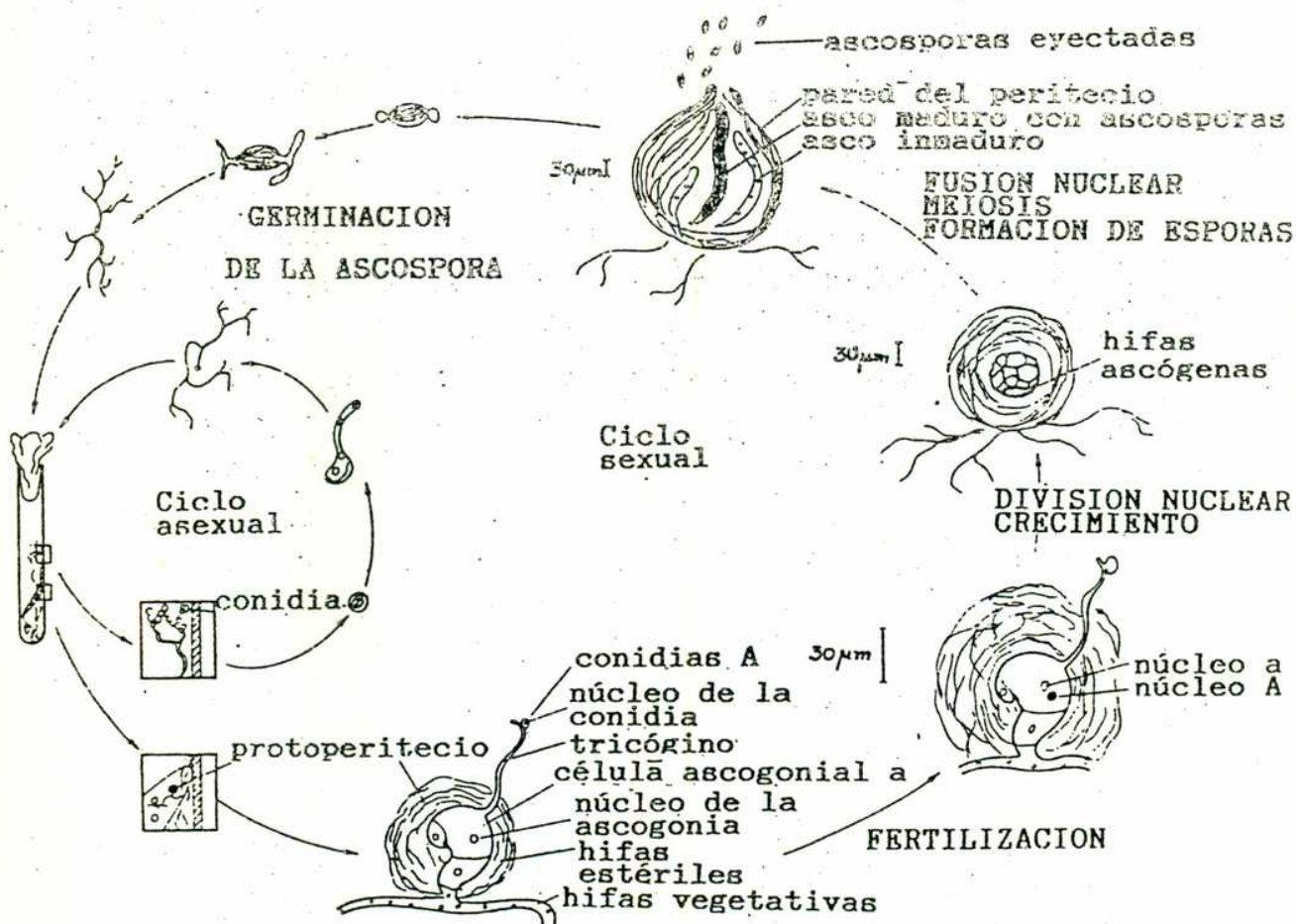


Figura 1: Ciclo de vida de *Neurospora crassa*

Tomado de Davis y de Serres, 1970.

3.1.2. Característica del genoma de *Neurospora crassa*

En el estado haploide, *Neurospora crassa* tiene 7 cromosomas, y el genoma en ellos contenido posee un total de 27000 Kpb (Krumlauf y Marzluf, 1980; Perkins y Bony, 1977). Un 90% de este DNA se encuentra como secuencias únicas y un 8% como secuencias repetitivas. Dichas secuencias, alrededor de 140 copias por genoma, tienen aproximadamente 15 Kpb cada, están dispuestas en tándem y codifican los rRNAs de 26S, 17S y 5,8S (Brooks y Huang, 1972; Dutta, 1973; Free et al, 1979).

A diferencia de lo que ocurre en eucariotes superiores el rRNA de 5S, no se encuentra en estas unidades repetitivas ni en otras agrupadas en tándem, sino que se halla disperso en el genoma (Selker et al, 1981).

El restante 2% del DNA genómico corresponde a secuencias palindrómicas de aproximadamente 700 b que están dispersas y en un número de 350 por genoma.

Si bien en los primeros momentos se pensó que al igual que levaduras y en contraste con los genes de eucariotes superiores, *Neurospora crassa* presentaba como característica general, la presencia de un número menor de intrones o la ausencia de los mismos, con la acumulación de nuevos datos sobre la secuencia de varios genes de *Neurospora crassa*, como por ejemplo, del gen de la metalotioneína (Munger et al, 1985), del gen de la β tubulina (Orbach et al, 1986), del gen de la proteína ribosomal L29 (Kreider y Heckman, 1987), del gen de la lacasa (Germann et al, 1988), de los genes de las subunidades de la ATPasa vacuolar (Bowman et al, 1988a y 1988b) y del gen de la ubiquitina (Taccioli et al, 1988), etc., se comprobó que la hipótesis original acerca de la ausencia de intrones en *Neurospora crassa* es incorrecta.

La mayoría de estos genes tienen intrones que varían en número y tamaño, y que se encuentran preferencialmente, y al igual que en *Saccharomyces*, en las regiones 5' de los mismos. Las secuencias consenso de *splicing* de estos intrones presentan homología con las descritas en levaduras y en eucariotes superiores y se analizarán con mayor detalle en Resultados y Discusión (ver 5.6.2. y Fig. 25).

3.2. **RESPUESTA A DISTINTAS SITUACIONES DE STRESS**

Se han descrito distintas condiciones, como ser, shock térmico, inhibición de la síntesis proteica, privación de nutrientes esenciales, daños del DNA, etc., que son capaces de provocar por diversos mecanismos, el aumento de los productos de los denominados "Genes de stress". Esta respuesta al stress le permite a las células adaptarse a las situaciones desfavorables mientras persistan las mismas.

En las siguientes secciones se tratarán en detalle aquellas situaciones de stress de las que se posee mayor información.

3.2.1. **Respuesta al shock térmico**

En todo organismo tanto procariótico como eucariótico cuando se eleva la temperatura de 5 a 15°C por encima de la óptima para el crecimiento celular, se produce como respuesta, la síntesis cierto número de proteínas altamente conservadas, las llamadas "hsp's" o *heat shock proteins* (Lindquist, 1980; Kothary y Candido, 1982; Francis y Lin, 1980; Giudice *et al*, 1980; Lindquist *et al*, 1982; Key *et al*, 1981; Barbely *et al*, 1985; Yammori *et al*, 1978; Daniels *et al*, 1984).

Introducción

Las *hsps* han sido descritas en todos los organismos donde se las ha buscado, mostrando un alto grado de conservación a nivel nucleotídico y aminoacídico (Kelly *et al*, 1982; Miller *et al*, 1979; Ingolia *et al*, 1980; Bienz, 1984; Hunt *et al*, 1985; Gutman *et al*, 1979).

Además del incremento de la temperatura, existen distintos tratamientos que son eficaces para provocar la inducción de las *hsps*, éstos incluyen el etanol, el arsenito de sodio, los metales pesados, la síntesis de proteínas anormales por incorporación de análogos de aminoácidos, los ionóforos de calcio, los agentes quelantes, las hormonas esteroides, la microinyección de proteínas desnaturalizadas, etc (Lindquist, 1986; Anathan *et al*, 1986). Por esta razón se presume que estas proteínas, cumplirían funciones de protección generalizada y de resistencia ante una condición hostil.

Por otra parte dentro de esta familia de proteínas, se encuentran algunas que se expresan ya sea en forma constitutiva, o en determinados estadios celulares, lo que permitiría especular sobre un posible rol de las mismas en el crecimiento normal y en el desarrollo (ver luego).

Los primeros estudios realizados a nivel molecular de la respuesta al shock térmico, los llevaron a cabo Tissieres y Mitchell (1973), quienes correlacionaron la aparición de un grupo pequeño de proteínas con el cambio inducido por calor en el patrón de *puffs* de los cromosomas de la glándula salival de *Drosophila buskii*.

A partir de este momento, se utilizó el sistema de respuesta al shock térmico como modelo para el estudio de la estructura y de la regulación génica. Este modelo resultó satisfactorio, dado que fueron los genes de las *hsps* de *Drosophila* unos de los primeros genes eucarióticos clonados (Livak *et al*, 1978; Schedl *et al*, 1978; Craig *et al*, 1979; Moran *et al*, 1979; Artava-

nis-Tsakonas 1979), los primeros en tener caracterizada su organización dentro del genoma (Ish-Horowicz *et al*, 1977; Holmgreen *et al*, 1979), los primeros en los cuales se determinó la estructura de la cromatina antes y después de la activación (Wu *et al*, 1979; Wu, 1980) y los primeros en tener identificadas sus secuencias regulatorias (Pelham, 1982), etc. Sin embargo, los avances evidenciados en la caracterización de los genes de las **hsps** no lograron aportar datos definitivos sobre la función de dichas proteínas, punto que actualmente sigue siendo tema de especulación.

3.2.1.1. Características de la respuesta al shock térmico

Los mRNA inducibles por shock térmico se comienzan a producir en unos pocos minutos de operado el incremento en la temperatura y son inmediatamente traducidos con una muy alta eficiencia. Simultáneamente se reprimen tanto la transcripción como la traducción de los genes que se expresaban hasta ese momento. Esta situación se mantiene mientras dura la exposición a altas temperaturas, tras lo cual se restauran gradualmente los patrones de transcripción y traducción normales (DiDomenico *et al*, 1982).

En cuanto a la respuesta específica de tejido, se demostró que en general, los distintos tipos de células responden al shock térmico de modo idéntico (Tissières *et al*, 1974), salvo las excepciones que se detallan a continuación. Por ejemplo, en cerebro de rata no se produce la inducción por calor de la hsp 70 hasta los 21 días de vida (White y Currie, 1982). Otro caso es el de los linfocitos de pollo que expresan el perfil completo de las **hsps**, mientras que los reticulocitos sólo expresan la hsp 70 (Morimoto *et al*, 1984).

Introducción

Por otro lado es importante destacar la influencia del desarrollo y de la diferenciación sobre la respuesta al shock térmico. Los embriones tempranos de *Drosophila* (Dura, 1981), de erizo de mar (Roccheri *et al*, 1981), de sapo (Bienz, 1984) y de ratón (Heikkila *et al*, 1985), son incapaces de producir la mayor parte de las *hsps*. Más aún, células de teratocarcinoma de ratón, equivalentes en varios sentidos a la masa interna de células pluripotenciales del blastocisto, no sintetizan *hsps* en respuesta a un shock térmico, pero sí lo hacen si previamente se las induce a diferenciarse *in vitro* con ácido retinoico (Morange *et al*, 1984). Sin embargo, hay otras *hsps* que se expresan en esos mismos embriones tempranos en forma constitutiva (Zimmerman *et al*, 1983).

Con respecto a la regulación de la respuesta al shock térmico, se ha descrito que en *Escherichia coli* (Yamamori, 1980) y en levaduras (Lindquist, 1981), ésta es exclusivamente a nivel transcripcional. En *Drosophila* (Lindquist, 1981), por el contrario la regulación se ejerce tanto a nivel transcripcional como traduccional.

En *Xenopus*, las células somáticas regularían la respuesta al shock térmico a nivel transcripcional, mientras que en el ovocito, el mRNA de la *hsp 70* sería transcripto en forma constitutiva pero existiría un bloqueo que impediría la traducción del mismo. Al producirse el shock térmico, dicho bloqueo desaparecería permitiendo la rápida síntesis de la *hsp 70* (Bienz, 1982).

Un cúmulo de evidencias indican que en los organismos eucarióticos existe un mecanismo común, de regulación de la transcripción de los genes involucrados en la respuesta al shock térmico.

En este sentido, el análisis de las secuencias de los genes *heat shock* de *Drosophila*, reveló la existencia de una estrecha homología entre secuencias ubicadas en las regiones 5' de

Introducción

los mismos, las cuales fueron postuladas como responsables de la activación de la transcripción (Ingolia *et al*, 1980; Karch *et al*, 1981; Holongren *et al*, 1981).

Además, los mapeos por delección, permitieron determinar con precisión la posición de la secuencia responsable de dicha activación. Subsiguientemente, esto permitió postular como el elemento consenso característico de *heat shock*, HSE, la siguiente secuencia: C--GAA--TTC--G. Esta secuencia se encuentra ubicada en eucariotes entre 47 y 66 pb *upstream* del sitio de iniciación de la transcripción. En procariotes la secuencia equivalente es TntCNCcCTTGAA (13-15 pb) CCCCATtTa que se encuentra ubicada a -35 y a -107 pb de la base +1 (Pelham, 1982).

Una sola copia del HSE en una secuencia promotora sintética es suficiente como para promover una transcripción inducible por shock térmico en sistemas heterólogos (Pelham *et al*, 1982); muchos de los genes *heat shock* se caracterizan por tener múltiples copias del HSE.

Además ha sido purificado y caracterizado el factor que interactuaría con el HSE, el *heat shock transcription factor* (HSTF) (Parker, 1984; Wu, 1985).

En cuanto a la regulación a nivel traduccional, se comprobó que en muchos organismos eucarióticos, los mRNA normales desaparecen de los polisomas en unos pocos minutos después del aumento de temperatura; simultáneamente, comienza la traducción de los mRNA de las *hsps* (Lindquist, McKenzie *et al*, 1975; Roccheri *et al*, 1981).

Cuando una variedad de organismos desde bacterias, plantas, mamíferos o células en cultivo, son incubados a una temperatura moderadamente elevada, capaz de inducir las *hsps*, y luego se los expone a una temperatura más alta, se observa un número de sobrevivientes aproximadamente 100 veces mayor que cuando individuos de la misma especie son expuestos a la temperatura ex-

trema sin ningún tratamiento previo. A este fenómeno se lo denomina **termotolerancia** (Subjeck *et al*, 1982; Mitchell *et al*, 1979; Tobe *et al*, 1984). Varios hechos indicarían la responsabilidad de las **hsps** en dicha termotolerancia.

La termotolerancia puede ser inducida además, por los otros inductores de las **hsps** (ver más atrás) y su aparición y desaparición se correlacionan perfectamente con la acumulación y la degradación de las **hsps**. Los mutantes, que poseen termotolerancia constitutiva sintetizan algunas **hsp** a temperaturas normales (Iida y Yanara, 1984).

De los aproximadamente 70 genes de *heat shock* clonados y secuenciados, sólo dos de ellos presentaron intrones, la **hsp 83** de *Drosophila* (Holmgren *et al*, 1981; Hackett *et al*, 1983), y uno de los genes de las **hsps** pequeñas de nematodos (Rusnak *et al*, 1983).

Esta carencia de intrones es muy poco frecuente en genes eucarióticos, y puede estar indicando alguna característica funcional. El bloqueo del *splicing* promovido por el shock térmico fue descrito por Pederson (1983). Esto determina que los **mRNAs** de las **hsps**, al no tener intrones, se encontrarían en ventaja con respecto a las demás **mRNAs** celulares para ser traducidos (Yost y Lindquist, 1986).

3.2.1.2. Principales proteínas inducidas por shock térmico

Las dos **hsps** más conservadas a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica son la **hsp 70** y la **hsp 83**. La **hsp 70** humana presenta una homología del 50% con la de *Escherichia coli* (Hunt y Morimoto, 1985).

El gen que codifica para la **hsp 70** de *E. coli* (**dnaK**) fue identificado originalmente como un gen del huésped esencial para la replicación del fago lambda y para la viabilidad de la

bacteria (Sunshine *et al*, 1977). Esta proteína es abundante en bacterias no infectadas aún a temperaturas normales, produciéndose un aumento en la expresión de la misma cuando se eleva la temperatura (Saito y Uchida, 1977).

En *E. coli* el dnaK es único (Bradwell *et al*, 1984), mientras que tanto en *Drosophila* (Ingolio, Stater *et al*, 1982; Wadsworth, 1982) como en *Saccharomyces cerevisiae* (Ingolia *et al*, 1982b) y en el hombre (Mues *et al*, 1986), los genes que codifican para las hsp 70 pertenecen a familias multigénicas cuyos miembros responden al incremento de temperatura en forma diferente dado que algunos no son inducibles por shock térmico y otros, por ejemplo las proteínas codificadas por los genes YG103 e YG101 de *S. cerevisiae*, son reprimidas por el incremento de temperatura.

Todos los miembros de la familia de hsp 70 son capaces de unir ATP y en condiciones adecuadas, algunas pueden hidrolizarlo (Welch y Feramisco, 1985).

En cuanto al rol fisiológico de la familia de las hsp 70, el mismo sigue siendo tema de discusión, y si bien no se ha arribado a ninguna conclusión de tipo general, existen datos que permiten aclarar las funciones de algunos de los componentes de dicha familia, los cuales se detallan a continuación.

En células de mamíferos sometidas a un shock térmico, varias proteínas nucleares se vuelven insolubles y son operativamente definidas como parte de la matriz nuclear. Se comprobó que un de las hsp 70 una vez producido el tratamiento térmico, migra al núcleo y se une a la matriz en forma resistente a la extracción salina, tras lo cual se concentraría en el nucleolo uniéndose a ribosomas parcialmente ensamblados (Welch y Suhan, 1986). La estructura de los nucleolos es muy sensible al incremento de temperatura y se comprobó que al transfectar las células con un plásmido que superproducía una hsp 70, se aceleraba la recuperación de los mismos tras el shock térmico (Pelham, 1984).

Introducción

Una característica de esta asociación entre dicha hsp70 y los nucleolos pretratados térmicamente, es que puede ser revertida *in vitro* por el agregado de ATP pero no de análogos del ATP no hidrolizables (Lewis y Pelham, 1985). El modelo que se postula para justificar los datos antes expuestos es que el tratamiento térmico produciría una desnaturalización parcial de ciertas proteínas nucleares, las que expondrían regiones hidrofóbicas que luego interaccionarían entre sí para dar agregados insolubles.

La hsp 70 se uniría estrechamente a esas regiones hidrofóbicas y limitaría la formación de los agregados insolubles, requiriendo luego la energía proveniente de la hidrólisis de ATP para liberarse de su "sustrato", el cual volvería a la conformación correspondiente, previa al tratamiento térmico (Pelham, 1985).

Un postulado de este modelo sería que las hsps 70 tendrían afinidad por proteínas anormales o desnaturalizadas, habiéndose sugerido que la acumulación de estas proteínas anormales *per se* serían la señal que dispararía la inducción de las hsps (Munro y Pelham, 1985).

La utilización de la energía proveniente de la hidrólisis del ATP por la hsp 70 para desacoplar agregados hidrofóbicos quedó demostrada al comprobar que la ATPasa responsable de la remoción de la clatrina de las vesículas revestidas, pertenece a la familia de las hsp 70 y es la llamada hsc 70 (Rotmman *et al*, 1986; Chappel *et al*, 1986).

En cuanto a la hsp 83 de *Drosophila* y de levadura, equivalentes a la hsp 90 de vertebrados, en condiciones normales tienen un nivel basal de expresión bastante alto y son inducibles por shock térmico o por deprivación de glucosa (ver más adelante). Se ha demostrado además que son capaces de asociarse en forma transitoria con proteína-quinasa de tirosina que se encuentran en tránsito hacia la membrana plasmática, y que también son

Introducción

capaces de asociarse a receptores de hormonas esteroides cuando no están unidas a sus ligandos correspondientes (Courteridge y Bishop, 1982).

3.2.1.3. Respuesta al shock térmico en *Neurospora crassa*

En *Neurospora crassa* la respuesta al shock térmico es similar a la descrita en otros organismos, aunque los estudios realizados se limitan a la inducción de las proteínas y al análisis de los mRNA totales antes y después del tratamiento, ya que los genes aún no han sido clonados (Kapoor y Lewis, 1987; Curle y Kapoor, 1987).

La inducción de las hsp's sería evidente a los 5 minutos de comenzado el tratamiento a 45°C, temperatura en la que la inducción es máxima.

Además de las hsp's principales y muy conservadas, se ha encontrado en *Neurospora crassa* y en otros hongos, una proteína de respuesta a shock térmico de 96-99 kD que también habría sido descrita en plantas verdes (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 es el lugar de acción de por lo menos alguna de las hsp's. Otras evidencias que apoyarían esta suposición son las aportadas por ensayos en los que se comprobó que muchos inhibidores de la respiración serían capaces de dar una respuesta equivalente (Plesofsky-Vig y Brambl, 1985).

3.2.2. Respuesta al ayuno

Generalmente, cuando un organismo sufre la privación de algún nutriente esencial o no, pone en marcha mecanismos adaptativos que van desde la utilización de caminos metabólicos alternativos, en el caso de procariotes y eucariotes inferiores, a la permanencia en alguna forma de latencia que le permita sobrevivir hasta que se den condiciones más favorables.

3.2.2.1. Deprivación de glucosa

En 1974 fue descrita por Stone *et al*, la acumulación de dos proteínas de 78 kD y 94 kD en fibroblastos de embrión de pollo transformados por el virus de sarcoma aviario. Si bien originalmente se pensó que estas proteínas eran específicas de transformación, se comprobó luego que eran proteínas que podían ser detectadas en células normales. Posteriormente se comprobó que la acumulación de estas proteínas no se debía directamente a la transformación, sino a la deprivación de glucosa del medio de cultivo, como consecuencia del rápido crecimiento de las células transformadas por el virus. Debido a que la síntesis de estas proteínas es regulada por la concentración de glucosa en el medio de cultivo es que se las llama *grps* (*glucose-regulated proteins*) (Lee, 1987).

El estudio de la secuencia de ambos genes demostró que la *grp 78* pertenecía a la familia multigénica de las *hsp 70* (Munro y Pelham, 1986), mientras que la *grp 94* tenía homología con la *hsp 90* de mamífero y la *hsp 83* de *Drosophila* (Sorger y Pelham, 1987).

La **grp** más abundante, la **grp 78**, ha sido localizada en el retículo endoplásmico. La síntesis de esta proteína es inducida también por tratamiento con el ionóforo de calcio A23187, por inhibidores de la glicosilación como la tunicamicina, la glucosamina y la 2-dioxiglucosa. Si bien las **grps** y las **hsp**s son especies de proteínas diferentes, presentan homologías entre sí y pertenecerían a la superfamilia de "proteínas inducibles por stress"; más específicamente las **hsp 70** y la **grp 78** serían miembros de la familia de *70 kD stress proteins*, cuya posible función se discute más adelante.

3.2.2.2. Respuesta al ayuno en *Neurospora crassa*

Un sistema bien estudiado en *Neurospora crassa*, es la respuesta a la deprivación de nitrógeno. Generalmente, la fuente de obtención de nitrógeno la constituyen la glutamina, el amonio y el glutamato, pero en situaciones desfavorables se han descrito hongos capaces de utilizar como fuentes secundarias de nitrógeno, nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos, etc.

La falta de los metabolitos más utilizados, o la presencia de los secundarios, productos del catabolismo, disparan la síntesis o la activación de las enzimas responsables de llevar a cabo las distintas vías alternativas. Es el caso del gen reguladorio nit-2 de *N. crassa*, que ante la falta de nitrógeno activa la transcripción de las nitrato- y nitrito-reductasas, deaminasas, enzimas del metabolismo de purinas, proteasas extracelulares, etc. (Tomsett y Garrett, 1981; Reinert y Marzluf, 1975; Marzluf, 1981; Sikora y Marzluf, 1982). A diferencia de esto, cuando *N. crassa* se encuentra en un medio conteniendo amonio o glutamina o ácido glutámico, se produce una represión catabólica de todas las vías metabólicas antes mencionadas.

Por falta de azufre, *Neurospora crassa* derreprime una serie de enzimas y sistemas de transporte involucrados en el metabolismo del azufre. La derrepreión estaría regulada por un gen regulador positivo, cys-3, de funciones análogas al locus nit-2 (Metzenberg, 1979).

En el caso de la RNAsa N₄ de *N. crassa*, es inducida ya sea por ayuno de fuentes de carbono, nitrógeno o azufre. Se trata de una enzima extracelular y su función es la de obtener C, N o S por hidrólisis del RNA (Lindberg y Drucker, 1984).

3.2.3. Familia de proteínas de stress de 70 kD

Se han agrupado dentro de esta clasificación a aquellas proteínas que comparten la característica de ser inducibles por algún tipo de stress y que tienen un peso molecular de aproximadamente 70 kD (Deshaies *et al*, 1988). Principalmente componen esta clasificación las *hsps* 70 y la *grps* 78. Como ya se ha descrito anteriormente, las *hsps* 70 son, a su vez, una familia multigénica ya que *Drosophila*, por ejemplo, tiene ocho genes homólogos en su genoma, el hombre por lo menos diez (Mues *et al*, 1986), y *Saccharomyces cerevisiae* al menos ocho (Werner-Warhburne *et al*, 1987). Esto hace que dilucidando la función fisiológica de algunos de sus miembros, se pueda tener aunque sea una aproximación al mecanismo de acción de los otros, sobre todo teniendo en cuenta que estos genes están conservados en mayor o menor medida en su estructura primaria.

En base a las evidencias acumuladas concernientes al rol de algunas de las *hsps* 70, tales como la remoción dependiente de ATP de la clatrina de las vesículas revestidas, la recuperación de los nucleolos después del daño térmico, y la unión a pro-

Introducción

teínas anormales o mal ensambladas reversible por ATP, se sugirió como modelo general que las hsp 70 se unirían a regiones hidrofóbicas naturalmente expuestas de proteínas, o expuestas como consecuencia de su desnaturalización. Esta unión (*binding*) sería reversible mediando la hidrólisis de ATP, previniendo así interacciones proteína-proteína inapropiadas (Pelham, 1986).

Los estudios realizados sobre translocación transmembrana de proteínas recién sintetizadas, ya sean secretorias o de organelas, revelaron que dichas proteínas debían estar desplegadas para poder atravesar la membrana (Eilers, 1988). Por otra parte ya era conocido, que el transporte post-traducciona l de proteínas mitocondriales y de secreción requieren de la hidrólisis de ATP y de factores citosólicos habiéndose incluso postulado la existencia de una actividad "desplegasa". Debido a la similitud con los roles atribuidos a las hsp 70, Chirico *et al* (1988) trataron de relacionar a alguna de las hsp 70 con la "desplegasa", y demostraron que la incorporación a vesículas microsomales de levadura del preprofactor- α de levadura traducido *in vitro*, era estimulado por dos proteínas del sobrenadante post-ribosomal. Dichas proteínas de 70 kD están inmunológicamente relacionadas con las codificadas por dos de los ocho genes de las hsp 70 de levadura. Dichos genes son los denominados SSA1 y SSA2.

Por otra parte, una cepa de levadura que posee tres de sus genes inducibles por shock térmico deletionados, SSA1, SSA2 y SSA4, resultó ser inviable (Deshaies *et al*, 1988). La viabilidad de esta cepa pudo recuperarse por transformación con un plásmido que expresa una de las hsp 70 bajo el control del promotor GAL1. Las células transformadas crecen en presencia de galactosa y pierden la hsp 70 mediante el pasaje de las levaduras a un medio con glucosa. En estas condiciones los autores estudiaron el efecto de la falta de la hsp 70 sobre el transporte transmembrana de proteínas.

No sólo encontraron que el preprofactor- α no se había translocado y se acumulaba en el citosol, sino que encontraron acumulación de la subunidad β de la ATPasa F_1 , mitocondrial, con lo cual se evidenció directamente la intervención de la **hsp 70** en la importación proteica al retículo endoplásmico y a la mitocondria.

Por otro lado, se había descrito en el lumen del retículo endoplásmico otro miembro de la familia de *70 kD stress*, que es la **grp 78** (ver 3.2.2.1.), también llamada BiP. Esta proteína se asociaría en forma transitoria y reversible por ATP a las cadenas pesadas de inmunoglobulinas que no estuvieran ensambladas con sus respectivas cadenas livianas, previniendo o revirtiendo la formación de agregados de cadenas pesadas en el retículo endoplásmico (Munro y Pelham, 1986). La proteína BiP interaccionaría preferentemente con proteínas que estuvieran incorrectamente plegadas, pero no se uniría a proteínas recién sintetizadas que hubieran alcanzado su estado de plegamiento correcto (Pelham, 1988).

3.2.4. Respuesta a diversos agentes químicos

Como ya se mencionó, en respuesta a una situación adversa un organismo es capaz de producir cambios en su programa genético que le permitan adaptarse a la nueva situación.

Una de estas respuestas es, en el caso de una agresión mediada por sustancias químicas, la inducción de sistemas de detoxificación que neutralicen o eliminen a dicho agente agresor.

Uno de los mecanismos de detoxificación celular más estudiados es el del sistema de las monooxigenasas, también denominado del Citocromo P-450.

Introducción

Los resultados expuestos en el capítulo de Resultados y Discusión, justifican la inclusión de esta sección en esta Introducción.

3.2.4.1. Características generales del CITOCROMO P450

Los citocromos P450 son hemoproteínas involucradas en el metabolismo oxidativo de diversas sustancias ya sean endógenas o exógenas tales como: esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biógenas, feromonas, metabolitos de plantas, innumerables drogas, agentes carcinogénicos, mutágenos y otros contaminantes del medio.

Participan en el metabolismo llamado de "FASE I", en el cual un sustrato es oxigenado. Luego las enzimas de "FASE II", utilizarán ese oxígeno como sitio de glucuronidación, sulfatación, de formación de conjugados con glutatión, con glicina, etc.

La detoxificación celular, generalmente requiere la participación de las enzimas de las dos FASES.

La actividad catalítica de las enzimas del complejo P450 involucradas en el metabolismo de diversas drogas, se encuentra en el retículo endoplásmico. La distribución de los componentes del sistema P450 en el retículo endoplásmico se esquematiza en la figura 2.

En dicho esquema está representado el "sistema de las monooxigenasas", el cual está compuesto por una flavoproteína (óxido reductasa), una hemoproteína (el llamado citocromo P450), y lípidos (Lu *et al*, 1968; French *et al*, 1980).

La NADPH-P450 oxidoreductasa, se encuentra libre sobre la bicapa lipídica, mientras que el *cluster* de enzimas P450 está profundamente embebido en la misma. La estequiometría de la NADPH-P450 oxidoreductasa y las moléculas de P450 es de 1:10-1:100 (French, 1980).

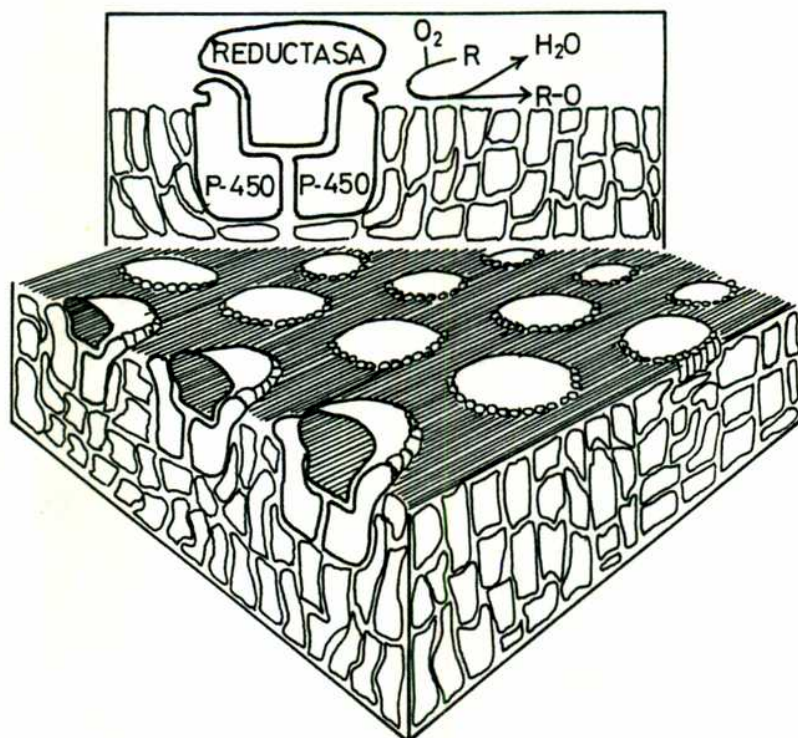


Figura 2: Representación tridimensional del sistema de las monooxigenasas en el retículo endoplásmico.

R: sustrato (Nebert, D.W., 1979, Mol. Cell. Biochem. 22, 27-46.

Introducción

El *cluster* de enzimas P450 recibe electrones del NADPH o del NADH, vía la oxidoreductasa. Cada molécula de citocromo P450 forma entonces, un complejo trimolecular con el O₂ atmosférico y alguno de los innumerables sustratos, tras lo cual, el sustrato es oxigenado (White y Coon, 1980). Dependiendo de la velocidad de formación de los intermediarios de reacción, de la vecindad de las enzimas de la "FASE II" (por ejemplo, UDP glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, glutation transferasas, etc.), y de la estabilidad de los intermediarios oxigenados, habrá dos caminos posibles: una vez conjugado el sustrato, se elimina de las células en forma de productos inocuos y altamente polares, o por el contrario se une covalentemente a proteínas, las cuales pueden migrar al núcleo hecho al que se le atribuye la responsabilidad en la carcinogénesis mediada por agentes químicos, la mutagénesis, etc.

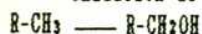
En la figura 3 se pueden observar las diversas reacciones de monooxigenación que pueden llevar a cabo las enzimas P450.

Inicialmente, los estudios que se llevaban a cabo sobre el sistema del citocromo P450 se basaban en la purificación de fracciones microsomales con actividad de monooxigenasas frente a distintos tipos de inductores. Para fines de la década del 60, se habían descrito más de 300 sustancias capaces de inducir su propio metabolismo (Conney, 1967).

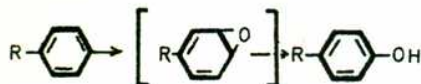
Con la aplicación de las técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética en el estudio del sistema del citocromo P450, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de más de 60 proteínas P450. Estos datos, permitieron organizar la SUPERFAMILIA DEL P450 en 10 familias (ocho integradas por genes de mamíferos, una por un gen de levadura y una por un gen de *Pseudomona*).

Para comprender acabadamente la relación existente entre los integrantes de esta superfamilia, es necesario aclarar la secuencia de eventos que llevaron al clonado de la mayoría de los

Oxidación de compuestos alifáticos



Hidroxilación de compuestos aromáticos



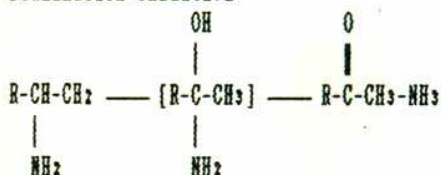
N-dealquilación



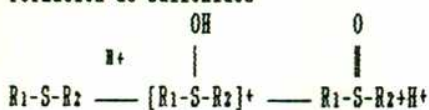
S-dealquilación



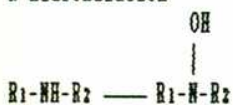
Deaminación oxidativa



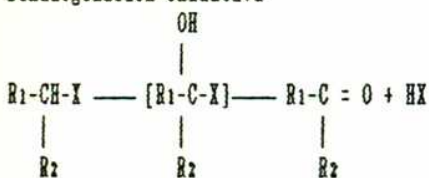
Formación de sulfoxidos



N-hidroxilación



Dehalogenación oxidativa



Dehalogenación reductiva

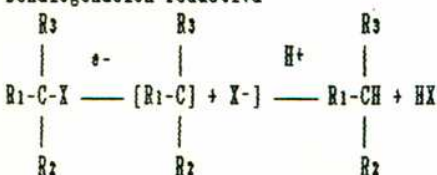


Figura 3: Ejemplos de algunas de las actividades de monooxigenasas de los citocromos P450

Introducción

mismos. Como se dijo anteriormente, se conocían por lo menos 300 sustancias capaces de inducir los distintos componentes del sistema P450. En general, se purificó cada una de esas enzimas, se obtuvieron anticuerpos contra las mismas (generalmente policlonales), y con ellos se buscaron las secuencias que codificaban para la/s proteínas reconocidas por los mismos en genotecas de cDNA del órgano u organismo respectivo, previamente inducido con la sustancia correspondiente.

Así, se fueron describiendo secuencias de P450 que respondían ante distintos inductores, y que no necesariamente conservaban altas homologías entre sí. Luego, con esos clones se analizaron nuevas genotecas de cDNA, del mismo organismo u otro, en condiciones de menor estringencia, o que habían sido inducidas por otras sustancias que compartían características químicas con el inductor original.

Es así que, en base a los datos de las secuencias halladas, se agruparon los distintos P450s de acuerdo a las homologías que presentaban entre sí, comprobándose que cada integrante de una subfamilia conserva una homología igual o mayor al 68% respecto de cualquier integrante de esa misma subfamilia. Mientras que, un P450 cualquiera muestra una homología menor o igual al 36% con cualquier integrante de alguna de las restantes 9 familias (Nebert, 1987).

Para unificar la nomenclatura, las familias se han designado con números romanos, las subfamilias con letras, y los integrantes de la subfamilia con números arábigos. En la Tabla I se puede apreciar la organización de la superfamilia de los genes P450.

Generalmente, los integrantes de una familia son inducibles por un determinado tipo de agentes químicos. La alta homología existente entre los integrantes de la misma daría cuenta de la conservación de secuencias relacionadas con la especificidad

Tabla I: Superfamilia de citocromos P450 (Nebert et al, 1987)

Familia, subfamilia y nombre del gen	Otras denominaciones encontradas en la literatura
<u>P450I (inducible por compuestos aromáticos policíclicos)</u>	
Sólo una subfamilia	
P450IA1	Rata c, Conejo forma 6, Ratón P1, Humano P1
P450IA2	Rata d, Conejo forma 4, Ratón P3, Humano P3
<u>P450II (mayor)</u>	
Subfamilia P450IIA	
P450IIA1	Rata a
P450IIA2	Humano P450(I)
Subfamilia P450IIB (inducible por Fenobarbital)	
P450IIB1	Rata b, Conejo forma 2
P450IIB2	Rata c
Subfamilia P450IIC	
P450IIC1	Conejo PBC1
P450IIC2	Conejo PBC2, K
P450IIC3	Conejo PBC3, forma 3b
P450IIC4	Conejo PBC4, forma 1-8
P450IIC5	Conejo forma 1
P450IIC6	Rata PB1
P450IIC7	Rata f
P450IIC8	Humano forma 1
P450IIC9	Humano mp
P450IIC10	Pollo PB15
P450IIC11	Rata M-1, h
Subfamilia P450IID	
P450IID1	Rata db1, Humano db1
P450IID2	Rata db2
Subfamilia P450IIE (inducible por Etanol)	
P450IIE1	Rata j, Conejo forma 3a, Humano j
<u>P450III (inducible por Esterolde)</u>	
Solo una subfamilia	
P450IIIA1	Rata pen1
P450IIIA2	Rata pen2
<u>P450IV (inducible por Clofibrato)</u>	
Solo una subfamilia	
P450IVA1	Rata La
<u>P450XI (proteínas mitocondriales)</u>	
Subfamilia P450XIA	
P450XIA1	Bovino (y Humano) scc
Subfamilia P450XIB	
P450XIB1	Bovino (y Humano) 11β
<u>P450XVII (esteroides 17α-hidroxilasa)</u>	
Solo una subfamilia	
P450XVIIA1	Bovino (y Humano) 17α
<u>P450XIX</u>	
Solo una subfamilia	
P450XIXA1	Humano aron
<u>P450XXI (esteroides 21-hidroxilasa)</u>	
Solo una subfamilia	
P450XXIA1	Bovino (y Ratón, Humano) C21A
P450XXIA2	Bovino (y Ratón, Humano) C21B
<u>P450LI (planta P450)</u>	
Solo una subfamilia	
P450LIA1	Levadura lan
<u>P450CI (procariote P450)</u>	
Solo una subfamilia	
P450CIA1	<i>Pseudomonas putida</i> cam

de respuesta a determinado inductor. Existen, sin embargo, casos en que determinados citocromos P450 responden también a inductores típicos de otras familias.

Es además importante destacar que todos los citocromos P450 que se han clonado y secuenciado, ya sean de mamíferos, el P450 *lan* de levadura y el P450 *cam* de *Pseudomona*, presentan un dominio altamente conservado situado cerca del extremo COOH terminal. Se trata de una secuencia de 7 aminoácidos que contiene una cisteína y que formaría el hueco donde se acomodaría el grupo hemo para permitir la unión del Fe con dicha cisteína (Nebert *et al.*, 1987).

Los estudios realizados sobre los datos de las secuencias de 67 proteínas P450, parecen demostrar que, entre el residuo 180 y el 320, correspondería al dominio para la unión específica del sustrato, siendo esta zona la responsable de la alta divergencia entre los integrantes de las distintas familias.

3.2.5. Respuesta a la cicloheximida

La cicloheximida (actidiona, naromicina A) es una glutarimida producida por *Streptomyces griseus*. Se trata de la β -[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietil-glutarimida] (Kornfeld *et al.*, 1949). Es un inhibidor de la síntesis proteica para un amplio espectro de organismos que incluyen hongos, plantas superiores, mamíferos (Whiffen, 1948, 1950), algas y protozoos (Palmer y Maloney, 1955; Loefer y Matney, 1952). No tiene acción sobre organismos procarióticos, ni sobre ribosomas mitocondriales o de cloroplastos.

El mecanismo de acción de la cicloheximida se ejerce a través de la unión de la misma a la subunidad 60S de los ribosomas eucarióticos, inhibiendo la actividad de la peptidil transfe-

Introducción

rasa y bloqueando como consecuencia, el desplazamiento de los ribosomas sobre los RNA mensajeros (Vázquez, 1979).

Se han obtenido mutantes de diferentes organismos eucarióticos que son resistentes al tratamiento con cicloheximida (Sutton *et al*, 1978), y se ha demostrado que, en el caso de la cepa *cyh2* de *S. cerevisiae* (Fried y Warner, 1982; Kaufer *et al*, 1983), la resistencia es consecuencia de una alteración del gen estructural de la proteína ribosomal L29.

En ensayos realizados *in vivo*, con ratas tratadas con una dosis de cicloheximida capaz de inhibir al 97% de la síntesis proteica, se observó que se producía un aumento de hasta 6 veces en la proporción de determinados mRNAs (Kelly *et al*, 1987; Erns *et al*, 1978; Hofer y Sekeris, 1978). Esto fue relacionado con el efecto inhibitorio de la cicloheximida sobre la disociación dependiente de GTP de polisomas (Wettstein *et al*, 1964), lo cual promovería un aumento en la vida media de los mRNAs que se encontraban formando parte de dichos polisomas.

El tratamiento con cicloheximida produciría una disminución brusca de la síntesis proteica, hecho que lo diferencia del shock térmico, del tratamiento con puromicina o con análogos de aminoácidos, los cuales provocan una acumulación de proteínas anormales en el citoplasma.

Recientemente se ha reportado que la cicloheximida en ratas promovería la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Este proceso también se estimula en cultivos celulares de ratas tratadas con distintos agentes mitogénicos (Krieg *et al*, 1988). Se ha postulado que dichos ribosomas fosforilados presentaría ventajas para la iniciación de la traducción frente a los ribosomas no fosforilados (Duncan y McConkey, 1982; Burkard y Traugh, 1984).

3.2.5.1. Efecto de la cicloheximida sobre *Neurospora crassa*

Se ha observado que el efecto de bajas concentraciones de cicloheximida ($0,4\mu\text{M}$), produce una inhibición significativa del crecimiento en *Neurospora crassa*, el cual llega a un 75% cuando la concentración de cicloheximida es $2\mu\text{M}$ y a un 95% para una concentración $14\mu\text{M}$ (Hsu, 1963). Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la inhibición de la síntesis proteica en un cultivo estacionario de *Neurospora crassa* tratado con cicloheximida $2\mu\text{M}$, fue del 90% a los 60 min del agregado del antibiótico, produciéndose luego una recuperación gradual hasta que, a las 6 h de incubación la misma correspondía de un 30 a un 50% del valor inicial (Grotewold *et al*, 1987a).

Por otro lado, si un cultivo de *N. crassa* es pretratado durante 6 h con cicloheximida $2\mu\text{M}$, y luego se lo incuba con cicloheximida $10\mu\text{M}$, se induce una tolerancia al inhibidor, consistente en un incremento en la síntesis proteica de dos veces con respecto al cultivo tratado con cicloheximida $10\mu\text{M}$, sin pre-tratamiento (Grotewold *et al*, 1988).

Este fenómeno de tolerancia ya había sido descrito en el hongo *Sclerotium rolfii* (Sullia y Maria, 1985), y en *Candida maltosa* (Takagi *et al*, 1985), donde se observó que el tratamiento con cicloheximida produce una inhibición casi completa de crecimiento pero que, luego de un tiempo se alcanza los valores de la velocidad de la división celular previos al tratamiento con el antibiótico. Los ribosomas de *C. maltosa* "adaptados" mostraron ser insensibles a la cicloheximida en ensayos de traducción *in vitro* con mRNAs heterólogos, mientras que si los ribosomas provenían de un cultivo adaptado, pero que luego fue incubado en ausencia del antibiótico, estos ribosomas, se volvían sensibles a la cicloheximida.

Introducción

A partir de los resultados de los experimentos mencionados, se postuló la existencia de un factor (inducible por cicloheximida) capaz de modificar en forma reversible los ribosomas y que los hace aptos para la síntesis proteica, aún en presencia del antibiótico.

En condiciones ambientales adversas, muchos hongos responden con un mecanismo adaptativo que induce la síntesis de ciertas enzimas involucradas ya sea en la diferenciación sexual, o en el catabolismo. Algunas de estas enzimas también son inducidas por la inhibición de la síntesis proteica promovida por el tratamiento con cicloheximida.

Una de estas enzimas es la **tirosinasa**, responsable de la melanización característica producida durante la maduración de los peritecios y las ascosporas (Hirsch, 1954) en *Neurospora crassa*. Los niveles de **tirosinasa** en cultivos en fase logarítmica o estacionaria, crecidos en medio mínimo, son indetectables, pero cuando se inhibe la síntesis proteica, ya sea por el agregado de actinomicina D, puromicina o cicloheximida, se observa un incremento considerable de la actividad de **tirosinasa** (Horowitz *et al*, 1970b). La máxima inducción de la **tirosinasa** se obtuvo incubando por 72 hs con cicloheximida 2 μ M.

Otras condiciones que inducen la **tirosinasa** son: el ayuno de nutrientes (Horowitz y Shen, 1952; Horowitz *et al*, 1961), la inducción sexual por el agregado de macroconidias del tipo de cruzamiento opuesto (Cruz y Terenzi, 1981), y el agregado de análogos de aminoácidos (Horowitz *et al*, 1970a).

Estudios posteriores demostraron que la cicloheximida produce la síntesis *de novo* de la **tirosinasa** (Katan *et al*, 1975).

Otra enzima que también es inducida por la cicloheximida es la **lacasa** (Fröehner y Eriksson, 1974). Esta enzima es una fenol oxidasa que se acumula en el medio extracelular y cuyo gen

Introducción

fue clonado recientemente (German *et al.*, 1988). En presencia de cicloheximida 2 μ M, la máxima actividad de esta enzima se alcanza a las 72 hs de cultivo (Grotewold *et al.*, 1988a).

También una L-aminoácido oxidasa es inducida por la cicloheximida (Horowitz, 1965), por ayuno de nutrientes o por entrada al ciclo sexual (Prade y Terenzi, 1985).

La ubiquitina de *Neurospora crassa* fue clonada en nuestro laboratorio, y demostró también ser inducida por cicloheximida (Taccioli *et al.*, 1989a). Este polipéptido mediaría, vía conjugación a proteínas intracelulares, la degradación selectiva de las mismas (Finley y Varshavsky, 1985).

Recientemente, se ha descrito en nuestro laboratorio la inducción de varios mRNAs por tratamiento de un cultivo de *N. crassa* estacionario durante 24 o 48 hs con cicloheximida 2 μ M (Aisemberg *et al.*, 1988). Se demostró también que, ya a las 6 hs de tratamiento con cicloheximida 2 μ M, aparecían por lo menos 4 polipéptidos de 99 kD, 70 kD, 31 kD y 27 kD, respectivamente (Grotewold *et al.*, 1988), y que esa inducción es a nivel transcripcional (Figura 4).

Al estudiar la respuesta a la puromicina de *Neurospora crassa* se comprobó que al alcanzar una inhibición de la síntesis de proteínas del 30% promovida por el agregado del antibiótico, en una concentración 30 μ M, se indujeron los polipéptidos de 99 kD y 31 kD. Las otras dos proteínas (70 kD y 27 kD) no mostraron ser inducidas en estas condiciones (Grotewold *et al.*, 1988).

Los genes que codifican los péptidos de 31 kD y 27 kD fueron clonados y caracterizados en este laboratorio (Grotewold *et al.*, 1988). El gen que codifica para la proteína de 70 kD (cip 70, *cicloheximide inducible protein*), también fue clonado en este laboratorio (Aisemberg *et al.*, 1988), y se lo denominó CI-1. Una descripción más detallada del mismo se brinda en la sección 3.2.5.2.

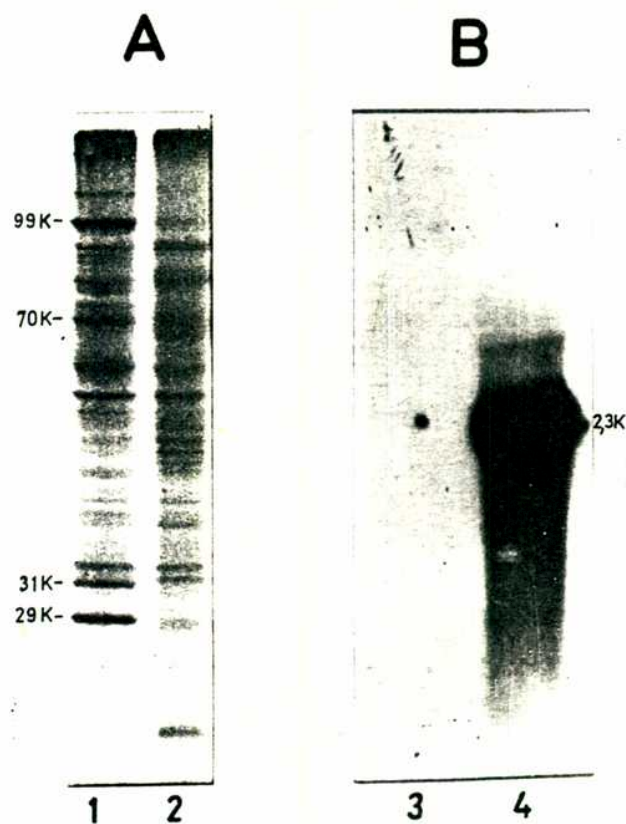


Figura 4: Respuesta de *Neurospora crassa* a cicloheximida 2 μ M

- A) 12% PAGE-SDS de proteínas marcadas *in vivo* con L³⁵-S metionina. Cultivos de 60 hs de crecimiento fueron incubados por 2 hs con L³⁵-S metionina, luego del tratamiento por 6 hs con (carril 1) o sin (carril 2) cicloheximida 2 μ M. Exposición 7 días.
- B) *Northern blot* de un cultivo de *N. crassa* incubado por 6 hs con (carril 2) o sin (carril 1) cicloheximida 2 μ M, hibridado con la sonda pGEM2-30A (codifica para el mRNA de la proteína de 70 kD). Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.

3.2.5.2. Características del gen CI-1

Como se ha mencionado anteriormente, en nuestro laboratorio se clonó un fragmento de DNA que contenía secuencias complementarias al mRNA de 2,3 kb que codifica para la proteína cip 70 (Aisemberg *et al*, 1987a).

Fue así que se clonó un fragmento de 4,4Kb que contenía por lo menos parte del gen que codifica para la cip 70. Como ya se mencionó anteriormente, a este gen se lo denominó CI-1. El mapa de restricción del plásmido que lo contenía pGEM2-30A se muestra en la figura 5.

Existe en el genoma de *Neurospora crassa*, una copia única de este gen (Aisemberg *et al*, 1989).

Estudios del patrón temporal de transcripción del CI-1, demostraron que a las 6 hs de inducción con cicloheximida, el transcripto de 2,3Kb se revelaba con mucha mayor intensidad respecto del nivel existente en micelios no inducidos por cicloheximida (Aisemberg *et al*, 1987). Por ensayos de hibridación-selección y luego la traducción *in vitro* de los RNAs seleccionados, se comprobó que el pGEM2-30A contiene secuencias complementarias al mRNA que codifica para la cip70, del mismo experimento se concluyó que esta proteína no sufriría modificaciones post-traduccionales ya que el producto de la traducción *in vitro* con un lisado de reticulocitos de conejo tiene la misma movilidad (70 kD) que la proteína sintetizada *in vivo* (Aisemberg *et al*, 1987).

En cuanto a la inducción del gen CI-1 en otras condiciones de stress, ni el shock térmico, ni el cultivo en medios pobres en fuentes de carbono y nitrógeno por períodos prolongados (de 4 a 8 días), provocaron un aumento en su transcripción (Aisemberg *et al*, 1989).

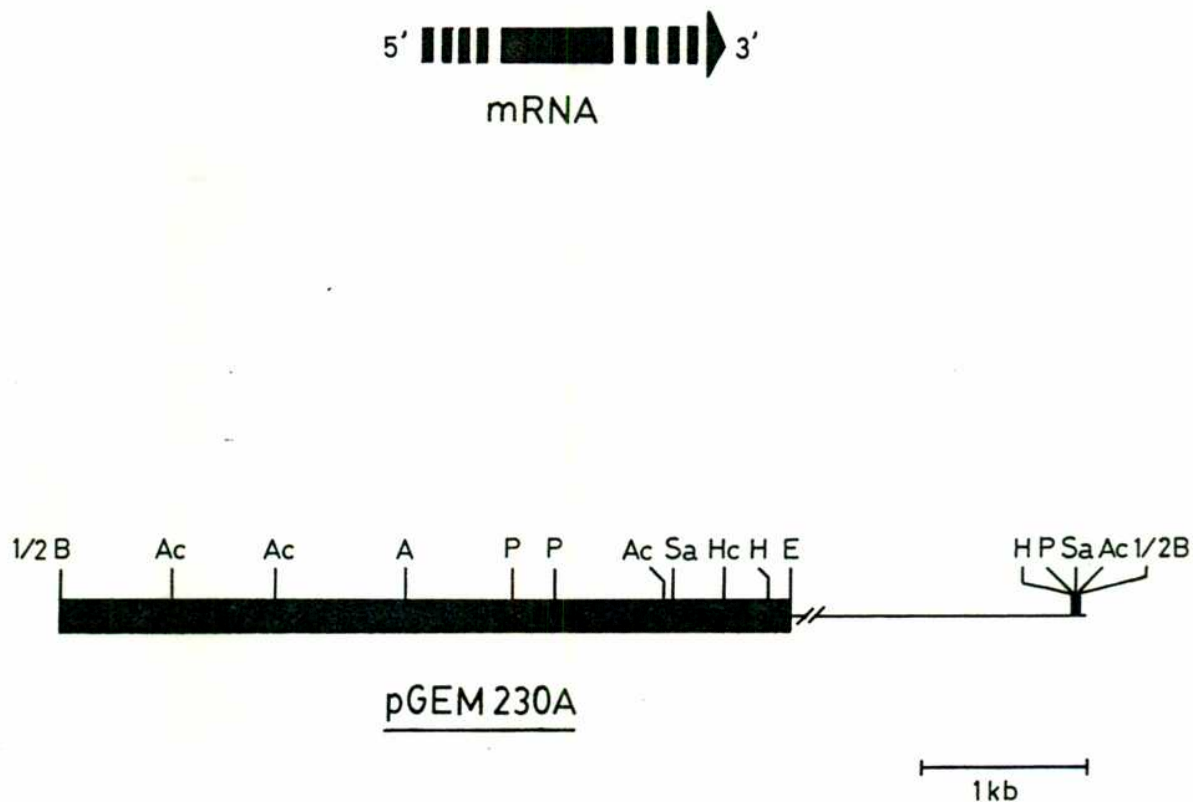


Figura 5: Mapa de restricción del pGEM2-30A

En la parte superior de la figura está indicada la polaridad del mRNA deducida a partir de datos de Aisemberg *et al* (1987a).

B: BamHI; Ac: AccI; A: AvaI; P: PstI; Sa: SacI; Hc: HincII;
H: HindIII; E: EcoRI.

Introducción

Entre otras funciones, se le ha asignado a las poliaminas un rol fundamental asociado a la biosíntesis de proteínas. Se estudió entonces el efecto de la depleción de poliaminas causado por la inhibición de la ornitina decarboxilasa (ODC)(difluorometilornitina), en la biosíntesis de las mismas (Grotewold *et al.* 1988). Se comprobó entonces, que el tratamiento de un cultivo de *Neurospora crassa* estacionario con DEMO 2,5mM durante 24 hs, fue capaz de inducir la expresión del gen CI-1.

Por último, se encontró que el gen CI-1 presentaría secuencias homólogas en DNA genómico de *Escherichia coli*, trigo, *Saccharomyces cerevisiae* y humano (Aisemberg *et al.*, 1989).

3.3. **OBJETIVOS DE ESTA TESIS**

Se han descrito en la Introducción, distintas condiciones de stress que provocan, como respuestas adaptativas en *Neurospora crassa*, la inducción a nivel transcripcional de determinados genes. Las funciones de dichos genes son, en la mayoría de los casos, desconocidas.

El objetivo de esta tesis consiste en la caracterización a nivel molecular del gen CI-1 de *Neurospora crassa*, y la obtención de la secuencia aminoacídica de su producto para ser sometida a comparación de homologías con las secuencias de otras proteínas contenidas en bancos de datos. Por medio de esto, se pretende obtener evidencias que ayuden a la comprensión del posible rol fisiológico de dicha proteína.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. REACTIVOS

acrilamida.....	BRL
agar.....	Difco o Merck
agarosa.....	BRL
alcohol isoamílico.....	Merck
bisacrilamida.....	BRL
cicloheximida.....	Sigma
cloroformo.....	Merck
compuestos radioactivos.....	New England Nuclear Corp.
etanol absoluto.....	Merck
extracto de levadura.....	Difco o Merck
filtros de nitrocelulosa (BA85).....	Schleicher & Schüll
formaldehído.....	Carlo Erba
formamida.....	Carlo Erba
Gene Screen.....	New England Nuclear Corp.
IPTG.....	Sigma
kit de <i>random priming</i>	Amersham
kit de secuenciación (Sequenasa™).....	USB
marcadores de peso molecular para geles de agarosa (1Kb DNA LADDER).....	BRL
oligo dT celulosa.....	Sigma
película Polaroid 667.....	Polaroid
película RX Cutix RP1.....	Agfa Gevaert
polietilenglicol.....	Sigma
polivinilpirrolidona.....	Sigma
poly A sintético.....	Miles
proteínasa K.....	Sigma
RNAsin.....	Promega Biotec
seroalbúmina bovina.....	Sigma

Materiales y Métodos

triptona.....Difco o Merck
Tris.....Sigma
X-gal.....Sigma

4.2. USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICADORAS

4.2.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas pertenecían en su mayoría a las siguientes empresas: New England Biolabs, Inc.; Boehringer Mannheim y Appligene.

Se utilizaron para cada ensayo de restricción 5U de enzima/ μ g de DNA, teniendo en cuenta no superar una concentración final de glicerol del 5% (V/V).

Las incubaciones se hicieron por 2 hs a 37°C, salvo en el caso de SmaI en el cual la incubación se hizo a 25°C.

Los buffers de incubación utilizados para cada enzima se especifican en las Tablas II y III.

Tabla II: Buffers de restricción correspondientes a cada enzima

Buffers	A	B	L	M	H
	AccI	AvaI	KpnI	HindII(HincII)	ClaI
	AluI	BamHI		SnaBI	EcoRI
	SacI(SstI)	HindIII		SphI	NcoI
	SmaI	StuI			PstI

Materiales y Métodos

Tabla III: Composición de los buffers para enzimas de restricción

Componente del buffer	A	B	L	M	H
Tris-Acetato	30				
Tris-ClH		10	10	10	10
Mg-acetato	10				
MgCl ₂		5	10	10	10
K-acetato	66				
NaCl		100		50	100
ditioeritritol (DTE)			1	1	1
ditiotreitol (DTT)	0,5				
2-mercaptoetanol		1			
pH a 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Las cantidades indican concentraciones milimolares.

En los casos en que se realizó la digestión de un DNA con dos enzimas que utilizaban buffers distintos, se digirió con la primera enzima, luego se precipitó con 1/10 de vol de AcONa 3M pH (5,2) y 2 vol de etanol, se dejó 15 min a -70°C , se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se resuspendió en el buffer adecuado para digerir con la segunda enzima.

4.2.2. Enzimas modificadoras

4.2.2.1. Fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP)

Se utilizó CIP de Boheringer Mannheim ($1\text{U}/\mu\text{l}$) en una concentración de $50\text{mU}/\mu\text{mol}$ de extremos 5 min de DNA. El buffer de reacción fue 50mM Tris-ClH (pH 9,0), 1mM MgCl_2 , $0,1\text{mM}$ ZnCl_2 y 1mM espermidina. Volumen total $50\mu\text{l}$.

Se incubó 30 min a 37°C , se volvió a agregar CIP ($50\text{mU}/\mu\text{mol}$ de extremos 5 min) y se incubó nuevamente 30 min a 37°C .

Se detuvo la reacción llevando a una concentración final de 10mM Tris-ClH (pH 8,0), $0,1\text{mM}$ NaCl y 1mM EDTA.

Se extrajo la enzima con 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1), 1 vol de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con 1/2 vol AcONH_4 7,5M + 2 vol etanol.

Se dejó 15 min a -70°C y se microcentrifugó a 12000 rpm por 5 min.

4.2.2.2. T4-DNA ligasa

Cada ensayo de ligado se llevó a cabo con 1U de DNA ligasa de T4, en un buffer conteniendo 50mM Tris-ClH (pH 7,8), 10mM MgCl₂, 20mM DTT, 1mM ATP y 50µg/ml BSA, en un volumen de reacción de 10µl.

Se incubó, en el caso de ligar extremos cohesivos durante 4 hs a 16°C y en los casos de extremos romos o romo y cohesivo durante 14 hs a 20°C.

4.2.2.3. DNA polimerasa I (Fragmento de Klenow)

En los casos en que se la utilizó para convertir extremos 5' protruyentes en romos, el ensayo se realizó en buffer M, se agregaron los 4 deoxinucleótidos en una concentración final de 100µM cada uno y 1U de DNA polimerasa I (fragmento de Klenow).

Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

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

4.3.1. Cepas de *Neurospora crassa*

Se utilizaron las cepas St. Lawrence 74A (*wild type*) y la M246 (*ga2-*, *arom9-*).

4.3.2. Condiciones de cultivo

En el caso de la cepa St. Lawrence 74A los cultivos se hicieron en medio mínimo N de Vogel (Vogel, 1956), suplementado con sacarosa en una concentración final del 0,5%. Para los cultivos de la cepa M246 las condiciones fueron las mismas que para la cepa salvaje más el agregado de: L-Phe en una concentración final de 80µg/ml; L-Tyr, 80µg/ml; L-Trp, 80µg/ml; ácido para-amino benzoico, 2µg/ml e inositol, 0,2mg/ml (Lambowitz, 1983).

En ambos casos se inocularon 10^5 conidias por ml de cultivo y se incubó en un agitador de aire por 60 horas a 30°C y 200 rpm, para luego proceder a los distintos tratamientos.

4.3.3. Inducción por cicloheximida

A partir de una solución madre de cicloheximida (10mg/ml, 40mM) se le agregó a cada cultivo el volumen necesario para llevarlo a una concentración final de la misma de 2µM. Luego se continuó la incubación por 6 hs y transcurrido ese tiempo los micelios se cosecharon por filtración, se lavaron abundantemente con agua deionizada y se guardaron a -70°C hasta su utilización.

4.3.4. Ayuno de aminoácidos aromáticos

Una vez transcurridas las 60 hs de crecimiento en medio de cultivo suplementado con L-Phe, L-Tyr, L-Trp, PAB e inositol, los micelios se cosecharon por filtración en forma estéril, se lavaron con medio de cultivo sin aminoácidos aromáticos y luego se volvieron a un medio suplementado o no, para continuar la in-

Materiales y Métodos

incubación por 12 o por 24 hs. Una vez concluido el tiempo de incubación, se cosecharon por filtración, se lavaron con H₂O deionizada y se guardaron a -70°C.

4.4. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

4.4.1. Preparación de *Escherichia coli* MC1061 competentes y transformación de las mismas

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

4.4.1.1. Preparación de *E. coli* MC1061 competentes

La preparación de células competentes susceptibles de ser transformadas (Mandel e Higa, 1970) se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

Se partió de un cultivo de *E. coli* MC1061 crecido en LB a 37°C hasta A₆₀₀=0,4.

Se cosecharon las bacterias centrifugando por 10 min a 7000 rpm y 4°C.

Se resuspendieron suavemente en 1/10 de vol de CaCl₂ 30mM frío y se dejaron por 30 min en hielo.

Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 1/50 de vol de CaCl₂ 100mM-15% glicerol.

Se congeló rápidamente en N₂ líquido y luego se guardaron a -70°C por un tiempo máximo de 14 días.

4.4.1.2. Transformación de *E. coli* MC1061 con plásmidos

Se descongeló un tubo con MC1061 competentes rápidamente y se adicionaron 40µl de las mismas a un tubo eppendorf que ya contenía el DNA plasmídico. Se dejó en hielo por 20 min y se calentó por 2 min a 42°C (shock térmico). Luego se le agregó 1ml de LB y se dejó 1 h a 37°C. Una vez concluida la recuperación, se centrifugó a 12000xg 4 min y se resuspendió en 100µl de LB que fueron rastrillados sobre una placa de LB-agar-ampicilina 100µg/ml.

4.4.2. Preparación de *E. coli* JM101 competentes y transformación de las mismas

Para amplificar el fago M13 (Messing, 1983) ya sea salvaje o recombinante, se utilizó la cepa de *E. coli* JM101.

4.4.2.1. Preparación de *E. coli* JM101 competentes

De un inóculo crecido a partir de una colonia individual seleccionada en medio mínimo (por litro: Na₂PO₄H 5g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0,5g; NH₄Cl 1g; MgSO₄ 2mM; glucosa 0,2%; CaCl₂ 0,1mM adicionado con tiamina 0,5µg/ml) se tomaron 2ml para reinocular 100ml de LB los cuales fueron crecidos durante 90 min a 37°C con mucha agitación.

Luego se cosecharon las bacterias centrifugando a 2500 rpm por 10 min y a 4°C. Se resuspendieron las mismas en 1/2 vol de CaCl₂ 50mM frío.

Las bacterias resuspendidas se dejaron en hielo durante 20 min y se volvió a centrifugar a 2500 rpm por 10 min y a 4°C.

Materiales y Métodos

Se resuspendieron en 1/10 de volumen de CaCl₂ 50mM frío y se dejaron en hielo hasta su utilización.

4.4.2.2. Transformación de *E. coli* JM101 con DNA doble cadena de fago M13

Se agregaron 250µl de JM101 competentes a un tubo Eppendorf que ya contenía el DNA. Se dejó 40 min en hielo y luego se calentó por 2 min a 42°C (shock térmico). Acto seguido se agregaron 200µl de JM101 provenientes de un cultivo estacionario, 20µl de una solución de IPTG 10mg/ml, 40µl de una solución de X-Gal 2% (P/V) disuelto en dimetilformamida y 3,5ml de LB-top (LB+ 0,75% agarosa a 55°C). Esta mezcla se vertió sobre una placa de 9cm de diámetro con 10ml de LB bottom (LB+1,5% de agar). Al cabo de 12 hs a 37°C se visualizaron placas de retardo de crecimiento claras (recombinantes) y azules (wild type).

4.4.3. Infección de *E. coli* Y1090 con fago λgt11

Para el plaqueo y la amplificación de los fagos λgt11 recombinantes se utilizó la cepa Y1090. El inóculo de Y1090 se cultivó en presencia de ampicilina 100µg/ml ya que esta cepa contiene el plásmido pMC9 el cual le otorga resistencia a la misma. Luego se agregó en un tubo Eppendorf estéril un vol de suspensión de fagos en SM (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 0,1M, MgSO₄ 10mM y gelatina 0,01%) y un vol de cultivo de Y1090 estacionario, se dejó sin agitación durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células infectadas, se utilizaron como inóculo para medio líquido o se plaquearon de la siguiente manera: se le agregaron 3,5ml (para placa de Petri de 9cm de diámetro) u 8ml (para placa de Petri de 15cm de diámetro) de LB-top y se vertió sobre LB-bottom.

4.5. PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

4.5.1. PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

El método empleado para la purificación de plásmidos fue el de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979) modificado.

4.5.1.1. Purificación en pequeña escala (miniprep)

Las minipreparaciones se realizaron a partir de 5ml de cultivo crecido en LB a 37°C durante toda la noche. Se cosecharon las bacterias por centrifugación y se resuspendieron en 100µl de solución I (Tris-HCl 25mM (pH 8,0), EDTA 10mM y glucosa 50mM). Se dejaron las bacterias así resuspendidas 5 min en hielo y se agregaron 200µl de solución II (NaOH 0,2N y SDS 1%, preparada en el momento de usar), se dejó en hielo entre 5 y 10 min y se le agregaron 150µl de solución III (NaAcO KAcO 5M, pH 4,8, que se prepara agregando a 60ml de KAcetato 5M, 11,5ml de ácido acético y 28,5ml de H₂O), se agitó por inversión y se dejó 10 min en hielo. Luego se centrifugó en microcentrífuga durante 5 min, se tomó el sobrenadante y se le agregó 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO 3M (pH 5,2) y 2 vol de etanol, se dejó 15 min a -70°C y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se resuspendió el precipitado en 200µl de H₂O y se le agregó RNasa A en cantidad suficiente para llegar a una concentración final de 0,1µg/ml; se incubó por 30 min a 37°C y se agregó 1/10 de volumen de NaAcO 3M (pH 5,2) y 300µl de etanol; se dejó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm en una microcentrífuga. Se resuspendió en 20-40µl de H₂O.

4.5.1.2. Purificación en gran escala (maxiprep)

En este caso se partió de 500ml de cultivo, el cual se cosechó centrifugando a 10000 rpm por 5 min y a 4°C, se resuspendió en 8ml de solución I, se dejó 5 min a temperatura ambiente y se le agregaron 15ml de solución II, se dejó 10 min en hielo tras lo cual se le adicionaron 12ml de la solución III fría; después de dejar 10 min en hielo se centrifugó a 15000 rpm por 30 min y a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio.

Al filtrado se le agregaron 0,6 vol de isopropanol, se dejó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min y a temperatura ambiente. Luego se resuspendió el precipitado en 7ml de TE (Tris-HCl, 10mM, pH 8 y EDTA 1mM), y se hizo una extracción con 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1) y 1 de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1); a la fase acuosa se le agregaron luego 500µl de BrEt (10mg/ml), se dejó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 25°C por 5 min a 5000 rpm. Al sobrenadante se le agregó 1g de CsCl por gramo de solución y se ultracentrifugó a 20°C por 40 hs a 36000 rpm. Se separó cuidadosamente la banda plasmídica y se la extrajo varias veces con butanol saturado en H₂O. Luego se dializó durante 14 hs contra TE y se precipitó el DNA con 1/10 de volumen de NaAcO 3M, pH 5,2 y 2 vol de etanol.

4.5.2. PURIFICACION DE DNA SIMPLE CADENA DE FAGOS M13 RECOMBINANTES

Se utilizó el protocolo descrito por Messing (1983). Se partió de una placa de retardo de crecimiento clara y se inocularon 2ml de LB; se agregaron luego 20µl de JM101 provenientes de un cultivo fresco crecido de 8 a 10 hs (D.Osso. aproximadamen-

Materiales y Métodos

te 1,2). Se incubó durante 4 horas y media a 37°C con mucha agitación y al cabo de este tiempo se cosecharon las bacterias por centrifugación. El pellet de bacterias se resuspendió en 100µl de LB y se destinó, ya sea como stock de células para nuevas purificaciones del fago recombinante (en este caso se guardó a -20°C en 50% de glicerol), o para la purificación, a partir de dicho pellet de bacterias, de DNA del fago recombinante doble cadena (forma replicativa) para su posterior análisis con enzimas de restricción. El sobrenadante se volvió a centrifugar en un tubo Eppendorf a 12000 rpm, y se tomaron 1,2ml a los cuales se le agregaron 200ml de PEG 20%-NaCl 2,5M.

Se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Luego se centrifugó 10 min a 12000xg y se descartó el sobrenadante teniendo la precaución de seguir adelante con el protocolo siempre que existiera un pellet visible. Una vez eliminado el sobrenadante, se volvió a centrifugar para descartar totalmente el sobrenadante que pudiera quedar en las paredes del tubo (de la eliminación del PEG depende la calidad de la secuenciación que se vaya a realizar, ya que el mismo inhibe a la enzima T7 DNA polimerasa). Se resuspendió el pellet en 100µl de TE y se hicieron dos extracciones sucesivas con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1); en la última extracción se tomó la fase acuosa, cuidando de no contaminar con la interfase y se precipitó el DNA simple cadena agregando 300µl de una mezcla de etanol y NaAcO 3M (pH 5,2) en una relación 25:1 (V/V). Se dejó durante 1 hora a -70°C o durante toda la noche a -20°C, se centrifugó a 12000xg por 10 min y se resuspendió en 25µl de H₂O. El rendimiento es aproximadamente 3µg DNA simple cadena por purificación.

4.5.3. PURIFICACION DE DNA DE FAGOS λ gt11 RECOMBINANTES

El protocolo que sirvió de guía para esta purificación fue el de Yamamoto *et al* (1970).

Un cultivo de 5ml de Y1090 creció en LB suplementado con maltosa en una concentración final de 0,2% durante 8-12 hs a 37°C. Luego se cosecharon las bacterias por centrifugación a 7000 rpm por 10 min y 4°C y se resuspendieron en un volumen tal de SM (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; NaCl 0,1M; MgSO₄ 10mM y gelatina 0,01%), como para tener 300µl de una suspensión de 2x10⁹ bacterias (el número de bacterias se estima teniendo en cuenta que 1 OD₅₅₀=8x10⁸ bacterias/ml). A esta suspensión se le agregaron 1x10⁷ unidades formadoras de placas (ufp) del fago a purificar, se incubó durante 20 min a 37°C sin agitación y se utilizó esta suspensión para inocular 500ml de LB suplementado con MgSO₄ en una concentración de 10mM final.

Una vez transcurridas 9-12 hs con agitación intensa a 37°C, se le agregaron 2ml de cloroformo y se incubó durante 30 min más con agitación a 37°C. Transcurrido este tiempo, se verificó la lisis comparando con una alícuota del cultivo que se apartó previo al agregado de cloroformo. De percibir lisis (es típica la diferencia en la turbidez y la aparición característica de agregados de células rotas), se agregó DNasa y RNasa como para obtener una concentración final de 1µg/ml respectivamente, se dejó durante 30 min a temperatura ambiente, se agregó NaCl hasta una concentración final de 1M y se dejó durante 1 h en hielo.

Una vez transcurrida la hora a 0°C, se centrifugó a 4°C a 10000 rpm por 10 min, y al sobrenadante se le agregó PEG sólido muy lentamente y a temperatura ambiente, hasta llegar a una concentración final del 10%. Se volvió a dejar 1 hora en hielo, y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C, se descartaron los sobrenadantes (se trató de secar bien las paredes del tubo), y se

Materiales y Métodos

resuspendió en 8ml de SM para hacer luego una extracción con cloroformo, se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm, a 4°C y la fase acuosa se ultracentrifugó a 39000 rpm por 2 h a 4°C en un rotor 50Ti.

El pellet de fagos se resuspendió en 0,5ml de SM y se llevó a una concentración final de EDTA 20mM, proteinasa K, 50µg/ml y SDS 0,5%, luego se incubó durante 1 hora a 65°C y se hizo una extracción con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1) y una con Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), tras lo cual se precipitó el DNA con 1/10 de volumen de NaAcO 3M, pH 5,2 y 2 vol de etanol. Se dejó 15 min a -70°C y se precipitó por centrifugación a 12000xg durante 5 min. El pellet se resuspendió en 200µl de H₂O y se agregaron 2µl de RNAsa A 10mg/ml, se incubó por 30 min a 37°C y se agregaron 10µl de NaAcO 3M, pH 5,2 y 300µl de etanol. Se dejó 10 min a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 min a 12000xg. El pellet se resuspendió en H₂O y el rendimiento fue de aproximadamente de 120µg.

4.5.4. PURIFICACION DE RNA DE *Neurospora crassa*

4.5.4.1. Purificación de RNA total

El método empleado fue el de N.H. Giles (Reinert *et al*, 1981) modificado.

Las precauciones que se tomaron para evitar la acción de RNAsas fueron las siguientes:

El material de vidrio fue horneado por 2 hs a 180°C.

Los buffers utilizados así como el material de plástico fueron autoclavados por 20 min a 140°C.

En todo momento se trabajó con guantes.

Materiales y Métodos

El micelio congelado a -70°C se molió en presencia de N_2 líquido y luego se lo liofilizó a temperatura ambiente, tras lo cual, se lo utilizó inmediatamente o se lo dejó a -70°C hasta su uso.

El micelio molido y liofilizado se virtió sobre una mezcla 1:1 de EB (NaAcO 0,3M (pH 5,2); EDTA 10mM y SDS 4%) y Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1). La relación utilizada fue de 7,5ml de EB por gramo de micelio seco. Se homogeneizó luego con un desintegrador de tejidos Ultra-Turrax durante 5 min a máxima velocidad y se centrifugó por 5 min a $10000\times g$ y a temperatura ambiente. Se extrajo la fase acuosa y se hizo una extracción con 1 vol de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1) y a la nueva fase acuosa resultante, se le agregó 1/20 de volumen de SDS 10% y se llevó a una concentración final de proteinasa K de $100\mu\text{g/ml}$, se incubó por 1 hora a 37°C tras lo cual se hizo una extracción con 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó 10 min a $10000\times g$ y la fase acuosa se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO 3M, pH 5,2 y 2 vol de etanol previamente enfriado a -70°C .

Se dejó a -70°C por 15 min, se centrifugó 10 min a $12000\times g$ y 4°C y el precipitado se resuspendió en 2/3 de volumen (de EB usado originalmente) de H_2O . Se procedió luego a una precipitación diferencial, agregando 3 vol de NaAcO 4M (pH 5,2) y se dejó 30 min en hielo, se centrifugó 20 min a $15000\times g$ y el precipitado se disolvió en H_2O para luego guardarlo a -70°C . El rendimiento fue aproximadamente 10mg de RNA total por gramo de micelio seco.

4.5.4.2. Purificación de mRNA (polyA⁺)

El enriquecimiento en mRNA se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna de oligodT-celulosa (Aviv y Leder, 1972).

Se utilizaron columnas de 1ml de volumen asentado y respetando las mismas precauciones que se tomaron para la purificación de RNA total.

Se equilibró la columna con 5 vol de buffer de carga (BC)(Tris-HCl 20mM, pH 7,6; LiCl 0,5M; EDTA 1mM; y SDS 0,1%). Se calentó el RNA total a 65°C por 5 min (de manera de desestabilizar la estructuras secundarias), se enfrió rápidamente en hielo, tras lo cual se le agregó 1 vol de BC 2x para luego sembrarlo en la columna.

El percolado contiene mayoritariamente RNA ribosomal. Luego se lavó la columna con 10 vol de buffer de lavado (BL) (Tris-HCl, pH 7,6; LiCl 0,1M; EDTA 1mM; y SDS 0,1%). La elución del RNA poly A⁺ se realizó con H₂O bidestilada libre de RNAsas. Se precipitó el RNA con 1/10 de volumen de NaAcO 3M (pH 5,2) y 2,5 vol de etanol. Se dejó a -70°C por 15 min y se centrifugó a 12000xg por 10 min y a 4°C; se disolvió el precipitado en H₂O y se guardó a -70°C.

La columna se regeneró con 3 vol de H₂O, 3 vol de NaOH 0,1M y luego se lavó con H₂O hasta llegar a pH neutro, guardando las columnas a 4°C.

El RNA polyA⁺ contiene aproximadamente un 50% de rRNA y representa un 2% del RNA total.

4.6. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

4.6.1. Cuantificación de RNA

El método utilizado fue el descrito por Schneider (1957) y se basa en una degradación ácida de los residuos de ribosa y la posterior cuantificación de los mismos por su reacción con orcinol en presencia de FeCl_3 . A 330 μl de solución de RNA se le agregaron 670 μl del reactivo preparado en el momento: orcinol 1% (P/V), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5% (P/V) en HCl. Se incubó durante 20 min a 100°C, tras lo cual se dejó la muestra 5 min en hielo para luego medir densidad óptica a 660nm. Simultáneamente se hizo una curva de calibración con polyA sintético, 1 OD₆₆₀ equivalen aproximadamente a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA.

4.6.2. Cuantificación de DNA

Para cuantificar DNA se utilizaron dos métodos. El primero consistió en medir absorbancia a 260nm, teniendo en cuenta que 1 OD₂₆₀ equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA. El segundo, utilizado en la mayoría de los casos, consistió en correr en un minigel de agarosa la muestra a cuantificar junto con muestras de DNAs de masa conocida, y comparar las intensidades de la fluorescencia producida por la incidencia de luz ultravioleta sobre los DNAs previamente teñidos con BrEt.

4.7. ANALISIS DE COMPLEMENTARIEDAD DE CLONES SIMPLE CADENA DEL FAGO M13 RECOMBINANTE (C-Test)

El método se basa en el retardo de la migración en un gel de agarosa 0.8% de un DNA simple cadena de M13 producido por la formación de un híbrido doble cadena con otro DNA simple cadena que contenga un inserto de secuencia complementario al primero.

Se mezclaron en un tubo Eppendorf 20µl del sobrenadante de un cultivo destinado a la preparación de DNA simple cadena de un fago M13 recombinante A con 20µl de sobrenadante de un fago M13 recombinante B. Como controles se agregaron 2 tubos Eppendorf conteniendo 20µl de SSC 1X y 20µl de sobrenadante de A y de B, respectivamente.

Se agregó a los 3 tubos 1µl de SDS 2%, 50µl de vaselina líquida y se calentó por 90 min a 65°C, tras lo cual se agregaron a cada tubo 5µl de BS (buffer de siembra). Posteriormente, se sembraron en un gel de agarosa 0,8%, 15µl de cada muestra, y se corrió la electroforesis aplicando un campo eléctrico de 5V/cm. Finalizada la misma, se tiñó el gel por 20 min en una solución de BrEt 0,5µg/ml y se fotografió. Se comparó la movilidad relativa de las muestras. El retardo respecto de los controles indica la existencia de secuencias de DNA complementarias.

4.8. **SEPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA**

4.8.1. **Electroforesis de DNA y transferencia a membranas
(Southern blot)**

La electroforesis en geles de agarosa de preparaciones de DNA se realizó en buffer TAE 1x (TAE 50x:Tris-ácido acético 2M, pH 8,0; y EDTA 50mM).

Previo al sembrado del gel, se le agregó a cada muestra 1/3 de volumen de BS (buffer de siembra)(buffer TAE 3x; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,25%), y se llevó a cabo la electroforesis aplicando un campo eléctrico de 5V/cm. Una vez concluida la corrida electroforética, se tiñó el gel con una solución de BrEt 0,5µg/ml durante 20 min. En el caso de los minigeles o de los geles preparatorios (ver más adelante), se incluyó BrEt en una concentración de 0,5µg/ml en la preparación del gel (Maniatis *et al*, 1982).

Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta de 300nm usando una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 667. En estas condiciones se pueden detectar hasta 10mg de DNA en una única banda de 5mm de ancho (Sharp *et al*, 1973).

Solamente en el caso de DNA genómico y de fagos λ gt11 recombinantes, se pretrató el gel durante 10 min con una solución de HCl 0,25N (favorece la transferencia de fragmentos grandes). Luego, el procedimiento fue el mismo para todos los geles independientemente de cuál fuera el origen del DNA, y consistió en tratar el gel con una solución de NaOH 0,2N y NaCl 0,6M por 30 min y luego se hicieron 3 lavados de 20 min cada uno con buffer fosfato de sodio 0,025M, pH 6,5 (para 1 litro 10X: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 26,72 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15,59 g).

Materiales y Métodos

A continuación se transfirió el DNA a un filtro de Gene Screen por capilaridad, según el método de Southern (1975) en buffer fosfato de sodio 0,025M, pH 6,5, durante 12 hs. Luego se horneó la membrana a 80°C por 2 h.

Como marcadores de peso molecular se usaron 1KB DNA Ladder (BRL) que tiene fragmentos de los siguientes tamaños (pb): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1635, 1018, 516/506, 394, 344, 298, 220, 200, 154, 142 y 75; fago λ digerido con AvaIII, con fragmentos de tamaños (pb): 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 372, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 23, y por último el plásmido pGEM1BH digerido con HinfI, con fragmentos de tamaños (pb): 1198, 517, 468/420, 396, 354, 79, 75, 65, 40, 36.

Para conocer el tamaño de una banda de DNA determinada, se corrió en un gel de agarosa, la muestra incógnita y alguno de los marcadores de peso molecular descriptos más arriba. Luego se estimó el tamaño de la misma, sabiendo que, la movilidad de una banda es proporcional al logaritmo del peso molecular de la misma (Helling, 1974).

4.8.2. Purificación de fragmentos de DNA por electroforesis en geles de agarosa preparativos

Para purificar un fragmento de DNA determinado, se corrió previamente una electroforesis en un gel de agarosa que contenía BrEt en una concentración de 0,5 μ g/ml. Una vez concluida la corrida, se extrajo del gel el taco de agarosa que incluía a la banda de interés, y se depositó sobre un pocillo (construido en otro gel) que estaba recubierto por una membrana de diálisis. A continuación, se procedió a la electroelución del fragmento de

Materiales y Métodos

DNA del taco de agarosa, aplicando un campo eléctrico de 5V/cm, y por un tiempo que variaba entre 45 y 90 min, según el tamaño de la banda a extraer.

Luego se eluyó el fragmento de DNA de la membrana de diálisis, haciendo 3 lavados con 150µl de TE. Tras lo cual se hicieron tres extracciones con butanol, una extracción con 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1), una con 1 vol de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), y se precipitó agregando 1/2 vol de NH₄AcO 7,5M y 2 vol de etanol, se dejó 15 min a -70°C y se centrifugó por 5 min a 12000xg. Luego se resuspendió en H₂O y se guardó a -20°C hasta su uso.

4.8.3. Electroforesis de RNA y transferencia a membranas (*Northern blot*)

El RNA se corrió en geles desnaturalizantes de agarosa 1,5%, formaldehído 6% y buffer MAE 1x (MAE 10x: MOPS-NaOH 0,2M, pH 7,0; NaAcO 50mM; EDTA 10mM), siguiendo el protocolo de Lehrach *et al* (1977). La agarosa se fundió en un volumen apropiado de H₂O deionizada y una vez enfriada a 65°C se le agregó formaldehído 37% y MAE 10x hasta llegar a la concentración indicada. La muestra de RNA se calentó por 15 min a 65°C en presencia de formaldehído 6%, formamida 50% y MAE 1x.

Luego de dejarla enfriar se le agregó BrEt hasta una concentración final de 50µg/ml y BS (buffer de siembra). El agregado de BrEt permitió observar los RNA ribosomales (17S y 26S), cuyos tamaños son aproximadamente 2000 y 4000 nucleótidos. Finalizada la corrida, se lavó el gel por 30 min en buffer fosfato 0,025M, pH 6,5, se transfirió por capilaridad en el mismo buffer, según el método de Southern (1977) durante 6-12 hs y luego se horneó la membrana por 2 hs a 80°C para eliminar el formaldehído.

4.8.4. Electroforesis en geles de agarosa alcalinos

Se fundió la cantidad de agarosa necesaria en un volumen apropiado de NaCl 50mM, EDTA 1mM, y luego se equilibró durante 30 min en el buffer de corrida (NaOH 30mM, EDTA 1mM), para evitar la hidrólisis de la agarosa en medio alcalino y a altas temperaturas.

Las muestras se resuspendieron en buffer de carga alcalino (NaOH 30mM, EDTA 1mM, Ficoll 3%, verde de bromocresol 0,025% y xileno cianol 0,025%), y se llevó a cabo la electroforesis en cuarto frío aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm.

4.9. PREPARACION DE SONDAS RADIOACTIVAS

4.9.1. Marcado de DNA doble cadena

En general se marcaron fragmentos de DNA eluidos de geles de agarosa preparativos utilizando el método de extensión de *primers* no específicos. Para ello, se hizo uso del kit "Multi-priming" (Amersham) siguiendo las condiciones aconsejadas por los fabricantes. La reacción se llevó a cabo utilizando entre 20 y 100ng de DNA y 25 μ Ci de [α^{32} P]dCTP. La actividad específica de las sondas así marcadas, osciló entre $5 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^9$ cpm/ μ g de DNA. El nucleótido no incorporado se eliminó mediante dos precipitaciones llevadas a cabo agregando 1/10 de volumen de NaAcO 3M (pH 5,2), 10 μ g de DNA de esperma de salmón como *carrier* y 2 vol de etanol.

4.9.2. Síntesis de DNA simple cadena marcado con [³²P]

Se mezcló entre 0,7 y 1,5µg de DNA del fago M13 recombinante simple cadena con 2µl del buffer TMN 10x (Tris-HCl, pH 8,0, 100mM; NaCl 100mM; y MgCl₂ 50mM), y 1 pmol del *primer* específico (20-mer) complementario a la zona de M13 que está ubicada 36 nucleótidos *downstream* del sitio HindIII de M13mp18; se agregó H₂O destilada hasta completar los 20µl, se calentó por 2 min a 85°C y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Se agregaron luego 2µl de buffer TMN 10x, 2U de enzima Klenow, 2,5µl de [³²P]dATP, (3000Ci/mmol) y dTTP, dCTP y dGTP para llegar a una concentración final de cada deoxinucleótido de 100µM en un volumen de reacción de 40µl. Se incubó durante 50 min entre 20-25°C y al cabo de ese tiempo se agregaron 3µl de una mezcla de los cuatro dNTP's (1mM c/u). Se dejó incubando a la misma temperatura por 30 min, y luego se inactivó a la enzima calentando por 20 min a 70°C, para luego digerir con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso y en las condiciones apropiadas para cada una de ellas.

El fragmento de DNA de interés se purificó de un gel de poliacrilamida nativo preparativo (ver más adelante) y la actividad específica obtenida fue de aproximadamente 1.10⁹ cpm/µg.

4.9.3. Marcación con [³²P] de DNA en extremos 5' protruyentes

Una vez digerido el DNA con la enzima de restricción adecuada, se precipitó con etanol y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en un volumen final de 30µl de buffer M 1X, con los 3 dNTPs en una concentración 80µM de cada uno, 25µCi del deoxinucleótido [³²P] y 1U de Klenow. Luego se le agregaron los 4

Materiales y Métodos

dNTPs para alcanzar una concentración final de 240 μ M en el caso de los nucleótidos fríos y 160 μ M en el caso del nucleótido marcado, y se incubó por 10 min más a temperatura ambiente.

En los casos en que el DNA marcado se fuera a recortar con enzimas de restricción que generaran extremos 5' protruyentes, se inactivó la DNA polimerasa (fragmento de Klenow) por calentamiento a 70°C durante 20 min.

4.9.4. Marcado de oligonucleótidos con γ^{32} P ATP

La reacción de marcado del extremo 5' del oligonucleótido se llevó a cabo utilizando 12 pmoles del oligonucleótido de 21 b (ver 4.14.3.1.), 12 pmoles de (γ^{32} P)ATP (9120 Ci/mmol), el volumen necesario de PNK buffer 10x (Tris-HCl, pH 7,5, 600mM; MgCl₂ 100mM; espermidina 1mM; EDTA 1mM; y DTT 50mM) y 5U de polinucleótido quinasa en un volumen final de 25 μ l. Se incubó por 1 h a 37°C, tras lo cual se sembró una alícuota 1/10 vol en un gel de poliacrilamida analítico (ver 4.13.1.), y el resto se utilizó directamente o previa purificación en un gel de poliacrilamida preparativo (ver 4.13.2.).

4.10. MAPEO DE RNA CON NUCLEASA S₁

Para identificar las zonas de DNA genómico que se encontraban representadas en el mRNA maduro, se aprovechó la capacidad de la nucleasa S₁ de degradar RNA o DNA simple cadena sin afectar los híbridos DNA-RNA.

Se realizó el ensayo siguiendo las condiciones originales descritas por Berk y Sharp (1978) o las condiciones de un protocolo modificado en el laboratorio.

4.10.1. Mapeo con S₁ (Berk y Sharp)

A partir de un clon de fago M13 recombinante simple cadena cuyo inserto correspondía a una secuencia de la misma polaridad que el mRNA, y utilizando el primer universal de M13, se sintetizó la cadena complementaria al mensajero marcado uniformemente con ³²P (ver 4.9.2.). Una vez digerido con la respectiva enzima de restricción, se corrió la muestra en un gel de poliacrilamida nativo, y el fragmento de interés se eluyó del mismo sumergiendo el tacho de acrilamida que contenía a dicho fragmento en 400µl de NaAcO 0,3M (pH 5,2).

La elución se llevó a cabo por 12 hs a 37°C. Una vez concluido este tiempo, se le agregó a los 400µl de NaAcO 0,3M, 30µg de polyA sintético *carrier* y 800µl de etanol. Se dejó 15 min a -70°C y se centrifugó 10 min a 12000xg. A partir de aquí, todos los materiales y reactivos que se usaron estaban pretratados para eliminar la posible presencia de RNAsas. Una vez centrifugado, el pellet se resuspendió en 50µl de H₂O.

Se rotularon tres tubos Eppendorf con +, - e INPUT y se le agregaron 22µl de la sonda resuspendida al tubo +, 22µl al -, y 5µl al INPUT. A continuación se agregaron a los tubos rotulados con + y -: 3,7µl de NaAcO 3M, pH 5,2, 84µl de etanol, 12µl de H₂O. Luego se agregó 3,5µl de RNA total (4,3µg/ml) al tubo + y 15µl de tRNA (1mg/ml) al tubo -, se dejó 15 min a -70°C, se centrifugó 10 min a 12000xg, y el pellet se resuspendió en 12,5µl de R-loop buffer (formamida 80%, NaCl 400mM, EDTA 1mM y PIPES 40mM (pH 6,7)). Se le agregaron a los dos tubos (+ y -) 50µl de vaselina, se calentaron por 15 min a 72°C y, sin dejar enfriar, se los dejó hibridando a 52°C por 12 hs.

Una vez finalizado el período de hibridación, se le agregaron a cada tubo 250µl de S₁ mix, la cual estaba compuesta por 248µl de S₁ buffer (NaCl 280mM, ZnSO₄ 4,5mM, NaAcO 30mM (pH

Materiales y Métodos

4,6), 1µl de nucleasa S₁ (400U/µl) y 0,5µl de DNA esperma de salmón 10mg/ml. Se incubó durante 1 hora a 37°C tras lo cual se hizo una extracción con 1 vol de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1), una con 1 vol de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), se precipitó con 1/10 de volumen de NaAcO 3M (pH 5,2) y 2 vol de etanol. Se centrifugó durante 10 min a 12000xg, se resuspendió las muestras + y - en 15µl de FD (formamida 80%, Tris-borato 50mM (pH 8,3), EDTA 1mM, xilenecyanol 0.1% (P/V) y azul de bromofenol 0,1% (P/V)), y al tubo INPUT se le agregaron 2 vol de FD. Se desnaturalizaron a 100°C por 3 min y se sembraron en un gel de poli-acrilamida desnaturalizante. El carril input servirá como control de la sonda utilizada, el carril - indicará si la nucleasa S₁ digirió totalmente los DNAs y RNAs simple cadena. Por último, el carril + mostrará los fragmentos protegidos por la formación de híbridos RNA-DNA.

4.10.2. Mapeo con S₁ modificado en el laboratorio

Debido a la dificultad encontrada para obtener sondas uniformemente marcadas con [$\alpha^{32}\text{P}$] de una extensión de 4,4Kb (el tamaño del inserto de DNA genómico), se ideó el siguiente método. Se siguió el mismo protocolo de hibridación que el descrito anteriormente salvo que se coprecipitó el RNA con aproximadamente 600ng de DNA simple cadena del fago M13 recombinante que contenía las 4,4Kb complementarias al mRNA sin marcar radioactivamente.

Se realizó el ensayo con nucleasa S₁ como ya fue descrito, se hizo una extracción con Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1), una con Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1), se precipitó con etanol, se resuspendieron las muestras en buffer de carga alcalina y se procedió a correr un gel de agarosa alcalino (ver 4.8.4.), junto con marcadores de peso molecular (1kB

Materiales y Métodos

DNA ladder) fríos. Una vez concluida la electroforesis, se lavó el gel durante 15 min en buffer fosfato 0.025M, pH 6,5 y se transfirió por capilaridad a GENE SCREEN siguiendo el método de Southern (ver 4.8.1.).

Finalizada la transferencia, se horneó la membrana por 2 hs a 80°C y se hibridó (ver 4.12.1.) con el fragmento genómico de 4,4Kb marcado radioactivamente o con distintos fragmentos del mismo.

4.11. CLONADO DEL DNA COPIA (cDNA) DEL GEN CI-1

Se analizó una biblioteca de cDNA de *Neurospora crassa* correspondiente a un cultivo inducido por 6 hs con cicloheximida. La misma, fue construida y cedida gentilmente por Guillermo Taccioli. Como característica de la construcción de esta biblioteca, cabe destacar que una vez sintetizada la primer cadena de cDNA, se realizó una digestión con la nucleasa S₁ antes de sintetizar la segunda cadena. Para el clonado en λ gt11, se ligaron los cDNAs a *linkers* de EcoRI cuya secuencia es 5'GGAATTC 3'.

Se plaquearon 40000 ufp en dos placas de Petri de 15cm de diámetro con células Y1090 como huésped. La infección se llevó a cabo agregando 300 μ l de una suspensión de fagos en SM y 300 μ l de un cultivo saturado de Y1090. Se incubó durante 30 min a 37°C y se agregaron los 600 μ l de células infectadas a 6ml de LB-top (a 55°C), los cuales se vertieron sobre 12ml de LB-bottom conteniendo ampicilina 100 μ g/ml.

Luego, los fagos se transfirieron a discos de nitrocelulosa de 14cm de diámetro, de acuerdo con lo descrito por Benton y Davis (1977).

Cada placa se transfirió por duplicado de la siguiente manera: se dejó el filtro de nitrocelulosa en contacto con el LB-top durante 1 min para el primer filtro, y durante 1 min 30 seg

Materiales y Métodos

para el segundo. Se posicionó la membrana sobre la placa haciendo marcas puntuales con una aguja embebida en tinta china, y se repitió la misma marcación para el segundo filtro. Luego se depositó el filtro sobre una solución de NaOH 0,5M-NaCl 1,5M durante 1 min, se pasó el mismo a una solución Tris-HCl 0,5M, pH 7,5, NaCl 1,5M, se lo dejó 1 min, para luego dejarlo por 2 min en una solución 2xSSC (NaCl 300mM-citrato de sodio 30mM, ajustado a pH 7,0). Luego se dejaron secar las membranas al aire y se las horneó durante 2 h a 80°C.

Los filtros se hibridaron con la sonda adecuada en las condiciones correspondientes a alta homología (ver 4.12.1), y luego del lavado y la autoradiografía se extrajeron 20 positivos, que tenían su duplicado correspondiente. Estos se volvieron a analizar plaqueando a baja densidad (50-100 ufp/placa de Petri 9cm de diámetro), teniendo en cuenta que el taco extraído de la placa original contiene aproximadamente $5 \cdot 10^6$ ufp. Las siete ufp individuales que dieron señal positiva se extrajeron de la placa de Petri para su posterior amplificación, análisis y subclonado.

4.12. CONDICIONES DE HIBRIDACION

Todas las hibridaciones descritas se llevaron a cabo con $1 \cdot 10^8$ cpm por ml de la solución de hibridación (SH) adecuada y con 0,05ml de solución de hibridación por cm^2 de GENE SCREEN o de filtro de nitrocelulosa.

Se prehibridó en todos los casos durante 2 hs en baño de agua a la temperatura de hibridación con la SH sin sonda, la cual fue inyectada una vez transcurrido el tiempo de prehibridación.

Las condiciones de hibridización utilizadas para sondas con alta homología (>90%) y con baja homología (aproximadamente 65%), se describen a continuación.

4.12.1. Condiciones de hibridación para sondas con alta homología

La prehibridación se llevó a cabo a 42°C en SH Tm-5, cuya composición es: SSC 5X, DENHARDT 5X (Ficoll 1mg/ml, polivinilpirrolidona 1mg/ml, albúmina bovina (fracción V) 1mg/ml, DNA de timo desnaturalizado 100µg/ml, SDS 1% y formamida 50%). La hibridación se prolongó por 12 hs a 42°C, tras lo cual se hicieron 4 lavados de 30 min cada uno en SSC 0,1X, SDS 1% y a 65°C.

4.12.2. Condiciones de hibridación para sondas con baja homología

La prehibridación se llevó a cabo a 42°C en SH Tm-40 compuesta por: SSC 4X, DENHARDT 5X, DNA de timo desnaturalizado 100µg/ml, SDS 1% y formamida 23,6%. Los lavados se realizaron a 50°C y en SSC 1X y 1% SDS.

Los filtros se secaron al aire y se autoradiografiaron con pantalla intensificadora a -70°C por el tiempo que se detallará en cada caso.

4.13. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

4.13.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida analíticos

Se emplearon geles verticales de 20cmx35cm o de 40cmx35cm con espaciadores de 0,4mm de espesor.

A partir de una solución stock de acrilamida: bisacrilamida (40:2) 40% se preparó una solución de concentración adecuada en TBE 1X (TBE 10X) para 1 l: Tris 108gr, ácido bórico 55g, EDTA 0,5, pH 8,0 40ml).

Materiales y Métodos

Para preparar geles desnaturalizantes se disolvieron 42g de urea cada 100ml de solución (7M final). La polimerización se realizó llevando a 0,8mg/ml de persulfato de amonio y 0,08% (V/V) de TEMED.

Las electroforesis se realizaron aplicando una potencia fija de 40W para los geles medianos y de 60W para los geles grandes. Una vez concluida la misma se fijó el gel en metanol 10%-ácido acético 10%-H₂O durante 30 min y se secó el gel en vacío y a 80°C.

4.13.2. Extracción de fragmentos de geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles, nativos o desnaturalizantes, similares a los descritos en 4.13.1. Luego de concluida la corrida electroforética, se autoradiografiaron a temperatura ambiente entre 15 y 30 min. Una vez posicionada la autoradiografía sobre el gel, se extrajeron las bandas de interés, dejándolas sumergidas en NaAcO 0,3M (pH 5,2) durante 12 hs a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se retiró el trozo de poliacrilamida y se precipitó con 2 vol de etanol.

4.14. SECUENCIACION

4.14.1. Subclonado de fragmentos para su secuenciación

En un primer momento, se apeló a una estrategia de tipo *shot-gun*, digiriendo el fragmento BamHI-EcoRI previamente purificado de geles de agarosa preparativos (ver 4.8.2.), en forma independiente con enzimas de alta frecuencia de corte, específicamente con AluI (5'AG*CT 3'), RsaI (5'GT*AC 3') y Sau3AI (5'*GATC 3')

Materiales y Métodos

(se indica con asterisco el sitio de corte de la enzima). Posteriormente se los subclonó en M13mp18-Sma (los digeridos con AluI y RsaI) y en M13mp18-BamHI (los digeridos con Sau3AI). Se purificó el DNA de simple cadena de los clones recombinantes y se secuenciaron utilizando el método de Sanger (ver 4.5.2. y 4.14.2.).

Si bien algunos clones fueron de utilidad (ver Resultados y Discusión), en general se produjeron artificios de subclonado como ser: inserción de más de un fragmento no necesariamente contiguos, y en ordenamiento cabeza-cabeza, cabeza-cola, invertidos, etc., lo cual dificultó mucho el análisis posterior.

Debido a esto, se utilizó la estrategia que se describe a continuación, tratando de diseñarla de forma tal que permitiera la mejor superposición posible de los clones y la lectura de ambas cadenas de DNA.

Se digirió el pGEM230A con las respectivas enzimas de restricción (ver 4.2.1.), se purificaron los fragmentos en geles de agarosa (ver 4.8.2.) y se subclonaron en el vector M13mP18 o M13mP19 previamente digerido con la o las enzimas de restricción adecuadas y fosfataseado (ver 4.2.2.1.). La reacción de ligado (ver 4.2.2.2.) se realizó con 100ng de vector y 3 cantidades crecientes de un fragmento aislado de geles de agarosa (5, 30 y 150ng de DNA por ensayo).

Es necesario destacar que en los casos de los fragmentos que tenían como un extremo un sitio AvaI (5'C*PyCGPuG 3'), AccI (5'GT*(A/C)(T/G)AC 3') o NcoI (5'C*CATGG 3') fue necesario convertir estos extremos en romos (ver 4.2.2.3.), ya que los vectores disponibles no poseían sitios para estas enzimas, útiles para el clonado.

Para asegurarse de que la secuencia leída correspondiera exactamente al fragmento deseado, se tomaron los siguientes recaudos al rescatar los clones recombinantes:

Materiales y Métodos

Los fagos M13 recombinantes se transfirieron a filtros de nitrocelulosa siguiendo el mismo protocolo que el descrito en 4.11., se hibridaron en condiciones de alta homología con el fragmento respectivo marcado por *priming at random* (ver 4.9.1.) y se lavó en condiciones de alta homología. Las placas de retardo de crecimiento claras que dieron señal positiva, se utilizaron para la preparación de DNA del fago M13 recombinante simple cadena (4.5.2).

Las células del mismo cultivo (para la purificación de ssDNA se utiliza el sobrenadante) se utilizaron para purificar DNA del fago M13 recombinante en su forma replicativa (DNA doble cadena), el cual se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI.

Es posible, que teniendo un fragmento con dos extremos A y B, se pueda dar la inserción Vector-AA—BB—AA—BB-Vector, En el caso de ambos extremos romos, esta situación es mucho más frecuente. Por lo tanto, en el supuesto caso de formarse un concatémero de este tipo, al digerir el dsDNA con EcoRI y con HindIII, (cada una de estas enzimas está en un extremo del polylinker de M13mp18 y M13mp19, Yanish-Perron *et al*, 1985), éste quedaría en evidencia por el tamaño del inserto.

Por otro lado, en los casos en que se subclonó un fragmento en forma no dirigida (esto es, cuando se subclonó un fragmento generado por una sola enzima de restricción en un sitio único de la misma enzima en el vector), se efectuó el C-test (ver 4.7.) de los DNAs simple cadena de los fagos M13 recombinantes respectivos, con el objeto de identificar un par de los mismos que tuvieran como inserto secuencias complementarias, para así poder secuenciar dicho fragmento desde los dos extremos.

Recién una vez efectuados los controles antes citados (Figura 6), se procedió a la secuenciación de los clones recombinantes.

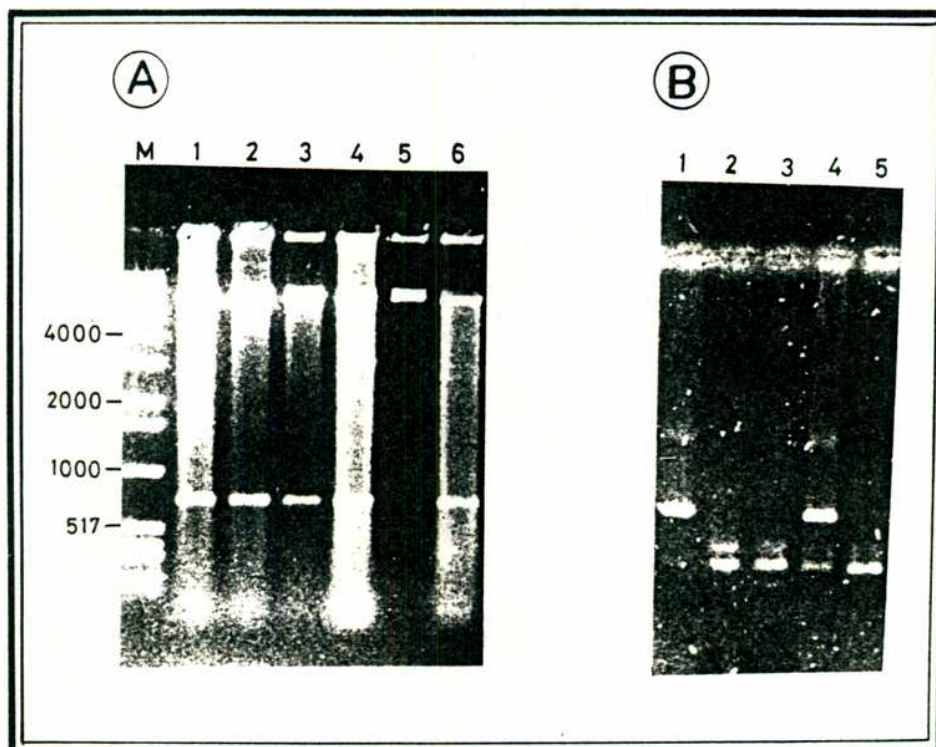


Figura 6: Controles de clones previos a su secuenciación

- A) Electroforesis en gel de agarosa 1%, 0,5 μ g/ml BrEt de restricciones con EcoRI e HindIII de distintos fagos M13 recombinantes 18AII, provenientes del subclonado del inserto AccI-AccI de 900pb en M13mp18/SmaI. Fueron rescatados por hibridación con el mismo fragmento.
- B) Electroforesis en gel de agarosa 0,8%, teñido después de la corrida con BrEt 0,5 μ g/ml del C-test de los subclones 18AIIA, B y C. Carril 1) A+B; 2) B; 3) A; 4) C+A; 5) C.

4.14.2. Secuenciación de DNA y de cDNA

La secuenciación se llevó a cabo por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para ello se utilizó el kit de secuenciación **Sequenase™**, (USB Corp.). Se siguieron las instrucciones indicadas por los fabricantes utilizando aproximadamente 1µg de DNA simple cadena de fagos M13 recombinantes para las cuatro reacciones de cada fragmento.

Se utilizaron para las cuatro reacciones 5µCi de [α -³⁵S]dATP (1250Ci/mmol). Se corrieron geles de acrilamida 6 a 8% y 7M urea (ver 4.13.1.). Una vez fijados y secados, se expusieron a temperatura ambiente por 72 hs.

4.14.3. SECUENCIACION DE RNA

4.14.3.1. Síntesis del oligonucleótido

Los criterios utilizados para la elección de la secuencia complementaria al mRNA del gen CI-1 a partir de la cual se construyó el oligonucleótido se discuten más adelante (ver 5.5.1. y Figura 21).

La síntesis de dicho oligonucleótido se llevó a cabo en el laboratorio según el método de fosforamidito y haciendo uso de un sintetizador de DNA, Modelo 381A de Applied Biosystems.

La cuantificación del mismo se realizó por medición de absorbancia a 260nm y considerando que 1 OD₂₆₀ equivale aproximadamente a 25µg/ml.

La secuencia de 21 bases elegida para sintetizar el oligonucleótido fue la siguiente:

5'GGGCGTTGGTGTAGTAGGTAA3'

4.14.3.2. Síntesis del cDNA de CI-1 utilizando el oligonucleótido de 21b como primer

Suponiendo que el mRNA del gen CI-1 correspondería al 0,5% (dato netamente especulativo) del mRNA total de un cultivo de *Neurospora crassa* inducido por cicloheximida, se utilizaron en el ensayo 12µg de RNA polyA⁺ (aproximadamente 0,07 pmoles del mRNA del gen CI-1) y un exceso molar 10 veces mayor del oligonucleótido (0,7 pmoles) marcado con $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, (ver 4.9.4.)

Se tomaron en todos los casos las precauciones acordes al trabajo con RNA (ver 4.5.4.1.). Se calentó el RNA en el tubo Eppendorf de reacción por 1 min a 100°C y se llevó a hielo rápidamente. Luego se agregó hidróxido de metil mercurio para alcanzar una concentración final de 10mM, se dejó 10 min a temperatura ambiente y se le adicionó β -mercaptoetanol hasta una concentración final de 160mM. Seguidamente se adicionaron 90 unidades del inhibidor de RNAsas RNAsin (Promega Biotec), el volumen necesario de buffer *anneal* 10x (KCl 2,5M y Tris-HCl 100mM, pH 8,3, a 43°C), los 0,7 pmoles del oligonucleótido (aproximadamente $3 \cdot 10^6$ cpm de ^{32}P por μmol) y el volumen de H₂O necesario para un volumen de reacción de 50µl.

Se calentó durante 30 min a 50°C y se dejó llegar lentamente a temperatura ambiente, tras lo cual se agregó 1,5 vol de la mezcla compuesta por: Tris-HCl 160mM, pH 8,3 a 43°C, MgCl₂ 12mM, los cuatro deoxinucleótidos trifosfato 2mM c/u, actinomicina D 20ng/µl, β -mercaptoetanol 14mM y transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviaria (AMV) 0,2U/µl. Se incubó por 1 h a 48°C, se paró la reacción con EDTA 16mM final y, luego de precipitar con 1/2 vol de NH₄AcO 7,5M y 25 vol de etanol, se re-suspendió en FD (ver 4.10.1.) y previo calentamiento por 5 min a 98°C, se sembró un gel de poliacrilamida 10% desnaturalizante, analítico o preparativo.

4.14.3.3. Secuenciación del cDNA sintetizado a partir del oligonucleótido de 21 b

Una vez corrido el gel de poliacrilamida preparativo, se cortó la banda de interés y se eluyó durante toda la noche en NaAcO 0,3M. Como el oligonucleótido estaba previamente marcado en el extremo 5' y, en consecuencia las moléculas de cDNA también lo estarían, se secuenciaron dichos fragmentos por el método de Maxam y Gilbert (1980), se corrió un gel de poliacrilamida desnaturante 10%, y se expuso con película autoradiográfica y doble pantalla intensificadora a -70°C durante 20 días.

4.14.4. Programa de computadora utilizado en el análisis de los datos de secuencias

El programa utilizado fue el desarrollado por IBI (DNA/Protein Sequence Analysis System, IBI Cat.# 81501 to 81509). Este permitió generar mapas de restricción, armar nuevas secuencias a partir de clones que se superponían, buscar secuencias consenso, traducir a aminoácidos secuencias de nucleótidos, predecir fragmentos generados por corte de dos o más enzimas de restricción, etc.

La comparación de la secuencia del cDNA del gen CI-1 con las secuencias reportadas hasta el momento en el GENBANK, fue realizada por el Dr. Raúl Andino en el Whitehead Institute for Biomedical Research, Mass., U.S.A.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. **SECUENCIACION DEL GEN CI-1**

Como se ha mencionado anteriormente, en nuestro laboratorio se clonó un fragmento de DNA que contenía secuencias complementarias al mRNA de 2,3 kb que codifica para la proteína cip 70 (Aisemberg *et al*, 1987a).

El mapa de restricción del cual se partió se muestra en la figura 5, los datos que se disponían acerca de este clon (Aisemberg *et al*, 1987a) se detallan a continuación. De las digestiones con distintas combinaciones de enzimas de restricción, su posterior transferencia a nitrocelulosa (*Southern blot*) e hibridación con cDNA inducido marcado radioactivamente (ver más arriba) como sonda, se concluyó que el fragmento AvaI-PstI (de aproximadamente 700pb) o parte del mismo, estaría representado en el mRNA de CI-1.

Las secuencias ubicadas *upstream* del sitio BglII y *downstream* del sitio HincII no estarían contenidas en el mRNA de CI-1.

La polaridad del mRNA (Aisemberg *et al*, 1987a) está indicada en la figura 5.

5.1.1. **Estrategia de secuenciación del gen CI-1**

A medida que se fueron analizando los datos de las secuencias de los primeros clones, se evidenciaron sitios para enzimas de restricción de baja frecuencia de corte que no habían sido descritos (por ejemplo, NcoI, ClaI, StuI, XmnI, KpnI), los cuales una vez confirmados por restricción y corrida en geles de agarosa, se utilizaron para obtener nuevos subclones y así conformar la estrategia de secuenciación que se muestra en la Figura

7. En esta figura sólo se presenta el mínimo número de clones que permitió armar la secuencia de todo el inserto de 4,4 Kb del pGEM2-30A.

5.1.2. Análisis de los datos de la secuenciación del DNA genómico del gen CI-1

Apelando al subclonado dirigido (ver 4.14.1.), se facilitó mucho el análisis de las secuencias de los distintos clones recombinantes, ya que *a priori* se sabía exactamente a qué fragmentos del pGEM2-30A correspondían dichas secuencias.

Para ubicar clones independientes, (que no se superponían), se hizo una macroaproximación mediante un mapa de restricción de enzimas de alta frecuencia de corte generado por computadora (ver Materiales y Métodos, 4.14.4.).

Lo mismo se hizo para ubicar en el mapa del pGEM230A los clones obtenidos a partir de la digestión del BamHI-EcoRI con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte.

La secuencia genómica del fragmento BamHI-EcoRI de 4,4Kb compilada a partir de las secuencias de los clones superpuestos (presentados en la Figura 7), se muestran en la figura 8. La fotografía de los autoradiogramas de los geles de secuenciación se muestran en el Apéndice.

5.2. ANÁLISIS DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL GEN CI-1

A medida que se iban compilando los datos de secuencias, se hicieron una serie de experiencias para tratar de dilucidar qué zonas del inserto BamHI-EcoRI estaban representadas en el mRNA de la cip70. Estas experiencias, se describen a continuación.

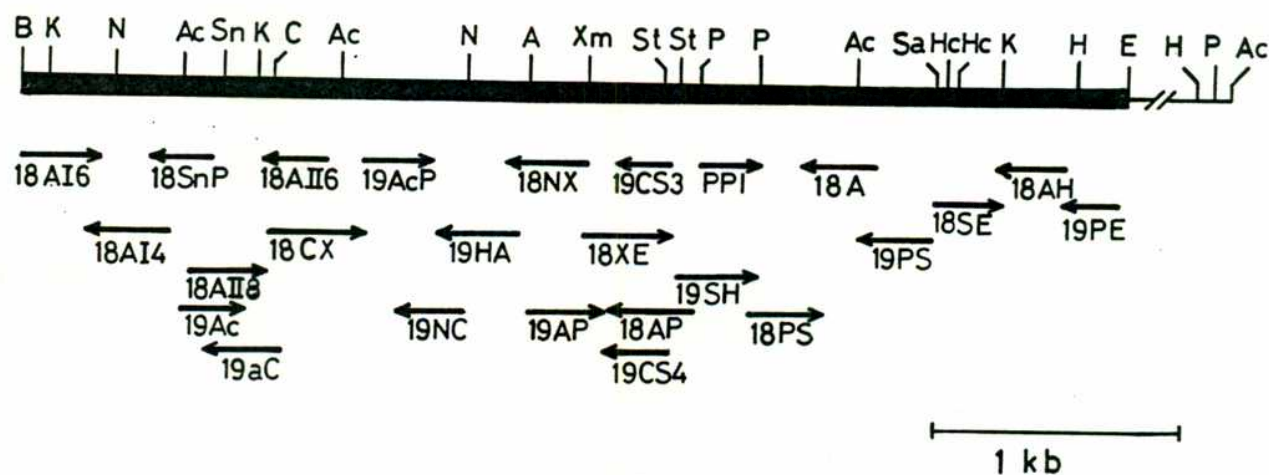


Figura 7: Estrategia de secuenciación del pGEM230A

Las flechas indican la orientación en que se secuenció cada subclon. El nombre de los mismos está conformado por: vector en que se subclonó (M13mp18 o 19) (el PPI está subclonado con mp19); (iniciales de las enzimas de restricción de los extremos de cada inserto orientadas 5' a 3' (18AI6, 18AI4, 18AII8 y 18AII6 son fragmentos AccI-AccI; 18A es un fragmento AluI-AluI).

Todos los subclones fueron secuenciados por el método de Sanger.

B: BamHI; K: KpnI; Ac: AccI; Sn: SnaBI; C: ClaI; N: NcoI; A: Aval; Xm: XmnI; St: StuI; P: PstI; Sa: SacI; Hc: Hinc II; H: HindIII; E: EcoRI

Resultados y Discusión

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATACTAAgCCGTACCGACATGAACCCAGGGGCGGGCACCTACTGGACGGATCACGAACCA
      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
TATCGCTCACTCAGCCCAAGAGATCTACCTACAGGTAGGTACCTTACTGTGGTACTCAGT
      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CTCAAAGTGCATGTAACCCAACGGTTGCTGATGTTTATCGGCGATTGCTCATCGGCATCA
      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGTGAGGCTTGGTGCAAGTGCCGTTCCGTAAACCTTCTTCTGGCATGTCGATTCCGGAT
      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
GGGGTGCTGCCGCGCTGGCATGGACTACATCCTTTGAAGGGAGGGCTGACGGACGGGGCT
      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
TAGAGGTACGTACGATACACCGACCGACATATACCGATCTTGAAATGATGTCAGATTTTC
      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GTGACGCTCGACTGAGATAAACCGCGCCCCACCATGGGTTTTGCGGGCCCGACGTGGCCG
      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CTGGACTGGACCCGTCCAGGTCTGTTCCATCACTAGCTCACATTAAGACGAACTGGTGGG
      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
AGAGAGAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAATCATGGTCAAGTGGAATGAATCATAGTGAACCA
      550     560     570     580     590     600
      *      *      *      *      *      *
ACACGGTTCTACCTTCCGTCCGTAAAGTAGGAAATCAAAAGGGTCACACAGCCGAGACAT
      610     620     630     640     650     660
      *      *      *      *      *      *
TGAAGAGCGAATCAACTTCAAACCGAATGCGAATGCGAATGCGAGCGTTTTACTAGACT
      670     680     690     700     710     720
      *      *      *      *      *      *
TGCCATTCCGTCTACACTACAGATTGCTACAAGGATGAGTTTTAGCGCAGTTACAATCGA
      730     740     750     760     770     780
      *      *      *      *      *      *
CTACCTATGTACACTAGATCCGTAGCACAACGTCGAGCGGTTTGAAGCAAAGTACCAAC
      790     800     810     820     830     840
      *      *      *      *      *      *
AACGAGAATAAACAAAAGCTGCCAAGATTAGGACCAGGACCACCGAAGAAAAGGGGGTGG

```

Figura 8: Secuencia del clon genómico pGEM2-30A

Resultados y Discusión

```

      850      860      870      880      890      900
      *        *        *        *        *        *
GATACATACGTA  

      910      920      930      940      950      960
      *        *        *        *        *        *
ATGCAGCAACCA  

      970      980      990     1000     1010     1020
      *        *        *        *        *        *
CTATGTGTCGGT  

     1030     1040     1050     1060     1070     1080
      *        *        *        *        *        *
GAGTTTACACGG  

     1090     1100     1110     1120     1130     1140
      *        *        *        *        *        *
TGCCTGCCTCTA  

     1150     1160     1170     1180     1190     1200
      *        *        *        *        *        *
CGCGATTTGGTC  

     1210     1220     1230     1240     1250     1260
      *        *        *        *        *        *
CCGTGGAAGGAA  

     1270     1280     1290     1300     1310     1320
      *        *        *        *        *        *
ACCATCAGTTTG  

     1330     1340     1350     1360     1370     1380
      *        *        *        *        *        *
TAGTAGACGGG  

     1390     1400     1410     1420     1430     1440
      *        *        *        *        *        *
CACCAAAGATGG  

     1450     1460     1470     1480     1490     1500
      *        *        *        *        *        *
CGGCTGAGTTG  

     1510     1520     1530     1540     1550     1560
      *        *        *        *        *        *
AAGGACTGGGT  

     1570     1580     1590     1600     1610     1620
      *        *        *        *        *        *
AGTCAGTCATT  

     1630     1640     1650     1660     1670     1680
      *        *        *        *        *        *
CTTACCTACTAC  


```

Figura 8 (continuación)

Resultados y Discusión

```

1690      1700      1710      1720      1730      1740
*         *         *         *         *         *
ACAGCCATCATGGCCCTCACCCAACCTGGCACACTCAGCGTCAGCACTCCTCCCCTTGTG
1750      1760      1770      1780      1790      1800
*         *         *         *         *         *
CTGCCCTCCATTGCAGCCATTCTGCCTTCGCCATCTTCCAGCGCTACTTCGCGCCGAATC
1810      1820      1830      1840      1850      1860
*         *         *         *         *         *
CGCTGTCCAACCTCCCGATCGTCGGCGAAGAGTACCATGGGTACGAGAAGAAGAGGCAGG
1870      1880      1890      1900      1910      1920
*         *         *         *         *         *
GGTATTTAACCAAAGCAAAGGATCTTTATCTTGAGGGATATACCAAGTTTGTCTCACCC
1930      1940      1950      1960      1970      1980
*         *         *         *         *         *
TCGGATGTGGATGTACTGGCAATAGATGAGGTGAATCGGGCAACAAAAGCAAAAAATA
1990      2000      2010      2020      2030      2040
*         *         *         *         *         *
TGGACGCGGAAGAGAAAAGAGAAACAAGGATGCTAACACTGGCGAAAACACACAGTTCAA
2050      2060      2070      2080      2090      2100
*         *         *         *         *         *
ACATGGCCTCTTCCGCATCGTGACCCCCAACCGTAACAGCGTTATTGTGCTTTCCCGAG
2110      2120      2130      2140      2150      2160
*         *         *         *         *         *
ATTCTTGGACGAGCTGAAGAAGTTGCCAGATGATGTGGTGAGCTTTGATGCTGCTAATGA
2170      2180      2190      2200      2210      2220
*         *         *         *         *         *
TGATGTGAGTTTTCTTCTTTTTTTGTGCGCCTCATCCAACATGTGCATCCTTCCGTCTTC
2230      2240      2250      2260      2270      2280
*         *         *         *         *         *
CTTCCAATTCTTCTGGCCCCACATTGATCTTTCTCTCCTCGCGTTTTGTCCGACAAATG
2290      2300      2310      2320      2330      2340
*         *         *         *         *         *
CTAAGCCGCCCTAGAGCATGCACACCAAATACACCTTGATCCCGACCCACGAACCTATTC
2350      2360      2370      2380      2390      2400
*         *         *         *         *         *
TCCCGCACACCATCAAGACCTCGCTCACGCCCTCGCTCCCTCGCCTCAACCCACAATTAT
2410      2420      2430      2440      2450      2460
*         *         *         *         *         *
CCGAAGAGGTGCAAATCGCCTTCTCGCAGGAAATTGCCCCCTCATGTCTAGCTCTCCGT
2470      2480      2490      2500      2510      2520
*         *         *         *         *         *
CCGACTGGGCCCCCATCAACATCAACTCCAAGCTCCTGCGCATCGTCGCCAAAGTGTCCG

```

Figura 8 (continuación)

Resultados y Discusión

2530	2540	2550	2560	2570	2580
*	*	*	*	*	*
GGCGCTTTCATCGGCCCTGAGTTATGTCACGATGAGCGTTACCTAGAGGCCGCCGTGG					
2590	2600	2610	2620	2630	2640
*	*	*	*	*	*
GTTATACCGTCAGCGTGATGGAGGCGCAGAGGGCCGTGGAGAGGATGAATCCCTGGGTCA					
2650	2660	2670	2680	2690	2700
*	*	*	*	*	*
GGCCTATTGCCCGTGGGCTGTAAGGAGTTTCGGAAGTTGGCGCAGATGGAGCGGGATGC					
2710	2720	2730	2740	2750	2760
*	*	*	*	*	*
CACGGCTTTCCTGAGGCCTGTCGTCGAGGCCGCAGGGAGAAGCAAAGAAAGGGGGAAGAG					
2770	2780	2790	2800	2810	2820
*	*	*	*	*	*
AAGGACAACGACATGCTGCAGTGGTTGATGGATTCAGCGGATCAGGGACAAGGGAAGCAA					
2830	2840	2850	2860	2870	2880
*	*	*	*	*	*
CACGGCAAGTGGGGGGAAGACACGACCACAACGAGAAAGTTGGCCAGGTTGCAGCTCGCT					
2890	2900	2910	2920	2930	2940
*	*	*	*	*	*
ATCAGCTTTGCTGCCATCCATACTACCACGTTGGTGACGACGCACGCGGTTTACAGCCTT					
2950	2960	2970	2980	2990	3000
*	*	*	*	*	*
GCCGCGGACCCCAAGTTGCAAGCCACGCTGCGTGAAGAGATCCAGTCGGTCCCTCCAAGAA					
3010	3020	3030	3040	3050	3060
*	*	*	*	*	*
CACAAGGGCGTGTTCAACACCTCGGCCCTGCAGGCATGAAGAAGACGGATTCCCTCCTCA					
3070	3080	3090	3100	3110	3120
*	*	*	*	*	*
AGGAGACGATGCGCTTCCATCCTCTGGGACAGACCTCCTTCAACCGCAAGTGCTCAGGAC					
3130	3140	3150	3160	3170	3180
*	*	*	*	*	*
CTTTGCTCTCTCCAACGGACAAGTCATCCCAAGGGATCGACCATCGAAGTCCCAACTA					
3190	3200	3210	3220	3230	3240
*	*	*	*	*	*
TGCTGTCTCGCGGACCCCGAAGCGTATCCCAACCCGGATGTGTTTGATCCGTTGAGGTT					
3250	3260	3270	3280	3290	3300
*	*	*	*	*	*
CTATAACCTCCGAAACGAGGCTAGGGAGAAGGGGGAGGCCGAACAGGCGGCTCGGGCCA					
3310	3320	3330	3340	3350	3360
*	*	*	*	*	*
GTTTGTGAGCGTGAACAAGGAGTTTTTGACATTCGGGTATGGACGGCATGCCTGCCCCGG					

Figura 8 (continuación)

Resultados y Discusión

3370	3380	3390	3400	3410	3420
*	*	*	*	*	*
CAGTTCTTTGCGGCGAACGAAATCAAGATGATTTTGGCGAACCTGGTGATGACGTATGAG					
3430	3440	3450	3460	3470	3480
*	*	*	*	*	*
ATGGGACTGGTGGAGGGAGAGACGGAGAGGTATAGGGACTGGGATATTGCGGCGGGGACC					
3490	3500	3510	3520	3530	3540
*	*	*	*	*	*
ATTCCAGATCCGACAAAGGATGTAATGTTTAGAAAGCTGTAGGGGCCCGGAATGATGTAG					
3550	3560	3570	3580	3590	3600
*	*	*	*	*	*
CTGTCCGTCGGTTCGTCCCTAGAGTAGTGGTAGGTGAAAGTTTCATACCTAATGTTGAGA					
3610	3620	3630	3640	3650	3660
*	*	*	*	*	*
ATTGTTGTAACCTCCCGATAGTCCCTCCTCATTACCAAAGTGAGCAGCAACATGATGAG					
3670	3680	3690	3700	3710	3720
*	*	*	*	*	*
CAACCGCCGTGGCAtnACCCAGAAATCGGCACATACGGGCATACCGATTCTCTCCG					
3730	3740	3750	3760	3770	3780
*	*	*	*	*	*
GTTCAACAGCAGTAGTAGTAGACGGcAAAGGATGGGATACGGTAGAGCTCTGACCAG					
3790	3800	3810	3820	3830	3840
*	*	*	*	*	*
CTCCACCTCTTCTCCTTTGGTCTTGGCCGGCTTGATATACGCATCCAGACCGAACTGCT					
3850	3860	3870	3880	3890	3900
*	*	*	*	*	*
GCGTCGGGGGAGGTTGGGGATGTCCGCCAGGTCTGGACGTGAAGCGCCACGGTGATGGG					
3910	3920	3930	3940	3950	3960
*	*	*	*	*	*
GCTGGCGTGATGGAGAGTCAAAGGTGGCGTTGAAGGATTCCATGTCCGCGCTTCCACTGT					
3970	3980	3990	4000	4010	4020
*	*	*	*	*	*
CCGGGTTGCTGTTTCATGGATTGCACGCGGCCGACTCGTCCATCAGTGAGGCGGACTTTGA					
4030	4040	4050	4060	4070	4080
*	*	*	*	*	*
TGCCGCGGGGATGGTTTCCTTTGGTGAGCACATCCTGGATAGTGCCGGATACGTGCGGCC					
4090	4100	4110	4120	4130	4140
*	*	*	*	*	*
GGTGGGCTGGTCAACTTTGAGGACGATGTTGACTCCAGCACCGGGGATGACTTGTTCGCGT					
4150	4160	4170	4180	4190	4200
*	*	*	*	*	*
TGTTGGTACTGGGGGACTGTTGGGGGGGGTTCGATGTGATGACCAGGATGGAACTTGAA					

Figura 8 (continuación)

Resultados y Discusión

4210	4220	4230	4240	4250	4260
*	*	*	*	*	*
GCAAGCGAGGGAAGTGAAATGCGTTGGTCGTTCCGCCCTTCTCAGTGATGGCTTTCAGTG					
4270	4280	4290	4300	4310	4320
*	*	*	*	*	*
ATCGTGACGGCGGGCATGCCTGGTGAGGGGGCGGGnGCGGGGGcaGTGGTTGAGTGGGn					
4330	4340	4350	4360	4370	4380
*	*	*	*	*	*
AACTTGGTACCTCTACCTCTACAGGACCACCTCCAGGTCAGTACCTAAGCTTGGCGGTGC					
4390	4400	4410	4420	4430	4440
*	*	*	*	*	*
ACGTGCGTAATCACGTTACTGCTCCCTCCCCATGTCGCCCGACTTTCCTTCTTCGGACCT					
4450	4460	4470	4480	4490	4500
*	*	*	*	*	*
TGGCGACATCGGGCCCTCCCCTCCATCGGCCGTCGCAGTCCACGGAACCCCGAAGCACTC					
4510	4520				
*	*				
CACTCGTCCACTCAACTCCnTTGTTGC					

Figura 8 (continuación)

5.2.1. Northern blot utilizando como sondas distintos fragmentos del pGEM230A

Los genes nucleares de *Neurospora crassa* que codifican para mRNAs y que habían sido caracterizados a nivel molecular hasta el momento en que se decidió estudiar la unidad transcripcional del gen CI-1, mostraban un número menor de intrones y de menor longitud que lo habitual en los eucariotes superiores. Muchos de los genes secuenciados revelaron no tener intrones en absoluto (Vollmer y Yanofsky, 1986; Flink y Wilkening, 1986; Leger-ton y Yanofsky, 1985; Giles *et al*, 1985; Catcheside *et al*, 1985; Dan-Coleman, 1984; Finchman y Kirnnaird, 1984; Buxton y Radford, 1983; Schechtman y Yanofsky, 1983; Kinnaird *et al*, 1982; Keeseey y DeMoss, 1982; Munger *et al*, 1985; y German y Lerch, 1985).

Es por esto que se hizo necesario descartar o confirmar la existencia de intrones en el gen CI-1. Para ello se realizó un *Northern blot*, con 20µg por calle de RNA total de *Neurospora crassa* inducido por cicloheximida, y se hibridó en condiciones de alta homología con distintos fragmentos previamente purificados por geles de agarosa preparativos y marcados radioactivamente por *priming at random* (Figura 9A).

Los resultados se muestran en la Figura 9B, según éstos, se puede afirmar que los fragmentos que claramente contienen secuencias representadas en el mRNA, son el AccI-AvaI (la sonda IV da señal mientras que la III no), el AvaI-PstI (en este caso hubo un problema con la sonda, pero este dato ya fue indicado por Aisemberg *et al* (1989) y se confirma más adelante en los ensayos de protección contra la nucleasa S1); el fragmento PstI-PstI (sonda VI), y el fragmento Pst-SacI (sonda VII).

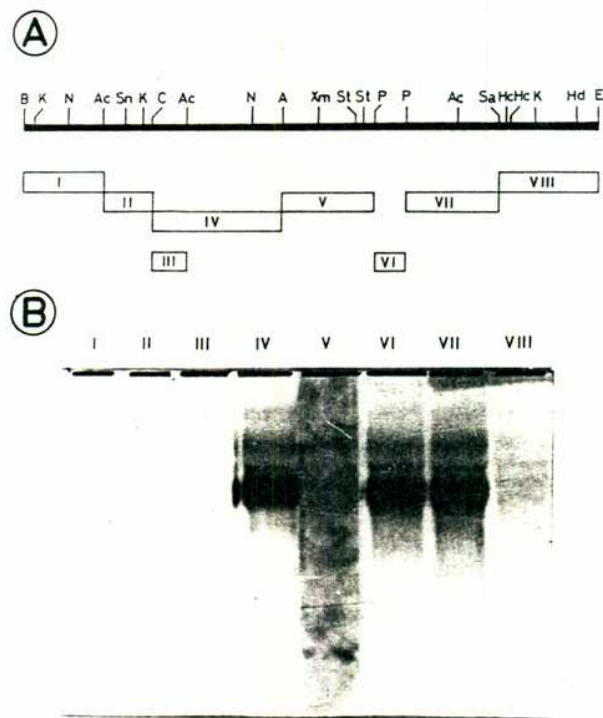


Figura 9: Northern blot hibridado con distintos fragmentos del inserto BamHI-EcoRI del pGEM2-30A.

- A) Esquema de las distintas sondas que se obtuvieron por digestión con las respectivas enzimas de restricción, extracción de geles de agarosa y posterior marcado por *priming at random*.
- B) Se corrieron 20µg de RNA total por calle, se transfirió a Gene Screen, se cortó la tira correspondiente a cada calle, y se hibridó en condiciones de alta homología con cada una de las sondas descritas en A. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.

Resultados y Discusión

En las calles hibridadas con las sondas I, II y III, aparece una sombra muy tenue en la zona del CI-1 mRNA y es difícil discernir si esta señal es producida por el "ruido de fondo" del ensayo o es debida a la hibridación de trectos homólogos muy pequeños.

Una vez acotados los fragmentos que contenían secuencias complementarias a los mRNA maduros, se diseñaron ensayos que permitieran conocer la longitud de los exones contenidos en cada uno de ellos. Estos ensayos se describen a continuación.

5.2.2. Protección contra la nucleasa S₁ del fragmento AvaI-PstI

Para este ensayo, se utilizó como sonda, un DNA simple cadena marcado uniformemente con [³²P], cuya secuencia era complementaria al mRNA, y que fue generado (según 4.9.2.) a partir del ssDNA de el clon M13mp18 recombinante 18AP4.

Dicho clon, lleva como inserto, un fragmento AvaI-PstI (el extremo AvaI fue previamente convertido en romo para luego subclonarlo en SmaI). Este fragmento está orientado de manera tal que la síntesis del DNA marcado se produce desde el sitio PstI al SmaI (AvaI).

Los resultados se aprecian en las figuras 10A y 10B.

Como se puede apreciar, la utilización de esta sonda produjo dos fragmentos protegidos, de aproximadamente 450pb y 67pb, respectivamente.

5.2.3. Protección contra la nucleasa S₁ del fragmento PstI-SacI

En este caso, el clon utilizado para preparar la sonda de DNA simple cadena [³²P] fue el 19PS1 que es un fago M13 recombinante que tiene insertado el fragmento PstI-SacI, de manera tal

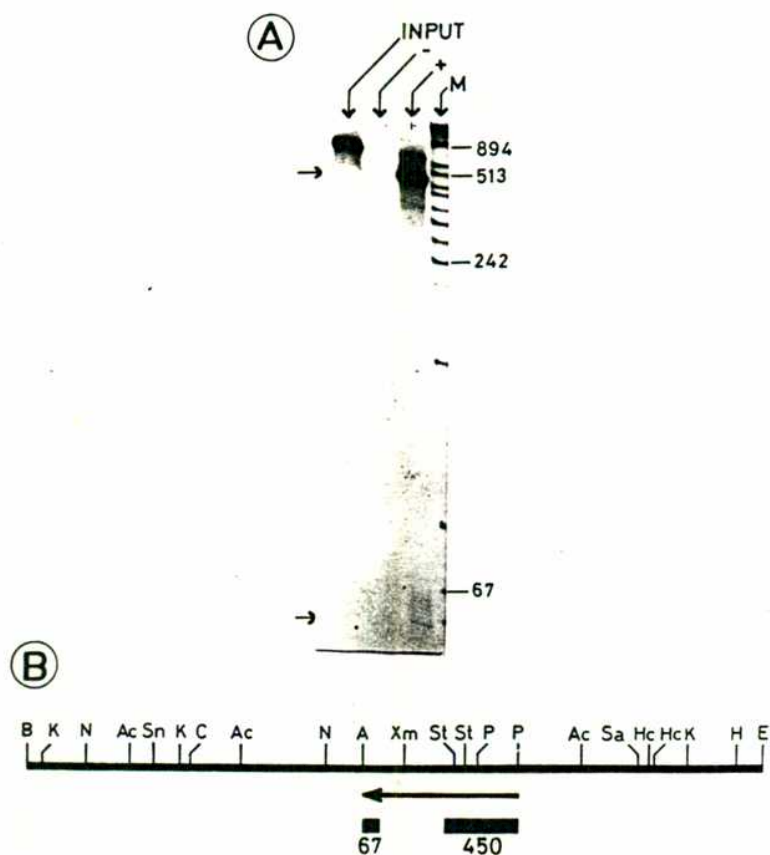


Figura 10: Protección contra S1 del fragmento AvaI-PstI

A) Gel de poliacrilamida 6%, 7M urea. INPUT: sonda; - : con 15 μ g de tRNA; +: con 15 μ g de RNA total inducido por 6 hs con cicloheximida 2 μ M; M: marcadores. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora..

B) La flecha indica la polaridad y la extensión de la sonda de DNA simple cadena [32 P] empleada. Las cajas muestran la longitud aproximada de los fragmentos protegidos.

que la extensión a partir del oligonucleótido universal de M13 se produce desde el sitio SacI al PstI, resultando un DNA simple cadena [³²P] complementario al mRNA. Los resultados se muestran en las figuras 11A y 11B, en las cuales se observa que al utilizar esta sonda, aparece protegido un fragmento de aproximadamente 520pb

5.2.4. Protección contra la nucleasa S₁ del fragmento ClaI-AvaI

La sonda utilizada en este ensayo se preparó a partir del ssDNA del clon de M13, 19HA, cuya construcción se detalla a continuación.

Posteriormente a la digestión del plásmido pGEM2-30A con la enzima de restricción AvaI, se convirtieron en romos los extremos generados por esta enzima. Luego se recortó con HindIII, que tiene un sitio dentro del inserto (posición 4367) y un sitio en el polylinker de pGEM2 a 23 nucleótidos del sitio BamHI. Por lo tanto, se generaron un fragmento HindIII(vector)-AvaI, uno AvaI-HindIII (inserto), y el HindIII-HindIII del vector.

Estos fragmentos fueron subclonados en el fago M13mp19 previamente digerido con HindIII y con SmaI, y luego se rescataron los clones correspondientes al HindIII (vector)-AvaI (que contenía la mitad 5' del inserto), y el AvaI-HindIII (que contenía la mitad 3' del inserto), por transferencia a nitrocelulosa y posterior hibridación con los fragmentos BamHI-AvaI por un lado, y AvaI-EcoRI por el otro. Este clon, llamado 19HA contiene el inserto orientado de manera tal que la extensión del DNA se produce desde el sitio AvaI al HindIII, generándose un DNA simple cadena [³²P] cuya secuencia es complementaria al mRNA.

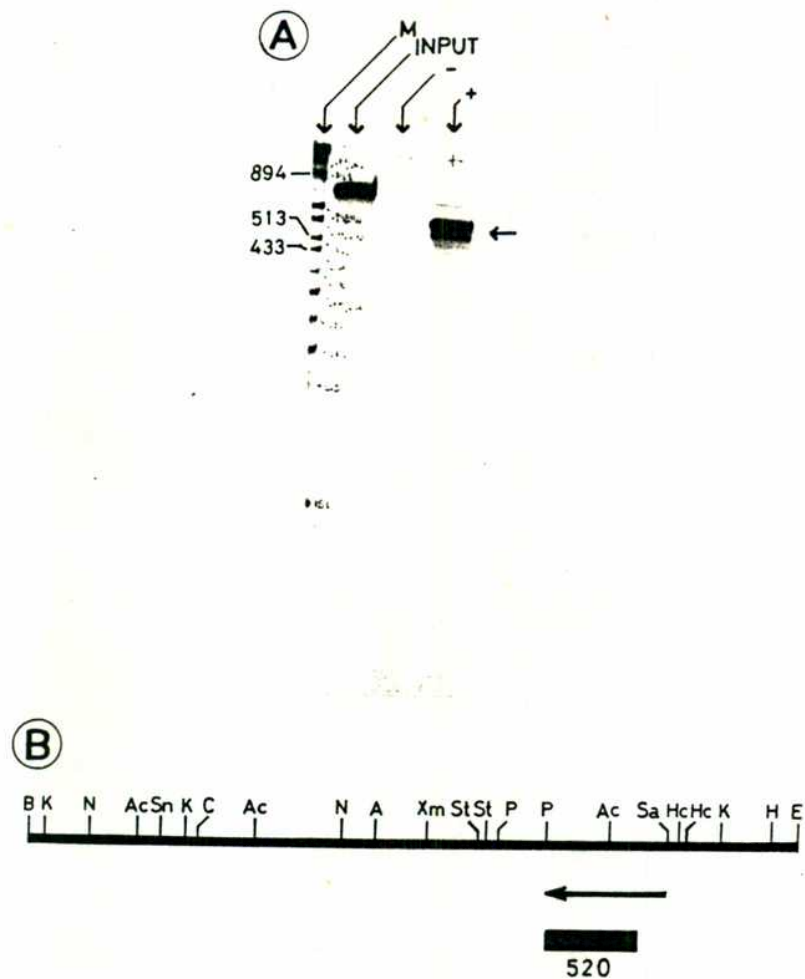


Figura 11: Protección contra S1 del fragmento PstI-SacI

- A) Gel de poliacrilamida 6%, 7M urea. INPUT: sonda; - : con 15µg de tRNA; +: con 15µg de RNA total inducido por 6 hs con cicloheximida 2µM; M: marcadores. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.
- B) La flecha indica la polaridad y la extensión de la sonda de DNA simple cadena [³²P] empleada. Las cajas muestran la longitud aproximada de los fragmentos protegidos.

Resultados y Discusión

Una vez sintetizado el DNA [$\alpha^{32}\text{P}$], recortado con la enzima ClaI, y extraído de un gel de poliacrilamida nativo, se utilizó para este ensayo. Los resultados se muestran en las Figuras 12A y 12B, en donde se ve la protección de dos fragmentos de aproximadamente 330pb y 60pb, respectivamente.

5.2.5. Protección contra la nucleasa S₁ del fragmento PstI-PstI

En la preparación de la sonda, se utilizó el clon PP1 que es un fago M13 recombinante que tiene un inserto PstI-PstI cuya extensión, en presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$]dNTPs y a partir del oligonucleótido universal de M13 genera un DNA simple cadena marcado uniformemente complementario al mRNA de CI-1. Los resultados se muestran en las figuras 13A y 13B. De este experimento se comprueba que hay una protección total de la sonda (aproximadamente 250pb).

En experimentos de protección contra la nucleasa S₁ (datos no mostrados), que se realizaron utilizando como sondas los fragmentos generados por la digestión del plásmido pGEM2-30A con la enzima de restricción AvaI, los cuales fueron marcados ya sea, por rellenado de extremo 5' protruyente con [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP o con polinucleótido quinasa y $\gamma^{32}\text{P}$, y luego recortados con EcoRI y BamHI, respectivamente, se comprobó que ambas sondas protegían un fragmento de aproximadamente 65pb. Con este resultado y los descritos en 5.2.2. y en 5.2.4., se pudo concluir que el sitio AvaI estaba ubicado aproximadamente en la mitad de un exón de 140pb.

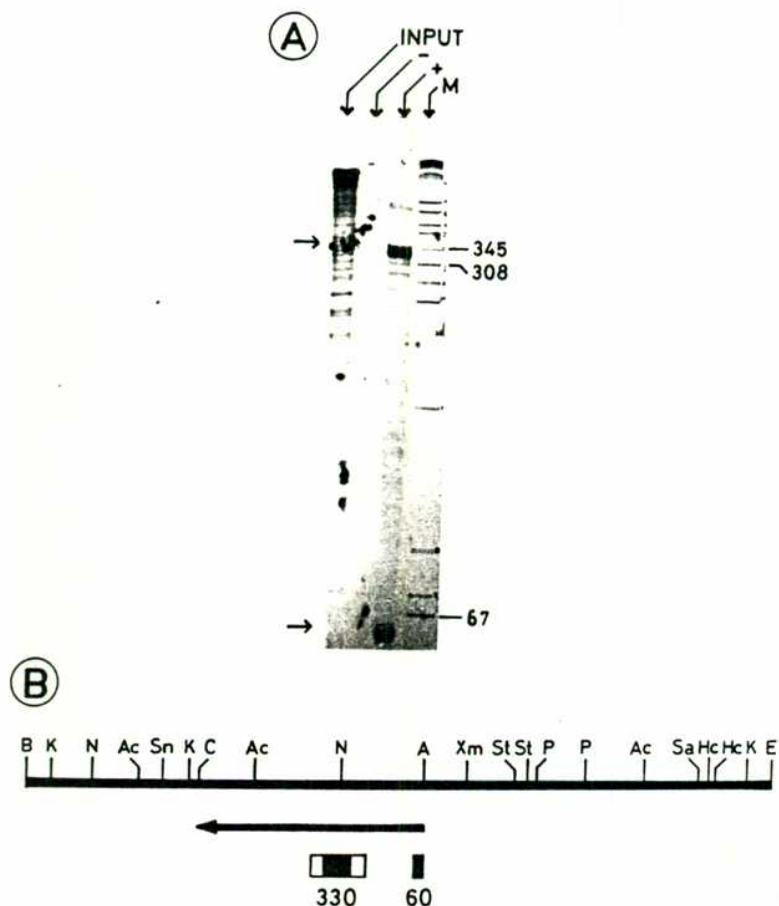


Figura 12: Protección contra S₁ del fragmento ClaI-AvaI

A) Gel de poliacrilamida 6%, 7M urea. INPUT: sonda; - : con 15 μ g de tRNA; +: con 15 μ g de RNA total inducido por 6 hs con cicloheximida 2 μ M; M: marcadores. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.

B) La flecha indica la polaridad y la extensión de la sonda de DNA simple cadena [³²P] empleada. Las cajas muestran la longitud aproximada de los fragmentos protegidos.

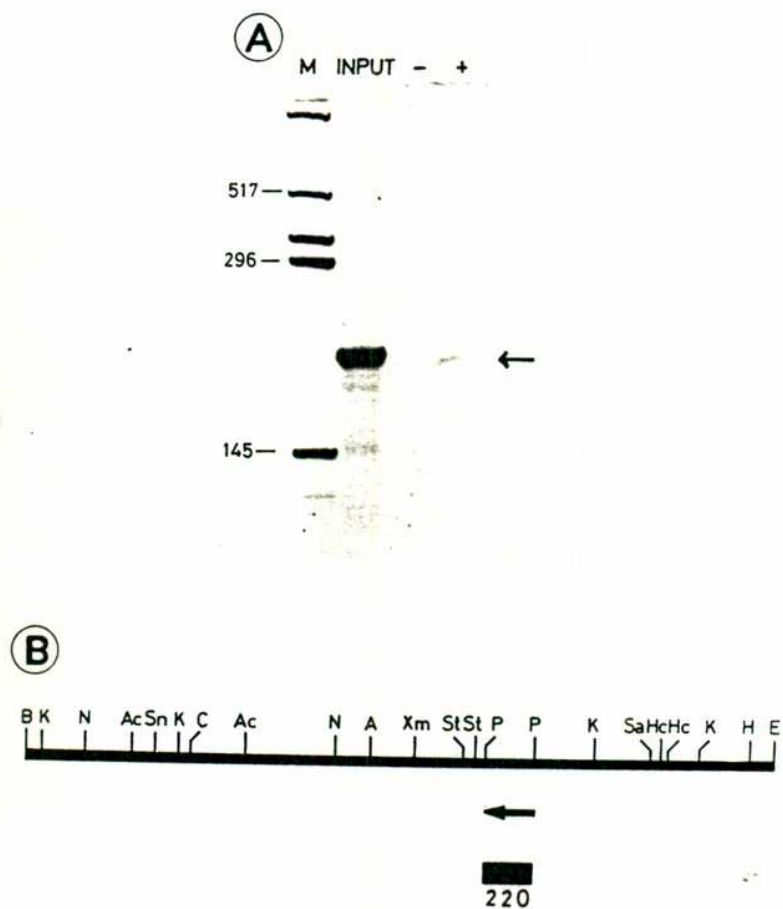


Figura 13: Protección contra S₁ del fragmento PstI-PstI

- A) Gel de poliacrilamida 6%, 7M urea. INPUT: sonda; - : con 15µg de tRNA; +: con 15µg de RNA total inducido por 6 hs con cicloheximida 2µM; M: marcadores. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.
- B) La flecha indica la polaridad y la extensión de la sonda de DNA simple cadena [³²P] empleada. Las cajas muestran la longitud aproximada de los fragmentos protegidos.

5.2.6. Ensayo modificado de protección contra la nucleasa S₁

Los resultados hasta aquí expuestos, permitieron afirmar, que en el gen CI-1 existirían por lo menos dos intrones, uno en el fragmento ClaI-AvaI y el otro en el fragmento AvaI-PstI, esta afirmación estaba basada en que en ambos ensayos se evidenció la protección de 2 fragmentos. Sin embargo la información obtenida no fue suficiente como para armar un mapa de exones e intrones ya que en el caso del fragmento AvaI - PstI por ejemplo, de aproximadamente 680 pb, si bien se sabía que el el fragmento protegido de 67pb se extendía desde el sitio AvaI (ver más arriba), la ubicación del fragmento de 450 pb era incierta ya que estos resultados no permitían discernir entre un ordenamiento A) intrón-exón de 450 bp-intrón y uno B) intrón de 110pb-exón de 450pb. Lo mismo ocurrió con el fragmento PstI-SacI de 740 pb, en donde no se pudo discernir entre un ordenamiento C) intrón de 220pb-exón de 520pb, uno D) exón de 520pb-intrón de 220pb, y uno E) intrón-exón de 520pb-intrón. Una forma de confirmar la ubicación de estos exones era hacer un ensayo de protección contra la nucleasa S₁ utilizando como sonda el inserto de 4,4kb BamHI-EcoRI. Como se aprecia, los fragmentos protegidos son de 140pb, 330pb, y aproximadamente 1200pb; por lo tanto, los ordenamientos correctos serían el B) y el D) (recordar que la sonda PstI-PstI daba una protección completa de aproximadamente 300pb).

Mientras que si hubieran aparecido fragmentos protegidos de 330pb, 140pb, 450pb, 300pb y de 520 pb, los ordenamientos correctos serían el A) y el C) o E). Ahora bien la realización de este experimento tropezaba con la dificultad práctica de marcar radioactivamente en forma uniforme un fragmento tán extenso como el de 4,4kb. Para salvar este obstáculo, se ideó una modificación

Resultados y Discusión

del método original de mapeo con nucleasa S₁ (Berk y Sharp, 1978), que se describe en detalle en Materiales y Métodos (4.10.2.).

Las características fundamentales de este ensayo fueron:

la utilización como sonda del DNA simple cadena del fago M13 recombinante que llevaba como inserto el fragmento BamHI-EcoRI de 4,4Kb complementario al mRNA, en el ensayo de protección contra la nucleasa S₁.

la corrida en un gel de agarosa alcalino (4.8.4.).

su transferencia a nitrocelulosa (*Southern blot*)(4.8.1.).

la hibridación con el fragmento EcoRI-BamHI marcado por *priming at random* (4.9.1.).

En las figuras 14A, 14B y 14C se puede constatar la protección de 3 fragmentos de aproximadamente 1200pb, 330pb y 120pb, respectivamente, con lo cual queda confirmado que los ordenamientos correctos para el exón de 450pb del fragmento AvaI-PstI y para el exón de 520 pb del fragmento PstI-SacI, serían el B) y el D) respectivamente.

Un detalle que cabría destacar de este método es el tiempo que fue necesario exponer la autoradiografía (1 semana), para poder visualizar el fragmento de 120pb. Esto se debería fundamentalmente a dos factores: la mayor difusión de los fragmentos pequeños y la pequeña proporción (comparada con la de fragmentos mayores) de secuencias marcadas capaces de hibridar con estos fragmentos.

Los resultados arrojados por este ensayo, se confirmaron por medio de otra experiencia en la que se utilizó el mismo método, pero esta vez utilizando como sondas distintos clones de

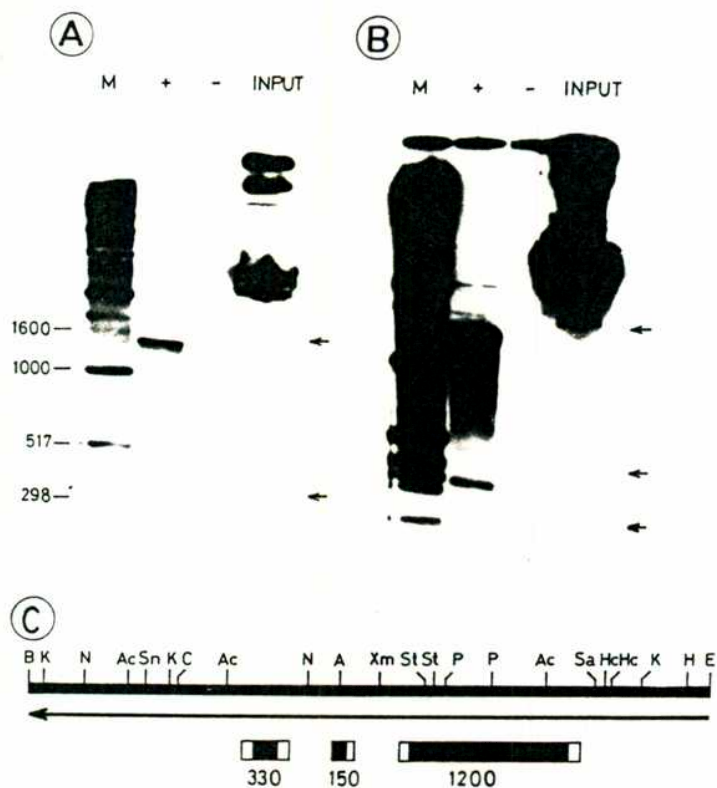


Figura 14: Ensayo de S1 modificado usando el fragmento BamHI-EcoRI como sonda

- A) Gel de agarosa 1,5% alcalino. M: marcadores; +: más 15µg de RNA total inducido con cicloheximida; -: + 15µg tRNA; INPUT: ssDNA del 19EB. Transferido a Gene Screen e hibridado en condiciones de alta homología con fragmento BamHI-EcoRI extraído de gel de agarosa, y 1KB DNA ladder, marcados por *priming at random*. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.
- B) Idem que A. Exposición 1 semana a -70°C con pantalla intensificadora.
- C) La flecha indica la extensión del fragmento BamHI-EcoRI. Las cajas representan la longitud de los fragmentos protegidos. Las zonas vacías de las cajas simbolizan la ubicación desconocida de los mismos.

Resultados y Discusión

M13 recombinantes que contenían los insertos que se muestran en la Figura 15A. Los resultados se presentan en las Figuras 15B y 15C.

Este experimento confirmó los datos del anterior y al igual que este no evidenció la presencia de ningún exón en la región que se extiende desde el sitio BamHI hasta el AccI de la posición 1324. Por último, no se ha encontrado una explicación que justifique los artificios que promovieron la aparición de las bandas inespecíficas en los carriles + correspondientes a las sondas I, II y III.

5.2.7. Estructura del gen CI-1 de acuerdo a los resultados de mapeos por S₁

Los resultados obtenidos permitieron hacer un esquema de la distribución de exones e intrones del gen CI-1, el cual se muestra en la Figura 16.

Como sustento del esquema presentado en la figura 16, se buscó la existencia de marcos de lectura abiertos (que correspondieran a los exones postulados), y la presencia de secuencias consenso de *splicing* descritas en la bibliografía hasta el momento (Roberts *et al*, 1988).

Los tres exones propuestos se encontraron en zonas de marcos de lectura abiertos.

Con respecto a la existencia de secuencias consenso de *splicing*, sólo se mencionará aquí la existencia de una secuencia homóloga en un 100% a la descripta como consenso interno de los intrones de *Neurospora crassa* (A/G)CT(A/G)AC, que se ubicó de 6 a 20 nucleótidos *downstream* del sitio aceptor de *splicing* (C/T)AG en la posición 2012 (ver figura 21), y a partir de la cual se inicia un marco de lectura abierto. En todos los otros casos no

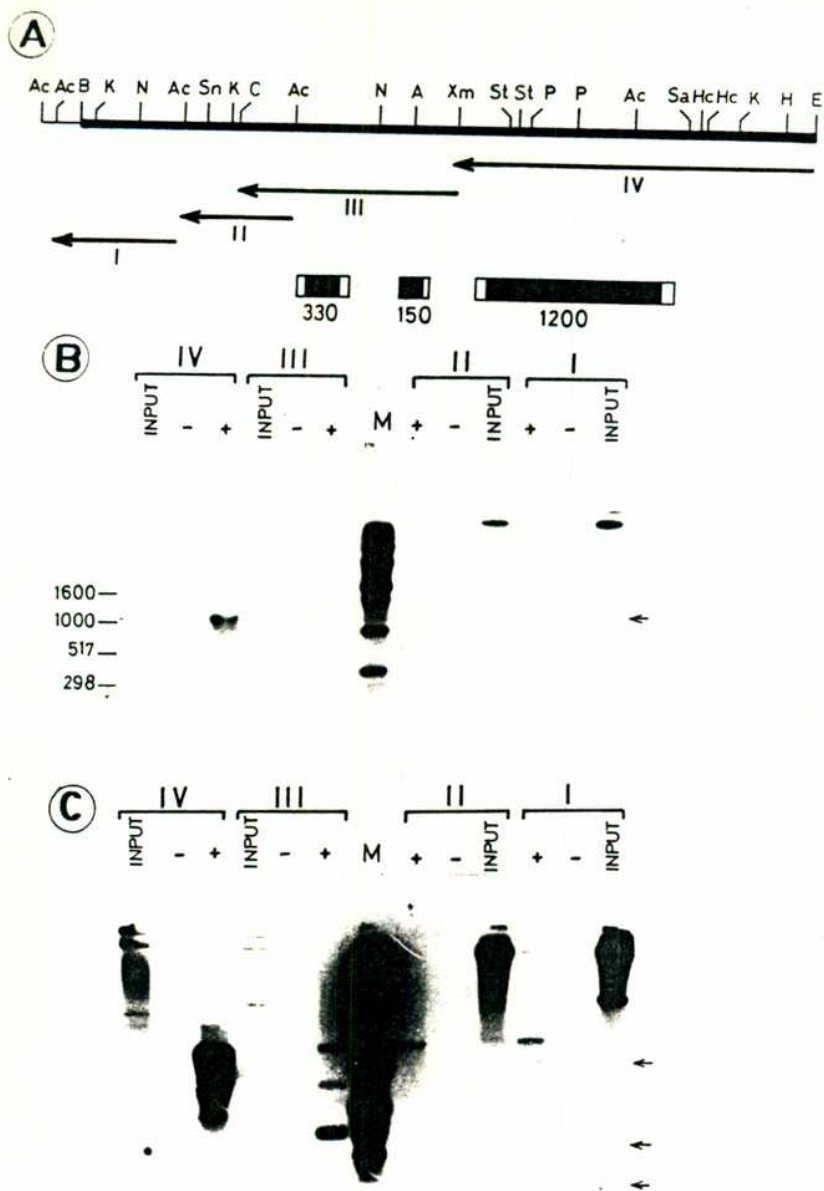


Figura 15: Ensayo de S₁ modificado utilizando distintos fragmentos como sondas

- A) Las flechas indican la extensión de cada fragmento, los cuales fueron extraídos de geles de agarosa y marcados por *priming at random*. Las cajas representan la longitud de cada inserto protegido. Las cajas vacías simbolizan la ubicación desconocida de los mismos.
- B) Gel de agarosa 1,5% alcalino; INPUT: respectivos ssDNAs; -: más 15 μ g de tRNA; +: más 15 μ g de RNA total inducido con cicloheximida. Se transfirió a Gene Screen, se cortó cada tira y se hibridó en condiciones de alta homología con las respectivas sondas. Exposición 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.
- C) Idem que B). Exposición 1 semana.



Figura 16: Estructura del gen CI-1 de acuerdo a los resultados de mapeos por S₁

Las cajas representan las longitudes aproximadas de los exones. Las zonas vacías simbolizan el desconocimiento de las posición exacta de los extremos de los mismos.

se encontraron evidencias lo suficientemente sólidas como para postular el inicio o la finalización de un exón. Es por ello que en la Figura 16 se representó a estas zonas como cajas vacías. Es necesario aclarar que debido a la dificultad que presentó este ensayo para detectar fragmentos de DNA pequeños (ver más arriba), no se puede descartar la presencia de otros exones (de tamaño menor de 100pb), todo esto hace que el esquema de la Figura 16 se deba tomar sólo como una aproximación a la distribución de exones e intrones en el gen CI-1.

Para la elucidación definitiva de la estructura del gen CI-1, se hizo indispensable el análisis por secuenciación de clones de cDNA del mismo, tópico que se desarrollará en los próximos capítulos.

5.3.1. Análisis de una genoteca de cDNA de *Neurospora crassa*

Como ya se mencionó en Materiales y Métodos (4.11.), esta genoteca fue construida en base al mRNA purificado de un cultivo de *Neurospora crassa* previamente inducido por 6 hs con cicloheximida (2µM). Fue analizada según se describe en 4.11., utilizando como sonda el fragmento Eco-Bam de 4,4Kb purificado por geles de agarosa (4.8.2.) y marcado radioactivamente por *priming at random* (4.9.1.).

5.3.2. Análisis de clones de cDNA y caracterización de los mismos

Del autoradiograma del primer análisis, surgieron 20 señales positivas (coincidentes en los duplicados), las cuales se posicionaron en la placa de Petri original para proceder luego a la extracción del taco de agar que contenía entre otros a los

Resultados y Discusión

clones con secuencias homólogas al CI-1. Una vez eluidos del saco, se volvieron a plaquear, pero esta vez a baja densidad (entre 50 y 100 ufp por caja de Petri de 9cm de diámetro), teniendo en cuenta que el título de fagos obtenido de la elución del taco de agar es aproximadamente 1.10^7 ufp/ml. Se volvió a analizar con el fragmento EcoRI-BamHI de 4,4Kb y se rescataron 14 clones que daban señal positiva.

Luego se hizo una preparación de DNA de estos fagos λ gt11 recombinantes según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (ver 4.5.3.), se liberó el inserto que contenían digiriendo con la enzima EcoRI, se corrió un gel de agarosa y se transfirió el mismo a nitrocelulosa (*Southern blot*) para analizarlo por hibridación con el fragmento EcoRI-BamHI de 4,4Kb.

Los resultados se muestran en la figura 17.

Los tamaños de los insertos deducidos a partir de la comparación de sus movilidades en el gel de agarosa con respecto a las movilidades de los marcadores de peso molecular, son: CI-1cD12A y CI-1cD12B, aproximadamente 1,8Kb; CI-1cD18A: 1,6Kb; CI-1cD4A: 1,45Kb; CI-1cD19A: 1,2Kb y CI-1cD1A: 1,1Kb. Estos insertos se subclonaron en el vector pGEM2 (Promega Biotec.) previamente digeridos con la enzima de restricción EcoRI, según se describe en Materiales y Métodos.

5.3.3. Mapeo de restricción del clon pGEM2-CI-1cD12B

Con el diseño del experimento de caracterización del clon pGEM2- CI-1cD12B por mapeo con enzimas de restricción, se intentó confirmar los sitios para enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, que se sospechaba estaban incluidos dentro de exones, según el esquema deducido a partir de los resultados de los ensayos de protección contra la nucleasa S₁ (figura 16).

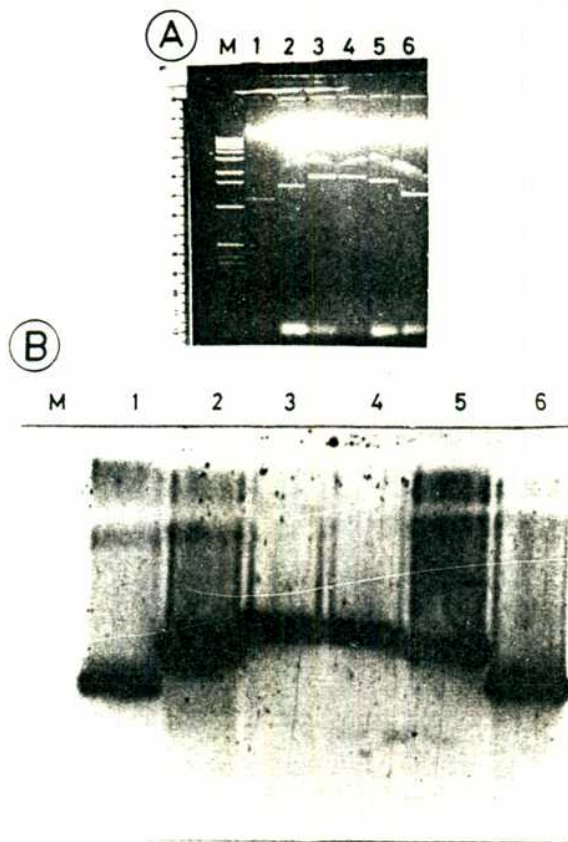


Figura 17: Análisis de clones de cDNA

- A) Electroforésis en gel de agarosa 1%, BrEt 0,5 μ g/ml de los distintos clones de cDNA digeridos con EcoRI. 1) λ gt11-1A, 2) λ gt11-4A, 3) λ gt11-12A, 4) λ gt11-12B, 5) λ gt11-19A, 6) λ gt11-18A M) Marcadores de peso molecular :1KB DNA LADDER)
- B) Transferencia a Gene Screen y posterior hibridación con el fragmento BamHI-EcoRI del pGEM2-30A marcado por *priming at random*. Expos. 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.

Resultados y Discusión

Además, se procedió a comprobar si es que existían sitios para enzimas de restricción de baja frecuencia de corte que pudieran estar incluidos en exones pequeños no detectados por los ensayos de protección contra la nucleasa S₁ (ver estructura de CI-1).

Los resultados y el esquema del pGEM2-CI-1cD12B deducido a partir de las movilidades en el gel de agarosa se muestran en la Figura 18. La distancia existente entre los sitios Aval y el PstI (aproximadamente 520pb), puso en evidencia la existencia de un posible intrón de aproximadamente 150pb, ya que la distancia entre estos dos sitios en el DNA genómico (Figura 8) es de 685pb.

5.3.4. Secuenciación del cDNA del gen CI-1

Para el subclonado dirigido de los clones pGEM2-CI-1cD12B y pGEM2-CI-1cD4A se siguieron los lineamientos generales descritos en 4.14.1.

La estrategia de secuencia y la secuencia de cDNA de CI-1 se muestran en las Figuras 19 y 20, respectivamente.

5.4. Análisis del extremo 3' del mRNA del gen CI-1

Una vez secuenciado completamente el clon pGEM2CI-1cD12B y al comprobar que este clon no incluía el tracto de polyA característico del extremo 3' del mRNA, se analizaron los otros clones descritos en 5.3.2.

Una vez subclonados en M13mp18, se buscaron por medio del C-test (4.7.) clones de DNA simple cadena que contuvieran insertos complementarios y que por lo tanto permitieran secuenciar cada inserto de los dos extremos. La secuencia de estos puso en

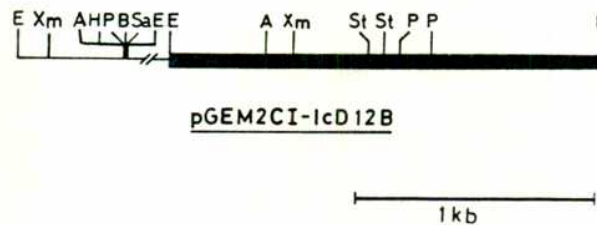


Figura 18: Mapeo con enzimas de restricción del pGEM1-CI-1cD12B

En la fotografía se muestra la electroforesis en gel de agarosa 1%, BrEt 0,5µg/ml, del DNA del pGEM2-CI-1cD12b digerido con: 1) PstI, 2) AvaI, 3) ClaI/SaI, 4) EcoRI, 5) SacI, 6) StuI/HindIII, 7) BamHI, 8) XmnI/SacI, M) Marcadores de peso molecular: 1KB DNA LADDER.

En el esquema se observa el mapa deducido a partir de los datos anteriores. Abreviaturas: E: EcoRI, Xm: XmnI, A: AvaI, H: HindIII, P: PstI, B: BamHI, Sa: SacI, St: StuI.

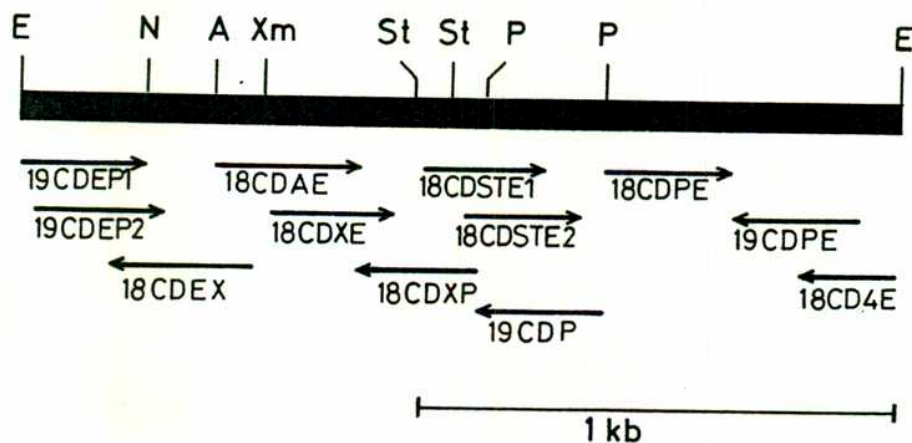


Figura 19: Estrategia de secuenciación del pGEM2-CI-1cDNA12B

Las flechas indican la orientación en que se secuenció cada subclon. El nombre de los mismos está conformado por: vector en que se subclonó (M13mp18 o 19); cD (cDNA) e iniciales de las enzimas de restricción de los extremos de cada inserto orientadas 5' a 3'. Todos los subclones fueron secuenciados por el método de Sanger. N: NcoI; A: AvaI; Xm: XmnI; St: StuI; P: PstI; E: EcoRI

Resultados y Discusión

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATTCTCTCTGTCTCTCACCCTGCTCCCATCGAGCATCTGCTACCTTCACCTTACCTA
      70      80      90      100     110     120
      *      *      *      *      *      *
CTACACCAACGCCCTTGAAGTGAAATCGAAAGAGCTACCAGGCTCAGCGACAACAGCCAT
      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CATGGCCCTCACCCAACTGGCACACTCAGCGTCAGCACTCCTCCCCTTGTGCTGCCCTC
      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
CATTGCAGCCATTCTCGCCTTCGCCATCTTCCAGCGCTACTTCGCGCCGAATCCGCTGTC
      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
CAACCTCCCGATCGTCGGCGAAGAGTACCATGGGTACGAGAAGAAGAGGCAGGCGTATTT
      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
AACCAAAGCAAAGGATCTTTATCTTGAGGGATATACCAAGTTCAAACATGGCCTCTTCCG
      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
CATCGTGACCCCAACCGTAACAGCGTTATTGTGCTTTCCCGAGATTCTTGGACGAGCT
      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAAGAAGTTGCCAGATGATGTGGTGAGCTTTGATGCTGCTAATGATGATAGCATGCACAC
      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
CAAATACACCTTGATCCCGACCCACGAACCTATTCTCCCGCACACCATCAAGACCTCGCT
      550     560     570     580     590     600
      *      *      *      *      *      *
CACGCCCTCGCTCCCTCGCCTCAACCCACAATTATCCGAAGAGGTGCAAATCGCCTTCTC
      610     620     630     640     650     660
      *      *      *      *      *      *
GCAGGAAATTGCCCCCTCATGTCTAGCTCTCCGTCCGACTGGGCCCCCATCAACATCAA
      670     680     690     700     710     720
      *      *      *      *      *      *
CTCCAAGCTCCTGCGCATCGTCGCCAAAGTGTCGGGGCGCGTCTTCATCGGCCCTGAGTT
      730     740     750     760     770     780
      *      *      *      *      *      *
ATGTCACGATGAGCGTTACCTAGAGGCCCGCGTGGGTTATACCGTCAGCGTGATGGAGGC
      790     800     810     820     830     840
      *      *      *      *      *      *
GCAGAGGGCCGTGGAGAGGATGAATCCCTGGGTGAGGCCTATTGCCGCGTGGCGGTTGAA

```

Figura 20: Secuencia del clon de cDNA pGEM2-CI-1cD12B

Resultados y Discusión

850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*
GGAGGTT	CGGAAGTT	GGCGCAGAT	GGAGCGGGAT	GCCACGGCT	TTTCTGAGGCCTGTCGT
910	920	930	940	950	960
*	*	*	*	*	*
CGAGGCCCG	CAGGGAGAAG	CAAAGAAAG	GGGGGAAGAGA	AAGGACAACGACAT	GCTGCAGTG
970	980	990	1000	1010	1020
*	*	*	*	*	*
GTTGATGGATT	CAGCGGAT	CAGGGACAAG	GGGAAGCAACAC	CGGCAAGT	GGGGGAAGACAC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
*	*	*	*	*	*
GACCACAAC	GAGAAAGTT	GGCCAGGTT	GCAGCTCGCTAT	CAGCTTTGCTG	CCATCCATAC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
*	*	*	*	*	*
TACCACGTT	GGTGACGAC	GCACGCGGTTT	TACAGCCTT	GCCGCGGAC	CCCAAGTTGCAAGC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*
CACGCTGCGT	GAAGAGAT	CCAGTCGGT	CCTCCAAGAAC	ACAAGGGCGT	GTTCAACACCTC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
*	*	*	*	*	*
GGCCCTGC	AGGCCAT	GAAGAAGAC	GGATTCCCTT	CCTCAAGGAGAC	GATGCGCTTCCATCC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
*	*	*	*	*	*
TCTGGGAC	AGACCTC	CTTCAACCG	CAAGGTGCT	CAGGACCTT	TGCTCTCTCCAACGGACA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
*	*	*	*	*	*
AGTCATCCC	CAAGGGAT	CGACCAT	CGAAGTCCC	CAACTATGCT	GTCTCGCGGGACCCCGA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
*	*	*	*	*	*
AGCGTATCCC	AACCCGGAT	GTGTTTGAT	CCGTTGAGGTT	CTATAACCT	CCGAAACGAGGC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
*	*	*	*	*	*
TAGGGAGA	AAGGGGAG	GCCGAACAG	GGCGCGT	CGGGCCAGTTT	TGTGAGCGTGAACAAGGA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
*	*	*	*	*	*
GTTTTTGAC	ATTCGGGT	ATGGACGGC	ATGCCTG	CCCCGGCAGGTT	CCTTTCGGGCGAACGA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
*	*	*	*	*	*
AATCAAGAT	GATTTTGG	CGAACCT	GGTGATGAC	GTATGAGAT	GGGACTGGTGGAGGGAGA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*
GACGGAGAG	GTATAGGG	ACTGGGAT	ATTGCGG	CGGGGACC	ATTCCAGATCCGACAAAGGA

Figura 20 (continuación)

Resultados y Discusión

```
      1690      1700      1710      1720      1730      1740
      *        *        *        *        *        *
TGTAATGTTTAGAAAGCTGTAGGGGCCCGGAATGATGTAGCTGTCCGTCCGTTTCGTCCT
      1750      1760      1770      1780      1790
      *        *        *        *        *
AGAGTAGTGGTAGGTGAAAGTTTCATACCTAATGTTGAGAATTGTTGTAACCTCCCG
```

Figura 20 (continuación)

```

1  atactaagccgtaccgacatgaaccagggcgggcacctactggacggatcagcaaccatatcgctcactcagccaagagatctacctacaggtaggtaccttactgtgtactcagt
121 etcaaacatgatgtaaccaaacggttctgatgtttatcggcgattgctcatcggcatcatgtgaggcttgggcaagtccgggtccgtaaaccttccttctggcatgtcgattcgat
241 ggggtgctccgctggcatggactacatccttgaagggagggctgacggacgggcttagaggtagctacgatacaccgaccgacataaccgatcttggaaatgatgtcagattc
361 gtgacgtcgtactgagataaacgcgccCCACCATGGgttttcggggcccagctggccgtggactggaccgctcaggtctgttccatcactagctcacattaagacgaactggggg
481 agagagagaaaaaaaaaagaaaaaaaaatcatggtaagtggaaatgaatcatagtgaaccaacacggttctaccttcgctcggtaaagtaggaaatcacaagggtcacacagccgagacat
601 tgaagagcgaatcaactcaaacccaatgcgaatgcgaatgcgagcgttctactagacttgcattccgtctacactacagattgctacaaggatgagttttagcgcagttacaatcga
721 ctacctatgtactatagatccgtagcacaacgtcgagcggttcgaagcaaacctgaccaacaacgagaataaacaagaagctccaagattaggaccaggaccaccgaagaaaggggtg
841 gatacatacgtactctgcattcaggcaaaccttgatatcatcatcaatgggtataggagatagcagcaaccacctacgccggcatgatggcaagagaaagaaagccctgctactgactgc
961 ctatgtgtcggtagctatggagtcattaggtatcttggatcgaggcagatgtaaccgtcgagtttacacgggattcatcgatgggaatgatggaagaaggaagcccttcgccgattac
1081 tgcctgctctatgttctcagctctcggacggatacatcatgccccccggcagtcagccgatttggctatgtttcacaatctccacttccaccattcgacaatgactcaagatg
1201 ccgtggaaggaacctggaaatgggtgatccatccattgattccgggatgattttgcgaccatcagttggaccagtggtatggagagaaaccgagaccgaacaacccaggggacac
1321 tagtagacgggccagccgttcgtgttggaaatgatcgtcattgctaactgggtctccccaccagaatggacctcattgcggctcttggaaaacacgctaagacggaggtcgttcgtt
1441 cggctgagttgttccgttgaggcgtcaagattgcacagggcatagattcaatcgagtcaggactgggtgtgtgtatagggccgctctcccactcggttgttaggtaagagt

```

```

                1570                1580                1590                1600
                *                  *                  *                  *
1561 agtcagtca TTC TCT CTC TGT CTC TCA CCA CTG CTC CCA TCG AGC ATC
      ...Phe Ser Leu Cys Leu Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ser Ile
                                *
                                10
    1610                1620                1630                1640                1650
    *                  *                  *                  *                  *
    TGC TAC CTT CAC CTT ACC TAC TAC ACC AAC GCC CTT GAA GTG AAA TCG
    Cys Tyr Leu His Leu Thr Tyr Tyr Thr Asn Ala Leu Glu Val Lys Ser
                                *
                                20

```

Figura 21: Secuencia del gen CI-1 y de la cip70:

La secuencia aminoacídica se encuentra alineada bajo su secuencia nucleotídica correspondiente. Las bases que aparecen en minúsculas corresponden a regiones no codificantes. Las bases que aparecen en mayúsculas y resaltadas corresponden a la secuencia consenso descripta para el sitio de iniciación de la traducción. Los puntos suspensivos indican incertidumbre acerca de la finalización e inicio de los exones. Las bases minúsculas resaltadas indican secuencias consenso de *splicing*. La secuencia del oligonucleótido sintético se muestra subrayada. El asterisco remarcado indica el sitio de poliadenilación.

1660	1670	1680	1690	1700	
* AAA GAG CTA CCA Lys Glu Leu Pro	* GGC TCA GCG Gly Ser Ala	* ACA ACA GCC Thr Thr Ala	* ATC ATG GCC CTC Ile Met Ala Leu	* ACC CAA Thr Gln	
30			40		
1710	1720	1730	1740	1750	
* CTG GCA CAC TCA Leu Ala His Ser	* GCG TCA GCA Ala Ser Ala	* CTC CTC CCA Leu Leu Pro	* CTT GTG CTG CCC Leu Val Leu Pro	* TCC ATT Ser Ile	
	50			60	
1760	1770	1780	1790	1800	
* GCA GCC ATT CTC Ala Ala Ile Leu	* GCC TTC GCC Ala Phe Ala	* ATC TTC CAG CGC Ile Phe Gln Arg	* TAC TTC GCG CCG Tyr Phe Ala Pro	* AAT Asn	
		70			
1810	1820	1830	1840		
* CCG CTG TCC AAC Pro Leu Ser Asn	* CTC CCG ATC GTC Leu Pro Ile Val	* GGC GAA GAG Gly Glu Glu	* TAC CAT GGG TAC Tyr His Gly Tyr	* GAG Glu	
80			90		
1850	1860	1870	1880	1890	
* AAG AAG AGG CAG Lys Lys Arg Gln	* GCG TAT TTA Ala Tyr Leu	* ACC AAA GCA Thr Lys Ala	* AAG GAT CTT TAT Lys Asp Leu Tyr	* CTT GAG Leu Glu	
		100			
1900	1910	1920	1930	1940	1950
* GGA TAT ACC AAG Gly Tyr Thr Lys	* gtttgtctcaccctcggatgtggatgtactggcaatagatgag	* gag	* gag	* gag	* gag
110					
1960	1970	1980	1990	2000	2010
* gtgaatcgggcaacaaaaagcaaaaaaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga	* gag	* gag	* gag	* gag	* gag
2020	2030	2040	2050	2060	
* tgctaacactggcgaaaaacacacag	* TTC AAA CAT GGC CTC TTC CGC ATC GTG Phe Lys His Gly Leu Phe Arg Ile Val	* gag	* gag	* gag	
				120	
2070	2080	2090	2100	2110	
* ACC CCC AAC CGT AAC AGC GTT ATT GTC GTT TCC CCG AGA TTC TTG GAC Thr Pro Asn Arg Asn Ser Val Ile Val Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp	* gag	* gag	* gag	* gag	
					130

Figura 21 (continuación)

Resultados y Discusión

```

      *           *           *           *
CCG CTG TCC AAC CTC CCG ATC GTC GGC GAA GAG TAC CAT GGG TAC GAG
Pro Leu Ser Asn Leu Pro Ile Val Gly Glu Glu Tyr His Gly Tyr Glu
      *
      80
1850           1860           1870           1880           1890
*           *           *           *           *
AAG AAG AGG CAG GCG TAT TTA ACC AAA GCA AAG GAT CTT TAT CTT GAG
Lys Lys Arg Gln Ala Tyr Leu Thr Lys Ala Lys Asp Leu Tyr Leu Glu
      *
      100
1900           1910           1920           1930           1940           1950
*           *           *           *           *           *
GGA TAT ACC AAG gtttgtctcaccctcgggatgtggatgtactggcaatagatgag
Gly Tyr Thr Lys
*
110
      1960           1970           1980           1990           2000           2010
*           *           *           *           *           *
gtgaatcgggcaacaaaaagcaaaaaaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga
      2020           2030           2040           2050           2060
*           *           *           *           *
tgctaacactggcgaaaacacacag TTC AAA CAT GGC CTC TTC CGC ATC GTG
Phe Lys His Gly Leu Phe Arg Ile Val
      *
      120
      2070           2080           2090           2100           2110
*           *           *           *           *
ACC CCC AAC CGT AAC AGC GTT ATT GTC GTT TCC CCG AGA TTC TTG GAC
Thr Pro Asn Arg Asn Ser Val Ile Val Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp
      *
      130
      2120           2130           2140           2150
*           *           *           *
GAG CTG AAG AAG TTG CCA GAT GAT GTG GTG AGC TTT GAT GCT GCT AAT
Glu Leu Lys Lys Leu Pro Asp Asp Val Val Ser Phe Asp Ala Ala Asn
      *
      140           150
2160           2170           2180           2190           2200           2210
*           *           *           *           *           *
GAT GAT gtgagttttcttctcttttttgtcgcctcatccaacatgtgcatecttccgt
Asp Asp
      2220           2230           2240           2250           2260           2270
*           *           *           *           *           *
cttccttccaattcttctggccccacattgatctttctctctcctcgcgttttgtcogac
      2280           2290           2300           2310           2320
*           *           *           *           *

```

1660	1670	1680	1690	1700	
* AAA GAG CTA CCA GGC TCA GCG ACA ACA GCC ATC ATG GCC CTC ACC CAA Lys Glu Leu Pro Gly Ser Ala Thr Thr Ala Ile Met Ala Leu Thr Gln *	* GGC TCA GCG ACA ACA GCC ATC ATG GCC CTC ACC CAA Gly Ser Ala Thr Thr Ala Ile Met Ala Leu Thr Gln *	* ACA ACA GCC ATC ATG GCC CTC ACC CAA Thr Thr Ala Ile Met Ala Leu Thr Gln *	* ATC ATG GCC CTC ACC CAA Ile Met Ala Leu Thr Gln *	* ACC CAA Thr Gln *	
30			40		
1710	1720	1730	1740	1750	
* CTG GCA CAC TCA GCG TCA GCA CTC CTC CCA CTT GTG CTG CCC TCC ATT Leu Ala His Ser Ala Ser Ala Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Ser Ile *	* GCG TCA GCA CTC CTC CCA CTT GTG CTG CCC TCC ATT Ala Ser Ala Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Ser Ile *	* CTC CTC CCA CTT GTG CTG CCC TCC ATT Leu Leu Pro Leu Val Leu Pro Ser Ile *	* GTG CTG CCC TCC ATT Val Leu Pro Ser Ile *	* TCC ATT Ser Ile *	
	50			60	
1760	1770	1780	1790	1800	
* GCA GCC ATT CTC GCC TTC GCC ATC TTC CAG CGC TAC TTC GCG CCG AAT Ala Ala Ile Leu Ala Phe Ala Ile Phe Gln Arg Tyr Phe Ala Pro Asn *	* TTC GCC ATC TTC CAG CGC TAC TTC GCG CCG AAT Ala Phe Ala Ile Phe Gln Arg Tyr Phe Ala Pro Asn *	* CAG CGC TAC TTC GCG CCG AAT Gln Arg Tyr Phe Ala Pro Asn *	* TAC TTC GCG CCG AAT Tyr Phe Ala Pro Asn *	* TTC GCG CCG AAT Phe Ala Pro Asn *	
		70			
1810	1820	1830	1840		
* CCG CTG TCC AAC CTC CCG ATC GTC GGC GAA GAG TAC CAT GGG TAC GAG Pro Leu Ser Asn Leu Pro Ile Val Gly Glu Glu Tyr His Gly Tyr Glu *	* CTC CCG ATC GTC GGC GAA GAG TAC CAT GGG TAC GAG Leu Pro Ile Val Gly Glu Glu Tyr His Gly Tyr Glu *	* GAG TAC CAT GGG TAC GAG Glu Tyr His Gly Tyr Glu *	* CAT GGG TAC GAG Tyr His Gly Tyr Glu *		
80			90		
1850	1860	1870	1880	1890	
* AAG AAG AGG CAG GCG TAT TTA ACC AAA GCA AAG GAT CTT TAT CTT GAG Lys Lys Arg Gln Ala Tyr Leu Thr Lys Ala Lys Asp Leu Tyr Leu Glu *	* CAG GCG TAT TTA ACC AAA GCA AAG GAT CTT TAT CTT GAG Gln Ala Tyr Leu Thr Lys Ala Lys Asp Leu Tyr Leu Glu *	* TAT TTA ACC AAA GCA AAG GAT CTT TAT CTT GAG Tyr Leu Thr Lys Ala Lys Asp Leu Tyr Leu Glu *	* AAG GAT CTT TAT CTT GAG Lys Asp Leu Tyr Leu Glu *	* TTT CTT GAG Leu Tyr Leu Glu *	
		100			
1900	1910	1920	1930	1940	1950
* GGA TAT ACC AAG Gly Tyr Thr Lys *	* gtttgtctcaccctcggatgtggatgtactggcaatagatgag *	* caccctcggatgtggatgtactggcaatagatgag *	* cggatgtggatgtactggcaatagatgag *	* gtggatgtactggcaatagatgag *	* gcaatagatgag *
110					
1960	1970	1980	1990	2000	2010
* gtgaatcgggcaacaaaaagcaaaaaaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *	* caacaaaaagcaaaaaaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *	* caaaaaaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *	* aaatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *	* aatatggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *	* atggacgcggaagagaaaagagaaacaagga *
2020	2030	2040	2050	2060	
* tgctaacactggcgaaaacacacag *	* aaaacacacag *	* TTC AAA CAT GGC CTC TTC CGC ATC GTG Phe Lys His Gly Leu Phe Arg Ile Val *	* CAT GGC CTC TTC CGC ATC GTG His Gly Leu Phe Arg Ile Val *	* GGC CTC TTC CGC ATC GTG Gly Leu Phe Arg Ile Val *	
			120		
2070	2080	2090	2100	2110	
* ACC CCC AAC CGT AAC AGC GTT ATT GTC GTT TCC CCG AGA TTC TTG GAC Thr Pro Asn Arg Asn Ser Val Ile Val Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp *	* AAC AGC GTT ATT GTC GTT TCC CCG AGA TTC TTG GAC Asn Ser Val Ile Val Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp *	* GTT ATT GTC GTT TCC CCG AGA TTC TTG GAC Val Ile Val Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp *	* TCC CCG AGA TTC TTG GAC Val Ser Pro Arg Phe Leu Asp *	* CGC AGA TTC TTG GAC Leu Phe Leu Asp *	
				130	

Figura 21 (continuación)

```

                2120                2130                2140                2150
                *                  *                  *                  *
GAG CTG AAG AAG TTG CCA GAT GAT GTG GTG AGC TTT GAT GCT GCT AAT
Glu Leu Lys Lys Leu Pro Asp Asp Val Val Ser Phe Asp Ala Ala Asn
                *
                140
2160                2170                2180                2190                2200                2210
*                  *                  *                  *                  *                  *
GAT GAT gtgagttttcttctcttttttgtcgcctcatccaacatgtgcatccttcogt
Asp Asp

                2220                2230                2240                2250                2260                2270
                *                  *                  *                  *                  *                  *
cttccttccaattcttcttggccccacattgatctttctctctcctcgcggttttgtccgac
                2280                2290                2300                2310                2320
                *                  *                  *                  *                  *
aaatgctaagccgcctag AGC ATG CAC ACC AAA TAC ACC TTG ATC CCG
                Ser Met His Thr Lys Tyr Thr Leu Ile Pro
                *
                160
                2330                2340                2350                2360                2370
                *                  *                  *                  *                  *
ACC CAC GAA CCT ATT CTC CCG CAC ACC ATC AAG ACC TCG CTC ACG
Thr His Glu Pro Ile Leu Pro His Thr Ile Lys Thr Ser Leu Thr
                *
                170
                2380                2390                2400                2410
                *                  *                  *                  *
CCC TCG CTC CCT CGC CTC AAC CCA CAA TTA TCC GAA GAG GTG CAA
Pro Ser Leu Pro Arg Leu Asn Pro Gln Leu Ser Glu Glu Val Gln
                *
                190
2420                2430                2440                2450                2460
*                  *                  *                  *                  *
GCC TTC TCG CAG GAA ATT GCC CCC CTC ATG TCT AGC TCT CCG TCC
Ala Phe Ser Gln Glu Ile Ala Pro Leu Met Ser Ser Ser Pro Ser
                *
                200
                2470                2480                2490                2500
                *                  *                  *                  *
GAC TGG GCC CCC ATC AAC ATC AAC TCC AAG CTC CTG CGC ATC GTC
Asp Trp Ala Pro Ile Asn Ile Asn Ser Lys Leu Leu Arg Ile Val
                *
                220
                2510                2520                2530                2540                2550
                *                  *                  *                  *                  *
GCC AAA GTG TCC GGG CGC GTC TTC ATC GGC CCT GAG TTA TGT CAC
Ala Lys Val Ser Gly Arg Val Phe Ile Gly Pro Glu Leu Cys His
                *
                230
                240

```

Figura 21 (continuación)

	2560		2570		2580		2590							
	*		*		*		*							
GAT	GAG	CGT	TAC	CTA	GAG	GCC	GCC	GTG	GGT	TAT	ACC	GTC	AGC	GTG
Asp	Glu	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Gly	Tyr	Thr	Val	Ser	Val
								*						
								250						
2600			2610				2620			2630			2640	
*			*				*			*			*	
ATG	GAG	GCG	CAG	AGG	GCC	GTG	GAG	AGG	ATG	AAT	CCC	TGG	GTC	AGG
Met	Glu	Ala	Gln	Arg	Ala	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Pro	Trp	Val	Arg
			*										*	
			260											270
			2650				2660			2670				2680
			*				*			*				*
CCT	ATT	GCC	GCG	TGG	CGG	TTG	AAG	GAG	GTT	CGG	AAG	TTG	GCG	CAG
Pro	Ile	Ala	Ala	Trp	Arg	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Lys	Leu	Ala	Gln
								*						
								290						
	2690			2700				2710			2720			2730
	*			*				*		*				*
ATG	GAG	CGG	GAT	GCC	ACG	GCT	TTC	CTG	AGG	CCT	GTC	GTC	GAG	GCC
Met	Glu	Arg	Asp	Ala	Thr	Ala	Phe	Leu	Arg	Pro	Val	Val	Glu	Ala
			*										*	
			300											310
			2740				2750			2760			2770	
			*				*			*			*	
CGC	AGG	GAG	AAG	CAA	AGA	AAG	GGG	GAA	GAG	AAG	GAC	AAC	GAC	ATG
Arg	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Lys	Gly	Glu	Glu	Lys	Asp	Asn	Asp	Met
								*						
								320						
	2780			2790				2800			2810			2820
	*			*				*		*				*
CTG	CAG	TGG	TTG	ATG	GAT	TCA	GCG	GAT	CAG	GGA	CAA	GGG	AAG	CAA
Leu	Gln	Trp	Leu	Met	Asp	Ser	Ala	Asp	Gln	Gly	Gln	Gly	Lys	Gln
			*										*	
			330											340
			2830				2840			2850			2860	
			*				*			*			*	
CAC	GGC	AAG	TGG	GGG	GAA	GAC	ACG	ACC	ACA	ACG	AGA	AAG	TTG	GCC
His	Gly	Lys	Trp	Gly	Glu	Asp	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Lys	Leu	Ala
								*						
								350						
	2870			2880				2890			2900			2910
	*			*				*		*				*
AGG	TTG	CAG	CTC	GCT	ATC	AGC	TTT	GCT	GCC	ATC	CAT	ACT	ACC	ACG
Arg	Leu	Gln	Leu	Ala	Ile	Ser	Phe	Ala	Ala	Ile	His	Thr	Thr	Thr
			*										*	
			360											370
			2920				2930			2940			2950	
			*				*			*			*	
TTG	GTG	ACG	ACG	CAC	GCG	GTT	TAC	AGC	CTT	GCC	GCG	GAC	CCC	AAG
Leu	Val	Thr	Thr	His	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Pro	Lys
								*						
								390						

Figura 21 (continuación)

2960	2970	2980	2990	3000
* TTG CAA GCC ACG CTG CGT GAA GAG ATC CAG TCG GTC CTC CAA GAA Leu Gln Ala Thr Leu Arg Glu Glu Ile Gln Ser Val Leu Gln Glu	* * 400 3010	* * 3020	* * 3030	* * 410 3040
CAC AAG GGC GTG TTC AAC ACC TCG GCC CTG CAG GCC ATG AAG AAG His Lys Gly Val Phe Asn Thr Ser Ala Leu Gln Ala Met Lys Lys				
		420 3070		3080
3050	3060			3090
* ACG GAT TCC TTC CTC AAG GAG ACG ATG CGC TTC CAT CCT CTG GGA Thr Asp Ser Phe Leu Lys Glu Thr Met Arg Phe His Pro Leu Gly	* * 430 3100	* * 3110	* * 3120	* * 440 3130
CAG ACC TCC TTC AAC CGC AAG GTG CTC AGG ACC TTT GCT CTC TCC Gln Thr Ser Phe Asn Arg Lys Val Leu Arg Thr Phe Ala Leu Ser				
		450 3160		3170
3140	3150			3180
* AAC GGA CAA GTC ATC CCC AAG GGA TCG ACC ATC GAA GTC CCC AAC Asn Gly Gln Val Ile Pro Lys Gly Ser Thr Ile Glu Val Pro Asn	* * 460 3190	* * 3200	* * 3210	* * 470 3220
TAT GCT GTC TCG CGG GAC CCC GAA GCG TAT CCC AAC CCG GAT GTG Tyr Ala Val Ser Arg Asp Pro Glu Ala Tyr Pro Asn Pro Asp Val				
		480 3250		3270
3230	3240		3260	
* TTT GAT CCG TTG AGG TTC TAT AAC CTC CGA AAC GAG GCT AGG GAG Phe Asp Pro Leu Arg Phe Tyr Asn Leu Arg Asn Glu Ala Arg Glu	* * 490 3280	* * 3290	* * 3300	* * 500 3310
AAG GGG GAG GCC GAA CAG GCG GCG TCG GGC CAG TTT GTG AGC GTG Lys Gly Glu Ala Glu Gln Gly Ala Ser Gly Gln Phe Val Ser Val				
		510 3340		3350
3320	3330			3360
* AAC AAG GAG TTT TTG ACA TTC GGG TAT GGA CGG CAT GCC TGC CCC Asn Lys Glu Phe Leu Thr Phe Gly Tyr Gly Arg His Ala Cys Pro	* * 520			* * 530

Figura 21 (continuación)

	3370		3380		3390		3400							
	*		*		*		*							
GGC	AGG	TTC	TTT	GCG	GCG	AAC	GAA	ATC	AAG	ATG	ATT	TTG	GCG	AAC
Gly	Arg	Phe	Phe	Ala	Ala	Asn	Glu	Ile	Lys	Met	Ile	Leu	Ala	Asn
								*						
	3410		3420				3430		3440				3450	
	*		*				*		*				*	
CTG	GTG	ATG	ACG	TAT	GAG	ATG	GGA	CTG	GTG	GAG	GGA	GAG	ACG	GAG
Leu	Val	Met	Thr	Tyr	Glu	Met	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	Glu	Thr	Glu
			*										*	
			550										560	
			3460				3470						3480	
			*				*						*	
AGG	TAT	AGG	GAC	TGG	GAT	ATT	GCG	GCG	GGG	ACC	ATT	CCA	GAT	CCG
Arg	Tyr	Arg	Asp	Trp	Asp	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Ile	Pro	Asp	Pro
								*						
								570						
	3500		3510				3520				3530		3540	
	*		*				*				*		*	
ACA	AAG	GAT	GTA	ATG	TTT	AGA	AAG	CTG	TAG		GGGCCC	GGAATG	GATG	
Thr	Lys	Asp	Val	Met	Phe	Arg	Lys	Leu	---					
				*										
			580											

*

3541 TAGCTGTCCGTCGGTTCCTAGAGTAAGTGGTAAAGTTTCATACCTAATGTTGAGAATTGTTGTAACCTCCGgatagtcctcctcattcaccaaagtgagcagcaacatgat

3661 gagcaaccgcggtggcatNaccccagaaatcggcacataaccgggcataaccgattcctcttccgggtcaacagcagtagtagtagtagacggCaaaggatgggatacggtagagctctgac

3781 cagctccacctcttcttcttcttggcttggcggcttgatatacgcacaccagaccgaactgctgcgtcggggaggttggggatgtccgccaggctggacgtgaagcggcaccgggtgatg

3901 gggctggcgtgatggagagtcacaaggtggcgttgaaggattccatgctcggcgttccactgtccgggttctgttcatggattgcacgcggccgactcgtccatcagtgaggcggacttt

4021 gatccgcggggatggtttcttggtagcacatectggatagtcgggatacgtcggcgggtggctggcaactttgaggacgatgttactccagcaccggggatgacttgcgc

4141 gttgttgactggggactgttgggggggggttcgatgtgatgaccaggatggaacttgaagcaagcaggggaagtgaatgcgttggctgttcgccctttctcagtgatggcttcag

4261 tgatcgtgacggggcatgcctggtgagggggcgggNgcgggggCagtgttgagtggaacttggtaacctctacctctacaggaccctccaggtcagtaaccttaagcttggcgg

4381 gcacgtgcgtaatacagttactgctcctcccctccatgctcccgaactttcttcttggacettggcgacatcgggcccctcccctccatcggccgtcagtcacggaaccccgaagcac

4501 tccactcgtccactcaactccNttgttgc

Figura 21 (continuación)

Resultados y Discusión

evidencia que el clon 18CI-1cD4A contenía un tracto de 12 timidinas a partir del sitio 3619 en la secuencia genómica (ver el autoradiograma en el Apéndice).

Según se puede apreciar en la Figura 21, la región 3' no codificante del gen CI-1 sería de 93 pb.

5.5. Análisis del extremo 5' del mRNA del gen CI-1

5.5.1. Secuenciación del RNA del gen CI-1

Como resultado del análisis de los clones de cDNA disponibles, se comprobó que ninguno de ellos se extendía hasta algún sitio de iniciación de la traducción que justificara, un mensajero codificante para una proteína de peso molecular de alrededor de 70 kD (el peso molecular calculado a partir de la secuencia de cDNA que se muestra en la Figura 20 fue de 63.669 kD).

Es por lo expuesto anteriormente que se decidió mapear el extremo 5' del gen CI-1 sobre el RNA. Para ello, se eligió una secuencia de 21 nucleótidos que estuviera a 10 nucleótidos del extremo 5' del clon 18CIcD12B, para sintetizar un oligonucleótido complementario a ella. Este oligonucleótido, una vez sintetizado y marcado con (³²P) se utilizó como *primer* para el ensayo de síntesis de cDNA simple cadena a partir de RNA polyA⁺ inducido con cicloheximida (ver 4.14.3.2.).

Como control previo al ensayo, se sembró el oligonucleótido marcado en un gel de poliacrilamida 18% analítico y desnaturizante, se expuso el gel con película autoradiográfica durante 15 min, tras lo cual se observó la existencia de una banda intensa a la altura correspondiente a un oligonucleótido de 21 b y bandas de intensidad muy débil (aproximadamente 1% de la inten-

Resultados y Discusión

sidad de la banda de 21 b), que correspondían a los oligonucleótidos intermediarios de la síntesis química (resultados no mostrados).

Una vez realizada la síntesis de cDNA utilizando el oligonucleótido de 21b como *primer*, se corrió un gel de poliacrilamida 10% desnaturalizante, el cual o bien se fijó, se secó y se puso a exponer, o lo utilizó para extraer la banda de cDNA para su posterior secuenciación

El resultado de este ensayo se observa en la figura 22.

En la Figura 22A se observan a las 2 hs de exposición, cuatro bandas de aproximadamente 73, 75, 77 y 83 b y de intensidad creciente en forma inversamente proporcional al tamaño de las mismas, lo cual muy probablemente, sería la consecuencia de la aparición de *stops* inespecíficos de la transcriptasa reversa. Esto sería debido posiblemente a la existencia de estructuras secundarias no desarmadas a pesar del tratamiento del RNA con hidróxido de metil mercurio y a la síntesis de cDNA en presencia de Actinomicina D.

Para confirmar que no hubieran bandas de mayor tamaño de muy baja intensidad debido al hecho de que sólo existieran muy pocas moléculas de cDNA en las cuales la transcriptasa reversa hubiera logrado sortear esos *stops*, se dejó exponiendo el gel durante una semana (Figura 22B). Al no encontrarse bandas de mayor tamaño, se supuso que el extremo 5' del mensajero debería estar aproximadamente a 83 nucleótidos del oligonucleótido de 21 b.

Con el objeto de ampliar las secuencias conocidas del mensajero hacia el extremo 5', se extrajeron las dos bandas más fuertes del cDNA sintetizado a partir del oligonucleótido de 21b (de 73 y 75b) de un gel de poliacrilamida 10%, y se secuenciaron por el método de Maxam y Gilbert (ver 4.14.3.3.).

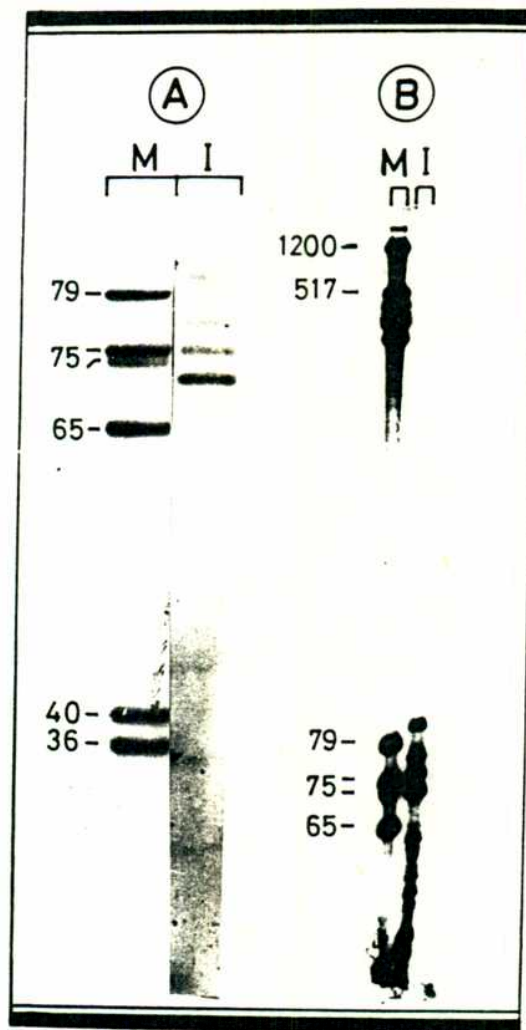


Figura 22: Síntesis de cDNA a partir del oligonucleótido sintético de 21 b

A y B. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10%, 7M urea, del ensayo de *primer extention* realizado a partir de mRNA polyA⁺ inducido y del oligonucleótido sintético de 21b. M) Marcadores de peso molecular: pG1BH-HinfI; I) ensayo de *primer extention*. Se expuso por 2 hs a -70°C sin pantalla intensificadora (A), y por 1 semana a -70°C con pantalla intensificadora (B).

Resultados y Discusión

La secuenciación de los fragmentos contenidos en las mismas permitió confirmar los datos obtenidos por la secuenciación de cDNA. Si bien los fragmentos de mayor tamaño hubieran sido más útiles para extenderse hacia el 5', tenían muy baja actividad específica como para ser secuenciados.

5.5.2. Putativo sitio de iniciación de la traducción

A partir de la base 389 del clon genómico, comienza un tracto de 9 nucleótidos: **CCACCATGG**, que conserva un 93% de homología con la secuencia consenso descrita para el codón de iniciación de la traducción en eucariotes superiores: **GCC(A/G)CCATGG** (Kozak, 1987). Por otro lado, no se encontró ninguna región con una homología significativa respecto de la secuencia consenso del codón de iniciación deducido a partir de las secuencias de 20 genes de *Neurospora crassa*, la cual es: **(A/G)TCA(A/G)AATGG**.

Para confirmar o descartar que el ATG de la posición 394 sea el codón de iniciación, se digirió el pGEM2-30A, con la enzima de restricción NcoI, cuya secuencia es: 5' **C*CATGG3'** y se marcó radioactivamente por rellenado de extremo 5' protruyente. Luego, se recortó con la enzima de restricción KpnI (tiene un sitio de corte en la posición 102, otro en la posición 974, y otro en la posición 4330), se separó el fragmento de 568pb de un gel de poliacrilamida nativo, y se llevó a cabo un ensayo de protección contra la nucleasa S1, según se describe en 4.10.1. Luego, se corrió un gel de poliacrilamida 10% desnaturizante, cuyo autoradiograma se muestra en la figura 23. Según se puede apreciar, existe una protección de un fragmento de aproximadamente 75pb. En la figura 24, se representa este exón como una caja llena, flanqueada por dos cajas vacías que dan cuenta de la imposibilidad de hacer alguna aseveración acerca de la extensión de la secuencia 5' no-codificante y de la terminación exacta de este primer exón.

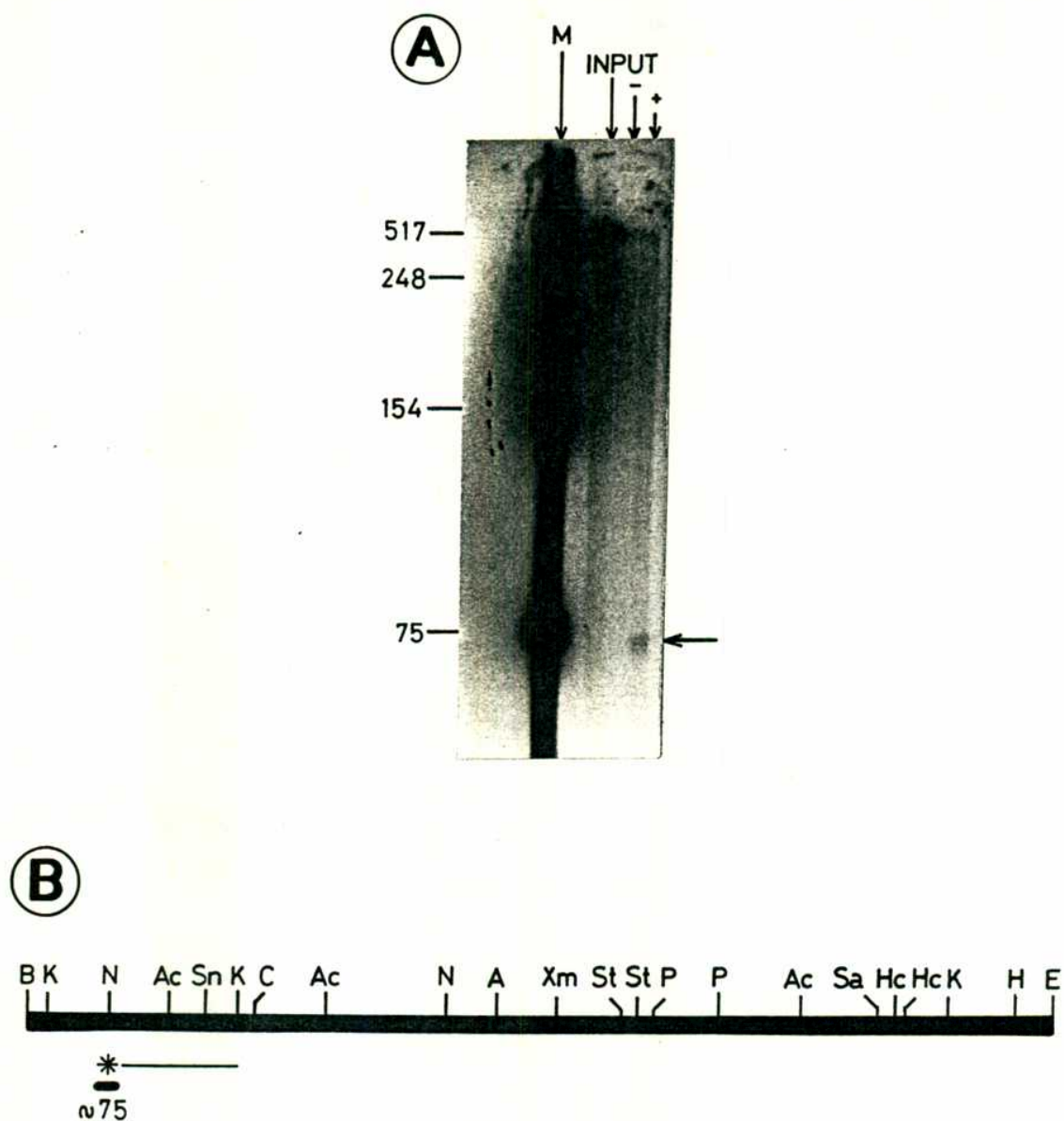


Figura 23: Confirmación de posible sitio de iniciación de la traducción por ensayo de S1

- A) Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%, 7M urea, M) marcadores de peso molecular pFH3-HinfI; INPUT: fragmento [³²P]*NcoI-KpnI; -: más 15µg de tRNA; +: más 15µg de RNA total inducidos por cicloheximida. La flecha indica el fragmento protegido de aproximadamente 75b.
- B) Esquema del ensayo donde se representa con un asterisco el sitio NcoI marcado con [³²P] y con una caja llena el fragmento protegido.

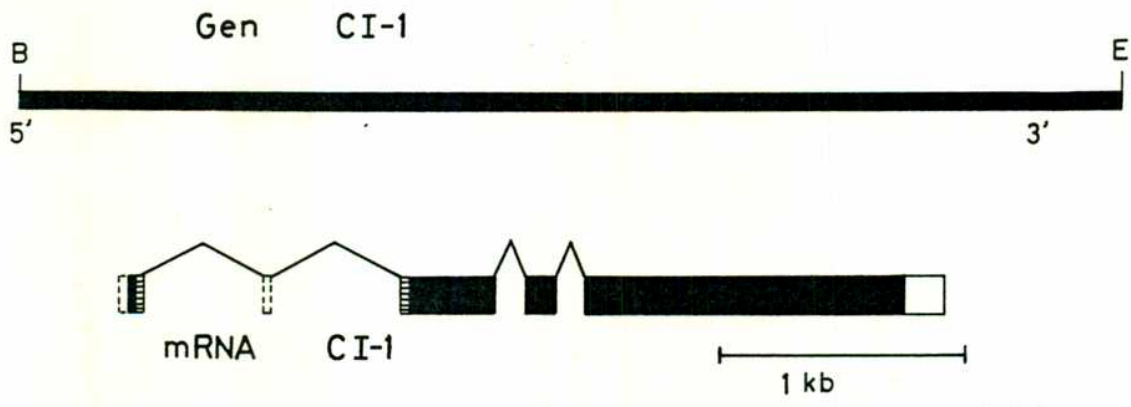


Figura 24: Estructura del gen CI-1

En la parte superior de la figura se representa el fragmento genómico de 4,4kb que contiene al gen CI-1. En la parte inferior el mRNA del mismo. Los exones están representados por cajas llenas, la región 3' no codificante por caja vacía y las cajas punteadas y rayadas representan zonas no confirmadas.

5.6. **ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DEL GEN CI-1**

En la Figura 24 se muestra la organización del gen CI-1 de acuerdo al análisis de los datos emergentes de la secuenciación del mismo, del estudio de la unidad transcripcional realizado por medio de mapeo con la nucleasa S₁ y la secuenciación de cDNA correspondiente. El estudio del extremo 5' por síntesis de cDNA a partir del oligonucleótido específico y la confirmación del posible codón de iniciación de la traducción, permitió completar el esquema del gen CI-1.

5.6.1. **Distribución de intrones**

Con respecto a los intrones, se puede afirmar que existirían por lo menos 3, los cuales se describen a continuación.

Intrón I

La longitud de este intrón de la figura 24 es totalmente especulativa, ya que no se puede descartar que exista un exón pequeño entre la posición 473 y la 1571, cosa que parecería probable, ya que hasta el momento no se ha descrito ningún intrón de hongos mayor de 500pb (ver más adelante).

Intrón II

A diferencia del intrón I, este intrón presenta las características descritas para la mayoría de los intrones de *Neurospora crassa*, un tamaño de 127pb, un sitio 5' de *splicing* de

secuencia **GTTTGT** y una secuencia consenso interna **TGCTAACA** situada a 14b del sitio 3' de *splicing* **CAG** (ver más adelante secuencias consenso de *splicing* de *N. crassa*).

Intrón III

Las características de este intrón también coinciden con las descritas para *N. crassa*. Tiene un tamaño de 129pb, un sitio 5' dador de secuencia **GTGAGT** y una secuencia consenso interna **TGCTAAGC** situada a 5b del sitio 3' acceptor **TAG**.

5.6.2. Secuencias consenso de *splicing*

De los 30 intrones descritos hasta el momento en *Neurospora crassa*, la mayoría tiene un tamaño que oscila entre 50 y 130pb, no habiéndose descrito ninguno de más de 520pb (Hawkins, 1988; Gurr *et al.*, 1987). El análisis de las secuencias 5' dadoras y de las secuencias consenso internas cercanas al sitio 3' acceptor, muestran una considerable variabilidad, lo que apoya la hipótesis que sostiene que los intrones de hongos filamentosos presentan una mayor semejanza con los intrones de eucariotes superiores, que con los de levaduras (Bowman *et al.*, 1988).

En la figura 25 se presentan las secuencias consenso y las longitudes de 13 intrones de *Neurospora crassa*, entre los cuales están los del gen CI-1.

De los datos de la figura 25 se puede concluir que existen por lo menos 12 secuencias distintas para el sitio 5' dador y que en las secuencias consenso internas se conserva invariablemente la secuencia **CT(A/G)A**.

	5'	longitud 3' (pb)
vna-1	GTAAAGC.....103.....TGCTGACA.....11.....TAG.....131	
vna-1	GTAAAGG.....36.....GGCTAACC.....10.....TAG.....63	
vna-1	GTAAAGT.....52.....TGCTAATA.....5.....CAG.....74	
vna-2	GTAAAGT.....36.....TGCTGACA.....5.....TAG.....58	
vna-2	GTAGAT.....35.....CGCTGATA.....7.....CAG.....59	
vna-1	GTATGG.....36.....AGCTGAGA.....7.....TAG.....60	
vna-1	GTATGT.....49.....GGCTAACC.....14.....TAG.....80	
vna-1	GTGAGG.....30.....AACTGACC.....8.....CAG.....55	
vna-1	GTGCGT.....38.....CGCTAACC.....10.....AAG.....65	
vna-2	GTGTGT.....40.....AGCTGACA.....14.....CAG.....71	
vna-2	GTGGGT.....32.....GTCTAACA.....7.....CAG.....56	
cip70 I	GTTTGT.....96.....TGCTAACA.....14.....CAG.....127	
cip70 II	GTGAGT.....109.....TGCTAAGC.....5.....TAG.....129	

Figura 25: Características de distintos intrones de *Neurospora crassa*

Se muestran remarcados los dos intrones totalmente caracterizados del gen CI-1.

5.7. **ANÁLISIS DE LA *cip70* DEDUCIDA A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL mRNA DEL GEN *CI-1***

La secuencia aminoacídica de la *cip70* deducida a partir de la secuencia de cDNA y que se muestra en la figura 21, dio un peso molecular calculado de 63.669 si se considera desde el nucleótido 1571 hasta el codón de terminación.

Con el objeto de buscar secuencias conservadas con función biológica conocida o dominios característicos a partir de homologías con otras proteínas, esta secuencia se comparó por computadora con el universo de proteínas reportadas hasta el momento, que figuran en el GENBANK.

Se comprobó que la *cip70* presenta homologías significativas con tres integrantes de la superfamilia del citocromo P450. Una descripción detallada del sistema del citocromo P-450 se presenta en la Introducción.

5.7.1.1. **Homología del mRNA de *CI-1* con integrantes de la superfamilia del Citocromo P-450**

Se ha comprobado que en todos los citocromos P450 que se han clonado y secuenciado, ya sean de mamíferos, de levadura (P450 *lan*) y de *Pseudomonas* (P450 *cam*), existe un dominio altamente conservado, que contiene una secuencia de 7 aminoácidos situada cerca del COOH terminal, la cual sería la responsable de la formación del hueco donde se acomodaría el grupo hemo para permitir la unión del Fe con una cisteína altamente conservada (Nebert *et al*, 1987).

A su vez, estudios realizados sobre los datos de las secuencias de 67 proteínas P450, parecen demostrar que la región ubicada entre el residuo 180 y el 320, correspondería al dominio

Resultados y Discusión

que incluye el sitio de unión específica del sustrato, que además presenta gran divergencia entre los integrantes de las distintas familias.

Por otro lado, entre los distintos citocromos P-450 de mamíferos, se conserva un segundo dominio ubicado en la región NH₂ terminal y que está constituido por un tracto hidrofóbico el cual determinaría su inserción en la membrana. En el caso del P450cam de *Pseudomona putida*, este dominio no está conservado ya que se trata de una enzima soluble.

La comparación de la cip70, gentilmente realizada por el Dr. Raúl Andino en el Whitehead Institute for Biomedical Research, Mass., U.S.A., con las secuencias disponibles hasta el momento en el GENBANK, arrojó los resultados que se muestran en las Figuras 26A, 26B y 26C.

Como se puede observar, en la Figura 26A, el mRNA de CI-1, presenta una homología del 49,2%, con una región de 180 aminoácidos situada a 11 residuos del extremo carboxilo terminal del mRNA del gen RATCYPLA (citocromo P450-LA-omega de rata; ácido láurico omega hidroxilasa. Las líneas entre dos residuos denotan identidad o presencia de sustituciones conservativas. El mRNA del gen CI-1 presenta dos inserciones de un residuo cada uno, y una de 17 residuos, tras las cuales se mantienen las zonas homólogas.

De la comparación con el mRNA del citocromo P-450, S-mephentoin 4-hydroxylase humano (HUMCYPmp)(Figura 26B), se comprobó la existencia de una homología del 48% con una región de 135 aminoácidos ubicada en el extremo COOH terminal del HUMCYPmp. En este caso también existen 3 *gaps*, 2 de un residuo y uno de 15, que están en las mismas zonas aunque no coinciden exactamente con los encontrados en la comparación con el RATCYPLA.

Por último, el mRNA de CI-1 presenta una homología del 44,98% con una región de 196 aminoácidos ubicada en el extremo carboxiterminal del mRNA del gen RABCY45g (citocromo P450- laura-

mRNA de citocromo P-450-LA-omega de rata (ácido láurico omega-hidroxilasa)

Porcentaje de similitud: 49.180

		* * * * *	
cip70	352	AISFAAIHTTTLVTTHAVYSLAADPKLQATLREBIQSVLQEHKGVNTSA	401
Ratcypla	320	TFMFEHDTTASGVSWIFYALATHPKHQQRCEEVQSVLGDGSSI.TWDH	368
		* * * * *	
cip70	402	LQAMKKTDSEFLKETMREHPLGQTSFNKVLRTFALSNGQVIPKGSTIEVP	451
Ratcypla	369	LDQIPYTTMCIKEALRLYP.PVPGIVRELSTSVTFPDGRSLPKGIQVTL	417
		* * * * *	
cip70	452	NYAVSRDPEAYPNPDVFDPLRFYNLRNEAREKGEAEQGASGQFVSVNKEE	501
Ratcypla	418	TYGLHHNPKVWPNEVEFDPSRF.....APDSPRHSHSF	450
		* * * * *	
cip70	502	LTFGYGRHACPGRFFAANEIKMILANLVMTYEMGLVEGETERYRDWDIAA	551
Ratcypla	451	LPFSGGARNCIGKQFAMSEMKVIVALTLRFE LLPDPTKVPIPLPRLVLK	500
cip70	552	GT 553	
Ratcypla	501	SK 502	

Figura 26A: Comparación de aminoácidos entre la cip70 y el citocromo P450-LA-omega de rata

Las líneas verticales señalan identidad de aminoácidos o sustituciones conservativas. Los puntos suspensivos indican los gaps existentes en los dos mRNAs.

mRNA de citocromo P450mp de hígado humano (S-mefentoin 4-hidroxilasa
Porcentaje de similitud: 48.000

			*		*		*		*		*
cip70	350	QLAISFAAIHTTTTLVTTHAVYSLAADPKLQATLREEIQSVLQEHKGVFNT									399
Humcypmp	286	AVDLEFGAGTETTSTTLRYALLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSPCMQ									335
			*		*		*		*		*
cip70	400	SALQAMKKTDSFLKETMRFHPLGQTSFNKVLRTFALSNGQVIPKGSSTIE									449
Humcypmp	336	DRSH.MPYTDAVVHEVQRCIDLLPSTSLPHAVTCDIKERN.YLIPKGTTL									383
			*		*		*		*		*
cip70	450	VPNYAVSRDPEAYPNPDVFDPLRFYNLRNEAREKGEAEQAGSQFVSVNK									499
Humcypmp	384	ISLTSVLHDNKEFPNPEMFDPHHFLD.....EGDNFKKSK									418
			*		*		*		*		*
cip70	500	EFLTFGYGRHACPGREFFAANEIKMILANLVMTYEMGLVEGETERYRWDI									549
Humcypmp	419	YFMFESAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVV									468
			*								
cip70	550	AAGTIPDPTKDVMFRKL									566
Humcypmp	469	NGFASVPPFYQLCFIPV									485

Figura 26B: Comparación de aminoácidos entre la cip70 y el citocromo P450mp de hígado humano

Las líneas verticales señalan identidad de aminoácidos o sustituciones conservativas. Los puntos suspensivos indican los *gaps* existentes en los dos mRNAs.

mRNA de citocromo P450 (laurato omega-1 hidroxilasa) de conejo

Porcentaje de similitud: 44.898

		* * * * *	
cip70	352	AISFAAIHTTTLVTTHAVYSLAADPKLQATLREEIQSVLQEHLKGVFNTSA	401
Rabcy45g	293	DVFMAGTETTSTTLRYGLLLMKHPEVIAKVQEEIERVIGRHRSPCMQDR	342
		* * * * *	
cip70	402	LQAMKKTDSFLKETMRFHPLGQTSFNRRKVLRTFALSNGQVIPKGSTIEVP	451
Rabcy45g	343	SR.MPYTDATVHEIQRYINLIPNNVPHTTICNLKFRN.YLIPKGTDLVLS	390
		* * * * *	
cip70	452	NYAVSRDPEAYPNPVDPLRFYNLRNEAREKGEAEQGASGQFVSVNKEF	501
Rabcy45g	391	LSSVLHDDKEFPNPDFDPGHFLDASGNFRKSD.....YF	425
		* * * * *	
cip70	502	LTFGYGRHACPGRFFAANEIKMILANLVMTYE.MGLVEGETERYRDWDIA	550
Rabcy45g	426	MPFSTGKRVCVGEALARMELFLFLTAILQNFTPKPLVNPNNVDENPFSSG	475
		*	
cip70	551	AGTIPDPTKDV MFR 564	
Rabcy45g	476	IVRVPPLYRVSEFIP 489	

Figura 26C: Comparación de aminoácidos entre la cip70 y el citocromo P450 (Laurato omega-1 hidroxilasa) de conejo

Las líneas verticales señalan identidad de aminoácidos o sustituciones conservativas. Los puntos suspensivos indican los gaps existentes en los dos mRNAs.

to omega-1 hidroxilasa de conejo)(Figura 26C). Aquí se presentan 4 *gaps*, cuatro de 1 residuo cada uno, y uno de 15 aminoácidos (éste está ubicado aproximadamente en las mismas zonas que los *gaps* de 17 y 15 aminoácidos descriptas en las dos comparaciones anteriores).

5.7.1.2. Conservación en el mRNA del gen CI-1 del sitio activo de los citocromos P450

Como se mencionó anteriormente, en absolutamente todos los citocromos P450 descriptos hasta el momento, se encontró altamente conservada la región de 7 aminoácidos que incluye la cisteína responsable de la unión al Fe del grupo hemo. Esta secuencia se encontró en el mRNA del gen CI-1 a 55 aminoácidos del extremo carboxilo terminal del mismo. En la Figura 27 se observa la alineación del CI-1 con respecto a las regiones conservadas de los citocromos P450 de las distintas especies en que fueron descriptas.

Como se puede apreciar, esta región del CI-1 coincide perfectamente con el perfil de los otros citocromos P450, ya que los residuos que están conservados en todos los citocromos también lo están en el CI-1.

En general, como se describió anteriormente, los nuevos clones de citocromos P450 surgieron a partir de la búsqueda con otros genes de citocromos P450 relacionados. A partir de este hecho, la confirmación de la identidad de un nuevo gen se basó fundamentalmente en la presencia de los dos dominios funcionales conservados: el tracto hidrofóbico en el NH₂ terminal y el sitio activo en el COOH terminal.

El hecho de que el CI-1 contenga el sitio activo de los citocromos P450 y que, además, conserve una homología significativa (de 44% a 49%) para un tracto de 200 aminoácidos con otros

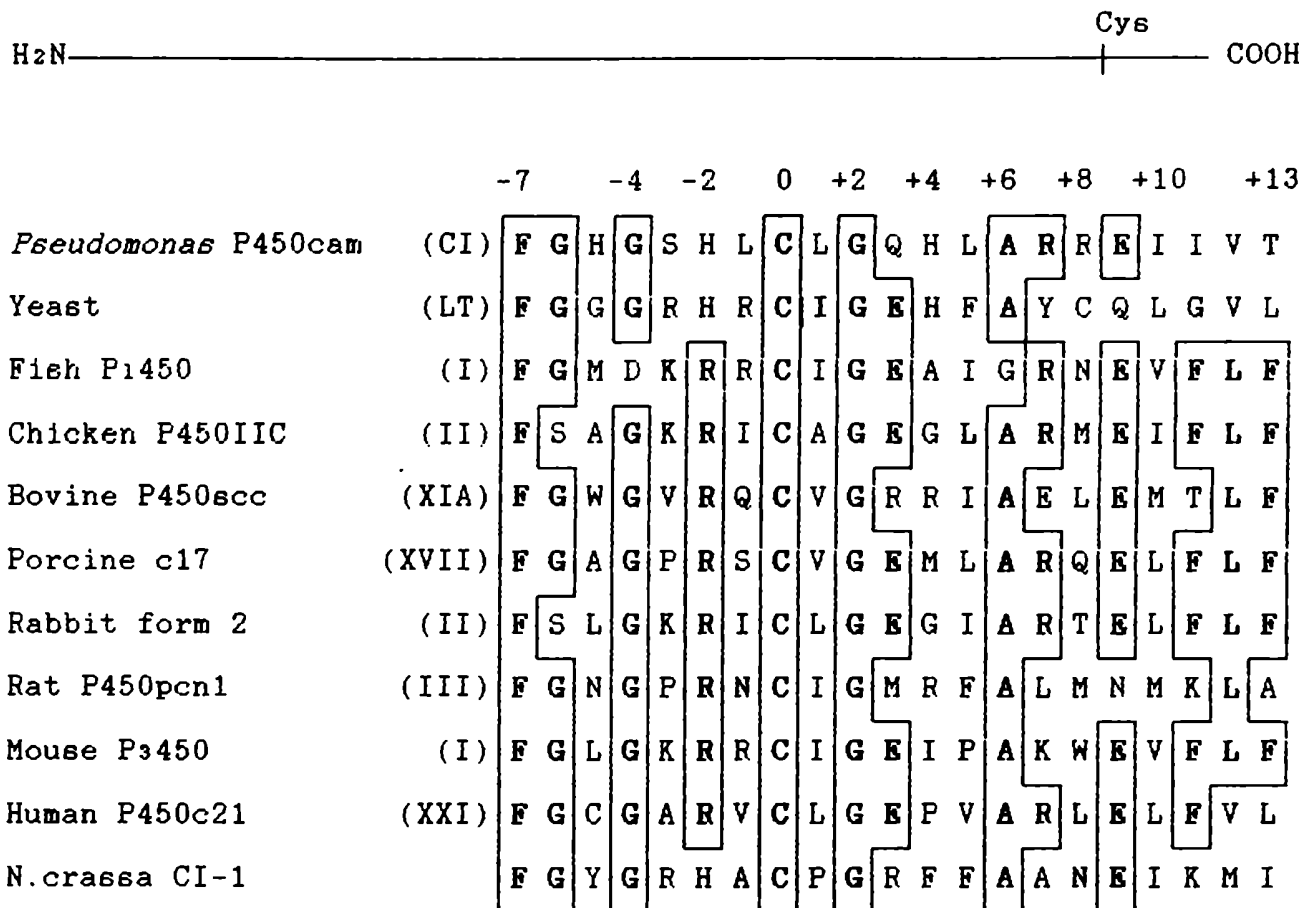


Figura 27: Comparación de la región del sitio activo de distintos citocromos P450

Los números posicionan los aminoácidos ubicados a ambos lados de la cisteína responsable de la unión al Fe del hemo, la cual se representa con 0. Las cajas comprenden aminoácidos idénticos.

Resultados y Discusión

citocromos P450s (ver Figuras 26A, 26B y 26C), sería un argumento de peso para considerar al CI-1 como un integrante de una familia de genes que codifican para los citocromos P450 de *Neurospora crassa*. Sin embargo, esta afirmación deberá ser confirmada por la existencia de alguna actividad enzimática de la *cip70* característica de los citocromos P-450.

Hasta el momento no había sido clonado ningún citocromo P450 de eucariotes inferiores, excepto el *lan* de levaduras (Kalb *et al*, 1986).

Con respecto a los citocromos P450 homólogos al CI-1, el RATCYPLA es el P450IVA1 según la nueva nomenclatura (Nerbert *et al*, 1987), y pertenece a la familia P450IV (ver tabla II), la secuencia completa de su cDNA demostró que conserva una homología igual o menor al 33% con cualquiera de los integrantes de alguna de las otras siete familias de citocromos de mamíferos (Hardwick *et al*, 1987). Este gen se induce por el clofibrato (un hipolipídico) (Reddy *et al*, 1980). En general, la vía metabólica de oxidación de ácidos grasos como fuente de energía, mediada por los citocromos P450 (ácido láurico hidroxilasa) es una vía secundaria, salvo en el caso de ayuno, en donde adquiere una importancia metabólica destacable.

En cuanto al gen de RABCY45g, responde al mismo inductor, y tiene homología significativa con el de RATCYPLA (P450IVA1), por lo que debe ser incluido en la misma familia.

Con respecto al gen HUMCYPmp (P450IIC9), es inducido por S-mefentoína (5-fenil-5 etil-N-metilhydantoína). Esta droga, que es un anticonvulsivo, sufre la N-demetilación y una 4-hidroxilación catalizada por el producto del gen HUMCYPmp (Shimada *et al*, 1986).

Resulta aventurado tratar de adjudicar una función a la *cip70* ante la agresión sufrida por el tratamiento con cicloheximida a partir de su homología con los respectivos citocromos P450

Resultados y Discusión

y la naturaleza química de estos inductores. De todos modos esto se discutirá más profundamente en las conclusiones.

5.8. Perfil de inducción de mRNAs en la cepa M246 deprivada de aminoácidos aromáticos

Con el objeto de inhibir la síntesis proteica en condiciones más "fisiológicas", se deprivó de L-Phe, L-Trp, L-Tyr, PAB e inositol a la cepa M246 (qa2-, arom9-), incapaz de crecer sin la suplementación del medio de cultivo con los mismos (ver 4.3.4.). Se purificó RNA de dicha mutante crecida en medio de cultivo suplementado con aminoácidos aromáticos y posteriormente transferida ya sea a un medio con o sin el agregado de los mismos. Se realizó un ensayo de *Northern blot* y se hibridó ya sea con el inserto EcoRI-BamHI del plásmido pGEM2-30A o con las sondas correspondientes a los genes que codifican para las proteínas inducibles por cicloheximida de 27 kD y de 31 kD (Grotewold *et al*, 1988). Los resultados se muestran en la Figura 28.

Como se puede apreciar en la misma, sólo fueron inducidos los mensajeros homólogos a las sondas correspondientes a las proteínas de 27 kD y de 31 kD, mientras que el mRNA del CI-1 no lo fue. Esto podría deberse a una diferencia en la sensibilidad del mecanismo de inducción del gen CI-1 a la inhibición de la síntesis proteica, o estaría evidenciando que el gen CI-1 y los genes de las proteínas de 31 kD y 27 kD se inducirían por mecanismos diferentes (ver Conclusiones).

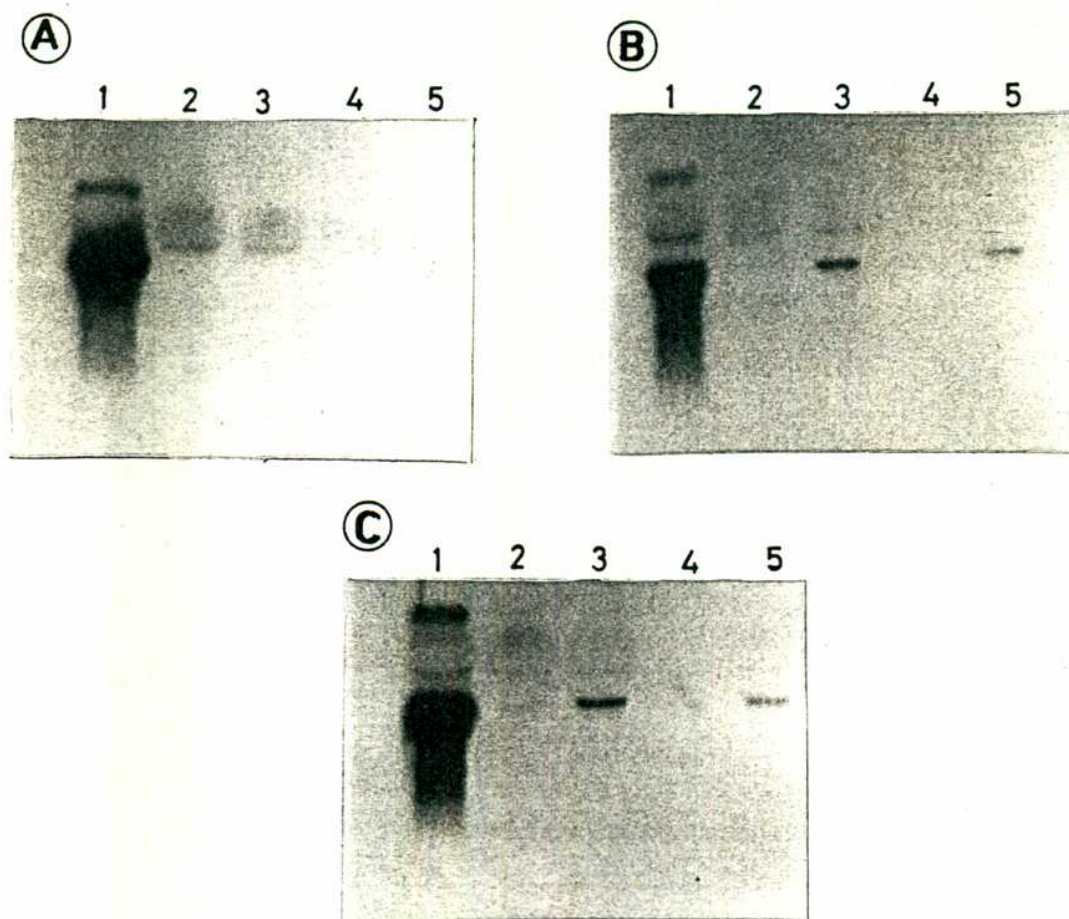


Figura 28: Efecto del ayuno de aminoácidos aromáticos de la cepa de *N. crassa* 246 sobre la expresión de algunos genes inducibles por cicloheximida

Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, formaldehído 6% de distintos RNAs de *N. crassa* provenientes de cultivos de 60 hs suplementados con aminoácidos aromáticos tratados luego de la manera que se indica. 1) inducción por 6 hs con cicloheximida 2 μ M, 2) 12 hs más aminoácidos aromáticos, 3) 12 hs sin aminoácidos aromáticos, 4) 25 hs más aminoácidos aromáticos, y 5) 25 hs sin los mismos. Luego de corrido el gel, se transfirió a Gene Screen y se hibridó con distintas sondas: A) Hibridado con el pGEM2-30A (gen de cip70); B) Hibridado con el EBBHH11 (gen de cip31); C) Hibridado con el EBBHH29 (gen de cip27)

Para todos los ensayos la exposición fue por 12 hs a -70°C con pantalla intensificadora.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las evidencias hasta aquí mostradas, permiten suponer que el gen CI-1 de *Neurospora crassa*, inducible por cicloheximida, codifica para una proteína del tipo de los citocromos P450. Si bien debiera medirse alguna actividad enzimática de la cip70 purificada relacionada con las actividades descritas para los citocromos P-450, existen argumentos de peso para afirmar lo antedicho en base a la conservación de dominios con respecto a otros citocromos P-450. Las homologías aminoácidas son evidentes no sólo en la región del sitio activo, sino en tramos de aproximadamente 180 aminoácidos de la región COOH terminal, que es generalmente la más conservada entre los miembros de esta superfamilia de genes.

Tomando en cuenta que la expresión del CI-1 es inducida por cicloheximida y suponiendo que realmente este gen codifica para un citocromo P450, una hipótesis sobre la posible acción de la cip70 sería la metabolización de la cicloheximida como agente tóxico para el hongo.

En este sentido, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Grotewold *et al*, 1988) sobre la inducción de la tolerancia, llevada a cabo por bajas concentraciones de cicloheximida (ver Introducción), se explicarían por el hecho de que concentraciones subletales de cicloheximida inducirían la expresión del citocromo P450 (cip70). Por lo tanto, al aumentar la concentración de cicloheximida en el medio de cultivo, ya existirían intracelularmente, cantidades suficientes de cip70 como para metabolizar la cicloheximida neutralizando su efecto tóxico.

En experimentos realizados con el hongo *Sclerotium rolfsii* (Sullia y Maria, 1985), se postuló que en la adquisición de tolerancia a bajas concentraciones de cicloheximida estaba involucrada una conversión de la cicloheximida a metabolitos menos tóxicos, específicamente la isocicloheximida.

Conclusiones

Por otro lado, el tratamiento de *Neurospora crassa* con puromicina, otro inhibidor de la síntesis proteica, no demostró provocar un aumento en la transcripción de este gen, pero sí de dos de las 4 proteínas inducibles por cicloheximida (99 kD y 31 kD, respectivamente)(Grotewold *et al*, 1988).

El ayuno de aminoácidos aromáticos de la cepa M246 (auxótrofa para L-Phe, L-Tyr, L-Trp, PAB e inositol)(ver 5.8.), mimetiza la inhibición de la síntesis proteica; sin embargo, esta situación no produjo ningún incremento en el nivel de expresión del gen CI-1, a diferencia de los que codifican para las proteínas inducibles por cicloheximida de 27 kD y 31 kD (Grotewold *et al*, 1989a). Esto indicaría que la inducción del CI-1 se produce exclusivamente por la presencia de la cicloheximida *per se*, y no por su efecto sobre la síntesis de proteínas. Los mismos resultados se obtuvieron en experimentos donde la inhibición de la síntesis proteica se llevó a cabo por ayuno de nutrientes producidos por pasaje de un micelio de *N. crassa* a buffer fosfato e incubado por 48 hs (Grotewold *et al*, 1988), lo cual sería otra evidencia para descartar la incidencia directa de la inhibición de la síntesis proteica en la inducción del CI-1.

Sin embargo hay otra serie de evidencias que obligan a ser prudente en cuanto a los posibles mecanismos de acción que se le atribuirían a la cip70.

Por un lado el agregado a un cultivo de *Neurospora crassa*, del inhibidor de la ODC, el DFMO, produce la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, y en última instancia la inhibición de la síntesis proteica. Este tratamiento fue capaz de inducir el gen CI-1; sin embargo esta inducción se revirtió si al mismo cultivo en presencia de DFMO se lo suplementaba con espermidina o putrescina (Grotewold *et al*, 1988). Si la inducción de la cip70 estuviera regulada por el agente tóxico *per se*, (DFMO en este ca-

Conclusiones

so), no debería esperarse que el agregado de poliaminas exógenas revirtiera este efecto siendo que el DFMO seguía presente en el medio de cultivo.

Por otro lado en experimentos realizados en este laboratorio (Grotewold *et al*, 1989b) se demostró que al tratar con cicloheximida una cepa resistente a la misma (por tener una proteína ribosomal modificada), no se observó ningún incremento en la expresión del mRNA de la *cip70*. Como se mencionó anteriormente esta cepa no era afectada a nivel de la síntesis de proteínas, y aunque no se ha descartado que exista una actividad enzimática responsable de la hidrólisis de la cicloheximida, este resultado constituiría un argumento en contra de la suposición de que la cicloheximida *per se* induce al citocromo P450 (capaz de metabolizarla).

Las evidencias presentadas hasta aquí demuestran que se está en una etapa preeliminar para asignarle a la *cip70* una función concreta; sin embargo, los datos aportados acerca de la naturaleza de la *cip70* sirven como punto de partida para futuras investigaciones que en última instancia esclarezcan el papel exacto que cumple esta proteína en la respuesta al stress producido por el tratamiento de *Neurospora crassa* con cicloheximida.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

Aisemberg, G.O., G.E. Taccioli, E. Grotewold y N.D. Judewicz (1987) Enviado para su publicación.

Aisemberg, G.O., E. Grotewold, G.E. Taccioli y N.D. Judewicz (1989) *Exp. Mycol.* En prensa.

Anathan, J., A.L. Goldberg y R. Voellmy (1986) *Science* 232, 522-524.

Artananis-Tsakonas, S, P. Schedl, M.E. Mirault, L. Moran y J. Lis (1979) *Cell* 17, 9-18.

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

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

Bardwell, J.C. y E.A. Craig (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 843-852.

Beadle, J.W. y F.L. Tatum (1945) *Ann. J. Botany* 32, 678.

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

Berk, A.J. y P.A. Sharp (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1274.

Bienz, M. (1984) *EMBO J.* 3, 2477-2483.

Bienz, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3138-3142.

Bienz, M. y J.B. Gordon (1982) *Cell* 29, 811-819.

Bibliografía

- 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.
- 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.
- Bowman, B.J., A. Royallynn, M.A. Wechser y E.J. Bowman (1988) **J. Biol. Chem.** 263, 14002-14007.
- Bowman, B.J., R. Allen, M. Wechser y E. Bowman (1988b) **J. Biol. Chem.** 263, 14002-14007.
- Bowman, E., K. Tenney y B. Bowman (1988a) **J. Biol. Chem.** 263, 13994-14001.
- Brooks, R.R. y P.C. Huang (1972) **Biochem. Genet.** 6, 41-49.
- Burkhard, S.J. y J.A. Traugh (1984) **Fed. Proc.** 43, 177.
- Buxton, F.P. y A. Radford (1983) **Mol. Gen. Genet.** 190, 403-405.
- Catcheside, D.E.A., P.J. Storer y B. Klein (1985) **Mol. Gen. Genet.** 199, 446-451.
- Chappell, H. (1986) **Cell** 45, 3-13.
- Chirico, W.J., G. Waters y G. Blobel (1988) **Nature** 332, 805-810.
- Conney, A.H. (1967) **Pharmacol. Rev.** 19, 317-366.
- Courteridge, S.A. y J.M. Bishop (1982) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79, 7117-7121.

Bibliografía

- Craig, E.A., B.J. McCarthy y S.C. Wadsworth (1979) *Cell* 16, 575-588.
- 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.)
- Daniels, C.J., A.H.Z. McKee y W.F. Doolittle (1984) *EMBO J.* 3, 745-749.
- Deshaies, R.J., B.D. Koch, M. Werner-Washburne, E.A. Craig y R. Schekman (1988) *Nature* 332, 800-805.
- DiDomenico, B.J., J.E. Bugarsky y S. Lindquist (1982) *Cell* 31, 593-603.
- Duncan, R. y E. McConkey (1982) *Eur. J. Biochem.* 123, 535-538.
- Dunn-Coleman, N.S. (1984) *Curr. Genet.* 8, 589-595.
- Dura, J.M. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 184, 381-385.
- Dutta, S.K. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 324, 482-487.
- Eilers, M. y G. Schatz (1988) *Cell* 52, 481-483.
- Ernst, M.J., L. De Lap y P. Felgelson (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2895-2897.
- Finchman, J.R.S. y J.A. Kirnaird (1984) *Biochem. Soc. Trans.* 12, 223-224.
- Fink, O.R. (1987) *Cell* 49, 5-6.

Bibliografía

- Finley, D. y A. Varshavsky (1985) **Trends Biochem. Sci.** 10, 343-347.
- Flint, H.J. y J. Wikening (1986) **Mol. Gen. Genet.** 203, 110-116.
- Francis, D. y L. Lin (1980) **Dev. Biol.** 79, 238-242.
- Free, S.J., P.W. Rice y K.L. Metzemberg (1979) **J. Bacteriol.** 137, 1219-1226.
- French, J.S., F.P. Guengerich y M.J. Coon (1980) **J. Biol. Chem.** 255, 4112-4119.
- Fried, H.M. y J.R. Warner (1982) **Nucl. Acids Res.** 10, 3133.
- Fröhner, S.C. y E. Eriksson (1974) **J. Bacteriol.** 120, 450-457.
- Gedamu, L., B. Culham y J.j. Heikkila (1983) **Bioscience** 3, 647-658.
- Germann, U.A., G. Müller, P.E. Hünziker y K. Lerch (1988) **J. Biol. Chem.** 263, 885-896.
- Giles, N.H., M.E. Case, J. Baum, R. Geever, L. Huiet., V. Patel y B. Tyler (1985) **Microbiol. Rev.** 49, 338-358.
- Giudice, G., M.C. Roccheri y M.G. DiBernardo (1980) **Cell Biol. Int. Rep.** 4, 69-74.
- Glass, N.L., C. Vollmer, J. Staben, J. Grotelmeschen, R.L. Metzemberg y C. Yanofsky (1988) **Science** 241, 570-573.
- Graham, J.D. (1967) **Neurospora Newsletter** 11, 14.
- Grotewold, E., G.E. Taccioli, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988) Enviado para su publicación.

Bibliografía

- Grotewold, E., G.E. Taccioli, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988a) **Mircen J. App. Microbiol. Biotech.** En prensa.
- Grotewold E., G.O Aisemberg, R.M.Attar, G.E.Taccioli y N.D. Judewicz (1989a) Enviado para su publicación.
- Grotewold E., G.E.Taccioli, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1989b) **Current Genet.** En prensa.
- Gurr, S.J., S.E. Unkles y J.R. Kinghorn (1987) En **Gene Structure in Eukaryotic Microbes** (Kinghorn, J.R. ed.) pp.93-139, IRL Press. Oxford.
- Guttman, S.D. y M.A. Gorovsky (1979) **Cell** 17, 305-317.
- Hackett, R.W. y J.T. Lis (1983) **Nucleic Acids Res.** 11, 7011-7030.
- Hardwick, J.P., B.J. Song, E. Huberman y F.J. González (1987) **J. Biol. Chem.** 252, 801-810.
- Hawkins, D.J. (1988) **NAR** 16, 9893-9908.
- Heikkita, J.J., J.G.O. Miller, G.A. Schultz, M. Kloc y L.W. Browder (1985) En **Changes in Eukariotic Gene Expression in Response to Environmental Stress**, pp. 135-158, London Academic 379 pp.
- Hirsch, H.M. (1964) **Physiol. Plantarum** 7, 72-97.
- Hofer, E. y C.E. Sekeris (1978) **Eur. J. Biochem.** 86, 547-554.
- Hollering, R.B., Goodman, H.M. y H.W. Boyer (1974) **J. Virol.** 14, 1235.
- Holmgren, R.V., K. Livak, R. Morimoto, R. Freund y M. Meselson (1979) **Cell** 18, 1359-1370.

Bibliografía

- Holmgren, R.V., U. Corces, R. Morimoto, R. Blackman y M. Messelson (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3775-3778.
- 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 Y. Watanabe (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 233.
- Hsu, K.S. (1963) *J. Gen. Microbiol.* **32**, 341-347.
- Hunt, C. y R. Morimoto (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6455-6459.
- Iida, H. e I. Yahara (1984) *J. Cell. Biol.* **99**, 1441-1450.
- Ingolia, T.D. y E.A. Craig (1982a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 525-529.
- Ingolia, T.D., E.A. Craig y B. McCarthy (1980) *Cell* **21**, 669-676.
- Ingolia, T.D., M.J. Slater y E.A. Craig (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1388-1398.
- Ish-Horowicz, D., J. Holden y W.J. Gehring (1977) *Cell* **12**, 643-652.
- Kalb, V.F., J.C. Loper, C.R. Dey, C.W. Woods y T.R. Sutter (1986) *Gene* **45**, 237-245.

Bibliografía

- Kapoor, M. (1983) *Int. J. Biochem.* 15, 639-649.
- Kapoor, M. y J. Lewis (1987) *Can. J. Microbiol.* 33, 162-168.
- Karch, F., I. Torok y A. Tissieres (1981) *J. Mol. Biol.* 148, 219-230.
- 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.
- Keeseey, J.K., Jr. y J.A. DeMoss (1982) *J. Bacteriol* 152, 954-958.
- Kelley, P.M. y M.J. Schlesinger (1982) *Cell* 15, 1277-1286.
- Kelly, R., D.R. Shaw y H.L. Ennis (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 799-805.
- Key, J.L., C.Y. Lin y Y.M. Chen (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3526-3530.
- Kinnaird, J.A., M.A. Keighren, J.A. Kinsey, M. Eaton y J.R. Finchman (1982) *Gene* 20, 387-396.
- Kornfeld, E.C., R.G. Jones y T.U. Parke (1949) *J. Ann. Chem. Soc.* 71, 150-159.
- Kothary, R.K. y E.P. Candido (1982) *Can. J. Biochem.* 60, 347-355.
- Kozak, M. (1987) *Nuc. Acids Res.* 15, 8125-8148.
- Kreader, C.A. y J.E. Heckman (1987) *Nucl. Acids. Res.* 15, 9027-9041.

Bibliografía

- Krieg, J., J. Hofsteenge y G. Thomas (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11473-11477.
- Krumlauf, R. y G.A. Marzluf (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1138-1145.
- Lambowitz, A.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1058-1062.
- Lampert, A. y P. Feigelson (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 1030-1038.
- Lee, A. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 20-23.
- Legerton, T.L. y C. Yanofsky (1985) *Gene* 39, 129-140.
- Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney y H. Boedker (1977) *Biochemistry* 16, 4743-4751.
- Lewis, A. y H.R. Pelham (1985) *EMBO J.* 4, 3137-3143.
- Lindberg, R.A. y H. Drucker (1984) *J. Bacteriol.* 157, 375-379.
- Lindell, T.J. y J.J. Duffey (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1454-1456.
- Lindquist, S. (1980) *Dev. Biol.* 77, 463-479.
- Lindquist, S. (1981) *Nature* 293, 311-314.
- Lindquist, S. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S., B.J. DiDomenico, G. Bugarsky, S. Kurtz, L. Petko y S. Sonoda (1982) En *Heat Shock from Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor, 167-176.
- Lindquist, S., S. McKenzie, S. Henikoff y M. Messelson (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1117-1121.

Bibliografía

- Livak, K.J., R. Freund, M. Schweber, P.C. Wensink y M. Messelson (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5613.
- Loefer, J.B. y T.S. Matney (1952) *Physiol. Zool.* **25**, 272.
- Lu, A.Y.H. y M.J. Coon (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 1331-1332.
- Mandel, M. y A. Miga (1970) *J. Mol. Biol.* **53**, 154.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marzluf, G.A. (1981) *Microbiol. Rev.* **45**, 437-461.
- Maxam, A. y W. Gilbert (1980) *Methods in Enzymology* **65**, 497-559.
- McGarry, T.J. y S. Lindquist (1985) *Cell* **42**, 903-911.
- Messing, J. (1983) *Methods in Enzymology* **101**, 20.
- Metzemberg, R.L. (1979) *Microbiol. Rev.* **43**, 361-383.
- Miller, M.J., N.H. Xuong y E.P. Geiduschek (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5222-5226.
- Mitchell, H.K., G. Moller, N.S. Petersen y L. Lipps-Sarmiento (1979) *Dev. Genet.* **1**, 181-192.
- Moran, L., M.E. Mirault, J. Lis, P. Schedl, S. Artananis-Tsakonas y W.J. Gehring (1979) *Cell* **17**, 1-8.
- Morange, M., A. Dju, O. Bensaude y C. Babinet (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 730-735.
- Morimoto, R. y E. Fodor (1984) *J. Cell. Biol.* **99**, 1316-1323.

Bibliografía

- Muebschman, C. (1952) **Mycologia** 44, 599.
- Mues, G.I., T.Z. Mun y J.D. Raese (1986) **J. Biol. Chem.** 261, 874-877.
- Münger, K., V.A. German y K. Lerch (1985) **EMBO J.** 4, 2665-2668.
- Munro, S. y H.R. Pelham (1985) **Nature** 317, 477-478.
- Nebert, D.W., N. Adesnik, M.J. Coon, R.W. Estabroock, F.J. González *et al* (1987) **DNA** 6, 1-11.
- Nebert, D.W. y F.J. González (1987) **Ann. Rev. Biochem.** 56, 945-993.
- Ogata, W.N. (1962) **Neurospora Newsletter** 1, 13.
- Orbach, M.J., B.E. Porro y C. Yanofsky (1986) **Mol. Cell. Biol.** 6, 2452-2461.
- Palmer, C. y T.E. Maloney (1955) **J. Sci.** 55, 1.
- Parker, C.S. y J. Topol (1984) **Cell** 36, 357-369.
- Pelham, H. (1988) **Nature** 332, 776-777.
- Pelham, H.R. (1982) **Cell** 30, 517-528.
- Pelham, H.R. y M. Bienz (1982) **EMBO J.** 1, 1473-1477.
- Pelham, H.R.B. (1984) **EMBO J.** 3, 3095-3100.
- Pelham, H.R.B. (1986) **Cell** 46, 959-961.
- Perkins, D.D. y E.G. Barry (1977) **Adv. Genet.** 19, 133-285.

Bibliografía

- Plesofky-Vig, N. y R. Brambl (1985) **J. Bacteriol.** 162, 1083-1091.
- Prada, R.A. y Terenzi, H.F. (1985) **Arch. Microbiol.** 229, 1-5.
- Reddy, J.K., D.L. Azarnoff y C.E. Hignite (1980) **Nature** 283, 397-398.
- Reinert, W.R. y G.A. Marzluf (1975) **Mol. Gen. Genet.** 139, 39-55.
- Reinert, W.R., V.B. Patel y N.M. Giles (1981) **Mol. Cell. Biol.** 1, 829-835.
- Roberts, A.M., V. Berlin, K.M. Hager y C. Yanofsky (1988) **Mol. Ce.. Biol.** 8, 2411-2418.
- Roccheri, M.C., M.G. DiBernardo y G. Giudice (1981) **Dev. Biol.** 83, 173-177.
- Rothman y Schmid (1986) **Cell** 46, 5-9.
- Russnak, R.H., D. Jones y E.P.M. Candido (1983) **Nucleic Acids Res.** 11, 3187-3205.
- Saito, H. y H. Uchida (1977) **J. Mol. Biol.** 113, 1-25.
- Sanger, F., S. Miklen y A.R. Coulson (1977) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74, 5463-5467.
- Schechtman, M.G. y C. Yanofsky (1983) **J. Mol. Appl. Genet.** 2, 83-99.
- Schedl, P., S. Artavanis-Tsakonas, R. Steward, W.J. Gehring, M.E. Mirault *et al* (1978) **Cell** 14, 921-929.
- Schneider, W.C. (1957) **Meth. Enzymol.** 3, 680-684.

Bibliografía

- Scott, M. y M.L. Pardue (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3353-3358.
- Selker, E.U., C. Yanofsky, K. Driftmier, K. Metzemberg, E. Alzner, B. DeWeerd y U.L. Rajbandary (1981) *Cell* 24, 819-828.
- Sharp, P.A., B. Sudgen y J. Sambrook (1973) *Biochemistry* 12, 3055.
- Shear, C.L. y B.G. Dodge (1927) *J. Agric. Res.* 34, 1019.
- Shimada, T., K.S. Misono y P. Guengerich (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 909-921.
- Sikora, L. y G.A. Marzluf (1982) *J. Bacteriol.* 150, 1287-1291.
- Sorger, N. y H.R.B. Pelham (1987) *J. Mol. Biol.*, en prensa.
- Southern, E. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503.
- Strauss, B.S. (1958) *J. Gen. Microbiol.* 18, 658-669.
- Subjeck, J.R., J.J. Sciandra y T.T. Shyy (1985) *Int. J. Radiat. Biol.* 47, 275-284.
- Sullia, S.B. y R. Maria (1985) *Proc. Indian Acad. Sci.* 95, 417-427.
- Sunshine, M., M. Feiss, J. Stuart y J. Yocham (1977) *Mol. Gen. Genet.* 151, 27-34.
- Taccioli, G.E., E. Grotewold, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988) 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.

Bibliografía

- Tissières, A., H.K. Mitchell y U. Tracy (1974) *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.
- Tobe, T., K. Ito y T. Yura (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195, 10-16.
- Tomsett, A.B. y R.H. Garrett (1981) *Mol. Gen. Genet.* 186, 33-39.
- Työrinoja, R.K., T. Nurminen y Suomalainen (1974) *Biochem. J.* 141, 133.
- Vázquez, D. (1979) *Inhibitors of Protein Biosynthesis.* Spriger-Verlag.
- Vogel, H.J. (1956) *Microb. Genet. Bull.* 13, 42-43.
- Vollmer, S. y C. Yanofsky (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4869-4873.
- Wadsworth, S.C. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 286-292.
- Welch, W.J. y J.R. Feramisco (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 1229-1237.
- Werner-Washburne, M., D.E. Stone y E.A. Craig (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 2568-2577.
- Westergaard, M. y H.K. Mitchell (1947) *An. J. Bot.* 34, 573.
- Wettstein, F.O., M. Noll y S. Pemnan (1964) *Biochem. Biophys. Acta* 87, 525.
- Whiffen, A.J. (1948) *J. Bacteriology* 56, 283.
- Whiffen, A.J. (1950) *Mycologia* 42, 253.

Bibliografía

- White, F.P. y W.R. Currie (1982) En **Heat Shock from Bacteria to Man**, Cold Spring Harbor, 379-386.
- White, R.E. y M.J. Coon (1980) **Ann. Rev. Biochem.** 49, 315-356.
- Wu, C. (1980) **Nature** 286, 854-860.
- Wu, C. (1986) **Nature** 317, 84-87.
- Wu, C., P.M. Bingham, K.J. Livak, R. Holmgren y S.C.R. Elgin (1979) **Cell** 16, 797-806.
- Yamamori, T. y T. Yura (1980) **J. Bacteriol.** 142, 843-851.
- Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura y T. Yura (1978) **J. Bacteriol.** 134, 1133-1140.
- Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lowhorne y G. Treiber (1970) **Virology** 40, 734.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira y J. Messing (1985) **Gene** 33, 103-119.
- Yost, J.H. y S. Lindquist (1986) **Cell** 45, 185-193.
- Zummerman, J.L., W. Petri y M. Messelson (1983) **Cell** 32, 1161-1170.

APENDICE

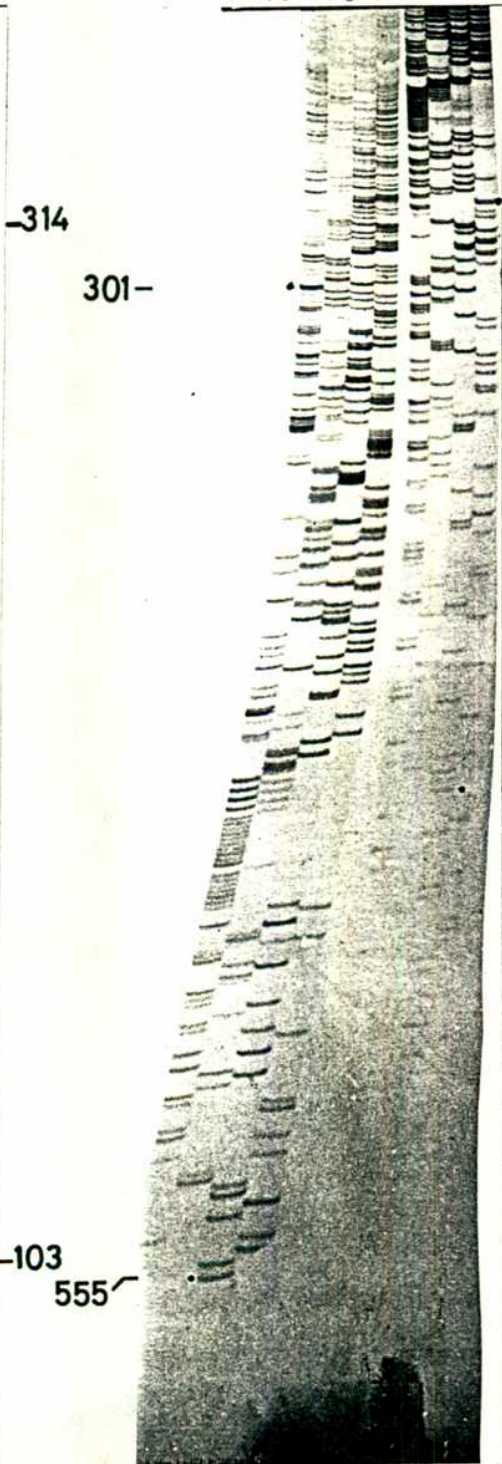
TCAG

18 A16



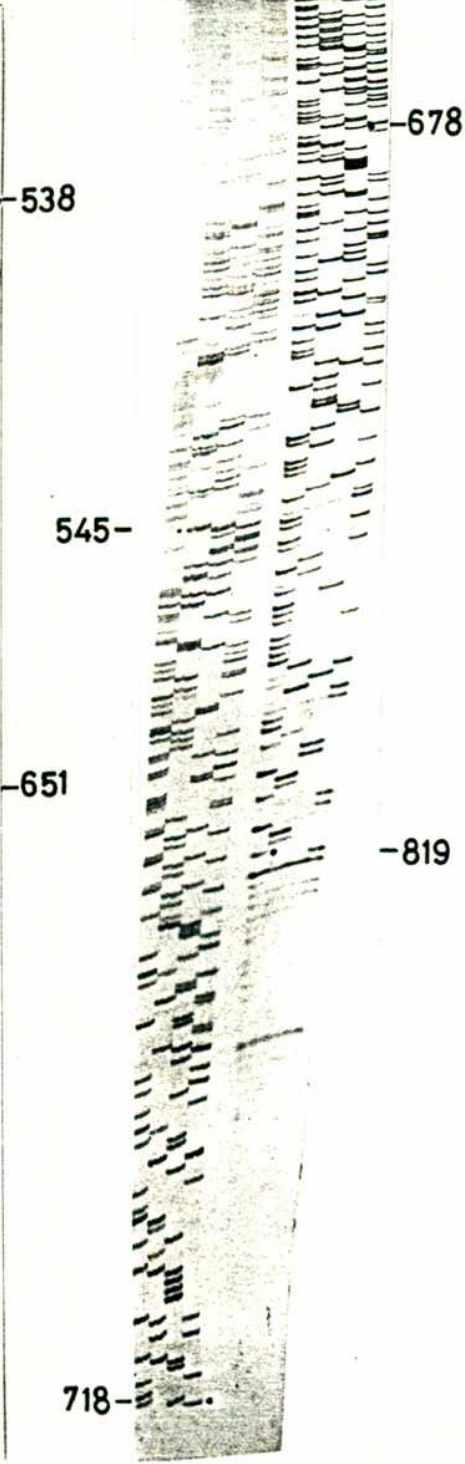
AGTC

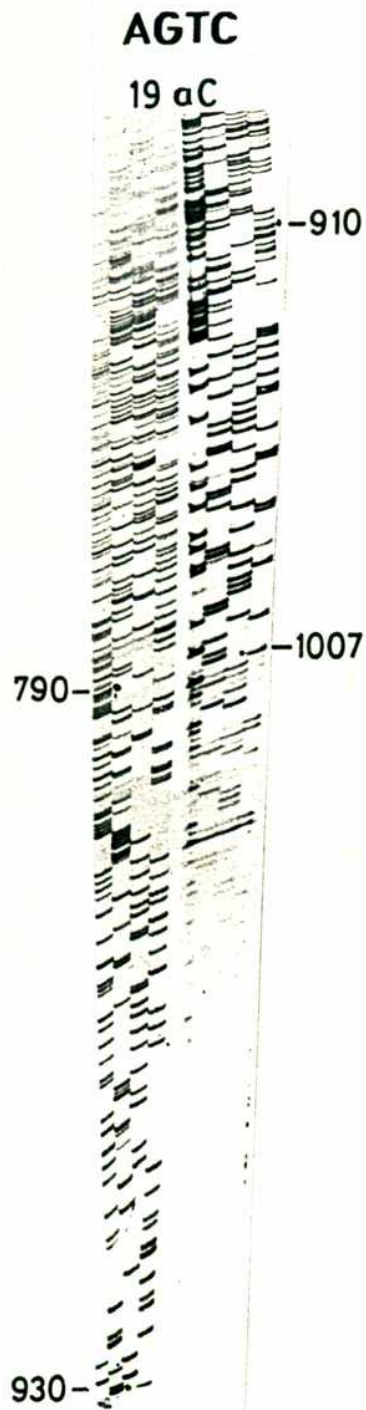
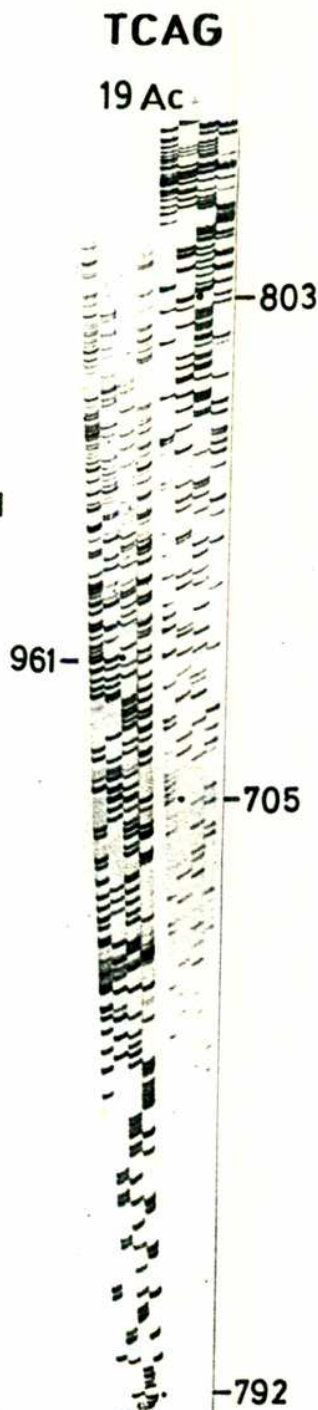
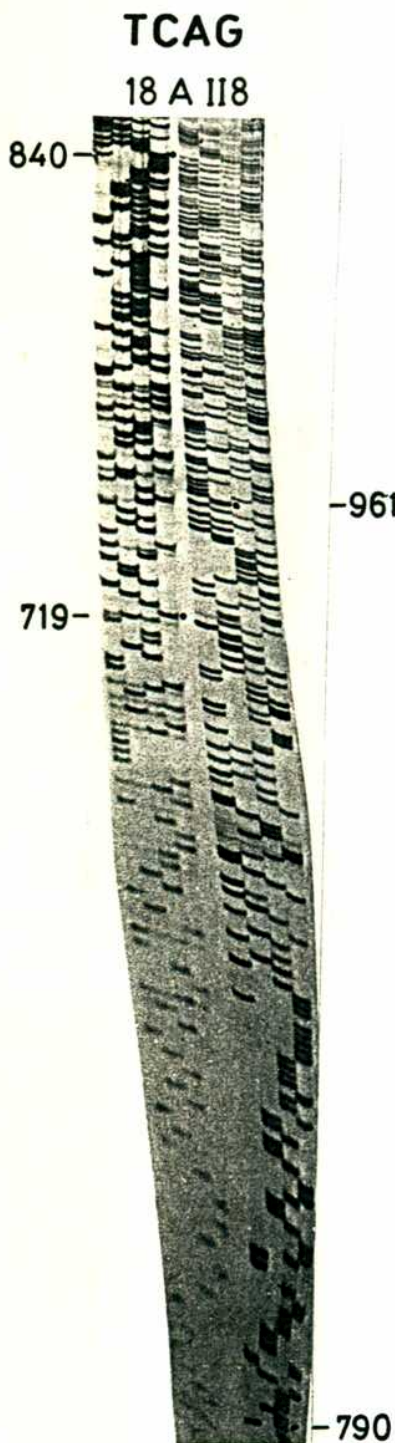
18 A14



AGTC

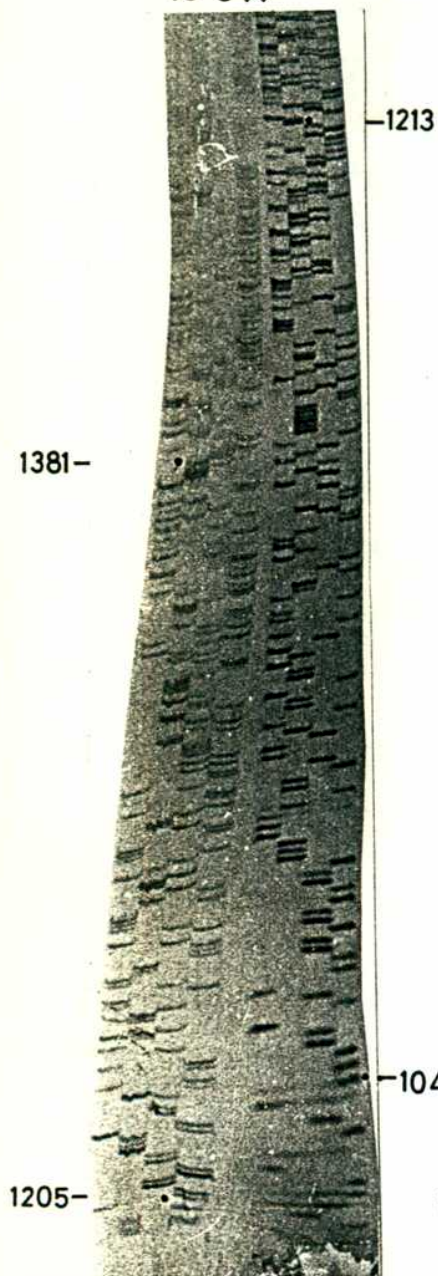
18 SnP





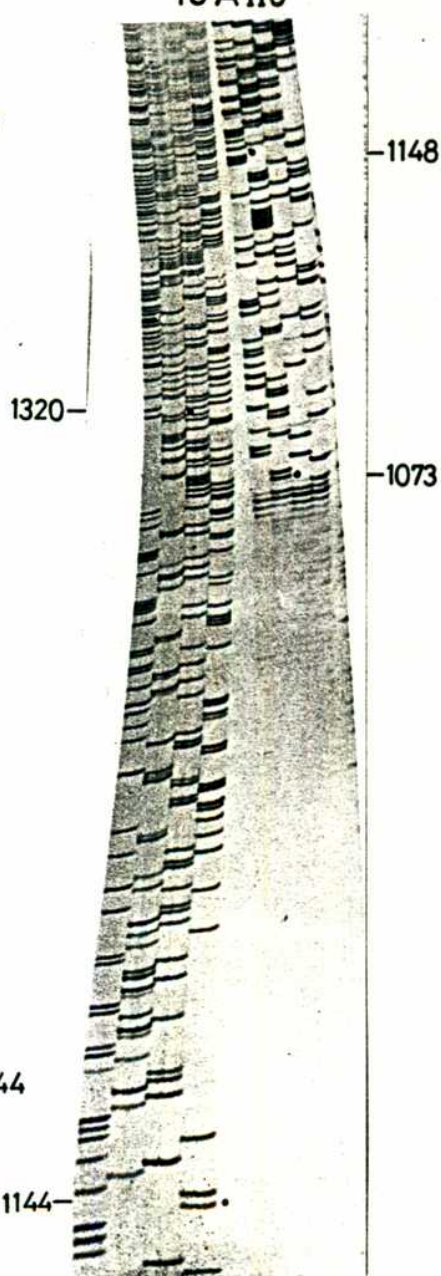
TCAG

18 C X



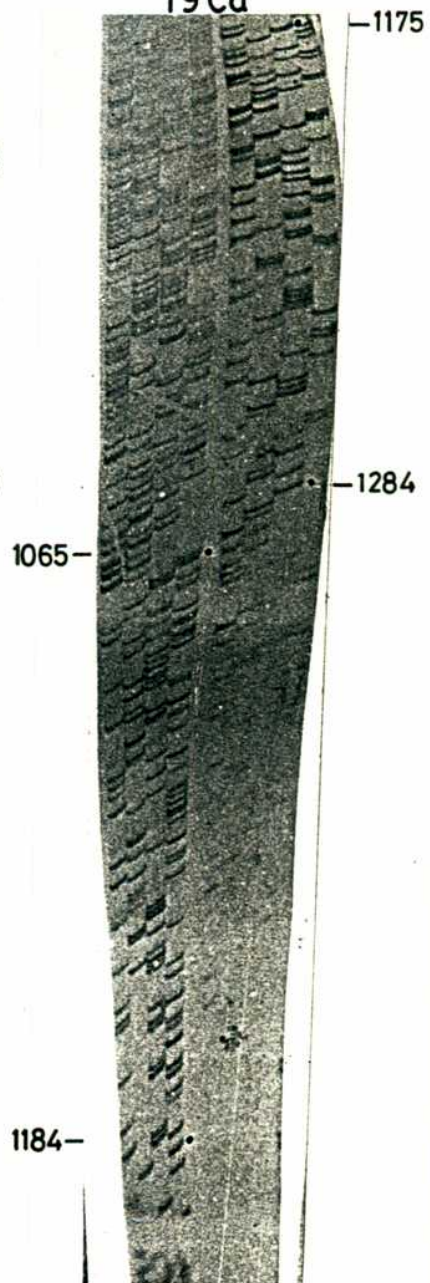
TCAG

18 A II 6



AGTC

19 Ca



TCAG

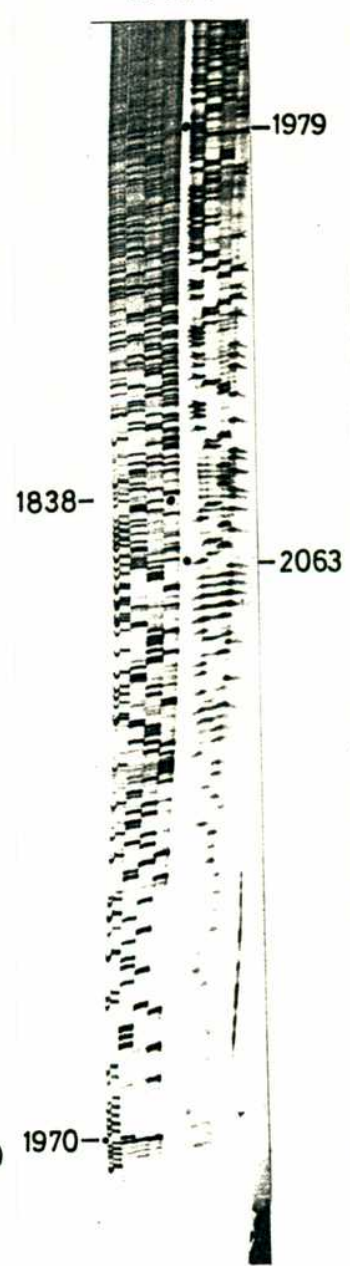
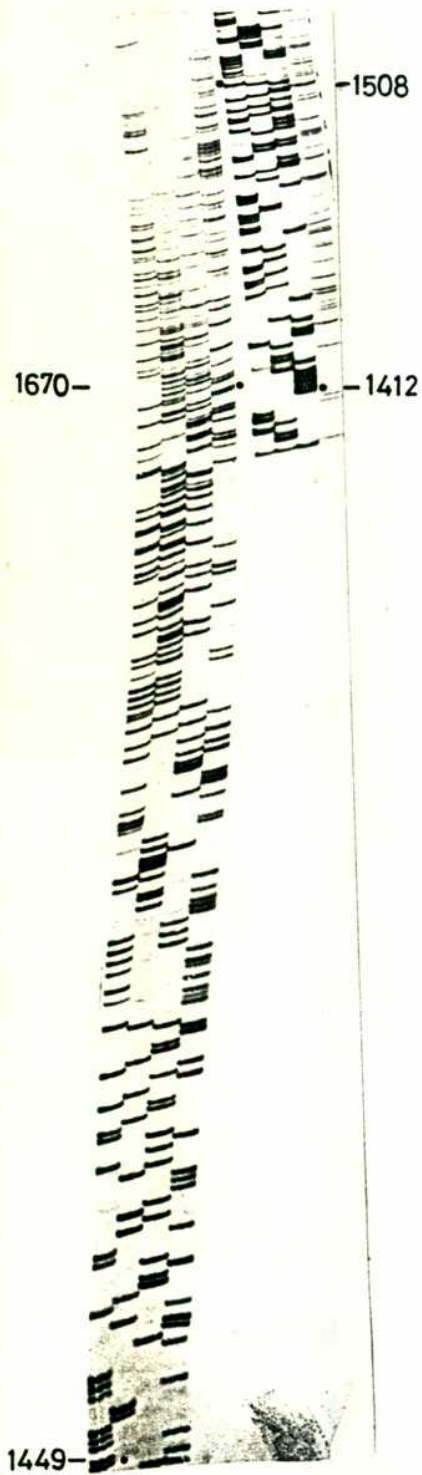
19 AcP

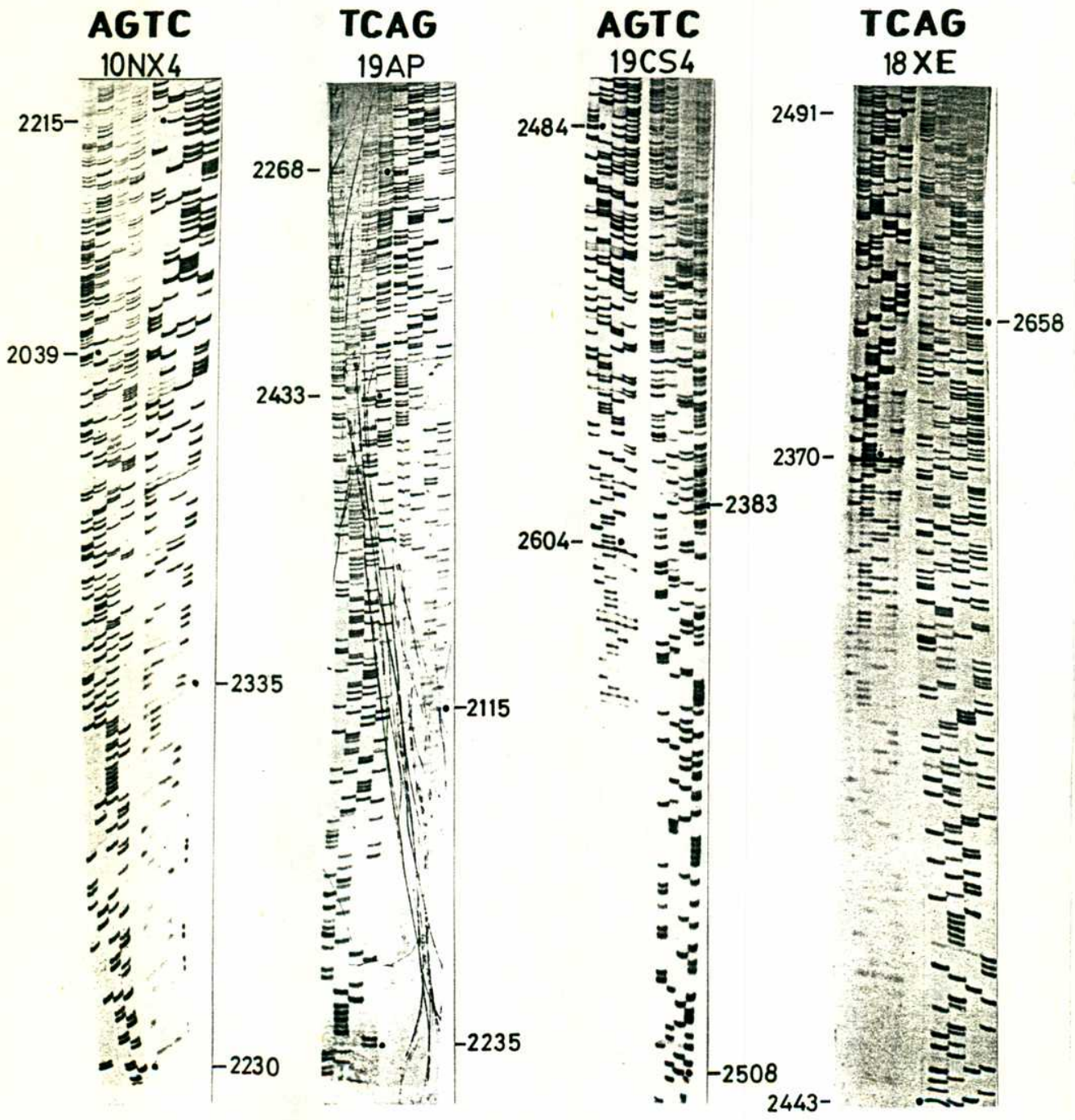
AGTC

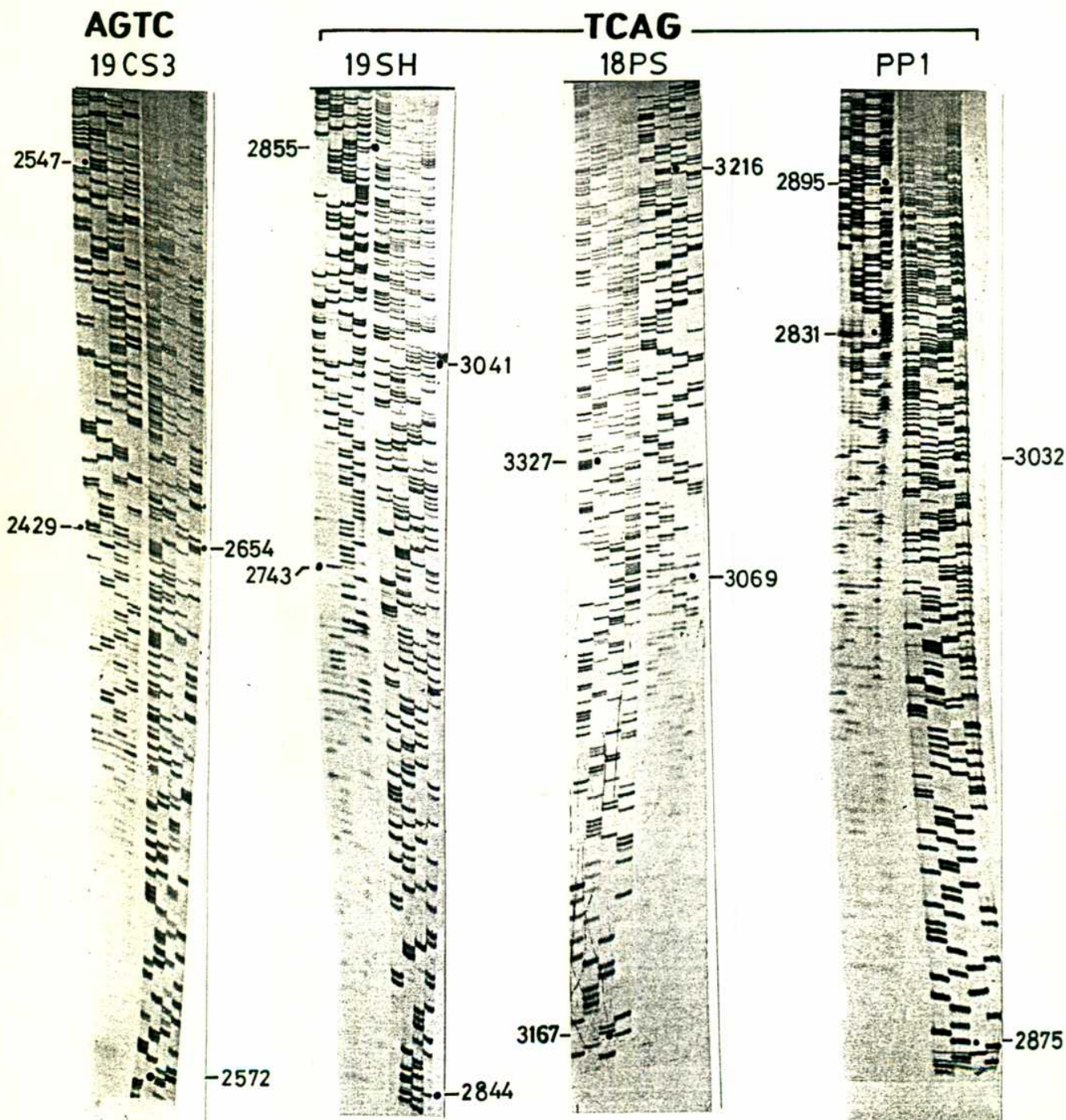
19 NC

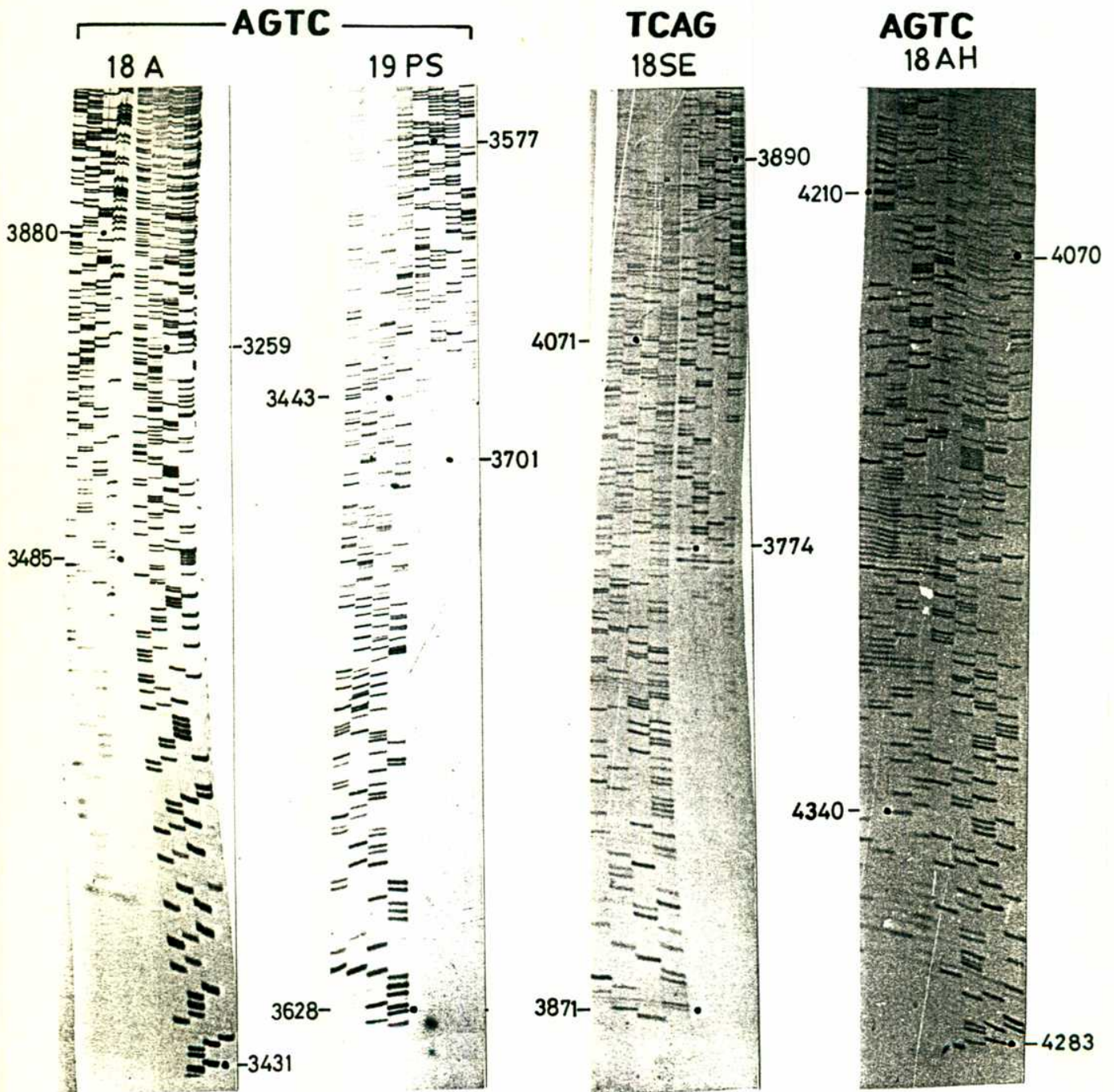
AGTC

19 HA

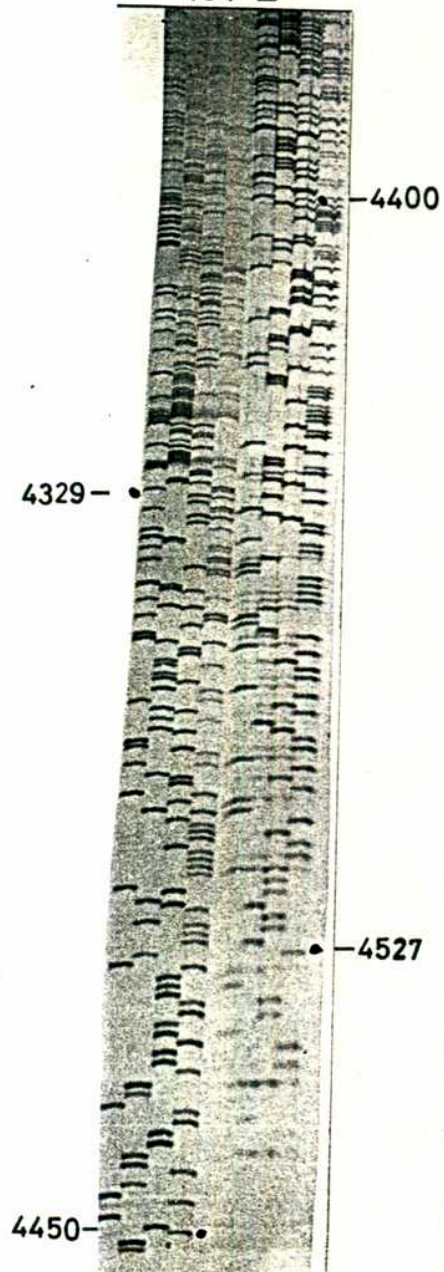








AGTC
19PE

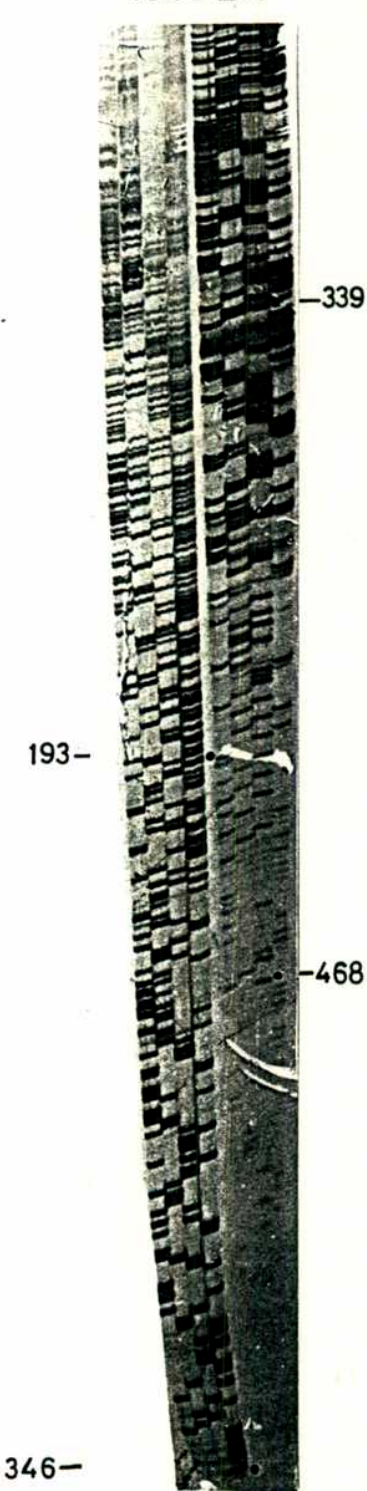


cDNA

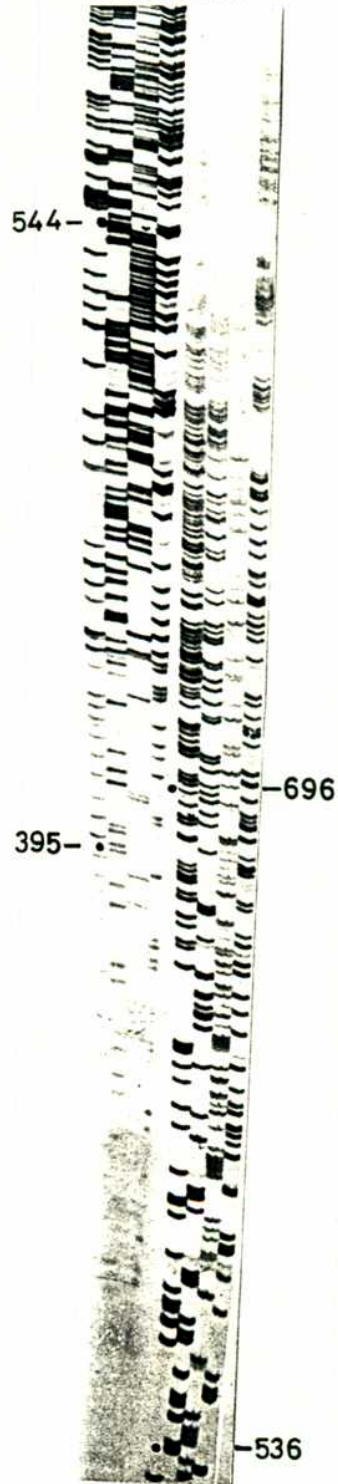
TCAG
19CDPE1

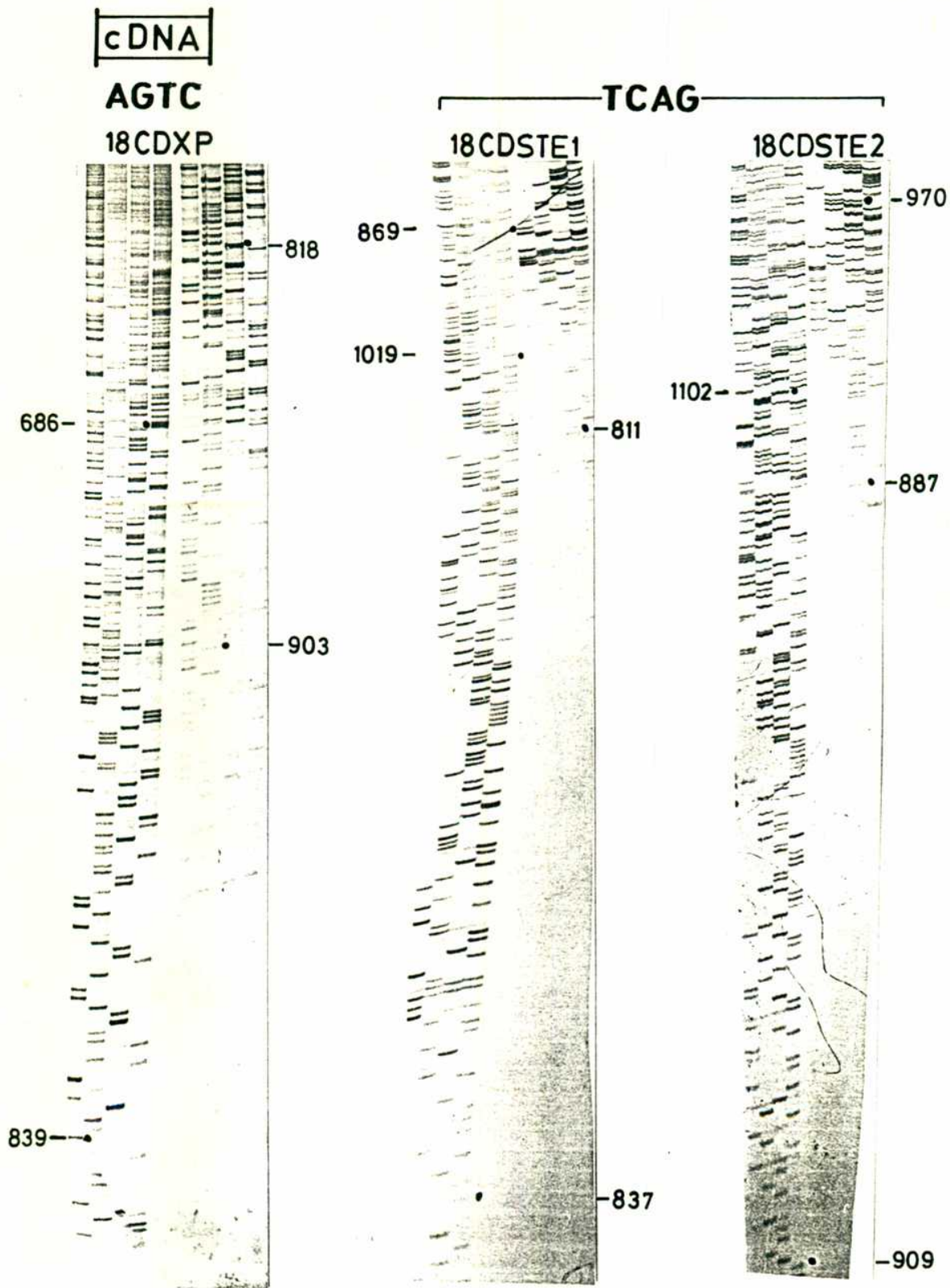


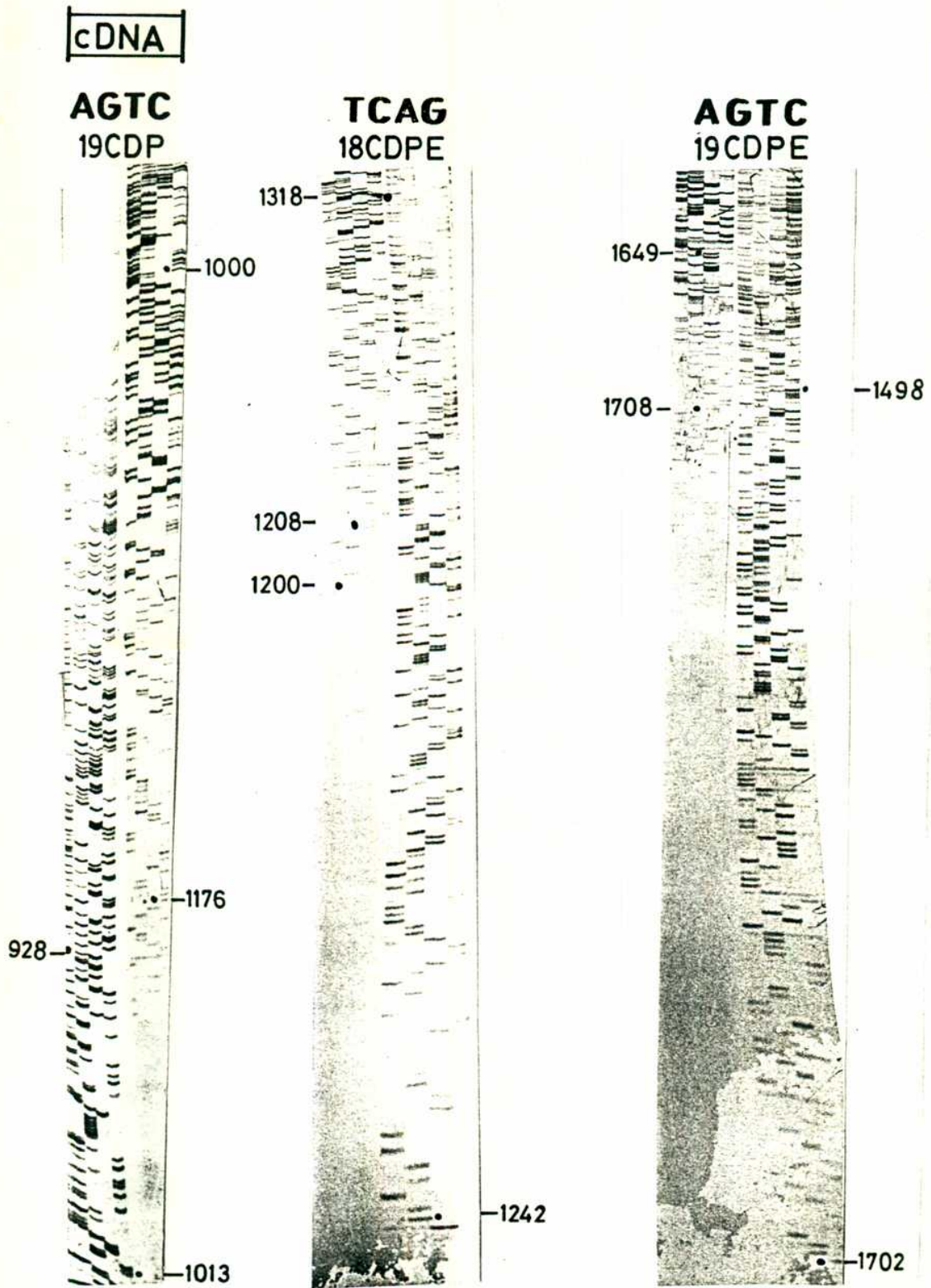
AGTC
18CDEX



TCAG
18CDAE

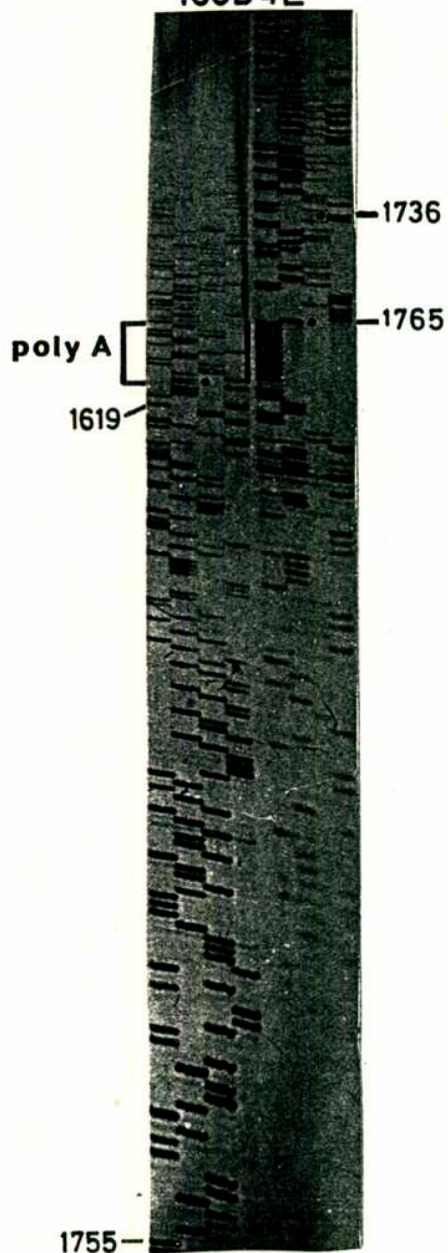






cDNA

AGTC
18CD4E



18CD4E

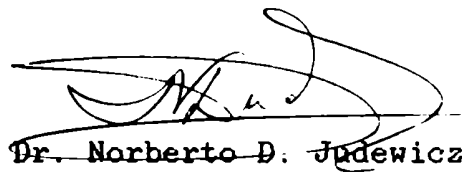


Bioq Ricardo Marcos Attar



Dr. Héctor N. Torres

Director de Tesis



Dr. Norberto D. Judewicz

Co-director de Tesis