



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**IZTACALA U.N.A.M.**

**BIOLOGIA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION  
DEL PLASMIDO 2 MICRAS DE LA LEVADURA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

P r e s e n t a :

**Ramón Víctor Moreno Torres**

**Los Reyes Iztacala, Méx. 1983**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Directores de Tesis:

Dr. Samuel Zinker

Dr. Patricio Gariglio

Tesista:

Ramón Víctor Moreno T.

DEDICATORIAS

A mi Padre: Un hombre que ha hecho su mejor esfuerzo, para hacer de sus hijos los 10 mejores.

A mi Madre: Quien con su amor y abnegación, ha sido el centro de unión de esta familia y que ha sabido brindar apoyo a todos.

A mis hermanos: Por la feliz unión fraterna que nos brindamos constantemente.

A mi ABUELA: Por habernos dado toda una vida de servicio.

A la vida en el Universo

DL MDS D/LD  
(en el MDS DCA)

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a los Doctores Samuel Zinker y Patricio Gariglio, su orientación y asesoría en todo el desarrollo de este trabajo

También, agradezco especialmente al Doctor Alfonso Carabez T., su desinteresada colaboración en la elaboración de las preparaciones y fotografías al microscopio electrónico.

Por otra parte, agradezco el apoyo económico de la subvención CONACYT-BID PCCBBNA-005006.

Por último, quiero agradecer a todos los profesores y compañeros del Departamento de Genética del CINVESTAV, especialmente a Luz María Guzmán y a los profesores y compañeros de la ENEP Iztacala, que de muchas formas contribuyeron a la realización de este trabajo y a mi formación personal.

" El bienestar público y los in  
tereses de la Humanidad, enno  
blecen la labor más desprecia  
ble y solo permiten a los hom  
bres cultos darse cuenta del  
entusiasmo y de la perseveran  
cia que se necesita para ven-  
cer los obstáculos "

LAVOISIER

## RESUMEN

La levadura *S. cerevisiae*, contiene aproximadamente 60 copias de un ADN circular de alrededor de 6,300 pares de bases. Este ADN se comporta como un gene nuclear (segregación meiótica 2:2) o bien, como una reminiscencia de los plásmidos bacterianos (pérdida por multiplicación vegetativa). El círculo de 2 micras, presenta una organización nucleosómica típica y se replica durante la fase S del ciclo celular; es activamente transcrito y susceptible de ser clonado en células procarióticas. Debido a estas propiedades se emplea para estudios de replicación, recombinación y como vector de clonación de genes eucarióticos. Al igual que se ha aislado y utilizado el genoma del virus SV40, como modelo de genes eucarióticos transcripcionalmente activos, el círculo de 2 micras puede ser un buen modelo para el estudio de los mecanismos de transcripción con la ventaja de ser un componente natural de la levadura.

En este trabajo, se reportan algunas propiedades bioquímicas y fisicoquímicas del 2 micras: tiene una densidad en --CsCl-EtBr de 1.652 g/ml.; encontramos el patrón de restricción reportado al cortarlo con: EcoR1, Pst1 y BamH1; además se presenta la evidencia reportada por la Microscopía Electrónica.

## INDICE

1.- INTRODUCCION	
PROCARIOTES Y EUCARIOTES	
Generalidades.....	1..
Tamaño del Genoma.....	2
Estructura de la Cromatina.....	3
Transcripción .....	6
VIRUS Y PLASMIDOS	
Virus.....	6
Plásmidos.....	8
El modelo SV40...-.....	9
La Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
Generalidades.....	10
Cromatina.....	11
Replicación.....	13
Transcripción.....	15
2.- MATERIAL Y METODO	
Reactivos y Químicos.....	17
Material Biológico.....	17
Soluciones.....	17
Medios de Cultivo.....	18
Crecimiento de la Cepa.....	19
Fraccionamiento Celular.....	20
Extracción del ADN.....	21
Determinación y Caracterización del ADN 2 micras..	22
Microscopía Electrónica.....	25
3.- RESULTADOS.....	27
4.- DISCUSION.....	32
5.- BIBLIOGRAFIA.....	38

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION  
DEL PLASMIDO 2 MICRAS DE LA LEVADURA

1.- INTRODUCCION

1.1.- PROCARIOTES Y EUCARIOTES

1.1.1.- Generalidades

Existen en la naturaleza pequeños organismos cu  
yos ancestros aparecieron en la tierra hace tres mil millones  
de años, cuando surgieron los primeros sistemas vivientes (51)  
Estos organismos se caracterizan por la ausencia de estructu-  
ras membranosas intracelulares, es decir, llevan a cabo todas  
sus funciones metabólicas en el citoplasma, ya que en éste se  
encuentran: el material genético, las enzimas y toda la maqui-  
naria de síntesis protéica los cuales funcionando en conjun-  
to, permiten la reproducción y subsistencia de estos seres --  
que se denominan procariotes. Estos microorganismos están re  
presentados por las bacterias y las cianobacterias (las ciano-  
bacterias se conocían con el nombre de algas azul-verdes) (17  
33, 51).

Los estudios realizados en procariotes, han con  
ducido a grandes avances en el conocimiento científico. Por -  
ejemplo, los experimentos con la bacteria Escherichia coli, -  
dieron la pauta para la comprensión inicial de los mecanismos  
de regulación de la expresión genética, que culminan al postu-  
larse los modelos tipo Operón, para las rutas metabólicas de  
degradación de azúcares (operón de lactosa) y de biosíntesis  
de aminoácidos (operón de triptofano) (22).

También , estudios con estos sistemas, han di-  
rigido el desarrollo de la Ingeniería Genética, consistente -  
en la manipulación de segmentos de ADN con una codificación -  
específica (4), la cual ha llevado a una comprensión mayor de  
la estructura, organización y función del genoma. Además, es-  
tas técnicas tienen la potencialidad de obtener, por procesos  
análogos a la fermentación, grandes cantidades de moléculas -  
de importancia biológica. Estos adelantos abren nuevos ca-

minos para abordar y resolver problemas de varios tipos, tales como:

a) Biomédicos.- por ejemplo, la producción de insulina por técnicas de Ingeniería Genética, será menos costosa y laboriosa que la obtención de la hormona a partir de animales(4)

b) Nutricionales.- Se vislumbra la posibilidad de introducir genes de alto valor nutricional a plantas dicotiledóneas, tales como el frijol, y aumentar su valor nutritivo (Herrera Estrella L., comunicación personal).

c) Ecológicos.- Ya que existen en la naturaleza organismos capaces de degradar sustancias que contaminan los mares, los ríos, y las tierras de producción. La manipulación de los genes de estos organismos, introducidos en otros de interés, o bien, la modificación de los organismos que presentan esas propiedades, puede abrir el camino que representa la descontaminación de ambientes productivos.

Los organismos eucariotes, caracterizados principalmente por presentar estructuras membranosas intracelulares que llevan a cabo una función especializada (organelos), surgieron, según los datos paleontológicos, hace aproximadamente mil quinientos millones de años (17,51). Su diversidad es mucho mayor, ya que están representados por los grupos unicelulares nucleados ó multinucleados (Protoctistas), y todos los organismos multicelulares (Hongos, Vegetales y Animales)(45).

#### 1.1.2-Tamaño del Genoma.

Los estudios del material genético procariote y eucariote, muestran diferencias significativas con respecto a la cantidad de ADN en ambos sistemas (Tabla 1). Es evidente, que la cantidad de ADN en general, aumenta de virus o plásmidos a procariotes y de éstos a eucariotes.

En los sistemas eucarióticos existe un exceso de ADN, es decir, haciendo un promedio, los vertebrados tenemos alrededor de cuatro mil millones de pares de bases (p.b.); potencialmente, esta cantidad de ADN sería suficiente para codi-

ORGANISMO	CANTIDAD APROXIMADA
PROCARIOTE(P)	DE ADN EN PARES DE
EUCARIOTE(E)	BASES p.b.
Bacteriófago (P)	$4.5 \times 10^4$ p.b.
Bacteriófago T <sub>2</sub> (P)	$2.2 \times 10^5$ p.b.
<u>Escherichia coli</u> (P)	$3.5 \times 10^6$ p.b.
SV40 (virus de riñón de mono) (E)	$5.2 \times 10^3$ p.b.
Levadura (E)	$1.2 \times 10^7$ p.b.
Plásmido 2 u (presen te en Levadura) (E)	$6.3 \times 10^3$ p.b.
Mosca de la Fruta ( <u>D. melanogaster</u> ) (E)	$1.7 \times 10^8$ p.b.
Gimnosperma ( <u>E. fragilis</u> ) (E)	$8.4 \times 10^4$ p.b.
Anfíbio ( <u>Necturus maculosa</u> ) (E)	$1.0 \times 10^{11}$ p.b.
Reptiles (en general) (E)	$4.5 \times 10^9$ p.b.
Aves (en general) (E)	$2.3 \times 10^9$ p.b..
Mamíferos (en general) (E)	$5.7 \times 10^9$ p.b.

Tabla 1.-Cantidad de ADN en sistemas procariotes y euca-  
riotes. (Según Chambon, P. Hinegardner, R. y Lohr, G.)

ficar de tres a cuatro millones de polipéptidos (11). Sin embargo, se estima que sólo se producen entre treinta y ciento cuenta mil proteínas. Entonces podríamos preguntarnos ¿para qué tanto ADN?

Los estudiosos de la Evolución a nivel molecular, reportan la existencia de secuencias de ADN que se repiten constantemente, es decir, que sólo unas cuantas secuencias del ADN eucariótico son originales y del 10 al 80% del ADN restante, está representado por copias de las secuencias originales. Las secuencias de ADN repetitivo, parecen hallarse distribuidas en todo el genoma, intercaladas entre las secuencias únicas, sugiriéndose que pueden hallarse implicadas en la regulación génica (5,17).

Por otra parte, una hipótesis apoyada por la existencia de familias proteicas -proteínas similares en conformación y función, presentes en variaciones polimórficas de algunas especies y aún en especies diferentes-, es que los genes sufren duplicaciones, repetición de un segmento cromosómico, las cuales han evolucionado independientemente originando grupos de productos génicos (proteínas), relacionados entre sí y, ó, con funciones divergentes; es decir, las familias proteicas pueden ser el resultado de la Evolución divergente de genes duplicados (11,15).

### 1.1.3-Estructura de la Cromatina.

Una característica de las células eucarióticas es contener el material genético en el núcleo. En este organelo, el ADN se encuentra asociado a proteínas y forma una sustancia con afinidad a colorantes básicos que recibe el nombre de cromatina (19).

Los estudios acerca de la cromatina y de la complejidad del genoma, reflejaban que el ADN se plegaba y se condensaba fuertemente. Por ejemplo, si se extendiera el ADN de una célula humana, este mediría alrededor de un metro y medio (11); este ADN se encuentra condensado en el núcleo, que es -

una estructura de ocho a quince micras de diámetro. Una de las razones por las que el ADN se condensa, es porque presenta una estructura de alfa-hélice, la cual reduce su longitud; la otra causa del plegamiento, son las proteínas que se asocian al ADN fundamentalmente, las histonas presentes en la cromatina, (22).

Hasta el momento del descubrimiento de las histonas, lo que se había estudiado de la cromatina, era únicamente su naturaleza Química. La microscopía, tanto de luz como electrónica, no había ayudado a entender a un nivel mayor que el de la mitosis y meiosis en las cuales, los únicos sucesos observables son: 1) La condensación de la cromatina en cromosomas y 2) El intercambio de segmentos cromosómicos en pares homólogos. La única evidencia existente de la estructura de la cromatina, era la aportada por las técnicas de difracción de rayos "X", la cual, indicaba que la cromatina presentaba un patrón de estructuras repetitivas con un diámetro aproximado de cien angstroms (37).

La digestión enzimática de la cromatina con nucleasa de hígado de rata y nucleasa micrococcal (endonucleasas que hidrolizan el ADN), seguida de electroforesis en gel (técnica utilizada para separar fragmentos de diferente peso molecular), reveló que los fragmentos de ADN generados por la nucleasa migraban a través del gel de tal manera que los fragmentos más pequeños migraban más de prisa, ent tanto que los fragmentos mayores lo hacían lentamente. Al establecer los pesos moleculares de los fragmentos de cromatina se obtuvieron dos evidencias:

1) Que existía un tamaño mínimo de los fragmentos generado por cualesquiera de las nucleasas.

2) Que los fragmentos mayores eran múltiplos de los de menor tamaño (Fig. 1) (37).

Al analizar la naturaleza química de los fragmen

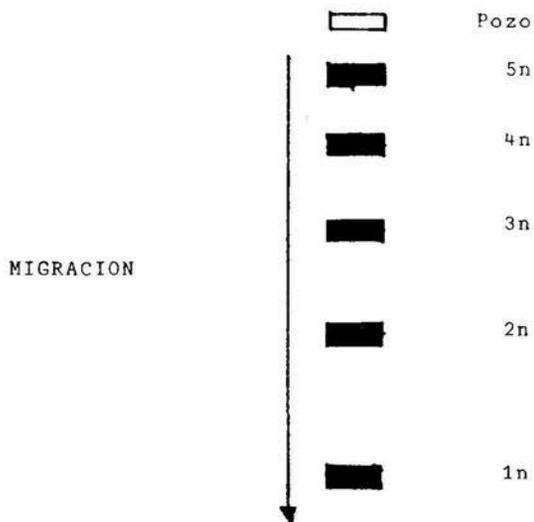


Figura 1.- Esquema que representa la migración electroforética de los fragmentos de cromatina digeridos por nucleasas; 1n representa el peso molecular mínimo de los fragmentos (banda inferior), las otras bandas son múltiplos de la primera y por eso se anotan como 2n, 3n, 4n y 5n. El pozo es el sitio, en el que se coloca la muestra.

tos cromatínicos se encontró que existía una cantidad equimolecular de ADN y proteínas, reportándose, que el contenido de -- ADN, correspondía a una cadena cuya longitud era de aproximadamente doscientos pares de bases para los fragmentos más pequeños y múltiplos de cuatrocientos, seiscientos, etc., pares de bases para los fragmentos mayores (37).

También se realizaron experimentos de digestión de la cromatina, seguidos de centrifugación en gradientes de - sacarosa, cuyos resultados fueron similares.

Los especialistas en microscopía electrónica después de mejorar las técnicas para observar las fibras de cromatina, encontraron que las fibras aparecían como estructuras de partículas esféricas de unos cien ångströms de diámetro, que - se parecía un collar de cuentas. Al observar los fragmentos digeridos por la nucleasa y sedimentados en gradientes de sacarosa notaron que los fragmentos menores se presentaban como esferas aisladas de cien ångströms de diámetro. En tanto que los múltiplos de estos fragmentos, aparecían como dos, tres ó cuatro esferas unidas por un ADN lineal (Fig. 2)..

Junto con los estudios de digestión de la cromatina y microscopía electrónica, otros investigadores se dedicaron a purificar las proteínas histónicas asociadas al ADN. Logrando establecer que cuando se reunían todos los tipos de histonas, más una cantidad equimolecular de ADN, se formaban las estructuras que por análisis de difracción de rayos "X" presentaba la cromatina.

Al reunirse toda la información correspondiente a la cromatina, se estableció que estaba formada por proteínas (un octámero de histonas), sobre las cuales se "enrollaba" el ADN compactándose en un orden de 5 veces. A esta estructura se le denominó nucleosoma. La organización nucleosómica del material genético se presenta solamente en eucariotes.

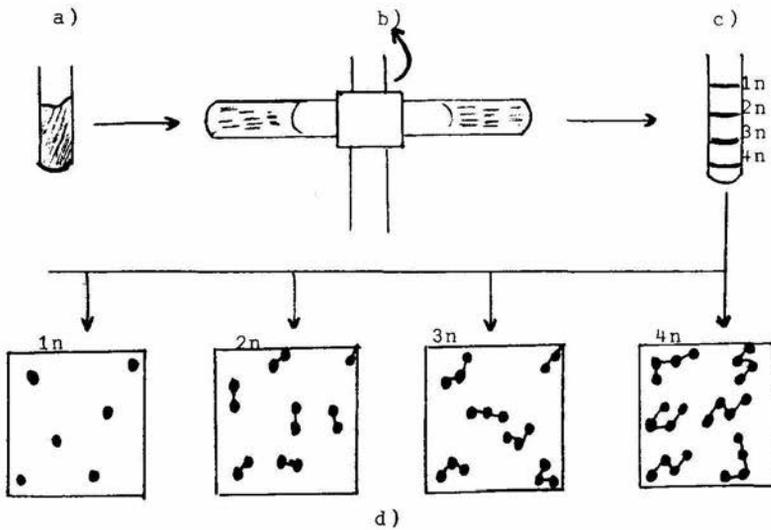


Figura 2.-Esquema que muestra el tratamiento (muy simplificado) y los resultados de la microscopía electrónica, al estudiarse la estructura de la cromatina; a) Muestra la cromatina incubada con nucleasa; b) Centrifugación en gradiente de sacarosa; c) Separación de los fragmentos cromatínicos en el gradiente; d) Campos de microscopía electrónica de cada una de las bandas del gradiente.

#### 1.1.4-Transcripción.

La transcripción, es el proceso mediante el cual un segmento de ADN (gene), es utilizado como templado para la síntesis de una cadena complementaria de ARN; las especies más estudiadas de ARN, realizan tres funciones:

- a) Son parte constituyente de los ribosomas.
- b) Funcionan como acarreadores de aminoácidos hacia los ribosomas.
- c) Llevan mensajes al ribosoma para que sean leídos por éste y traducidos a polipéptidos.

Se ha visto que en sistemas procarióticos, que casi todo el ADN que presentan, es transcrito y traducido a proteínas. Por ejemplo, E.coli presenta alrededor de tres millones quinientos mil pares de bases, los cuales pueden codificar para aproximadamente tres mil proteínas, cantidad aproximada de polipéptidos que se sintetizan en la bacteria (4,11).

Recientemente se ha determinado que los eucariotes presentan secuencias de ADN que son transcritas en moléculas de ARN mensajero precursor, el cual, sufre un proceso de maduración consistente en una serie de cortes postranscripcionales. De esta manera el ARN mensajero maduro tiene, en general, una longitud menor que el ADN que le dió origen. Es decir, existen secuencias de ADN intercaladas entre los genes llamadas intrones, de las cuales se desconoce bien a bien su función, que no son traducidas a proteínas. Por otra parte, los segmentos de ADN eucariótico que persisten en el ARN mensajero maduro y por lo tanto son traducidas a proteínas, son denominados exones. La figura No. 3, explica en forma breve el proceso de maduración del ARN desde su transcripción.

#### 1.2.-Virus y Plásmidos

##### 1.2.1.-Virus.

Existen partículas constituidas por proteína que protege a un tipo de ácido nucleico (ADN, o bien, ARN); cuando el ácido nucleico de estas partículas penetra al interior de -

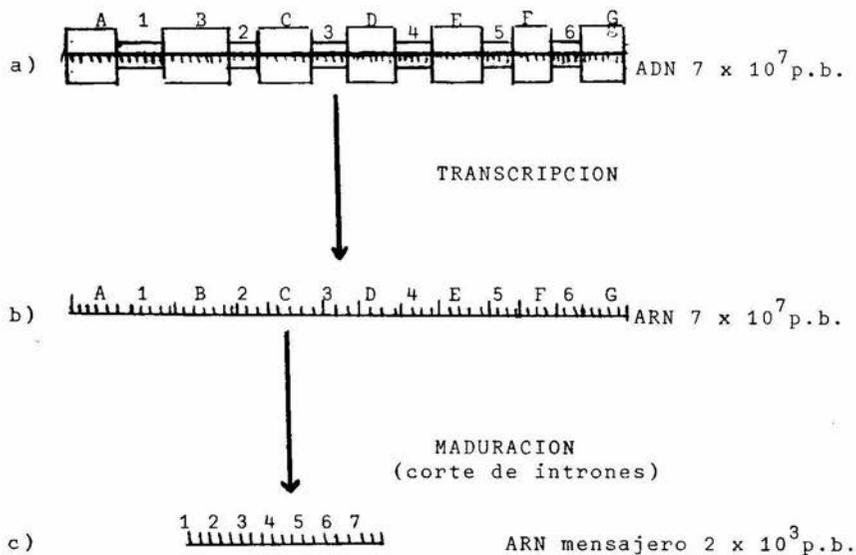


Figura 3.- a) Muestra la cadena de ADN la cual será transcrita, los cuadros claros con letras representan los intrones; los rectángulos oscuros numerados del 1 al 7, son los exones (ver texto). b) Después de la transcripción se observa la copia de una cadena de ARN precursor cuya longitud es igual a la del ADN que lo originó. c) Durante el proceso de maduración son cortados los segmentos de ARN precursor que representan los intrones, originando una cadena de ARN mensajero maduro de menor longitud que la del ADN que le dió origen.

una célula, es capaz de utilizar toda la maquinaria metabólica del hospedero para sintetizar todos los componentes moleculares necesarios, para ensamblarlos y originar una gran cantidad de partículas nuevas con capacidad infectiva; estos elementos que sólo son observables a microscopía electrónica, reciben el nombre de virus.

Dos características sobresalientes de los virus:

- 1) Presentan un comportamiento de parasitismo obligado, debido a que carecen de metabolismo propio y
- 2) Son específicos, en cuanto al tipo de célula que infectan.

El estudio de los virus con respecto a la forma en que alteran la maquinaria metabólica celular para que ésta, sintetice partículas virales, indica que algunos codifican un factor protéico que modifica la ARN polimerasa del hospedero; otros, inhiben la traducción de los ARN mensajeros celulares, de tal manera sólo se traducen los ARN mensajeros virales. También hay virus que codifican para una ARN polimerasa diferente la cual sólo sintetiza mensajeros virales (22). Como podemos ver, no existe regla general con respecto a los mecanismos de acción de los virus.

Los efectos citopáticos de los virus son muy variados. En ocasiones, después del ensamblaje, los nuevos viriones lisan a la célula liberando partículas infectivas; otras veces, la célula muestra en su interior inclusiones citoplásmicas que corresponden a material viral. También el genoma vírico puede integrarse al material genético del hospedero modificando su expresión.

Por último, se ha observado que en algunos virus la organización del material genético es muy similar a la del genoma de la célula que parasitan (20,23); en base a esto, los virus se han utilizado como modelo para estudiar la organización y los mecanismos de regulación de la expresión del genoma (20,23,43).

### 1.2.2.-Plásmidos.

En 1958, Jacob y Wollman, al estudiar la sexualidad en bacterias, describieron un elemento genético físicamente separado del cromosoma bacteriano, capaz de perpetuarse en esa condición. A estos elementos extracromosómicos se les denominó plásmidos (34).

Los plásmidos presentan tres formas (Fig. 4): 1) superenrollado o superhelicoidal, 2) circular y 3) lineal; estas tres formas se diferencian al migrar en un campo electroforético. Los plásmidos no son esenciales para el crecimiento y metabolismo normal de las células portadoras. Están asociados -- funcionalmente a aspectos de sexualidad celular (la célula que porta el plásmido es donadora de material genético), o bien, -- con la resistencia a drogas, ya que en muchas ocasiones los -- plásmidos codifican para enzimas o productos que pueden degradar o modificar metales pesados como el mercurio o inhibidores del metabolismo como el arsénico y algunos antibióticos. Dentro de las propiedades de los plásmidos se pueden comentar:

Integración.- Aunque no todos los plásmidos se integran, muchos de ellos tienen un sitio específico en el cromosoma. En el estado integrado los plásmidos reciben el nombre de episomas, en la figura No. 5 se representa la forma en que se integra un plásmido quedando en forma de episoma.

Incompatibilidad.- Se ha demostrado que dos plásmidos isogénicos (que contienen los mismos genes), no pueden -- mantenerse en forma estable en una misma bacteria. Cuando dos plásmidos isogénicos se introducen en una misma célula bacteriana, uno de ellos se pierde por ser incompatible (14).

Eliminación.- La pérdida de un plásmido se puede presentar espontáneamente; también es posible inducir esta eliminación por medio de tratamientos (curación del plásmido), -- por ejemplo, creciendo a las células en presencia de Bromuro -- de Etidio.



A)



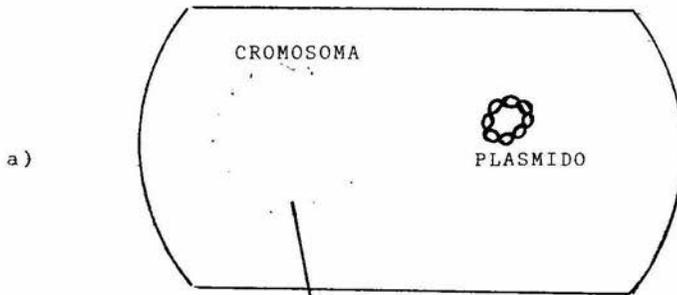
B)



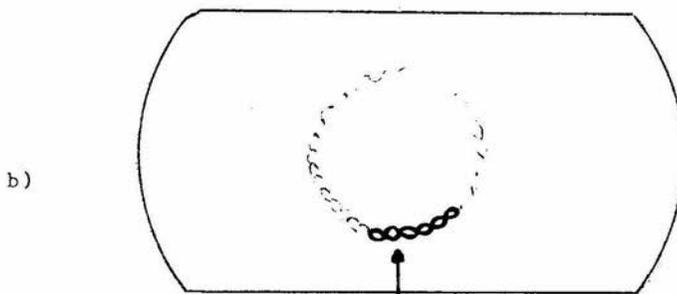
C)

Figura 4 .- Muestra las tres formas (esquemáticas) en que se presentan los plásmidos. A) Forma I o superhelicoidal; B) Forma II o Circular C) Forma III o Lineal.

MODELO DE INTEGRACION



Sitio de integración



Episoma

Figura No. 5.- a) Célula bacteriana que presenta el ADN cromosómico (Claro) y del plásmido (oscuro), en forma independiente. b) El plásmido se encuentra integrado en el cromosoma y de esta forma recibe el nombre de episoma.

Una propiedad más de los plásmidos es la replicación; se ha demostrado que en general, este ADN presenta dos loci que actúan en forma consecutiva; el primero origina un producto génico difundible (inductor), el cual se une a un segundo locus y estimula la unión de la ADN polimerasa, para que desde este sitio se inicie la replicación (replicador). También se ha postulado la existencia de un sitio de fijación a la membrana, al cual se une el plásmido para ser replicado. Se ha visto que la replicación del plásmido, cuando no está en forma de episoma, es independiente a la del cromosoma (14).

Estos elementos extracromosómicos, pueden tener diferentes pesos moleculares y presentarse desde una o dos copias por célula, hasta cien o más copias intracelulares. Además, los plásmidos son muy utilizados para estudios sobre estructura y replicación del ADN, debido a que su manipulación es relativamente más sencilla que la del genoma celular.

### 1.3.- El modelo SV40

Uno de los modelos más utilizado para el estudio de la cromatina eucariótica, es el virus de simio No.40 (SV40) que infecta a células de riñón de mono. La regulación de la transcripción del ADN de SV40, también es de gran interés, puesto que en ciertas condiciones, este pequeño virus es oncogénico (55). SV40 tiene un pequeño genoma de solamente cinco genes, se replica y transcribe en el núcleo utilizando las enzimas y las polimerasas de la célula huésped; además, al estar en el interior del núcleo contiene histonas y su genoma forma estructuras circulares con veinticuatro nucleosomas, conocidas como minicromosomas (20,23)

Cuando SV40 infecta células de riñón, se obtienen alrededor de quinientas mil copias de su genoma por célula. Con este tipo de infecciones (infección productiva), se han re

alizado estudios de transcripción, los cuales demuestran que los genes transcripcionalmente activos, presentan nucleosomas (20). También, se demostró que solamente cinco mil copias (el 1%), del ADN de SV40 es activo en transcripción.

La purificación de complejos transcripcionalmente activos, a pesar de presentar hasta el momento algunos problemas, será de gran utilidad para los estudios de regulación de la expresión de los genes eucariotes.

#### 1.4.- La Levadura Saccharomyces cerevisiae.

##### 1.4.1.- Generalidades.

Otro organismo usado activamente para estudios bioquímicos en general, y también para estudiar la cromatina eucariótica, es la levadura S. cerevisiae. Este microorganismo es un hongo del grupo de los Ascomycetes, cuyas características le han favorecido con respecto al trabajo experimental. En un medio de cultivo líquido, su ciclo de vida es relativamente corto, siendo la fase de adaptación al ambiente, de alrededor de diez a doce horas; se puede llegar a una densidad poblacional de veinte millones de células por mililitro, en la cual el tiempo de generación es de 135 a 150 minutos (fase logarítmica). En estas condiciones, las células tienen un estado metabólico óptimo para el trabajo en el laboratorio (60).

Por otra parte, las levaduras presentan ciclos diploides y haploides que en medios sólidos son fáciles de diferenciar. Las generaciones diploides producen, por meiosis, ascosporas que son células diferenciadas que contienen en su interior cuatro esporas. Las esporas pueden separarse por micromanipulación, de tal manera que al germinar y duplicarse en ciclos heterotálicos, originan colonias haploides que permiten seguir la segregación mendeliana de marcadores genéticos intra nucleares o citoplásmicos respectivamente.

Otra de las ventajas que nos ofrecen estos microorganismos, es que son susceptibles de transformación -proceso- mediante el cual las levaduras y otros microorganismos, incorporan genes completos del medio, de tal manera que modifican - su genotipo- (1), Esto proporciona una herramienta para el empleo de todas las técnicas genéticas modernas que se utilizan en bacterias.

#### 1.4.2.- Cromatina.

En las levaduras, el ADN presenta una estructura nucleosómica; el peso molecular total de su genoma es de nueve millones de kilodaltones (44,46); solamente tres veces mayor - que el genoma de E.coli y 85% menor que un cromosoma humano en promedio; es decir, la levadura presenta un genoma relativamente pequeño para un eucariote.

Otra de las ventajas del genoma de la levadura, la cual es el objeto de nuestro estudio, es que algunas cepas presentan un segmento de ADN minicircular, con una longitud de contorno de aproximadamente dos micras (seis mil pares de bases)(6,26,42) y al cual se le ha llamado plásmido dos micras, -minicírculo dos micras o ADN circular dos micras (12,24,30).

Las primeras observaciones de la existencia del minicírculo, sólo mostraban que la levadura contenía, además - del ADN nuclear y mitocondrial, una especie molecular de ADN, con una densidad similar a la del ADN nuclear y muy diferente de la del ADN mitocondrial (24,30,54).

El descubrimiento de una nueva especie de ADN en levadura, motivó los estudios con respecto a su función. Se demostró que la presencia del plásmido dos micras, guardaba relación con la resistencia a algunos antibióticos, tales como la oligomicina y la venturicidina (2,25); sin embargo, otros estudios indican que la resistencia génica a antibióticos puede residir en el ADN nuclear o en el ADN mitocondrial (21). Por lo que los datos a este respecto, no han sido concluyentes.

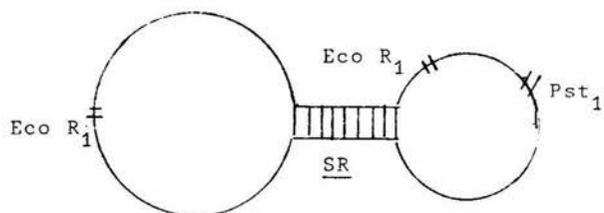
Otra observación interesante con respecto al mini círculo de dos micras, es que presenta dos tipos de comportamiento genético:

1) Como gene nuclear, ya que presenta una segregación meiótica 2:2 en ascosporas(25); utiliza las enzimas nucleares para su replicación (41); se replica una sola vez durante el primer tercio de la fase S del ciclo celular de levadura (58) y las mutaciones que afectan la replicación del ADN nuclear, también afectan la replicación del plásmido (7,48).

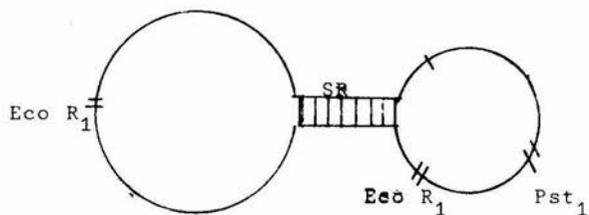
2) Como plásmido extracromosomal, ya que se puede perder espontáneamente o por tratamientos de curación (25); se mantiene estable independientemente de que las células se multipliquen por mitosis o meiosis (40); se presenta en más de dos copias intracelulares (a diferencia de los genes alélicos) (13); para ser más precisos, se presentan de 50 a 100 copias intracelulares del plásmido dos micras, representando del uno al 5% del genoma total de levadura (13,24).

Es interesante señalar que cuando segmentos de ADN utilizados para transformación de la levadura, llevan secuencias del minicírculo dos micras, se aumenta de 15 a 150 veces la eficiencia de la transformación, con respecto al índice de mutación espontánea (2,28).

El análisis realizado con enzimas de restricción muestra que el plásmido dos micras presenta dos formas equimolares; A y B, (Fig. 6) cuya diferencia es causada por la recombinación intramolecular recíproca de una secuencia de repetición invertida -estas secuencias tienen en sus extremos la característica de ser pálindrómicas, es decir se leen de la misma forma en ambas direcciones-, cuya longitud es de aproximadamente 600 pares de bases (26,28,49). Se piensa que ésta, puede estar asociada al mecanismo de resistencia a antibióticos (25), como una reminiscencia de la translocación de resistencia a drogas, presente en cromosomas y plásmidos bacterianos.



A



B

Figura 6.- Esquema que representa las formas equimolares A y B del minicírculo 2 u. SR, representa la secuencia de repetición, la cual por recombinación intramolecular provoca un giro en el asa del lado derecho del plásmido originando así las dos formas del plásmido.

#### 1.4.3.- Replicación.

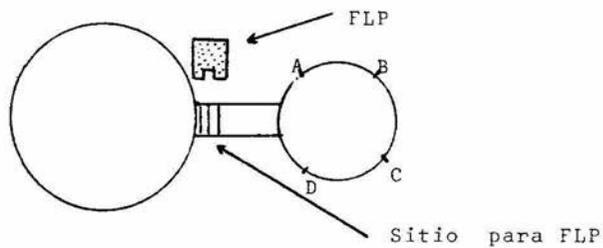
Los eventos de replicación del plásmido dos micras, muestran que éste, como otros ADNs circulares, presenta intermediarios replicativos en forma de bandas dobles hacia ambos lados (replicación bidireccional), de la misma forma como se observan en SV40 (47). Otros estudios indican que un segmento de la secuencia de repetición, cuya longitud es de 350 pares de bases, tiene dos funciones:

a) Es el sitio de unión de un polipéptido. "Function Linkage Protein"(FLP), codificado por el genoma del plásmido, inductor de la recombinación intramolecular especializada que origina las dos formas intracelulares del plásmido (7,10). En la figura No.7 se muestra un esquema del probable mecanismo de interconversión, en el cual FLP se une a la secuencia de repetición y al girar, genera la otra forma del plásmido..

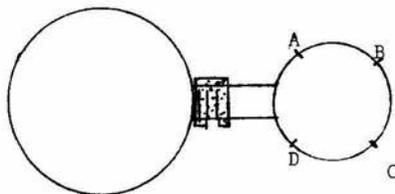
También se sugiere que este sistema, contiene enzimas y sitios de recombinación legítima y eficiente similar a sistemas procarióticos, tales como las asas G del fago mu y el locus H<sub>2</sub> de Salmonella. Es posible que en este plásmido se presente el único mecanismo de regulación de la expresión genética eucariótica por rearrreglo del ADN (7).

b) Es un sitio de origen de replicación. Lo cual se demostró por medio de experimentos de inhibición de la elongación, en los que se observó una fuerte marca radioactiva en -- los sitios de origen replicativo (10)

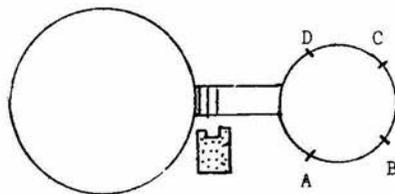
Evidencias recientes apoyan estas dos funciones, ya que se reporta la existencia de secuencias homólogas entre el minicírculo de dos micras y los cromosomas de la levadura, las cuales pueden presentar enlaces cruzados unidos covalentemente (8,18); en otras palabras, se sugiere que el plásmido - dos micras se puede integrar a diferentes sitios del genoma nuclear de la levadura, afectando los genes cromosómicos cercanos al origen de replicación del genoma del plásmido dos micras que se encuentra covalentemente unido. Los experimentos - de inhibición de la elongación, demuestran la fuerte marca radioactiva de los genes cercanos al origen replicativo. En la - figura No. 8 se muestra un esquema en el cual las secuencias



1) Forma A



2) Complejo de Unión



3) Forma B

Figura 7.- Esquema que muestra el mecanismo de recombinación especializada que origina las formas A y B del plásmido 2 u. 1) Forma A del plásmido señalándose el sitio de unión a FLP y el producto FLP. 2) Complejo de unión entre el minicírculo y la proteína (FLP), en el sitio donde se verifica la recombinación. 3) Liberación de FLP originando la forma B del plásmido.

del minicírculo y del cromosoma de la levadura comparten los genes O, P, Q, R, y S. Después de la unión covalente de estos genes y la incubación con nucleótidos y enzimas de replicación. Se observa que los genes cromosómicos cercanos al origen replicativo presente en el plásmido no son replicados. (10).

También estudios recientes, demuestran que el ADN minicircular dos micras codifica para dos polipéptidos "Replicador 1 y Replicador 2 (REP 1 y REP 2), los cuales son utilizados para mantener el número de copias del plásmido en forma alta (50 o más). Además, bajo ciertas condiciones, fomentan la replicación del plásmido en forma autónoma (8).

De los estudios realizados por lisis osmótica de esferoplastos, seguidos de centrifugación en gradientes de sacarosa. Se observó que los minicírculos sedimentan a una velocidad de 75s, es decir, tres veces más que cuando se tratan los plásmidos con el detergente Sarkosyl (este detergente disocia las proteínas que se unen al ADN)(20); por analogía con el coeficiente de sedimentación del minicromosoma del virus SV40, el valor de 75s, corresponde al de un minicromosoma cuya longitud es de dos micras (42).

Las preparaciones del minicírculo observadas en el microscopio electrónico, muestran que estos minicromosomas presentan de 28 a 34 nucleosomas, cada uno con 165 pares de bases. Otro aspecto interesante del minicírculo, es el hecho de que no es exclusivo de Saccharomyces cerevisiae; también se ha aislado de Schizosaccharomyces pombe y del ascomyceto Podospora anserina (21). El plásmido presenta un sitio de corte con la restrictasa Hpa 1, el cual puede ser deletado sin afectar su mantenimiento intracelular (9).

Estos últimos dos hechos, aunados al anteriormente descrito de la transformación, aumentan considerablemente el valor del minicírculo como modelo para la introducción de -

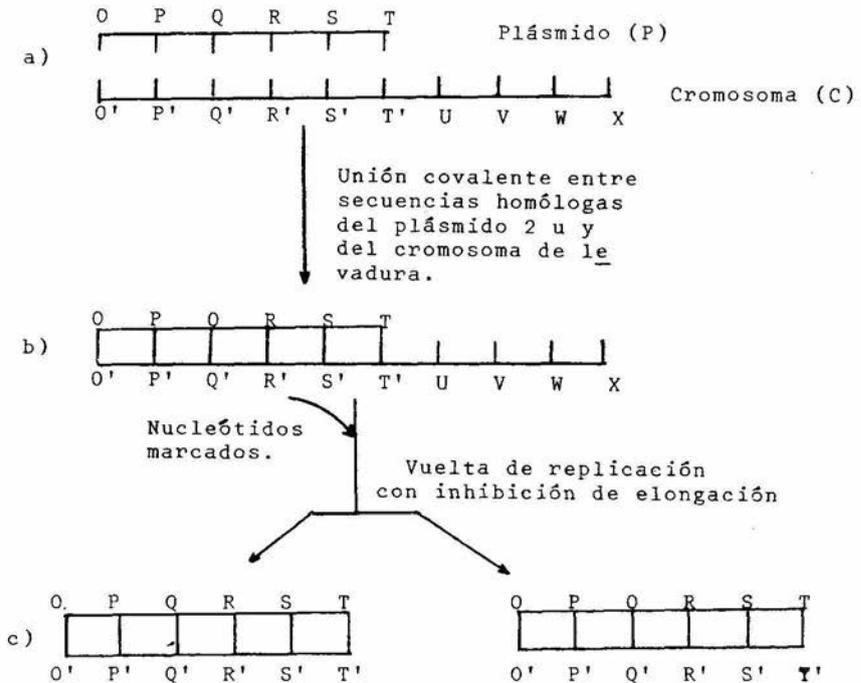


Figura 8.- Esquemáticamente se muestra en: a) Secuencia homóloga entre el plásmido (P) y el cromosoma (C), también se muestran algunos genes cercanos presentes en el cromosoma (T, U, V, W, X). b) Unión covalente entre las secuencias homólogas. c) Después de la replicación, se marcan las secuencias covalentemente unidas, al estar inhibida la elongación, no son copiados los genes cercanos a la unión covalente.

segmentos de ADN de otros organismos en levaduras, para el desarrollo de técnicas de Ingeniería Genética eucariótica.

#### 1.4.4.- Transcripción.

Realizando pruebas en donde se sintetiza ADN a partir de ARN mensajero, usando la enzima transcriptasa reversa, se ha demostrado que el 40% del genoma de la levadura se transcribe activamente (44). Mucho más que otras células eucarióticas en las que el nivel de transcripción, oscila entre el 5 y el 15% del genoma (44). Otros experimentos sugieren que potencialmente, todos los genes de la levadura son activos en transcripción, debido a que todo el genoma de la levadura es degradado uniformemente por la ADNasa I (44). Bajo el criterio de que genes transcripcionalmente activos son más sensibles a la digestión por la ADNasa I (56).

Por otra parte, el genoma del minicírculo se transcribe a partir de dos promotores, originando varias especies de ARN complementarias a ambas cadenas del plásmido. A excepción de una pequeña región que no se transcribe y en la cual se localiza la secuencia de repetición invertida (6,26).

Usando técnicas de ADN recombinante, se han sintetizado plásmidos quiméricos, entre un plásmido bacteriano y el minicírculo de dos micras, si éstos se introducen en minicélulas de E.coli, originan productos transcripcionales y traduccionales (6).

#### 1.5.- Justificación y Objetivos.

De la descripción anterior se infiere que, el plásmido de dos micras es un buen modelo para estudiar la complejidad del genoma de organismos superiores, sus mecanismos de recombinación, replicación y la transcripción de genes eucariotes. En base a sus propiedades, el plásmido, o algún derivado de éste, podría utilizarse como un vector de clonación de genes eucarióticos (27), lo cual evitaría el problema que representa, la clonación de genes eucarióticos en células proca-

rióticas, las cuales por tener diferentes mecanismos de regulación y expresión, no siempre proporcionan los logros esperados

Podemos comentar que el ADN minicircular dos micras, representa una de las alternativas de investigación que podrá ayudar, substancialmente, a la comprensión de los mecanismos de regulación genética eucariótica; también, por su gran potencialidad de aplicación, colaborará con el avance de la Ingeniería Genética en organismos superiores.

Por lo expuesto anteriormente, los objetivos de este trabajo son:

El desarrollo de la metodología apropiada para la obtención del plásmido dos micras y la determinación de propiedades físicas tales como su densidad.

La caracterización bioquímica por medio de cortes con enzimas de restricción y la visualización directa del minicírculo a Microscopía Electrónica.

Estos objetivos, representan el primer paso hacia la caracterización de moléculas del plásmido activas en transcripción y hacia el empleo de plásmidos análogos, con el fin de clonar genes eucarióticos de importancia en la medicina, la industria y la agricultura.

## 2.- MATERIAL Y METODOS.

### 2.1.- Reactivos y Químicos.

De J.T.Baker, se obtuvieron: Etanol, Glicerol, - Cloruro de Sodio (NaCl), Hidróxido de Sodio (NaOH), ácido Tricloroacético (TCA), ácido Acético ; ácido Clorhídrico (HCl) y Perclorato (HClO<sub>4</sub>). Algunos componentes de los medios de cultivo, se obtuvieron de Difco y fueron: Bacto-Agar, Bacto-Peptona y extracto de levadura. El ácido Succínico, Tolueno, Fenol, Etilen-diaminotetra-acético (EDTA), Hidroxi-Metil-Amino-Metano (Trizma Base), Sulfato de Amonio, Acetato de Amonio, Acetaldehído y Difenil-Amina se obtuvieron de Merck. De Sigma se obtuvieron: Adenina, Uracilo, Histidina, Lisina, Tirosina, Sorbitol y Bromuro de Etidio (Et.Br). De los laboratorios BDH, el - Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) y la agarosa. Las enzimas EcoR1, Pst1 y BamH1, así como el fenol se obtuvieron de los laboratorios BRL. El Cloruro de Cesio se obtuvo de KBL. De los laboratorios NEN el Omnifluor y el <sup>3</sup>HUMP de Gamersham Scientific.

### 2.2.- Materiales Biológicos.

Utilizamos las cepas isogénicas S288c (MAT-alfa-Ade<sup>-</sup>Ura<sup>-</sup>Lis<sup>-</sup>Tir<sup>-</sup>Hist<sup>-</sup>), con minicirculo (circ<sup>+</sup>) y sin plásmido (circ<sup>-</sup>). Generosamente donadas por la Dra. Judith Campbell del Instituto Tecnológico de California.

### 2.3.-Soluciones

2.3.1.-Solución Base Nitrogenada de Levadura libre de aminoácidos (YNB) (Difco).

2.3.2.-Solución Tampón TES: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50-mM NaCl de pH 7.8, ajustado con HCl.

2.3.3.-Solución Tampón TE: 10mM Tris, 1mM EDTA de pH - 7.1

2.3.4.-Solución Tampón de Diálisis (D): 10mM Tris, 1mM EDTA, 0.3M NaCl de pH 7.4.

2.3.5.-Solución de lavado para muestras en CsCl-Et.Br:  
10.5 gr.de CsCl, 12.3 ml. de TES y 150 ml. de Isopropanol.

2.3.6.-Mezcla Lítica: 50mM Tris, 10mM EDTA, 7.5mM NaCl  
0.75 mM Citrato de Sodio(NaCit) 2% Sarkosyl de pH 7.4

2.3.7.-Reactivo de Difenilamina (DFA): 5 gr de difenil  
amina destilada, 1.5 gr de ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 100 ml de á  
cido Acético. Al usar la DFA, se activa agregando 0.5% de Ace-  
taldehído

2.3.8.-Solución Tampón E (para electroforesis): 40mM -  
Tris, 20mM Acetato de Sodio(NaAc) 1.5mM EDTA de pH 7.8.

2.3.9.-Solución de Ensayo para EcoR1: 10mM Tris, 0.5mM  
MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM 2-Mercaptoetanol, 5mM NaCl de pH 7.2.

2.3.10-Solución de Ensayo para Pst1: 2mM Tris, 1mM --  
MgCl<sub>2</sub>, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM BSA de pH 7.5.

2.3.11-Solución de Ensayo para BamH1: 4mM Tris, 1.5mM  
MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 1mM 2-Mercaptoetanol de pH 7.2.

2.3.12.-Solución hipofase para Microscopía Electrónica:  
0.25M de Acetato de Sodio.

2.3.13.-Solución hiperfase para Microscopía Electrónica:  
1M de Acetato de Sodio, 1mM EDTA, 200 ug/ml de citocromo "c".

2.3.14.-Omnifluor Tolueno: 4% de omnifluor disuelto en  
Tolueno

#### 2.4.-Medios de Cultivo.

##### Medios Sólidos:

2.4.1.- YEPG: 1% de Extracto de Levadura, 2% de Peptona,  
40 ug/ml de treonina, 40 ug/ml de Adenina, 40 ug/ml de uracilo,  
2% de Glicerol y 2% de agar; esterilizado en el autoclave a --  
120°C y 20 lbs. durante 15 minutos.

2.4.2.- YEPG oli: Se prepara igual al YEPG, después de  
sacar del autoclave, agregar 3 ug/ml de oligomicina.

2.4.3.- YEPD: 1% de Extracto de Levadura, 2% de peptona,  
2% de agar esterilizado en autoclave a 120°C y 20 lbs durante  
15 minutos. Después de enfriar se agrega 2% de glucosa esteri-  
lizada por filtración.

#### Médios Líquidos.

2.4.4.-YM-1: 0.5% de Extracto de Levadura, 1% de Peptona 1% de ácido Succínico, 0.6% de NaOH, esterilizado en el autoclave a 120°C y 20 lbs. durante 15 minutos. Agregar ya frío, 1% de glucosa y 10% de YNB esterilizados por filtración.

2.4.5.-SC: 1% de ácido Succínico, 0.6% de NaOH, 20 ug/ml de Adenina, 20 ug/ml de Uracilo, 62 ug/ml de Lisina, 50 ug/ml de Histidina, 50 ug/ml de Tirosina, esterilizado en el autoclave a 120°C y 20 lbs durante 15 minutos. Después de enfriar, agregar 1% de glucosa y 10 % de YNB esterilizados por filtración.

2.4.6.-SCS: Los ingredientes del SC más 1M de Sorbitol.

2.4.7.-SC radioactivo: Agregar los ingredientes del SC modificándose de la siguiente manera; 10 ug/ml de Uracilo, y 1,5% de  $^3\text{H}$  UMP 1mCi/ml.

#### 2.5.- Métodos.

2.5.1.- Crecimiento de la Cepa.

2.5.1.1.- Selección.

Se estriaron colonias de *S. cerevisiae* S288 c<sup>+</sup>, - en cajas de Petri que contenían de 10 a 15 ml de medio sólido - YEPG oligomicina 3 ug/ml (ver medios 2.4.2), selectivo para resistencia a oligomicina; las cajas fueron incubadas durante 5 días a 30°C. Se tomaron 2 colonias resistentes al antibiótico y se colocaron en 10 ml de medio líquido YM-1 (ver medios 2.4.4), contenidos en un matraz Erlenmeyer, incubándose con agitación a 23°C - durante 3 días, para obtener soluciones stock de la cepa resistente.

2.5.1.2.- Obtención de abasto celular.

Se creció una dilución 1/200 ( $5 \times 10^6$  células) del stock de la cepa resistente a oligomicina en medios líquidos, ya sea SC, ó , SC radioactivo (ver medios 2.4.6 y 2.4.7 respectivamente), incubándose con agitación a 23°C durante 15 hrs. El cultivo alcanzó una densidad de  $8 \times 10^7$  células /ml, las cuales fueron colectadas, en tubos o botellas de centrifuga dependiendo del volumen de medio, por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos -- (min) a 4°C, usando los rotores Sorvall SS34 ó GSA.

## 2.5.2.- Fraccionamiento Celular.

### 2.5.2.1.- Obtención de Esferoplastos.

Los paquetes celulares (provenientes de 4 L. de cultivo en SC) contenidos en botellas Sorvall, fueron lavados 2 veces con 50 ml. de agua bidestilada estéril. Se centrifugaron nuevamente a 5000 rpm. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 200 ml de Sorbitol 1M estéril, agregándosele 2 ml. de glucosidasa e incubando 30 min. a temperatura ambiente, (la glucosidasa digiere parcialmente la pared celular de las levaduras). Los esferoplastos -levaduras a las cuales se les digirió la pared celular- fueron recuperados metabólicamente por incubación en 1.8-L. de SCS (ver medios 2.4.6); con agitación suave durante 2 hrs. Posteriormente los esferoplastos fueron colectados por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. (Sorvall GSA).

### 2.5.2.2.- Lisis de los Esferoplastos.

Los esferoplastos fueron resuspendidos en 60 ml. de mezcla lítica (ver Soluciones 2.3.6); se incubaron durante 10 min. a 4°C para lograr así la lisis osmótica. Las muestras así tratadas fueron centrifugadas por 30 min. a 10000 rpm (Sorvall -SS34) para desechar los restos celulares.

### 2.5.2.3.- Lisis Mecánica de las Levaduras.

Los paquetes de levaduras obtenidos a partir de un cultivo con 100 ml. de SC radioactivo (ver medios 2.4.7), fueron lavados con 20 ml. de agua bidestilada estéril y nuevamente centrifugados a 5000 rpm durante 5 min (Sorvall SS34). Las células fueron resuspendidas en 20 ml. de mezcla lítica (4 tubos con 5 ml. cada uno), agregándoseles un volumen igual de perlas de vidrio. Posteriormente, las muestras se agitaron en Vortex durante 2 min., colocándose 2 min. en hielo; este procedimiento se repitió hasta que el 80% de las células estuvieran rotas. Se extrajo el sobrenadante conteniendo la mezcla de células lisadas, las perlas fueron lavadas con 2 ml de TES (ver soluciones 2.3.2) y el líquido de lavado se juntó con la mezcla de lisis. Con el fin de eliminar los restos celulares, las muestras se centrifugaron 30 min. a 10000 rpm (Sorvall SS34).

### 2.5.3.- Extracción del ADN.

Después del lisado y la separación de los restos celulares, los sobrenadantes se incubaron con 1 volumen (vol.) - de fenol y 0.5 vols. de cloroformo, invirtiéndose el tubo que contenía la mezcla durante 20 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 min. a 5000 rpm (Sorvall SS34), recuperándose la fase acuosa (superior) en la cual se encuentran los ácidos nucleicos evitando que se mezclara la interfase orgánica (en la cual se reparten las proteínas). Las muestras acuosas se mezclaron con 1 vol. de éter etílico saturado en TES, invirtiendo continuamente el tubo que contenía la mezcla por 1 0 2 min. y centrifugando 5 min. a 5000 rpm (Sorvall SS34). Este último paso se repitió hasta que la fase acuosa se observó transparente. (La fase orgánica de este lavado, permanece en la parte superior y es desechada en cada ocasión). El éter, que aún permanecía en la muestra, se evaporó por aereación. Después de evaporar el éter, la muestra fue llevada a una concentración final de 0.3M de NaCl. -- Luego se agregó 0.1 vol. de acetato de Sodio 3M de pH 6 y el ADN se precipitó después de agregar 2 vol. de etanol a -20°C e incubarlo por lo menos cuatro hrs en esta temperatura. La solución, fue centrifugada a -10°C durante 30 min a 10000 rpm (Sorvall SS34) formándose así una pastilla de ADN. El sobrenadante se decantó y el ADN se secó por aereación. La pastilla fue resuspendida en 12 ml de TE (ver soluciones 2.3.3), agregándosele 10 ug/ml de RNasa A 10 U/ml de RNasa T<sub>1</sub>, 1 U/ml de RNasa T<sub>2</sub> - las RNasas fueron incubadas 15 min. a 80°C para inactivar ADNasas presentes, e incubándose 2 hrs. a 37°C, ya que la pastilla contenía una alta concentración de ARN celular.

#### 2.5.3.1.- Separación del ADN en CsCl.

Las muestras de ADN (3.5 ml) se colocaron en tubos Beckman de polialómero previamente hervidos 5 min. en TES, agregándoseles 3.1 gr de CsCl y 0.3 ml de Et.Br (5 mg/ml). Se mezcló suavemente por inversión hasta que se disolvió el CsCl. Los tubos se llenaron con aceite de nujol y se taparon.

Las muestras se centrifugaron durante 40 hrs. a 45000 rpm 18°C, en una ultracentrífuga Beckman H, utilizando el rotor SW 50.1.

El procedimiento anterior también se realizó colocando 7.6 ml de solución de ADN, 7.1 gr de CsCl y 0.6 ml de Et. Br; centrifugándose en el rotor 50 Ti.

En ambos casos se agregó el Et.Br, ya que este compuesto se intercala en el ADN y cuando se transilumina, con luz ultravioleta, se observa fluorescencia en las regiones donde hay ADN.

#### 2.5.3.2.- Recolección del Gradiente de CsCl.

Después de la centrifugación isopícnica, el gradiente se colectó de 2 maneras:

1) Para las muestras de ADN radioactivo, se picó el fondo del tubo con una aguja caliente, colectando fracciones de aproximadamente 150 ul por pozo, en una caja de microtítulo. (Se colectaron alrededor de 50 fracciones).

2) Para las muestras de ADN no radioactivo, se picó con una jeringa 3 mm por debajo de la banda del ADN 2 micras, ex trayendo la banda con mucha suavidad (aproximadamente 0.8 ml de muestra).

En ambos casos se trabajó en una zona oscura, de bido a que el Et.Br es un compuesto sensible a la luz.

#### 2.5.4.- Determinación y Caracterización del ADN 2 micras.

##### 2.5.4.1.- Cuantificación de Radioactividad.

De las muestras contenidas en la caja de microtítulo, se tomaron alícuotas de 20 ul, las cuales fueron ajustadas a pH 11 con NaOH 1N, incubándose durante 18 hrs a 37°C, con el fin de degradar todo el ARN que pudiera contaminar la muestra; - las alícuotas fueron neutralizadas con HCl 1N. Posteriormente se agregaron 50 ul de Albúmina de Suero de Bovino (BSA) 1 mg/ml y 1 vol. (80 ul) de TCA al 10% frío. Las muestras se colocaron en fil tros Whatman 3 MM. Se lavaron 3 veces con solución de TCA 5% frío posteriormente, los filtros se secaron y se les agregó 3 ml de líquido de centelleo omnifluor tolueno. Las cuentas por minuto -

(cpm) incorporadas a cada fracción de ADN, se cuantificaron utilizando un contador de centelleo líquido Pakard Tri-Carb Spectrometer C2425.

#### 2.5.4.2.- Densitometría.

Se colocaron alícuotas de 20 ul en un refractómetro Baush and Lomb. La densidad de cada muestra se calculó a partir del índice de refracción siguiendo la relación:

$$\text{Densidad} = a(\text{índice de refracción}) - b$$

en donde :  $a = 10.8601$  y  $b = 13.4974$  , utilizados como constantes de corrección para los gradientes de CsCl.

#### 2.5.4.3.- Purificación

A las bandas de ADN colectadas con jeringa, se les agregó 1 vol. de isopropanol saturado en TES.CsCl (ver soluciones 2.3.5), se mezcló por inversión durante 2 min. y se dejó 5 min. en hielo. Se extrajo la fase orgánica, en la cual se disuelve el Et.Br (este lavado se realizó tres veces). Posteriormente, las muestras se colocaron en membranas de diálisis y se dializaron por 24 hrs. en 2 L. de Tampón D (ver soluciones 2.3.4) -Es conveniente cambiar el Tampon D después de 1 ó 2 hrs. de diálisis- La muestra se guardó a 4°C en un tubo Eppendorf estéril.

#### 2.5.4.4.- Cuantificación

La cuantificación del ADN se realizó de 2 formas

a) Se tomó una dilución 1/4 de la muestra y se midió la densidad óptica a 260nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss partiendo de la relación:

$$1 \text{ Unidad de Densidad Optica } 260\text{nm} = 50 \text{ ug/ml de ADN}$$

b) También se realizó la determinación de la cantidad de ADN por el método de la Difenilamina, el cual consistió en; mezclar 3 concentraciones conocidas de ADN(vol. final 200 ul) con un volumen de  $\text{HClO}_4$  1M y 2 vol. de reactivo de Difenilamina-activada (ver soluciones 2.3.7); de esta manera se elaboró una curva patrón de concentración de ADN en relación a la densidad -

óptica a 600nm. El procedimiento anterior, también fue realizado con una dilución 1/10 de la muestra de ADN purificado (ver Métodos 2.5.4.3). El dato obtenido en este caso, fue interpolado en la curva patrón determinándose así la concentración de la muestra

#### 2.5.4.5.- Ensayos con Enzimas de Restricción.

Las muestras del ADN minicircular 2 micras, así como las muestras testigo, ADN circular de SV40 y plásmido de *E. coli* pLax, se sometieron a hidrólisis con las restrictasas EcoR1, Pst1 y BamH1, bajo las siguientes condiciones:

Para la enzima EcoR1: se colocaron 4 ul de mezcla de sales EcoR1 5X (ver soluciones 2.3.9), 2 ul de enzima 2 U/ul, 2 y 4 ug de ADN 2 micras (vol. final 7.5 y 15 ul), ó 2 ug de ADN SV40 (vol. final 8 ul), ó 2 ug de ADN pLax (vol. final 6 ul).

Para la nucleasa Pst1: se colocaron 4 ul de mezcla de sales Pst1 5X (ver soluciones 2.3.10), 2 ul de enzima 1U/ul, 1 y 2 ug de ADN 2 micras (vol. final 4 y 8 ul), ó 2 ug de -- ADN SV40 (vol. final 8 ul), ó 2 ug de ADN de pLax (vol. final 6- ul).

La nucleasa BamH1 se ensayó utilizando: 4ul de -- mezcla de sales BamH1 5X(ver soluciones 2.3.11), 1 ul de enzima- 2 U/ul, 1 y 2 ug del ADN 2 micras (vol. final 4 y 8 ul), ó 2 ug- del ADN de SV40 (vol. final 8 ul), ó 2 ug del ADN de pLax (vol. final 6 ul).

En todos los casos el volumen final para las -- volumen final para las reacciones enzimáticas se ajustó a 20 ul. Las mezclas se incubaron durante 2 hrs. a 37°C. La reacción fue detenida incubando las muestras 5 min a 70°C.

#### 2.5.4.6.- Electroforesis en Agarosa.

Después de la restricción, se adicionó a las -- muestras 1 ul de colorante (azul de bromofenol 0.07% glicerol -- 33% SDS 7%). Se colocaron 20 ul de cada muestra en diferentes po cillos de un gel de agarosa y se sometieron a electroforesis (utilizando como soporte el gel de agarosa) durante 15 hrs. a 35 V a temperatura ambiente, en Tampón E (ver soluciones 2,3.8)

Se preparó el gel disolviendo 1.25 gr. de agarosa en 125 ml. de Tampón E (llevándolo a ebullición por 2 min.). - Se vació la solución en una cámara horizontal y se colocó el peine para la formación de los pozos, dejándolo enfriar durante 15 min. Se agregaron 1,3 Ls. de Tampon E, se sacó el peine y se recorrió el gel 30 min. a 70 V. Posteriormente, se colocaron 20 ul de muestra por pozo (la concentración de ADN fue la misma que la indicada en los ensayos de restricción); además se colocaron -- muestras testigo: 2 ug de ADN de 2 micras, 2 ug de ADN de SV40 y 2 ug de ADN de pLax sin restringir. Se corrió primero a 70 V. durante 15 min. y luego a 35 V. durante el resto de la electroforesis (15 hrs.).

Después de la migración electroforética, los -- fragmentos de ADN se observaron tñiendo el gel por incubación, durante 30 min. con una solución de Et.Br 2 ug/ml y colocándolo directamente en un transiluminador adaptado por la Jolla Scientific. El gel fue fotografiado con una cámara polaroid MP4, usando película polaroid T-55.

#### 2.5.5.- Microscopía Electrónica.

##### 2.5.5.1.- Preparación de las Rejillas.

Se colocaron segmentos de mica, de aproximadamente 3 cm. x 2 cm, en un evaporador Jeol; evaporando carbono por el método del arco eléctrico (57), se depositó una película de carbono en las micas. Las rejillas se lavaron con acetona y agua destilada y se colocaron en un portarrejillas. El portarrejillas fue sumergido en un cristizador lleno de agua destilada. En el mismo recipiente, se desprendieron cuidadosamente las películas de carbono de la mica, permitiendo que la película flotara en el agua del cristizador. Se drenó el agua del cristizador y la película de carbono se depositó en las rejillas. (Fig. 9).

##### 2.5.5.2.- Preparación de las Muestras.

Las muestras del ADN minicircular 2 micras, fue-

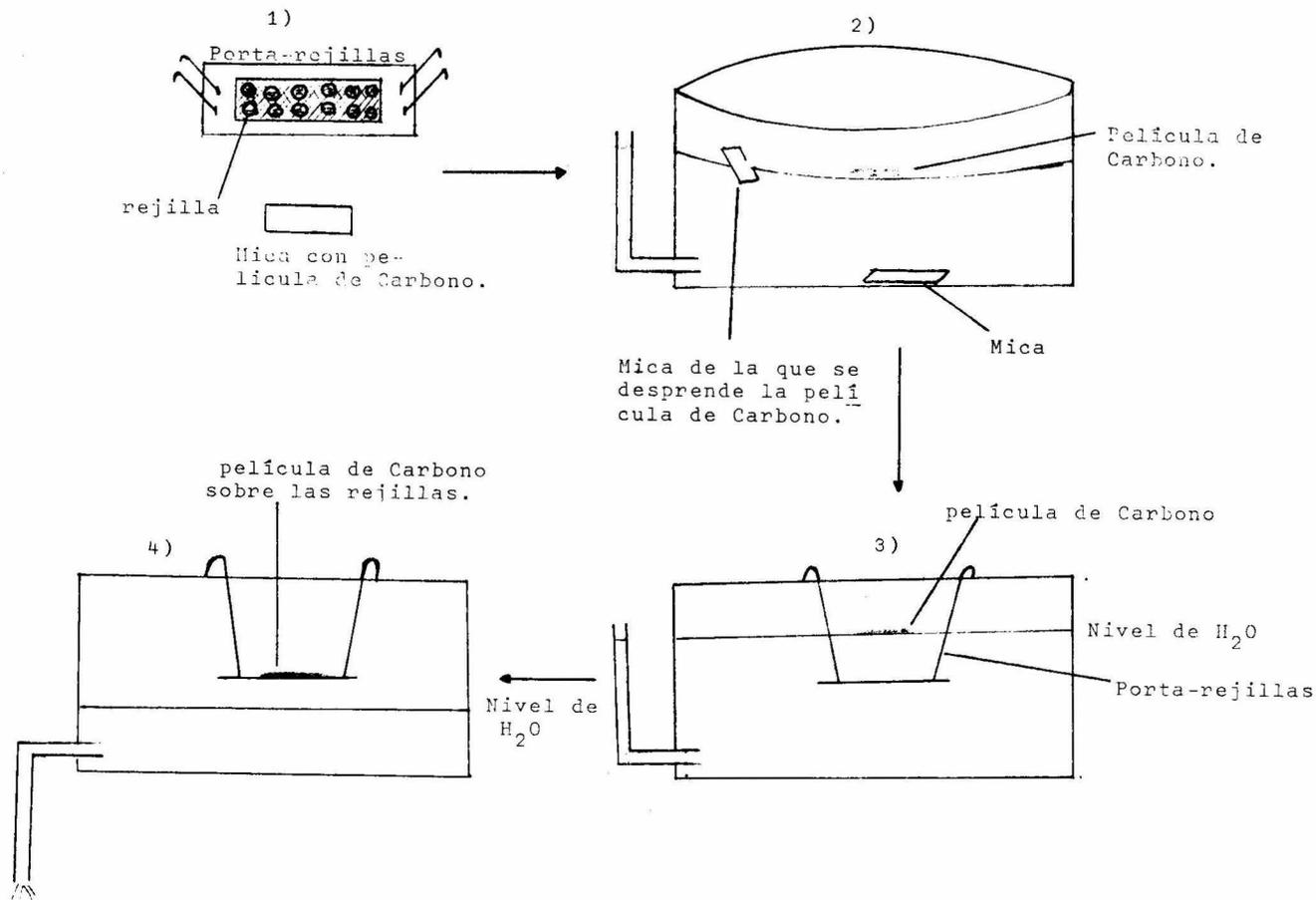


Figura No. 9

ron diluídas en una solución hiperfásica (ver soluciones 2.3.13) a una concentración de 0.0015 ug/ul; 10 ul de muestra diluída se deslizaron (sobre un portaobjetos limpio) hacia una solución hipofásica (ver soluciones 2.3.12), contenida en una caja de Petri (sobre la solución hipofásica es conveniente poner una fina película de talco) (Fig. 10).

Se tomó una (rejilla previamente preparada), con ésta se tocó la hiperfase extendida en la caja de Petri. Se dejó que la muestra se adsorbiera a la rejilla por 2 min. Posteriormente la rejilla fue sumergida en una solución de etanol al 90% (sólo unos segundos). Se eliminó el exceso de etanol con un papel filtro. Una vez fijada la muestra, se tiñó durante 5 min. -- con una solución de acetato de uranilo al 1% (se agregó una gota de acetato de uranilo sobre la rejilla y se impidió al máximo el contacto con el aire, ya que éste descompone la solución de uranilo). Nuevamente se lavó con etanol al 90% eliminando el exceso con papel filtro; la muestra se dejó secar 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron las muestras sobre una base rotatoria dentro del evaporador (a un ángulo de 15°), para ser sombreadas por evaporación de platino-paladio.

Las rejillas fueron observadas y fotografiadas - en un Microscopio Electrónico Carl Zeiss Modelo Jeol

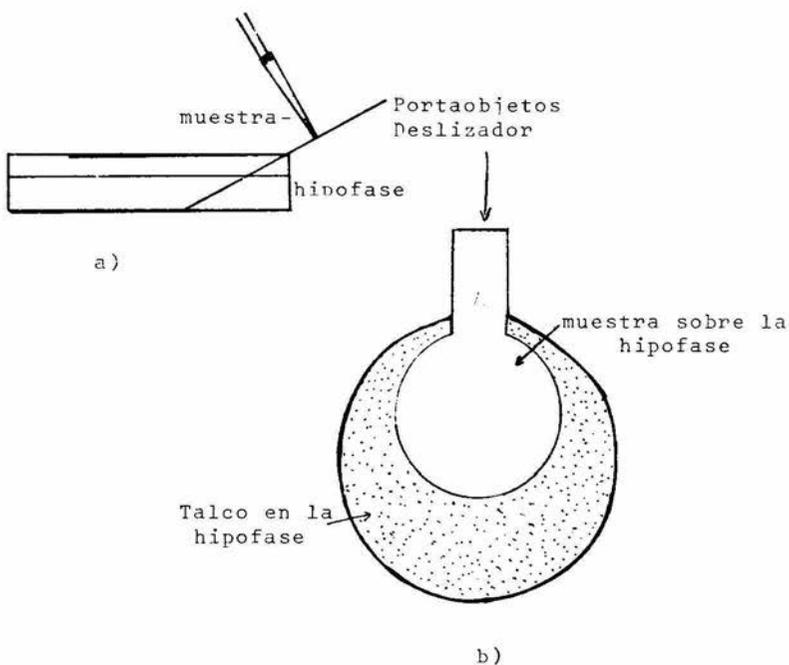


Figura No. 10.- a) Vista lateral de la caja de Petri que contiene la hipofase, el portaobjetos en el que se desliza la muestra y la pipeta -que contiene la hipofase con la muestra- con la que se coloca la preparación sobre el deslizador. b) Vista superior del deslizador y la caja de Petri con la hipofase, el talco -presente en la hipofase- es desplazado por la muestra contenida en la hipofase. Se observa como una película de aceite, formada por una gota de aceite en agua.

### 3.- RESULTADOS

3.1.- Se determinó el ciclo celular de la levadura con dos fines:

a) Trabajar cuando las levaduras se reproducen activamente (fase logarítmica de crecimiento), para que estén sintetizando secuencias del plásmido 2 micras, ya que está reportado que el minicírculo se replica durante la fase S del ciclo celular (58).

b) Evitar que las levaduras crecieran hasta la fase estacionaria, ya que en ésta, comienzan a acumular glucógeno y otros productos que, para los fines de purificación, provocarían dificultades para los procedimientos de separación del --ADN.

Después de la incubación en medio selectivo para resistencia a oligomicina (ver métodos 2.5.1.1), se obtuvieron 308 colonias resistentes, de las cuales se escogieron 2 de ellas para hacer soluciones stock de trabajo y para conservar--las.

Los stocks de la cepa s288c<sup>+</sup> (resistentes a 3 ug /ml de oligomicina), se crecieron a una densidad de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml. ; esta concentración fue calculada --por turbidimetría utilizando un fotocolorímetro Klett.Summer--son (filtro rojo), en donde 6 unidades Klett corresponden a -- $5 \times 10^6$  células/ml. Los datos del crecimiento se muestran en --la figura 11.

La curva de crecimiento nos indicó que las levaduras, como cualquier otro microorganismo, presentan una fase de adaptación, otra logarítmica y también la fase estacionaria de crecimiento; además, se observó que entre las 12 a 15 hrs.- del crecimiento, las células se encontraban en fase logarítmica, por lo que fue el momento en que se colectaron, para reali--zar los métodos de lisis, fraccionamiento y purificación del --ADN 2 micras. Por otra parte, con el fin de determinar la velo--cidad específica del crecimiento (W) y el tiempo de duplica--

CRECIMIENTO DE LEVADURA

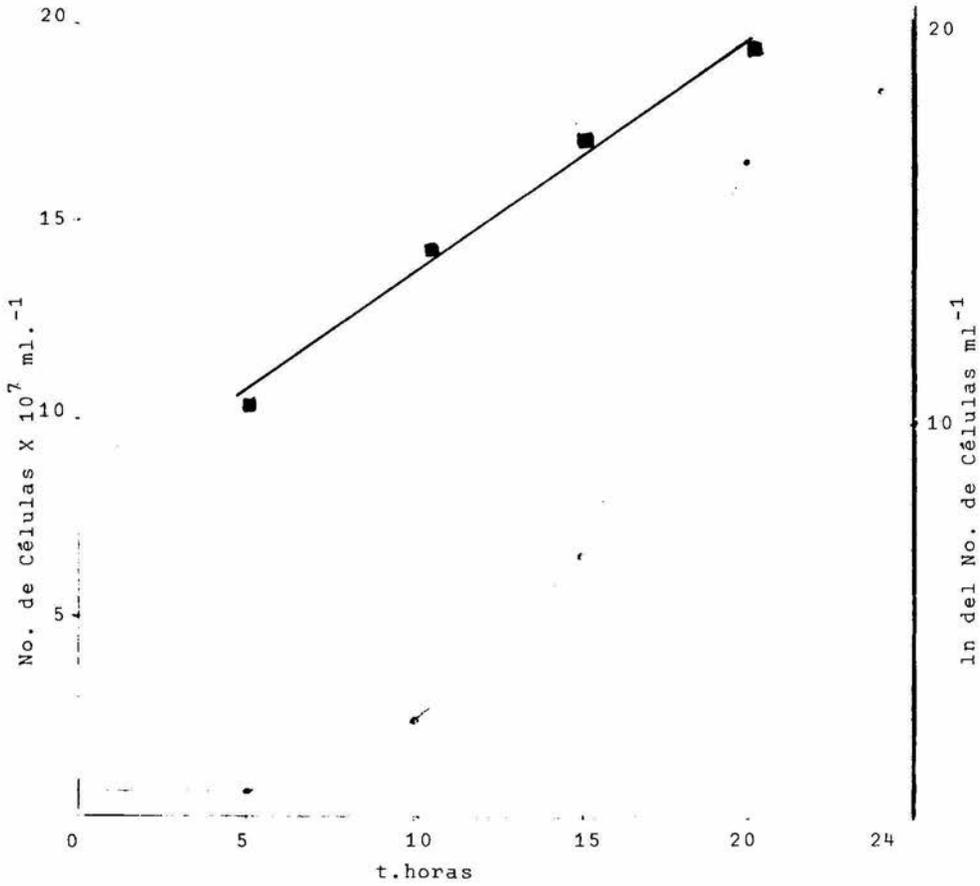


Figura No. 11.- Crecimiento de *S. cerevisiae* en medio líquido a 23°C. La línea clara con puntos, indica el crecimiento exponencial típico de cualquier microorganismo (escala izquierda). La línea oscura con cuadros, indica el logaritmo natural (ln) del número de células, utilizado para conocer el tiempo de duplicación de la cepa.

ción (td). Se calculó el logaritmo natural del No de células, cuya pendiente en relación al tiempo, nos indicó que la velocidad específica de crecimiento fue de  $2.6 \times 10^{-1}$  células / hr. (ecuación No. 1). El dato que encontramos para el tiempo de duplicación de nuestra cepa fue de 2.6 hrs (ecuación No. 2).

$$W = \frac{\ln 2 - \ln 1}{t_2 - t_1} = 0.26 \quad (1)$$

$$\ln 2 = W t_d ; t_d = \frac{\ln 2}{W} = 2.6 \text{ hrs.} \quad (2)$$

3.2.- Para caracterizar la presencia del ADN minicircular 2 micras en los cultivos celulares, se realizó un experimento de marcaje (ver métodos 2.5.1.2, 2.5.2.3, 2.5.3.1, 2.5.3.2 y 2.5.4). Posteriormente se graficaron las cpm (cuentas por minuto) incorporadas al ADN presente en las diferentes fracciones del gradiente. Además, se cuantificó la densidad de cada fracción, con el fin de determinar la densidad del minicircular. La figura No. 12, muestra los resultados de la incorporación de radioactividad y de la densitometría.

Las gráficas de la figura No. 12, muestran que el plásmido 2 micras se distribuye entre las fracciones 18 y 23, en tanto que las fracciones 30 a 36 corresponden al ADN nuclear y mitocondrial que también incorporaron radioactividad.

Puede observarse también, que el ADN del minicircular presentó una densidad en solución de CsCl-Et.Br de 1.651 gr./ml., en tanto que el ADN nuclear presentó una densidad de 1.614 gr./ml.. La densidad del ADN mitocondrial no fue calculada.

3.3.- En un experimento preparativo la cantidad de ADN minicircular purificado (ver la sección de métodos), obtenido a partir de  $3.2 \times 10^{11}$  células (en fase logarítmica de crecimiento), fué de 2 D.O (D.O=unidad de Densidad Óptica) a 260nm o sea, 100ug de ADN total cuantificado por absorción a 260 nm-- (1 D.O<sub>260</sub> = 50 ug de ADN).

Para cotejar este dato se realizó el método de -

ANALISIS DEL ADN CELULAR TOTAL DE LEVADURA  
EN GRADIENTE DE CsCl-EtBr.

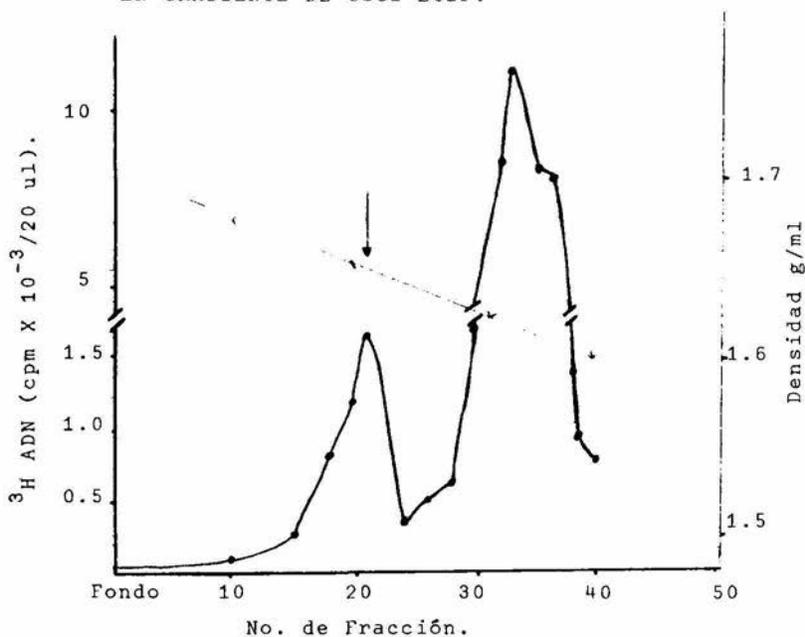


Figura No. 12.- Las células se crecieron en presencia - de  $^3\text{H}$  UMP. El ADN celular total de la levadura, se extrajo y - se centrifugó en presencia de  $\text{CsCl-EtBr}$ ., como se describió en Métodos (2.5.3, 2.5.3.2, 2.5.4.1, 2.5.4.2). La flecha indica la densidad del ADN 2 micras.

difenilamina (ver métodos 2.5.4.4), los resultados de este expe rimento se muestran en la figura No. 13. Como puede observarse, la concentración de ADN minicircular fue de aproximadamente 94-ug/ml (D.O. a 600 nm = 0.52). Esta concentración es similar a - la obtenida midiendo directamente a 260 nm, la cual fue de 100-ug de ADN. Los datos teóricos de la concentración de ADN 2 mi-- cras que es posible obtener, se comentan en la discusión.

3.4.- Con el fin de determinar algunos de los sitios - de restricción presentes en la secuencia del plásmido 2 micras, cuantificando el número de fragmentos resultantes, se realiza-- ron restricciones de la muestra seguidas de electroforé<sup>s</sup>is.

El resultado de la migración electroforética de- los ADNs 2 micras, SV40 y pLax (los últimos 2 se utilizaron co- mo testigos), tanto digeridos por nucleasas como sin digerir, - se muestran en la figura No. 14.

En el primer carril migró el plásmido testigo -- pLax, cuya longitud de contorno (perímetro) es de 1.5 micras; - se observaron 2 bandas correspondientes a 2 formas del plásmido. La banda superior (cuya migración fue de 41 mm.) corresponde a- la forma III, linealizado; la banda inferior, corresponde a la- forma I, superhelicoidal (migró 60 mm.). La migración de la for- ma I fue mayor porque el ADN superenrollado opone menor resis- tencia por fricción que las formas circulares y lineales.

El segundo carril contiene el ADN del virus SV40 cuyo perímetro es de 1.68 micras, éste también presento la for- ma I (cuya migración fue de 58 mm) y la forma III (que migró 38 mm).

El carril No. 3 muestra la migración del ADN mi- nicircular 2 micras; la forma I presentó una migración de 51 mm (banda inferior). La forma II, presentó una migración de 40 mm y la forma III, migró 31 mm. Las 3 formas de los plásmidos se - pueden observar en la figura No. 4. También en este carril exis- ten otras bandas con diferente migración, que al parecer son dí- meros o formas concatenadas de las moléculas del plásmido 2 mi- cras.

CURVA DE CONCENTRACION DE ADN

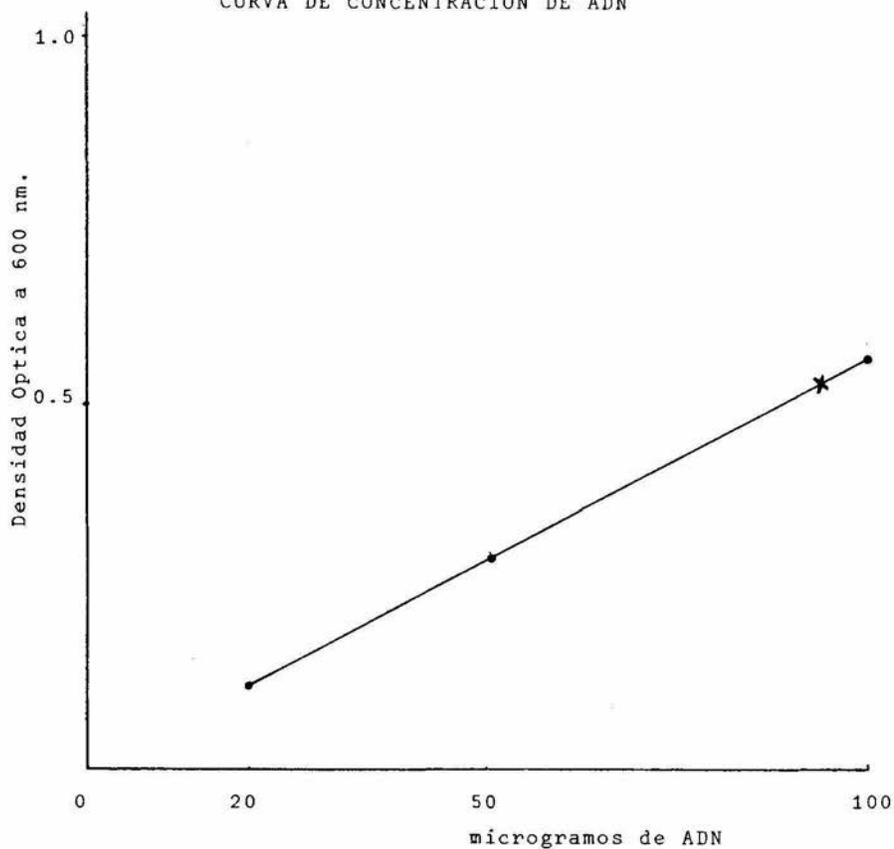


Figura No.13.- La reacción se describe en la sección de Métodos (2.5.4.4). ADN de timo de ternera fue utilizado para la curva patrón. El punto marcado con una cruz (X) corresponde a la concentración obtenida para el ADN 2 micras.

En el carril No. 4, migraron los fragmentos del ADN 2 micras obtenidos después de digerir con la nucleasa EcoR1 (la cual corta secuencias G'AATTC). Hay que hacer notar que la encuentra dos sitios de corte en la secuencia del plásmido 2 micras y genera 4 fragmentos, 2 mayores en tamaño de aproximadamente 3600 pares de bases (cuya migración fue de 47 y 48 mm.) y 2 menores de alrededor de 2600 pares de bases que migraron 64 y 66 mm. ya que el plásmido presente 2 formas intracelulares (ver introducción).

Carril No. 6; se presenta una sola banda producto de la digestión del ADN de SV40 por la nucleasa EcoR1. Esta banda indicó, que la mayor parte de este ADN fue linearizado y migró 38 mm.

Carril No. 7; se observa la migración del ADN de pLax, digerido por la enzima EcoR1, que como en el caso anterior se linearizó y produjo un fragmento que migró 40 mm.

Los carriles 8 y 9, muestran el ADN del plásmido 2 micras obtenidos después de la digestión con la enzima Pst1 - (corta secuencias CTGCA'G), la cual linearizó el ADN 2 micras.- Ya que se observó una sola banda cuya migración fue de 34 mm., - indicación de que la enzima solamente produce 1 corte en la secuencia del ADN 2 micras.

En el carril No. 10 migró el ADN de SV40, después de ser digerido con la nucleasa Pst1, sin embargo en este caso falló la restricción (ver discusión) y la migración fue similar a la mostrada por el ADN de SV40 sin digerir.

Por otra parte, en el carril No. 11 se digirió - el ADN de pLax con la enzima Pst1, como esta enzima sólo hace 1 corte en la secuencia de pLax, lo lineariza. La migración fue - de 40 mm. (igual que en el carril No. 7).

La restrictasa BamH1, corta secuencias G'GATCC. Al ensayar esta enzima con el ADN del plásmido 2 micras (carriles 12 y 13), se observó que no hay sitios de corte en el plásmido y por lo tanto, el patrón de migración es similar al de -- los carriles 3 y 16..

MIGRACION DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

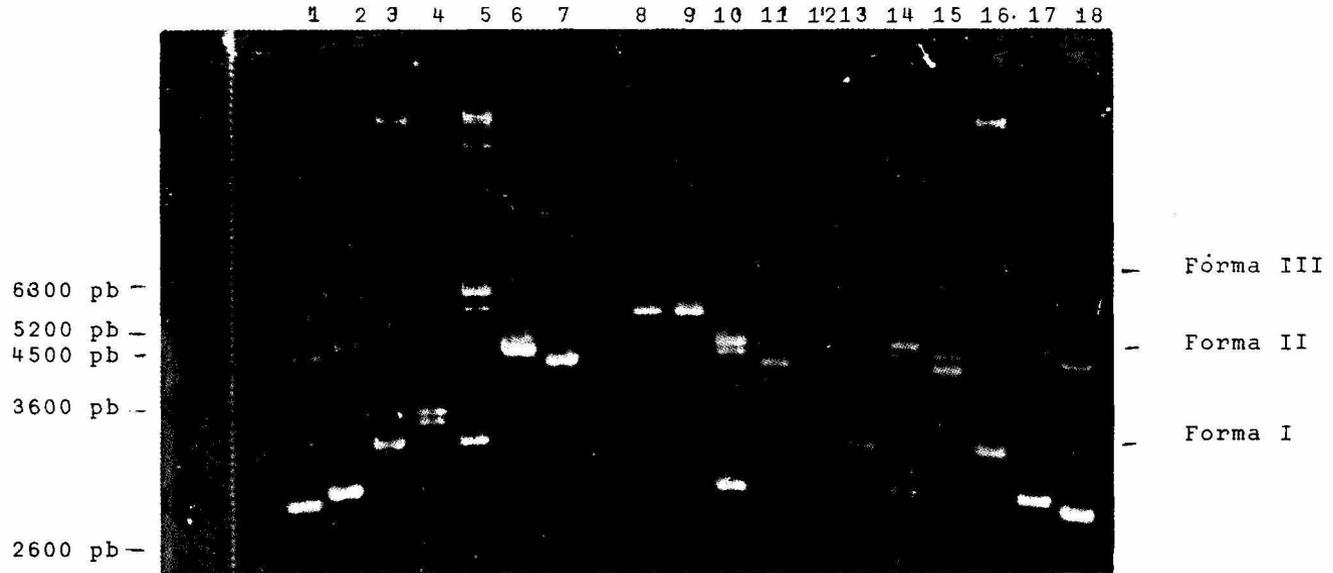


Figura No. 14.- Gel de Agarosa 1% en Tampón E. La migración se realizó utilizando Tampon E (durante 15 hrs. a 35 V. temperatura ambiente). En los carriles se observan los patrones de migración de los ADNs 2 micras, SV40 y pLax, tanto restringidos con las enzimas, como sin restringir (ver Métodos). En la escala de la derecha se muestra las formas en que migró el plásmido 2 micras sin restricción. En la escala de la izquierda se indica el número de pares de bases de algunas moléculas linearizadas.

El carril No. 14, muestra al ADN de SV40 "digerido" con BamH1, sin embargo, (como en el carril No. 10) falló la restricción y la migración fue similar a la del carril en -- donde se encuentra el ADN de SV40 sin digerir.

En el carril No. 15 se observa una banda que corresponde al plásmido pLax linearizado por la digestión de la enzima BamH1, ya que el ADN de pLax, tiene una secuencia en donde corta la enzima. La banda migró al igual que con EcoR1 y PstI 40 mm.

En los carriles 16, 17 y 18 se colocaron respectivamente, ADN 2 micras, ADN de SV40 y ADN de pLax sin digerir (igual que en los carriles 1, 2 y 3), para obtener una mejor relación de los fragmentos de ADN en ambos extremos del gel.

3.5.- Por último con el fin de observar la estructura del plásmido 2 micras, se hicieron preparaciones para Microscopía Electrónica (ver métodos 2.5.5).

En la figura No. 15 puede verse una estructura circular. Con el aumento utilizado (20000 diámetros), 2 cm corresponden a 1 micra. La longitud de contorno de la molécula que se muestra en dicha figura, fue de 2.15 micras.

La figura No. 16, es una amplificación a 45000 - diámetros del plásmido 2 micras, y como en el caso anterior, la medida corresponde a 2.1 micras. Sin embargo, en esta preparación del ADN 2 micras, la mayoría de las moléculas observadas, si --- bien medían 2 micras, eran lineales.

Una segunda muestra preparada para microscopía - electrónica, en la cual se realizó un sombreado rotatorio a un - ángulo de 15°, se observa en la figura No. 17. El aumento utilizado en este caso fue de 120000 diámetros; en esta preparación - se observó que más del 50% de las moléculas de ADN eran circulares.

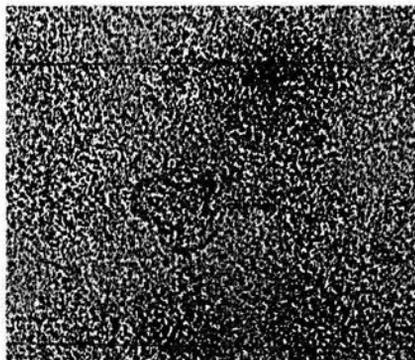


Figura 15,- Fotografía al microscopio electrónico de una molécula del ADN 2 micras, La preparación de la muestra se describió en la sección de Métodos (2.5.5) y la amplificación fue de 20000X.

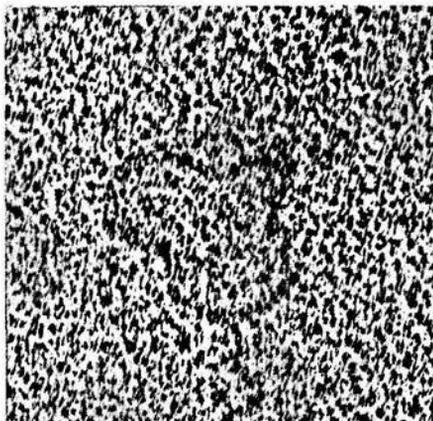


Figura 16.- Amplificación del plásmido 2 micras a 45000X las condiciones para la preparación de esta micrografía, fueron iguales a las descritas en la figura 15.

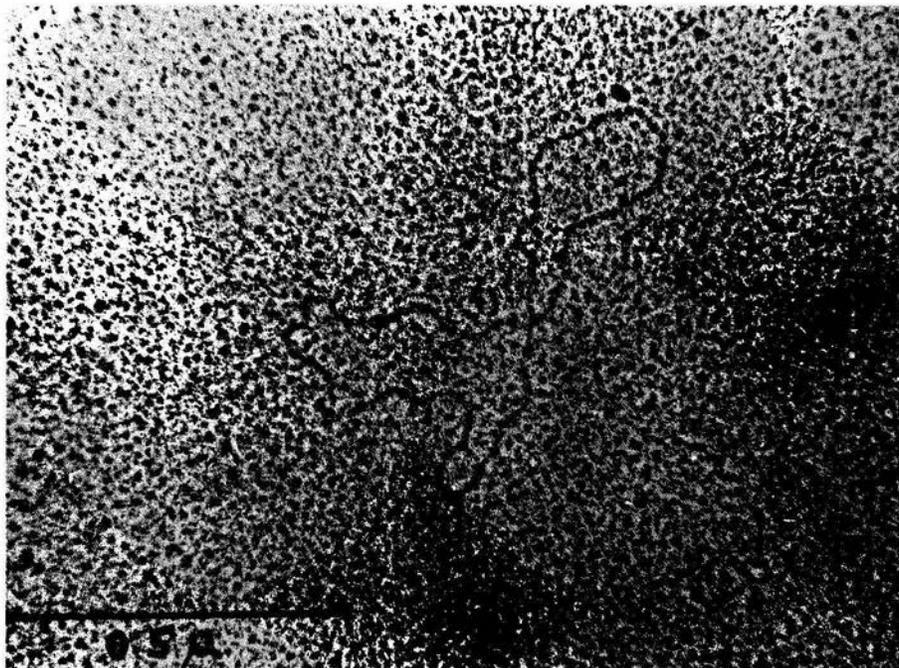


Figura No. 17.- Micrografía del ADN minicircular 2 micras, sombreado a un ángulo de  $15^{\circ}$  y utilizando una amplificación de 120,000 X

#### 4.- DISCUSION

Podemos considerar que la prueba de resistencia a oligomicina, nos proporcionó un criterio adecuado para la determinación de la presencia del plásmido, ya que nuestros resultados concuerdan con lo propuesto por Guerineau (1974) y Berg (1975), los cuales señalan que existe una relación directa entre la presencia del plásmido y la resistencia a algunos antibióticos. Las colonias utilizadas en nuestros experimentos de aislamiento y purificación, fueron resistentes a 3 ug/ml de oligomicina. La cepa isogénica S288C<sup>-</sup> (sin el plásmido), no presentó resistencia al antibiótico (resultados no presentados) y por lo tanto, podemos atribuir la resistencia a oligomicina a la presencia del ADN minicircular 2 micras en la cepa S288C<sup>+</sup>.

Se podría cuestionar la validez del uso de <sup>3</sup>HUMP como precursor para marcar el ADN 2 micras, ya que este metabolito se incorpora específicamente al ARN y no al ADN; sin embargo, por conveniencia metodológica debimos emplear este marcaje partiendo de los siguientes hechos:

1) Las cepas de levadura empleadas son impermeables a timina y timidina (precursores para ADN) por lo que no podríamos marcar ADN específicamente.

2) El uso de cualquier otro nucleósido o nucleótido precursor (en el caso de ser permeable), se incorporaría inespecíficamente al ADN o al ARN.

3) La levadura contiene la enzima Timidilato sintetasa, la cual cataliza la conversión del dUMP (desoxiuridilato) en dTMP (desoxitimidilato); aprovechando esta ruta metabólica, podemos marcar específicamente ADN y aún cuando el isótopo se incorpore al ARN, degradando las moléculas de ARN con ARNasa o con álcali, el marcaje resultó específico para ADN.

La reacción de conversión del dUMP a dTMP se muestra en la figura No. 18.

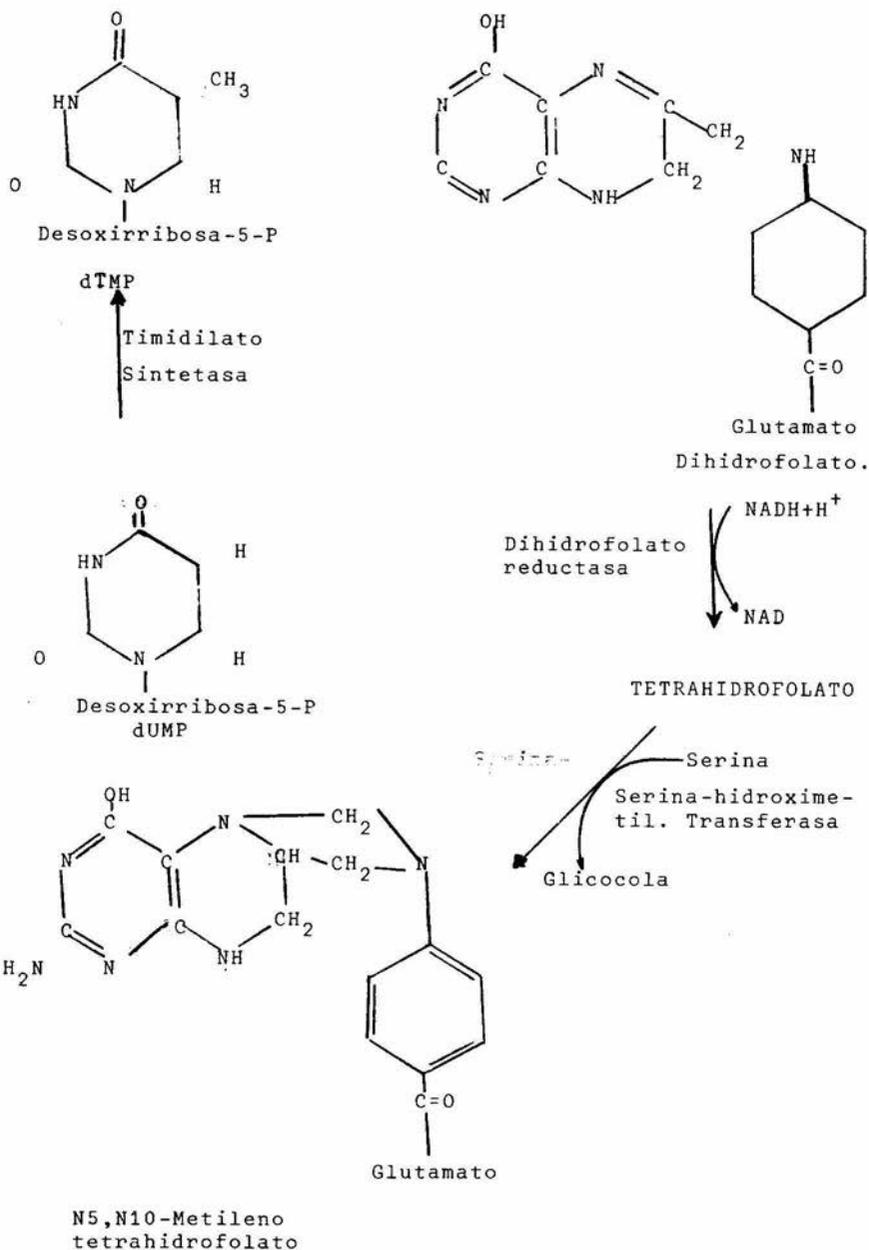


Figura No. 18.- Ruta de conversión del desoxiuridilato en desoxitimidilato por la timidilato sintetasa.

Los resultados de la figura No. 12 nos muestran la presencia de 2 picos de incorporación ( $^3\text{HADN}$ ) y un hombro en el segundo pico. El primer pico corresponde al del ADN 2 micras, ya que éste es un poco más denso y se encuentra más cercano al fondo del gradiente, este hecho concuerda con los resultados de Guérineau, Stevens (1974) y Hollenberg (1976). Además, un dato interesante es que el tritio incorporado en el primer pico ( $9 \times 10^{-3}$  cpm), es de 7 a 8 veces menor que la cantidad incorporada al ADN total ( $65 \times 10^{-3}$  cpm). Se podría preguntar ¿por qué, si el ADN del minicírculo corresponde al 3% del ADN total, no existe un 3% de incorporación en el primer pico con respecto a la incorporación total? ya que de acuerdo a nuestros resultados, en el primer pico existe más de un 13% de tritio incorporado. - Esto se puede deber a diferentes causas:

a) Al procedimiento aislado para aislar ADN, el cual favorece el enriquecimiento de ADN de bajo peso molecular.

b) A que la cantidad de timina en las secuencias del minicírculo sea mayor que en las secuencias de los cromosomas de la levadura; de esta manera, la incorporación de tritio al plásmido sería mayor. Aunque esta segunda posibilidad es menos probable que la primera, un experimento de marcaje uniforme con  $^{32}\text{P}$  (fósforo 32), o bien, un análisis de las abundancias de timina en el plásmido y en el núcleo podría indicar mejor cuáles es la respuesta.

Suponemos que el hombro que se presentó en el segundo pico de la figura No. 12, corresponde al isótopo incorporado al ADN mitocondrial, ya que en nuestro gradiente, se observó que la banda de ADN nuclear y la de ADN mitocondria se se paraban muy poco. Sin embargo, como el ADN mitocondrial no fue objeto de nuestro estudio, no lo analizamos detalladamente.

Por otra parte, también en la figura No. 12, se muestra la densitometría del gradiente en que obtuvimos el plásmido 2 micras. La densidad del minicírculo en solución de  $\text{CsCl-EtBr}$ . fue de  $1.651 \text{ g/cm}^3$ , este resultado no concuerda con los datos de Hollenberg (1970) y Giudice (1979), quienes han repor-

tado una densidad de  $1.698 \text{ gr/cm}^3$ , sin embargo, hay que aclarar que ellos determinaron la densidad en gradientes de CsCl sin - Et.Br. Consideramos que por esta razón, nuestro dato es discordante con respecto al de otros autores.

Los resultados mostrados en la figura No. 13, - indican que la concentración de ADN minicircular 2 micras obtenida a partir de  $3.2 \times 10^{11}$  células, fue de 100 ug. Consideramos que es necesario realizar un cálculo teórico que nos indique el No. de plásmidos que obtuvimos, con el fin de calcular el No. de plásmidos por célula. Para realizar este cálculo, partimos - del peso molecular del minicírculo,  $4.1 \times 10^{12}$  daltones, y lo relacionamos con el No. de Avogadro  $6.023 \times 10^{23}$ , de donde se deduce que:

$6.023 \times 10^{23}$  copias del plásmido pesan  $4.1 \times 10^{12}$  ug.  
por lo tanto:

$1.47 \times 10^{13}$  copias de plásmido pesan  $1.0 \times 10^2$  ug.

En base al cálculo anterior tenemos:

si  $3.2 \times 10^{11}$  células presentaron  $1.47 \times 10^{13}$  plásmidos  
entonces 1 célula presenta 46 copias de plásmido.

Considerando un 100% de rendimiento nuestra cepa presentó, de acuerdo a nuestro cálculo teórico, 46 plásmidos por célula. Este resultado concuerda con el dato reportado por Clark Walker (1972), Guerineau (1974) y Livingston (1977), el cual indica la presencia de 50 copias intracelulares del plásmido. Esta concordancia nos hace ver que el procedimiento de aislamiento y purificación del minicírculo fue el adecuado.

De acuerdo al análisis realizado con las enzimas de restricción, se demostró la presencia de las formas A y B del minicírculo 2 micras, las cuales presentan una inversión en la - secuencia de repetición invertida (broach 1979). Esta inversión, es la responsable de que después de la restricción con EcoR1, se presentaran 4 fragmentos de ADN (vease la figura No. 14). En esta misma figura, notamos que la restrictasa Pst1 cortó en un solo sitio el minicírculo, por lo que dió origen solo a moléculas

linearizadas.

Cabe mencionar que la enzima BamH1, no encontró sitios de corte en la secuencia del plásmido 2 micras. Estos datos concuerdan con los trabajos de Cameron(1977) y Hartley (1980) y el mapa de corte para el plásmido se mostró en la figura No. 6 Sin embargo, en los resultados se comentó que en los ensayos del carril No 5 (ADN 2 micras EcoR1), carril No. 10 (Pst1 ADN de SV40), y carril No. 14 (ADN de SV40 BamH1), fallaron las restricciones. Consideramos que las fallas en los ensayos tuvieron diferentes causas dependiendo del caso.

Con respecto al carril No 5, se duplicó la cantidad de ADN 2 micras con respecto a la que se incubó en el ensayo del carril No. 4; en la sección de métodos, se indicó que todos los ensayos fueron realizados en las mismas condiciones, y era probable que incubándose más tiempo, por haber más ADN, o bien agregando una mayor cantidad de enzima, se hubiera obtenido el mismo resultado que en el carril No. 4.

Con respecto a los carriles 10 y 14, esperábamos que las enzimas cortaran al ADN de SV40, sin embargo consideramos que en estos ensayos hubo algún error al colocar la cantidad de muestra del ADN de SV40, ya que en ambos casos parece no haber una digestión por las enzimas y si las bandas correspondientes al ADN no digerido; también es posible haber cometido algún error al colocar la enzima. Aunque no se presentan en este trabajo (por haberse realizado para probar al testigo), los patrones de restricción del ADN de SV40 fueron probados en minigeles pero no fotografiados. La razón por la que pensamos que no era necesario presentar los resultados de los minigeles, es la presencia, en nuestro gel, del testigo pLax que presentó los cortes esperados.

Por último con respecto a los ensayos de restricción, es muy interesante reconocer que en la secuencia del ADN 2 micras, existe un sitio para la restrictas HpaI (resultado no mostrado), el cual no altera las propiedades genéticas del mini

círculo cuando se corta con esta enzima. Se ha sugerido que genes de otros tipos, pueden ser incluidos en este sitio. Para -- después utilizar este ADN modificado para transformar levaduras y así estudiar el gene de interés.

Los resultados de la microscopía electrónica (figuras 15, 16 y 17), nos permitieron corroborar que nuestro material de trabajo fue el plásmido 2 micras. Sin embargo, es evidente que hay notables diferencias entre las figuras 16 y 17 -- con respecto a la figura 18. Las razones de estas diferencias -- fueron: la técnica de sombreado y el ángulo del mismo.

En las figuras 15 y 16, el sombreado se realizó sobre una base inmóvil, a un ángulo de 35°; por lo cual el depósito de la aleación sombreadora, es en una sola cara de la molécula. En tanto que en la figura 17, el sombreado se hizo sobre una base rotatoria y a un ángulo de 15°; de tal manera que la aleación sombreadora se depositó uniformemente en toda la molécula.

Por otra parte, hay que considerar que el porcentaje de moléculas circulares en la muestra utilizada para la figura No. 17, era mucho mayor y por lo tanto se pudo escoger un mejor campo para la fotografía.

Consideramos adecuados nuestros métodos de aislamiento y purificación del plásmido 2 micras, y pensamos continuar una segunda fase del trabajo en la cual se contempla investigar:

a) El aislamiento del minicírculo con histonas (como un minicromosoma), que nos permitirá hacer estudios sobre la estructura de la cromatina eucariótica y su regulación.

b) La caracterización de un complejo de transcripción del plásmido 2 micras. Esta proposición parte del hecho de que deben existir (de las 30 copias intracelulares de cada forma del plásmido), al menos una copia del minicírculo activa en transcripción. De donde se deduce que el porcentaje de genes ac

tivos en transcripción sería mayor al 3%; este porcentaje es mayor que el que se presenta en el virus SV40, que es otro modelo utilizado para estudios de este tipo (ver introducción).

Además, nosotros esperamos que más de una copia del plásmido sea activa en transcripción, ya que:

1) Se ha demostrado, en pruebas en las que se sintetiza ADN a partir de ARN con reversotranscriptasa, que el 40% de los genes de levadura son transcripcionalmente activos (44).

2) Lohr y hereford (1979), demostraron que el genoma de la levadura es degradado uniformemente por ADNasaI, lo cual sugiere, bajo el criterio de Weitraub -los genes activos - en transcripción son más sensibles a digestión por ADNasaI-(56), que todos los genes, incluyendo los del plásmido 2 micras, de la levadura son, potencialmente, transcripcionalmete activos. Añadiendo a lo anterior, que el plásmido 2 micras tiene la ventaja de ser un componente natural de la levadura, lo cual facilita su obtención y manipulación, además de disminuir los costos con respecto a los modelos virales.

c) La clonación de genes eucarióticos utilizando como vector al minicírculo 2 micras, de hecho, un derivado quimérico del plásmido ya se ha utilizado como vector, es decir, es una herramienta de Ingeniería Genética eucariótica, que nos permite usar algunos procedimientos seguidos en procariotes. Los cuales ayudarán a conocer los mecanismos de clonación, expresión y regulación de genes eucarióticos que no se presentan en procariotes.

Hemos mencionado previamente que el ADN minicírculo 2 micras, representa una alternativa de investigación para estudiar la replicación y la recombinación especializada de genes eucarióticos.

Por último, debemos aclarar que el plásmido 2 micras no es el único ni el mejor modelo para estudios de Ingeniería Genética eucariótica; sino solamente un sistema cuya importancia empieza a ser considerada.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Bentley, A., R. Atchinson, A. Deyenish, and P. Nagely (1980). TRANSFORMATION OF SACCHAROMYCES cerevisiae WITH YEAST MITOCHONDRIAL DNA LINKED TO TWO MICRON CIRCULAR YEAST PLASMID. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28: 580-586.
- 2.- Berg, D.E., J. Davies, and J. Rochaich (1975). TRANSPOSITION OF R FACTOR GENES TO BACTERIOPHAGE . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3628-3632.
- 3.- Bloom, K.S., and J. Carbon (1982). YEAST CENTROMERE DNA IS IN A UNIQUE AND HIGHLY ORDERED STRUCTURE IN CHROMOSOMES AND SMALL CIRCULAR MINICHROMOSOMES. Cell. 29: 305-317.
- 4.- Bolivar, Z.F. (1982). INGENIERIA GENETICA MOLECULAR. Ciencia 31: 155-163.
- 5.- Britten, R.J. and E.H. Davidson (1971). REPETITIVE AND NON-REPETITIVE DNA SEQUENCES AND SPECULATION ON THE ORIGINS OF EVOLUTIONARY NOVELTY. Quart. Rev. Biol. 46: 111-138.
- 6.- Broach, J.R., J.F. Atkins, C. McGill and L. Chow (1979). IDENTIFICATION MAPPING OF THE TRANSCRIPTIONAL AND TRANSLATIONAL PRODUCTS OF THE YEAS PLASMID 2 U CIRCLE. Cell. 16: 827-839.
- 7.- Broach, J.R., and R. Hicks (1980). REPLICATION AND RECOMBINATION FUNCTIONS ASSOCIATED WITH THE YEAST PLASMID, 2 U CIRCLE. Cell. 21: 501-508.
- 8.- Broach, J.R. (1982). THE YEAST PLASMID 2 U CIRCLE. Cell. 28: 203-204.
- 9.- Cameron, J.R., P. Phillipsen, R.W. Davies (1977). Nucleic Acid Research 4: 1429-1448.
- 10.- Carl Falco, S., Y. Li, J.R. Broach and D. Botstein (1982). GENETICS PROPERTIES OF CHROMOSOMALLY INTEGRATED 2 U PLASMID DNA IN YEAST. Cell. 29: 573-584.
- 11.- Chambon, P. (1981). Genes Fragmentados. Sci. Am. 64: 22-35.
- 12.- Clark-Walker, G.D. (1972). ISOLATION OF CIRCULAR DNA FROM A MITOCHONDRIAL FRACTION YEAST. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 388-392.
- 13.- Clark-Walker, G.D. and G.L.D. Miklos (1974). LOCALIZATION AND QUANTIFICATION OF CIRCULAR DNA IN YEAST. Eur. J. Biochem. 41: 359-365.
- 14.- Clowes, R.C. (1972). Bacterial Rev. 36: 361-405.
- 15.- Davidson, E.H. and R.J. Britten (1973). ORGANIZATION, TRANSCRIPTION AND REGULATION IN THE ANIMAL GENOMA. Quart. Rev. Biol. 48: 565-613.

- 16.- Davies, R.W., M. Simon and N. Davidson (1971). ELECTRON MICROSCOPE HETERO  
 DUPLEX METHODS FOR MAPPING REGIONS OF BASE SEQUENCE HOMOLOGY IN NUCLEIC  
 ACIDS. *Methods in Enzimol.* 21D: 413-428.
- 17.- Dohzhansky, T., F. Ayala, G.C. Stebbins y J.W. Valentine (1980). EVOLUCION.  
 Omega. Barcelona 558.
- 18.- Forte, M.A. and W.L. Fangman (1976). NATURALLY OCCURRING CROSS-LINKS IN  
 YEAST CHROMOSOMAL DNA. *Cell.* 8: 425-431.
- 19.- Frankel, E. (1980). DNA EL PROCESO DE LA VIDA. Siglo XXI . Méx. pp. 126.
- 20.- Gariglio, P., R. Llopis, P. Oudet, and P. Chambon (1979). THE TEMPLATED OF  
 ISOLATED NATIVE SIMIAN VIRUS 40. TRANSCRIPTIONAL COMPLEXES IS A MINICHRO  
 MOSOMES. *J. Mol. Biol.* 131: 75-135.
- 21.- Giudice, L, K. Wolf, P. Sasson-Corsi and A. Mazza (1979). 2 Um COVALENTLY  
 CLOSED NON-MITOCHONDRIAL CIRCULAR DNA IN THE PETIT NEGATIVE YEAST Schi  
zosaccharomyces pombe. *Mole. Gen. Genet.* 172: 165-169.
- 22.- Goodenought, U. (1978). GENETICS. 2<sup>a</sup> Holt-Rinehart and Winston USA pp 840.
- 23.- Griffith, J.D. (1975) Chromatin Structure Deduced from a Minichromosomes.  
*Sci.* 187: 1202-1203.
- 24.- Guerineau, M., C. Grandchamp, C. Paoletti and P. Slonimski. (1971). CHARACTE-  
 RIZATION OF A NEW CLASS OF CIRCULAR DNA MOLECULES IN YEAST. *Biochem.*  
*Biophys. Res. Comm.* 42: 550-557.
- 25.- Guerineau, M., P. Slonimsky, and P. Avner. (1974). YEAST EPISOME COVALENTLY  
 CLOSED NON-MITOCHONDRIAL CIRCULAR DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 61: 412  
 418.
- 26.- Guerineau, M., C. Grandchamp and P. Slonimsky. (1976). CIRCULAR DNA OF A  
 YEAST EPISOME WITH TWO INVERTED REPEATS. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73:  
 3030-3034.
- 27.- Guerineau, M. (1978). in: VIRUSES AND PLASMID IN FUNGI. P.A. LEMKE ed. MAR  
 CEL DEKKER, New York USA.
- 28.- Hartley, J.L. and J.E. Donelson. (1980). NUCLEOTIDE SEQUENCE OF YEAST PLAS  
 MID. *Nature.* 286: 860-864.
- 29.- Hinegardner, R. (1976). EVOLUTION AND GENOMA SIZE; in: MOLECULAR EVOLUTION  
 F. J. Ayala ed. Sinauer Sunderland.
- 30.- Hollenberg, C.P., A. Degelman, B. Kustermann-Kuhn and H.D. Royer. (1976) CHA  
 RACTERIZATION OF 2 Um DNA OF Saccharomyces cerevisiae. *Proc. Nat. Acad. Sci*  
*USA.* 73: 2072-2076.

- 31.- Hollenberg, C.P., B. Kusterman, and H.D. Royer. (1976). SYNTHESIS OF HIGH - MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDES IN E.coli MINICELLS DIRECTED BY CLONED - Saccharomyces cerevisiae 2 Um DNA. Gene. 1: 33-47.
- 32.- Hollenberg, C.P., P. Borst and E.F.J. Van Brungen. (1970). Biochem. Biophys. Acta. 209: 1-15.
- 33.- Holm, C. (1982). CLONAL LETHALITY CAUSED BY THE YEAST PLASMID 2 U DNA. -- Cell. 29: 585-594.
- 34.- Jacob, F. and E. Wollman. (1958). C.R. Acad. Sci. 247: 154-156.
- 35.- Junqueira, D., L. Carneiro y López-Saiz. (1976). BIOLOGIA CELULAR. ed. La - Prensas Médicas Mexicanas. pp. 290.
- 36.- Kleinsmidt, A.K. (1968). MONOLAYER TECHNIQUES IN ELECTRON MICROSCOPY OF NUCLEIC ACID MOLECULES. Methods in Enzymology. 12B: 361.
- 37.- Kornberg, R.D. and A. Klug. (1981) The Nucleosome. Sci. Am. Feb. 48-60.
- 38.- Leuchtenberger, C., R. Leuchtenberger, and Davies, A.M. (1954). Am. J. Pathol. 308: 65-85.
- 39.- Leth Bak, A., C. Christiansen and G. Christiansen. (1972). Biochem. Biophys. Acta. 264: 527-529.
- 40.- Livingston, D.M. (1977). INHERITANCE OF THE 2 Um DNA PLASMID FROM Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 86: 73-84.
- 41.- Livingston, D.M. and D.M. Kupfer. (1977) CONTROL OF Saccharomyces cerevisiae 2 Um DNA. REPLICATION BY CELL DIVISION CYCLE GENES THAT CONTROL NUCLEAR DNA REPLICATION. J. Mol. Biol. 116: 249-260.
- 42.- Livingston, D.M. and S. Hahne. (1979). ISOLATION OF A CONDENSED, INTRACELLULAR FORM OF 2 Um DNA PLASMID OF Saccharomyces cerevisiae. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 3727-3731.
- 43.- Llopis, R., F. Perrin, F. Bellard and P. Gariglio. (1981). QUANTITATION OF TRANSCRIBING NATIVE SIMIAN VIRUS 40 MINICHROMOSOMES EXTRACTED FROM CV1 CELLS LATE IN INFECTION. J. Virology 38: 82-90.
- 44.- Lhor, D. and L. Hereford. (1979). YEAST CHROMATIN IS UNIFORMLY DIGESTED BY DNase I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 4285-4288.
- 45.- Margulis, L. (1974). FIVE KINGDOM CLASSIFICATION AND THE ORIGIN AND EVOLUTION. in: Dobzhansky, T. et. al. EVOLUTIONARY BIOLOGY. Plenum Press.
- 46.- Mortimer, R.K. and D.C. Hawthorne. (1973). Genetics 74: 53-54.
- 47.- Nelson, R.G. and W.L. Fangman. (1979). NUCLEOSOME ORGANIZATION OF THE YEAST 2 Um DNA PLASMID. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 6515-6519.

- 48.- Petes, T.D., B. Byers and W.L. Fangman, (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79: 3072-3076.
- 49.- Petes, T.D. and D.H. Williamson, (1975). REPLICATING CIRCULAR DNA MOLECULES IN YEAST. Cell. 4: 249-253.
- 50.- Reeves, R. (1978). Biochemistry 17: 4908-4916.
- 51.- Schopf, W.J. (1978) EVOLUCION DE LAS CELULAS PRIMITIVAS. Investigacion y Ciencia. Nov. 58-76.
- 52.- Shelton, E.R., P.M. Wassarman and M.L. DePamphilis, (1978). J. Mol. Biol. 125: 491-514.
- 53.- Scheer, U. and H. Zentgraf, (1978) Cromosoma. 69: 259-266.
- 54.- Stahl, U.L., P.A. Lemke, P. Tudzinski, P. Kuck and K. Esser (1978). EVIDENCE FOR PLASMID LIKE DNA IN FILAMENTOUS FUNGUS, ASCOMYCETE Podospora anserina Mole. Gen. Gemet. 163 : 341.
- 55.- Tooze, J. (1973). THE MOLECULAR BIOLOGY OF TUMOUR VIRUSES. P 350 .CSH N. York
- 56.- Weintraub, H. and C. Groudine. (1976). Science 193: 848-856.
- 57.- Westmoreland, B.C. et. al. (1969) Science 163: 1343.
- 58.- Zakian, V.A., B.J. Brewer and W.L. Fangman, (1979). REPLICATION OF EACH COPY OF THE YEAST 2  $\mu$ m DNA PLASMID OCCURS DURING THE S PHASE. Cell. 17: 923-934.
- 59.- Zeman, L. and C.V. Lusena, (1974). CLOSED CIRCULAR DNA ASSOCIATED WITH YEAST. Febs. Letters. 38: 171-174..
- 60.- Zinker, S. Comunicaci3n personal.