



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"IZTACALA"

"OBTENCION DE ARN MENSAJERO DE BAJO PESO  
MOLECULAR, TRADUCCIONALMENTE ACTIVO,  
DE LA LEVADURA Saccharomyces cerevisiae".

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
LEONOR HUERTA HERNANDEZ

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, I.P.N., bajo la dirección del Dr. Samuel Zinker Ruzal.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Samuel Zinker Ruzal por su continua asesoría y apoyo durante la elaboración de esta tesis.

Asimismo, agradezco al Sr. Catarino Villanda por la elaboración de los dibujos.

## INDICE

|   | pag. |
|---|------|
| RESUMEN.....  | 1    |
| I. INTRODUCCION.....  | 3    |
| A) El ribosoma.....   | 4    |
| B) Síntesis de ribosomas.....   | 6    |
| C) Proteínas ribosomales.....   | 7    |
| D) Características de la asociación de las proteínas<br>ribosomales al ARN ribosomal..... | 9    |
| E) Proteínas ribosomales fosforiladas.....  | 10   |
| II. ANTECEDENTES.....   | 15   |
| III. OBJETIVOS.....   | 19   |
| IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....  | 20   |
| V. MATERIAL Y METODOS.....  | 22   |
| A) Microorganismos.....   | 22   |
| B) Medios de cultivo.....   | 22   |
| C) Condiciones de crecimiento.....  | 24   |
| D) Preparación de esferoplastos.....  | 24   |
| E) Extracción de ARN total.....   | 25   |
| F) Extracción de ARN pequeño.....   | 26   |
| G) Electroforesis en geles de poliacrilamida.....   | 27   |
| H) Cuantificación de la radioactividad en cultivos...                                     | 29   |
| I) Cuantificación de secuencias poliadenílicas.....                                       | 30   |
| J) Cromatografía en columnas de celulosa-oligo-dT....                                     | 31   |
| K) Traducción "in vitro".....   | 32   |
| L) Geles de electroenfoque.....   | 34   |

|  |    |
|--|----|
| VI. RESULTADOS.....  | 36 |
| A) Manejo del ARN ribosomal.....   | 36 |
| 1. Incorporación de adenina en células completas<br>y esferoplastos.....                           | 36 |
| 2. Patrón electroforético y maduración del ARN<br>ribosomal a 23°C.....                            | 39 |
| 3. Cinética de incorporación de adenina- <sup>3</sup> H a esfe-<br>roplastos de la cepa ts368..... | 49 |
| 4. Maduración del ARN ribosomal en la cepa ts368 a<br>36°C.....                                    | 54 |
| B) ENRIQUECIMIENTO PARA ARN PEQUEÑO A PARTIR DE CELU-<br>LAS INTEGRAS.....                         | 61 |
| 1. Determinación de secuencias poliadeniladas.....   | 61 |
| 2. Separación del ARN mensajero en columnas de ce-<br>lulosa-oligo-dT.....                         | 63 |
| 3. Traducción "in vitro".....  | 79 |
| VII. DISCUSION.....  | 83 |
| VIII. CONCLUSIONES.....  | 88 |
| REFERENCIAS.....   | 89 |

## RESUMEN

La cepa mutante ts368 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, crecida en condiciones restrictivas, manifiesta inhibición de la síntesis de la mayor parte de las proteínas ribosomales exceptuando 3 proteínas fosforiladas, entre las cuales se encuentra el complejo de L36/L37, proteínas ácidas de bajo peso molecular de la subunidad 60S del ribosoma. La obtención de una fracción enriquecida de ARN mensajero de éstas proteínas, posibilita la aplicación posterior de la tecnología del ADN recombinante, para un acercamiento más directo a los mecanismos de su función, síntesis y regulación.

En el presente trabajo se muestran las características de la cepa ts368 en relación a la producción de ARN ribosomal en condiciones restrictivas, ya que es bien conocida la estrecha relación entre la síntesis de proteínas ribosomales y la síntesis de ARN ribosomal. Hemos confirmado que, tal como se había mostrado en trabajos anteriores, las especies precursoras 35S, 27S y 20S, subsisten en el citoplasma sin llegar a formar las especies maduras 25S y 18S del ribosoma de *S. cerevisiae*.

Para este estudio, hemos utilizado la mutante ts368 para mostrar que, mediante un procedimiento sencillo de permeabilización de la pared celular con una mezcla de fenol-cloroformo a 45°C, técnica usada hasta el presente para extraer ARN ribosomal pequeño y de transferencia a partir de células

Integras, es posible extraer también una fracción de ARN mensajero de bajo peso molecular en el cual es altamente probable encontrar el ARN mensajero de las proteínas ribosomales ácidas L36/L37.

La unión de fragmentos de ARN a secuencias de oligodeoxitimina, demuestra la presencia de secuencias poliadeniladas en el ARN pequeño extraído de células completas por el procedimiento mencionado. Estas secuencias constituyen el 4% del total del ARN obtenido, medido como material resistente a las nucleasas A y T1. La cromatografía de afinidad en columnas de celulosa-oligodeoxitimina, produjo un enriquecimiento de 3.5 veces la cantidad de éste ARN mensajero. La utilidad como templado para la síntesis de proteínas, probada en un sistema "in vitro", demostró la integridad funcional del ARN poli-A<sup>+</sup>.

La extracción del ARN pequeño de levaduras completas de la cepa ts368 crecida a 37°C y la separación del ARN mensajero por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa-oligodeoxitimina, ofrece la posibilidad de obtener, en dos pasos metodológicos, una fracción enriquecida para ARN mensajero de las proteínas fosforiladas ácidas del ribosoma.

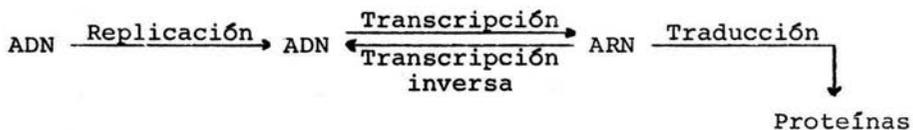
## I. INTRODUCCION

Las proteínas, compuestos multifuncionales indispensables para todo organismo vivo, son producidas por mecanismos celulares que forman un complejo pero armonioso conjunto de procesos entrelazados, que contienen la clave de los fenómenos que dan a un ente la categoría de organismo vivo.

El fenotipo de todos los organismos es el resultado de la regulación de la expresión de su genoma. La vía molecular por medio de la cual los genes estructurales pueden producir toda la gama de proteínas conocidas es la siguiente:

1. Transcripción de la información genética en moléculas de ARN mensajero (ARNm).
2. Traducción de la información de los ARN mensajeros en proteínas.

En ciertos virus que contienen ARN en lugar de ADN, la transcripción puede revertirse por la acción de la enzima transcriptasa inversa (ARN $\rightarrow$ ADN). En cambio, la traducción del ARN en proteínas es unidireccional y no puede ser revertida. Estos conceptos fueron reunidos por Crick (1) en la siguiente secuencia, que se considera como el dogma central de la Biología Molecular.



## A) EL RIBOSOMA.

La síntesis de proteínas, la última etapa en el flujo de la información genética, es un intrincado proceso que ocurre sobre el ribosoma. Durante él, un gran número de moléculas solubles interactúan con este organelo y entre sí de manera precisa. Para ser capaces de comprender y describir estas interacciones, se requieren estudios tanto funcionales como estructurales de los componentes que intervienen en ellas.

Los ribosomas son partículas de ribonucleoproteína. En organismos procariontes tienen un diámetro de aproximadamente 18 nm., una masa de 2.8 megadaltones y un coeficiente de sedimentación de 70S; tienen entre un 60% a 65% de ARN ribosomal (ARNr) y casi 35% a 40% de proteínas. El ARN ribosomal maduro está presente en tres formas: 5S, 16S 23S (2).

Los componentes de los ribosomas citoplásmicos eucarióticos son más grandes y están en número mayor por células, que los de procariontes (3). Su diámetro es de 20 a 22 nm. La subunidad pequeña o 40S, tiene una molécula de ARNr 18S y alrededor de 30 proteínas ribosomales diferentes. La subunidad grande o 60S tiene tres moléculas de ARNr: 28S, 5.8S y 5S; el ARN 5.8S es equivalente al extremo 5' del rARN 23S de *E. coli* (4). El número de proteínas de esta subunidad varía entre 45 y 50 (3). La figura 1 contiene un resumen de nombres, tamaños y relaciones de los varios tipos de ARN ribosomal.

|                            | SUBUNIDAD PEQUEÑA |            | SUBUNIDAD GRANDE |                  |
|----------------------------|-------------------|------------|------------------|------------------|
| MITOCONDRIAS               | 12S (956)         |            | 16S (1582)       |                  |
| BACTERIAS                  | 16S (1541)        |            | 23S (2904)       | 5S (120)         |
| CLOROPLASTOS               | 16S (1491)        |            | 23S (2992)       | 4.5S (103)<br>5S |
| EUCARIONTES<br>(LEVADURAS) | 18S (1789)        | 5.8S (163) | 28S              | 5S               |

Fig. 1. Relación entre los ARN's ribosomales de las subunidades grandes y pequeñas; entre paréntesis se indica el número de nucleótidos encontrados en algunas secuencias representativas. (2).

## B) SINTESIS DE RIBOSOMAS.

La síntesis de ribosomas es un modelo de las interacciones moleculares entre el núcleo y el citoplasma en las células eucarióticas. El ARNr se transcribe dentro del núcleo. Las proteínas ribosomales se sintetizan en el citoplasma a partir de un ARN mensajero originado en el núcleo. Las proteínas ribosomales migran entonces al núcleo y se ensamblan con el pre-ARNr en partículas nacientes de ribonucleoproteína. Estas son entonces procesadas por enzimas, las cuales a su vez tienen su origen en el citoplasma. Finalmente, la subunidad ribosomal completa pasa al citoplasma para participar en la síntesis de proteínas (5).

En ausencia de proteínas ribosomales, el pre-ARNr no es procesado apropiadamente y se degrada con rapidéz. Por otra parte, las proteínas ribosomales que son sintetizadas en ausencia de síntesis del pre-ARNr, son degradadas cuando no se pueden ensamblar en partículas preribosomales (6,7). Por lo tanto, la síntesis de ribosomas requiere la producción de todos sus constituyentes y, consecuentemente, una expresión altamente coordinada de un gran número de genes diferentes. Warner y Gorenstein (8), demostraron que, bajo ciertas condiciones, la síntesis de los ARNm's de 40 a 50 proteínas ribosomales se reprime en un 80% a 90% comparada con la síntesis de los ARNm's de la proteína celular total; concluyeron que la producción de proteínas ribosomales está regulada coordinadamente a nivel de la transcripción.

### C) PROTEINAS RIBOSOMALES.

Las protefnas ribosomales son, en general, relativamente pequeñas y básicas. Su identificación se ha realizado por electroforesis en geles de poliacrilamida, reportándose 31 en la subunidad pequeña (SP) y 39 en subunidad grande (SG) del hígado de la rata (9), 32 (SP) y 39 (SG) en los reticulocitos de conejo (10), 30 (SP) y 37 (SG) en la levadura (11) 34 (SP) y 37 (SG) en los óvulos de Xenopus leavis (12) y 26 (SP) y 39 (SG) en Chlamydomonas reinhardi (13).

Las protefnas de E. coli se numeran de S1 a S21 para la subunidad pequeña y de L1 a L34 para la subunidad grande (14). Sin embargo, se ha objetado la existencia de diferencias entre algunas de ellas. Así, S20 es idéntica a L26, aparentemente una protefna que se encuentra tanto en la subunidad grande como en la pequeña (15, 16). También en cierto que L7 es una modificación postraducciona de L12 (17). Además, L8 no representa una protefna única, sino un complejo de L7/L12 totalmente estable a la urea (18).

Hay también algunas protefnas no numeradas que se adhieren a los ribosomas y que pueden o no pertenecer a él. Los distintos procedimientos de separación y la extensión de lavado, dan ribosomas con diferencias en cuanto a las protefnas asociadas (19, 20, 21).

Para analizar si una protefna es un constituyente ribosomal genuino, se pueden comparar ribosomas de diferentes espe

cies. Las técnicas inmunológicas y la secuenciación de aminoácidos han complementado el análisis electroforético. Todas las proteínas numeradas como S2 a S21 en E. coli, tienen su contraparte en algunos otros ribosomas bacterianos (22).

Muchas de las proteínas ribosomales están presentes en una copia, o menos, en ribosomas purificados. La estequiometría puede variar entre 0.2 y 1 (23). Esto significa que una población de ribosomas purificados es altamente heterogénea en cuanto a su contenido proteico. En E. coli, solo una proteína no está sujeta a la estequiometría de 1 o menos. Ella es L7/L12. Está bien establecido que hay 4 copias de L7 mas L12 sobre el ribosoma (23, 24).

Algunos descubrimientos recientes han añadido complicaciones, considerando la importancia de algunas de las proteínas para la función ribosomal. Se encontró que mutantes de E. coli totalmente carentes de ciertas proteínas ribosomales, eran aún viables y sintetizaban proteínas "in vivo". En algunas de las mutantes se demostró, convincentemente, que estas proteínas no se habían expresado. Algunas de las proteínas faltantes, como L11 y L27, habían sido consideradas hasta entonces como esenciales para la función ribosomal. Se ha visto que ciertas proteínas con habilidad para unirse al ARN, tienen funciones regulatorias para la expresión de otras proteínas ribosomales. Tal papel regulatorio puede ser la única función de algunas de estas proteínas (25).

D) CARACTERISTICAS DE LA ASOCIACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES AL ARN RIBOSOMAL.

Las moléculas presentes en un ribosoma no están unidas entre sí por enlaces covalentes; Warner (26) distinguió 3 clases de protefnas ribosomales, dependiendo de las características de su asociación con el ARNr:

1. Protefnas que se encuentran asociadas irreversiblemente al ARNr recién sintetizado. Al parecer, éstas protefnas son ensambladas con pre-ARNr en el núcleo y constituyen las verdaderas protefnas estructurales del ribosoma. Representan el 60% del total de las protefnas ribosomales de las partículas ribosomales nacientes.

2. Protefnas que aparecen en los ribosomas cuando no hay síntesis de éstos y que por lo tanto intercambian con protefnas solubles homólogas "in vivo". "In vitro" se encuentran fuertemente unidas a los ribosomas; sólo se desprenden de él a concentraciones de KCl por arriba de 0.8M. Estas protefnas ribosomales denominadas de intercambio, representan entre el 15% al 20% de la protefna ribosomal total.

3. Protefnas débilmente unidas a los ribosomas. Como las de la clase 2, éstas se encuentran en equilibrio con las protefnas solubles, pero pueden ser removidas a baja fuerza iónica (menos de 0.8 M de KCl). Pueden ser moléculas unidas adventiciamente a los ribosomas, o bien factores del citosol indispensables para la función ribosomal.

E) PROTEINAS RIBOSOMALES FOSFORILADAS.

Kabat (27), Loeb y Blat (28), descubrieron que las protefnas ribosomales pueden estar fosforiladas "in vivo", sugiriendo la posibilidad de un mecanismo regulatorio de acción rápida.

Los resultados de investigaciones efectuadas en el hgado de la rata, establecieron que el principal componente fosforilado es S6. Posteriormente se confirmó que S6 es la principal fosfoprotefna en los reticulocitos de conejo (29), las células de tumor ascftico (30), las células HeLa (31) y los organismos eucariontes primitivos como Lemna minor (32) y Tetrahy-mena pyriformis (33). El grado de fosforilación de S6 se modifica bajo algunos estmulos fisiológicos (34). Algunos factores como hormonas, AMP cfclico, infecciones virales, cambios en las condiciones de crecimiento de las células en cultivo, etc., estimulan la fosforilación de S6 mientras que otros, como la administración de insulina a animales diabéticos, la disminuyen (3).

Hay algunas otras protefnas ribosomales, además de S6, que están fosforiladas; incluyen polipéptidos tanto de la subunidad 40S como de la 60S. Las modificaciones en la fosforilación de las protefnas ribosomales, como respuesta a factores que afectan la síntesis de protefnas, ha conducido a la hipótesis de que la fosforilación tiene una función regulatoria; sin embargo, el significado funcional preciso de estos cambios es, al presente, desconocido.

Zinker y Warner (11), describieron 5 fosfoproteínas en los ribosomas de la levadura Saccharomyces cerevisiae; las designaron P1 a P5. En la Tabla 1 se muestran algunas de las propiedades de estas proteínas. Llamaremos la atención sobre el componente designado como P5, el cual es equivalente a L7/L12 de E. coli, pertenece a la clase de las proteínas ribosomales de intercambio. Forma parte de la subunidad 60S y es, a diferencia del resto de los componentes proteicos del ribosoma, fuertemente ácida.

Las proteínas ribosomales fosforiladas y, en particular, las ácidas, han sido detectadas en todas las especies estudiadas hasta el presente, desde eucariontes primitivos hasta células de mamífero, circunstancia que expresa la importancia de estas proteínas para la función ribosomal. Su grado de fosforilación y su tamaño, se incrementan con la posición en la escala evolutiva del organismo en cuestión (35). En la tabla 2 se señalan algunos reportes sobre las relaciones entre las fosfoproteínas ácidas encontradas en diferentes organismos.

La función de estas proteínas no ha sido esclarecida. El complejo de L7/L12, constituye una de las tres protuberancias, designada tallo, detectadas por microscopía electrónica en la subunidad 60S de E. coli (36).

Al igual que en E. coli, eL12/eL12p, se requieren por los ribosomas de A. salina para la unión del aminoacil-ARNt dependiente del EF-1 (factor de elongación 1), así como para la hidrólisis del GTP catalizada por EF-2 (factor de elongación

TABLA 1. Proteínas ribosomales fosforiladas de S. ce-  
revisiae. Tomado de Zinker y Warner (11).

| DESIGNACION | P.M.   | LOCALIZACION | CARGA A<br>pH 8.6 | OBSERVACIONES  |
|-------------|--------|--------------|-------------------|--|
| P1          | 40,000 | 60S          | Neutra?           | Intercambiable   |
| P2          | 31,000 | 40S          | Básica            | Dos especies: S5/S6                                      |
| P3          | 22,000 | 40S          | Acida             | S27  |
| P4          | 15,500 | Polisomas    | Acida             | Proteína minoritaria                                     |
| P5          | 13,000 | 60S          | Muy ácida         | Dos o más especies:<br>L35/L36, intercambia <u>ble</u> . |

TABLA 2. Fosfoproteínas ribosomales  
ácidas.

| ORGANISMO                       | DESIGNACION              | OBSERVACIONES   | REF.    |
|---------------------------------|--------------------------|---|---------|
| <u>E. coli</u>                  | L7/L12                   | No fosforilada en condiciones ordinarias. L12 es la forma acetilada en elNH <sub>2</sub> -terminal de L7. | (14)    |
| Rata<br>(células hepáticas)     | L40/L41                  | Inmunológicamente relacionada con L7/L12.   | (15)    |
| <u>Artemia salina</u>           | EL7/EL12<br>(EL12/EL12p) | EL12p es la forma fosforilada de EL12. Tienen la misma función que L7/L12 pero no la misma estructura.    | (37,38) |
| <u>Saccharomyces cerevisiae</u> | L35/L36<br>(P5/P5')      | Homóloga a L7/L12. Existe en el citoplasma en forma no fosforilada.                                       | (74)    |

2) (37,38). Sin embargo, "in vitro" las partículas ribosomales pueden realizar algunas funciones de los factores de elongación en ausencia de dichas proteínas (39,40).

## II. ANTECEDENTES

Gran parte de las investigaciones sobre protefnas ribosomales que se han realizado recientemente, utilizan a las levaduras como organismos modelo, tanto por ser células eucarióticas, como por presentar facilidades de manejo fisiológico, bioquímico y genético, mediante el uso de las técnicas microbiológicas convencionales.

La síntesis de ribosomas en la levadura Saccharomyces cerevisiae, es un proceso muy similar al de otros eucariontes. El ARN se transcribe como una molécula precursora única, la cual se metila y se fragmenta según el esquema de la figura 2 (41).

Utilizando a S. cerevisiae, Warner y Udem (41) reportaron 3 péptidos de la clase de las protefnas de intercambio, cuya síntesis no está sujeta al control coordinado que se manifiesta para cerca de 50 protefnas ribosomales. Este hecho fue evidente cuando la mutante termosensible denominada ts368, en la cual la maduración del ARNr no se completa, manifestó inhibición en la síntesis de protefnas ribosomales a la temperatura restrictiva, con excepción de los tres péptidos mencionados, los cuales se encontraban fosforilados (7). Las células permanecen viables por algunas horas, sintetizando protefnas para aumentar su masa e incluso para dividirse. Zinker y Warner (11) confirmaron que dichas moléculas corresponden a las protefnas fosforiladas de intercambio designadas como P1 y P5, siendo la

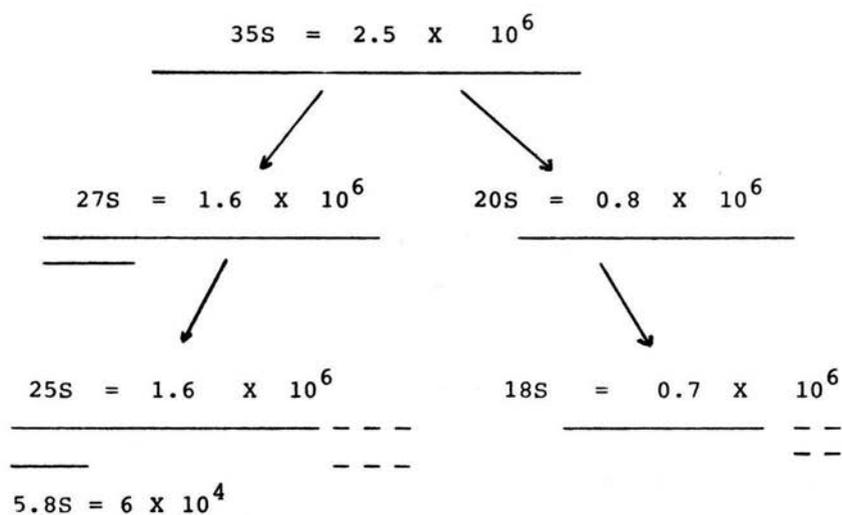


Fig. 2. Síntesis del ARN ribosomal en la levadura S. cerevisiae. Se indica el peso molecular de cada fragmento. Tomado de Udem y Warner (41).

última equivalente a las proteínas ácidas L35/L36 y a L7/L12 de E. coli (Tablas 1 y 2).

Los análisis cinéticos de Peterson y McLaughlin (42) y de Bollen y colaboradores (43) en levaduras, así como los experimentos de traducción "in vitro" del ARNm extraído de células del hígado de la rata, por Nabeshima y colaboradores (44), evidencian que cada proteína ribosomal se sintetiza a partir de moléculas de ARNm monocistrónico, cuya longitud es generalmente proporcional al peso molecular de la proteína individual sintetizada. Otros experimentos similares en distintos organismos indican que lo anterior es una característica general de las células eucarióticas. Por lo tanto, se sugiere que el ARNm de P5 sea de bajo peso molecular, puesto que la proteína que origina tiene un peso de 13,700 daltones. Si para fines prácticos se considera un peso molecular promedio de 100 para los residuos de aminoácidos y de 300 para los residuos de nucleótidos, una proteína de 13,700 daltones está constituida por 137 residuos de aminoácidos y el ARNm correspondiente, por 411 residuos de nucleótidos con un peso molecular total de 123,300 daltones, o sea, cerca del doble del peso molecular del ARNr 5.8S.

Holley y colaboradores (45), demostraron que las levaduras liberan su "ARN soluble" cuando la pared celular es permeabilizada con una mezcla de fenol-cloroformo; desde entonces se han introducido muchas modificaciones a esta técnica básica. En el aislamiento del ARN pequeño, el método tiene dos ventajas sobre la técnica alternativa de extracción fenólica a partir de

polisomas; primero, la permeabilización es altamente selectiva para ARN de bajo peso molecular, cuyo rango varía cambiando las condiciones de extracción; segundo, no se requiere la digestión enzimática previa de la pared celular (46). Al presente, la técnica de permeabilización con fenol-cloroformo se ha utilizado solamente para la extracción del ARNr pequeño. Aún no se ha explorado si otros tipos de ARN de bajo peso molecular pudieran estar presentes en esta fracción. En el presente trabajo se utilizó dicho método para la obtención del ARN pequeño, ribosomal y mensajero, a partir de células íntegras de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

### III. OBJETIVOS

Las diferencias metabólicas entre la cepa silvestre A364A y su derivada, la mutante ts368, plantean la posibilidad de utilizar a esta mutante para obtener una población enriquecida en ARN mensajero de las proteínas ácidas L35/L36, como paso preliminar para posteriores estudios en relación a la estructura, función y regulación de la transcripción de los genes que las codifican, mediante la tecnología del ADN recombinante. Por lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos los objetivos siguientes:

1. Reconocer el desarrollo del proceso de maduración del rARN en las cepas silvestre (A364A) y mutante (ts368), de la levadura Saccharomyces cerevisiae y
2. Examinar si en la población del ARN de bajo peso molecular obtenida por extracción fenólica a partir de células íntegras de la cepa ts368 de S. cerevisiae, incubadas a la temperatura restrictiva (37°C), existe ARN mensajero.

#### IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para identificar el proceso de maduración del ARNr en las cepas A364A y ts364, se siguió la siguiente secuencia experimental:

a) Cinética de incorporación de adenina-<sup>3</sup>H en la cepa A364A, tanto en células completas como en esferoplastos (células cuya pared ha sido parcialmente digerida). El propósito de observar la incorporación de adenina a esferoplastos es asegurar la viabilidad metabólica de éstos, ya que para la obtención del ARN total marcado radioactivamente, se requiere la incubación de los esferoplastos en presencia de un nucleótido precursor radioactivo.

b) Reconocimiento de la cinética de maduración de las especies grandes del ARNr de la cepa A364A, mediante la aplicación de "pulsos" de adenina-<sup>14</sup>C a tiempos cortos (1, 5 y 15 minutos) y el análisis posterior del ARN en geles de poliacrilamida al 2.75%.

c) Cinética de incorporación de adenina-<sup>3</sup>H a esferoplastos de la cepa ts368 a las temperaturas permisiva (23°C) y restrictiva (37°C).

d) Reconocimiento, por el mismo método, de la cinética de maduración de las especies grandes del ARNr de la cepa ts368 después de su incubación a 36°C.

Con respecto al segundo objetivo, se utilizó la estra-

tegia siguiente:

a) Cuantificación de las secuencias de poliadenina por su retención en filtros de nitrocelulosa, después de la digestión del ARN total y pequeño con las RNasas A y T1.

b) Obtención del ARN mensajero por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa oligo-deoxitimina.

c) Traducción "in vitro" del ARN mensajero en un sistema libre de células, preparado a partir de reticulocitos de conejo.

## V. MATERIAL Y METODOS

### A) MICROORGANISMOS.

En este trabajo se utilizó la cepa denominada A364A (ATCC no. 22244) de la levadura Saccharomyces cerevisiae, obtenida originalmente por L. Hartwell (47) y que tiene el siguiente genotipo:

- Tipo de apareamiento: a.
- Grande (tiene mitocondrias).
- Haploide.
- Marcadores nutricionales: gal, ade<sub>1</sub>, ade<sub>2</sub>, ura<sub>2</sub>, his<sub>7</sub>, lis<sub>2</sub> y tir<sub>1</sub>.

Se utilizó asimismo la cepa termosensible denominada ts368, derivada de la anterior, obtenida y caracterizada por Hartwell y colaboradores (48), que además del genotipo de la A364A, tiene una mutación, rnal, que se manifiesta a la temperatura restrictiva (37°C), como ausencia de síntesis de ribosomas.

### B) MEDIOS DE CULTIVO.

#### 1. Base nitrogenada para levaduras (YNB).

Soluciones stock:

Vitaminas (100X) (400ml.): 200 µg. de biotina, 40 mg. de pantotenato de calcio, 200 µg. de ácido fólico, 200 µg. de inositol, 40 mg. de niacina, 20 mg. de ácido p-aminobenzóico.

co, 40 mg. de clorhidrato de piridoxina, 20 mg. de riboflavina y 40 mg. de clorhidrato de tiamina.

Elementos traza (100X): 50 mg. de ácido bórico, 4 mg. de sulfato de cobre, 10 mg. de ioduro de potasio, 20 mg. de cloruro férrico, 40 mg. de sulfato de manganeso, 20  $\mu$ g. de molibdato de sodio y 40 mg. de sulfato de zinc. Se disolvieron cada uno por separado en 10 ml. de agua.

Sales (50X) (por litro): 50 gr. de fosfato de potasio monobásico, 25 gr. de sulfato de magnesio, 5 gr. de cloruro de sodio y 1 gr. de cloruro de calcio.

Preparación: 50 gr. de sulfato de amonio, 40 ml. de la mezcla de vitaminas, 0.1 ml. de cada uno de los elementos traza y 200 ml. de la mezcla de sales.

## 2. Medio YM-1.

Por litro: 5 gr. de extracto de levadura (Difco), 10 gr. de peptona, 10 gr. de ácido succínico, 6 gr. de hidróxido de sodio, 100 ml. de YNB 10 gr. de glucosa.

## 3. Medio Sintético Completo (SC):

Por litro: 10 gr. de ácido succínico, 6 gr. de hidróxido de sodio, 20 mg. de adenina, 20 mg. de uracilo, 62.5 mg. de lisina, 50 mg. de histidina, 50 mg. de tirosina, 100 ml. de YNB y 20 gr. de glucosa (49).

## 4. Medio Sintético Completo suplementado con Magnesio (SCM):

Por litro: 10 gr. de ácido succínico, 6 gr. de hidróxido de sodio, 98.6 gr. de sulfato de magnesio, 10 mg. de adenina, 10 mg. de uracilo, 62.5 mg. de lisina, 50 mg. de histidina, 50 mg. de tirosina, 100 ml. de YNB y 20 gr. de glucosa.

#### C) CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Se prepararon cultivos stock inoculando una asada de células en fase estacionaria en medio YM-1, dejando crecer con agitación continua a 23°C durante 3 días para conservarse posteriormente a 4°C.

Para los cultivos experimentales, se inoculó una dilución 1:200 del stock de células en medio SC dejando crecer con agitación continua a 23°C, hasta una densidad de 40-60 unidades Klett (aproximadamente  $1-2 \times 10^7$  células/ml., utilizando filtro rojo).

#### D) PREPARACION DE ESFEROPLASTOS.

La preparación de los esferoplastos se llevó a cabo por digestión enzimática parcial de la pared celular, según lo descrito por Hutchison y Hartwell (49).

Las células se colectaron por centrifugación a 3,000 g durante 5 minutos y se lavaron con agua estéril. El paquete celular se resuspendió en Sorbitol 1 M estéril, en una proporción de 10 ml. de Sorbitol por cada 100 ml. del cultivo original; se agregaron 0.01 volúmenes de una preparación comercial de

Glusulasa (jugo intestinal del caracol de tierra Helix pomatia; Laboratorios Endo, N.Y.); las células se incubaron a 23°C durante 15 a 20 minutos.

Para comprobar la formación de los esferoplastos, se transfirieron 0.05 ml. de la suspensión de células y se colocaron en 0.5 ml. de sulfato de magnesio 0.4 M; una muestra alícuota igual, se colocó en 0.5 ml. de SDS al 0.1%. La susceptibilidad de los esferoplastos a la lisis por el SDS, es indicada por la transparencia mostrada en el tubo correspondiente, mientras que la solución de sulfato de magnesio permanece turbia. Los esferoplastos fueron colectados por centrifugación a 4,000 g durante 5 minutos y lavados con Sorbitol 1 M frío.

Para los experimentos en que se requirió medir la incorporación de adenina-<sup>3</sup>H, los esferoplastos fueron resuspendidos previamente en medio SCM y mantenidos durante dos horas a 23°C, agitando levemente con el objeto de permitir su recuperación metabólica después del tratamiento enzimático.

#### E) EXTRACCION DEL ARN TOTAL.

El procedimiento es esencialmente el descrito por Udem y Warner (41).

A partir de un cultivo de levaduras en medio SC. se prepararon los esferoplastos como se describió anteriormente. En seguida fueron lisados con 1 ml. de LETS (Tris 0.1 M, LiCl 0.1 M, SDS 1%, pH 7.4) y posteriormente se añadió un volúmen

igual de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2). Después de agitar en el vórtex durante 10 minutos, la mezcla se centrifugó inmediatamente a 480 g durante 5 minutos para obtener una buena separación de las fases acuosa (superior) y orgánica (inferior). Con una pipeta Pasteur se colectó la fase acuosa y se reextrajo dos veces más; la fase orgánica se lavó con 1 ml. de LETS y se juntaron las fases acuosas. A éstas se agregaron 2 volúmenes de etanol al 95% y 0.1 volúmenes de LiCl 5 M; posteriormente el ARN se dejó precipitar a -20°C durante una hora.

Para la determinación cuantitativa del ARN, el precipitado se sedimentó a 27,000 g durante 15 minutos; se eliminaron las trazas de etanol mediante vacío y la muestra seca fué disuelta en 2 ml. de LETS. De aquí se tomaron alícuotas de 10 y 20  $\mu$ l., las cuales se colocaron en 1 ml. de LETS para medir la absorbancia a 260 nanómetros. El ARN se precipitó nuevamente con etanol y LiCl para guardarse a -20°C.

#### F) EXTRACCION DEL ARN PEQUEÑO.

La extracción del ARN pequeño se realizó a partir de células íntegras por permeabilización de la pared celular con fenol, en base al método descrito por Rubin (46).

Las células de un cultivo se colectaron por centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en 3 ml. de LETS por cada 50 ml. de cultivo original, agregando un volumen i-

gual de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1). Después de 10 a 15 minutos de agitación vigorosa en el vórtex, la mezcla se calentó a 45°C durante 10 minutos agitando ocasionalmente. Posteriormente se agitó 10 minutos más a temperatura ambiente, procediendo en seguida a centrifugar la suspensión a 1,200 g durante 5 minutos para permitir una buena separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa fue colectada y reextraída; la fase orgánica se lavó con 1 ml. de LETS. Se unieron las fases acuosas para agregarles 2 volúmenes de etanol al 95% y 0.2 volúmenes de LiCl 0.5 M, después de lo cual la solución se incubó a -20°C. El precipitado formado después de una hora, se reextrajo nuevamente y se determinó la cantidad de ARN como se describió para el ARN total.

#### G) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El análisis de los distintos tipos de ARN se efectuó en geles de poliacrilamida con SDS, colocados en tubos de vidrio con 0.6 cm. de diámetro interno y 13 cm. de largo. Para el ARN total se utilizaron geles con una concentración de acrilamida de 2.75%; para el ARN pequeño la concentración de acrilamida en los geles fue del 10%. La electroforesis del ARN en los geles se realizó según la técnica descrita por Kadowaki y Halvorson (50).

#### Soluciones

- Solución amortiguadora P-D (20X):

Por litro: 108 g. de Tris-base, 9.3 g. de EDTA-Na<sub>2</sub> y 55 g. de ácido bórico.

- Solución de acrilamida:

A) 10% de acrilamida y 0.5% de bis-acrilamida.

B) 30% de acrilamida y 0.8% de bis-acrilamida.

- Solución amortiguadora de muestra (20 ml.):

1 ml. de P-D (20X), 1 g. de sacarosa, 0.2 ml. de SDS al 10%, 0.2 ml. de azul de bromofenol al 1% y 18.6 ml. de agua bidestilada.

- Solución amortiguadora de corrida:

Por litro: 75 ml. de P-D (20X) y 10 ml. de SDS al 10%.

Geles

|                                  | 2.75%    | 10%      |
|----------------------------------|----------|----------|
| Solución de acrilamida A         | 5.5 ml.  | -        |
| Solución de acrilamida B         | -        | 6.6 ml.  |
| Solución amortiguadora P-D (20X) | 1.0 ml.  | 1.0 ml.  |
| Agua bidestilada                 | 11.1 ml. | 10.2 ml. |
| SDS al 10%                       | 0.2 ml.  | 0.2 ml.  |
| Glicerol al 50%                  | 2.0 ml.  | 2.0 ml.  |
| TEMED                            | 10 ul.   | 10 ul.   |
| Persulfato de amonio al 10%      | 0.1 ml.  | 0.1 ml.  |

Para su aplicación en el gel, el ARN precipitado con etanol fué sedimentado a 27,000 g durante 15 minutos; las trazas de etanol se eliminaron aplicando vacío a la muestra. El

precipitado seco se disolvió en la solución amortiguadora de muestra para ser colocado en la parte superior del gel. La corrida se llevó a cabo sujetando a los geles a una corriente de 5 miliamperios por gel en el caso de los geles al 10% de acrilamida; los geles con 2.75% de la misma, se corrieron a 1 miliamperio por gel. En ambos casos, el tiempo de corrida fué el necesario para que el colorante alcanzara el extremo inferior del gel.

Terminada la corrida, los geles se sacaron de los tubos, se congelaron y se cortaron en rebanadas de 1 mm. de grosor con un fraccionador Mackle (Mackle Lab., England). Las fracciones se colocaron separadamente en viales de vidrio con 0.7ml. de hidróxido de amonio 0.1 N, dejando hidrolizar el ARN toda la noche a 30°C. Posteriormente se agregaron a cada vial 10 ml. de líquido de centelleo, compuesto por 70% de tolueno, 30% de Tritón X-100 y 4 g./l. de PPO; los viales se agitaron en el vórtex hasta que la mezcla quedó transparente y se contó la radioactividad contenida en cada vial con ayuda de un contador de centelleo líquido (Tri Carb, modelo 3385).

#### H) CUANTIFICACION DE LA RADIOACTIVIDAD EN CULTIVOS.

La radioactividad incorporada a las macromoléculas de células en cultivo, se midió en alícuotas de 0.5 ml. de éste, tomadas a los tiempos indicados en cada caso, colocándolas en tubos de ensayo con 0.5 ml. de TCA al 20% frío. Después de incubar en hielo durante 30 minutos, se filtraron a través de u-

na membrana Millipore (poro de 0.4  $\mu$ m.) enjuagando los tubos con TCA al 5% y etanol al 30%. Los filtros se dejaron secar y se colocaron en un vial con 5 ml. de líquido de centelleo (4 g. de PPO por litro de tolueno).

#### I) CUANTIFICACION DE SECUENCIAS POLIADENILICAS.

Los ARN's mensajeros de células eucarióticas, se distinguen por contener largas secuencias de residuos adenílicos en su extremo 3'. Estas cadenas son resistentes a las ARasas A (pancreática) y T1, en presencia de concentraciones moderadas de sales (46), por lo cual la cuantificación de ARN mensajero se ha realizado midiendo la cantidad de ARN que se retiene en un filtro de nitrocelulosa, es decir, ARN no digerido, después de la digestión de la muestra con dichas ribonucleasas.

El ARN precipitado con etanol fué secado y resuspendido en una solución conteniendo NaCl 0.1 N, EDTA 0.01 M y Tris-HCl 0.01 M, de pH 7.4. Las ARasas A y T1 (Sigma), se agregaron utilizando 0.025  $\mu$ g. y 2.5 unidades por muestra respectivamente. La mezcla se incubó a 36°C durante 30 minutos, se añadieron 0.5 ml. de TCA al 10% para detener la reacción y se incubaron en hielo durante 30 minutos más; como acarreador se añadió 0.1 ml. de albúmina bovina 1 mg./ml. Finalmente las muestras se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa para medir la radioactividad retenida en ellas por centelleo líquido con 5 ml. de PPO-tolueno.

#### J) CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE CELULOSA OLIGO-dT.

Las columnas se prepararon y corrieron a temperatura ambiente, según la técnica descrita por Sripati y Warner (51).

Se prepararon pipetas Pasteur con fibra de vidrio para mantener un flujo de 0.5 ml./min. y se colocó en ellas la celulosa oligo-dT (30-50 mg. para 10-20 D.O.<sub>260 nm.</sub> de ARN) a una concentración de 0.1 g./ml. en solución amortiguadora de unión (Tris-HCl 10 mM, de pH 7.4; EDTA 10 mM, SDS 0.2%, 0.1 vol. de LiCl 5 M). Después de eliminar las burbujas de aire, la columna fué lavada sucesivamente con 2 volúmenes de agua, 5 volúmenes de hidróxido de potasio 0.1 N, 5 volúmenes de agua, 5 volúmenes de solución amortiguadora de unión y 5 volúmenes de Tris-HCl 0.01 M, de pH 7; finalmente se equilibró con la solución amortiguadora de unión.

Para su aplicación a las columnas, el ARN fué sedimentado, secado y disuelto en la solución amortiguadora de unión a una concentración aproximada de 20 D.O.<sub>260 nm.</sub>/ml. Se colocó en las columnas en porciones de 0.2 ml. con intervalos de 10 minutos entre cada adición. Después de fluir a través de la celulosa, el eluato fué colectado y aplicado nuevamente a la columna. Esta segunda colecta constituyó la fracción 1. Después de 20 minutos de la segunda aplicación, la columna se lavó con 6 ml. de la misma solución en 3 porciones de 2 ml., para constituir las fracciones 2, 3 y 4. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de solución amortiguadora de unión sin SDS y 0.15 M de LiCl, con

el fin de remover las trazas de ARN no adsorbido (fracción 5). El ARN retenido en la columna se eluyó con 2 ml. de solución amortiguadora de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4), para formar la fracción 6. Finalmente la columna se lavó con 2 fracciones de 2 ml. de solución de elución (fracciones 7 y 8).

Se cuantificó la radioactividad contenida en alícuotas de 100 ul. de cada fracción, las cuales se precipitaron colocándolas en tubos de ensayo con 1 ml. de TCA al 10% y agregando 0.1 mg. de albúmina bovina en solución acuosa como acarreador. El contenido de cada tubo se filtró a través de una membrana millipore (poro de 0.4  $\mu$ m.). Cada membrana se introdujo por separado, a un vial de vidrio especial para el contador de centelleo. Las membranas dentro de los viales se secaron dentro de un horno a 80°C durante una hora. Los viales se sacaron del horno y se dejaron reposar hasta alcanzar el equilibrio con la temperatura ambiente. A cada vial se le agregaron 5 ml. de líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad.

#### K) TRADUCCION "IN VITRO".

Para realizar los experimentos de traducción "in vitro" se utilizó un lisado de reticulocitos de conejo (Amersham Co.), el cual está tratado con una nucleasa dependiente de calcio, con el fin de destruir cualquier ARNm endógeno que pudiera estar presente en la preparación. En condiciones óptimas de traducción, el lisado permite obtener una alta incorporación de aminoácidos marcados radioactivamente.

La traducción "in vitro" requiere que el ARN se encuentre disuelto en agua y libre de iones  $\text{Li}^+$  y de SDS. Para remover estos solutos, el ARN se sedimentó y se redisolvió en agua; en seguida se reprecipitó agregando 0.1 volúmenes de acetato de potasio al 20% y 2 volúmenes de etanol al 95%. Este procedimiento se repitió tres veces y, finalmente, el ARN se disolvió en agua a una concentración de 2-4  $\mu\text{g.}/\mu\text{l.}$  (8).

El procedimiento se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por Amersham Co., a 30°C y a una concentración final de aminoácido radioactivo de 1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l.}$  Se colocaron tubos Ependorf en hielo y se procedió a diluir la L-metionina- $^{35}\text{S}$  (Amersham Co. hasta una concentración de 5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l.}$ , de la cual se tomó la cantidad necesaria para hacer la mezcla de ensayo con 20% del aminoácido radioactivo y 80% del lisado. Se colocaron en cada tubo 10  $\mu\text{l.}$  de la mezcla, agregando 1  $\mu\text{l.}$  de agua bidestilada al primer tubo (control) y 1  $\mu\text{l.}$  de TMV (virus de mosaico del tabaco) al siguiente. Se colocó 1  $\mu\text{l.}$  del ARN problema en cada uno de los tubos restantes. La reacción se inició transfiriéndolos a un baño a 30°C, incubando a esta temperatura durante 60 minutos. Posteriormente se tomó 1  $\mu\text{l.}$  de cada uno y se colocó en tubos de ensayo con 0.5 ml. de NaOH 1 N y 5% de peróxido de hidrógeno; en seguida se calentaron a 37°C durante 10 minutos y después se enfriaron en hielo. Finalmente se añadieron 300  $\mu\text{g.}$  de albúmina bovina y 3 ml. de TCA al 25%; el contenido se filtró a través de una membrana millipore (poro de 0.4  $\mu\text{m.}$ ) lavando con 3 ml. de TCA al 8% frío y 5 ml. de etanol al 30%.

Después de secar las membranas, se contó la radioactividad usando 5 ml. de PPO-tolueno.

L) GELES DE ISOELECTROENFOQUE.

Composición:           5% Acrilamida  
                          0.2% Bisacrilamida  
                          6 M Urea  
                          2% Anfolinas  
                          0.03% TEMED  
                          0.06% Persulfato de amonio

Solución amortiguadora de muestra:

Urea 8 M: 250  $\mu$ l.

Anfolinas: 15  $\mu$ l.

Fuczina básica al

0.1% en H<sub>2</sub>O: 5  $\mu$ l.

Solución reservorio ánodo: 0.01 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Solución reservorio cátodo: 0.02 N NaOH.

La solución del gel se filtra a través de una membrana millipore (poro de 45  $\mu$ m.) y se deposita, después de desgasificada al vacío, entre dos placas de vidrio con separadores de teflón (separador horizontal = 13 cm. X 0.6 mm.; separadores verticales = 9 cm. X 0.6 mm.), a los que previamente se les ha untado grasa siliconizada. La placa de vidrio a la que no se quiere que se adhiera el gel se siliconiza. Se deja polimerizar a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. El gel se

coloca posteriormente sobre la plancha refrigerada (15°C) del aparato de electroforesis (Heidelberg Desaga). Las muestras se disuelven en la solución amortiguadora de muestra y se absorben sobre tiras de papel Whatman (0.6 X 1.0 cm.), las cuales se colocan en los carriles del gel.

Corrida:

- |          |             |            |             |
|----------|-------------|------------|-------------|
| 1) 50 V  | (2 mA), 15' | 5) 400 V   | (3 mA), 30' |
| 2) 100 V | (3 mA), 30' | 6) 500 V   | (3 mA), 30' |
| 3) 200 V | (5 mA), 30' | 7) 600 V   | (3 mA), 30' |
| 4) 300 V | (3 mA), 30' | 8) 250 V + | 12 horas.   |

## VI. RESULTADOS

### A) MANEJO DEL ARN RIBOSOMAL.

#### 1) INCORPORACION DE ADENINA EN CELULAS COMPLETAS Y ESFEROPLASTOS.

Durante el presente trabajo, se ha hecho uso extensivo del marcaje radioactivo "in vivo" del ARN con el nucleótido adenina-<sup>3</sup>H o adenina-<sup>14</sup>C, añadiéndolo al medio de incubación de las levaduras en su fase de crecimiento exponencial. Puesto que la extracción del ARN total requiere de la digestión parcial previa de la pared celular, así como la incubación de éstas células (esferoplastos) en presencia del precursor radioactivo, es necesario asegurar que su viabilidad metabólica se conserve intacta después del tratamiento enzimático a que han sido sometidas. Con tal objeto, se midió la radioactividad incorporada a células de cultivos de levaduras completas y de esferoplastos a diferentes tiempos. La gráfica de la Figura 3 muestra el curso lineal de la captación del precursor radioactivo a material TCA-precipitable en ambos casos, indicando que los esferoplastos son viables y que su ritmo de síntesis de ácidos nucleicos en la fase exponencial no se encuentra alterado, puesto que, salvo un pequeño retraso de aproximadamente 12 minutos al comienzo de la incorporación, la pendiente de la curva es igual a la de las células integras. Una vez comprobada su viabilidad, se prepararon e incubaron esferoplastos con adenina-<sup>3</sup>H en todos los casos previos a la

Fig. 3: Incorporación de adenina-<sup>3</sup>H a células completas y esferoplastos de la cepa A364A a 23°C.

Se creció un cultivo de levaduras en medio SC hasta fase exponencial y posteriormente se le agregaron 0.1  $\mu$ Ci/ml. de adenina-<sup>3</sup>H. La incorporación del nucleótido radioactivo a las células, como material TCA-precipitable, se midió cada 10 minutos durante un lapso de 1.5 horas como se indica en Material y Métodos. La incorporación de adenina a los esferoplastos de la misma cepa, se midió por un procedimiento semejante después de digerir enzimáticamente la pared celular. —●— células completas, ----○----- esferoplastos.

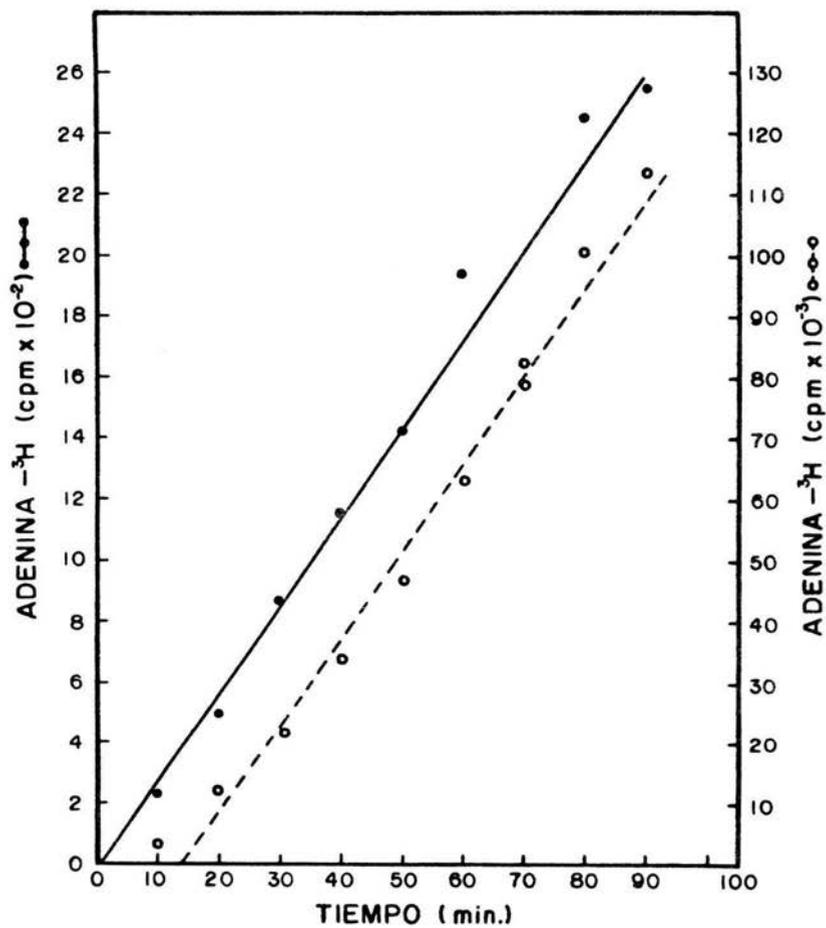


Fig. 3

extracción del ARN total, no así para la obtención del ARN pequeño, el cual se extrajo de células íntegras según se describió en Material y Métodos.

2) PATRON ELECTROFORETICO Y MADURACION DEL ARN RIBOSOMAL A 23°C.

Para mostrar el patrón del ARN ribosomal maduro y las etapas de su procesamiento, se extrajo el ARN total y pequeño marcado radioactivamente, a partir de esferoplastos y de células completas respectivamente, sometiéndolo posteriormente a separación por electroforesis en geles de poliacrilamida, según lo descrito en la sección de Material y Métodos.

Las Figuras 4 y 5 muestran los patrones de las especies grandes y pequeñas de ARNr maduro de la cepa A364A crecida a 23°C. Se observa que el ARN estable está constituido, en un 60%, por los ARN's 25S, 18S, 5.8S y 5S; aparece además en forma predominante (13%) el ARN de transferencia en la región de 4S, que sin ser ribosomal propiamente dicho, se une a los sitios A (aminoacil) y P (peptidil) de los ribosomas durante la síntesis de proteínas (52). Los picos correspondientes a los ARNr's 35S y 18S, suelen exhibir hombros que pueden representar isómeros conformacionales del ARN maduro con migración más lenta.

Las etapas del procesamiento se analizaron aplicando pulsos cortos (1, 5 y 15 minutos) de adenina marcada con  $^3\text{H}$  a un cultivo de esferoplastos en fase de crecimiento exponencial. El

Fig. 4: Patrón electroforético de las especies grandes del ARN maduro de la cepa A364A.

Se creció un cultivo de levaduras a 23°C en presencia de 1  $\mu$ Ci/ml. de adenina-<sup>3</sup>H, hasta la fase exponencial. Después de la obtención de los esferoplastos, el ARN total de las células fué extraído con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y sometido a electroforesis en un gel cilíndrico al 2.75% de poliacrilamida. La radioactividad a lo largo del gel fué cuantificada en fracciones transversales de 1 mm. del mismo, como se indica en la sección de Material y Métodos.

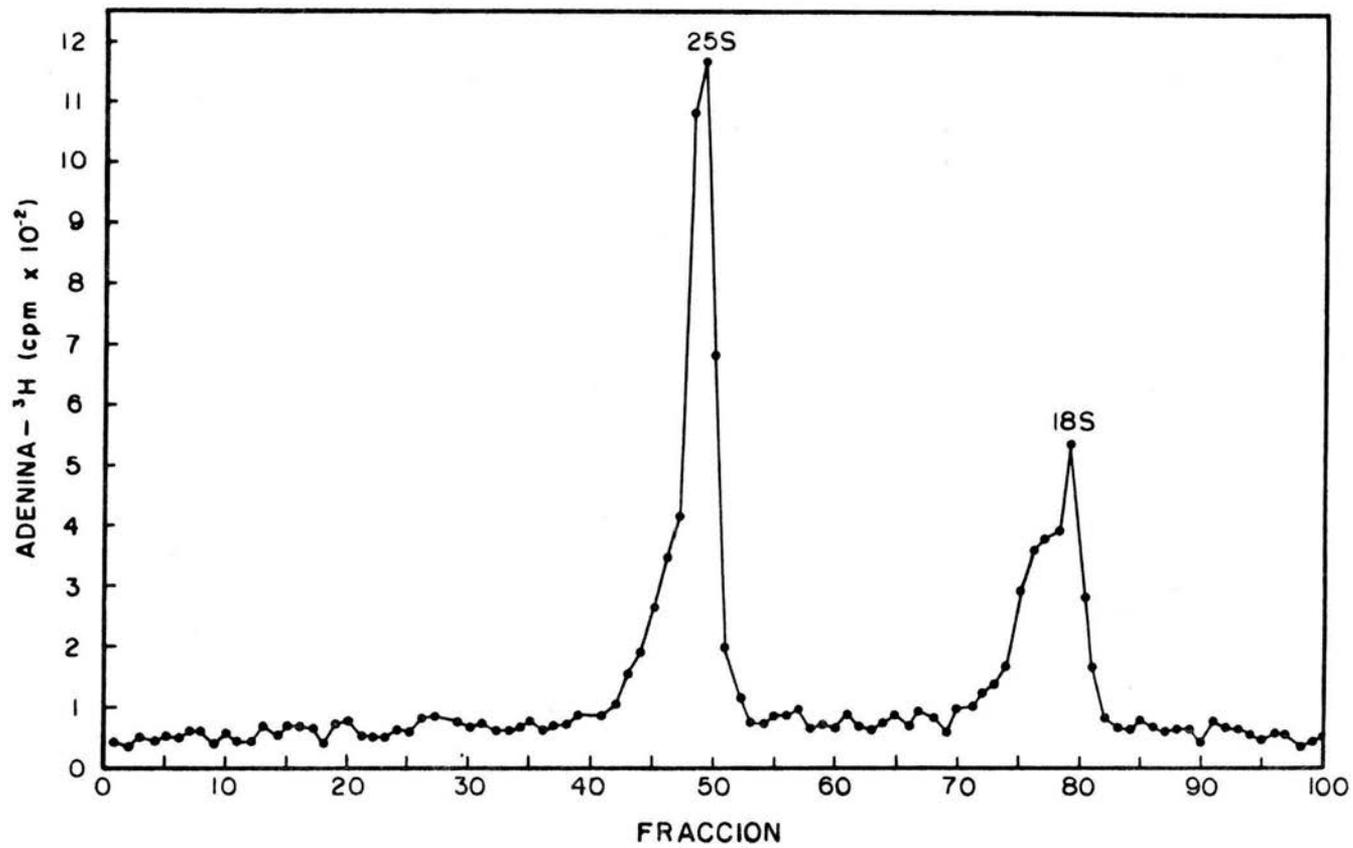


Fig. 4

Fig. 5: Patrón de ARN pequeño de la cepa A364A.

El ARN pequeño fué extraído a partir de células íntegras de un cultivo crecido con  $1\mu\text{Ci/ml}$ . de adenina- $^3\text{H}$  a  $23^\circ\text{C}$ , utilizando una mezcla de fenol-cloroformo a  $45^\circ\text{C}$ . La muestra de ARN se sometió a electroforesis en un gel de acrilamida al 10%; la radioactividad se cuantificó después de rebanar el gel en fracciones de 1 mm., como se indica en Material y Métodos.

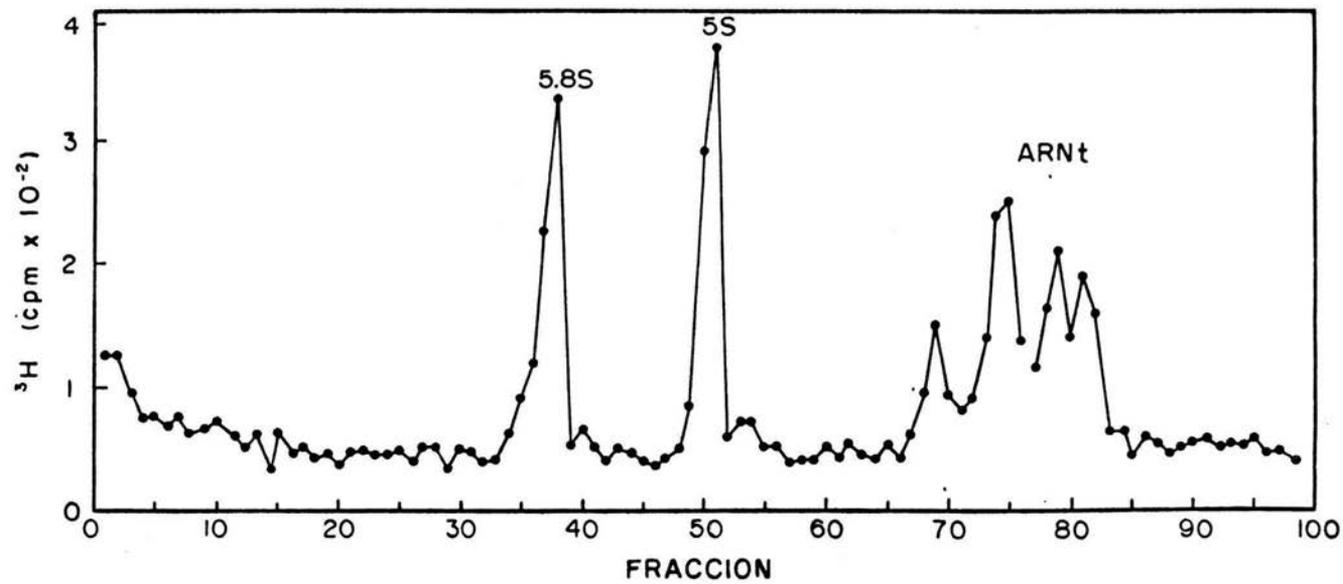


Fig. 5.

ARN estable fué marcado previamente incubando las células, desde que se inocularon al medio de cultivo SC, en presencia de adenina-<sup>14</sup>C.

El ARN-<sup>3</sup>H que aparece marcado después de un minuto de exposición al nucleótido radioactivo (Figura 6a), es heterogéneo en tamaño, predominando sin embargo tres picos distintivos: uno en la región de 35S, otro en la de 27S y el tercero en la región de 20S. Los tres ocupan el 54% de la radioactividad total de <sup>3</sup>H en el gel; no hay indicios de ARN maduro. Después de 5 minutos (Figura 6b), la cantidad de las tres especies precursoras continúa aumentando, abarcando ahora el 66% del ARN marcado con <sup>3</sup>H. Al aumentar la exposición continuada al radioisótopo, la incorporación total de la marca se incrementa y después de 15 minutos puede detectarse un 43% de ARN maduro 25S y 18S, junto con un 31% de las especies precursoras 35S, 27S y 20S del ARN ribosomal. Es notable que el ARN 35S se encuentra ahora sensiblemente reducido y representa sólo el 7% del ARN total (Figura 6c). El ARN heterogéneo, que se marca rápidamente y que es detectado como un 46% de la radioactividad total 1 minuto después de la adición de adenina-<sup>3</sup>H (Figura 6a), puede estar compuesto de productos de transcripción precursores de ARNm, ya que, por un lado, su marcaje es probablemente debido a la adición de secuencias poliadenílicas, proceso que se ha reconocido como muy rápido (53, 54, 55); por otra parte, el procesamiento de este ARNm precursor es un proceso relativamente lento, involucrando la producción de moléculas intermediarias por la remo-

Figs. 6a, 6b y 6c: Análisis electroforético del ARN preribosomal de la cepa ts368 a 23°C.

Se creció un cultivo hasta fase exponencial a 23°C en un volúmen de 15 ml. en presencia de 1  $\mu$ Ci de adenina-<sup>14</sup>C para marcar el ARN estable. Las células fueron colectadas para preparar esferoplastos, los cuales fueron mantenidos en el mismo volúmen inicial de medio con magnesio durante 2 horas antes de añadir 25  $\mu$ Ci/ml. de adenina-<sup>3</sup>H. A 1, 5 y 15 minutos después de añadido el último nucleótido, se tomaron alícuotas de 5ml. del cultivo y se vertieron en Sorbitol 1 M congelado y molido, con el fin de detener rápidamente la incorporación de adenina. Después de colectar los esferoplastos, el ARN total fué extraído y sujetado a electroforesis en geles de poliacrilamida al 2.75%. Finalmente, cada gel se cortó en fracciones transversales de 1 mm. de grosor y la radioactividad se contó en cada fracción. a) 1 min., b) 5 min., c) 15 min, —●— <sup>3</sup>H, ----○---- <sup>14</sup>C.

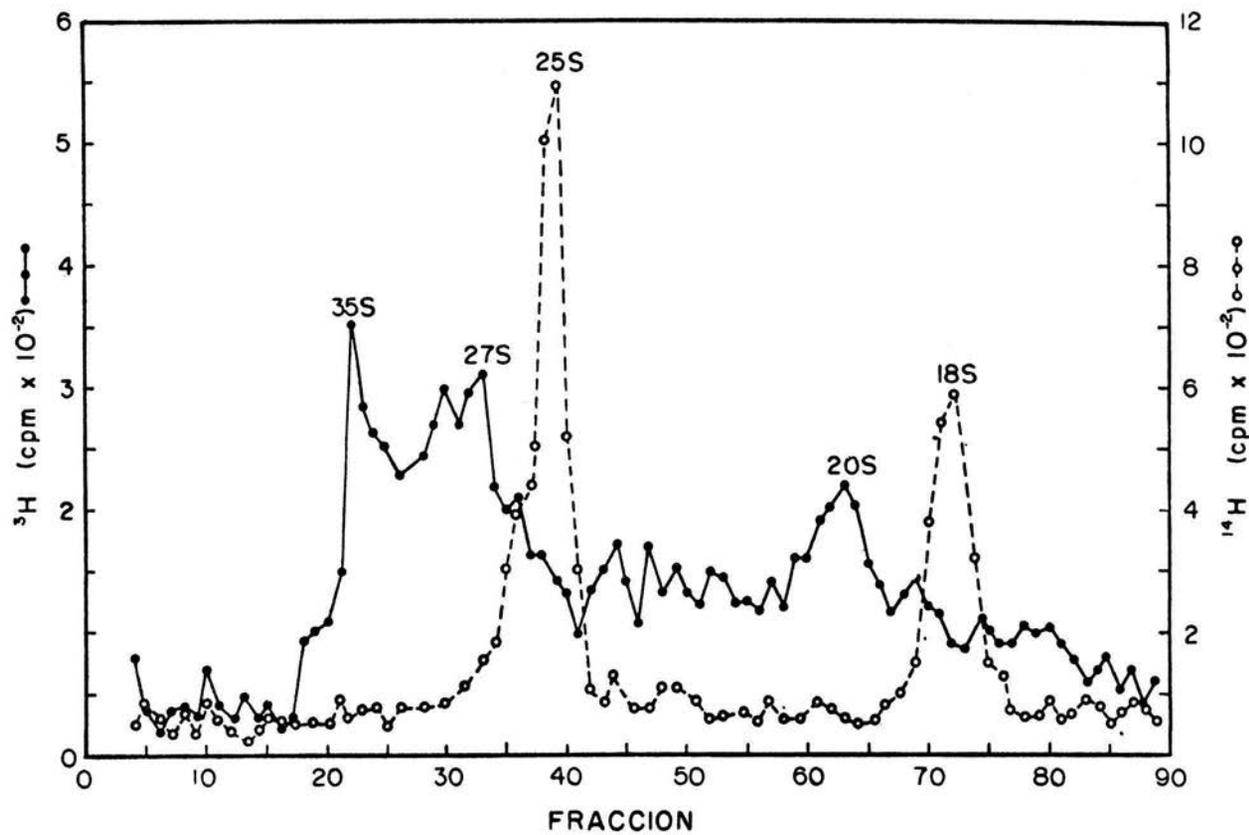


Fig. 6a.

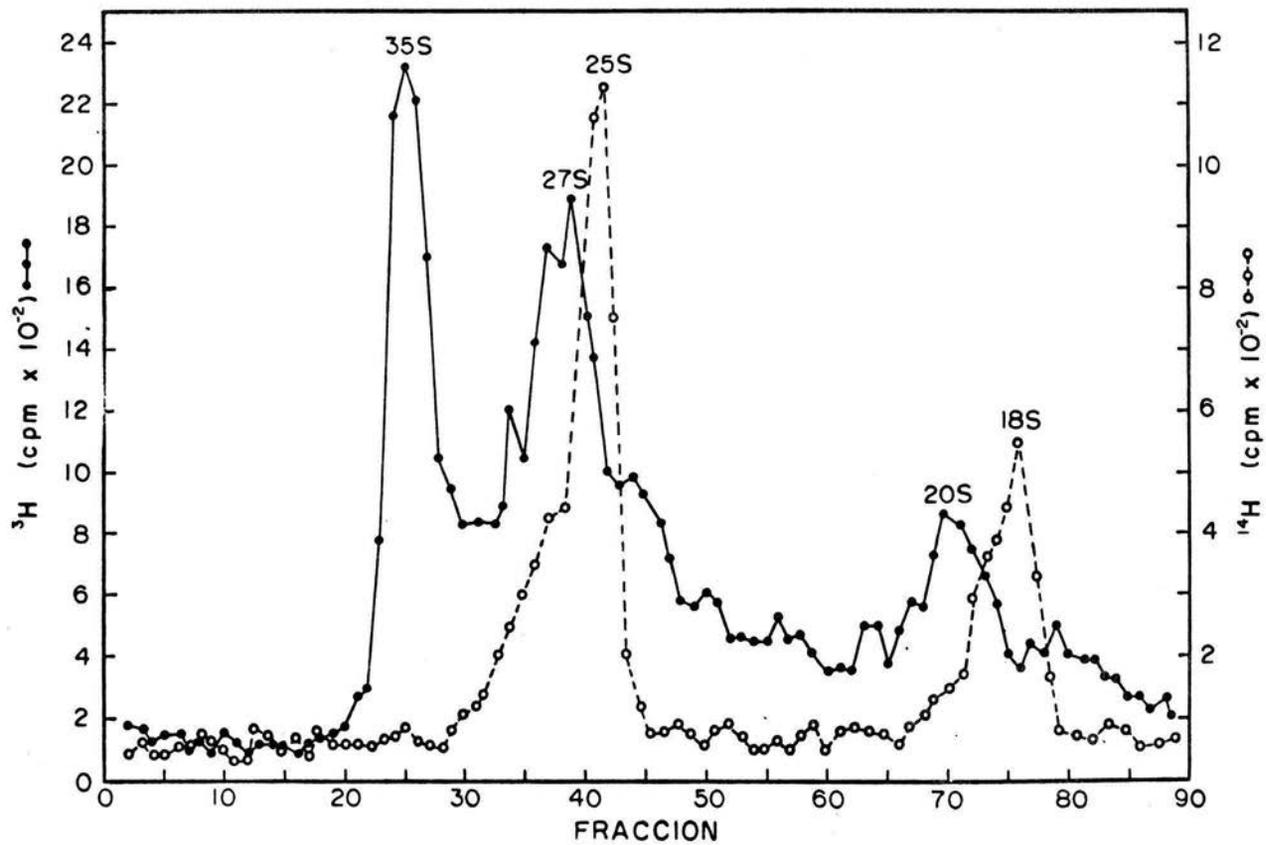


Fig. 6b.

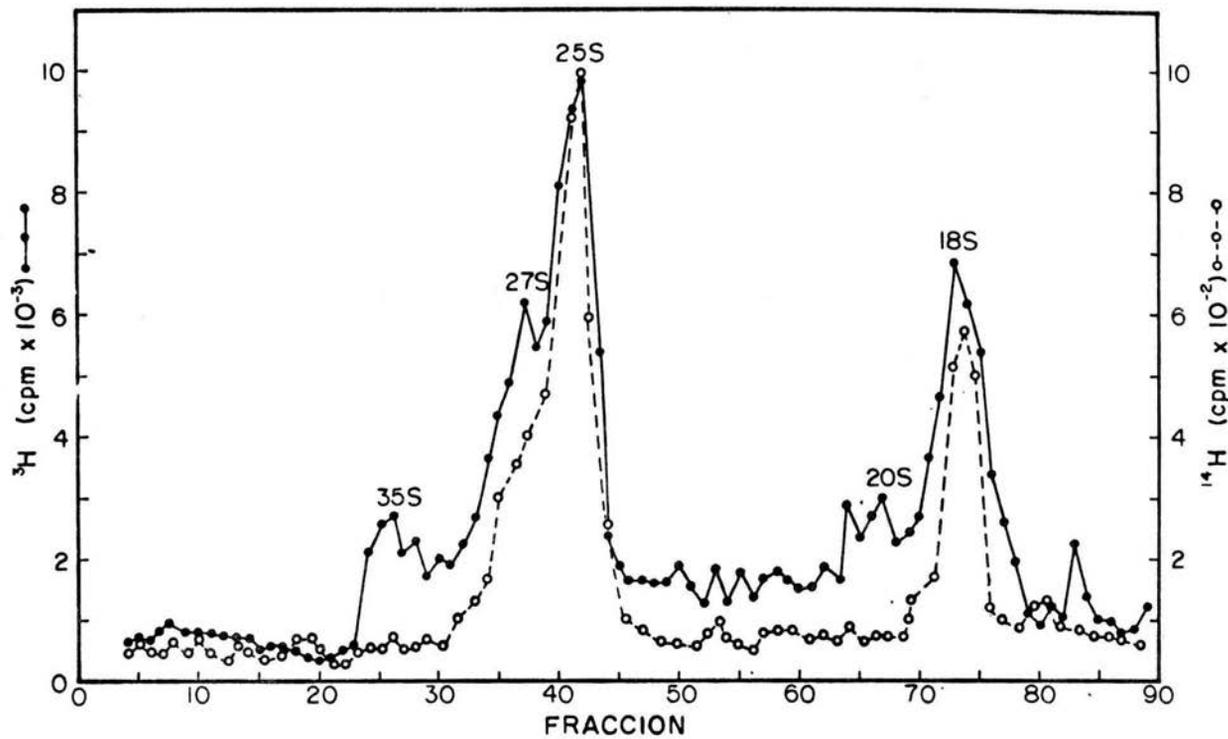


Fig. 6c.

ción de intrones (56, 57, 58, 59), lo cual explica que su presencia en los geles disminuya progresivamente hasta ocupar sólo el 20% del ARN total a 15 minutos del pulso con adenina- $^3\text{H}$  (Figs. 6b y 6c).

Como se mostrará a continuación, la incorporación de adenina y la maduración del ARN ribosomal, se encuentran modificadas en la cepa ts368 en condiciones restrictivas.

### 3) CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE ADENINA- $^3\text{H}$ A ESFEROPLASTOS DE LA CEPA ts 368.

El primer efecto generalizado de una mutación termosensible, se observa en la interrupción del crecimiento del cultivo en condiciones restrictivas. Para la mutante ts368, este efecto se muestra en la Figura 7. Las curvas de crecimiento se elaboraron midiendo fotocolorimétricamente la turbidez de los cultivos cada media hora durante un lapso de 8 horas. Como puede notarse, la mutación se refleja en la disminución paulatina del crecimiento del cultivo a 36°C, hasta prácticamente detenerse después de 5 horas. El aumento inicial en la velocidad de crecimiento, se debe a la aceleración del metabolismo celular a causa del aumento de la temperatura.

El efecto mutacional sobre la síntesis de los ácidos nucleicos, se pone de manifiesto cuando se sigue el curso de la incorporación de adenina- $^3\text{H}$  en condiciones restrictivas, según lo ilustra la Figura 8. La captación del precursor radioactivo a un cultivo de esferoplastos en fase de crecimiento exponen-

Fig. 7: Curva de crecimiento de la cepa ts368 a 23°C y a 36°C.

Un cultivo de la cepa ts368 crecido a 23°C hasta la fase de crecimiento exponencial, fué dividido en dos porciones iguales, una de las cuales se colocó a 36°C, dejando la otra a 23°C. El crecimiento de ambos cultivos se determinó midiendo su turbidez fotocolorimétricamente cada 30 minutos. —●— 23°C, ----○---- 36°C.

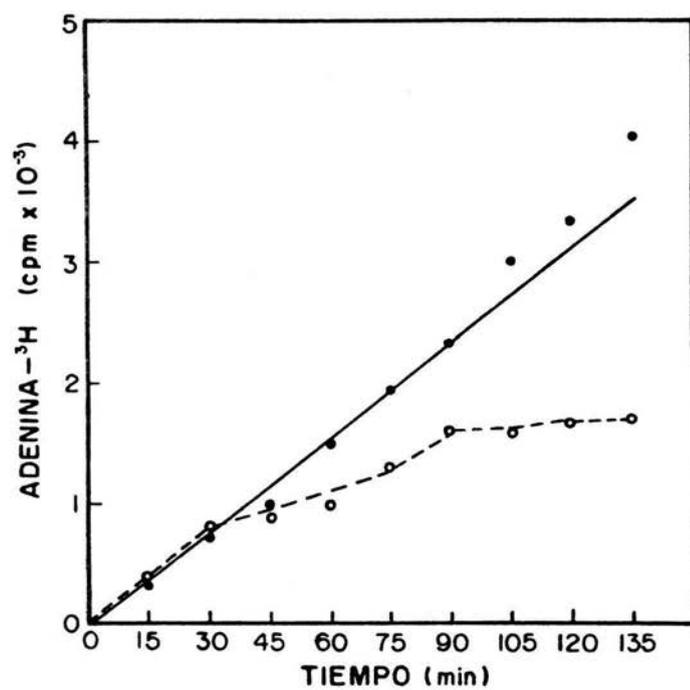


Fig. 7

Fig. 8: Incorporación de adenina a esferoplastos de la cepa ts368 a 23°C y a 36°C.

Se obtuvieron los esferoplastos de un cultivo de la cepa ts368 crecido a 23°C hasta la fase exponencial; se colocaron en medio SCM durante 2 horas a la misma temperatura. Posteriormente se agregaron 0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ . de adenina- $^3\text{H}$  e inmediatamente la mitad del cultivo fué trasladado a 36°C, manteniendo la mitad restante a 23°C. La radioactividad incorporada a las células se cuantificó cada 15 minutos como se indica en Material y Métodos. —●— 23°C, ----○---- 36°C.

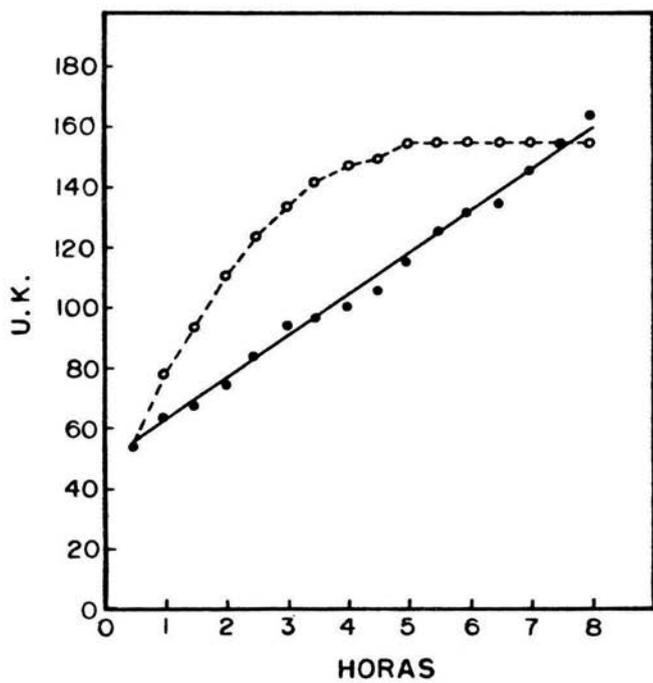


Fig. 8

cial a 23°C y a 36°C, cuantificada cada 15 minutos, muestra que, ya desde 30 minutos después del cambio de temperatura, la captación comienza a decrecer alcanzando solamente el 50% de incorporación en relación al control 90 minutos después. Por lo tanto, previamente a la interrupción del crecimiento del cultivo, el metabolismo de macromoléculas es severamente afectado en condiciones restrictivas a causa de la mutación. A continuación se mostrará un acercamiento a la naturaleza de dicho efecto.

#### 4) MADURACION DEL ARN RIBOSOMAL EN LA CEPA ts368 A 36°C.

Warner y Gorenstein (8) mostraron que la mutación en el genoma de la cepa ts368, ocasiona una inhibición casi completa y además, específica, de la síntesis de proteínas ribosomales. El análisis electroforético del ARN ribosomal durante sus etapas de procesamiento, ilustra el efecto de ésta inhibición sobre la producción de partículas ribosomales.

El ARN se marcó radioactivamente a tiempos cortos con adenina-<sup>3</sup>H en cultivos en fase exponencial de crecimiento. El ARN estable fué marcado con adenina-<sup>14</sup>C, agregandola al medio en el momento de inocular, con lo que se aseguró que se incorporara uniformemente durante el crecimiento del cultivo celular.

En la Figura 9a observamos de nuevo la aparición de los picos correspondientes a las especies de ARN 35S, 27S y 20S, precursores del ARN<sub>r</sub> maduro 25S y 18S, que concuerdan con los ya mostrados después de 1 minuto de marcaje en la Figura 6a. La Fi-

gura 9b ilustra el estado de maduración del ARNr después de 15 minutos de aplicada la adenina-<sup>3</sup>H. En ella notamos que los ARNr's precursores comprenden el 45% de la radioactividad total y que no hay radioactividad de <sup>3</sup>H en el ARN maduro 25S y 18S (compárese con la Figura 6c). Este resultado confirma la termosensibilidad de esa cepa en lo que respecta a la síntesis de ARN ribosomal maduro, caracter que conlleva a una inhibición de casi la mitad del proceso de maduración de los precursores ribosomales.

En cuanto al estado del ARN pequeño, la Figura 10 muestra que las especies 5.8S y 5S permanecen presentes, aunque en mucho menor proporción (13%) que el mismo ARN de células crecidas permanentemente a 23°C (29%), (ver Figura 3). No se conoce la razón de tal procesamiento residual; una posible explicación sería que la mutación ts368, sea del tipo denominado "leaky", o sea, que no se exprese en un 100% para el caso del ARNr 5.8S. Por otra parte, la síntesis del ARN 5S es independiente de la síntesis del ARN precursor 35S (60), por lo que la transcripción de sus genes podría no estar coordinada con la de éste.

Una vez establecidas las condiciones de manejo del ARN total y pequeño (extracción, marcaje radioactivo, separación en geles de poliacrilamida) y de utilización de la cepa ts368, se procedió a medir las secuencias de poliadenina como paso preliminar para examinar la presencia de ARNm en una muestra de ARN pequeño.

Figs. 9a y 9b: Síntesis de especies grandes de ARN por esferoplastos de la cepa ts368 a 37°C.

Se creció un cultivo hasta la fase exponencial a 23°C, en un volumen de 10 ml. en presencia de 1  $\mu$ Ci de adenina- $^{14}\text{C}$  para marcar el ARN estable. Después de obtener y recuperar los esferoplastos en medio con magnesio, las células se trasladaron a 37°C durante 90 minutos más. Se añadieron 25  $\mu$ Ci/ml. de adenina- $^3\text{H}$  y después de 1 y 15 minutos de adición de este último nucleótido, se tomaron alícuotas de 5 ml. del cultivo y la incorporación se detuvo vertiendo los esferoplastos en Sorbitol 1 M congelado y molido. Posteriormente, el ARN total fue extraído y analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 2.75%. La radioactividad se cuantificó en fracciones de 1 mm. de cada gel. —●—  $^{14}\text{C}$ , ----○----  $^3\text{H}$ .

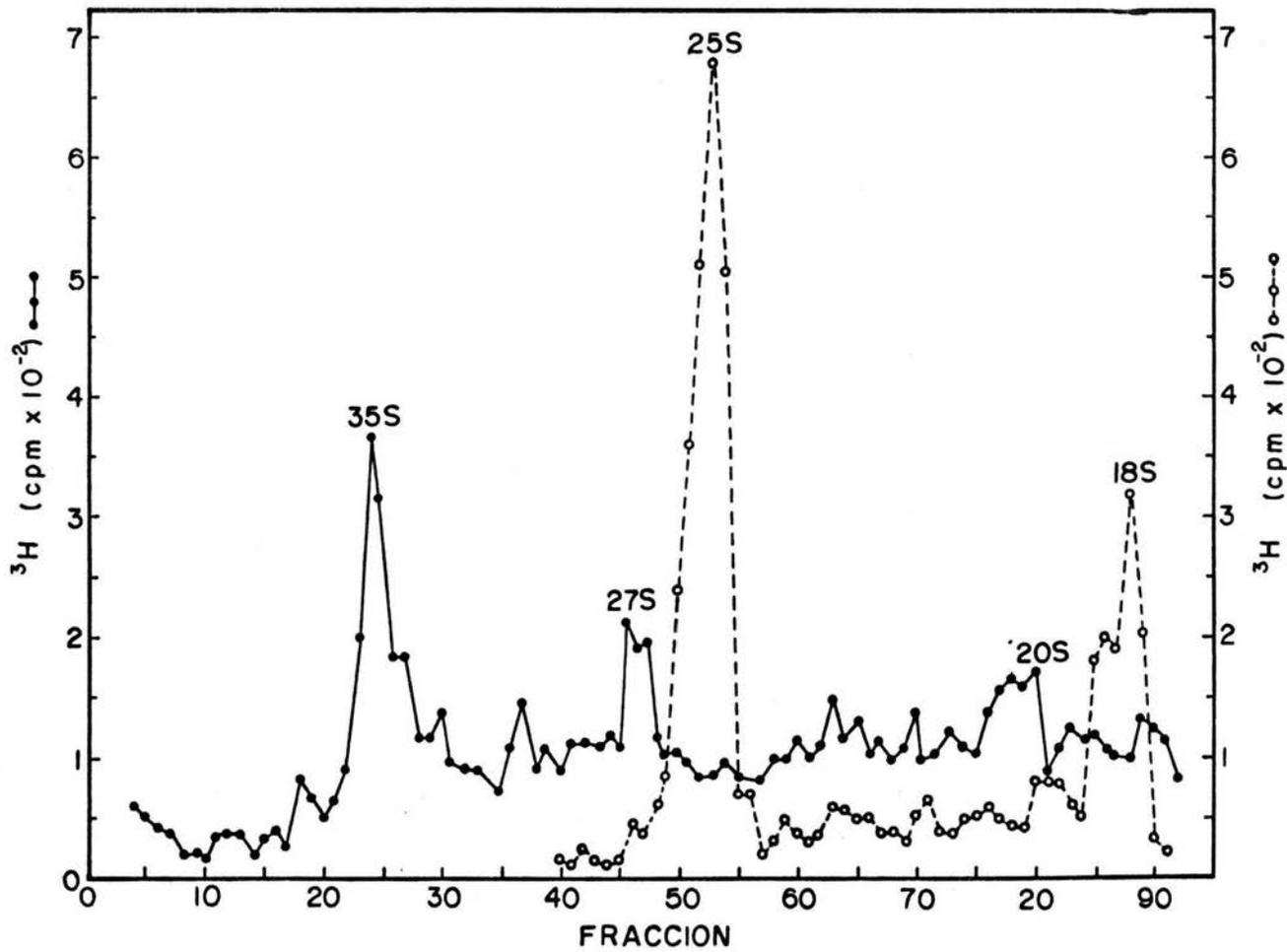


Fig. 9a.

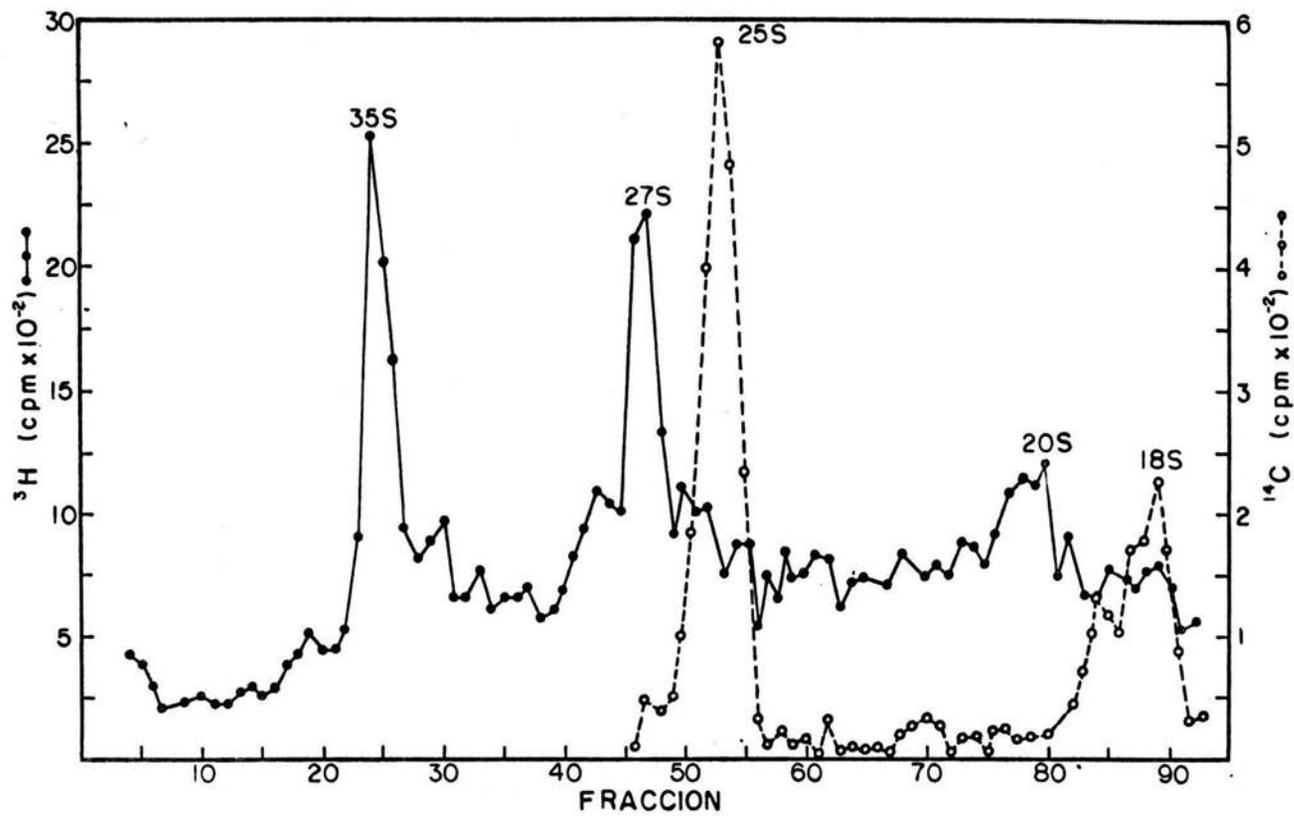


Fig. 9b.

Fig. 10: Patrón de ARN pequeño de la cepa ts368 a 36°C.

Un cultivo creciendo en fase exponencial a 23°C, fué colocado durante 2 horas a 36°C, añadiendo posteriormente 1  $\mu$ Ci/ml. de adenina-<sup>3</sup>H e incubando a esa temperatura durante 30 minutos más. Posteriormente las células se colectaron, se extrajo el ARN pequeño y se corrieron geles de poliacrilamida al 10%. La radioactividad se cuantificó en fracciones de 1 mm. del gel, como se describió en Material y Métodos.

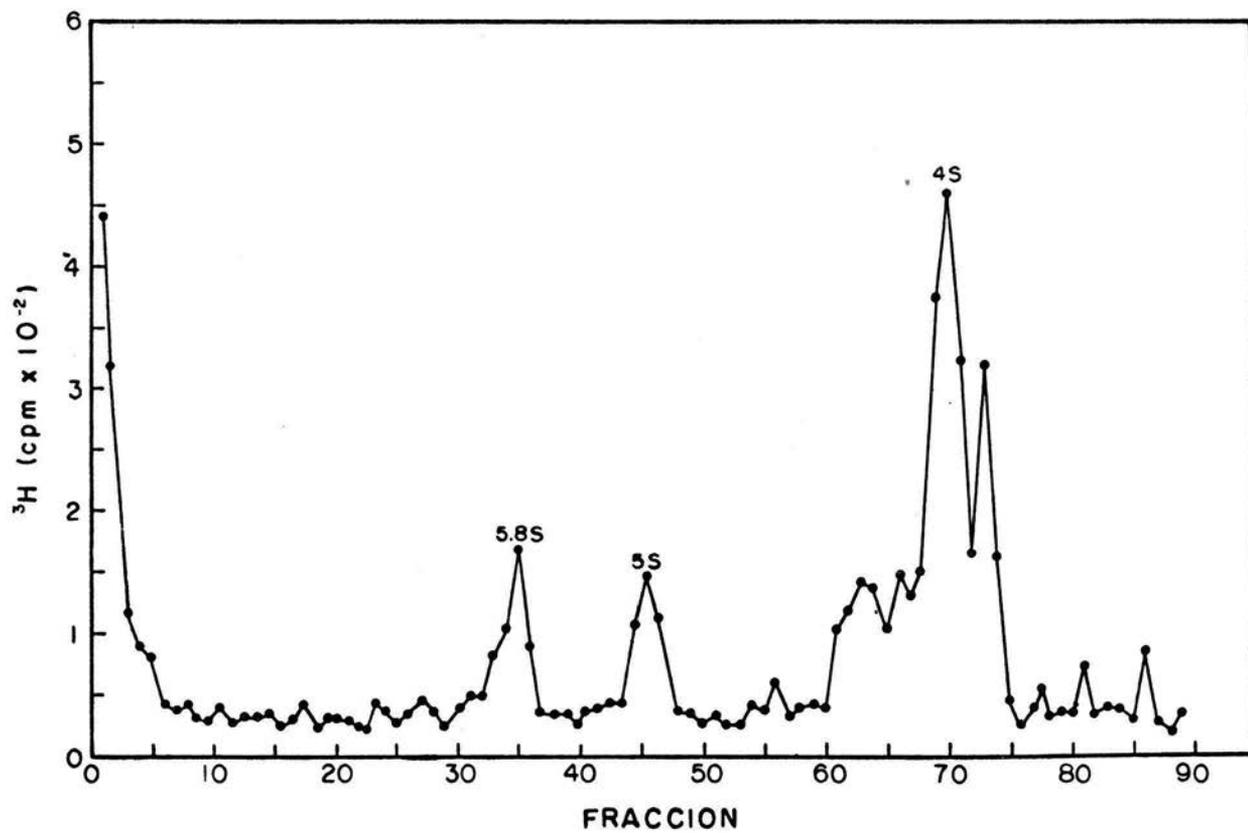


Fig. 10.

B) ENRIQUECIMIENTO PARA ARN PEQUEÑO A PARTIR DE CELULAS INTE-GRAS.

1) DETERMINACION DE SECUENCIAS POLIADENILADAS.

Un criterio para identificar un ARN mensajero en células eucarióticas, es la presencia, en la cadena nucleotídica, de una secuencia de ácido poliadenílico de aproximadamente 50-150 bases cerca del extremo 3' (61,62). La resistencia de estas secuencias a la digestión por las ribonucleasas A y T1 bajo condiciones específicas (46), se utilizó para medir la proporción en que se encuentran en muestras de ARN pequeño de levaduras. La Tabla 3 muestra el porcentaje de radioactividad de adenina-<sup>3</sup>H en el ARN obtenido de un cultivo crecido en presencia del nucleótido marcado desde el momento de la inoculación en el medio de cultivo. Las muestras de ARN tratadas y sin tratar con las enzimas mencionadas, se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.4  $\mu$ m. Las secuencias de ARN no hidrolizado son retenidas en los filtros, por lo que la radioactividad del ARN no expuesto a las enzimas se tomó como el 100%. Podemos notar que, con y sin incubación a 36°C, al ARN es digerido en presencia de las enzimas y que el porcentaje de radioactividad retenida en los filtros es de aproximadamente 4%. Por estos resultados, puede afirmarse que hay ARN poli-A<sup>+</sup> (probablemente ARN mensajero) y que las secuencias poliadenílicas incorporan alrededor del 4% de la radioactividad total que se extrae como ARN pequeño.

TABLA 3: CONTENIDO DE SECUENCIAS DE POLIADENINA  
EN EL ARN PEQUEÑO.

| Tratamiento                               | c.p.m.<br>retenidas <sup>a</sup> | %   |
|---|----------------------------------|-----|
| ARN/36°, 30 min./TCA <sup>b</sup>         | 30673                            | 100 |
| ARN/ARasas <sup>c</sup> /TCA/36°, 30 min. | 1174                             | 3.8 |
| ARN/ARasas/36°, 30 min./TCA               | 1267                             | 4.1 |

<sup>a</sup>Se utilizaron filtros de nitrocelulosa (Millipore; diámetro del poro: 0.4 um.)

<sup>b</sup>El TCA se utilizó para detener la reacción y precipitar los oligonucleótidos.

<sup>c</sup>ARasa A: 1 ug./ml.; ARasa T1: 10 unidades/ml.

Habiendo confirmado la presencia de una cantidad significativa de poli-A<sup>+</sup> en el ARN extraído de células íntegras, el paso siguiente consistió en la separación de los probables ARN's mensajeros que las contienen, recurriendo para ello a la cromatografía de afinidad en columnas de celulosa-oligo-dT.

2) SEPARACION DEL ARN MENSAJERO EN COLUMNAS DE CELULOSA OLIGO-dT.

Las secuencias poliadenílicas, probablemente unidas a ARNm, fueron separadas por cromatografía de afinidad, en columnas compuestas por gránulos de celulosa que contienen cadenas de poli-timina inmovilizadas. La formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias timina y adenina, da lugar a la adsorción, en la columna, de las moléculas que contienen las cadenas de poli-A.

Las muestras de ARN total y pequeño se aplicaron disueltas en una solución amortiguadora con SDS y alto contenido de sales, con el objeto de aumentar la fuerza iónica del medio y favorecer así las interacciones moleculares.

Las fracciones 1, 2, 3 y 4, se colectaron 20 minutos después de aplicada la muestra, correspondiendo al ARN no retenido en las columnas. La fracción 5 se obtuvo lavando a baja fuerza iónica, por lo que está constituida por trazas de ARN no adsorbido. El ARN retenido en las columnas, se eluyó con una solución amortiguadora sin sales ni SDS, formando las fracciones

6, 7 y 8.

El perfil de elución del ARN total de la cepa A364A, se muestra en la Figura 11. El primer pico, con el 45% de la radioactividad total, corresponde al ARN no retenido en la columna y concentrado en la fracción 1. El 54.7% de la radioactividad total se encuentra en la fracción 6, correspondiente al ARN que sí fué adsorbido y que por lo tanto se encuentra enriquecido para ARN poli-A<sup>+</sup>. El análisis electroforético de éstas fracciones está mostrado en las Figuras 12a y 12b. Podemos ver que el 61% de la radioactividad de la fracción 1, se encuentra en las especies ribosomales maduras 25S y 18S. En la fracción 6, éstas representan sólo el 39% de la radioactividad total, constituyendo el resto moléculas de ARN mensajero de tamaño heterogéneo. Para conseguir una mejor purificación, ésta fracción fué sometida nuevamente a cromatografía a través de una segunda columna, cuyo perfil de elución se muestra en la Figura 13. En este caso, se consiguió obtener 71% de ARN en la fracción 6 y 29% en la fracción 1. La Figura 14 presenta el análisis electroforético de la fracción 6 de esta última separación y en ella no se observan ya los picos de ARN ribosomal; el contenido de ARN mensajero en esta fracción es de un 96%.

El mismo tratamiento fué llevado a cabo para el ARN pequeño, según se muestra en las Figuras 15, 16a y 16b. La figura 15 ilustra el perfil de elución de la columna de afinidad, el cual se distribuyó en 71% de ARN no adsorbido (fracción 1) y 29% de poli-A<sup>+</sup> (fracción 6). El análisis electroforético reveló

Fig. 11: Fraccionamiento del ARN total de la cepa ts368.

El ARN disuelto en una solución amortiguadora con SDS y LiCl 5 M, se aplicó a una columna de celulosa oligo-dT como se indica en Material y Métodos. Las fracciones 1 a 4 se colectaron utilizando la misma solución. La fracción 5 se obtuvo lavando la columna con una solución sin SDS y 0.15 M de LiCl. Las fracciones 6, 7 y 8, se obtuvieron lavando con una solución amortiguadora sin SDS y sin LiCl. Región A: ARN no retenido. Región B: ARN adsorbido a la celulosa oligo-dT.

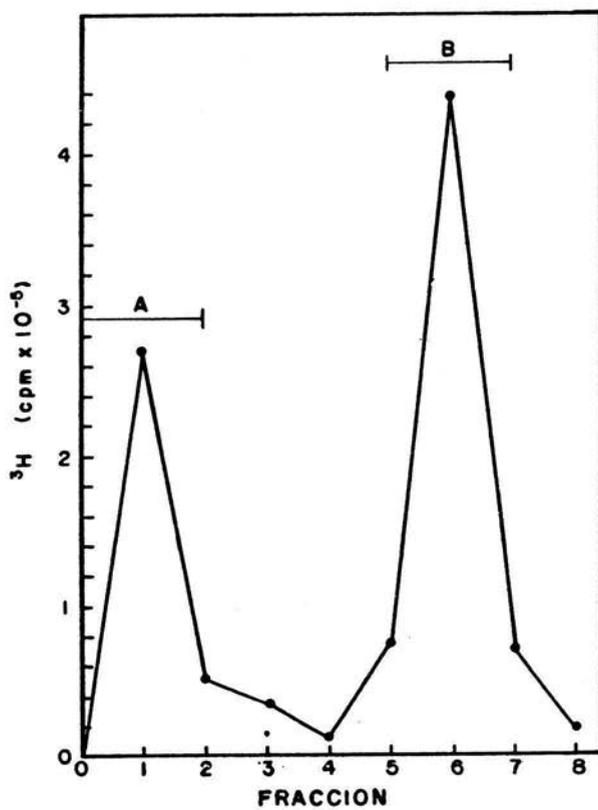


Fig. 11.

Fig. 12: Electroforesis de las fracciones 1 (recuadro a) y 6 (recuadro b), del ARN total de la cepa A364A, eluidas de la columna de celulosa oligo-dT, correspondientes a las regiones A y B, respectivamente, de la figura 11.

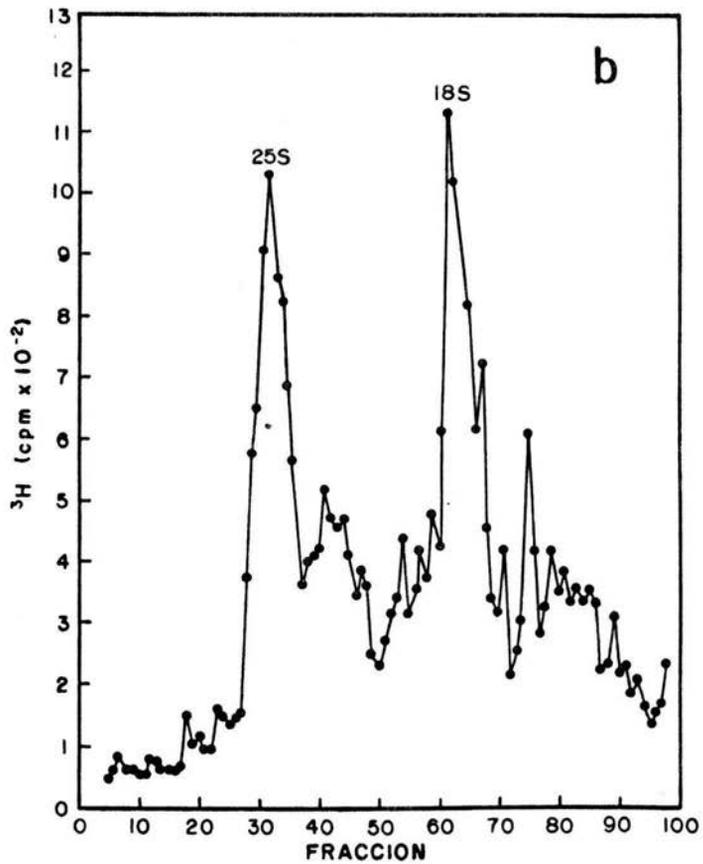
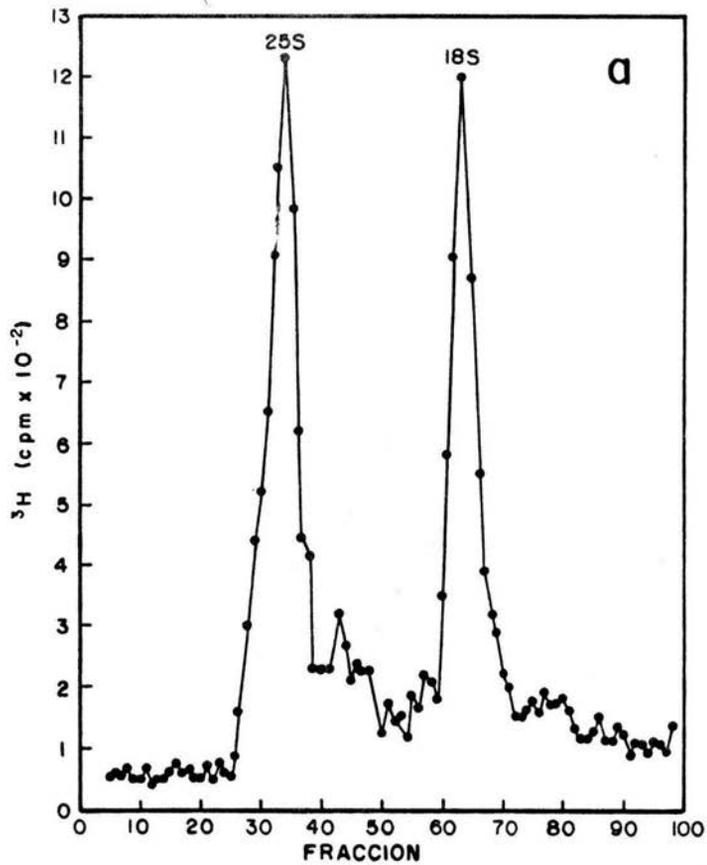


Fig. 12.

Fig. 13: Perfil de elución de la recromatografía de la región b de la Figura 11.

El ARN retenido en la columna (región b), se precipitó y redisolvió en la solución amortiguadora de unión, para ser sometido nuevamente al fraccionamiento en una columna de celulosa oligo-dT.

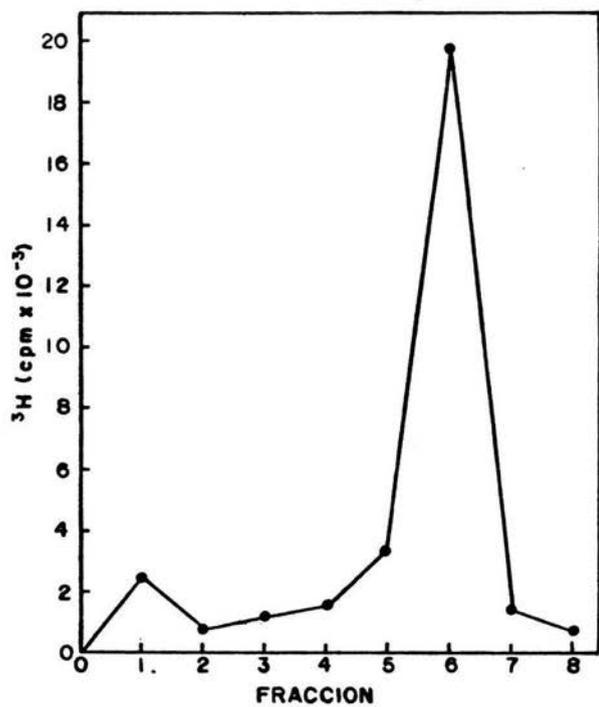


Fig. 13.

Fig. 14: Electroforesis del ARN poli-A<sup>+</sup>

Análisis del ARN obtenido en la fracción 6 de la Figura 13, en un gel de poliacrilamida al 2.75%.

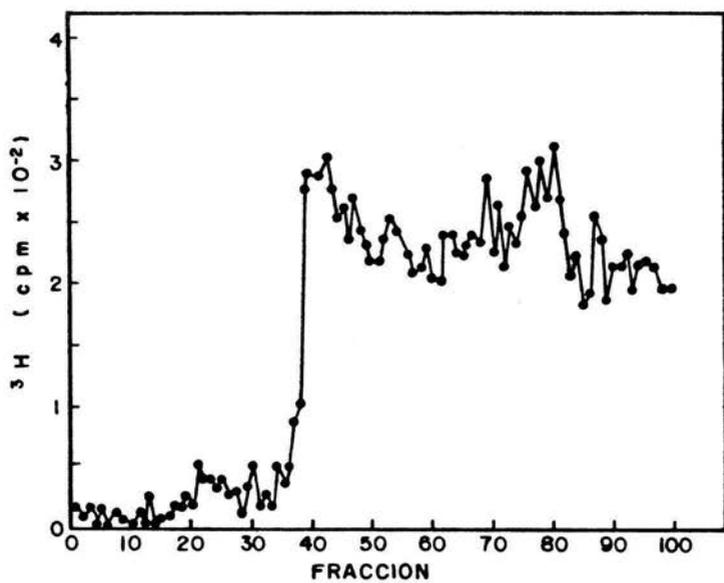


Fig. 14

Fig. 15: Fraccionamiento del ARN pequeño de la cepa A364A.

El ARN extraído de células íntegras, se sometió a cromatografía a través de una columna de celulosa oligo-dT como se indica en Material y Métodos. La fracción 6 constituye el ARN adsorbido en la columna y eluido con una solución amortiguadora con baja fuerza iónica.

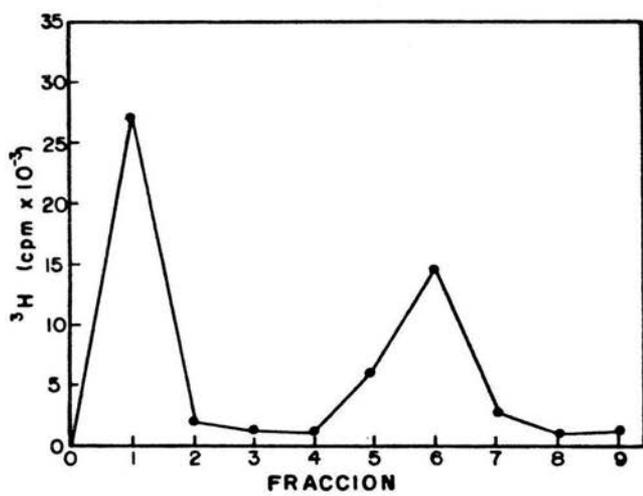


Fig. 15

Fig. 16: Electroforesis de las fracciones 1 (recuadro a) y 6 (recuadro b) de la figura 11.

Análisis en geles de poliacrilamida, del ARN pequeño obtenido en la fracción 1 (no adsorbido en la columna) y en la fracción 6 (ARN pequeño poli-A<sup>+</sup>).

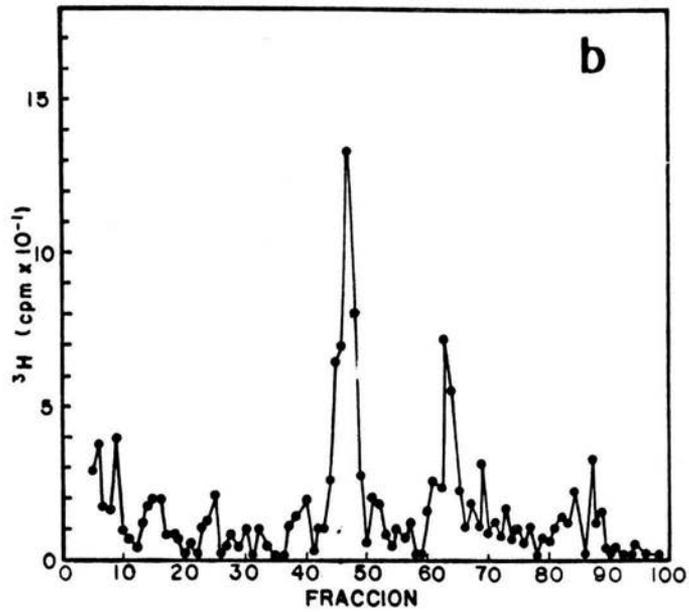
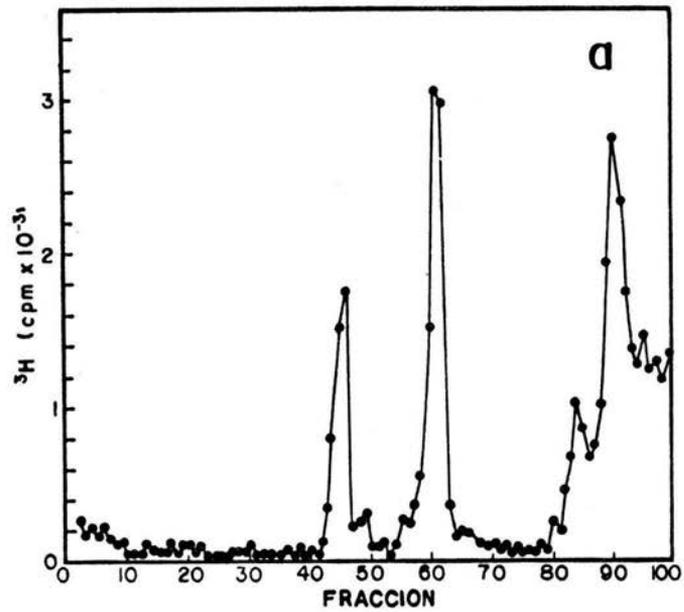


Fig. 16.

que la fracción 1 (Figura 16a) está constituida, en un 88%, de ARN ribosomal 5.8S, 5S y ARN de transferencia (región de 4S). Es notable que en la fracción 6 (Figura 16b), el ARN de transferencia es absolutamente eliminado, no así el ARN ribosomal 5.8S y 5S, del cual se observan aún picos prominentes que representan el 40% del ARN total en la fracción y el 11% del ARN inicialmente extraído. No obstante, se obtuvo un significativo aumento para ARN mensajero, ya que constituyó el 60% de las cuentas de radioactividad totales en ésta fracción.

En suma, después de calcular el porcentaje del ARNm obtenido en relación al ARN inicialmente extraído, el enriquecimiento para ARN mensajero fué como sigue:

|             | % ARNm inicial<br>(calculado) | % ARNm final<br>(obtenido) |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|
| ARN total   | 38.8                          | 100                        |
| ARN pequeño | 17.2                          | 60                         |

3) TRADUCCION "in vitro".

La integridad funcional del ARN obtenido a partir de células completas y enriquecido para ARNm, se demostró por su capacidad para servir como templado para la síntesis de proteínas, en un sistema de traducción "in vitro" libre de células. Dicho sistema, consistente en un lisado de reticulocitos de conejo, no contiene ARN endógeno debido a la presencia de una nucleasa dependiente de calcio. La síntesis de proteínas "in vitro", se midió cuantificando la incorporación de metionina-<sup>35</sup>S a macromoléculas, como material TCA-precipitable, como se describe en Material y Métodos.

La Tabla 4 muestra la incorporación de metionina-<sup>35</sup>S por microgramo de ARN total y pequeño no enriquecido para ARNm. Podemos notar que la eficiencia de traducción del ARN total, es casi 4 veces mayor que la del ARN pequeño. La Tabla 5 muestra el resultado de la traducción, utilizando como templado las fracciones enriquecidas para ARNm. Aunque el ARNm total sólo exhibe un incremento del 50% con respecto al ARN correspondiente no enriquecido, para el ARN pequeño éste incremento es de aproximadamente 5 veces.

El análisis electroforético de los productos de la traducción se realizó en un gel de isoelectroenfoque, el cual se sometió posteriormente a autorradiografía como se indica en Material y Métodos. No se observó ningún componente en la "zona ácida" del gel, mientras que en la "zona básica" se pudieron detectar productos de traducción no identificados. La mayor parte

TABLA 4: TRADUCCION "in vitro".<sup>a</sup>

| TEMPLADO                  | c.p.m./ $\mu$ l.<br>mezcla de incubaci3n | c.p.m.- basal | c.p.m./ $\mu$ g.<br>ARN |
|---------------------------|--|---------------|-------------------------|
| H <sub>2</sub> O          | 289                                      | 0             | 0                       |
| TMV <sup>b</sup>          | 5680                                     | 5391          | N.D. <sup>c</sup>       |
| 4 $\mu$ g.<br>ARN total   | 11224                                    | 10935         | 2733                    |
| 2 $\mu$ g.<br>ARN total   | 6892                                     | 6603          | 3301                    |
| 3 $\mu$ g.<br>ARN peque1o | 2733                                     | 2444          | 814                     |

<sup>a</sup>Se emple3 un sistema libre de c3lulas derivado de reticulo-  
citos de conejo. La temperatura de incubaci3n fue de 30°C.

<sup>b</sup>Virus del mosaico del tabaco.

<sup>c</sup>N.D.= No determinado.

TABLA 5: TRADUCCION "in vitro".

| TEMPLADO                   | c.p.m./ $\mu$ l.<br>mezcla de incubación | c.p.m.- basal | c.p.m./ $\mu$ g.<br>ARN |
|----------------------------|--|---------------|-------------------------|
| H <sub>2</sub> O           | 3234                                     | 0             | 0                       |
| TMV                        | 37093                                    | 33859         | N.D.                    |
| 4 $\mu$ g.<br>ARN total    | 5236                                     | 2002          | 500                     |
| 2 $\mu$ g.<br>ARN total    | 5594                                     | 2360          | 1180                    |
| 5 $\mu$ g.<br>ARN pequeño  | 4750                                     | 1516          | 303                     |
| 3 $\mu$ g.<br>ARN pequeño  | 5302                                     | 2068          | 689                     |
| 2 $\mu$ g.<br>mARN pequeño | 6876                                     | 3642          | 1821                    |
| 1 $\mu$ g.<br>mARN total   | 5015                                     | 1781          | 1781                    |

de estos productos son, muy probablemente, correspondientes a las proteínas ribosomales básicas, las cuales componen la mayor parte de los péptidos del ribosoma (Fig. 17). Consideramos que la cantidad de proteínas ribosomales ácidas sintetizadas fué sumamente pequeña, dado que no se detectaron en el gel. Es probable que la aplicación de la muestra en el gel en presencia de proteínas ácidas exógenas no marcadas radioactivamente, cuya función sería la de "acarreadoras", facilite la visualización de dichas proteínas en el gel.

Fig. 17: Electroforesis en un gel de isoelectroenfoque de los productos de la traducción "in vitro". (1) 2  $\mu$ g. mRNA pequeño, (2) TMV, (3) 3  $\mu$ g. RNA pequeño, (4) 2  $\mu$ g. ARN total, (5) 4  $\mu$ g. RNA total.

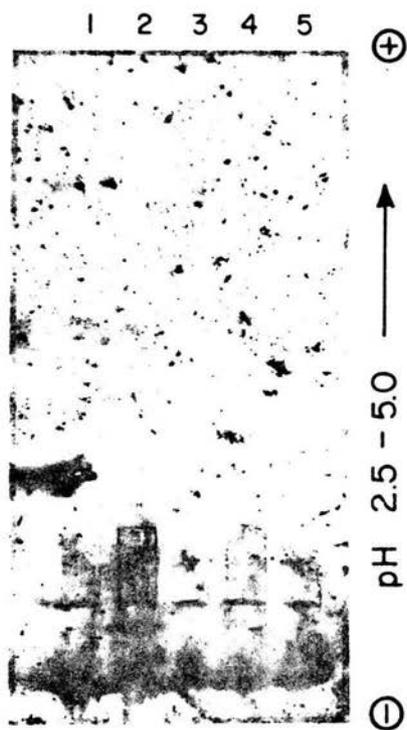


Fig. 17

## VII. DISCUSION

El advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, ha hecho posible la elaboración de estudios detallados acerca de los mecanismos regulatorios que gobiernan la expresión genética en una gran cantidad de organismos, principalmente procariontes. En eucariontes, la complejidad de estos procesos es mayor, tal como lo demuestran numerosos estudios realizados en Xenopus (63), Drosophila (64, 65), ratón (66) y levaduras (67, 68, 69). Varios son los factores que determinan ésta circunstancia: a) el genoma más abundante por un factor de 2 o 3 órdenes de magnitud; b) cromosomas con una compleja composición y estructura molecular; c) la presencia de la membrana nuclear, la cual separa el ADN del citoplasma; d) la naturaleza monocistrófica de los genes y e) la especialización funcional de las células en los organismos pluricelulares.

La obtención de moléculas de ARNm de proteínas específicas, es importante porque representa el paso inicial de los métodos de manipulación genética a nivel molecular, que hacen posible el acceso directo al estudio de los fenómenos que rigen la expresión de genes determinados.

A lo largo del desarrollo experimental del presente trabajo, hemos apreciado la utilidad de las levaduras como un modelo en el cual es posible realizar estudios en un sistema con organización eucariótica, valiéndonos de las técnicas más o menos simples utilizadas para los microorganismos procariontes. El es

tudio de los ácidos nucleicos, en particular, está facilitado por la capacidad de las levaduras de metabolizar rápidamente nucleótidos radioactivos administrados en forma exógena.

La existencia de mutantes termosensibles que manifiestan inhibición de la síntesis de la mayor parte del ARNm de las proteínas ribosomales, da pie a la hipótesis de un mecanismo regulatorio que actúa coordinadamente sobre casi la totalidad de dichas proteínas (7). La ausencia de tal control sobre algunos componentes ribosomales (las proteínas ácidas) (41), sugiere una forma diferente de regulación para la expresión de éstas, a la vez que proporciona un elemento de utilidad para su estudio. En este sentido, la cepa ts368 de S. cerevisiae se ha propuesto, en este trabajo, para la obtención de ARN mensajero pequeño después de mantener los cultivos a la temperatura restrictiva. El abatimiento en la producción de ARNm para el resto de las proteínas ribosomales en estas condiciones, así como la obtención directa del ARN pequeño a partir de células íntegras, son factores que, desde el primer paso, restringen el rango de variabilidad de las moléculas extraídas, simplificando así el procedimiento general.

La característica que originalmente fué propuesta como distintiva de la mutante ts368 con respecto a la cepa silvestre, es la interrupción del procesamiento normal del ARNr precursor. La permanencia de éste rasgo en la cepa mutante a nuestra disposición, se corroboró por medio de experimentos de "pulso y caza" con adenina-<sup>3</sup>H, la cual se aplicó directamente al me

dio de cultivo (Figs. 9a y 9b). El ARNr precursor, sólo completa el 50% de su procesamiento en condiciones restrictivas.

No se conocen aún con certeza las causas de la interrupción. Es conocido que, al inhibir la metilación del ARNr, se inhiben también algunos estados de la maduración del ARNr, ya que varios intermediarios poco metilados se acumulan en el núcleo de células ováricas de hamster en cultivo (73), sugiriendo que la maduración del ARN y su transporte desde el núcleo al citoplasma están estrechamente relacionados. Por otra parte, los trabajos de Warner y Gorenstein (8), han mostrado que la síntesis de proteínas ribosomales en la cepa ts368, se encuentra reprimida en un 80% a 90% comparada con la síntesis de la proteína celular total. Rosbash y sus colaboradores (70), encontraron que, a la temperatura restrictiva, la mutante ts368 muestra aumento de ARNm's de alto peso molecular, los cuales fueron identificados como complementarios a segmentos genómicos de algunas proteínas ribosomales incorporadas en plásmidos. Estos transcritos diferían del ARNm maduro por la presencia de un intrón. Notaron además que el aumento en la concentración del ARNm precursor, es paralelo a la disminución en la concentración de ARNr maduro. Por lo tanto, sugieren que el efecto de la mutación (denominada rna  $\bar{2}$ ), puede ser a nivel postranscripcional, modificando el procesamiento del ARNm de las proteínas ribosomales, aunque aún es necesario confirmarlo para muchas más proteínas de esa familia.

Trabajos anteriores habían mostrado la presencia de mRNA de proteínas ribosomales en el ARN de bajo peso molecular (43,

71, 72). Sin embargo, la extracción de ARN pequeño a partir de células íntegras, había sido utilizada solamente para la obtención de las especies ribosomales 5.8S, 5S y ARN de transferencia (60). No se había examinado, en levaduras, la presencia de ARNm en ésta fracción. En el presente trabajo, hemos demostrado la presencia de ARNm's funcionales, los cuales contienen 4% de segmentos poli-A<sup>+</sup> (Tabla 3) y que presentan una subsecuente afinidad a columnas de oligo-dT-celulosa (Fig. 15). La evidencia conclusiva de que se trata de moléculas funcionales, la constituye su capacidad para servir como templado en un sistema de traducción "in vitro" (Tabla 5).

Dentro del rango de tamaño del ARN obtenido por extracción fenólica a partir de células íntegras, están comprendidas las moléculas con un coeficiente de sedimentación menor de 8S (Fig. 16b), las cuales incluyen los ARN's 5.8S, 5S y 4S (ARNt) y ARN mensajero de proteínas con un peso molecular posiblemente menor de 17,000 daltones. Dentro de éste rango se encuentran muchas proteínas ribosomales tanto de la subunidad pequeña como de la subunidad grande del ribosoma, incluyendo el ARNm de las proteínas ácidas.

El abatimiento de la síntesis del ARNm de éstas proteínas ribosomales en la mutante ts368 (salvo, entre otros, el correspondiente a las proteínas ácidas, abre la posibilidad de obtener, en dos pasos metodológicos, una fracción de ARN enriquecida para ARNm de las proteínas ácidas, esto es, la extracción del ARN de levaduras completas de la cepa ts368 crecida a 37°C

y la posterior eliminación de las especies ribosomales y de transferencia por cromatografía en columnas de celulosa oligodT.

Actualmente, resultados obtenidos por Zinker y Márquez (73), muestran que la extracción del ARN pequeño de S. cerevisiae por extracción fenólica a 60°C, permite una mejor permeabilización de la pared celular de las levaduras, produciendo un rendimiento mas alto de ARN ribosomal que por método inicial de extracción a 45°C. Este ARN pequeño, no enriquecido para ARN-poli-A<sup>+</sup>, posee buena eficiencia de incorporación de aminoácidos marcados a macromoléculas, en un sistema de traducción "in vitro", pudiendo detectarse algunos productos de dicha traducción por electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (en estas condiciones, todas las proteínas tienen carga negativa y por lo tanto migran en la misma dirección). Se pudo observar la presencia de una proteína radioactivamente marcada que migra en el área del peso molecular de las proteínas ácidas. Estos resultados permiten suponer que la extracción fenólica de ARN a 60°C a partir de células íntegras, permite obtener una cantidad mayor de las moléculas que se extraen por el mismo procedimiento a 45°C, y que éstas pueden ser utilizadas próximamente para la localización del DNA correspondiente, mediante las técnicas de hibridización actuales.

### VIII. CONCLUSIONES

1. El ARN ribosomal precursor de la cepa ts368, solamente completa el 50% de su procesamiento en condiciones restrictivas.
2. La síntesis de proteínas ribosomales es una condición necesaria para que el curso de la maduración del ARN ribosomal se efectúe normalmente.
3. La unión de fragmentos de ARN a secuencias de oligotimina, demuestra la presencia de secuencias poliadeniladas en el ARN pequeño extraído de células íntegras. Estas secuencias constituyen el 4% del total de ARN pequeño extraído, medido como material resistente a las nucleasas A y T1.
4. El ARN poli-A<sup>+</sup> extraído de células íntegras, es capaz de servir como templado para la síntesis de proteínas en un sistema de traducción "in vitro".
5. Por cromatografía de afinidad, se enriqueció 2.8 veces la cantidad de ARN mensajero total y 3.5 veces la de ARN mensajero pequeño.

REFERENCIAS

1. De Robertis, E. (1980). Cell and molecular biology. Ed. De Robertis E. Saunders College, Phi. 7a. ed.
2. Liljas, A. (1982). Structural studies of ribosomes. Biophys. Mol. Biol. 40: 161-171.
3. Wool, I. G. (1979). The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48: 719-754.
4. Walker, W. F. (1981). Proposed sequence homology between the 5'-end regions of prokaryotic 23S rRNA and eukaryotic 28S rRNA. Relevance to the hypothesis that 5.8S rRNA is homologous to the 5'-end region of 23S rRNA. FEBS Lett. 126: 150-151.
5. Wu, S. R. (1972). The formation of ribosomes in HeLa cells: a model for nucleocytoplasmic interaction. Tesis Doctoral. Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, N. Y.
6. Warner, J. R. (1977). In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. J. Mol. Biol. 115: 315-333.
7. Gorenstein, C y Warner, J.R. (1977). Synthesis and turnover of ribosomal proteins in the absence of 60S subunit assembly in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 157: 327-332.
8. Warner, J. R. y Gorenstein, C. (1977). The synthesis of eukaryotic ribosomal proteins "in vitro". Cell 11: 201-212.
9. Welfle, H., Stahl, J. y Bielka, H. (1972). Studies on proteins of animal ribosomes. XIII. Enumeration of ribosomal proteins of rat liver FEBS Lett. 26: 228-232.

10. Howard, G.A., Traugh, J.A., Croser, E.A. y Traut, R. R. (1975). Ribosomal proteins from rabbit reticulocytes: number and molecular weights of proteins from ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* 93: 391-404.
11. Zinker, S. y Warner, J. R. (1976). The ribosomal proteins of Saccharomyces cerevisiae. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J. Biol. Chem.* 251: 1799-1807.
12. Leister, D. E. y Dawid, I. B. (1974). Physical properties and protein constituents of cytoplasmic and mitochondrial ribosomes of Xenopus leavis. *J. Biol. Chem.* 249: 5108-5118.
13. Hanson, M. R., Davidson, J. N., Mets, L. J. y Bogorad, L. (1974). Characterization of chloroplast and cytoplasmic ribosomal proteins of Chlamydomonas reinhardi by two-dimensional gel electrophoresis. *Molec. Gen. Genet.* 132: 105-118.
14. Kaltschmidt, E. y Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for finger printing of ribosomal proteins. *Anal. Biochem.* 36: 401-412.
15. Stoffler, G. (1974). En Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, (Eds. M. Nomura, A. Tissieres y P. Lengyel). Long Island, N. Y.
16. Wittmann, H. G. y Wittmann-Liebold, B. (1974). En Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, (Eds. M. Nomura, A. Tissieres y P. Lengyel). Long Island, N. Y.
17. Terhost, C., Wittmann-Liebold, B. y Möller, W. (1972). 50S ribosomal proteins. Peptide studies on two acidic proteins, A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>, isolated from 50S ribosomes of Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* 25: 13-19.
18. Petterson, I., Hardy, S. J. S. y Liljas, A. (1976). The ribosomal protein L8 es a complex of L7/L12 and L10. *FEBS Lett.* 64: 135-138.

19. Mora, G., Donner, D., Thammanna, P., Lutter, L., Kurland, C. G. y Craven, G. R. (1971). Purification and characterization of 50S ribosomal proteins of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 112: 229-242.
20. Subramanian, A. R. (1974). Sensitive separation procedure for Escherichia coli ribosomal proteins and the resolution of high-molecular weight components. Eur. J. Biochem. 45: 541-546.
21. Zimmermann, R.A. y Soffler, G. (1976). Purification of proteins from the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli by ion-exchange chromatography. Biochem. 15: 2007-2017.
22. Matheson, A. T., Möller, W., Amons, R. y Yaguchi, M. (1980). Comparative studies on the structure of ribosomal proteins, with emphasis on the alanine-rich, acidic ribosomal "A" protein. En Ribosomes, structure, function and genetics. University Park Press (Eds. Chamblis, G., Craven, G. R., Davies, J., Davies, K., Kahan, L. y Nomura, M.) Baltimore.
23. Hardy, S. J. S. (1975). The stoichiometry of the ribosomal proteins of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 140: 253-274.
24. Subramanian, A. R. (1975). Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of Escherichia coli ribosome. J. Mol. Biol. 95: 1-8.
25. Subramanian, A. R. (1980). Evidence of a repeated protein structure in the 30S subunit of Escherichia coli ribosome. J. Biol. Chem. 255: 6941-6946.
26. Warner, J. R. (1966). The assembly of ribosomes in HeLa cells. J. Mol. Biol. 19: 383-398.
27. Kabat, D. (1970). Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. Biochem. 9: 4160-4175.

28. Gressner, A. M. y Wool, I. G. (1974). Phosphorylation of liver ribosomal proteins "in vivo". Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. J. Biol. Chem. 249: 6917-6925.
29. Trough, J. A. y Porter, G. G. (1976). Biochem. 15: 6110-6119.
30. Rankine, A. D. y Leader, D. P. (1975). The phosphorylation of ascites cell ribosomes "in vivo": identification of a phospholylated protein of the small ribosomal subunit by two-dimensional gel electrophoresis. FEBS Lett. 52: 284-287.
31. Lastick, S. M., Nielsen, P. J. y McConkey, E. H. (1977). Phosphorylation of ribosomal protein S6 in suspension culture HeLa cells. Mol. Gen. Genet. 152: 223-230.
32. Trewavas, A. (1973). The phospholylation of ribosomal protein in Lemna minor. Plant Physiol. 51: 760-767.
33. Kristiansen, K., Plesner, P. y Krøge, A. (1979). Phosphorylation "in vivo" of ribosomes in Tetrahymena pyriformis. Eur. J. Biochem. 83: 395-403.
34. Henshaw, F. C. (1980). En Biochemistry of cellular regulation. CRC Press (Ed. Clemens, S. M. J.). Vol. I, Boca Ranton, Fla.
35. Juan, V. F. (1981) Estudio de la estructura y función de proteínas ribosómicas de Saccharomyces cerevisiae. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
36. Strycharz, W. A. y Nomura, M. (1978). Ribosomal proteins L7/L12 localized at a single region of the large subunit by immune electronmicroscopy. J. Mol. Biol. 126: 123-140.

37. Möller, W., Slobin, L. I., Amons, R. y Richter, D. (1975). Isolation and characterization of two acidic proteins of 60S ribosomes from Artemia salina cystis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72: 4744-4748.
38. Van Agthoven, A. J., Massen, J. A. y Möller, W. (1977). Structure and phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 989-998.
39. Ballesta, J. P. G. y Vázquez, P. (1972). Reconstitution of the 50S ribosome subunit. Role of protein L7 and L12 in the GTPase activities. Site of action of thiostrepton. FEBS Lett. 28: 337-342.
40. Hamel, E., Koka, M. y Nakamoto, T. (1972). Requirement of an Escherichia coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with guanosine. J. Biol. Chem. 247: 805-814.
41. Udem, S. A. y Warner, J. R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 65: 227-242.
42. Petersen, N. S. y McLaughlin, C. S. (1973). Monocistronic messenger RNA in yeast. J. Mol. Biol. 81: 33-45.
43. Bollen G. H. P. M., Mager, W. H., Jenneskens, L. W. y Planta, R. J. (1980). Small-size mRNA's code for ribosomal proteins in yeast. Eur J. Biochem. 105:75-80.
44. Nabeshima, Y. y Ogata, K. (1980). Stimulation of the synthesis of ribosomal proteins in regenerating rat liver with special reference to the increase in the amounts of effective mRNA's for ribosomal proteins. Eur. J. Biochem. 107: 323-329.

45. Holley, R. W., Apgar, J., Doctor, B. P., Farrow, J., Marini, M. A. y Merrill, S. H. (1961). A simplified procedure for the preparation of tyrosine- and valine-acceptor fractions of yeast "soluble ribonucleic acid". *J. Biol. Chem.* 236: 200-202.
46. Rubin, G. M. (1975). Preparation of RNA and ribosomes from yeast. En *Methods in Cell Biology*. (Ed. Prescott, D. M.) Vol. XII, Academic Press, N. Y.
47. Hartwell, L. H. (1967). Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bact.* 93: 1662-1670.
48. Hartwell, L. H., McLaughlin, C. S. y Warner, J. R. (1970). Identification of ten genes that control ribosome formation in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 109: 42-56.
49. Hutchison, H. T. y Hartwell, L. H. (1967). Macromolecule synthesis in yeast spheroplast. *J. Bact.* 94: 1697-1705.
50. Kadowaki, A. y Halvorson, r. (1971). Appearance of a new species of ribonucleic acid during sporulation in Saccharomyces cerevisiae. *J. Bact.* 105: 826-830.
51. Sripati, C. E. y Warner, J. R. (1978). Isolation, characterization, and translation of mRNA from yeast. En *Methods in Cell Biology* (Ed. Prescott, D. M.), Academic Press, N. Y.
52. Lehninger, A. L. (1981). *Biochemistry; the molecular basis of cell structure and function*. Worth Publishers, Inc., New York, N. Y. 2a ed.
53. Nevins, J. R. y Darnell, J. E. (1978). Steps in the processing of Ad2 mRNA: poly (A)<sup>+</sup> nuclear sequences are conserved and poly (A) addition precedes splicing. *Cell* 15: 1477-1493.

54. Salditt-Georgieff, M., Harpold, M., Sawiki, S., Nevins, J., y Darnell, J. E. (1980). Addition of poly(A) to nuclear RNA occurs soon after RNA synthesis. *J. Cell Biol.* 66: 844-848.
55. Weber, J., Blanchard, J. M., Ginsberg, H., Darnell, J. E. (1980). Order of polyadenylic acid addition and splicing events in early adenovirus mRNA formation. *J. Virol.* 33: 286-291.
56. Nevins, J. R. (1979). Processing of late adenovirus nuclear RNA to mRNA. *J. Mol. Biol.* 130: 493-506.
57. Breathnach, R. y Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349-383.
58. Abelson, J. (1979). RNA processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 1035-1069.
59. Kinniburgh, A. J. y Ross, J. (1979). Processing of the mouse  $\beta$ -globin mRNA precursor: at least two cleavage-ligation reactions are necessary to excise the larger intervening sequence. *Cell* 17: 915-921.
60. Udem, S. A., Kaufman, K. y Warner, J. R. (1971). Small Ribosomal ribonucleic acid species of Saccharomyces cerevisiae. *J. Bact.* 105: 101-106.
61. Darnell, J. E., Jelinek, W. R. y Molloy, G. R. (1973). Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells. *Science* 181: 1215-1218.
62. Brawerman, G. (1974). Eukaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 621-642.
63. Bozzoni, I., Beccari, E., Luo, Z. X., Amaldi, F., Pierandrei-Amaldi, P. y Campioni, P. (1981). Xenopus leavis ribosomal protein genes: isolation of recombinant cDNA clones

- and study of the genomic organization. *Nucleic Acids. Res.* 9: 1069-1086.
64. Vaslet, C. A., O'Connell, P., Izuquierdo, M. y Rosbash, M. (1980). Isolation and mapping of a cloned ribosomal protein gene of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 285: 674-675.
  65. Fabijanski, S. y Pellegrini, M. (1982). Isolation of a cloned DNA segment containing a ribosomal gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 18: 267-276.
  66. Meyuhas, O. y Perry, R. P. (1980). Construction and identification of cDNA clones for mouse ribosomal proteins: application for the study of r-protein gene expression. *Gene* 10: 113-129.
  67. Woolford, J. L., Hereford, L. M. y Rosbash, M. (1972). Isolation of cloned DNA sequences containing ribosomal genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 18: 1247-1259.
  68. Fried, H. M., Pearson, N. J., Kim, C. H. y Warner, J. R. (1981). The genes for fifteen ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 251: 10176-10183.
  69. Bollen, G. H. P. M., Cohen, L. H., Mager, W. H., Klaassen, A. W. y Planta, R. J. (1981). Isolation of cloned ribosomal protein genes from the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* 14: 279-287.
  70. Rosbash, M., Harris, P. K. W., Woolford, J. L. y Teem, J. L. (1981). The effect of temperature-sensitive RNA mutants on the transcription products from cloned ribosomal protein genes of yeast. *Cell* 24: 679-686.
  71. Pierandrei-Amaldi, P. y Beccari, E. (1980). Messenger RNA for ribosomal proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 106: 603-611.

72. Nabeshima, Y., Imai, K. y Ogata, K. (1979). Biosynthesis of ribosomal proteins by poly (A)-containing mRNA's from rat liver in a wheat germ cell-free system and sizes of mRNA's coding ribosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 564: 105-121.
  
73. Zinker, R.S. y Márquez, G. M. I. Datos no publicados.