

Tesis de Posgrado

Metabolismo y función de poliaminas en levaduras

Miret, Juan José

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:

Miret, Juan José. (1989). Metabolismo y función de poliaminas en levaduras. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2278_Miret.pdf

Cita tipo Chicago:

Miret, Juan José. "Metabolismo y función de poliaminas en levaduras". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2278_Miret.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

METABOLISMO Y FUNCION DE POLIAMINAS EN
LEVADURAS

Autor: Juan Jose Miret

Director: Sara H. Goldemberg

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones

Bioquimicas "Fundacion Campomar", Buenos Aires,
ARGENTINA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1989

- 2.278 -
Ej: 2

a mi madre, Teresita,

por todo su empuje y sus ganas de vivir.

a mi padre, Emilio,

por que me enseñó a pensar.

a Cecilia,

por el hoy y por el mañana.

Quiero dedicar este trabajo a todos aquellos que hicieron y hacen posible el desarrollo científico en la Argentina; con la esperanza de que, con el esfuerzo colectivo, la implementación de los sistemas adecuados, el estímulo de la creatividad, la aceptación de nuevas ideas y hombres favoreciendo el desarrollo y crecimiento de la juventud, y la defensa de la libertad de pensamiento; podamos superarnos, elevar nuestro nivel académico y mejorar la calidad de vida de toda nuestra comunidad.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las Instituciones y personas que en distintas formas posibilitaron la realización de este trabajo. A todas ellas les brindo un cálido agradecimiento.

Al Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"; por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto, facilitando toda la infraestructura necesaria.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas, que a pesar de su escaso monto me permitieron dedicarme en forma exclusiva a la investigación científica.

A la Dra Sara H. Goldemberg por haberme iniciado en la investigación y por su constancia y dedicación en la dirección de este trabajo.

Al Dr. A. J. Solari por la notable realización de la microscopía electrónica.

Al Dr S. Yamashita por la donación de la cepa con la que se realizó este trabajo.

Al Dr. I. D. Algranati por sus valiosas críticas y sugerencias, fundamentalmente en el campo de la síntesis de proteínas.

Al Dr. R. A. Wolosiuk, por haberme brindado su amistad, un constante estímulo, sus buenos consejos generosamente brindados y por las charlas científicas que debido a su solidez intelectual, contribuyeron notablemente a mi formación.

A los Dres. R. A. Couso, L. Quesada, M. García Patrone por las sugerencias realizadas en algunos experimentos, el constante apoyo brindado durante estos años y los gratos momentos compartidos; a las Dras. C. Krisman y N. Gonzalez por el cálido apoyo brindado y al Dr. A. J. Parodi por haberme abierto las puertas de su laboratorio.

A mis amigos A. Cataldi, E. Cafferata y R. Geremía por una inmensidad de razones.

A todos mis compañeros por las charlas de café, los gratos momentos compartidos y por hacer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas un buen lugar de trabajo, quiero agradecer especialmente a D. Tolmasky, P. Marini, H. Nastri, A. Coira, E. Guillen, M. Bravo, A. Petroni, C. Bertinetti, O. Perez, A. Wilner, y N. Iusem por haberme brindado su amistad durante todos estos años.

A M. Bravo, S. Raffo, L. Maurellos por la asistencia técnica brindada.

A todo el personal administrativo y de mantenimiento por posibilitar parte de la infraestructura necesaria, en especial a S. Gimenez, M. Mazzardi, J. Pinto, F. Irusta, S. Genovese, A. Micalis, B. Wolf, M. Angel, T. de Saba, G. Suter.

A los Dres. R.A. Wolosiuk, R. Ugalde y A. J. Parodi por su visión de progreso al haber invertido en una computadora con multiples usos y por su generosidad al haber permitido su utilización para la confección de este trabajo. Ojalá que todos los investigadores sigan su ejemplo.

A N. Malarini y al Sr. Millara por la rápida y eficiente realización de las fotos y dibujos de esta tesis.

Finalmente, a mis padres por todo el apoyo y comprensión brindada durante todos estos años y Cecilia Sanchez por toda la ayuda brindada en la confección de este trabajo, su tolerancia por las horas dedicadas al mismo y por el apoyo brindado en estos últimos años.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ARN	Acido ribonucleico.
A ₅₅₀	Absorbancia a 550.
ADC	Arginina decarboxilasa.
c.p.m.	cuentas por minuto.
CDC	mutantes deficientes en el ciclo celular.
DAPI	Acido diaminofenolindolacético.
DFMO	α-difluormetilornitina.
EDTA	Acido etilendiamino-tetra-acético.
KDa	Kilo Dalton.
MGBG	Metil-glioxal-bis(guanilhidrazona)
min.	minuto.
ml	mililitro.
ODC	Ornitina decarboxilasa.
r.p.m.	revoluciones por minuto.
SAM-DC	S-adenosilmetionina decarboxilasa.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SPB	centríolo.
TCA	Acido tricloroacético.
TLC	cromatografía en capa delgada.
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol.
μCi	microCurie.

INDICE

<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
GENERALIDADES. DISTRIBUCION DE POLIAMINAS EN LA NATURALEZA	3
METABOLISMO DE POLIAMINAS	5
FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS	6
Poliaminas y proliferación celular	7
Efecto de poliaminas sobre crecimiento celular	7
Poliaminas y ADN	8
Poliaminas y ARN	8
Poliaminas y síntesis de proteínas	9
Efectos de poliaminas sobre la división celular	10
LA LEVADURA <i>S. cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	11
Ciclo celular	11
Pared celular	13
Ribosomas y síntesis de proteínas	15
Metabolismo y función de poliaminas en <i>S. cerevisiae</i>	16
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	18
Descripción de cepas celulares	18
Medios de cultivo	18
Ayuno de poliaminas	20
Determinación del contenido en poliaminas	20
Determinación de ornitina decarboxilasa	21
Captación de poliaminas	21
Incorporación de precursores radiactivos en macromoléculas	22
Purificación de Zymoliasa	22
Preparación de esferoplastos y perfiles ribosomales	23
Perfiles de polisomas	23
Microscopía de contraste de fase - Determinación del porcentaje de brotación y distribución de tamaños	24
Coloración de núcleos	24
Ataque enzimático de la pared	24

Microscopía electrónica	25
Análisis de la composición química de la pared celular	25
<u>RESULTADOS</u>	27
CARACTERISTICAS GENERALES DEL ORGANISMO	27
Contenido endógeno de poliaminas.	27
Actividad de ornitina decarboxilasa.	27
Curvas de crecimiento	28
Captación de poliaminas	28
Efecto de poliaminas sobre la síntesis de macromoléculas	29
POLIAMINAS Y SINTESIS DE PROTEINAS	30
Análisis de los perfiles ribosomales	30
Efecto de las condiciones de ayuno sobre el perfil ribosomal	32
Efecto de cationes monovalentes y divalentes sobre el perfil ribosomal	32
Perfil de polisomas	34
POLIAMINAS Y CICLO CELULAR	35
Características morfológicas	35
Análisis del porcentaje de brotación	36
Examen de los núcleos celulares	36
PARED CELULAR	38
Acción de enzimas líticas sobre la pared celular	38
Composición química cuantitativa	41
Microscopía electrónica	42
<u>DISCUSION</u>	45
POLIAMINAS Y CRECIMIENTO CELULAR	46
Efecto sobre la síntesis de macromoléculas	46
Efecto sobre el ensamblado y/o biogénesis de los ribosomas	46
Efecto sobre la síntesis y/o estructura de la pared celular	49
POLIAMINAS Y DIVISION CELULAR	52
Morfología, Citología y Ciclo celular	52
<u>CONCLUSIONES</u>	55
<u>REFERENCIAS</u>	57

RESUMEN

Las poliaminas son policationes orgánicas nitrogenadas de bajo peso molecular, ampliamente distribuidos en todos los seres vivos, que participan en numerosos procesos metabólicos y fisiológicos. Si bien estos compuestos tienen una importante participación en la proliferación celular, no se conoce su papel fisiológico exacto.

Una de las tres estrategias fundamentales para determinar las posibles funciones de las poliaminas en los seres vivos es el estudio de las alteraciones que se producen en células u organismos que carecen o tienen disminuido el contenido endógeno de poliaminas, siendo por diversas razones la mejor estrategia. Se han desarrollado dos sistemas para disminuir el contenido endógeno de estos policationes: 1.- la utilización de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y 2.- la obtención de mutantes auxótrofos para estas bases orgánicas. El uso de las mutantes constituye una muy buena herramienta de trabajo y ha permitido determinar algunos de los papeles fisiológicos de las poliaminas en los seres vivos.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un excelente modelo para el estudio de la bioquímica y de la biología celular y molecular en eucariotes. En los últimos años se han aislado mutantes de este organismo auxótrofos para poliaminas^{21,32,33,116}, pero han sido poco estudiadas y nos permitirían determinar los papeles fisiológicos de estos compuestos en la proliferación celular. Estas mutantes crecen deficientemente^{32,33,116}, no pueden esporular³², no mantienen el plásmido "killer"¹¹⁸ y tienen alterado el transporte de colina³³.

En el presente trabajo se utilizó la cepa de levaduras *S.cerevisiae* 179-5 auxótrofa para poliaminas obtenida por Hosaka et al³³. El estudio de las alteraciones que se producen en ausencia de estos policationes permitió asignarles nuevas funciones en este organismo. Hemos encontrado que se producen una serie de deficiencias en ausencia de poliaminas, además de las descriptas previamente^{32,33,116,118}:

- a.- La síntesis de macromoléculas, ADN, ARN, y proteínas está disminuída, recuperándose primero la síntesis proteica por reagregado de poliaminas.
- b.- Los ribosomas se encuentran disociados, siendo el índice de asociación dependiente del grado de ayuno; muestran además una mayor sensibilidad al efecto disociante de la presión hidrostática durante la corrida. Además, responden menos al efecto asociante del catión Mg^{2+} ; el catión monovalente K^+ , por el contrario, los disocia más fácilmente. El agregado *in vitro* de poliaminas no altera el equilibrio de subunidades ribosomales. También se observan alteraciones en los polisomas, hay una menor proporción de monosomas involucrados en la síntesis proteica y aparecen estructuras denominadas "halfmers" que son acúmulos de la subunidad 40S sobre el ARN_m . Todas estas evidencias demuestran por primera vez un papel fisiológico de las poliaminas en el ensamblado y/o biogénesis del ribosoma eucariótico, previamente hallado en procariotes.

c.- La pared celular se vuelve más resistente al ataque de diversas enzimas líticas, dependiendo del grado y tiempo de ayuno de los cultivos. La lisis producida por estas enzimas aumenta parcialmente por agregado de distintos agentes que favorecen su acceso al sustrato, que es la capa más interna de glucano β 1-3. La composición química de la pared se encuentra alterada, pues disminuye drásticamente la cantidad de glucano β 1-3, aumentan ligeramente las manoproteínas y se incrementa moderadamente el glucano β 1-6. La estructura de la pared celular, analizada por microscopía electrónica, no es homogénea, es de mayor espesor y aparecen microcuerpos electrodensos dentro de la misma de probable origen citoplasmático. Por lo tanto, se pudo ver que las poliaminas participan en la síntesis y/o estructura de la pared celular, siendo la primera vez que se describe este papel para estos compuestos.

d.- Se observaron por microscopía de contraste de fase y electrónica una serie de cambios morfológicos en la célula que sugieren que las poliaminas participan y/o regulan algunos de los eventos específicos del ciclo celular. Los cultivos se arrestan en fase G_1 , como organismos no brotados, pero un porcentaje (5-15%) posee multibrotaciones, algunas de ellas en sitios anormales. Las células son más grandes, lo que se confirmó por análisis de los tamaños de poblaciones celulares con un Coulter Analyzer. Además, utilizando un colorante fluorescente específico para ADN que tiñe los núcleos celulares, se observaron alteraciones en la mitosis. La septación también se encuentra alterada como se observa por microscopía electrónica.

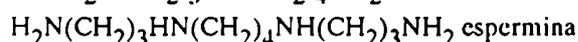
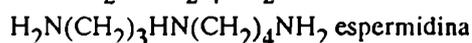
INTRODUCCION

GENERALIDADES - DISTRIBUCION DE POLIAMINAS EN LA NATURALEZA

Las poliaminas son policationes orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular, ampliamente distribuídos en todos los seres vivos.

La estructura química de estos compuestos es relativamente simple, lo que les permite establecer una gran variedad de interacciones con los diferentes componentes celulares. A pH fisiológico están cargados positivamente, por lo tanto pueden unirse electrostáticamente a ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos, etc. También pueden establecer puentes de hidrógeno con diferentes tipos de moléculas y su esqueleto carbonado interactúa hidrofóbicamente con estructuras como las membranas celulares. Teniendo en cuenta esta flexibilidad en su estructura química podemos comprender su participación en numerosos procesos celulares^{1,2}.

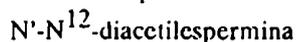
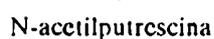
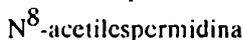
Las poliaminas más ampliamente distribuídas en la naturaleza son la putrescina (1-4 diamino butano), la espermidina (amino propil 1-4 diaminobutano), y la espermina (bisamino propil 1-4 diaminobutano)^{1,2}.



En los organismos procarióticos, salvo en termófilas, la espermina no está presente^{3,4}.

Generalmente estas policationes se encuentran en su forma libre, pero también se los puede hallar como derivados acetilados, conjugados con otros compuestos químicos, formando parte de moléculas complejas como alcaloides, y unidos a estructuras macromoleculares^{4,5}.

Los principales derivados acetilados de estos compuestos son:



Entre los componentes conjugados más importantes que forman estas policationes podemos mencionar:

- a) La glutationil-espermidina.- Este compuesto fue aislado de cultivos de *Escherichia coli* en fase estacionaria ; se desconoce cual es su función en este organismo⁶.
- b) Las poliaminas, o algún derivado de ellas, forman parte de las estructuras de varios antibióticos. Los ejemplos más notables son:

1.- Los aminoglicósidos bleomicina A5 y A6⁷.- Estos antibióticos han sido usados en enfermedades neoplásicas como linfoma de Hodgkins, tumores de testículos, y carcinomas de piel y cuello.

2.- Las edeínas A y B. Son oligopéptidos lineales conjugados a espermidina (Edeína A) o guanidil espermidina (Edeína B)⁵. Fueron aislados y caracterizados en *Bacillus brevis* Vm4. Numerosos estudios han demostrado que estos compuestos bloquean la síntesis de proteínas a nivel de iniciación tanto en procariotes como eucariotes⁸.

c) Varios sideróforos, como la agrobactina y parabactina, involucrados en el transporte de hierro de diversos microorganismos. Son derivados catecólicos de la amida terciaria treonilespermidina⁹.

Se han encontrado estructuras macromoleculares que poseen alguna poliamina unida covalentemente. Los dos ejemplos más importantes son:

a) La hipusina, donde la putrescina está unida covalentemente a un residuo lisina de una proteína de PM 18.000 y punto isoeléctrico ácido. Esta proteína fue identificada como un factor de iniciación de la síntesis proteica en eucariotes superiores¹⁰.

b) La α -putrescinil-timina. Esta pirimidina modificada reemplaza la mitad de los residuos de timina en el ADN del bacteriofago OW-14¹¹.

Existen también en la naturaleza otras poliaminas en menor proporción :

La cadaverina (1-5 diaminopentano) y la aminopropilcadaverina (aminopropil 1-5 aminopentano) han sido identificadas en varios organismos como *E. coli* y *Neurospora crassa*^{12,13}. Generalmente, se encuentran en mayor concentración en mutantes auxótrofas para poliaminas crecidas en medio libre de estos policaciones. El significado fisiológico de estas poliaminas menos frecuentes se desconoce, ya que no pueden reemplazar totalmente a las poliaminas clásicas en sus funciones¹³. Se ha encontrado también que la cadaverina forma parte de la estructura de la pared de algunos cocos anaerobios¹⁴.

La hidroxiputrescina fue aislada de *Pseudomonas sp*¹⁵ y *Pseudomonas acidovorans*¹⁸⁹. En el primer caso, esta poliamina es más eficiente que la putrescina para estabilizar la estructura de los ribosomas¹⁶.

En el organismo *Thermus thermophilus*¹⁷ y otras termófilas fueron descritas una gran variedad de poliaminas nuevas, tales como:

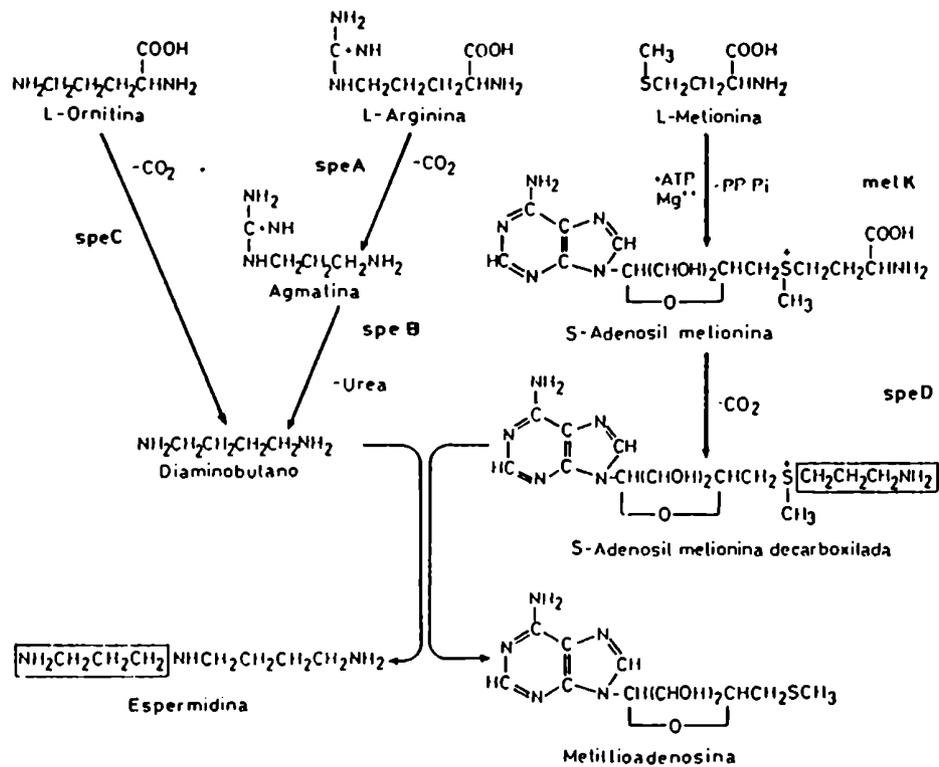
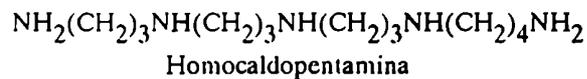
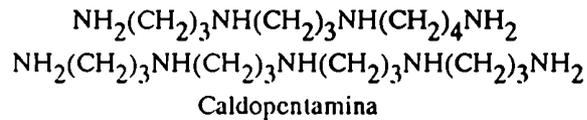
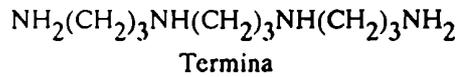
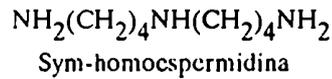
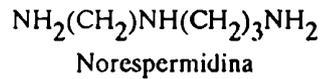


Figura 1. Camino biosintético de poliaminas en procaríotes y plantas (de Tabor C.W. y Tabor H.; Microbiol.Rev. 49:81, 1985).

Los genes indicados corresponden a las siguientes enzimas: Spe, ODC; Spe A, ADC; Spe D, SAM-DC; Spe B, Agmatina ureohidrolasa; Met K, S-adenosilmencionina sintetasa.



Algunas de ellas se encuentran también en bacterias mesófilas y en algunos organismos superiores. En termófilos extremos el contenido de poliaminas depende de la temperatura de crecimiento, predominando las tetra y pentaaminas a altas temperaturas. Se desconoce la función de estas poliaminas raras en dichos organismos, aunque se piensa que podrían actuar estabilizando macromoléculas como el ADN u organelas como los ribosomas, frente al aumento de la temperatura de crecimiento¹⁷.

METABOLISMO DE POLIAMINAS

La concentración intracelular de poliaminas está regulada por la célula de acuerdo con su estado de crecimiento. Cualquier célula en proliferación activa suele tener niveles elevados de estas poliaminas.

Hasta el momento no ha sido posible determinar cuál es la localización intracelular de estas sustancias polibásicas, debido a que cuando una célula se rompe, estos compuestos fuertemente cargados se unen a diversas estructuras celulares, sufriendo una redistribución durante la manipulación. Estudios recientes empleando resonancia magnética nuclear *in vivo* demuestran que en *E.coli* la putrescina se encuentra asociada a macromoléculas, probablemente ribosomas y/o fracciones que contienen membranas¹⁸.

En los últimos años, una serie de estudios en el hongo *N. crassa* han demostrado que las poliaminas se encuentran compartimentalizadas. En este organismo, tanto la putrescina como la ornitina - su precursor en la vía de biosíntesis - se encuentran secuestrados en vacuolas^{19,20}. Hasta el momento no se ha demostrado la compartimentalización en ningún otro organismo.

Los caminos de biosíntesis de las poliaminas han sido dilucidados en microorganismos, plantas y mamíferos superiores.

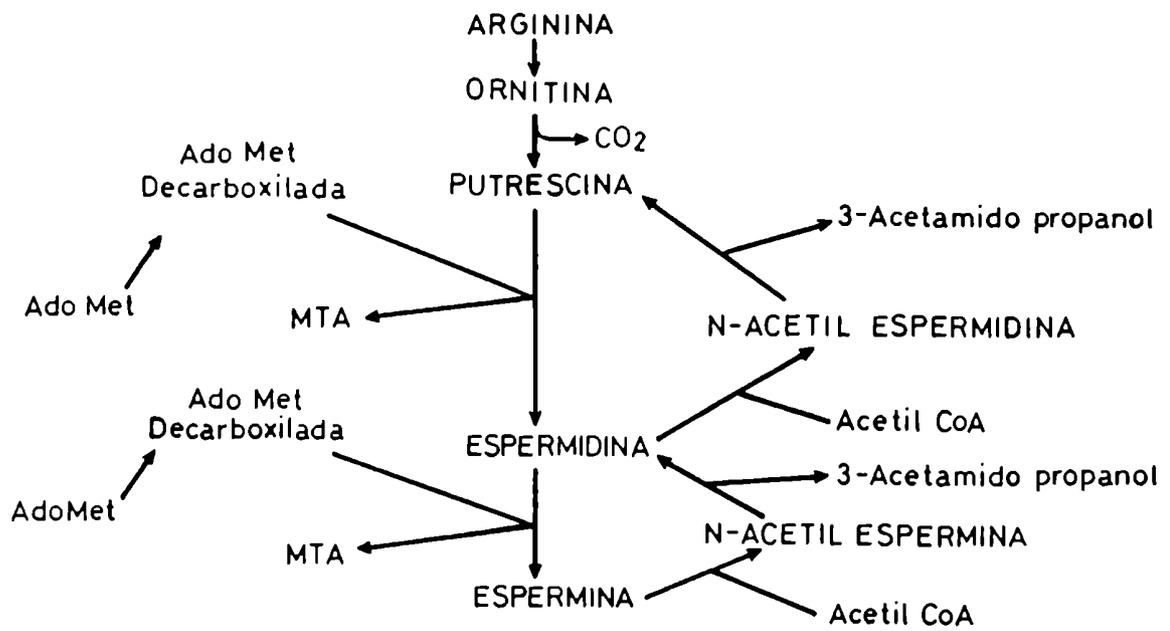


Figura 2. Camino biosintético de poliaminas en mamíferos (de Pegg, A; Cancer Res. 48:759, 1988).

En la Figura 1 se muestran los caminos biosintéticos para poliaminas en organismos procarióticos y plantas. La putrescina puede ser sintetizada por dos vías, una utiliza el aminoácido ornitina como precursor y la otra arginina. El dador de grupos aminopropilo es el aminoácido metionina, a través de S-adenosil-metionina. Las enzimas claves para la regulación de este camino metabólico son: la ornitina decarboxilasa (ODC), la S-adenosil metionina decarboxilasa (SAM-DC) y la arginina decarboxilasa (ADC).

En eucariotes superiores solo existe una vía de biosíntesis de putrescina, la que utiliza el aminoácido ornitina como precursor (Figura 2). A diferencia de los organismos procariotes, se ha identificado un camino metabólico que puede reciclar y sintetizar putrescina a partir de espermidina o espermina, por medio de la acetilación de estos dos policationes y su posterior oxidación. Las enzimas claves para la regulación de este camino metabólico son la ornitina decarboxilasa, la S-adenosil metionina decarboxilasa y las acetiltransferasas.

Muchos de los genes que codifican para estas enzimas han sido aislados y clonados de diversos organismos²¹⁻²³.

Por otra parte, las poliaminas ingresan al interior de la célula por un sistema de transporte activo, que ha sido identificado en algunos organismos como *E.coli*, *S. cerevisiae* y una gran variedad de células de mamíferos, aunque no ha sido caracterizado completamente a nivel bioquímico^{4,24,25}.

FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS

A pesar del gran progreso realizado en el conocimiento del metabolismo de las poliaminas en diversos organismos, muy poco es lo que se ha avanzado sobre dos preguntas fundamentales de este campo:

- 1) ¿Cuál es el papel fisiológico de estos policationes en los seres vivos?
- 2) ¿Cuál es su mecanismo de acción?

Numerosos estudios realizados en diferentes laboratorios demuestran la participación de estas bases orgánicas en procesos fundamentales como proliferación celular^{26,27}, diferenciación celular²⁷, modulación hormonal, desarrollo embriogénico²⁷, resistencia a "stress"²⁸, etc.

La mayoría de estos estudios han seguido tres tipos de estrategias experimentales:

a) La correlación de distintos parámetros de la fisiología celular con los niveles intracelulares de poliaminas y la actividad de las enzimas biosintéticas correspondientes. Este tipo de estudio sólo nos permite lograr una primera aproximación hacia los procesos fisiológicos o metabólicos afectados por las poliaminas, pero no podemos obtener evidencias directas de su participación en ellos.

b) Estudios en sistemas libres de células (*in vitro*). Con este tipo de estudios se ha demostrado la participación de las poliaminas en numerosos procesos. La interpretación de estos resultados debe ser cautelosa, debido a que por ser compuestos altamente cargados pueden interactuar en forma inespecífica con distintos componentes celulares y estas interacciones pueden no estar relacionadas con sus funciones biológicas específicas.

c) El estudio de las alteraciones que se producen en células u organismos que carecen de o tienen disminuído su contenido endógeno en poliaminas. En los últimos años se han aislado varias mutantes auxótrofas para los distintos poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) en diversos organismos, que han sido utilizadas para numerosos estudios. Por otra parte, se han descubierto varios inhibidores específicos para distintas enzimas del camino biosintético de las poliaminas como el α -difluormetilornitina (DFMO), inhibidor irreversible de la ODC²⁹; el MGBG, inhibidor de la SAM-decarboxilasa³⁰ y la ciclohexilamina, inhibidor de la espermidina sintetasa³¹. Utilizando estos compuestos por separado o en forma conjunta se puede disminuir el contenido endógeno de poliaminas en una célula y estudiar qué funciones celulares se alteran en estas condiciones.

Utilizando estas distintas estrategias se ha demostrado la participación de las poliaminas en diferentes procesos, como diferenciación celular y desarrollo embriogénico, pero debido a las implicancias en distintos campos (tratamiento de enfermedades neoplásicas, desarrollo de agentes antivirales y antichagásicos) ha sido prioridad conocer cuál es su papel fisiológico en la proliferación celular.

Poliaminas y proliferación celular

Distintos organismos, tanto procariotes como eucariotes, tienen niveles elevados de poliaminas y de sus enzimas biosintéticas cuando proliferan activamente. Este hecho sugirió que estos compuestos podrían tener un papel fisiológico en la proliferación celular, lo que fue confirmado utilizando mutantes auxótrofas para poliaminas o inhibidores de la biosíntesis de las mismas. En algunas mutantes obtenidas en diversos organismos como *S. cerevisiae*^{32,33}, *N. crassa*¹³ y *Aspergillus nidulans*³⁴, el requerimiento de poliaminas es absoluto. En otros casos, como varias mutantes obtenidas en *E. coli*³⁵⁻³⁷ las poliaminas sólo son necesarias para un crecimiento óptimo. Algunos organismos incapaces de sintetizar estos compuestos naturalmente como *Hemophylus parainfluenzae* las necesitan como factor de crecimiento³⁸. Por último, numerosos estudios llevados a cabo en células de eucariotes superiores demuestran que el agregado de distintos inhibidores de la biosíntesis de poliaminas disminuye la velocidad de crecimiento de estas células^{26,27}.

Durante la proliferación celular se llevan a cabo dos procesos: el crecimiento, en que se duplica la masa celular, y la división, en que los componentes celulares y la información genética son distribuídos entre la célula madre e hija, dando lugar a dos organismos idénticos. Hay evidencias experimentales que asignan a las poliaminas distintas funciones en ambos procesos.

Efecto de poliaminas sobre crecimiento celular

El evento clave durante el crecimiento celular es la duplicación del contenido de ADN (que es un requisito absoluto para que la célula pueda dividirse). Además, la célula aumenta su contenido en organelas y macromoléculas mediante la síntesis de ARN (tARN, rARN y mARN), y la síntesis de

proteínas. Se han encontrado evidencias de la participación de las poliaminas en estos procesos claves para el crecimiento celular.

Poliaminas y ADN

Los niveles de poliaminas sufren variaciones a lo largo del ciclo celular²⁷ presentando un pico máximo en el final de la fase G₁ previa a la fase S de replicación cromosomal. Algo semejante ocurre con la enzima ODC, primera enzima en el camino sintético de poliaminas. Varios hechos experimentales sugieren que esta síntesis de poliaminas prepara a la célula para la síntesis de ADN: 1- Los factores que retardan o impiden la entrada en fase S también afectan la aparición del pico de ODC²⁷. 2- La cantidad de poliaminas acumuladas en fase G₁ está directamente relacionada con la fracción de células capaces de entrar en fase S³⁹.

Varios estudios *in vivo* utilizando tanto mutantes auxótrofas para poliaminas como inhibidores de la biosíntesis de las mismas han demostrado la participación de estas bases orgánicas en la síntesis de ADN. Diversos tipos de células tratadas con estos inhibidores tienen una menor incorporación de timidina-H³ y debido a que la velocidad de elongación se encuentra ligeramente disminuída, se atribuyó esta disminución a una reducción en la iniciación de la síntesis de ADN⁴⁰. Sin embargo, Geiger y Morris, trabajando con mutantes de *E. coli* auxótrofas para poliaminas, encontraron que la velocidad de elongación de la síntesis de ADN estaba muy disminuída en ausencia de estos poliaminas, lo que sugiere una participación directa de los mismos en la replicación, probablemente como cofactores⁴¹.

Se han realizado numerosos estudios sobre la interacción de ADN y poliaminas en sistemas libres de células. Estas poliaminas protegen las macromoléculas de la desnaturalización por calor⁴² y de la ruptura por fuerzas mecánicas²⁶. Se han utilizado diversas técnicas como difracción circular, absorción en el ultravioleta, etc., para estudiar las interacciones con el ADN²⁶. Sin embargo, la interpretación de estos datos debe hacerse con cautela debido a que estas poliaminas podrían actuar mediante interacciones iónicas no específicas, ya que sales de cationes trivalentes como CO³⁺(NH₄)₆, que no tienen relación estructural con las poliaminas, producen efectos similares⁴³. Sin embargo, estudios teóricos recientes sugieren la existencia de sitios específicos de unión de la espermina al ADN⁴⁴.

Poliaminas y ARN

Mencionaremos algunos ejemplos de la acción de poliaminas sobre la síntesis de ARN.

Si se estimula la síntesis de ARN con hormonas, se incrementan los niveles intracelulares de poliaminas y ODC: en riñón la actividad de esta enzima incrementa 1.000 veces su valor basal luego de suministrar andrógenos a ratones castrados⁴⁵.

Se obtuvieron resultados muy interesantes perfundiendo corazón de conejo con MGBG, ya que junto con la disminución intracelular de poliaminas y ARN se reduce la acetilación de histonas ricas en arginina. El agregado de espermidina junto con MGBG impide la inhibición de la síntesis de ARN y la disminución en la acetilación de histonas, lo que sugiere que estos policationes pueden tener algún papel en la regulación de la expresión genética⁴⁶.

La síntesis total de ARN *in vivo* en cepas de *E. coli* auxótrofas para poliaminas está disminuída en ausencia de éstas. Al agregarse alguna de estas bases orgánicas se recupera primero la síntesis de proteínas, y luego la de ARN⁴⁷. Las subunidades β y β' de la ARN polimerasa están entre las primeras proteínas cuya síntesis aumenta por agregado de poliaminas⁴⁸.

Las poliaminas también afectan el control estricto de la transcripción. Una mutante de *E. coli* suplementada con estos policationes, así como la cepa parental, se comportan como estrictas, es decir, la síntesis de ARN estable cesa cuando se detiene la síntesis de proteínas por falta de un aminoácido. En cambio, las mutantes cultivadas en ausencia de poliaminas se comportan como relajadas, ya que la síntesis de ARN continúa aún cuando la síntesis proteica se detiene⁴⁹.

Los estudios realizados en sistemas libres de células sugieren que las poliaminas están involucradas en todos los pasos de la síntesis y degradación del ARN⁵⁰. Por las razones citadas anteriormente, se debe tener mucha cautela al interpretar estos resultados. Ha suscitado particular interés la unión de estos policationes con tARN⁵¹, ya que se consideró modelo de estudio de la interacción de estas bases orgánicas con este ácido nucleico. Varios trabajos han demostrado sitios de unión específicos para poliaminas, los más recientes sugieren la existencia de dos sitios a baja fuerza iónica y solo uno a alta fuerza iónica⁵².

Poliaminas y síntesis de proteínas

La participación de las poliaminas en la síntesis proteica ha sido demostrada por numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*.

Cuando se someten cepas mutantes de *E. coli* auxótrofas para estos policationes a condiciones de ayuno para los mismos, la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN y proteínas) se encuentra disminuída. Al agregarse poliaminas al medio de cultivo primero se recupera la síntesis de proteínas y luego la síntesis de ARN y ADN⁴⁷. Algranati y colaboradores demostraron que este defecto en la síntesis de proteínas se origina en la biosíntesis y/o ensamblado del ribosoma procariótico⁵³. En condiciones de ayuno para poliaminas, estas mutantes presentan un perfil ribosomal alterado, con mayor disociación de sus subunidades⁵⁴. Estos ribosomas son más resistentes a antibióticos del grupo de los aminoglicósidos como la estreptomina⁵⁵. Dichas organelas, aislados de las mismas mutantes cultivadas sin poliaminas tienen una menor actividad de síntesis de proteínas en sistemas libres de células⁵⁴, son menos efectivos para iniciar la traducción⁵⁶ y tienen menor afinidad por estreptomina⁵⁷. Utilizando mezclas heterólogas de subunidades con ribosomas normales y anormales y evaluando su actividad en sistemas libres de células, los mismos autores demostraron que

el defecto se encontraba en la subunidad 30S del ribosoma procariótico⁵⁸. Posteriormente, Igarashi y colaboradores demostraron que el ARN 16S que compone la subunidad menor del ribosoma estaba submetilado, y que la proteína S₁ está en menor cantidad en esta subunidad⁵⁹.

Existen algunas mutantes de *E. coli* auxótrofas para poliaminas, que en ausencia de las mismas, crecen con una velocidad 30% menor que la cepa parental. Tabor y colaboradores demostraron que si a estas bacterias se les introduce una mutación rpsL (que afecta la proteína ribosomal S₁₂), el requerimiento de poliaminas para crecer se vuelve absoluto. Una posible explicación de este fenómeno sería que la estabilidad y/o conformación de los ribosomas que contienen una proteína S₁₂ alterada, estaría muy influenciada por la presencia o ausencia de poliaminas⁶⁰.

Estudios realizados en sistemas libres de células indicaron que las poliaminas son capaces de reemplazar parcialmente, pero no totalmente, el requerimiento de Mg²⁺ para la síntesis proteica⁶¹. Las poliaminas, en determinadas concentraciones, tienen un efecto estimulante sobre casi todos los pasos de la síntesis proteica. Así se unen al tARN promoviendo cambios conformacionales que lo hacen más activo en su capacidad aceptora de aminoácidos⁶², inducen la asociación de las subunidades ribosomales^{55,63-65} y la unión del ARN mensajero (poliU) y del aminoacil tRNA a los ribosomas⁶⁶. Muchos de estos procesos pueden inhibirse por un exceso en la concentración de poliaminas.

Las poliaminas también afectan la fidelidad de la traducción en sistemas libres de células, la aumentan cuando se agregan en concentraciones fisiológicas y niveles subóptimos de Mg²⁺⁶⁶. A altas concentraciones de Mg²⁺, estos policaciones no tienen efecto o disminuyen la fidelidad⁶⁵. Por otra parte el agregado de espermidina corrige parcialmente el aumento en los errores de la traducción provocada por estreptomycin en sistemas libres de células⁵⁵.

Estudiando *in vivo* la influencia de estos policaciones sobre la fidelidad de la traducción con mutantes auxótrofas para poliaminas se concluyó que las mismas disminuyen los errores que suceden *in vivo* a alta frecuencia, mientras no parecen tener efecto sobre los errores que ocurren a menor frecuencia⁶⁷.

Efectos de poliaminas sobre la división celular

Mediante la división celular el contenido nuclear y citoplasmático de la célula madre es repartido en partes iguales dando lugar a la formación de dos células idénticas; se han encontrado pruebas de la participación de las poliaminas en este proceso. Algunas células ayunadas en poliaminas por tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de las mismas, tienen un alto índice de células binucleadas⁶⁸. El agregado de espermidina reduce este índice a niveles comparables con el control; por lo tanto las poliaminas están involucradas de alguna manera con la separación nuclear. El aparato mitótico responsable de dicha separación y de la citoquinesis está compuesto por filamentos de actina. Varias células analizadas en fase mitótica y tratadas con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas pierden la integridad de dichos filamentos; el agregado de espermidina produce la reaparición de los mismos. La integridad de los filamentos es esencial para que la célula pueda realizar una citoquinesis

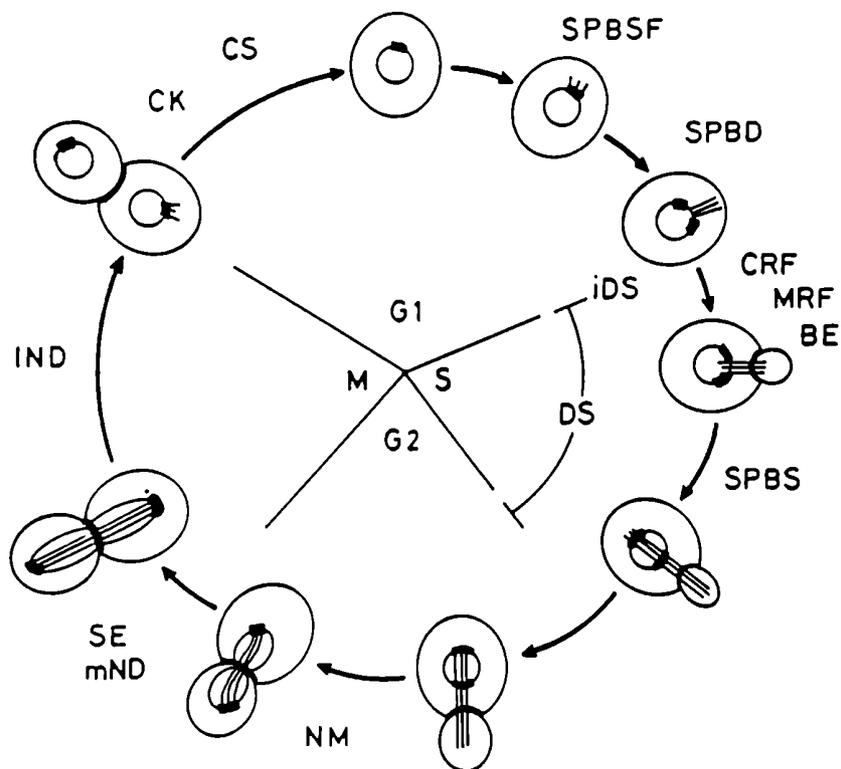


Figura 3. Ciclo celular de *S. cerevisiae*.

SPBSF: formación de la placa satélite, SPBD: duplicación del centriolo, CRF: formación del aro de quitina, MRF: formación del anillo de microfilamentos, BE: aparición del brote, iDS: iniciación de la síntesis de ADN cromosomal, DS: síntesis de ADN cromosomal, SPBS: separación del huso, NM: migración nuclear, mNM: estadio medio de la migración nuclear, SE: elongación del huso, IND última etapa de la división nuclear, CK: citoquinénesis, CS: separación celular (de Hartwell, L.H. *Bacteriol. Rev.* **38**:164, 1974).

normal⁶⁸. El agregado de poliaminas en concentraciones fisiológicas promueve la polimerización de los filamentos de actina en sistemas libres de células⁶⁹ y estimula el cambio de conformación de esta proteína de su forma globular a filamentosa⁶⁹.

LA LEVADURA *S. cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo unicelular que puede crecer rápidamente en medios sintéticos. Se reproduce por brotación y el brote aumenta de tamaño a lo largo del ciclo celular de manera tal que los distintos eventos del mismo son fácilmente caracterizables morfológicamente⁷⁰. Además este organismo es fácilmente manipulable genética y bioquímicamente, y los elementos básicos de su estructura celular, síntesis de macromoléculas, replicación y segregación del cromosoma son bastante homólogos a los observados en células superiores de animales y plantas. Todos estos elementos hacen que la levadura *S. cerevisiae* sea un modelo interesante para el estudio y función de las poliaminas en eucariotes.

Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso de reproducción vegetativa mediante el cual una célula se duplica originando dos organismos genéticamente idénticos. Al igual que en otros eucariotes, en la levadura ha sido dividido en cuatro fases: la fase G₁ que precede a la iniciación de la replicación; la fase S durante la cual se replica el ADN cromosomal; la fase G₂ previa a la mitosis; y por último la fase M donde tienen lugar la mitosis y la división nuclear.

En cada una de estas fases hay eventos específicos que se manifiestan una o dos veces por ciclo (Figura 3), denominados procesos discontinuos⁷¹; comienzan en la fase G₁ luego de atravesar el punto de control "start". En la fase G₁ tardía, el centrólo (SPB) que es un sistema localizado en la envoltura nuclear que organiza todo el sistema de microtúbulos, desarrolla una pequeña estructura satélite, e inmediatamente después se duplica; al mismo tiempo aparece el brote celular y comienza la replicación del genoma que dura aproximadamente el 25% del ciclo celular. Este último evento marca el comienzo de la fase S. Cerca del final de esta fase, los centrólos se separan formando el huso mitótico, lo que marca el final de la segunda etapa del ciclo. El final de la fase G₂ está marcado por la migración del núcleo hacia el cuello de la brotación. Durante la fase M o mitótica, el huso se elonga y se produce la división nuclear; al igual que en otros hongos, la membrana nuclear no desaparece durante este proceso. La falta de condensación y el pequeño tamaño de los cromosomas no permiten determinar con precisión el momento en que se produce la segregación mitótica. Por definición, la fase G₁ comienza una vez terminada la división nuclear, por lo tanto la citoquinesis y la separación celular ocurren en la fase G₁ temprana.

Son necesarios por lo menos 50 genes para que tenga lugar un ciclo celular normal⁷¹. Debido a que una mutación en cualquiera de estos genes es letal para el organismo, se aislaron mutantes termosensibles que se denominaron mutantes deficientes en el ciclo celular (CDC). En teoría, el producto de esos genes es necesario en sólo uno de los eventos discontinuos del ciclo celular; por lo tanto, una mutación condicional va a ser reconocida porque a la temperatura no permisiva, todas las células de un cultivo asincrónico se detendrán en aquella etapa donde se requiera el producto de dicho gen. El fenotipo que presentan las células a la temperatura no permisiva se llama terminal⁷⁰. Podemos encontrar algunos ejemplos de estas mutantes y de sus fenotipos terminales en la Tabla 1.

Gen	Fenotipo terminal	Etapa afectada a la temp. no permisiva
CDC 3	M	MRF
CDC 4	D	iDS
CDC 7	H	iDS
CDC 9	H	DS
CDC 10	M	MRF
CDC 13	H	mND
CDC 14	J	IND
CDC 24	C	CRF
CDC 25	A	SPBSF
CDC 31	E	SPBE
CDC 35	A	SPBSF

Tabla nº 1. Algunos genes CDC, especificando su fenotipo terminal y el evento discontinuo afectado a la temperatura no permisiva.

Fenotipos terminales: A.- células no brotadas, uninucleadas, arrestadas en fase G_1 que no continúan el crecimiento a la temperatura no permisiva. C.- células no brotadas que no pueden formar el aro de quitina pero continúan el crecimiento, la síntesis de ADN y la división nuclear. D.- células multibrotadas, mononucleadas, en fase G_1 , su centríolo se encuentra duplicado pero no separado, continúan su crecimiento a la temperatura no permisiva. E.- células con una sola brotación, mononucleadas, arrestadas en fase G_2 , su centríolo tiene aproximadamente el doble del tamaño normal pero no se encuentra duplicado. H.- células con una sola brotación, mononucleadas, arrestadas en fase G_1 o G_2 , con centríolos cortos y completos, su núcleo se encuentra situado en el cuello de brotación. J.- células con una sola brotación, uninucleadas, arrestadas en fase G_2 , con husos mitóticos completos y extendidos entre célula madre e hija que continúan el crecimiento a la temperatura no permisiva. M.- células multibrotadas y multinucleadas. SPBSF: formación del cuerpo satélite del huso mitótico, SPBD: duplicación del centríolo, MRF: formación del anillo de microfilamentos, CRF: formación del anillo de quitina, iDS: iniciación de la síntesis de ADN cromosomal, DS: síntesis de ADN cromosomal, mND: estadio medio de la división nuclear, IND: estadio tardío de la división nuclear. (de Pringle J.R. y Hartwell L.H.; 1982, The *S.cerevisiae* cell cycle. In J.N.Strathern, Jones E.W y Broach J.R.; ed. The Molecular Biology of the Yeast *S.cerevisiae*, Vol 2).

Conjuntamente con los eventos discontinuos del ciclo celular hay un proceso continuo

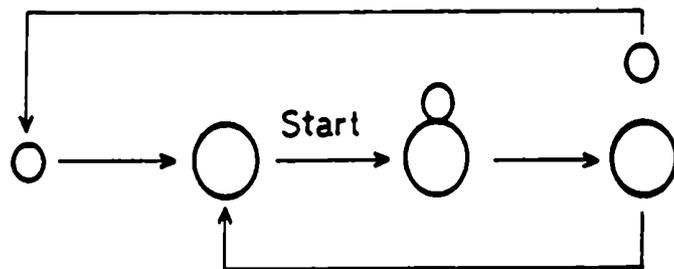


Figura 4. División asimétrica en *S.cerevisiae*.

La célula madre y su hija tienen distinto tamaño en el momento de la división. La nueva célula debe crecer más y tarda más tiempo en alcanzar el punto start (de Pringle J.R. y Hartwell L.H.; 1982, *The S.cerevisiae cell cycle*. In J.N.Strathern, Jones E.W y Broach J.R.; ed. *The Molecular Biology of the Yeast S.cerevisiae*. Vol 2).

caracterizado por el mantenimiento del medio interno^{72,73}, el metabolismo intermedio⁷¹ y el crecimiento celular⁷¹; este proceso tiene lugar aún en células que no hayan entrado al ciclo celular o estén detenidas en alguna de las etapas del mismo. Los procesos principales del crecimiento celular son la síntesis de la pared celular, de ARN y proteínas y la replicación del ADN mitocondrial.

La célula coordina los eventos discontinuos y continuos del ciclo celular de forma tal que se divida una sola vez por duplicación de la masa celular. Una gran cantidad de experimentos sugieren la existencia de un solo punto de control donde las feromonas sexuales, el crecimiento, la disponibilidad de nutrientes y los eventos del ciclo celular previo ejercen su acción⁷⁰. Este punto ha sido denominado start, y una vez completado la célula desarrolla el programa de eventos discontinuos del ciclo. Johnston et al⁷⁴ propusieron un modelo, confirmado por varios autores^{75,76}, que explica la coordinación entre crecimiento y ciclo celular (Figura 4). Tiene dos proposiciones fundamentales: 1) Normalmente, la etapa limitante de la proliferación celular es el crecimiento y no el progreso a través de los distintos eventos discontinuos. 2) La levadura debe llegar a un tamaño crítico para que se active uno y solo uno de los eventos discontinuos, el pasaje por el punto start.

Pared celular

Con excepción de la región del septo, la pared celular de *S. cerevisiae* presenta una morfología bastante uniforme, .

Su composición química es bastante simple y consta de tres clases de polisacáridos:

1) Las manoproteínas que son polímeros de 100-200 residuos de manosa unidos covalentemente por N-diacetilquitobiosa a residuos asparagina de las proteínas. También se pueden observar polímeros más cortos de manosa unidos a serina y treonina. Estos compuestos constituyen el 45% de la pared, habiendo por lo menos dos tipos de manoproteínas: los componentes estructurales de la pared⁷⁷ y las exoenzimas como la invertasa y la fosfatasa ácida. Su biosíntesis se realiza por un camino similar al de las glicoproteínas celulares de mamíferos.

2) Los glucanos, que son polímeros de glucosa con uniones β 1-3 ó β 1-6; constituyen el 45 % de la pared. Se han podido aislar dos tipos de glucanos en base a su solubilidad en álcali o en medio ácido. A partir de células enteras se obtiene por calentamiento en medio ácido un glucano altamente ramificado donde predominan las uniones β 1-6^{78,79}. Del residuo de la extracción ácida es posible aislar por tratamiento alcalino un glucano donde predominan en cambio las uniones β 1-3⁸⁰, que también se puede preparar por tratamiento a pH alto a partir de paredes aisladas⁸¹. La biosíntesis del glucano β 1-3 es catalizada por la glucano sintetasa a partir de UDP-Glc; la enzima es activada por nucleótidos, siendo GTP el más efectivo⁸².

3) La quitina, que es un polímero lineal de N-acetil glucosamina con uniones β (1-4), constituye el 1-2% de la pared. Este polímero polimórfico puede presentar tres tipos de estructuras cristalinas α , β y σ . En la pared de levaduras sólo existe la forma α ⁸³, que tiene un alineamiento antiparalelo de las cadenas de N-acetil glucosamina. En esta estructura, los puentes de hidrógeno son máximos y en

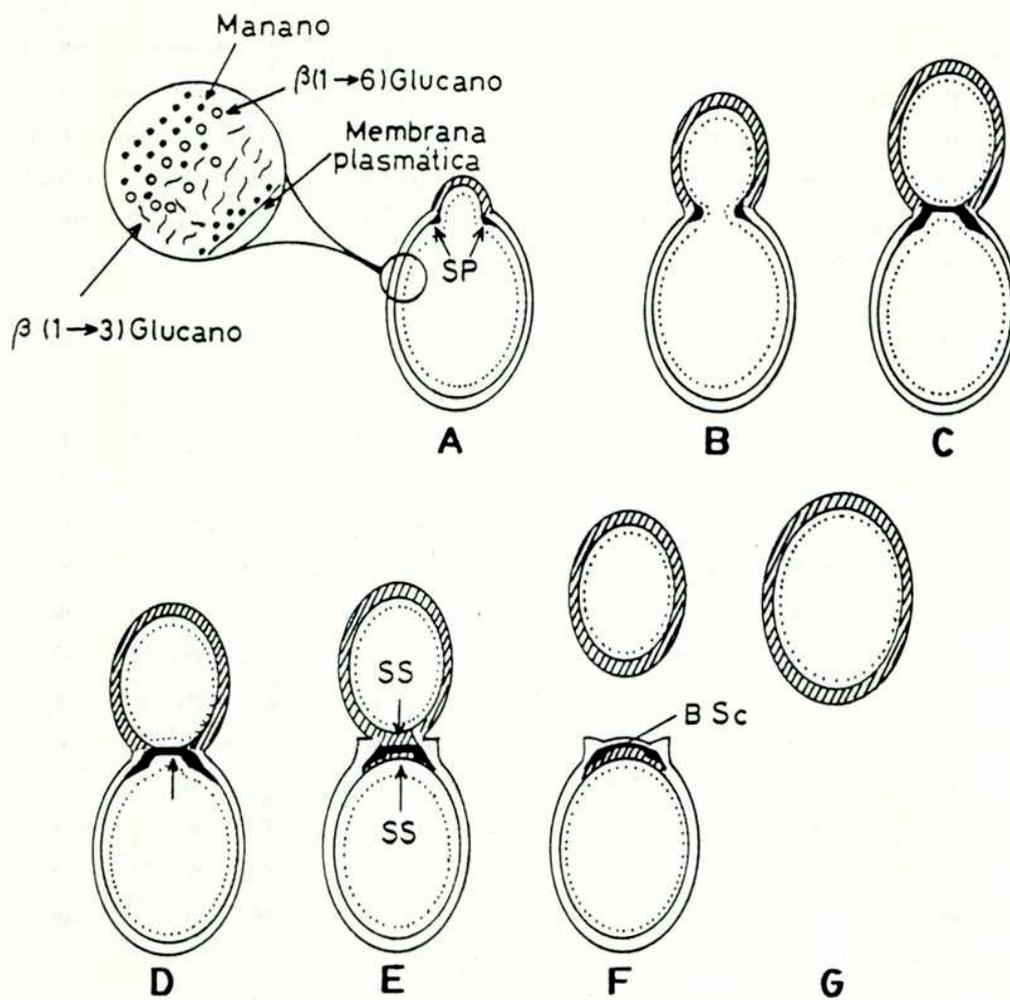


Figura 5. Esquema del crecimiento de la pared celular a lo largo del ciclo celular.

La pared celular nueva se representa rayada; la vieja en blanco y la quitina en negro. SP primordio septal; PS septo primario; SS septo secundario y BSc cicatriz celular. A.- aparición del brote celular y formación del aro de quitina; B.- crecimiento de la pared en el brote a lo largo del ciclo celular; C y D.- formación del septo primario; E.- formación del septo secundario; F.- separación celular (de Cabib E. y Roberts R., *Ann.Rev.Biochem.* 51:763, 1982).

consecuencia este compuesto es altamente resistente a la extracción química⁸⁴. El 90% de este polímero se encuentra formando el septo⁸⁵. Se han identificado dos enzimas responsables de la biosíntesis de quitina, la quitina sintetasa I y la II^{86,87,177}. La quitina sintetasa I ha sido estudiada extensamente, utiliza UDP-NAcGlc como sustrato, se activa por degradación proteolítica de su zimógeno, y se cree que es la responsable de la reparación de la pared celular¹⁷⁵, y se ha clonado recientemente el gen que la codifica⁸⁸. Además se ha podido identificar otra enzima, la quitina sintetasa II, la cual no es activada por proteólisis y es la verdadera responsable de la síntesis de quitina en el septo durante el ciclo celular⁸⁹.

Se ha podido dilucidar la estructura de la pared celular mediante observación por microscopía electrónica, acción de enzimas líticas, extracción diferencial de glucanos, unión específica de lectinas o anticuerpos. En la Figura 5 A se muestra un esquema de la pared. La capa más externa está compuesta por manoproteínas, seguida de una capa intermedia formada por glucano β 1-6, y por último la capa más interna de glucano β 1-3. En la figura 6 se puede observar su ultraestructura por microscopía electrónica, pudiéndose distinguir en este caso la capa externa más electrodensa de mananos.

Como ya se ha descrito anteriormente, la aparición del brote marca el final de la fase G₁ del ciclo celular. Esta formación es una protuberancia que tiene aproximadamente 1 μ m de ancho en la base; su pared es continua con la de la madre (Figura 5-A). Mediante técnicas autorradiográficas se ha demostrado que crece continuamente a lo largo del ciclo celular (Figura 5-B)⁹⁰. La síntesis de la pared se encuentra localizada en el brote como puede verse por autorradiografía usando precursores marcados y por tinción con colorantes fluorescentes específicos para los componentes de la pared⁹¹⁻⁹⁴. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la incorporación del nuevo material a la pared celular. La idea más aceptada es que el nuevo material se inserta en sitios de crecimiento donde la pared celular ha sido lisada por acción de varias glucanasas específicas^{94,95}. Estos sitios de crecimiento se encuentran ubicados en el brote cuya localización estaría regulada por los genes CDC que controlan el ciclo celular. Varias cepas que poseen mutaciones termosensibles en alguno de estos genes y que afectan distintas etapas del ciclo, como duplicación del centrólo, síntesis de ADN, iniciación de la brotación o división nuclear, continúan creciendo a la temperatura no permisiva en forma desordenada, aumentando el tamaño tanto de la célula madre como de la hija⁷⁴. Por lo tanto, la interrupción del ciclo celular altera el mecanismo de localización de la síntesis de pared.

Cuando aparece el brote se forma un aro en la unión con la célula madre, que observado por microscopía electrónica presenta una menor densidad electrónica (Figura 5-A)⁹⁶. Utilizando colorantes específicos para quitina e inhibidores de la biosíntesis de la misma se ha demostrado que este aro está formado por dicho polisacárido⁹⁷. Al final del ciclo celular, luego de la división nuclear, tienen lugar la citoquinesis y la separación celular, la membrana plasmática se invagina donde se juntan ambas células, y el aro de quitina crece en forma centrípeta formando el septo primario (Figura 5-C-D y 6-A); el septo secundario se forma posteriormente, por deposición de glucano y manano sobre el septo primario (Figura 5-E y 6-B). Cuando las células se separan, el septo primario constituido por quitina es retenido

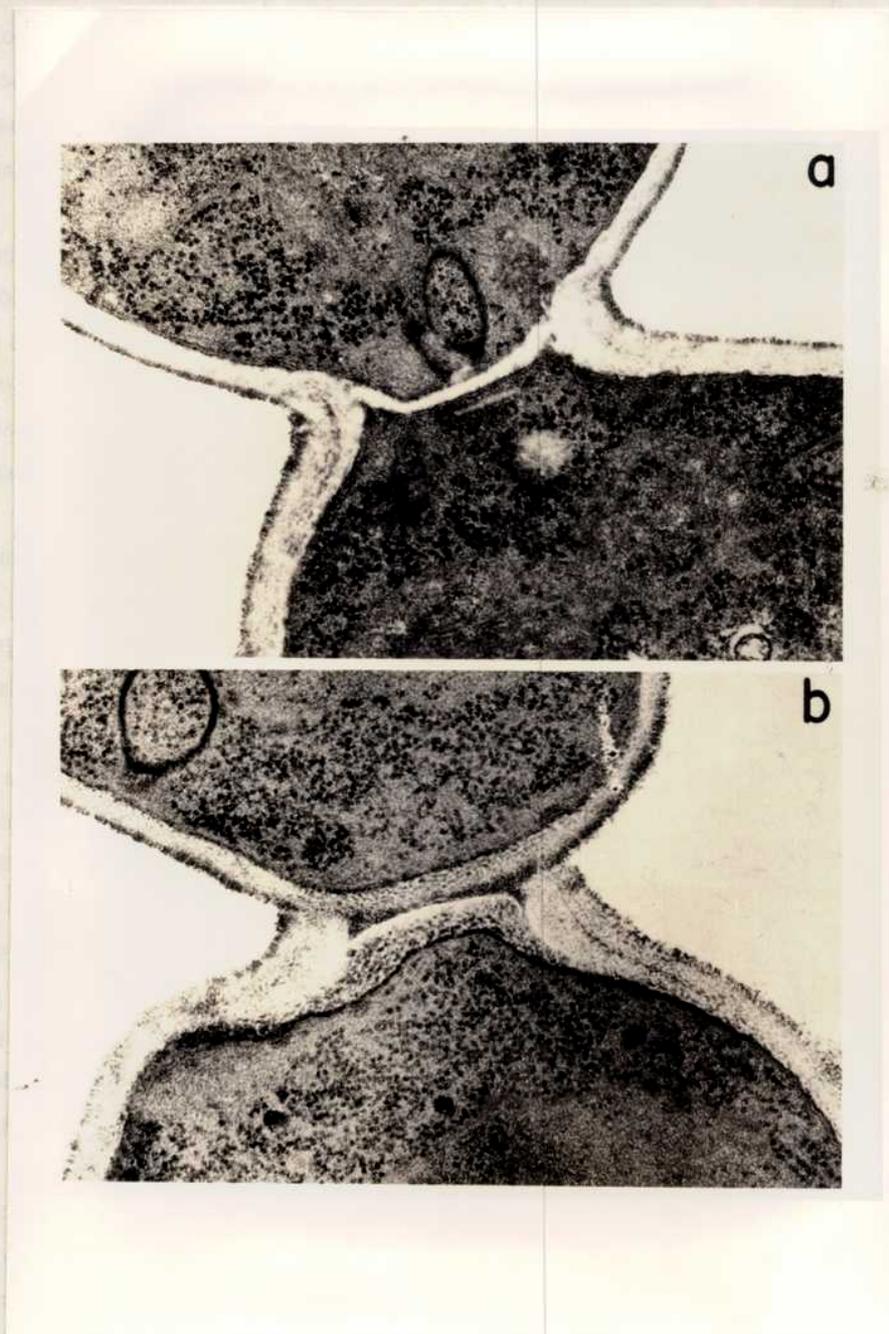


Figura 6. Microscopía electrónica de la pared celular.

A.-formación del septo primario y B.-formación del septo secundario (de Hartwell, L.H. Bacteriol.Rev.38:164, 1974).

por la célula madre formando la cicatriz de brotación (Figura 5-F)⁸⁵. Para que aparezca el septo se requiere que se completen otros eventos del ciclo celular como la síntesis de ADN, la división nuclear y la formación del brote. Todas las mutantes termosensibles del ciclo celular que a temperatura no permisiva se bloquean en alguna de estas etapas son incapaces de formar el septo⁹⁸. Tampoco lo forman aquellas mutantes que no puedan realizar citoquinesis⁹⁹. Esto es lógico, debido a que la citoquinesis y la deposición del septo primario son coincidentes. La formación del septo secundario requiere la síntesis previa del primario; cuando esta última es inhibida, el material que formaría el septo secundario se deposita anormalmente¹⁰⁰. Estos eventos, a saber citoquinesis, formación del septo y separación celular, parecen comenzar muy temprano en el ciclo celular junto con la aparición del brote⁹⁹.

Durante cada ciclo celular se forma un solo brote por célula en *S. cerevisiae* y su momento de aparición está estrictamente regulado, correlacionándose estrictamente con la duplicación y aparición del centríolo. Algunas mutantes termosensibles, incapaces de duplicar el centríolo a la temperatura no permisiva, no presentan brotación; asimismo no se han detectado células brotadas que no tengan esta estructura duplicada¹⁰¹. En cambio otras mutantes que no pueden separar los centríolos duplicados, forman más de un brote por célula. Por lo tanto, la separación del centríolo ejerce un control negativo sobre la iniciación de la brotación¹⁰².

La levadura brota en lugares específicos, en el área de mayor curvatura de los polos de la célula. El sitio de brotación se encuentra ubicado en lugares diferentes en células haploides o diploides, en el primer caso está alrededor de la cicatriz de nacimiento y en el segundo en el polo distal¹⁰³. Se han descrito dos casos donde se encuentra alterado el mecanismo de localización de la brotación:

1- Levaduras que crecen a muy baja velocidad en un quimiostato con glucosa limitante¹⁰⁴; y 2- la mutante del ciclo celular *cdc24*, en que la brotación se produce en sitios anormales¹⁰⁵.

Ribosomas y síntesis de proteínas

El ribosoma de levadura como el de otros eucariotes es una ribonucleoproteína que tiene un coeficiente de sedimentación de 80S y esta formada por dos subunidades de 40S y 60S que se encuentran en equilibrio con el monómero; este estado dinámico es muy importante en la síntesis proteica. En sistemas libres de células, el equilibrio es afectado por varias condiciones como pH, concentraciones de cationes divalentes y monovalentes, solventes orgánicos, urea, etc.¹⁰⁶.

El ribosoma es una partícula compleja compuesta por cuatro tipos de ácidos ribonucleicos y aproximadamente 70 (± 10) proteínas, dependiendo de los métodos de extracción y análisis¹⁰⁷.

La subunidad 40S está formada por un rRNA de 18S y 30(± 5) proteínas, y la subunidad 60S por tres rRNA de 25S, 5,8S y 5S, además de 40(± 5) proteínas¹⁰⁷.

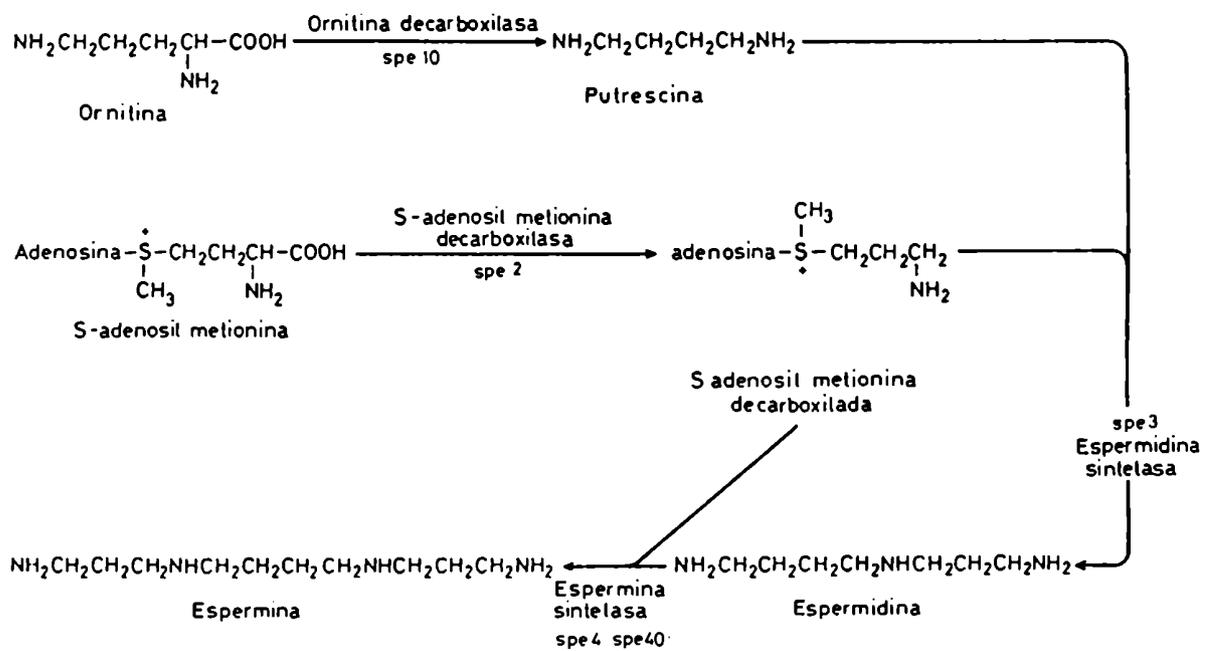


Figura 8. Biosíntesis de poliaminas en *S.cerevisiae* (de Tabor C.W. y Tabor H.; Microbiol.Rev. 49:81, 1985).

En la Figura 7 podemos observar un esquema del camino biosintético para el rRNA.

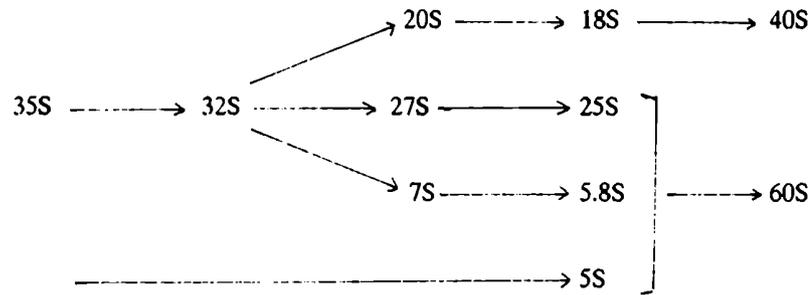


Figura 7. Esquema de la biosíntesis de los ribosomas en *S. cerevisiae* (de Warner J.R. The Yeast Ribosome: Structure, Function and Biosynthesis; In J.N.Strathern, Jones E.W y Broach J.R.; ed. The Molecular Biology of the Yeast *S.cerevisiae*, Vol 2).

A medida que se procesa el rRNA se produce el ensamblado y maduración de la partícula ribosomal. Al rRNA se le unen varias proteínas, la mayoría de ellas ribosomales, en forma escalonada y ordenada, formando diferentes ribonucleoproteínas intermedias denominadas pre-RNP¹⁰⁸. Este proceso se produce casi en su totalidad en el nucleolo y los últimos pasos en la maduración de las subunidades ribosomales son citoplasmáticos¹⁰⁹.

El mecanismo de síntesis de proteínas es similar al descrito en otros eucariotes. Tiene tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Los mensajeros son monocistrónicos y poseen cap.

Metabolismo y función de poliaminas en *S. cerevisiae*

En *S.cerevisiae* se encuentran presentes las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en concentraciones de 0.45, 2.0 y 0.3 pmol por g. húmedo de células, respectivamente¹¹⁰. Hasta el presente no se han identificado ninguna de sus formas derivadas, por ejemplo acetilados, ni ninguna otra poliamina especial.

La biosíntesis de estas poliaminas es similar a la descrita en otros eucariotes (Figura 8). No parecen existir caminos alternativos (por acetilación) para la formación de putrescina como los observados en mamíferos superiores. Varias de las enzimas de este camino biosintético han sido purificadas a homogeneidad y algunos de los genes que las codifican han sido aislados y clonados. Se describen a continuación las principales enzimas:

a.-La ornitina descarboxilasa (ODC) de *S. cerevisiae* purificada a homogeneidad tiene un PM 110.000; es una proteína oligomérica compuesta por dos subunidades de 53 Kd. y tiene piridoxal fosfato como cofactor. La putrescina la inhibe competitivamente ; la α -difluormetilornitina (DFMO) es un inhibidor irreversible en un sistema libre de células¹¹¹. El gen que codifica para la ODC ha sido aislado^{21,113}. Hasta el momento, la regulación de esta enzima no ha sido aclarada. Su actividad es

mayor en cultivos en rápida proliferación y varía en las distintas fases de la curva de crecimiento¹¹². La vida media de la ODC de *S. cerevisiae* es de 6 hs, valor muy superior al observado en otros eucariotes (10-20 min). El agregado de espermidina y espermina inactiva la enzima disminuyendo su vida media a 2 hs. Esta pérdida de actividad no está asociada a degradación proteica y depende de la síntesis de proteínas, lo que sugiere una modificación post-traducciona de la enzima¹¹¹ no aclarada hasta el momento. No hay ninguna prueba de la presencia de antizima en levadura.

b.-La S-adenosil metionina decarboxilasa ha sido purificada a homogeneidad, está compuesta por dos subunidades de PM 41.000 y tiene unida covalentemente una molécula de piruvato que es esencial para su actividad. La enzima es activada por putrescina, pero no por Mg^{2+} ; es inhibida por metil-glioxal-bis(guanilhidrazona) y por su producto la S-adenosilmetionina decarboxilada¹¹⁴.

c.-Existen en levadura dos aminopropiltransferasas, la putrescina-aminopropil transferasa y la espermidina aminopropil transferasa, codificadas por dos genes independientes¹¹⁵; estas enzimas no han sido purificadas hasta el momento.

En los últimos años se han aislado mutantes de levaduras auxótrofas para poliaminas en varios laboratorios, algunas de las cuales tienen alterado el gen que codifica la ODC^{21,32,33,116}. En ausencia de poliaminas, algunas de estas cepas no pueden crecer, y otras lo hacen a muy baja velocidad con T1/2 de 10-60 hs (T1/2 normal: 3 hs). Por otra parte, no pueden esporular³² ni mantener el plásmido "killer"¹¹⁸. Nosotros hemos trabajado con una cepa mutante aislada por Hosaka et al, no caracterizada genéticamente, que no tiene actividad de ornitina decarboxilasa y que tiene disminuido el transporte de colina, en consecuencia incorpora menos colina a fosfatidil colina y la síntesis de la membrana celular se encuentra alterada; además no crece en ausencia de poliaminas³³.

Se han aislado varias mutantes deficientes en la enzima S-adenosil metionina decarboxilasa¹¹⁷ que por ayuno de poliaminas no contienen espermidina ni espermina, si bien acumulan putrescina y tienen niveles muy altos de ODC¹¹⁷. En estas condiciones, hay una marcada disminución de la velocidad de crecimiento, incapacidad para esporular y pérdida del plásmido "killer"^{117,118}.

Se han aislado mutantes deficientes en las dos aminopropil transferasas, aunque no han sido caracterizadas hasta el momento¹¹⁵.

MATERIALES Y METODOS

Descripción de cepas celulares

Se utilizaron para la realización de este trabajo las cepas *S. cerevisiae* X-2180 1B (MAT α) (proveniente del Yeast Genetic Center, University of California) y *S. cerevisiae* 179-5. Esta última fue obtenida por mutagénesis química a partir de X-2180-1B por Hosaka y colaboradores³³, quienes tenían interés en conocer el papel bioquímico de agentes promotores de la proliferación celular, tales como las poliaminas, en la síntesis de la membrana celular, específicamente la biosíntesis de fosfolípidos. Esta mutante no ha sido caracterizada genéticamente, posee muy baja actividad de ornitina decarboxilasa y niveles muy disminuídos de poliaminas. En ausencia de estas bases orgánicas, el transporte de colina se encuentra disminuído. Por reagregado de estos policationes al medio de cultivo se recuperan niveles normales, dependiendo de la síntesis de proteínas.

Medios de cultivo

YPAD: Medio rico que contiene cantidad suficiente de poliaminas para permitir un crecimiento normal de mutantes deficientes en la síntesis de estas bases orgánicas.

Contiene (%):	
Extracto de levadura Difco	1
Peptona Difco	2
Glucosa	2
Adenina	0,05 mg/ml
Agar (solo para medio sólido)	2

Se esteriliza por autoclavado 120°C 20min.

Medio de Wickerman modificado:

Es un medio mínimo completo, libre de poliaminas, y se utiliza para ayunar de estos policationes a *S. cerevisiae* 179-5. Su composición química es la siguiente:

KH_2PO_4	0,785 mg/ml
K_2HPO_4	0,125 mg/ml
NaCl	0,1 mg/ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 mg/ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 mg/ml
H_3BO_3	0,01 ppm
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 ppm
KI	0,10 ppm
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 ppm
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,07 ppm
Biotina	2 ng/ml
Pantotenato de calcio	400 ng/ml
Inositol	2 ng/ml
Piridoxina	400 ng/ml
Tiamina	400 ng/ml
Glucosa	2 %
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,1 %
Agar (para medio sólido)	2 %

Para evitar precipitaciones durante la esterilización, se autoclavan por separado 20 minutos a 120°C las mezclas KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -NaCl; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; y oligoelementos. Las vitaminas se filtran por millipore 0.24 μm ^{33,119}.

Medio para *Arthrobacter luteus*

Para cultivar la cepa *A. luteus* ATCC 21606 (obtenida de ATCC) que se utiliza para obtener la enzima Zymoliasa, se emplea el siguiente medio(%)¹²⁰:

Levadura prensada	2
Extracto de levadura Difco	0,2
NH_4NO_3	0,2
K_2HPO_4	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,01

Se lleva a pH 10 con NaOH 10 N y se esteriliza por autoclavado 120°C 20min.. La levadura prensada fue donada generosamente por la empresa C.A.L.S.A.

Ayuno de poliaminas

Para reducir el contenido endógeno de poliaminas en las mutantes auxótrofas para estos policones, se las cultiva repetidamente en un medio mínimo libre de estas bases orgánicas.

En el caso de *S. cerevisiae* 179-5, se partió de células cultivadas en medio YPAD líquido a 28°C, en fase exponencial media (A_{550} 1.0). Estas células se lavaron tres veces por centrifugación con H_2O bidestilada estéril, y se sembraron distintas diluciones en el medio de Wickerman modificado, sin agregado de poliaminas. Se cultivaron a 28°C a 250 rpm de agitación y se seleccionaron los cultivos que aumentan la velocidad de crecimiento por agregado de poliaminas (controlado en alícuotas del mismo). En esta forma se pueden obtener células que crecen con tiempos de generación creciente en ausencia de poliaminas, por agotamiento del pool endógeno.

Las curvas de crecimiento de las cepas X-2180 1-B y 179-5 con o sin suplementar con poliaminas, se realizaron midiendo la absorbancia a 550 nm de los cultivos.

Determinación del contenido en poliaminas

Las poliaminas se extrajeron a partir de un extracto perclórico de las células con solventes orgánicos en medio básico¹²¹, haciendo luego una dansilación de los grupos amino en medio alcalino, extrayendo sus derivados en fase toluénica¹²² y analizándolos por TLC como se describe a continuación.

Las células se recogieron por centrifugación en la mitad de la fase logarítmica (usando 100 ml de cultivo, A_{550} 0.3-0.7). Después de lavar con H_2O destilada, se sometieron a dos extracciones a 4°C con ácido perclórico 0,2 M (usando 0,3 ml en cada extracción). Se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm, y del sobrenadante resultante se extrajeron las aminos con 4 vol. de n-butanol en medio alcalino (NaOH 3N) 30min. a temperatura ambiente. El extracto butanólico resultante se evaporó a sequedad con N_2 y luego de resuspender en H_2O se dansiló según el método de Dion y Herbst, usando 100 μ l de solución saturada de CO_3Na_2 , 100 μ l de muestra y 200 μ l de cloruro de dansilo (20 mg/ml en acetona). Después de reaccionar durante toda la noche en la oscuridad a temperatura ambiente en tubos herméticamente tapados, se detuvo la reacción con 50 μ l de prolina 100 mg/ml para eliminar el cloruro de dansilo libre remanente. A continuación, se realizó una extracción con dos volúmenes de tolueno; en estas condiciones sólo pasan a la fase orgánica las aminos dansiladas, quedando en la fase acuosa distintos compuestos químicos, fundamentalmente aminoácidos, también dansilados. Se incluyeron soluciones standard de poliaminas y blancos tratados análogamente.

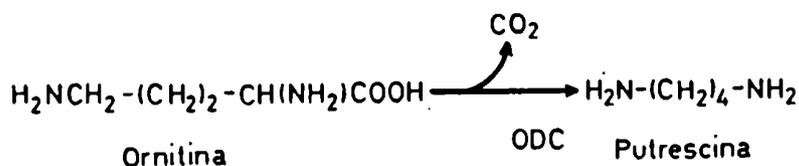
Las fases toluénicas correspondientes a distintas muestras se analizaron por cromatografía en capa delgada (TLC) monodimensional y bidimensional, usando placas recubiertas con Sílica gel (Merck Kieselgel 60), activadas previamente durante 1 h a 110°C. Se utilizaron como solventes de

corrida Cl_3CH :Trietilamina(10:1) y ciclohexano: acetato de etilo (1:1). Las manchas fluorescentes se visualizaron con luz UV de 340 nm¹²³.

El cloruro de dansilo (Sigma) fue purificado previamente por cromatografía en columna de Sílica gel (Merck Kiesclgel 60) de 0,5 x 2 cm, utilizando tolueno como solvente de corrida, cristalizándolo luego por evaporación al vacío¹²⁴.

Determinación de ornitina decarboxilasa

Su actividad se determinó midiendo la producción de CO_2 -¹⁴C a partir de ornitina marcada en el carboxilo 1. El CO_2 -¹⁴C liberado durante la reacción enzimática fue retenido sobre un papel de filtro impregnado con álcali.



La preparación del extracto enzimático y la determinación de su actividad fueron realizadas de acuerdo con Tabor y colaboradores¹¹¹, según se describe a continuación.

Las células se cosecharon en mitad de fase logarítmica (A_{550} 0.3 -0.6), se resuspendieron en buffer A (fosfato 10 mM pH 7,5; MgCl_2 1 mM; piridoxal fosfato 0,1 mM; EDTA 0,1 mM y ditiotreitól 5 mM) y se rompieron con Biox-Press en frío. El extracto obtenido se dializó directamente contra el mismo buffer a 4°C 24 hs., se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 min, y se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante. La mezcla de reacción para el análisis contiene: ornitina (15 mM 4 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$; New England Nuclear, 40 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$); buffer A (en concentración final como la descripta anteriormente) y extracto celular en cantidades variables para un volumen final de reacción de 0,3 ml. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C en un vial de vidrio(de los empleados en el centellador) herméticamente cerrado, conteniendo un tubo de plástico de 5 cm.x 1.2 cm. con papel Whatman 3 MM impregnado con hidróxido de hyamina. La reacción se detuvo agregando 0.2 ml. de HCl 4 N en el recipiente externo incubando durante 20 min adicionales a 37°C para permitir que todo el CO_2 -¹⁴C liberado fuese retenido por el papel. La radiactividad del mismo se determinó por centelleo líquido, empleando tolueno-omni-flúor. La actividad se expresa en $\mu\text{mol } 10^{-5}/\text{hs.}/\text{mg. prot.}$

Captación de poliaminas

La captación de ($\text{U-}^{14}\text{C}$) putrescina y ($\text{U-}^{14}\text{C}$) espermidina se determinó midiendo su incorporación en células enteras, según el método descrito por Tabor y colaboradores¹¹¹. Los cultivos se cosecharon en mitad de fase logarítmica y se lavaron una vez con H_2O destilada. La mezcla de

incubación contenía: (U-¹⁴C) putrescina (250 μM 0,1 μCi/μmol; New England Nuclear, 80 mCi/mmol), o (U-¹⁴C) espermidina (100 μM 0,1μCi/μmol; New England Nuclear, 15 Ci/mmol), células (A₅₅₀ 0.3-0.6) y medio de cultivo de Wickerman modificado para un volumen final de reacción de 5 ml. Esta mezcla se incubó 15 min. a 28°C (se comprobó que durante este tiempo la incorporación es lineal). Al cabo del mismo, las células se filtraron por Millipore 0.24 μm y se lavaron con 3 volúmenes de Cl₂Mg 50 mM. Se determinó la radiactividad retenida en el papel por centelleo líquido empleando tolueno-omnifluor.

Incorporación de precursores radiactivos en macromoléculas

La velocidad de acumulación de proteínas y ARN se determinó midiendo la incorporación de ³⁵S-metionina (10 μCi/μmol, 10 μM; New England Nuclear, 1125 Ci/mmol) y ¹⁴C-uracilo (20 μCi/μmol, 40 μM; New England Nuclear, 40 mCi/mmol) respectivamente, a material insoluble en TCA.

Debido a que la levadura *S.cerevisiae* no posee la enzima timidilato quinasa, no se puede utilizar timidina radioactiva para determinar la velocidad de acumulación de ADN. Por lo tanto se midió la misma a través de la incorporación de H³ adenina (320 μCi/umol 40 μM; New England Nuclear, 15 Ci/mmol) a material insoluble en TCA, luego de degradar por hidrólisis alcalina (NaOH 1 N; 37°C; 16 hs) el ARN marcado junto con el ADN ¹²⁵.

En todos los casos, las muestras se filtraron a través de filtros de papel de vidrio MSF GF/C, se lavaron con EtOH , y se determinó la radiactividad retenida por centelleo líquido, empleando tolueno-omnifluor.

Purificación de Zymoliasa

Esta enzima fue preparada en el laboratorio obteniéndola del medio de cultivo de *A.luteus* y purificandola según Kitamura y colaboradores^{120,126}, como se describe a continuación.

Se siembra un inóculo en el medio de cultivo anteriormente descrito y se cultivan las células a 28°C y 250 rpm de agitación. Kitamura y colaboradores mostraron que la producción de enzima es máxima en fase estacionaria; como el pH del medio de cultivo varía a lo largo de la curva de crecimiento, disminuyendo progresivamente en fase logarítmica y se eleva al entrar en fase estacionaria, se cosecharon las células al comenzar a subir el pH . Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 20 min. y del sobrenadante se obtuvo la enzima con SO₄(NH₄)₂ 300 g/l dejando precipitar la suspensión durante 24 hs. Se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 min; el precipitado obtenido se resuspendió en H₂O destilada y se dializó contra buffer fosfato 10 mM pH 6,5 durante 24 hs. Este extracto se utilizó como fuente de actividad enzimática, la cual se determinó midiendo la capacidad lítica de la preparación sobre *S. cerevisiae* X-2180 1B. La mezcla de reacción incluyó buffer fosfato 10 mM pH 7,5, suspensión de células con A₅₅₀ 5-8 y extracto enzimático

en volumen final de 1 ml. Después de incubar a 35°C por 30min., se trató con SDS 0.5 % para facilitar la lisis.

La actividad lítica se expresa como:

$$(1 - A_{550f}/A_{550i}) \times 100$$

A_{550f} : Absorbancia a 550 nm final.

A_{550i} : Absorbancia a 550 nm inicial.

Se define como 1 unidad enzimática la cantidad de extracto que produce el 50% de actividad lítica en 30 min a 35°C.

Preparación de esferoplastos y perfiles ribosomales

La preparación de esferoplastos se realizó utilizando una modificación del método de Hutchison y Hartwell, digiriendo la pared de levadura con Zymoliasa¹²⁷. Las levaduras lavadas con H₂O se resuspendieron en 10 volúmenes de sorbitol 1 M en buffer fosfato 10 mM pH 7,5, y se incubaron con 5-10 unidades de Zymoliasa a 35°C. La formación de protoplastos se controló midiendo la lisis de los mismos en una alícuota en presencia de SDS 0,5% como se describió más arriba. Los protoplastos así obtenidos se cosecharon por centrifugación a 8.000 rpm durante 5 min y se guardaron a -70°C; en estas condiciones son estables durante 15 días aproximadamente. Para su análisis se resuspendieron en buffer Tris HCL 10 mM pH 7,3, con concentraciones variables de Mg(AcO)₂ y KCl, según lo indicado en cada caso, se lisaron por agregado secuencial de deoxicolato de Na y Brij 58 (concentración final 0,2% y 0,25% respectivamente) durante 5 min en frío¹²⁸. Los extractos obtenidos luego de centrifugar durante 10 min en Eppendorf, se incubaron durante 30 min a 20°C y se analizaron por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa 15-30% a 42.000 rpm durante 105 min a 20°C; trabajando a esta temperatura no se produce dimerización de las subunidades ribosomales¹²⁹. Se revelaron los perfiles determinando la absorbancia a 254 nm con un analizador Isco.

La fijación de partículas ribosomales se llevó a cabo según lo descrito por García Patrone y Algranati¹³⁰. Al extracto obtenido después de la centrifugación en Eppendorf se le agregó glutaraldehído neutralizado con NaOH hasta pH 7,5, para una concentración final de 1%; se incubó durante 10 min a 4°C y se analizó según las condiciones descriptas.

El índice de asociación del perfil ribosomal se determinó por triangulación de las áreas de los distintos picos y se calculó el cociente 80S/(40S + 60S).

Perfiles de polisomas

Los perfiles polisomales se analizaron según la técnica de Warner¹³¹. Los cultivos en mitad de fase logarítmica se mezclaron con igual volumen de una solución de cicloheximida 50 µg/ml para

frenar inmediatamente la síntesis proteica y evitar el desprendimiento de los ribosomas del ARNm y a continuación se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. El precipitado así obtenido se lavó una vez con cicloheximida 50 $\mu\text{g/ml}$ y se resuspendió en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,3, KCl 100 mM, $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 10 mM, cicloheximida 50 $\mu\text{g/ml}$, heparina 200 $\mu\text{g/ml}$, y dietilpircarbonato 10 $\mu\text{l/ml}$ (los dos últimos son inhibidores de ARNasas). Se agregaron 170 mg/ml de perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diámetro, y se rompieron las células agitando durante 3 min por vórtex, alternando 20 seg de agitación con 20 seg en hielo. Todas las operaciones se efectuaron a 4°C.

Los extractos obtenidos se analizaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% a 45.000 rpm durante 2 hs a 4°C. Los gradientes se revelaron midiendo la A_{254} con un analizador Isco.

Microscopía de contraste de fase - Determinación del porcentaje de brotación y distribución de tamaños

Las células a observar se cosecharon por centrifugación, se fijaron con formaldehído 3%-NaCl 0,9% y se observaron por microscopía de contraste de fase a 1.000 aumentos con un microscopio Zeiss. El número de células y el porcentaje de brotación se determinaron contando un total de 200 células¹³².

La distribución de tamaños fue analizada en muestras de cultivos fijadas como se describió anteriormente, utilizando un contador Coulter channelyzer modelo ZB1 (Coulter Electronics), con un electrodo de 70 μm de apertura. El aparato fue calibrado con esferas de poliestireno de 35 μm^3 de diámetro.

Coloración de núcleos

Los núcleos se tiñeron con un colorante fluorescente específico para ADN, el diaminofenolindolacético (DAPI) según Williamson y Fennell¹³³. Las células se cosecharon en mitad de fase logarítmica y se fijaron durante 30 min en 70% de etanol, se lavaron una vez con H_2O y se resuspendieron durante 5 min a temperatura ambiente en una solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ de colorante, lavándose después varias veces. Las células coloreadas se examinaron con un microscopio de fluorescencia Leitz a 1.000 aumentos (excitación 350 nm, emisión 450 nm), luego de ser embebidas en agar 3% para evitar la movilidad de las mismas durante la observación microscópica.

Ataque enzimático de la pared

Se ensayó la digestión de la pared con diferentes enzimas. La zymoliasa fue obtenida en el laboratorio según la técnica ya descrita. Las células se resuspendieron en buffer fosfato 10 mM pH 7,5

y se incubaron con una cantidad de enzima según lo indicado en cada caso a 35°C durante distintos tiempos.

La glucosidasa fue obtenida de los laboratorios Endo. Las células se resuspendieron en H₂O con las cantidades de enzima indicadas en cada caso y se incubaron a 24°C durante distintos tiempos.

La novozima 234 fue donada por los Dres. H. Maccione y R. Davis. Las células se resuspendieron en buffer fosfato 10 mM pH 7,5, y se incubaron con las cantidades de enzima indicadas en cada caso a 30°C.

La actividad lítica se determinó siempre en presencia de SDS 0,5% según lo descrito en la preparación de Zymoliasa.

Microscopía electrónica

Las observaciones y la preparación de las muestras para microscopía electrónica fueron efectuadas por el Dr. A. Solari (Facultad de Medicina, U.B.A.).

Se fijaron las células por 24-26 hs en paraformaldehído 2% y glutaraldehído 1,5% en buffer cacodilato de sodio 50 mM pH 7,2 a 4°C. De esta manera se obtuvo una rápida penetración por el primero y una estabilización permanente por el segundo¹³⁴. Las células se centrifugaron a baja velocidad, se lavaron con H₂O destilada, se sonicaron suavemente para eliminar precipitados que se formaron durante la fijación, se lavaron con H₂O destilada, se deshidrataron y se embebieron en una resina Spurr de baja viscosidad (Laboratorios Taab), o en Maraglas (Polysciences). Las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y con citrato de plomo, y se examinaron con un microscopio electrónico Siemens Elmikop I. Se controlaron los aumentos con una grilla calibrada.

Análisis de la composición química de la pared celular

Para estudiar la composición química de la pared celular, los cultivos de *S.cerevisiae* X-2180 y *S.cerevisiae* 179-5, suplementados o no con poliaminas, fueron incubados con glucosa-¹⁴C uniformemente marcada (2,5-15 μCi/ml, American Radiolabeled Chemicals, 300 Ci/mol), por 2-4 generaciones.

Se agregaron células frías (A₅₅₀ 1.0, 100-400 ml) como portadores. Las células se resuspendieron en la proporción 1 gr de células: 4-5 gr de perlas de vidrio (0.45-0.50mm de diámetro): 0,5 ml H₂O, y se agitaron fuertemente en un vórtex durante 20 intervalos de 30 seg¹³⁵. Del sobrenadante se aislaron las paredes celulares por centrifugación durante 5 min a 3.000 rpm y se lavaron varias veces con H₂O destilada. Los glucanos y los mananos que componen la pared solubles en medio alcalino (ver Introducción), se extrajeron de las paredes aisladas con NaOH 6% durante 90 min a 80°C (dos tratamientos)¹³⁶. De un alícuota de este extracto alcalino se precipitó el manano con 1 volumen de reactivo de Fehling, que reacciona específicamente con este polisacárido¹⁷³. Se precipitó el glucano soluble junto con el manano con 3 volúmenes de etanol en otra alícuota del extracto

alcalino; la diferencia en radiactividad entre el precipitado con etanol y el de Fehling equivale al glucano soluble. Para determinar el contenido en glucano β 1-6 y quitina, los cuales son insolubles en álcali, el residuo de la extracción con NaOH se lavó varias veces para eliminar el NaOH remanente y luego se hidrolizó completamente con HCl 12 N en tubo cerrado durante 75 min a 95°C¹⁷⁹. Después de evaporar el ácido con corriente de aire, se efectuó una electroforesis en papel Whatman 1 en ácido fórmico 10% a 1.500 volts durante 30 min¹³⁷. Se corrieron simultáneamente testigos de glucosa y glucosamina, que se revelaron separadamente por tinción con reactivo de nitrato de plata¹³⁸. Se cortaron las zonas correspondientes a glucosa y glucosamina en la corrida del hidrolizado y se determinó su radiactividad por centelleo líquido empleando Bray como centellador. La radiactividad en las zonas de glucosa y glucosamina equivale, respectivamente, a la cantidad de glucano insoluble y quitina de la muestra original.

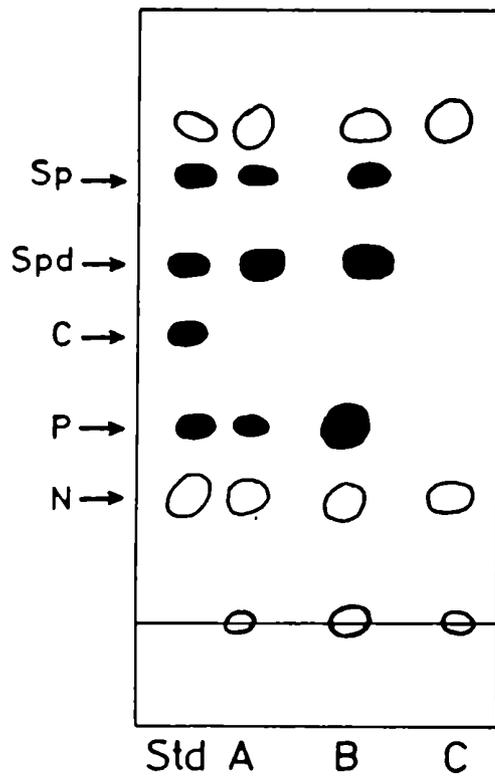


Figura 9. Análisis del contenido endógeno de poliaminas en levaduras.

Carril A *S.cerevisiae* X-2180, carril B *S.cerevisiae* 179-5 + poliam., carril C *S.cerevisiae* 179-5 - poliam.. Las muestras se procesaron según se describe en Materiales y Métodos, analizandolas por cromatografía en capa delgada. Solvente de corrida: cloroformo : trietilamina (10:1). N: amoníaco, P: putrescina, C: cadaverina, Spd: espermidina, Sp: espermina.

RESULTADOS

CARACTERISTICAS GENERALES DEL ORGANISMO

Se controlaron algunas características generales de las cepas *S.cerevisiae* X-2180 y *S.cerevisiae* 179-5 tales como la curva de crecimiento, el contenido endógeno de poliaminas, captación de estas poliaminas del medio de cultivo, la actividad de la principal enzima biosintética (ornitina decarboxilasa), y la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas).

Contenido endógeno de poliaminas.

Las poliaminas presentes en *S.cerevisiae* son putrescina, espermidina y espermina. Sus concentraciones intracelulares fueron determinadas por Tabor et al. y sus valores son en nmoles/gr. peso húmedo: 0.45 para putrescina, 2.0 para espermidina, 0.4 para espermina¹¹⁰.

Para verificar la disminución del contenido endógeno de poliaminas en levaduras ayunadas se analizaron por cromatografía en capa delgada los derivados dansilados obtenidos de cultivos de *S.cerevisiae* con distintas velocidades de crecimiento. Se encontró que a todas las velocidades de crecimiento, desde $T_{1/2}$ 7 hs hasta cultivos detenidos en condiciones de ayuno para poliaminas no se detectan ninguna de estas bases orgánicas (Figura 9). Los niveles de putrescina, espermidina y espermina son normales en la cepa parental *S.cerevisiae* X-2180. En la cepa *S.cerevisiae* 179-5 suplementada con putrescina, se observa que los niveles endógenos de espermidina y espermina son similares a los encontrados en la cepa parental, en cambio, los niveles de putrescina son mayores debido a que se acumula esta poliamina que capta del medio de cultivo (Figura 9).

Tanto en la cepa parental, como en la mutante auxótrofa para poliaminas cultivada en presencia o ausencia de estas no se observaron otras poliaminas ni derivados de las mismas.

Actividad de ornitina decarboxilasa.

La disminución de la concentración intracelular de poliaminas en la cepa *S.cerevisiae* 179-5 se debe a una deficiencia en la enzima ornitina decarboxilasa³³. Para verificarlo se determinó esta actividad enzimática en la mutante y en la cepa parental *S.cerevisiae* X-2180, según se describe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la Tabla 2, se confirmó que *S.cerevisiae* 179-5 no posee actividad apreciable de ornitina decarboxilasa.

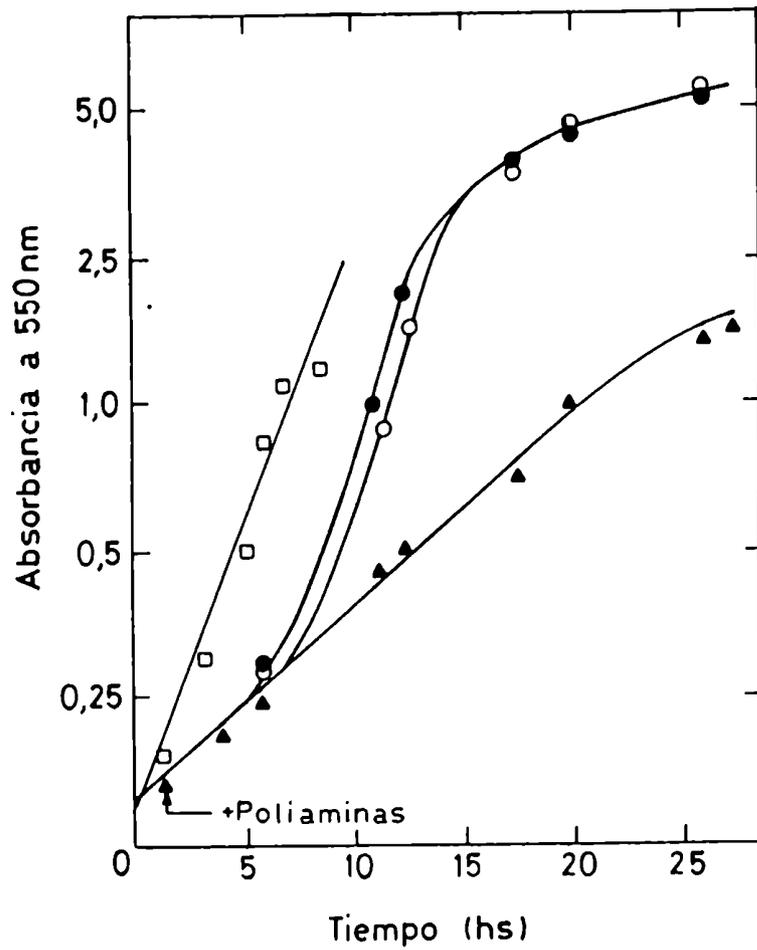


Figura 10. Normalización de la velocidad de crecimiento de un cultivo ayunado por agregado de putrescina o espermidina.

S. cerevisiae X-2180 □ --- □ --- □ ▲ --- ▲ --- ▲ *S. cerevisiae* 179-5 sin poliaminas
S. cerevisiae 179-5 suplementada con putrescina 10 μg/ml ○ --- ○ ● --- ●

	<i>S.cerevisiae</i>	
	X-2180	179-5
Act.enzimática		
$\mu\text{mol CO}_2 \cdot 10^{-5} / \text{hs. mg prot}$	280(185)	0.54(1)

Tabla 2. Actividad enzimática de ornitina decarboxilasa.

Los valores entre paréntesis corresponden a Hosaka y colaboradores³³

Curvas de crecimiento

En la Figura 10 se muestra la curva de crecimiento a 28 °C de *S.cerevisiae* 179-5 ayunada en poliaminas, comparada con la cepa parental X-2180. En presencia de poliaminas (putrescina 10 $\mu\text{g/ml}$ o espermidina 10 $\mu\text{g/ml}$), *S.cerevisiae* 179-5 y X-2180 tienen la misma velocidad de crecimiento ($T_{1/2}$ 2-3 hs). En ausencia de estas poliaminas el tiempo de generación de *S.cerevisiae* 179-5 aumenta y varía entre aproximadamente 7 hs hasta la detención total del crecimiento, dependiendo probablemente del grado de ayuno en poliaminas. Las células ayunadas pueden recuperar velocidades de crecimiento similares a la cepa parental tras 6-10 hs de incubación por el reagregado de estas poliaminas siendo las concentraciones mínimas necesarias 0.1 $\mu\text{g/ml}$ para putrescina y espermidina y de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de espermina .

Captación de poliaminas

La captación de diversos metabolitos celulares se encuentra alterada en la cepa *S.cerevisiae* 179-5 cultivada en ausencia de poliaminas³³. Para establecer si también hay variaciones en la captación de poliaminas, se la determinó midiendo incorporación de putrescina ^{14}C y espermidina ^{14}C a células enteras según lo descrito en Materiales y Métodos.

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos trabajando con las cepas descritas. Se estudió la captación en 15 minutos debido a que durante este tiempo la incorporación es lineal y se obtiene un buen rendimiento de cuentas incorporadas.

Se puede observar que en ausencia de poliaminas disminuye la captación de putrescina, la que vuelve a valores normales por agregado de estas bases orgánicas al cultivo. En el caso de espermidina, hay una disminución de la captación de la misma en cultivos ayunados de poliaminas y esto no cambia mayormente añadiendo putrescina o espermidina al medio de cultivo. En la cepa parental se observa menor captación de espermidina si se agrega putrescina o espermidina al medio de cultivo. Esto sugiere que el agregado de estas poliaminas al medio de cultivo aumenta sus niveles endógenos y en el caso de espermidina se inhibiría su posterior captación .

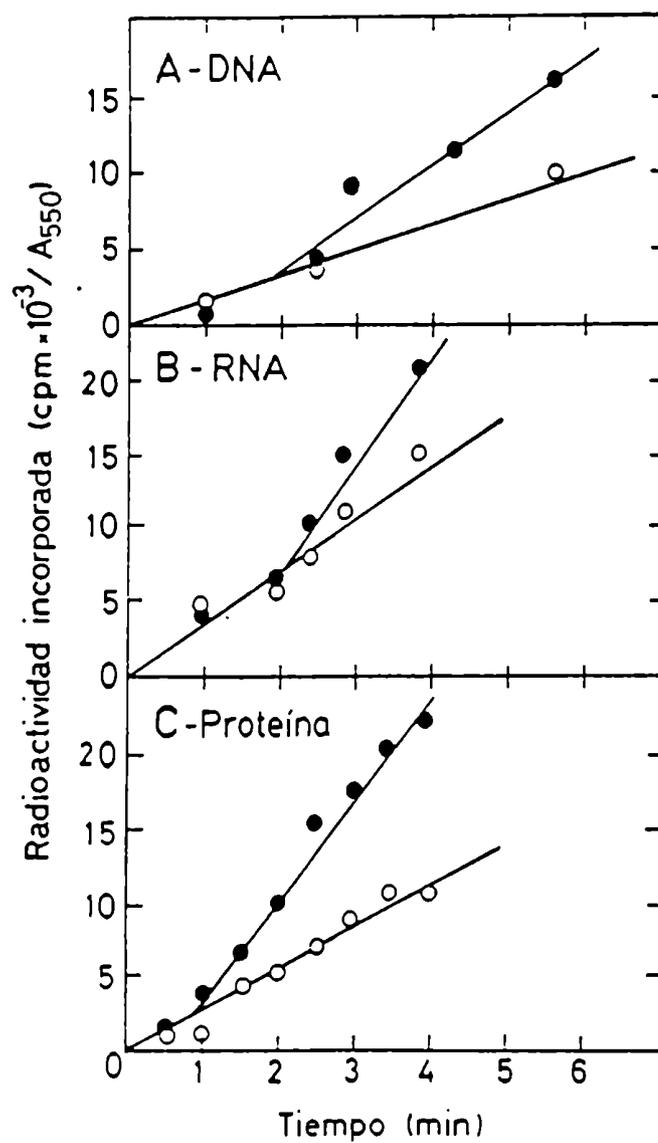


Figura 11. Síntesis de ADN, ARN y proteínas en *S.cerevisiae* 179-5 ayunada en poliaminas y normalización de sus niveles de síntesis por agregado de poliaminas.

A un cultivo de *S.cerevisiae* 179-5 ayunada en poliaminas (○ - - - - ○) se agregó putrescina 100 μg/ml a tiempo 0 a la mitad del cultivo (● - - - - ●). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para medir ADN, ARN y proteínas como se describe en Materiales y Métodos.

Si bien la captación en los primeros 15 minutos se reduce en células ayunadas, los niveles endógenos después de 60 minutos son similares a los de células suplementadas, determinados por análisis de sus derivados dansilados.

<i>S.cerevisiae</i>	Captación de poliaminas.	
	cpm incorp./15 min./A ₅₅₀ ml	
	Putrescina	Espermidina
X-2180	2190	4185
X-2180 + put o spd.	2280	720
179-5	510	1455
179-5 + put o spd.	2850	1215

Tabla 3. Captación de poliaminas del medio de cultivo.

Los resultados están expresados en cpm incorp./min./A₅₅₀ ml. La concentración de putrescina o espermidina agregada fue 100 µg/ml. Los resultados presentados son un promedio de 4 determinaciones realizadas por duplicado.

Efecto de poliaminas sobre la síntesis de macromoléculas

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de macromoléculas, ADN, ARN y proteínas, se encuentra disminuída en varios tipos de organismos cuando baja el contenido endógeno de poliaminas^{26,27,47}. Se trató de determinar si la falta de poliaminas en levadura afecta la síntesis de éstas macromoléculas en forma similar.

En la Figura 11 se muestran los datos obtenidos trabajando con la mutante *S.cerevisiae* 179-5. En ausencia de poliaminas se encuentran disminuídas tanto la síntesis de proteínas como la síntesis de ARN y ADN.

Después del agregado de putrescina (100 µg/ml) al medio de cultivo, se recupera primero la síntesis de proteínas, y luego la síntesis de ADN y ARN al mismo tiempo.

Este comportamiento es similar al observado en mutantes bacterianas auxotrofas para poliaminas donde después del reagregado de éstas, se observa que la síntesis de proteínas se recupera antes que la de ARN y ADN⁴⁷⁻¹³⁹.

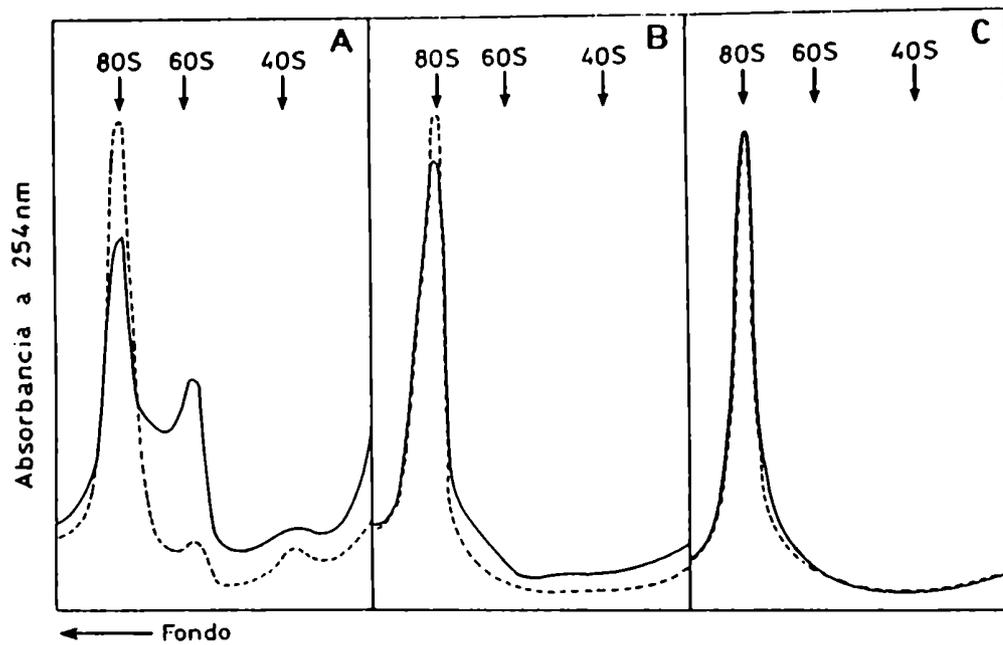


Figura 12. Análisis de los perfiles ribosomales de *S.cerevisiae* 179-5 y de su cepa parental X-2180.

Los lisados de esterooplastos obtenidos según se describe en Materiales y Métodos provenientes de *S.cerevisiae* 179-5 sin (A), con poliaminas (B) y de la cepa parental (C) fueron analizados por centrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% a 45.000 r.p.m. 2hs a 15°C en presencia de 10 mM Mg(AcO)₂ y 100 mM KCl con (- - - - -) o sin (———) pretratamiento con glutaraldehído 0.1%.

POLIAMINAS Y SINTESIS DE PROTEINAS

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la participación de las poliaminas en distintos procesos involucrados en la síntesis proteica, tales como en el ensamblado y en la biogénesis de los ribosomas⁵³, en la formación del complejo de iniciación⁵⁶ y en la fidelidad de la traducción^{65,67}. La mayoría de estos estudios se realizaron en organismos procarióticos, y poco se conoce acerca del papel fisiológico de éstas bases orgánicas en la síntesis proteica eucariótica.

La síntesis de proteínas se realiza en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El ribosoma tanto en procariotes como en eucariotes está compuesto por dos subunidades que se encuentran en equilibrio con su monómero; este equilibrio es sumamente importante para la síntesis proteica ya que cuando se inicia la traducción el monómero se disocia por factores de iniciación y las subunidades resultantes se unen secuencialmente al ARN_m para dar lugar a la formación del complejo de iniciación¹⁴⁰. Durante la síntesis proteica se unen varios ribosomas a un solo mensajero formando polisomas. Los defectos en la biogénesis y/o ensamblado de los ribosomas pueden provocar alteraciones en éste equilibrio que se pueden visualizar analizando el perfil ribosomal. Por lo tanto, para saber si las poliaminas tiene alguna función en la biogénesis y/o ensamblado de los ribosomas eucarióticos, similar a la observada en procariotes, se examinaron los perfiles ribosomales de mutantes de levaduras auxótrofas para estos poliaminas.

El equilibrio de subunidades con su monómero es afectado por varias condiciones como el pH, concentración y tipo de iones, etc¹⁰⁶. Los cationes divalentes como el Mg²⁺, probablemente debido a un efecto estabilizante sobre la conformación del ARN_r, provocan la asociación de las subunidades^{141,142}. Éste mismo efecto es producido también por las poliaminas putrescina, espermidina y espermina¹⁴¹⁻¹⁴³. En cambio los cationes monovalentes como el K⁺ tienen un efecto disociante porque desestabilizarían la conformación de dicho ARN¹⁴¹⁻¹⁴³. En general, el factor que modifica el equilibrio de subunidades es la relación cationes monovalentes/cationes divalentes¹⁴⁴. Por esta razón se analizaron los perfiles ribosomales en presencia de distintas concentraciones de cationes mono y divalentes, distintas relaciones entre ambos cationes y también se analizó el efecto del agregado *in vitro* de poliaminas sobre el perfil ribosomal.

Se estudiaron los perfiles polisomales de mutantes auxótrofas para poliaminas para establecer qué alteraciones se producen en la síntesis de proteínas *in vivo* por ayuno de las mismas.

Análisis de los perfiles ribosomales

El equilibrio de subunidades se analizó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Se prepararon esferoplastos por digestión de la pared celular en presencia de un estabilizante osmótico como el sorbitol, observándose que las levaduras ayunadas en poliaminas resultaron mucho

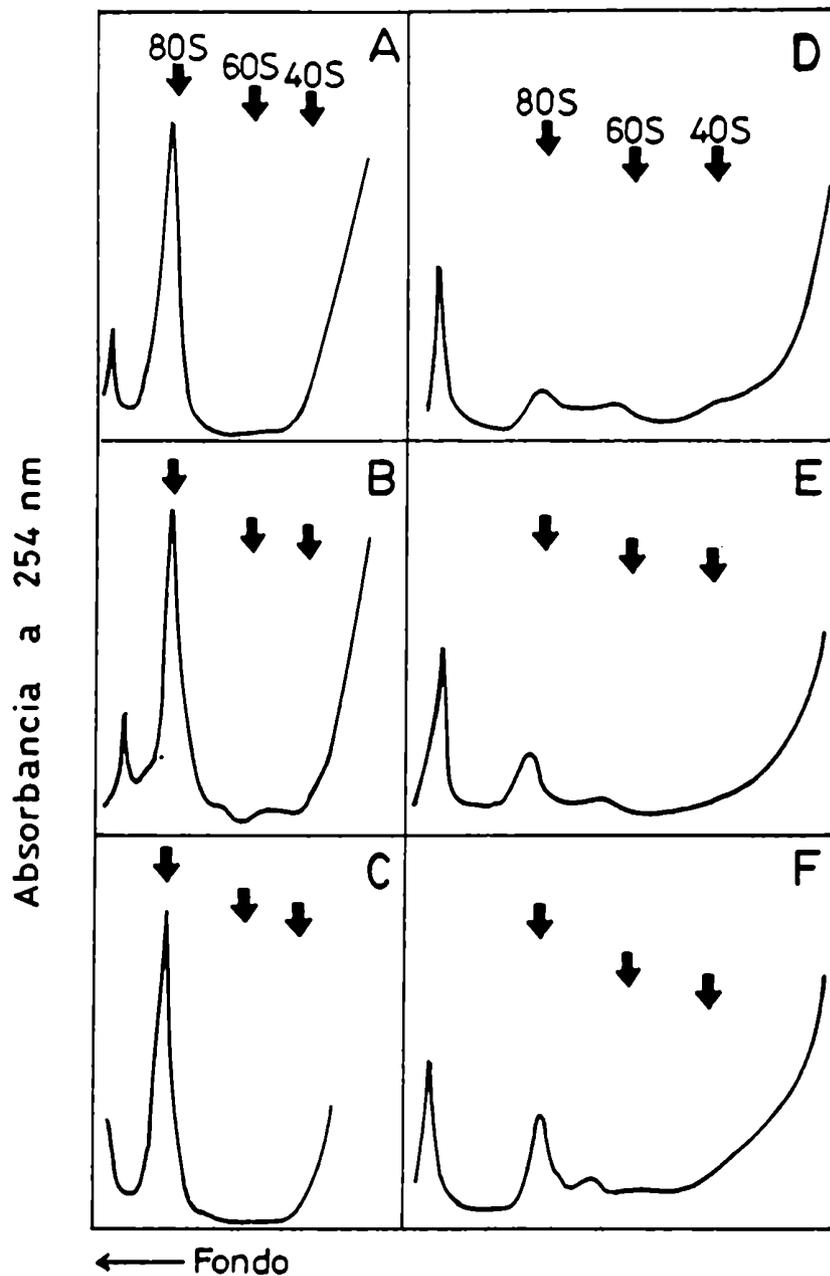


Figura 13 Efecto de la velocidad de crecimiento sobre los perfiles ribosomales de *S.cerevisiae* X-2180 y del agregado de inhibidores de proteasas y ARNasas sobre el perfil ribosomal de *S.cerevisiae* 179-5 ayunada en poliaminas

Los lisados de esferoplastos obtenidos según se describe en Materiales y Métodos provenientes de *S.cerevisiae* X-2180 cultivados con distintas fuentes de nitrógeno: 0.1% de $SO_4(NH_4)_2$ (Panel A); 0.1% de treonina (Panel B), 0.1% de triptofano (Panel C); fueron analizados por centrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% a 45.000 r.p.m. $15^\circ C$ 2hs en presencia de 10 mM $Mg(Ac)_2$ y 100 mM KCl. Los lisados de esferoplastos obtenidos como se describe en Materiales y Métodos provenientes de *S.cerevisiae* 179-5 sin poliaminas (Panel D) fueron tratados con Heparina 0.5 mg/ml y PMSF mM (Panel E), o incubados a $4^\circ C$ (Panel F) antes de la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% a 45.000 r.p.m. 2hs a $15^\circ C$ en presencia de 10 mM $Mg(Ac)_2$ y 100 mM KCl.

más resistentes a la acción de las enzimas líticas utilizadas que las levaduras suplementadas o las parentales (ver Pared celular). Los esferoplastos obtenidos, luego de ser lisados con detergentes en presencia de 10 mM $Mg(Ac)_2$ y 100 mM KCl, para mantener la integridad del monosoma, fueron analizados como se describe en Materiales y Métodos.

Tanto en la cepa parental como en la cepa mutante cultivada en presencia de 100 μg putrescina, más del 90% de las partículas ribosomales sedimentan en la zona de 80S (Figura 12). En ausencia de poliaminas hay una disminución del material correspondiente a 80S, un importante aumento en la zona 60S y en la fracción sobrenadante, así como una pequeña cantidad de material que sedimenta a 40S.

Se ha demostrado que la presión hidrostática que se genera durante la ultracentrifugación, tiene un efecto disociante sobre las partículas ribosomales^{145,174}. El desbalance entre la cantidad de material que sedimenta a 40S y 60S observado en la figura podría originarse por la alta presión hidrostática que disociaría y/o desarmaría los ribosomas durante la corrida. Para evitar éste efecto se trataron los ribosomas con glutaraldehído inmediatamente después de lisar los esferoplastos. Este reactivo reacciona con los grupos amino de las proteínas ribosomales, fijando la estructura del ribosoma e impidiendo el efecto de la presión hidrostática. En estas condiciones se observa en la cepa ayunada una mejora en el grado de asociación entre subunidades, pero sin lograr el perfil normal observado en la cepa parental o en la cepa mutante suplementada con poliaminas. Si la ultracentrifugación se realiza a menor velocidad por más tiempo, para disminuir la presión hidrostática generada durante la corrida, no se mejora el perfil ribosomal de las células ayunadas. Estos resultados demuestran una mayor sensibilidad al efecto disociante de la presión hidrostática en los ribosomas obtenidos en ausencia de poliaminas.

Para determinar si la disociación observada en ausencia de poliaminas es consecuencia de las muy bajas velocidades de crecimiento de las células, se trató de disminuir esta velocidad en la cepa parental para ver si afectaba el perfil ribosomal. Para ello se agregó en lugar de 0.1% $SO_4(NH_4)_2$ como habitualmente, 0.1% de treonina o 0.1% de triptofano como fuente de nitrógeno, que se sabe que disminuyen la velocidad de crecimiento¹⁸⁰. En éstas condiciones el tiempo de generación aumenta a 9 hs pero no se observan cambios en los perfiles ribosomales (Figura 13 A-C). Estos resultados sugieren que las alteraciones ribosomales que se observan en ausencia de poliaminas no se deben a una disminución en la velocidad de crecimiento. Tampoco puede ser explicado por un aumento en la actividad de proteasas o ARNasas. El agregado de inhibidores de proteasas como el PMSF, inhibidores de ARNasas como la heparina, y la incubación antes de la ultracentrifugación a 4°C en lugar de 20°C, para disminuir probables actividades enzimáticas, no modifican el perfil ribosomal alterado (Figura 13 D-F). Esto podría descartar la intervención de proteasas, o ARNasas como causa de anomalía.

Las poliaminas, fundamentalmente espermidina y espermina, asocian las partículas ribosomales en sistemas libres de células¹⁴². Por lo tanto se decidió comprobar si el reagregado *in vitro* de estas bases orgánicas revertía los efectos observados en el perfil ribosomal observándose que el añadido de putrescina o espermidina 10mM no tiene efecto sobre los perfiles ribosomales

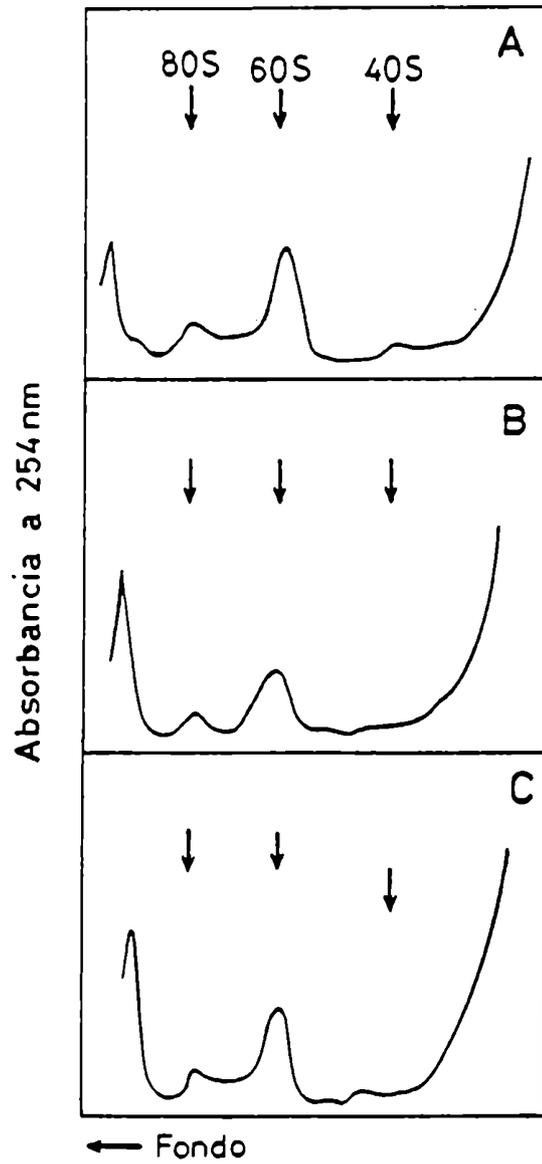


Figura nº 14 Efecto del agregado de poliaminas *in vitro* sobre el perfil ribosomal.

Los lisados de esferoplastos provenientes de *S.cerevisiae* 179-5 sin poliaminas fueron obtenidos según Materiales y Métodos, sin agregados (Panel A), o añadiendo al lisado putrescina 10mM (Panel B), o espermidina 10 mM (Panel C) y luego analizados por centrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% a 45.000 r.p.m. 2hs en presencia de 10 mM $Mg(Ac)_2$ y 100 mM KCl.

(Figura 14). La concentración utilizada está por encima de la necesaria (1 mM) para provocar la asociación completa de los ribosomas en otros organismos como germen de trigo¹⁴².

Efecto de las condiciones de ayuno sobre el perfil ribosomal

Variando las concentraciones del inóculo es posible obtener cultivos con distintas velocidades de crecimiento (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Tabla 4 existe una correlación inversa entre el tiempo de generación y el índice de asociación determinada por la relación Area 80S/Area (60S+40S): a medida que aumenta el primero disminuye el último

Cepa	Velocidad de crecimiento (duplicaciones/hs.)	Indice de Asociación (80S/40S+60S)
X-2180	0.33	6.0
179-5 + put.	0.33	5.3
179-5 - put.	0.24	4.3
	0.15	1.5 (5.2)
	0.13	0.8 (2.8)
	0.10	0.38
	C.D.	0.16 (1.4)

Tabla 4. Grado de asociación de las partículas ribosomales a diferentes velocidades de crecimiento.

Cultivos de *S.cerevisiae* 179-5 en ausencia de poliaminas, con diferentes velocidades de crecimiento, suplementados con putrescina 100 µg/ml. o X-2180 fueron obtenidos según Materiales y Métodos. El análisis del perfil ribosomal se llevó a cabo por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% 45.000 r.p.m. 2 hs. en presencia de 10 mM Mg(Ac)₂, 100 mM KCl. Los valores entre paréntesis corresponden a ribosomas pretratados con glutaraldehído 0.1%. C.D.: crecimiento detenido.

Efecto de cationes monovalentes y divalentes sobre el perfil ribosomal

La Figura 15 muestra los perfiles ribosomales obtenidos con distintas concentraciones de Mg²⁺ en lisados de esterooplastos de la cepa parental y de *S.cerevisiae* 179-5 con o sin poliaminas. En los paneles D, E, F se observan los perfiles ribosomales de la mutante suplementada con poliaminas obtenidos a concentraciones de 5, 15 y 30 mM Mg²⁺ respectivamente, con o sin tratamiento previo con glutaraldehído. A concentraciones bajas de Mg²⁺ (5 mM), se observa un cierto grado de disociación que desaparece completamente cuando la concentración se eleva a 15 mM. Se obtuvieron resultados análogos con *S.cerevisiae* X-2180. El tratamiento previo con glutaraldehído disminuye la disociación a bajas concentraciones de Mg²⁺, pero no tiene efecto apreciable con concentraciones mayores o iguales a 15 mM. En los paneles A, B, C se muestran los perfiles ribosomales obtenidos en las mismas condiciones con *S.cerevisiae* 179-5 ayunada de poliaminas. Se observa que el grado de disociación de

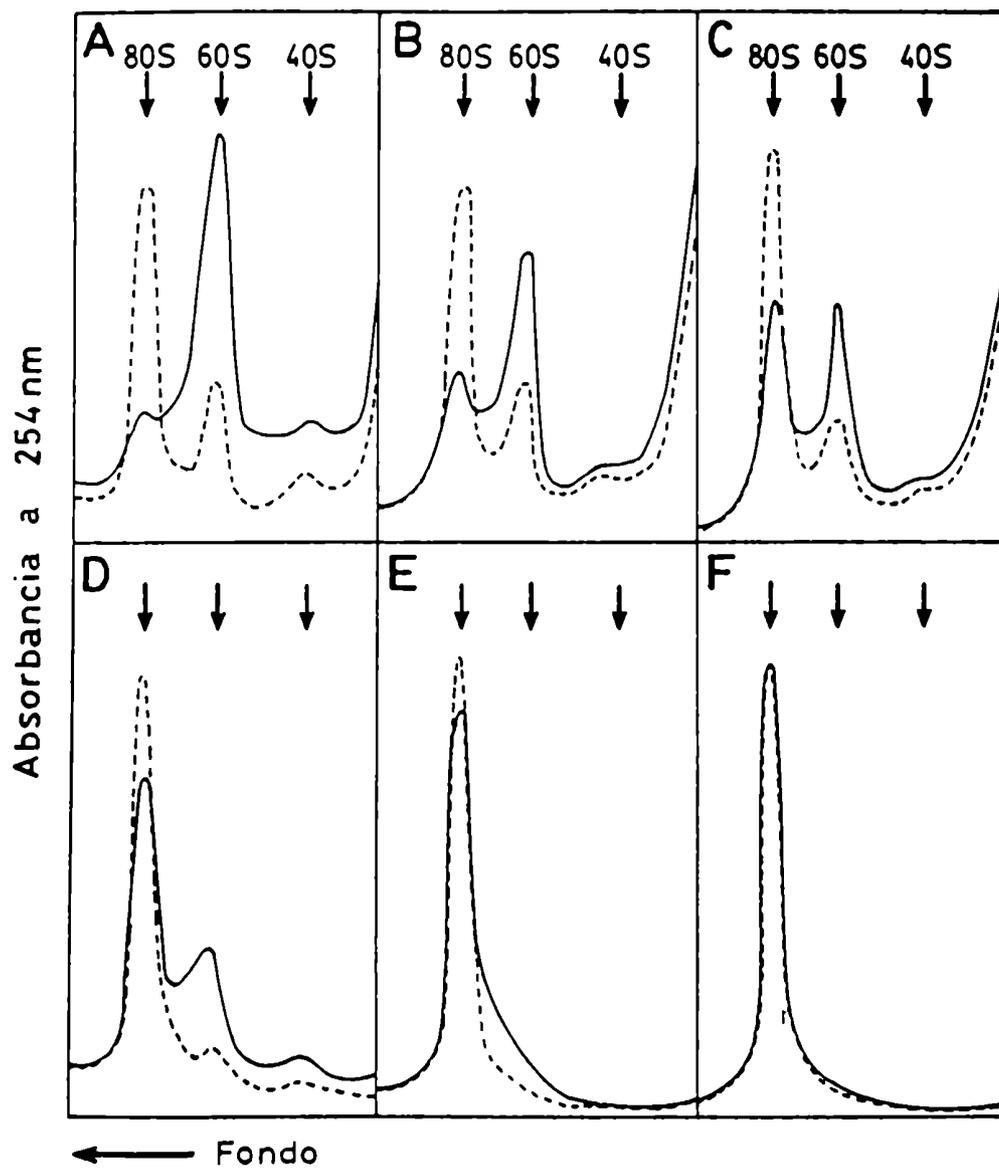


Figura 15. Efecto de distintas concentraciones de Mg^{2+} sobre el perfil ribosomal de *S. cerevisiae* 179-5 cultivada con o sin poliaminas.

Los lisados de esferoplastos de *S. cerevisiae* 179-5 sin poliaminas (Paneles A, B, C) y con poliaminas (Paneles D, E, F) se analizaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% 45.000 r.p.m. 2 hs a 15°C en presencia de 100 mM KCl y $(AcO_2)_2Mg$ 5 mM (Paneles A y D), 15 mM (Paneles B y E) y 30 mM (Paneles C y F) de $Mg(Ac)_2$ con (- - - - -) o sin (———) tratamiento con glutaraldehído 0.1%.

los ribosomas es mucho mayor que en las cepas descritas anteriormente en todas las condiciones analizadas. A concentraciones bajas de Mg^{2+} (5 mM), hay escaso material que sedimenta como 80S, un marcado pico en la zona de 60s y un aumento del sobrenadante. El incremento de la concentración de Mg^{2+} a 15 o 30 mM aumenta ligeramente la asociación de las subunidades, pero no logra provocar una asociación completa de las mismas. La fijación previa con glutaraldehído disminuye el grado de disociación, sin provocar una completa normalización como la observada en los perfiles de la cepa parental o la cepa *S.cerevisiae* 179-5 suplementada con poliaminas. Esto demuestra que los ribosomas provenientes de *S.cerevisiae* 179-5 cultivada en ausencia de poliaminas tienen una menor respuesta a las variaciones en la concentración de Mg^{2+} .

Esta falta de sensibilidad al incremento de la concentración de catión divalente se puede correlacionar con la velocidad de crecimiento de los cultivos. La Figura 16 muestra una relación inversa entre el tiempo de generación del cultivo y el efecto asociante de Mg^{2+} . La fijación previa con glutaraldehído aumenta parcialmente este efecto, especialmente a bajas concentraciones de Mg^{2+} . Los cultivos suplementados con poliaminas o la cepa parental son más sensibles al efecto asociante de éste catión, con o sin fijación previa con glutaraldehído.

Los cationes monovalentes como el K^+ , en cambio tienen efecto disociante sobre los monómeros¹⁴¹⁻¹⁴³. El factor que determina el grado de asociación de los perfiles ribosomales es la relación de cationes monovalentes/cationes divalentes¹⁴⁴. La Tabla 5 muestra el efecto de distintas relaciones K^+/Mg^{2+} sobre la asociación ribosomal en lisados provenientes de células ayunadas o suplementadas con putrescina.

Putrescina en el cultivo	(K^+) mM	(Mg^{2+}) mM	(K^+)/(Mg^{2+}) relación	Índice de asociación (80S/40S+60S)
	10	10	1	9.0(12)
	35	35	1	2.4(9.9)
	100	10	10	0.18(2)
+	10	10	1	13.4(13.9)
	100	10	10	12.6(14.6)

Tabla 5. Efecto de distintas concentraciones de cationes monovalentes y divalentes sobre el índice de asociación ribosomal.

Las condiciones de cultivo y análisis fueron descritas en la Tabla 4. Las células cultivadas sin poliaminas tenían detenido su crecimiento y las suplementadas crecían a una velocidad de 0.33 duplicaciones/hora.

Puede verse que los cultivos suplementados con poliaminas están completamente asociados a las dos relaciones K^+/Mg^{2+} estudiadas. Por el contrario en levaduras ayunadas en poliaminas el grado de asociación de sus subunidades depende sólo de la concentración de K^+ y no de la relación ($K^+)/(Mg^{2+})$ aún con fijación previa con glutaraldehído.

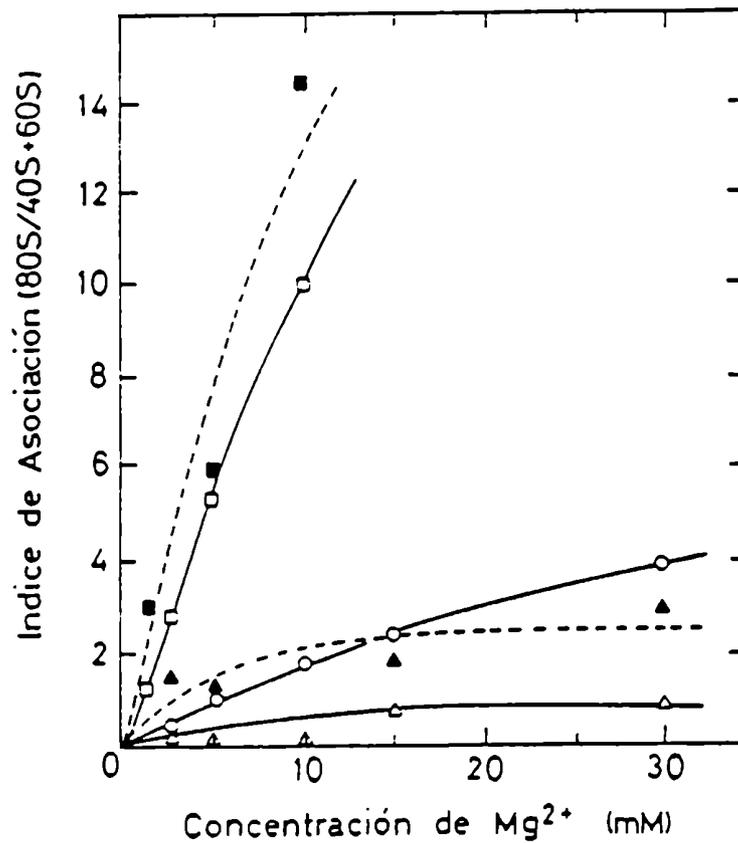


Figura 16. Efecto de distintas concentraciones de Mg^{2+} sobre el grado de asociación de subunidades ribosomales provenientes de células con distinto contenido de poliaminas. La velocidad de crecimiento en cultivos sin poliaminas fue 0.07 (Δ) o 0.14 (\circ) duplicaciones/hora y para cultivos con estas bases orgánicas 0.33 duplicaciones/hora (\square). Los perfiles se obtuvieron sin (—) o con fijación previa (- - -) con glutaraldehído 0.1%. Las determinaciones se hicieron por duplicado según Materiales y Métodos.

de asociación de sus subunidades depende sólo de la concentración de K^+ y no de la relación $(K^+)/(Mg^{2+})$ aún con fijación previa con glutaraldehído.

Perfil de polisomas

Los resultados expuestos hasta el momento demuestran que en ausencia de poliaminas se observa un monómero ribosomal alterado. Para saber si éste ribosoma mal ensamblado puede afectar la síntesis de proteínas *in vivo*, se analizaron los polisomas.

En la Figura 17 se observan los perfiles de la cepa *S.cerevisiae* 179-5, con o sin poliaminas, centrifugados en gradientes de sacarosa en condiciones que permiten distinguir polisomas. La cepa mutante suplementada con poliaminas tiene el mismo perfil que la cepa parental, y en el caso de la Figura 17 pueden verse hasta cuatro ribosomas por ARN_m , ya que los polisomas de mayor tamaño sedimentaron completamente durante la corrida. En condiciones de ayuno para poliaminas se observan varias alteraciones en éste perfil. La cantidad total de polisomas es un poco menor y aumenta proporcionalmente el monómero 80S, lo que corresponde con una menor cantidad de ribosomas involucrados en la síntesis proteica. Otra anomalía evidente es la presencia de "halfmers", que son acúmulos de la partícula ribosomal 40S sobre el ARN_m . Durante la iniciación de la traducción, la partícula 40S junto con determinados factores de iniciación se une al extremo 5' del ARN_m y migra hasta el codón de iniciación, donde se une la partícula 60s para formar el complejo de iniciación¹⁷⁸. Diversos factores pueden alterar la formación de este complejo, provocando la unión simultánea de varias subunidades 40S al ARN_m con lo que se generan los "halfmers"^{146,147}. Además de esta estructura se observa un considerable aumento de la fracción que migra a 40S y una marcada disminución del material que sedimenta a 60s.

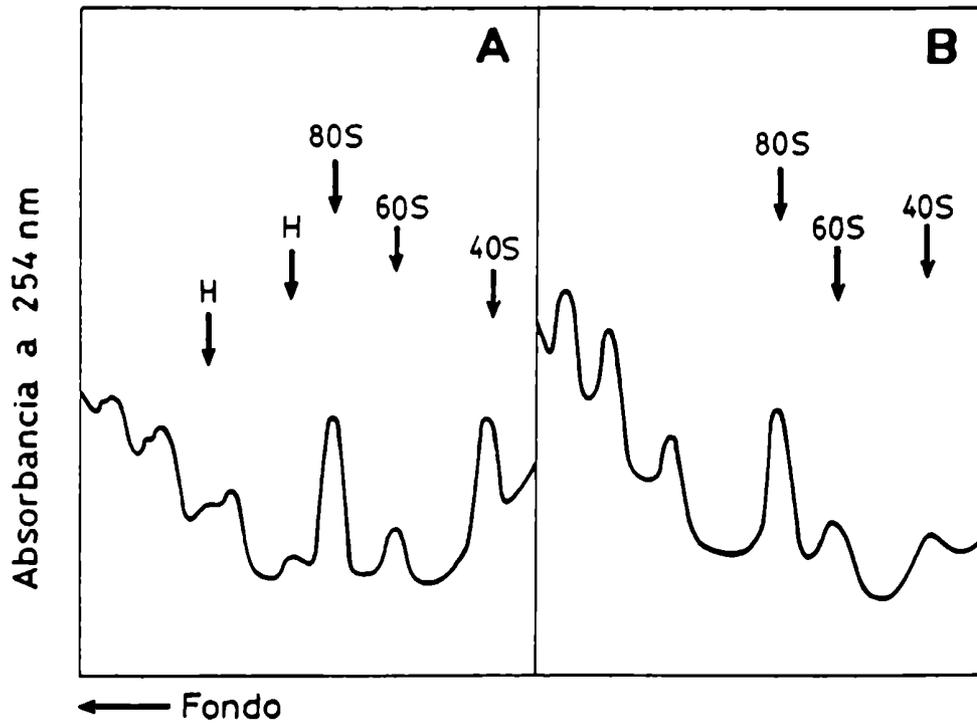


Figura 17. Perfil de polisomas de *S.cerevisiae* 179-5 cultivados en presencia o ausencia de poliaminas.

Los lisados de esterooplastos, obtenidos según se describe en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de poliaminas, se analizaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 15-45% 45.000 r.p.m. 2hs a 4°C. H: halfmers.

POLIAMINAS Y CICLO CELULAR

Las poliaminas podrían tener un papel importante en el ciclo celular ya que la actividad de ornitina decarboxilasa (responsable de la biosíntesis de putrescina) sufre en mamíferos variaciones a lo largo de dicho ciclo, con un pico máximo al final de la fase G_1 ²⁷. El aumento en la concentración endógena de poliaminas prepararía a la célula para entrar en fase S ²⁷. Por otra parte, estos poliaminas estarían involucrados en la división celular, ya que algunas células de mamíferos superiores tratadas con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, no pueden llevar a cabo la división celular observándose un gran porcentaje de células binucleadas⁶⁸. Sin embargo, si bien sólo se conoce la posible participación de las poliaminas en el ciclo celular, no se han determinado sus funciones exactamente.

La levadura *S.cerevisiae* es un excelente modelo para el estudio del ciclo celular, porque en este organismo dicho ciclo, además de haber sido extensamente estudiado, se correlaciona con cambios morfológicos fácilmente observables por microscopía óptica⁷⁰. Como se ha mencionado anteriormente, se han identificado 50 genes necesarios para que se complete normalmente el ciclo celular, los fenotipos terminales producidos por mutaciones termosensibles en cualquiera de estos genes son bien conocidos y sus características morfológicas han sido ampliamente descritas⁷¹.

Se estudió si la falta de poliaminas afecta alguno de los procesos discontinuos que se desarrollan a lo largo de dicho ciclo. En primera instancia, se examinaron las características morfológicas de las levaduras ayunadas en poliaminas y se determinaron parámetros del ciclo celular, como el índice de brotación. El núcleo de la levadura migra a lo largo del ciclo hasta ubicarse en el cuello de brotación al comienzo de la fase mitótica, por lo cual se examinó la posición y el número de núcleos por célula luego de teñirlos con colorantes fluorescentes.

Características morfológicas

Se observaron por microscopía de contraste de fase las características morfológicas de células provenientes de cultivos con o sin poliaminas.

En la Figura 18 se muestran células de cultivos de *S.cerevisiae* X-2180 que presentan las mismas características que *S.cerevisiae* 179-5 suplementadas con estas poliaminas. Como los cultivos son asincrónicos, se pueden observar células en las distintas etapas del ciclo celular. Las características morfológicas de las células son normales en ambos casos, tienen un solo brote por individuo y no hay variaciones en el tamaño medio de las mismas. En cambio, en las células ayunadas en poliaminas, un porcentaje de la población celular (5 a 15 %) presenta más de un brote por célula y algunos de ellos situados en sitios anormales. Por otra parte, hay un aumento del tamaño de las células, un porcentaje apreciable de las mismas son muy grandes con brotes muy pequeños. Estas alteraciones sugieren que

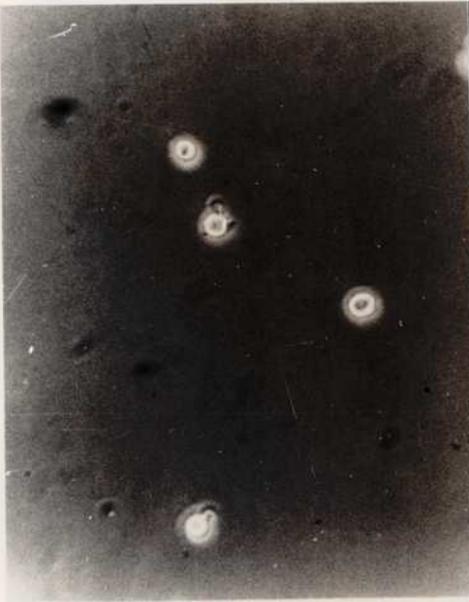
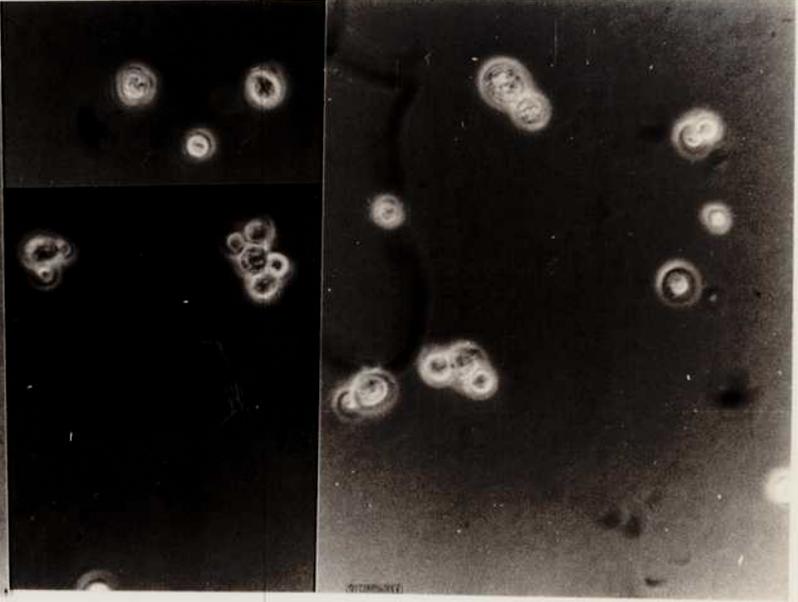
A**B**

Figura 18. Características morfológicas de *S. cerevisiae* X- 2180 (A) y 179-5 sin poliaminas(B).
Las células fueron fijadas y se observaron por contraste de fase en un microscopio Zeiss a 1000 aumentos.

las poliaminas tendrían participación en alguna etapa del ciclo celular, en los mecanismos de regulación de la brotación y/o de la síntesis localizada de la pared celular.

Para confirmar el aumento de tamaño en ausencia de poliaminas fácilmente observable por microscopía de contraste de fase se analizó la distribución de tamaños con un analizador Coulter. Los resultados se observan en la Figura 19 : el panel A corresponde a cultivos de la cepa parental y el B a cultivos de *S.cerevisiae* 179-5 suplementados con poliaminas, observándose en ambos la misma distribución de tamaños. Los paneles C y D muestran cultivos de *S.cerevisiae* 179-5 sin poliaminas a distintos tiempos de ayuno, notándose un aumento progresivo del volumen de las células a medida que se prolonga el tiempo en ausencia de estos policationes. Este aumento es mucho mayor que el observado en cultivos de la cepa parental al entrar en fase estacionaria.

Análisis del porcentaje de brotación

El porcentaje de brotación es un parámetro del ciclo celular que nos indica cuántos organismos han sido capaces de iniciarlo. Sus valores están en estrecha relación con las condiciones fisiológicas de un cultivo; las células que crecen activamente presentan altos valores de este índice, mientras que si cesan de proliferar por falta de nutrientes o cualquier otra condición, disminuyen notablemente.

En la Figura 20 observamos la relación entre el porcentaje de brotación y el número de divisiones celulares en cultivos de *S.cerevisiae* 179-5 con o sin poliaminas, y de *S.cerevisiae* X-2180. En los cultivos suplementados con estas bases orgánicas o en cultivos de la cepa parental, este índice mantiene un valor alto y constante que sólo disminuye cuando las células entran en fase estacionaria. En cambio, en las levaduras cultivadas sin poliaminas, este porcentaje disminuye rápidamente a medida que aumenta el número de divisiones celulares. Como en las mutantes el contenido endógeno de poliaminas disminuye a medida que se dividen, el porcentaje de brotación parece correlacionarse con la concentración intracelular de poliaminas.

Examen de los núcleos celulares

Después de la fase S o de replicación del cromosoma el núcleo migra hacia el cuello de brotación, donde se ubica durante la mitosis. Se estudió si este proceso se produce normalmente en ausencia de poliaminas y si la citocinesis se encuentra alterada, dando lugar a la formación de células binucleadas. Para ello se tiñeron los núcleos celulares con un colorante fluorescente, el diaminofenolindolacético (DAPI), que se intercala entre el ADN nuclear y mitocondrial.

En la Figura 21 se presentan fotos de células parentales y de mutantes suplementadas con putrescina, teñidas con DAPI y observadas por microscopía de fluorescencia. Las células son mononucleadas, sus núcleos son normales y es posible ver cómo se ubican en el cuello de la brotación al comienzo de la mitosis (Panel A). En cambio, en células ayunadas en poliaminas (Panel B) se

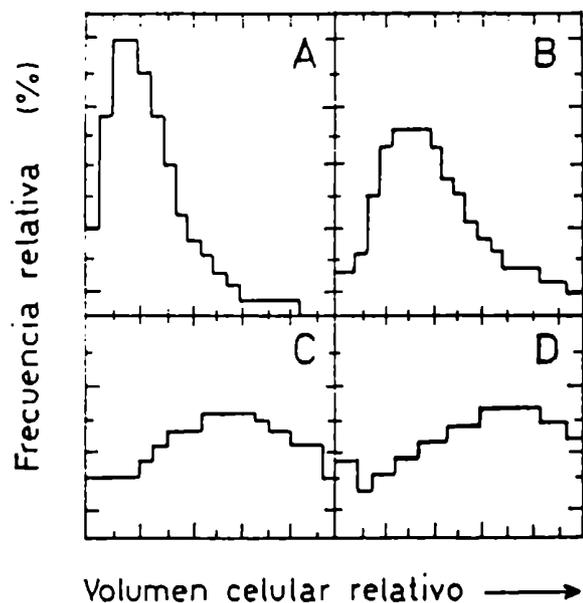


Figura 19. Distribución de tamaños en cultivos de *S. cerevisiae* X-2180 y 179-5.

Las muestras se analizaron con un Coulter counter según se describe en Materiales y Métodos. A.- *S. cerevisiae* X-2180 (0.33 duplicaciones/hs. A_{550} 0.4). B.- *S. cerevisiae* 179-5 + poliaminas (0.33 duplicaciones/hs. A_{550} 0.38). C.- *S. cerevisiae* 179-5 - poliaminas (0.04 duplicaciones/hs. A_{550} 0.31). D.- Igual a C. 5³⁰ hs más tarde (A_{550} 0.48).

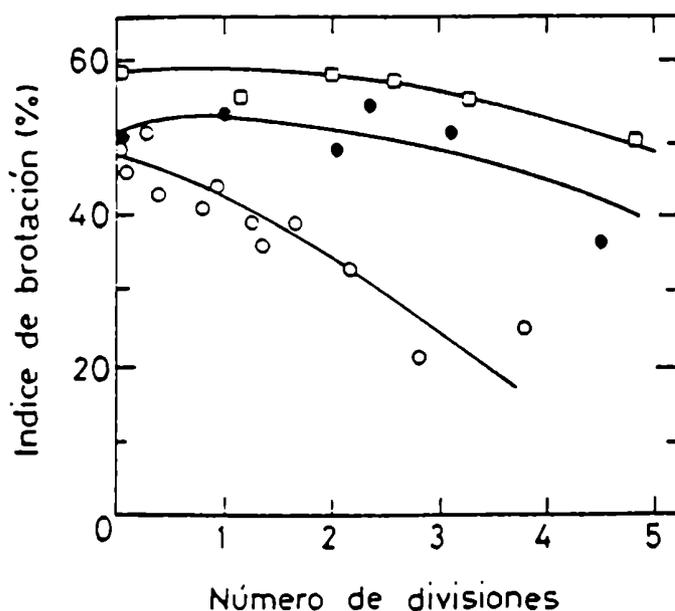


Figura 20. Índice de brotación en cultivos ayunados y suplementados con poliaminas.

Se determinó el porcentaje de células brotadas en cultivos de *S. cerevisiae* 179-5 ayunados (○) o suplementados (●) con poliaminas y en *S. cerevisiae* X-2180 (□). El número de divisiones se calculó por recuento del número de células. Los cultivos en fase estacionaria tenían un 10% y un 13% de células brotadas en *S. cerevisiae* 179-5 y X-2180 respectivamente.

observan algunas alteraciones ya que una proporción de las células podría ser binucleada o presentar núcleos deformados. Por otra parte, hay algunos ejemplos que indicarían que la división nuclear podría llevarse a cabo fuera de su lugar normal.

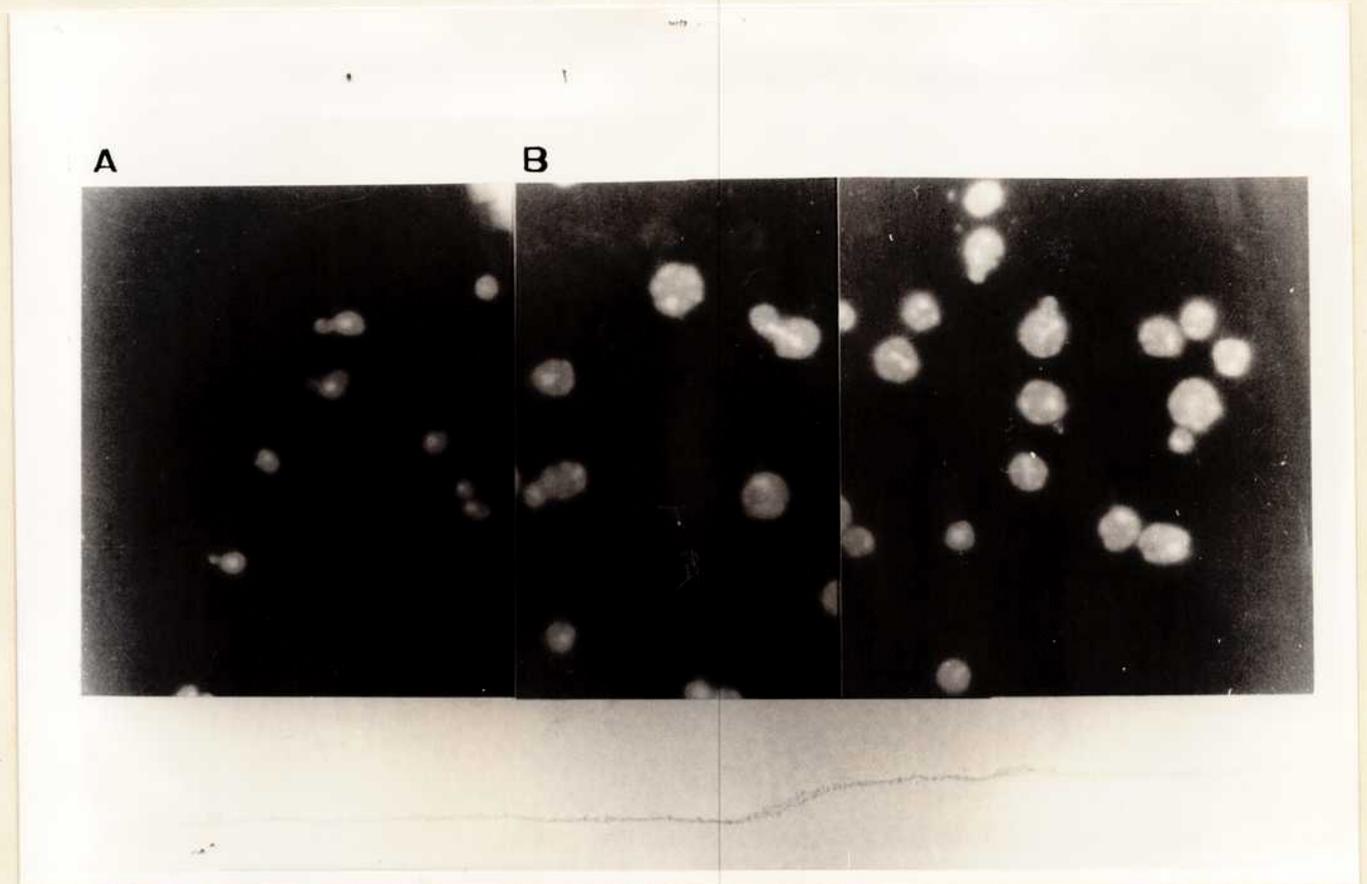


Figura 21. Exámen de los núcleos celulares.

Las levaduras *S. cerevisiae* X-2180 (A) y 179-5 cultivada en ausencia de poliaminas (B), fueron fijadas y coloreadas con DAPI según se describe en Materiales y Métodos.

PARED CELULAR

La pared celular es importante para la forma, tamaño y crecimiento de las levaduras, constituyendo un interesante modelo para el estudio de la morfogénesis⁸⁵. Su estructura y composición química varía durante el ciclo celular, la esporulación y la conjugación¹⁴⁸. La espóra está formada por una gruesa pared interna semejante a la que se observa en células vegetativas y una fina capa exterior de composición no establecida¹⁴⁸. Antes de la conjugación la feromona α produce cambios morfológicos, las células son más alargadas y la composición química de la pared varía aumentando la proporción de glucanos¹⁴⁸. Los cambios observados durante el ciclo celular ya han sido descritos (Figura 5).

Las poliaminas son necesarias para la esporulación, puesto que las mutantes auxótrofas para las mismas son incapaces de llevar a cabo dicho proceso en ausencia de ellas³². No se conocen hasta el momento las bases moleculares o bioquímicas de ésta deficiencia. Ya hemos descrito en páginas anteriores que la falta de poliaminas produce alteraciones morfológicas (aumento de tamaño) y anomalías en la formación del brote (múltiples sitios de brotación), así como una resistencia parcial a la acción de enzimas que degradan normalmente la pared celular. Como estas alteraciones están todas relacionadas con la pared, se decidió estudiar en más detalle su estructura y composición química. Con este objetivo se llevaron a cabo una serie de estudios.

Se ensayaron otros agentes de lisis de la pared en *S.cerevisiae* X-2180 y en *S.cerevisiae* 179-5 con y sin poliaminas, y se analizó el efecto de las condiciones de ayuno y de diferentes agregados que favorecen la sensibilidad a las actividades líticas.

La pared celular está compuesta por manoproteínas que forman la capa más externa de la pared y son responsables de su reacción inmunológica; glucanos, que forman la capa más interna, y quitina que se encuentra localizada en el septo⁸⁵. Para establecer si los cambios morfológicos y la diferente sensibilidad a enzimas se correlacionan con alteraciones en su composición se determinó la misma en *S.cerevisiae* X-2180 y de *S.cerevisiae* 179-5 con o sin poliaminas.

Estudios por microscopía electrónica revelaron que la estructura de la pared celular es homogénea con excepción de la región del septo; en esta última zona se producen cambios a lo largo del ciclo celular. Para determinar si hay alteraciones estructurales tanto en el septo como en el resto de la pared se analizaron células provenientes de *S.cerevisiae* X-2180 y de *S.cerevisiae* 179-5 con o sin poliaminas, por microscopía electrónica.

Acción de enzimas líticas sobre la pared celular

Se determinó el efecto de distintos preparados enzimáticos sobre la lisis de la pared en

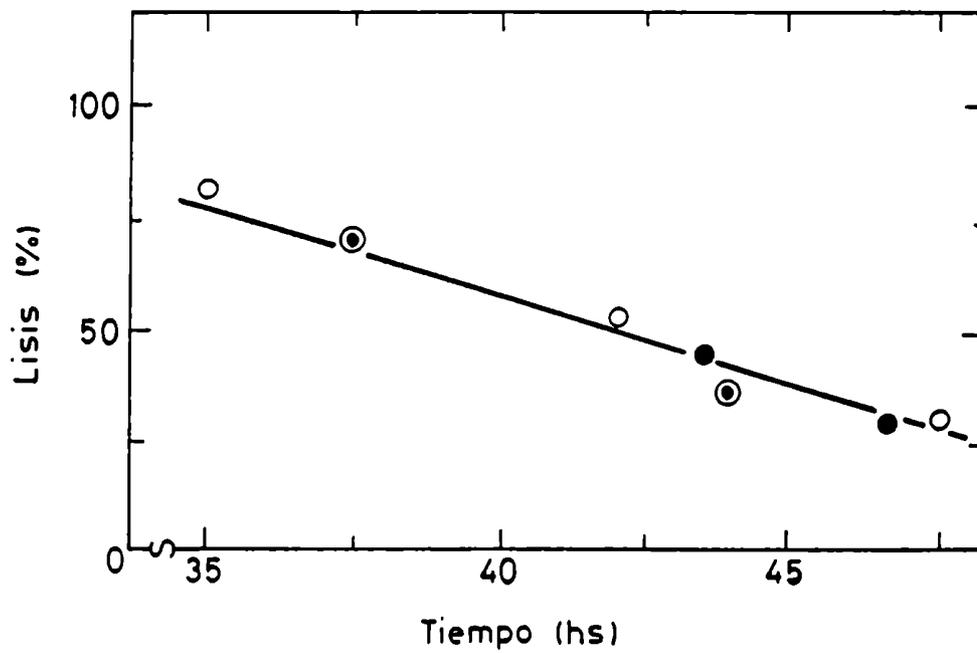


Figura 22 Efecto del grado de ayuno sobre la sensibilidad a zimoliasa.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de ayuno de distintos cultivos de *S. cerevisiae* ayunados en poliaminas, con tiempos de generación entre 0.04 duplic./hs y detención total del crecimiento, y se determinó el porcentaje de lisis según Materiales y Métodos. La reacción enzimática se llevó a cabo con 10 U/ml de zimoliasa durante 60 minutos a 37 °C.

○ ● representan muestras de distintos cultivos.

S.cerevisiae 179-5 cultivada en presencia o ausencia de poliaminas y sobre *S.cerevisiae* X-2180. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Enzima	% de lisis $100 - (A_{550} / A_{550i})$		
	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.cerevisiae</i> 179-5	
	X-2180	+ poliam.	-poliam.
Zymoliasa 10 U/ml, 35°C	100	100	40-60
Glusulasa 1%, 25°C	100	100	10
Novozima 10 mg/ml, 30°C	90	90	20-30

Tabla 6. Digestión de la pared celular por distintos preparados enzimáticos.

Las células fueron obtenidas y tratadas según se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de lisis se expresa como $100 - (A_{550} / A_{550i})$.

La zymoliasa que contiene fundamentalmente β 1-3 glucanasa y una proteasa específica para las manoproteínas de la pared celular¹⁴⁹, tiene sobre la cepa parental y la cepa mutante suplementada con poliaminas un 100% de actividad lítica, mientras que, sobre *S.cerevisiae* 179-5 en condiciones de ayuno, sólo un 40-60% es susceptible al ataque. La glusulasa, que está compuesta por una mezcla de mananasa, glucanasa, quitinasa y lipasa¹⁵⁰, tiene sólo un 10% de actividad lítica sobre la mutante de levadura sin suplementar. La novozima 234, por su parte que es un complejo enzimático que contiene, fundamentalmente, β 1-3 glucanasas y que se utiliza para degradar la pared de algunos hongos¹⁵¹, presenta muy baja actividad lítica sobre *S.cerevisiae* 179-5 sin poliaminas. Estos cambios en la susceptibilidad a la lisis no se deben a la disminución de la velocidad de crecimiento, porque cultivando la cepa parental en medio pobre en nitrógeno (por ejemplo, triptofano o treonina 0.1% en lugar de $SO_4(NH_4)_2$ 0.1%) se obtiene un aumento del tiempo de generación a 8-12 hs, sin que haya pérdida de la sensibilidad al ataque enzimático.

Determinando la actividad lítica de zymoliasa sobre cultivos con distintos tiempos de generación, como muestra la Tabla 7 pudo verse que a medida que los cultivos crecen más lentamente aumenta la resistencia a la lisis.

Por otra parte se determinó en cultivos de *S.cerevisiae* 179-5 la variación del porcentaje de lisis con el tiempo de ayuno. La Figura 22 muestra los resultados obtenidos, observándose una correlación lineal entre estas dos variables.

La resistencia a la lisis no depende de la concentración de enzima ni de los tiempos de incubación ensayados (Tabla 8). En ambos casos se llega a un valor máximo que no es modificado por ninguna de estas dos variables.

Cepa	Velocidad de crecimiento dupl./hs.	Lisis de la pared $100(A_{550f}/A_{550i})$
X-2180-1B	0.33	100
179-5 + poliam.	0.33	100
179-5 - poliam.	0.24	87
	0.15	75
	0.13	47
	0.10	46
	C.D	44

Tabla 7. Relación entre sensibilidad a zimoliasa y el grado de ayuno.

S.cerevisiae X-2180 y 179-5 se cultivaron en medio mínimo y se determinó el porcentaje de lisis según Materiales y Métodos. C.D.: crecimiento detenido.

Tiempo de ayuno	Zymoliasa(U/ml)			Tiempo de incubación		
	2	10	20	30'	60'	90'
hs	Porcentaje de lisis					
37	27	67	80	29	67	71
42	10	19	31	16	19	24

Tabla 8. Efecto de la concentración de zimoliasa y del tiempo de incubación sobre la lisis en células ayunadas en poliaminas.

Un cultivo de *S.cerevisiae* 179-5 sin estas poliaminas (0.04 duplicaciones/hs) se procesó según lo descrito en Materiales y Métodos. Cuando se analizó el efecto de la concentración enzimática el tiempo de incubación fue 60 minutos. La concentración de zimoliasa utilizada al determinar el efecto del tiempo de incubación fue 10 U/ml. El porcentaje de lisis se expresa como A_{550f}/A_{550i}

En algunos casos la acción de zimoliasa puede ser estimulada por diversos agentes que facilitan la penetración de esta enzima hasta la capa más interna de glucano, atravesando la capa de manoproteínas externa^{152,153}. En la Tabla 9 se muestra el efecto de diversos agentes estimulantes de la actividad de zimoliasa sobre *S.cerevisiae* 179-5 con distintos tiempos de ayuno.

En tiempos cortos de ayuno los agentes empleados aumentan considerablemente la actividad lítica; se ve que en algunos casos, como con pretratamiento con mercaptoetanol 500 mM y digitonina 0.1% se logra lisis total de las células. En cambio si la falta de poliaminas se prolonga, el efecto estimulatorio sobre la lisis es menor, alcanzando un valor máximo que no es modificado. Este

incremento depende del tipo y concentración de agente utilizado, resultando el mercaptoetanol y la digitonina más eficaces que el KCl.

Tiempo de ayuno (hs)	Trat. con zym (min.)	Sin	Porcentaje de lisis					
			Pretratamiento					
			Mercapt.		Digit.		KCl	
			50mM	500mM	0.01%	0.1%	0.2M	0.8M
74	15	25	100	100	100	100	50	100
	30	45					73	100
	60	70						93
98	15	8	18	63	38	60	12	22
	30	12	34	70	52	70	20	35
	60	18	46	72	60	76	24	50

Tabla 9. Estimulación de la actividad lítica de zymoliasa por diversos agentes sobre células ayunadas en poliaminas.

Las células provenientes de un cultivo con 0.04 duplicaciones /hs se cosecharon después de 74 y 98 hs de ayuno. Se pretrataron 30 minutos a 37°C con los agentes elegidos y luego de lavarlas con agua, se determinó el porcentaje de lisis. La incubación se realizó con 10 U/ml de zymoliasa por 60 minutos.

Composición química cuantitativa

Para determinar el posible efecto del contenido endógeno en poliaminas sobre la composición química cuantitativa de la pared, las levaduras fueron incubadas con glucosa-¹⁴C por 2 a 4 generaciones y luego de aislar las paredes celulares se comparó la distribución de radioactividad en los diferentes polisacáridos que la constituyen. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Se observa que en condiciones de ayuno para poliaminas hay una drástica disminución del glucano β 1-3 soluble en álcali, un moderado incremento en manoproteínas, un aumento del glucano β 1-6 insoluble en álcali y la quitina no sufre modificaciones. La composición de la pared de *S.cerevisiae* X-2180 y *S.cerevisiae* 179-5 suplementadas con poliaminas es normal y coincide con datos citados anteriormente¹³⁶. Por otra parte, como se muestra en la Tabla 10, en ausencia de poliaminas aparece una mayor proporción de marca en la pared celular puesto que el 36% de las cuentas totales incorporadas se encuentra en este componente celular en estas condiciones, mientras que sólo un 22-24% se incorpora a cultivos con estas poliaminas o a la cepa parental.

Se controló también la composición de la pared de células de *S.cerevisiae* X-2180 en fase estacionaria y resultó semejante a la observada en fase logarítmica.

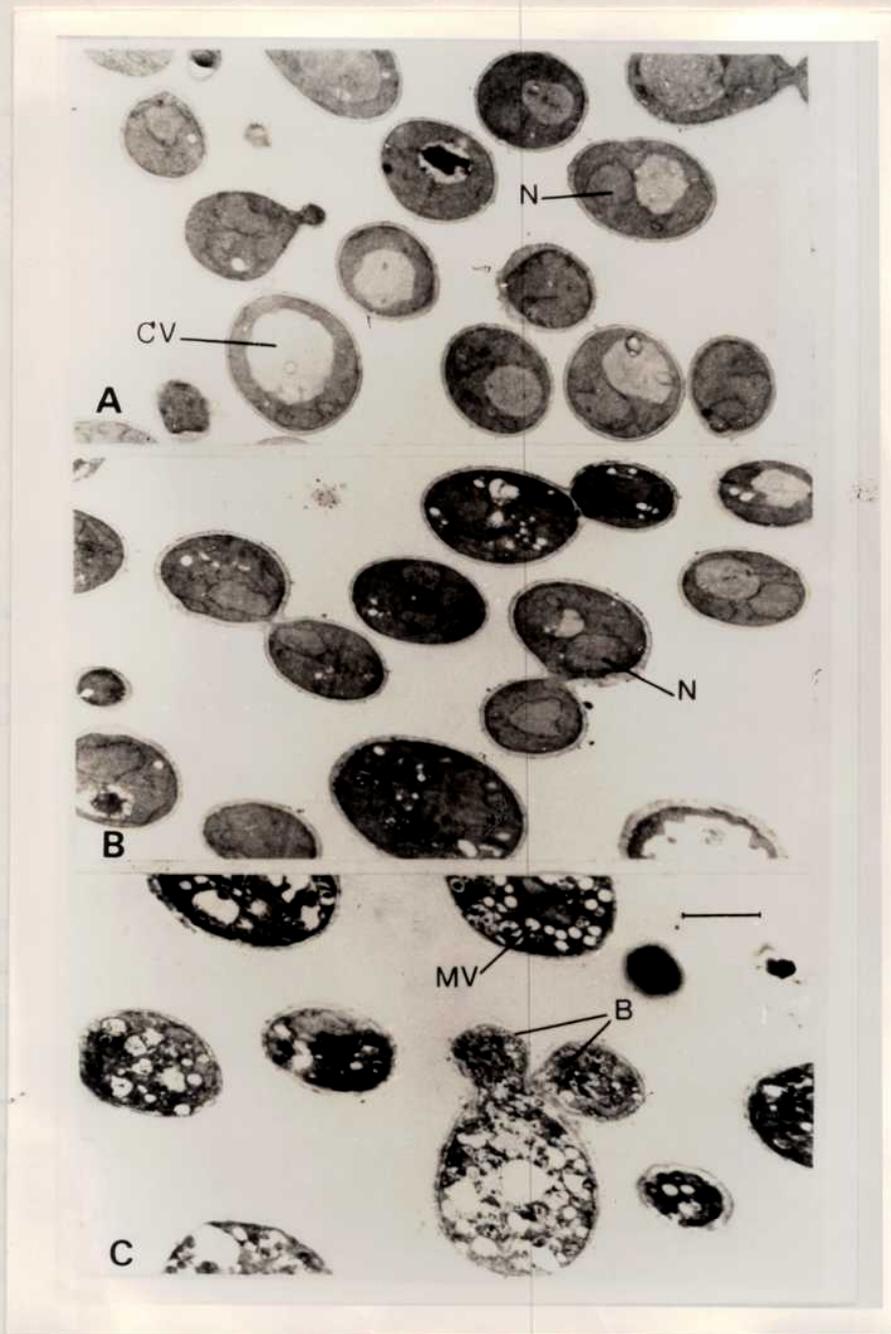


Figura 23. Observación por microscopía electrónica. *S.cerevisiae* X-2180 (A), *S.cerevisiae* 179-5 con (B) y sin poliaminas (C). Aumento 7500x. N: núcleo, CV: vacuola central, MV: microvacuolas, B: brote anormal. Barra 2 μ m.

Cepa	Manano	Glucano		Quitina
		soluble	insoluble	
X-2180	47	30	20	2.5
179-5 + poliam.	50.4	28	16	2
179-5 - poliam.	64	5.4	28	2.4

Tabla 10. Composición química cuantitativa de la pared celular de levaduras.

Las células se marcaron con ^{14}C -glucosa y las paredes aisladas se procesaron según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son un promedio de 2-3 experimentos y se expresan como porcentaje de la radioactividad incorporada en cada fracción con respecto a la suma de todas éstas. El porcentaje de radioactividad incorporada en la pared, con respecto al total, fue de 24, 22 y 36 para *S.cerevisiae* X-2180, 179-5 + poliaminas y 179-5 - poliaminas, respectivamente.

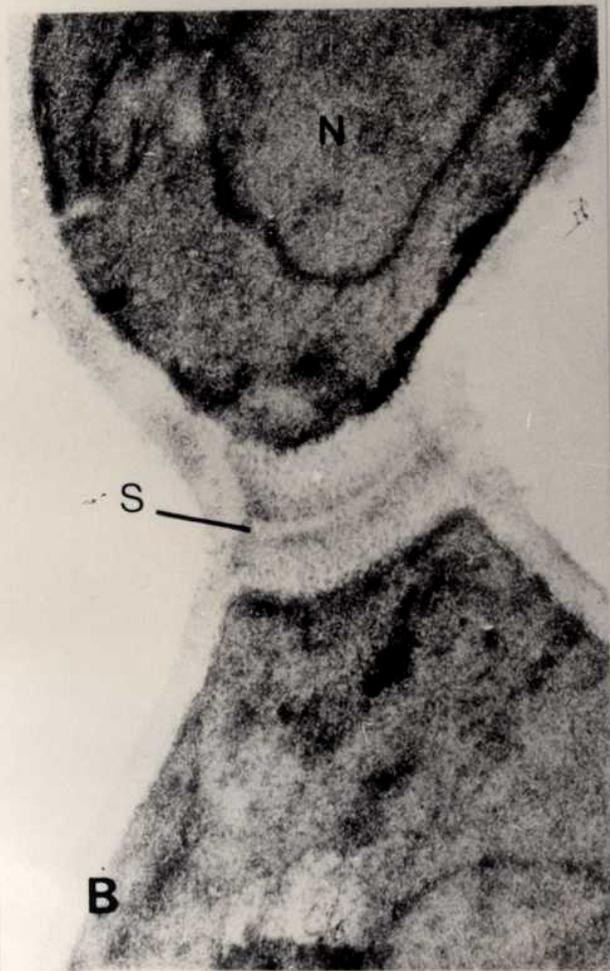
Microscopía electrónica

Las diferencias de tamaño descritas anteriormente fueron confirmadas por microscopía electrónica. La Figura 23 muestra que en el caso de *S.cerevisiae* 179-5 cultivada en ausencia de poliaminas (Panel C) las células son más grandes que las cultivadas con estos poliaminas (Panel B) o que las células provenientes de cultivos de *S.cerevisiae* X- 2180 (Panel A). Las células ayunadas tienen un diámetro promedio 21 % mayor que las suplementadas o la cepa parental (Tabla 11).

Otra característica importante es la presencia de microvacuolas. Estas son raras en *S.cerevisiae* X-2180 observándose generalmente una única vacuola central, pero son más frecuentes y en bajo número en *S.cerevisiae* 179-5 cultivadas con poliaminas. En cambio en levaduras ayunadas en estos poliaminas el 100 % de las células presentan microvacuolas en gran cantidad (Tabla 11). Estas estructuras no tienen ningún contenido, no poseen unidad de membrana y se pueden fusionar para formar cavidades más grandes (Figura 23 y 24). El origen de estas microvacuolas es desconocido pero podrían provenir de inclusiones lipídicas cuyo contenido fue extraído durante la fijación.

Además, la pared celular de levaduras cultivadas sin poliaminas no tiene una textura homogénea como la observada en las células normales y es significativamente más gruesa, siendo su ancho un 45 % mayor. Otra característica importante es la presencia de microcuerpos electrodensos dentro de la pared. Estas estructuras están rodeadas de una unidad de membrana trilaminar similar a la membrana celular, y su contenido no puede ser diferenciado del citoplasma circundante (Figuras 24 y 25).

En células ayunadas en poliaminas se pueden observar varias levaduras con multibrotaciones, en algunos casos una al lado de la otra (Figuras 23, 24 y 25) o en sitios anormales (Figura 25) El núcleo de estas células se encuentra generalmente deformado, con protuberancias y estrangulaciones (Figura 24) aunque también es posible observar núcleos normales.



Cepa	Diametro celular (μm)	Células con microvacuolas (%)	Número por cél.	Ancho de la pared celular (nm)
X-2180	2.79 (0.71, N29)	12	0-1	120 (SD 26, N15)
179-5 + pol.	2.92 (SD 0.77, N29)	55.3	3.15 (SD 2, N26)	
179-5 - pol	3.38 (SD 1.15, N20)	100	22.8 (SD 18, N14)	174.9 (SD 29.2, N15)

Tabla 11. Algunas características estructurales observadas por microscopía electrónica.

* p 0.01 para diferencias entre X-2180 y 179-5 sin poliaminas. ** p 0.01 para diferencias entre 179-5 con o sin poliaminas.

Por último, se observa que la septación en ausencia de poliaminas es defectuosa, el septo primario pierde su estructura y en algunos casos no se completa, formándose deposiciones de material muy heterogéneo a su alrededor (Figura 25).

Figura 24. Efecto del ayuno en poliaminas.

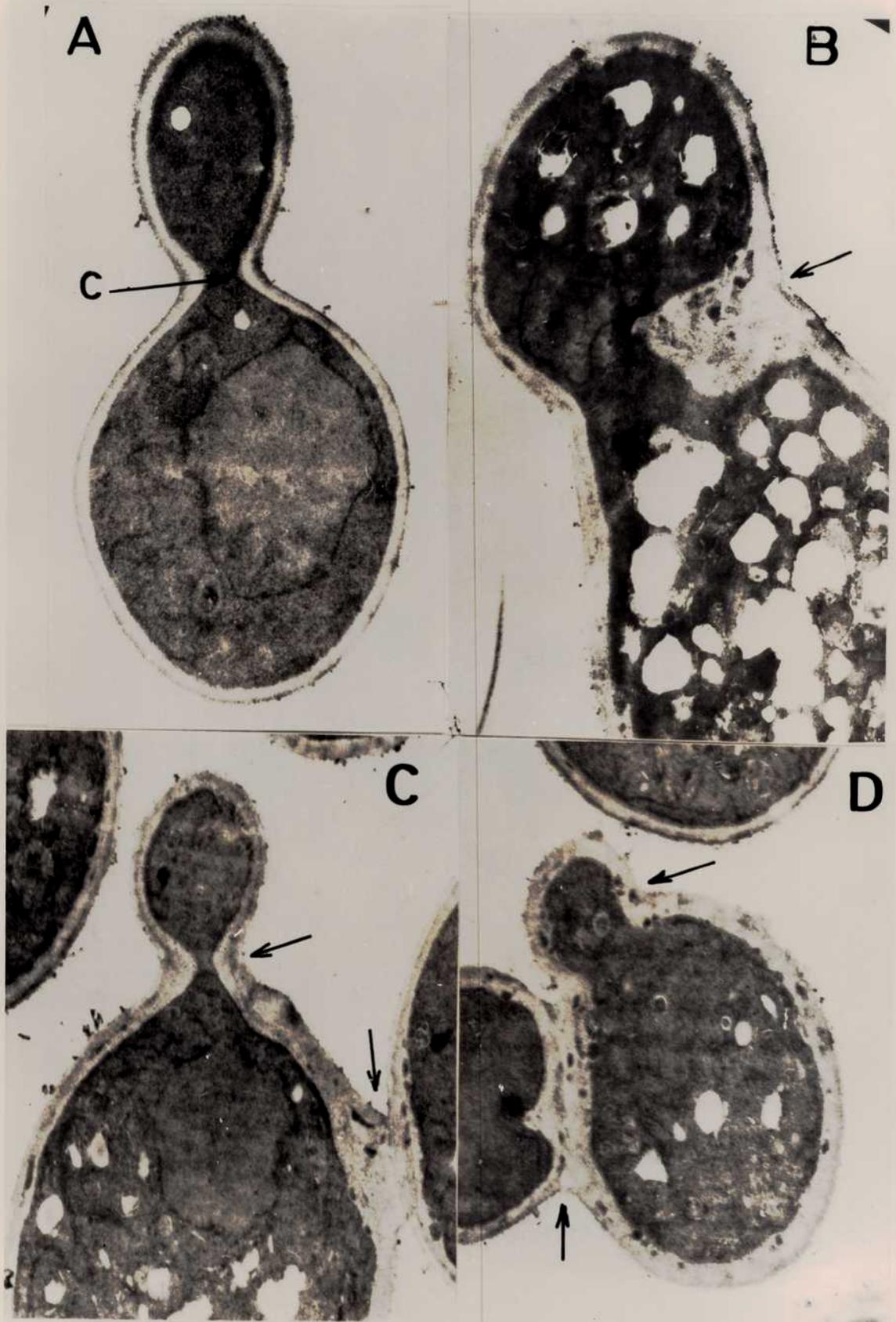
(A) Cultivos ayunados en poliaminas, mostrando los microcuerpos densos en la pared celular, la abundante cantidad de microvacuolas (MV) y los núcleos deformados (N). Aumento 17000x. Barra 1 μm . (B) Cepa parental, se observa la textura homogénea en la pared excepto en la región del septo (S). Aumento 50.000x (C) Célula ayunada en poliaminas, con una pared heterogénea, más gruesa y se pueden observar los microcuerpos densos (DB) rodeados por una membrana trilaminar similar a la membrana celular (CM). Aumento 50.000x Barra 0.5 μm .

Figura 25. Efecto del ayuno en poliaminas.

(A) Cepa parental brotando normalmente. Aumento: 36.000

(B) Septación anormal en ausencia de poliaminas, observándose un engrosamiento por deposición asimétrica del material que forma el septo secundario. Aumento: 31.500

(C) y (D) Células multibrotadas en ausencia de poliaminas con alteraciones en el número y localización del brote. Aumento: 24.000. N: núcleo, C: citocinesis.



DISCUSION

Si bien las poliaminas participan en numerosos procesos fisiológicos y metabólicos (ver Introducción) no se conoce con exactitud su papel fisiológico en los seres vivos. Estas poliaminas tienen una importante participación en la proliferación celular^{26,27}. Aunque no se conoce exactamente el papel de las poliaminas en dicho proceso, los estudios realizados indican que participan tanto en el crecimiento como en la división celular. El objetivo del presente trabajo fue establecer el papel fisiológico y/o bioquímico de las poliaminas en la proliferación celular de eucariotes.

Hasta el presente se han adoptado tres estrategias fundamentales para determinar las posibles funciones de las poliaminas: a.- la correlación de distintos parámetros de la fisiología celular con los niveles intracelulares de las mismas y sus enzimas biosintéticas^{4,26}, b.- los estudios en sistemas libres de células^{4,26} y c.- el estudio de las alteraciones que se producen en células u organismos que carecen de o tienen disminuído el contenido endógeno de poliaminas^{26,27}. En el primer caso sólo podemos tener una primera aproximación a los procesos fisiológicos o metabólicos afectados por estas bases orgánicas sin tener evidencias directas de su participación en ellos; en el segundo caso, debido a que las poliaminas son altamente cargadas, interactúan con numerosos compuestos celulares que pueden no estar relacionados con sus funciones biológicas específicas, por lo tanto se debe tener mucho cuidado al interpretar los resultados experimentales.

Quizás la mejor estrategia para determinar las funciones de las poliaminas en los organismos vivos es el estudio de los procesos metabólicos y fisiológicos afectados por la falta de ellas, por tratarse de estudios *in vivo*, aportan evidencias más directas de su participación en los procesos alterados. Se han desarrollado dos sistemas para disminuir el contenido endógeno de poliaminas en los seres vivos: la obtención de mutantes auxótrofos para estos compuestos, y la utilización de inhibidores de la biosíntesis de las mismas^{26,27}. Esta última estrategia presenta una serie de inconvenientes: la inhibición de las enzimas suele ser parcial, algunos inhibidores producen efectos secundarios¹⁵⁴ y en algunos organismos no penetran fácilmente. La obtención de mutantes auxótrofos en diversos organismos, por el contrario, ha permitido determinar algunos de los papeles fisiológicos de las poliaminas y constituyen una muy buena herramienta de trabajo para determinar los procesos metabólicos y celulares en los cuales podrían participar estas poliaminas. Se han obtenido mutantes de *E.coli*³⁵⁻³⁷, *N.crassa*¹³, *S.cerevisiae*^{32,33}. Si bien estos sistemas presentan numerosas ventajas, en algunos casos existe el inconveniente de no poder determinar cuál es el sitio primario de acción de los poliaminas, ya que muchas alteraciones estudiadas pueden ser secundarias.

La levadura *S.cerevisiae* es un excelente modelo para el estudio de la bioquímica y de la biología molecular y celular en eucariotes, debido a que este organismo es fácilmente manipulable desde el punto de vista genético y bioquímico y la mayoría de los procesos fundamentales como el ciclo celular, la replicación, la transcripción, la síntesis de proteínas, etc., son muy semejantes a la de los

eucariotes superiores. En los últimos años se han aislado mutantes de *S.cerevisiae* auxótrofos para poliaminas^{32,33,116} que nos permitirían determinar los papeles fisiológicos de las poliaminas en la proliferación celular. Entre estas cepas mutantes se encuentra *S.cerevisiae* 179-5 obtenida por Hosaka et al, que como demostraron sus autores, tiene las siguientes características: no prolifera en ausencia de poliaminas, son deficientes en la biosíntesis de las mismas ya que no se encuentra actividad de ornitina decarboxilasa, la primera y principal enzima del camino biosintético, y tampoco se detecta ninguna de las tres poliaminas descritas en levaduras por análisis de sus derivados dansilados por cromatografía en capa delgada³³. Estos resultados fueron confirmados en el presente trabajo. El crecimiento celular fue deficiente en ausencia de poliaminas, con tiempos de generación de 7 hs. o mayores incluyendo detención total del mismo (Figura 10). No se detectaron poliaminas por análisis de sus derivados dansilados a ninguna de las velocidades de crecimiento (Figura 9), siendo la falta de actividad de ornitina decarboxilasa la responsable de esta deficiencia (Tabla 2). Sembrando diluciones crecientes de un inóculo de *S.cerevisiae* 179-5 en medio mínimo libre de poliaminas como se describe en Materiales y Métodos, se obtienen distintos tiempos de generación por diferencias en el grado de ayuno de los cultivos. El crecimiento celular normal se recupera luego de 6-10 hs. por reagregado de poliaminas, siendo más efectiva la espermina que la putrescina o la espermidina.

En el presente trabajo se presentan evidencias que nos permiten asignar a las poliaminas un papel fisiológico en el crecimiento celular, ya que participan en la síntesis de macromoléculas, en el ensamblado de los ribosomas y en la síntesis y/o estructura de la pared. También creemos que tienen un papel en la división celular, debido a que participarían en algunos de los eventos discontinuos del ciclo celular.

POLIAMINAS Y CRECIMIENTO CELULAR

Efecto sobre la síntesis de macromoléculas

La disminución en la velocidad de crecimiento que se observa en ayuno de poliaminas podría deberse a una deficiencia en la síntesis de alguna de las macromoléculas fundamentales (ADN, ARN y proteínas). Se pudo demostrar en nuestro caso que la síntesis de estas tres macromoléculas está afectada en estas condiciones, recuperándose primero la síntesis proteica por reagregado de poliaminas (Figura 11). Este comportamiento es similar al observado en procariotes^{47,139} y sugiere que las poliaminas actuarían quizá fundamentalmente sobre la síntesis proteica.

Efecto sobre el ensamblado y/o biogénesis de los ribosomas

La deficiente síntesis de proteínas que se observa en ausencia de poliaminas podría deberse

a alteraciones en los componentes de la maquinaria biosintética. Para verificar esta posibilidad se analizaron los perfiles ribosomales de cultivos de *S.cerevisiae* crecidos con o sin poliaminas.

En ausencia de estas bases orgánicas se encuentran varias alteraciones en los perfiles ribosomales, similares a los observados en procariotes⁵⁴. Los monosomas se encuentran más disociados; no se obtiene asociación completa de las subunidades aún a concentraciones altas de cationes divalentes (Mg^{2+} 30 mM)(Figuras 12 y 15). Estas alteraciones no se deben a las bajas velocidades de crecimiento de los cultivos, ni a la acción de ARNasas, proteasas u otras actividades enzimáticas que podrían degradar parcialmente los ribosomas dando perfiles similares (Figura 13). Por otra parte, se observa una correlación entre el grado de ayuno y el índice de asociación de las subunidades ribosomales, lo que constituye una evidencia de que la falta de poliaminas provoca las alteraciones anteriormente descritas (Tabla 5).

Durante la ultracentrifugación se genera una presión hidrostática a lo largo del tubo de centrifuga que en algunas ocasiones disocia las partículas ribosomales tanto en procariotes como en eucariotes^{145,174}. Los ribosomas obtenidos en ausencia de poliaminas son más sensibles a este efecto de la presión hidrostática; como puede deducirse de la comparación de los perfiles ribosomales con o sin fijación previa con glutaraldehído (Figura 12). Este comportamiento es semejante al que presentan las denominadas "loose couples" de *E.coli*¹⁵⁴. Estas partículas son monómeros ribosomales, obtenidos a baja concentración de Mg^{2+} , que se disocian fácilmente durante la ultracentrifugación, son menos activos en la síntesis proteica *in vitro* y se originarían por cambios conformacionales o estructurales en la partícula ribosomal. A diferencia de los ribosomas de levaduras obtenidos en ausencia de poliaminas, se asocian completamente a altas concentraciones de cationes divalentes como el Mg^{2+} ; lo que sugiere que la naturaleza de las alteraciones provocadas por la ausencia de estas bases orgánicas en levadura es distinta a la que origina las "loose couples".

Estos resultados parecen indicar que en ausencia de poliaminas se producen alteraciones estructurales y/o conformacionales en los ribosomas de levaduras, lo que se verificó mediante el estudio del efecto de los cationes mono y divalentes sobre la asociación de subunidades. Hasta el momento se han desarrollado dos modelos para explicar el efecto de éstos cationes sobre el equilibrio de subunidades. El primero de ellos propone la existencia de sitios específicos en el ribosoma para el Mg^{2+} , el cual favorecería la asociación ribosomal a través de la formación de puentes entre los grupos fosfato del ARN ribosomal. Los cationes monovalentes competirían por estos sitios y debido a su incapacidad para formar puentes provocarían la disociación de las subunidades. Además estos cationes por efecto electrostático pueden impedir que los ribosomas adquieran una conformación que permita la unión específica de Mg^{2+} . La diferente capacidad de distintos cationes divalentes para asociar los ribosomas constituye una evidencia a favor de este modelo¹⁴¹⁻¹⁴³. El otro modelo propone que los cationes divalentes neutralizan las cargas en las subunidades ribosomales y la consecuente reducción de la repulsión electrostática entre las mismas provocaría su asociación. Los cationes monovalentes disociarían los ribosomas porque protegerían a las subunidades por efecto de uniones no específicas y no covalentes¹⁵⁸. Actualmente la mayor parte de la evidencia favorece un modelo combinado, donde el

Mg^{2+} reduciría la repulsión electrostática entre las subunidades y también se uniría a sitios específicos en el ribosoma¹⁴²⁻¹⁵⁹.

Los ribosomas obtenidos en ausencia de poliaminas tienen una menor sensibilidad a las variaciones en la concentración de Mg^{2+} . Vemos que con valores altos como 30 mM no hay asociación completa con o sin fijación previa con glutaraldehído (Figura 15); sólo se observa un pequeño grado de asociación dependiente de la concentración de Mg^{2+} , que indicaría que este catión podría disminuir la repulsión electrostática de las cargas de los grupos fosfato, pero al estar las subunidades mal ensambladas, los sitios específicos para el Mg^{2+} se encontrarían alterados provocando la falta de sensibilidad a este catión. Esta alteración depende del contenido endógeno de poliaminas, ya que existe una correlación entre el efecto asociante del Mg^{2+} y el tiempo de generación de los cultivos (Figura 16).

Como se explicó anteriormente, los cationes monovalentes promueven la disociación de los ribosomas debido a que competirían con los cationes divalentes por los sitios específicos o alterarían la conformación de los ribosomas disminuyendo la afinidad de dichos sitios por los cationes divalentes. En ausencia de poliaminas, los ribosomas son más sensibles a las concentraciones de K^+ , ya que menores cantidades de este catión tienen efecto disociante, independientemente de la relación K^+/Mg^{2+} (Tabla 5). Debido a que la concentración de K^+ es el factor importante para la disociación de los ribosomas y no la relación K^+/Mg^{2+} , es poco factible que el efecto del K^+ se deba a que compite con el Mg^{2+} . Probablemente, el catión K^+ promueva cambios conformacionales más fácilmente en el ribosoma mal ensamblado por ausencia de poliaminas y disminuya la afinidad por el Mg^{2+} o la cantidad de sitios específicos para el mismo, lo que comprueba un defecto en la estructura y/o conformación de los ribosomas.

Las poliaminas, fundamentalmente espermidina y espermina, asocian las partículas ribosomales en sistemas libres de células¹⁴². Sin embargo, el agregado *in vitro* de estos policationes a ribosomas obtenidos en ausencia de estas bases orgánicas no provoca cambios en el equilibrio de subunidades (Figura 14), demostrando que las poliaminas son necesarias durante la biogénesis y/o ensamblado de este componente celular.

Si los ribosomas están mal ensamblados en ausencia de poliaminas, pueden ser responsables de la deficiente síntesis proteica *in vivo*. Por lo tanto, se examinaron los polisomas en presencia o ausencia de ellas. En ausencia de las mismas se observa una menor proporción de polisomas y un aumento de la fracción que migra como 80S lo que indica que una menor cantidad de ribosomas se halla involucrada en la síntesis proteica (Figura 17). Otra anomalía evidente es la presencia de "halfmers". Estas estructuras, que representan acúmulos de subunidades 40S unidas al ARN_m , pueden originarse por defectos en la iniciación de la síntesis proteica, específicamente por incapacidad de la subunidad 60S para unirse al complejo 40S- ARN_m formando el complejo de iniciación completo¹⁴⁶, o por algún defecto en la biogénesis de la subunidad 60S¹⁴⁷. En levaduras ayunadas en poliaminas no se observa una acumulación de la fracción 60S que se produciría si esta subunidad no pudiera unirse al complejo de iniciación 40S- ARN_m ; en cambio se observa una mayor proporción de partículas que

migran en la región 40S y una ligera disminución de las que migran en la zona de 60S. La biogénesis de ambas subunidades comienza con la síntesis de un ARN_r precursor de 35S, el cual luego es procesado para generar los ARN específicos de cada subunidad (ver Introducción). Durante el ensamblado se unen varias proteínas, la mayoría ribosomales, a estos pre-ARN_r formándose las denominadas pre-RNP¹⁰⁸. El desbalance en la producción de estas dos subunidades sugiere que las poliaminas son necesarias para la biogénesis y/o ensamblado de la subunidad 60S. Diversos mecanismos podrían explicar la participación de las poliaminas en este proceso. Debido a que el ARN_r de eucariotes se encuentra metilado en bases específicas¹⁰⁹, lo que es muy importante para la maduración de los ribosomas¹⁰⁹, y como las poliaminas tienen un papel fisiológico en la metilación del ARN_r en procariotes⁵⁹, podría ser que las alteraciones descritas anteriormente se deban a una deficiencia en la metilación de esta macromolécula. Otras posibilidades no excluyentes entre sí son: a.- que las poliaminas sean necesarias en alguno de los pasos del camino biosintético de los ribosomas; b.- que formen parte estructural de la partícula ribosomal, como ha sido sugerido en *E.coli*¹⁹⁰, permitiéndoles adquirir la conformación correcta.

Se ha demostrado la participación de las poliaminas en el ensamblado y/o biogénesis de los ribosomas en procariotes. Algranati et al demostraron que en su ausencia se produce una subunidad ribosomal 30S defectuosa, lo que provoca una mayor disociación de los monosomas^{53,59}. Los primeros estudios análogos en eucariotes son los presentados en este trabajo.

Las características similares de los mecanismos de asociación en los ribosomas eucarióticos y procarióticos nos permiten pensar que dicho proceso puede ser esencialmente general. Los análisis del ARN ribosomal de *E.coli* han demostrado la presencia de secuencias complementarias entre el extremo 3' del ARN_r 16S y el extremo 5' del ARN_r 23S. La interacción de las partículas 30S y 50S para formar el monómero 70S podría verse facilitado y estabilizado por el apareamiento de los ARN_r complementarios de cada subunidad¹⁶⁰. La unión a oligonucleótidos complementarios de estas regiones o la mutagénesis dirigida en dicha región reduce significativamente el grado de asociación de las partículas ribosomales¹⁶¹. Por otra parte, se ha determinado *in vitro* la formación de un complejo entre los ARN_r eucarióticos de 16S y 5S¹⁵⁵, lo que sugiere que el apareamiento de estos ARN es importante en la formación de la partícula 80S. Se puede especular que en ausencia de poliaminas estas secuencias de ARN no adquirirían la conformación correcta, provocándose la disociación de los ribosomas.

Efecto sobre la síntesis y/o estructura de la pared celular

La pared celular es importante para la protección osmótica, forma, tamaño y crecimiento de la levadura; su estructura y composición química varían durante la esporulación, la conjugación y a lo largo del ciclo celular.

Durante la preparación de protoplastos para obtener ribosomas por un método suave, se observó que la pared de levaduras ayunadas en poliaminas es más resistente al ataque de enzimas

líticas como la zimoliasa. Otros preparados enzimáticos como la glucosidasa o la novozima 234 tampoco fueron capaces de degradar la pared de levaduras formada en ausencia de poliaminas (Tabla 6).

Esta alteración depende del contenido endógeno de poliaminas, debido a que cultivos con distinta velocidad de crecimiento por diferente grado de ayuno, tienen diferente sensibilidad al ataque de zimoliasa (Tabla 7). Por otra parte, a medida que aumenta el tiempo de ayuno se incrementa el porcentaje de células resistentes (Figura 22). Este efecto no es dependiente de la concentración de enzima utilizada ni de los tiempos de incubación (Tabla 8). Estos resultados sugieren que las poliaminas tienen algún papel fisiológico en la formación de la pared celular y que su ausencia provoca alteraciones en este componente celular. Estas alteraciones no se deben a la baja velocidad de crecimiento de los cultivos, ya que cultivando levaduras con niveles normales de poliaminas en medios pobres en nitrógeno para que crezcan más lentamente (tiempo de generación 9-12 hs.) las células son totalmente sensibles a estas enzimas.

La zimoliasa es un preparado enzimático que contiene fundamentalmente dos enzimas, una proteasa específica para las manoproteínas de la pared y una β 1-3 glucanasa¹⁴⁹. La primera, actuando sobre la capa más externa de manoproteínas, favorece la penetración de la segunda, que degrada la capa más interna de glucano provocando la lisis celular¹⁵². Cuando los cultivos de levadura entran en fase estacionaria se observa un incremento de la resistencia a la acción de estas enzimas líticas debido a cambios en la capa más externa de manoproteínas que impiden el acceso de las glucanasas a su sustrato específico¹⁴⁸. Diversos agentes que alteran la capa de manoproteínas, tales como agentes reductores (mercaptoetanol, ditiotretol), detergentes (digitonina), y sales (KCl) favorecen la penetración de la β 1-3 glucanasa e incrementan la lisis de estas células^{152,153}. La resistencia a la lisis observada en ausencia de poliaminas parece similar a la notada en fase estacionaria. Por lo tanto se emplearon diversos agentes que favorecen la penetración enzimática en cultivos estacionarios y se determinó la actividad lítica en cultivos de 179-5 con distintos tiempos de ayuno. A tiempos cortos de ayuno los agentes empleados aumentan considerablemente la actividad lítica y en algunos casos (pretratamiento con mercaptoetanol 500 mM o con digitonina 0.1 %) se llega a lisis total. En cambio a tiempos más prolongados, el efecto estimulador de la lisis es menor alcanzando un valor constante que no es modificado (Tabla 9). El comportamiento de las células ayunadas en poliaminas frente a distintos agentes que favorecen la penetración es, pues, diferente al de células en fase estacionaria ya que estas se lisan totalmente y requieren una menor concentración de estos agentes para lograr este efecto. Estos resultados sugieren que en ausencia de poliaminas las alteraciones en la pared se producirían en dos etapas; en la primera, a tiempos cortos de ayuno se modificaría la capa externa de manoproteínas, impidiendo el acceso de la β 1-3 glucanasa a la capa más interna de glucano, y posteriormente con ayunos más prolongados, se formaría una estructura que ya no es susceptible al ataque.

Estos resultados sugieren que se produciría una alteración en la composición química de la pared en ausencia de poliaminas, lo que se verificó analizando la distribución de polisacáridos radioactivos que la componen, luego de marcar las células por varias generaciones con glucosa¹⁴C. En primera instancia, se observa que en ausencia de estos polímeros se incrementa la cantidad de

cuentas totales incorporadas a este componente celular en un 57%, lo que sugiere la síntesis de una pared más gruesa, hecho comprobado también por microscopía electrónica. Además se detecta un moderado incremento en la cantidad de manoproteínas, una drástica disminución del glucano β 1-3 y un aumento del glucano β 1-6 (Tabla 10). Estos resultados nos permiten explicar la resistencia a la actividad lítica de la siguiente manera. El incremento en las manoproteínas y en el espesor de la pared, constituirían una barrera para la penetración de la zimoliasa. Superada la barrera externa mediante el agregado de diversos agentes, la enzima encuentra, fundamentalmente, glucano β 1-6 que no puede degradar, ya que el β 1-3 está muy disminuído. Este comportamiento es diferente al de las células en fase estacionaria, que no presentan mayores variaciones en la composición cuantitativa de su pared.

La marcada disminución del glucano β 1-3 podría explicarse tanto por una disminución en su síntesis como por un aumento en su degradación. Se conoce un sistema lítico de la pared celular de *S. cerevisiae* que está compuesto, principalmente, por glucanasas que degradan la pared en los sitios de crecimiento, para incorporar el material sintetizado de novo^{94,95,156,157}. Podría suceder que este sistema se active en ausencia de poliaminas. Por otra parte, la síntesis de glucano se lleva a cabo por la enzima glucano sintetasa, que es estimulada por nucleótidos⁸². Sería interesante determinar si también las poliaminas tienen un efecto estimulador sobre esta actividad enzimática.

La estructura de la pared se analizó en más detalle por microscopía electrónica (Figuras 24 y 25). La pared celular en ausencia de poliaminas es significativamente más gruesa siendo su ancho un 45% mayor, lo que concuerda con el aumento del 55% en la síntesis de este componente celular, su textura no es homogénea lo que se debe, probablemente, a su diferente composición química. También es posible observar que prácticamente no se forma la capa más interna de la pared constituida por el glucano β 1-3. Una anomalía muy evidente es la presencia de microcuerpos electrodensos dentro de la pared que podrían tener origen citoplasmático. Estas estructuras están rodeadas de una unidad de membrana trilaminar, similar a la membrana celular, podrían ser evaginaciones citoplasmáticas dentro de la pared celular. Es factible que la deficiencia de glucano β 1-3 deje espacios en la pared celular que serían ocupados por el citoplasma para mantener la estructura de la misma.

La participación de las poliaminas en la síntesis y/o estructura de la pared celular de levaduras es un hecho completamente novedoso. Hasta el momento el único antecedente conocido es la existencia de cadaverina como parte estructural de la pared de algunos cocos anaerobios¹⁴. Sin embargo las poliaminas participarían en la síntesis y/o estructura de la pared celular de levaduras de forma fundamentalmente diferente, ya que su efecto principal sería indirecto, regulando probablemente el nivel de los componentes de esta estructura.

POLIAMINAS Y DIVISION CELULAR

Morfología, Citología y Ciclo celular

La levadura *S.cerevisiae* es un organismo que debido a sus características se utiliza como modelo de estudio del ciclo celular en eucariotes. Como ya se describió anteriormente, hay un punto central para la regulación de este ciclo denominado "start" (ver Introducción), donde la célula integra las señales intra y extracelulares para controlar la entrada al ciclo mitótico, a los distintos caminos de diferenciación, tales como esporulación y conjugación o bien a fase estacionaria. Este punto se encuentra en la fase G_1 y permite la coordinación entre el crecimiento celular, que constituye la etapa limitante del ciclo celular, y los eventos discontinuos del mismo. Es necesario un tamaño crítico para que las células atraviesen este punto, puedan brotar y entrar en fase S ^{74,75}. Dicho tamaño crítico está relacionado con las condiciones nutricionales de la célula, siendo menor para medios mínimos o pobre en nutrientes⁷⁶. Se han obtenido varias mutantes termosensibles cuyos ciclos celulares se arrestan en start o cerca de este punto, lo que ha permitido identificar varios de los genes y productos que intervienen en este mecanismo de regulación. Se han definido dos clases de mutantes en base a sus fenotipos terminales¹⁶². Las mutantes clase I, como cdc 28 o cdc 36, tienen un fenotipo terminal similar a las levaduras tratadas con feromona α y continúan el crecimiento celular llegando a formar células muy grandes con una forma característica denominada "shmoo". En cambio, las mutantes clase II, como cdc 25, cdc 33, cdc 35, tiene un fenotipo terminal muy parecido al de las células que entran en fase estacionaria¹⁶².

Las células ayunadas en poliaminas se parecen bastante a las mutantes clase II. El número de células brotadas disminuye a medida que aumenta el número de divisiones celulares (Figura 20), lo que indica un arresto progresivo en fase G_1 , aumentan su volumen (Figuras 18, 19 y 23) y presentan una resistencia a la acción de enzimas líticas de la pared celular (Tabla 7). Si bien las células que entran en fase estacionaria presentan estos mismos cambios, parecen ser diferentes a las células ayunadas en poliaminas, ya que en las últimas el aumento de tamaño es mayor, y no se observan las mismas alteraciones citológicas o en la estructura de la pared celular.

La deficiencia de poliaminas provoca alteraciones en algunos procesos metabólicos no relacionados con los mecanismos de control del ciclo celular, que podrían explicar el arresto en fase G_1 . Se sabe que el transporte de diversos nutrientes esenciales, como aminoácidos, se encuentra disminuído en ausencia de poliaminas³³, pero el arresto en fase G_1 no sería provocado por una deficiencia de nutrientes, ya que las células aumentan de tamaño, en lugar de disminuirlo.

La maquinaria de síntesis de proteínas está alterada en ausencia de poliaminas. Se han aislado mutantes de levaduras que tienen afectada la iniciación de la síntesis proteica, que se arrestan cerca del punto start a la temperatura no permisiva, pero su comportamiento es distinto a las células ayunadas en poliaminas ya que han sido clasificadas como mutantes clase I¹⁶³. Por otra parte, la

síntesis de ARN estable también es necesaria para atravesar este punto¹⁶⁴. En ausencia de poliaminas se encuentra disminuída la síntesis de ambas macromoléculas, lo que podría ser la razón del arresto de estas células en fase G₁. Sin embargo, no parece haber un aumento de tamaño cuando se afecta la síntesis de ARN o proteínas.

Recientemente se ha descrito un mecanismo que regularía positivamente el crecimiento celular y negativamente los caminos de diferenciación como esporulación o entrada en fase estacionaria, mediante la activación de proteínas quinasas dependientes de AMP_c¹⁶⁵. Todas las mutantes que inactivan este mecanismo disminuyendo los niveles de AMP_c, como *cde 25*, *cde 35*, *ras 1*, *ras 2*, arrestan el crecimiento celular dando un fenotipo similar al obtenido por ayuno de nutrientes. Si la inactivación es parcial se produce un fenotipo que se caracteriza por alta resistencia a heat-shock, hiperacumulación de glucógeno e incapacidad para crecer en azúcares no fermentables. Varios de estos genes, *cde 25*, *ras 1*, *ras 2*, también están involucrados en la regulación de tamaño de las células en el punto start, probablemente a través de un mecanismo en el que intervenga el AMP_c¹⁶⁶.

El fenotipo que presentan las células ayunadas en poliaminas es bastante similar al observado en la mutante *cde 25*¹⁶⁷, hay un aumento del tamaño celular (Figuras 18, 19 y 23), resistencia parcial a enzimas líticas de la pared celular (Tabla 6) y arresto en fase G₁. Esto sugiere que las poliaminas podrían estar involucradas en este mecanismo, modulando en alguna forma la cascada de reacciones que activan las proteín-quinasas dependientes de AMP_c.

La función codificada por el gen *CDC 25* está involucrada en la regulación del producto del gen *CDC 28*, responsable del pasaje a través del punto start¹⁶⁸. Este gen ha sido aislado y clonado en *S.cerevisiae*, *S.pombe*, humanos^{184,185} (en los últimos organismos se denomina *CDC 2*), su producto es una proteína fosforilada en residuos tirosina, tiene actividad de proteína quinasa y tiene un papel sumamente importante durante la mitosis¹⁸⁶. En *S.pombe* la función codificada por este gen es necesaria tanto en fase G₁ como en fase G₂ antes de entrar en mitosis¹⁸⁶. En cambio, en *S.cerevisiae* solo es requerido en fase G₁ en el punto start, lo que refleja probablemente la naturaleza inusual de la mitosis en esta levadura donde los eventos específicos de esta fase comienzan en el punto start a diferencia de otros eucariotes. Si la falta de poliaminas afecta el sistema de fosforilación de proteínas dependientes de AMP_c, sería esperable observar alteraciones en la mitosis. Se observaron en nuestro caso los núcleos por tinción con un colorante fluorescente (DAPI) y por microscopía electrónica. En estas condiciones el núcleo es anormal, segmentado y multilobulado. También se encontraron algunas células que llevaban a cabo la mitosis fuera de su lugar normal (Figura 21). Un fenotipo similar se ha descrito en otros organismos eucarióticos que tienen alteraciones en la mitosis, por ejemplo en algunas células tratadas con inhibidores de la formación de microtúbulos como nocodazol o colcemida¹⁶⁹. Sin embargo, también se observan anomalías en el núcleo, similares a las descritas, en células de fibroblastos humanos microinyectadas con anticuerpos contra el producto del gen *SUC 1*, una proteína de 13 KD que normalmente se encuentra en un complejo macromolecular con el producto del gen *CDC 2*¹⁶⁹. La fosforilación y defosforilación de distintas proteínas constituye una señal sumamente importante para regular los distintos eventos de la mitosis¹⁷⁰. Se ha comprobado que las

poliaminas están relacionadas con la fosforilación de proteínas nucleares en eucariotes; por lo tanto estas bases orgánicas podrían tener un papel fisiológico en la regulación de este mecanismo, controlando de esta manera la proliferación celular.

Por otra parte, una fracción de las células ayunadas en poliaminas (10-20 %) son multibrotadas, y en algunos casos, las brotaciones se encuentran en sitios anormales (Figuras 18, 24 y 25). Un evento muy importante que está relacionado con el control de la brotación es la duplicación y la separación del centríolo⁷¹. La mutante *cdc 4* que puede duplicar esta estructura pero no separarla, tiene un fenotipo terminal compuesto por células multibrotadas¹⁷¹, lo que sugiere que las poliaminas tendrían alguna participación en la formación y separación del centríolo. Por otra parte, esta estructura que se encuentra en la envoltura nuclear organiza el sistema de microtúbulos y filamentos celulares, tanto nucleares como citoplasmáticos, y del mismo emanan estos filamentos hacia el interior del núcleo y hacia el sitio de brotación. Este último sería responsable de la síntesis localizada de la pared ya que los polímeros de actina se encuentran ubicados en la porción más distal del brote celular, donde se incorpora la nueva pared, y los polímeros de tubulina (microtúbulos) se dirigen hacia esta región¹⁷². Durante el ayuno de poliaminas es posible observar células madres muy grandes con brotes muy pequeños, además, si bien la síntesis de la pared continúa, no se observan los brotes alargados característicos de los fenotipos terminales de algunas mutantes *cdc*⁷⁰; por lo tanto la síntesis de la pared se encuentra deslocalizada. En ausencia de poliaminas en algunos casos se observan brotes en lugares anormales. La cepa *cdc 24* que tiene defectos en la localización de la brotación tiene alterado el sistema de filamentos de actina¹⁷². En eucariotes superiores, las poliaminas estimulan la polimerización de actina *in vitro* y están involucrados en la integridad de los filamentos de la misma durante la mitosis⁶⁸, por lo tanto estos polímeros pueden ser necesarios para la formación del citoesqueleto normal en levaduras y su ausencia provocaría alteraciones en la separación del centríolo y una síntesis deslocalizada de la pared. La falta de integridad de los filamentos de actina y/o de los microtúbulos podría ser también la causa de las alteraciones observadas en la mitosis.

Como ya se describió anteriormente, luego de la citocinesis se forma el septo primario constituido por quitina, y luego sobre esta estructura se depositan glucanos y mananos para formar el septo secundario. En ausencia de poliaminas no se forma correctamente el septo primario y se observa una deposición de estructuras muy heterogéneas a su alrededor (Figura 25). Las poliaminas también participan en la septación en *E.coli* ya que se ha descrito que mutantes auxótrofos para estos polímeros son incapaces de generar esta estructura, produciéndose formas alargadas denominadas "snakes"⁴⁷, lo que sugiere que las poliaminas podrían tener un papel en la septación bastante conservado a través de la evolución.

CONCLUSIONES

Hasta el momento se había demostrado la participación de las poliaminas en levaduras en distintos procesos fisiológicos como el crecimiento celular^{32,33,116}, el mantenimiento del plásmido "killer"¹¹⁸, la esporulación³² y el transporte de colina³³. Los estudios presentados en este trabajo demuestran nuevas funciones para estas poliaminas que nos permiten comprender su participación en la proliferación celular.

1.-Son importantes para la síntesis de macromoléculas y tienen un papel fisiológico en el ensamblado y/o biogénesis del ribosoma. La estructura de este componente celular se encuentra bastante conservada a través de la evolución lo que nos permitiría suponer que las poliaminas participan en dicho proceso en todos los organismos eucarióticos. Por otra parte estas poliaminas participan en el mismo proceso en procariotes⁵³ lo que implica que esta función ha sido conservada a través de toda la evolución y las poliaminas serían importantes para la biogénesis y/o ensamblado de los ribosomas en todos los seres vivos.

2.-La síntesis de la pared es importante para el crecimiento celular de levaduras. Hasta el momento no se había descrito la participación de las poliaminas en la síntesis y/o estructura de la pared de ningún organismo, salvo como parte estructural de la misma en algunas especies de coccas¹⁴. Sería interesante comprobar si las poliaminas cumplen el mismo papel en otros organismos tanto procarióticos como eucarióticos ya que debido a que la pared celular es un sitio de acción preferencial de antibióticos y antifúngicos permitiría el diseño de nuevos compuestos químicos con dicha acción.

3.-El contenido endógeno de poliaminas, como el de sus enzimas biosintéticas, sufre variaciones a lo largo del ciclo celular, con un pico marcado en fase G₁²⁷. Hasta el momento se interpretó que este incremento preparaba a las células para entrar en fase S. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que las poliaminas son necesarias para el cumplimiento de eventos específicos en fase G₁, como la septación, la regulación del tamaño celular, la localización y aparición del brote celular, etc.. La participación de las poliaminas en eventos específicos de la fase G₁ del ciclo celular no había sido descrita y aporta una nueva perspectiva en la comprensión de la función de estas poliaminas en el control del ciclo celular.

Diversos metabolitos celulares pueden tener más de una función en los seres vivos, por ejemplo el K⁺ es importante para la síntesis de purinas, pirimidinas y proteínas y además participa en el balance osmótico de la célula. Algo semejante ocurriría con las poliaminas que cumplen más de un papel fisiológico en los seres vivos. Estas poliaminas tendrían dos tipos de funciones: una estructural como demuestran los estudios sobre el ensamblado y/o biogénesis de los ribosomas, la síntesis y/o estructura de la pared celular, la conformación del ADN¹⁸⁷, etc. y otra regulatoria como se deduce de su participación en el control del ciclo celular, la iniciación de la síntesis proteica en eucariotes¹⁸⁸, en el control estricto de la síntesis de ARN⁴⁹, etc.. Estas moléculas, debido a la flexibilidad de su estructura química, pueden interactuar con varios componentes celulares; por otra parte su síntesis

se encuentra estrictamente regulada por la célula; lo que sugiere que estos compuestos serían sumamente importantes en la coordinación de distintos procesos fisiológicos durante la proliferación celular.

Sara Goldemberg

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and vertical strokes, possibly representing the initials 'S.G.' or a similar monogram.

REFERENCIAS

- 1.-Cohen Seymour S., Introduction to the Polyamines, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1971.
- 2.-Bachrach U., Function of Naturally Occurring Polyamines, Academic Press Inc., 1973.
- 3.-Bachrach U., Function of Naturally Occurring Polyamines, Academic Press Inc., 1973, p.16.
- 4.-Tabor C.W. y Tabor H., (1976), Ann.Rev.of Biochem. 45: 285
- 5.-Bachrach U., Function of Naturally Occurring Polyamines, Academic Press Inc., 1973, p.29-35.
- 6.-Tabor C.W. y Dobbs L.G., (1967), J.Biol.Chem. 245:2086 .
- 7.-Umezawa H., Advances in Polyamine Research, Vol. 4, (U. Bachrach, A. Kaye y R. Chayen, eds.) 1983, pp. 1
- 8.-Vázquez D. (1979), Inhibitors of Protein Synthesis. (Springer - Verlaq - Berlin - Heidelberg - New York p31.
- 9.-Neilands J.B., (1983), Methods in Enzymol. 94: 437.
- 10.-Cooper H.L., Park M.H. y Folk, (1982), Cell 29: 791.
- 11.-Kropinski A.M.B., Bose J. y Warren R.A.J., (1973), Biochemistry 12: 151
- 12.-Dion A.S. y Cohen S.S., (1972), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69:213.
- 13.-Paulus T.J., Kiyono P. y Davis R.H., J.Bacteriol. 152: 291
- 14.-Kamio Y., Itoh Y., Terawaki Y. y Kusano T., (1981), J.Bacteriol. 145:222
- 15.-Kullnig R., Rosano C.L. y Hurwitz., (1970),Biochem.Biophys.Res. Commun. 39: 1145
- 16.-Rosano C.L., Bunce S.C. y Hurwitz C., (1983), J.Bacteriol. 153: 326.
- 17.-Oshima T., en: Advances in Polyamine Research, vol. 4 (U. Bachrach, A. Kaye y R. Chayen, eds.), Raven Press, New York, (1983)
- 18.-Frydman, B.; Frydman, R.; de los Santos, C.; Alonso, D.;Goldemberg, S.H. y Algranati, I.D. , (1984),Biochem. Biophys. Acta 805:337. .
- 19.-Paulus T.J., Cramer C.L. y Davis R.H., (1983), J.Biol.Chem. 258: 8608.
- 20.-Paulus T.J. y Davis R.H., (1982), Biochem.Biophys.Res.Commun. 104: 228
- 21.-Fonzi, A.W. y Sypherd, P., (1985), Mol.Cell.Biol. 5:161.
- 22.-Mc Conlogue L.; Gupta M., Wu L. y Coffino P., (1984), Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 81:540.
- 23.-Phillips M.A., Coffino P. y Wang C., (1987), J.Biol.Chem. 262:8721.
- 24.-Tabor C.W. y Tabor H., (1966), J.Biol.Chem. 241: 3714.
- 25.-Pegg A., (1988), Cancer Res. 48: 759-765
- 26.-Tabor C.W. y Tabor H., (1984), Ann.Rev.Biochem. 53: 749.
- 27.-Heby O., (1981), Differentiation 19: 1
- 28.-Miret J.J., Nainudel S. y Goldemberg S.H., (1986), FEBS Lett. 200: 117
- 29.-Metcalf B.W., Bey P., Danzin C., Jung M.J., Casara P. y Vevert J.P., (1978), J.Am.Chem.Soc. 100: 2251.

- 30.-Williams Ashman H.G, Schenone A., (1972) *Biochem.Biophys. Res.Comm* 46: 288
- 31.-Hibasami H, Tanaka M., Nagai J. y Ikeda T.,(1980), *FEBS Lett.* 116:99. .
- 32.-Cohn M.S., Tabor C.W. y Tabor H.,(1980), *J.Bacteriol* 142:791.
- 33.-Hosaka K. y Yamashita S., (1981) *Eur.J.Biochem.*, 116: 1.
- 34.-Sneath P.H.A., (1955),*Nature* 175: 818.
- 35.-Hafner E.W.,Tabor C.W. y Tabor H., (1979), *J.Biol.Chem.* 254: 12419.
- 36.-Morris D.R. y Jorstad C.M., (1970), *J.Bacteriol* 101: 731.
- 37.-Hirshfield I.N., Rosenfeld H.J., Leifer Z. y Maas W.K., (1970), *J.Bacteriol* 101: 725.
- 38.-Herbst, E.J. y Snell E.E., (1948), *J.Biol.Chem.* 176: 989.
- 39.-Heby O., Marton L.J., Zardi L., Russell D.H., Baserga R. *Exp.Cell.Res.*, (1975), 90: 8.
- 40.-Krokan H., Eriksen A. (1977), *Eur. J. Biochem*, 72:501.
- 41.-Geiger L.E., Morris D.R., (1978), *Nature* 272: 730.
- 42.-Cohen Seymour S., *Introduction to the Polyamines*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1971, p.
- 43.-Widom J., Baldwin R.L., (1980), *J.Mol.Biol.* 144: 431
- 44.-Feuerstein, B.; Nagarajan, P. y Marton, J.C., (1986), *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 83:5948.
- 45.-Henningsson S., Persson L., Rosengren E., (1978), *Acta Physiol Scand.* 102: 385.
- 46.-Caldarera C.M., Casti A., Guarnieri C., Moruzzi G.,(1975), *Biochem J.* 152:91.
- 47.-Young D.V. y Srinivasan P.R.,(1972), *J.Bacteriol* 112: 30
- 48.-Mitsui K., Ohnishi R., Hirose K. e Igarashi K., (1984), *Biochem.Biophys.Res.Comm* 123: 528.
- 49.-Goldemberg S.H., (1984), *Biochem J.* 219: 205.
- 50.-Karpetsky T.P., Hieter P.A., Frank J.J., Levy C.C., (1977), *Moll.Cell.Biochem.* 17:89.
- 51.-Cohen S.S., (1978), *Advances in Poliamine Research*; eds Campbell R., Morris D., Bartos D., Doyle Daves G. y Bartos F. ; Raven Press, New York 10036 ;Vol. 1 p1.
- 52.-Mc. Mahon M.E., Erdmann V.A., (1982), *Biochemistry* 21:5280.
- 53.-Algranati I.D., Goldemberg S.H., (1977), *TIBS* 2:272.
- 54.-Echandi G. y Algranati I.D., (1975), *Biochem.Biophys.Res.Comm* 67: 1185.
- 55.-Goldemberg S.H. y Algranati I.D., (1981), *Eur.J.Biochem.* 117: 251.
- 56.-Algranati, I.D. y Goldemberg, S.H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*103:8.
- 57.-Goldemberg S.H., Fernandez-Velazco J.G. y Algranati I.D., (1982), *FEBS Lett* 142: 275.
- 58.-Echandi G.y Algranati I.D., (1975), *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 62: 313.
- 59.-Igarashi, K.K., Kashiwagi K., Watanabe Y., Kogo A y Hirose S., (1979), *Eur.J.Biochem.* 93:345.
- 60.-Tabor H., Tabor C.W.,Cohn M.S. y Hafner E.W., (1981), *J.Bacteriol.* 147: 702.
- 61.-Algranati I.D. y Lengyel P., (1966), *J.Biol.Chem.* 241:1778.
- 62.-Cohen S.S., (1970), *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 171: 869.
- 63.-Garcia-Patrone M., Gonzalez N.S. y Algranati I.D., (1975), *Biochem.Biophys. Acta* 395: 373.
- 64.-Changchien L. y Aronson J.N., (1970), *J. Bacteriol.* 103: 734
- 65.-Abraham A.K., Olsnes S. y Phil A., (1979), *FEBS Lett.* 101:93

- 66.-Igarashi K., Sugawar K., Izumi I., Nagayama C. y Hirose S., (1974), *Eur.J.Biochem.* 48:495.
- 67.-Mc Murry L.M. y Algranati I.D., (1986), *Eur.J.Biochem.* 155:83
- 68.-Sunkara P.S., Rao P.N., Nishioka K., Brinkley B.R., (1979) *Exp.Ccl.Res.* 119: 63
- 69.-Oriol-Audit C., (1978), *Eur.J.Biochem* 87: 371
- 70.-Hartwell L.H., (1974), *Bacteriol Rev.* 38: 164
- 71.-Pringle J.R., Hartwell L.H., (1982). The *S.cerevisiae* cell cycle. In J.N. Strathern, Jones, E. W. y Broach, J.R.(ed.). *The Molecular Biology of the Yeast S. cerevisiae* Vol.2 p97.
- 72.-Navon G., Shulman R.G., Yamane T., Eccleshall T.R., Lam B., Barohotsky J.J. y Marmur J., (1979), *Biochemistry* 18:4487
- 73.-Watson T.G., (1970), *J.Gen.Microbiol* 64: 91
- 74.-Johnston G.C., Pringle J.R. y Hartwell L.H., (1977), *Exp.Cell.Res.* 105: 79
- 75.-Hartwell L.H. y Unger M.W., (1977), *J.Cell.Biol* 75: 422
- 76.-Lord P.G. y Wheals A.E., (1980), *J.Bacteriol* 142: 808
- 77.-Ballou C.E., (1976), *Adv.Microb.Physiol.* 14: 93
- 78.-Bacon J.S.D., Farmer V.C., Jones D., Taylor I.F., (1969),*Biochem.J.* 114: 557
- 79.-Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C., Bjorndal H.,Lindberg B., (1973), *Biochem.J.* 135: 31
- 80.-Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C., (1973),*Biochem.J.* 135: 19
- 81.-Fleet, G.H., Manners D.J., (1976), *J.Gen.Microbiol* 94: 180
- 82.-Shematek E.M., Cabib E., (1980), *J.Biol.Chem.* 255: 895
- 83.-Ruiz-Herrera J., Bartnicki-Garcia S., (1974), *Science* 186:357
- 84.-Minke .R., Blackwell J., (1978), *J.Mol.Biol.* 120:167
- 85.-Cabib E. y Roberts R., (1982), *Ann.Rev.Biochem* 51:763
- 86.-Cabib E., y Farkas V., (1971), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 68:2052
- 87.-Orlean, P.(1987). *J.Biol.Chem.* 262:5732.
- 88.-Bulawa, C.E.; Slater, M.; Cabib, E.; Au-young, J.; Sburlati, A.; Adair, W.Jr. y Robbins, P.W.(1986). *Cell* 46:213
- 89.-Silverman, S.; Sburlati, A.; Slater, M. y Cabib, E.(1988). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 85:4735.
- 90.-Biely P., Kovarek J., Bauer S.,(1973), *Arch.Mikrobiol.*94:365
- 91.-Johnson B.F., Gibson E.J., (1966), *Exp.Cell.Res.* 41:580
- 92.-Tkacz J.S., Lampen J.O., (1972), *J.Gen.Microbiol* 72:243
- 93.-Farkas V., Kovarik J., Kosinova A., Bauer S., (1974),*J.Bacteriol* 117: 265
- 94.-Johnson B.F., (1968), *J.Bacteriol* 95:1169
- 95.-Abd-El-Al A.T.F. y Phaff H.J., (1968), *Biochem.J.* 109:347
- 96.-Marchandt R., Smith D.G., (1968), *J.Gen.Microbiol* 19:23
- 97.-Cabib E. y Bower B., (1975), *J.Bacteriol* 124:1586
- 98.-Hartwell L.H., Culotti J., Pringle J., Reid B., (1974), *Science* 183:46
- 99.-Hartwell L.H., (1971), *Exp.Cell.Res.* 69:265.
- 100.-Bowers B., Levin G. y Cabib E., (1974), *J.Bacteriol.* 119:564.

- 101.-Byers B., Goetsch L., (1975), *J.Bacteriol.* 124:511
- 102.-Hereford L.M., Hartwell L.H., (1974), *J.Mol.Biol.* 84:445
- 103.-Streiblova E., (1970), *Can.J.Microbiol.* 16:827
- 104.-Thompson P.W., Wheals A.E., (1981), *J.Gen.Microbiol.* 121:401
- 105.-Sloat B.F., Adams A., Pringle J.R., (1981), *J.Cell.Biol.* 89: 395
- 106.-Spirin, A.S. y Lishneukaya, E (1971). *FEBS Letters* 14:114.
- 107.-Warner J.R., (1982), *The Yeast Ribosome: Structure, Function and Synthesis*; In Strathern J.N., Jones, E.W. y Broach, J.R. *The Molecular Biology of the Yeast S.cerevisiae Vol.2.*
- 108.-Trapman J., Retel J. y Planta R.J., (1975), *Exp.Cell.Res.* 90:95
- 109.-Russell P.J. y Wilkerson W., (1980), *Experimental Mycology* 4:281
- 110.-Tabor C.W. y Tabor H., (1985), *Microbiol.Rev.* 49:81.
- 111.-Tyagi A.K., Tabor C.W. y Tabor H.,(1981) *J.Biol.Chem.* 256:12156
- 112.-Poso H. y Pegg A., (1983), *Biochem.Biophys.Acta* 747:209
- 113.-Fonzi W., (1989), *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 162:1409.
- 114.-Cohn M.S., Tabor C.W. y Tabor H., (1978), *J.Bacteriol* 134:208
- 115.-Cohn M.S., Tabor C.W. y Tabor H., (1979), In. E.Usdin, R.T. Borchardt y C.R. Creveling (ed), *Transmethylation Elsevier North-Holland New York*, p91.(obtenida de Tabor C.W. y Tabor H., (1985), *Microbiol.Rev.* 49:81)
- 116.-Whitney P.A. y Morris D.R., (1978), *J.Bacteriol* 134:214
- 117.-Cohn M.S., Tabor C.W. y Tabor H.,(1978), *J.Biol.Chem.* 252:8212
- 118.-Tyagi A.K., Wickner R.B., Tabor C.W. y Tabor H., (1984), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81: 1149
- 119.-Wickerham, L. (1946). *J.Bacteriol.* 52:293.
- 120.-Kitamura K., Kaneko T. y Yamamoto Y., (1974), *J.Gen.Appl.Microbiol.* 20: 323
- 121.-Raina, A. (1962). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 14:318 (obtenida de Cohen Seymour S., *Introduction to the Polyamines*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1971).
- 122.-Dion A.S. y Herbst E.J., (1970), *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 171:723
- 123.-Seiler, N. y Wicemann, M. (1970). *Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods* (Niederwieser, A. y Pataki, G., eds.) vol.1.
- 124.-Seiler N., (1983), *Methods in Enzímol* 94:12
- 125.-Hartwell L.H., (1967), *J.Bacteriol.* 93:1662
- 126.-Kitamura K., Kaneko T. y Yamamoto Y., (1972), *J.Chem.Appl.Microbiol.* 18:57
- 127.-Hutchinson, H.T. y Hartewll, L.H. (1967). *J. Bacteriol.* 94:1697.
- 128.-Carter C.J., Cannon M. y Jimenez A.,(1980), *Eur.J.Biochem.* 107: 173
- 129.-van der Zeijst, B.; Kool, A. y Bloemers, H.(1972). *Eur. J. Biochem.* 30:15.
- 130.-Garcia-Patrone M. y Algranati I.D., (1976), *Mol.Biol.Rep.* 2:507
- 131.-Baim S, Pietras D., Eustice, D y Sherman F., (1985), *Mol.Cell.Biol.* 5:1839.
- 132.-Hartwell. H.L. (1970). *J. Bacteriol.* 104:1280.

- 133.-Willianson, D.H. y Fennell, J.D. (1975). *Methods in cell biology*. Vol XII. Academic Press, N. York. pp 335.
- 134.-Glanert A.M.,(1975), North Holland/ American Elsevier Amsterdam p47
- 135.-Roberts R.L., Bowers B. Slater M.L. y Cabib E., (1983), *Moll.Cell.Biol.* 3:922
- 136.-Roncero C., Valdivieso M.H., Ribas J.C.y Durán A.,(1988). *J.Bacterial* 170:1950
- 137.-Parodi, A.J., Behrens N.H., Leloir L.F. y Carminatti H, (1972), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 69:32
- 138.-Trevelyan, W.E.; Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1952). *Nature (Lond.)* 179:800
- 139.-Algranati I.D., Echandi G., García-Patrone M., Gonzalez N.S. y Goldemberg S.H., (1976), *Arch.Biol.Med.Exper.* 10:49.
- 140.-Weissbach, H. y Ochoa, S. (1976). *Annu. Rev. Biochem.* 45:191.
- 141.-Zitomer, R.S. y Flaks, J.G. (1972). *J. Mol. Biol.* 71:263.
- 142.-Sperrazza, J.; Moore, M.H. y Spremulli, L. (1981). *Biochemistry* 20:5073.
- 143.-Sperrazza, J; Russell, D.W. y Spremulli, L. (1980). *Biochemistry* 19:1053.
- 144.-Ghyssen, A.; Bollen, A. y Herzog, A. (1970). *Eur. J. Biochem.* 13:132.
- 145.-Infante, A. y Baierlein, R. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:1780.
- 146.-Helser, T.; Baan, R y Dahlberg, A.(1981). *Mol.Cell.Biol.* 1:151.
- 147.-Rotenberg, M.; Moritz, M y Woolford, J.Jr.(1988). *Genes and Development* 2:160.
- 148.-Ballou, C.E. (1982). Yeast cell wall and cell surface. pp 335 In J.N. Strathern; E.W. Jones and J.R. Broach (ed). *The Molecular Biology of the Yeast *S.cerevisiae**, vol 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 149.-Kitamura K., (1982). *Agric.Biol.Chem.* 46:963.
- 150.-Holden, M. y Tracey, M.W.(1950). *Biochem.J.* 47:407.
- 151.-Crowe, H.M., Levitz, S.M. y Sugar, A.M.(1987). *Exper.Mycol.* 11:159
- 152.-Zlotnik, H.; M.P. Fernandez; B. Bowers y E. Cabib. (1984). *J. Bacteriol.* 159:1018.
- 153.-Kitamura, K. y Y. Yamamoto. (1981). *Agric. Biol. Chem.* 45:1766.
- 154.-Hapke, B. y Noll, H.(1976). *J.Mol.Biol.* 105:109.
- 155.-Oakden K.M., Azad, A. y Lane, B., (1977), *Can.J.Biochem.* 55:99.
- 156.-Fleet G. y Phaff H., (1974), *J.Biol.Chem.* 249:1717.
- 157.-Matile P., Cortat M., Wiemken A. y Frey-Wyssling A., (1971), *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 68:636.
- 158.-Wishnia, A. y Boussert, A.S. (1977). *J.Mol.Biol.* 116:577
- 159.-Grunberg-Manago, M. (1979). *Ribosome Structure, Function and Genetics* (Chambliss, G.; Craven, G.; Davies, J.; Kahan, L. y Nomura, M.; eds.) p447, University Park Press, Baltimore, MD.
- 160.-Dahlberg, A.E.(1989). *Cell* 57:527.
- 161.-Tapprich, W. y Hill, W.(1986). *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 83:556.
- 162.-Reed, S.(1980). *Genetics* 95:561.
- 163.-Hanic-Joyce, P.; Johnston, G. y Singer, R.(1987). *Exp.Cell.Res.* 172:134.
- 164.-Johnston, G.C. y Singer, R.A.(1978). *Cell* 14:951.
- 165.-Matsumoto, K.; Uno, I. y Ishikawa, T.(1985). *Yeast* 1:15.

- 166.-Baroni, M.; Martegani, E.; Monti, P. y Alberghina, L.(1989). *Mol.Cell.Biol.* 9:2715.
- 167.-Martegani, E.; Vonomi, M. y Baroni, M.(1984). *Eur.J.Biochem.* 144:205.
- 168.-Russel, P. y Nurse, P. (1986) *Cell* 45:145.
- 169.-Riabowol, K.; Draetta, G.; Brizuela, L.; Vandre, D. y Beach, D.(1989). *Cell* 57:393.
- 170.-Cyert, M. y Thorner, J. (1989). *Cell* 57:89.
- 171.-Hartwell, L.H.; Mortimer, R.K.; Culotti, J. y Culotti M.(1973). *Genetics* 74:267
- 172.-Adams, A. y Pringle, J (1984). *J.Cell.Biol.* 98:934.
- 173.-Algranati I.D., Behrens N, Carminatti H. y Cabib E., (1966), *Methods Enzymol*, 8:411
- 174.-Baierlein, R. y Infante, A.A.(1974). *Methods in Enzymol.* Vol 30:328.
- 175.-Cabib, E.; Sburlati, A.; Bowers, B. y Silverman, S. (1989). *J.Cell.Biol.* 108:1665.
- 177.-Keller F.A., Cabib E., (1971), *J.Biol.Chem* 246:160
- 178.-Kozak, M. (1983). *Microbiol. Rev.* 47:1.
- 179.-Mc Murrough I., Flores-Carreón A. y Bartnicki-Garcia S., (1971), *J. Biol Chem*, 246:3999
- 180.-Kay D., Singer R. y Johnston G., (1980), *J.Bacteriol.* 141:1041
- 184.-Beach D., Durkacz B. y Nurse P., (1982), *Nature* 300:706.
- 185.-Lee M. y Nurse P., (1987), *Nature* 327:31.
- 186.-Lee M. y Nurse P., (1988), *Trends in Genetics* 4:287.
- 187.-Feuerstein B. y Marton L.J., *The Physiology of Polyamines*; Bachrach U. y Heimer Y. eds; C.R.C. press, Inc.; Boca Ratón, Florida. Vol 1 p.109, (1988).
- 188.-Barbiroli B., Mezatti G. y Moruzzi A., *The Physiology of Polyamines*; Bachrach U. y Heimer Y. eds; C.R.C. press, Inc.; Boca Ratón, Florida. Vol 1 p.125, (1988).
- 189.-Karrer E., Bose R.J. y Warren R.A.J., (1973), *J.Bacteriol.* 114: 1365.
- 190.-Cohen Seymour S., *Introduction to the Polyamines*, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1971, p.68.