

113  
2º yº



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS DE LA  
CONIDIACION DURANTE LA PRIVACION DE  
NUTRIENTES EN *Aspergillus nidulans*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A  
MONICA MAGIDIN VISO



MEXICO, D.F.

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JESUS AGUIRRE LINARES

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Expresión de genes específicos de la conidiación durante  
la privación de nutrientes en Aspergillus nidulans  
realizado por Mónica Magidín Viso  
con número de cuenta 9250134-8 , pasante de la carrera de Biología  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jesús Aguirre Linares

Propietario Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Propietario Dra. Alejandra Maihero del Paso

Suplente Dra. Luisa Alba Lois

Suplente Dr. Alfonso Torre Blanco

*Jesús Aguirre Linares*  
*Wilhelm Hansberg Torres*  
*Alejandra Maihero del Paso*  
*Luisa Alba Lois*  
*Alfonso Torre Blanco*

Consejo Departamental de Biología  
*[Firma]*

**A mi Zeide y mi tía Becky,  
su presencia continúa siendo fuente  
de inspiración y entusiasmo.**

**A mis padres, quienes me han  
enseñado con el ejemplo la  
dedicación y el entusiasmo, y sobre  
todo han sabido ser guías y  
compañeros al mismo tiempo.**

**A Eyal, por darme todo su cariño y apoyo.**

Agradezco al Dr. Jesús Aguirre por guiarme en estos, mis primeros pasos en la investigación, y hacer de ellos una experiencia única, por la confianza y todas las enseñanzas que depositó en mí y por brindarnos dirección y amistad a los miembros del laboratorio.

Agradezco a los miembros del jurado: Dr. Jesús Aguirre, Dr. Wilhelm Hansberg, Dra. Alejandra Mainero, Dra. Luisa Alba y Dr. Alfonso Torre por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo así como por su cuidadoso análisis y comentarios.

Agradezco a Laurita Kawasaki, Rosa Navarro, Olivia Sánchez, Denli Schuabel, Isaac Skronne y Rosalinda Tapia por hacer del laboratorio un lugar tan agradable, por su amistad, por estar siempre dispuestos a escuchar y responder "una última pregunta boba" y porque gracias a convivir con ellos aprendí muchísimo, no sólo de la Biología.

Agradezco a mi familia por el apoyo y por estar siempre dispuestos a escuchar sobre *Aspergillus* y sus curiosidades (aún las veces que no entendían de que hablaba). A mi papá, Mario Magidin, por toda su asesoría computacional y hacer el programa "pepdata". A mi mamá, Elisa Viso, por permitirme cohabitar con ella en el cubículo 003. A mi hermano, Arturo, quien me aguantó en casa (a veces), por los desfogues y por su cariño.

Agradezco a Mariana Peimbert y Tatiana Fiordellisio por su amistad y porque sin ellas, no imagino lo que hubiera sido estudiar la licenciatura.

Agradezco a Eyal de Lara, quien terminó conociendo las peculiaridades de este trabajo, por apapacharme cuando las cosas no salían y celebrar conmigo cuando sí.

Agradezco a Mónica Hochstein, Ada Smoler, Aliza Szejnberg y Marcos Weber por la disposición para aprender junto conmigo, queriéndolo o no, sobre Biología y los "bichitos", por todo el relajo, la compañía y sobre todo, por su valiosa amistad.

Este trabajo se realizó, en parte, gracias a una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>LA CONIDIACIÓN EN <i>Aspergillus nidulans</i> COMO MODELO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR</b>	<b>1</b>
LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	1
EL CICLO DE VIDA DE <i>Aspergillus nidulans</i>	1
<b>LA GENÉTICA DE LA CONIDIACIÓN EN <i>Aspergillus nidulans</i></b>	<b>5</b>
REGULACIÓN GENÉTICA DE LA CONIDIACIÓN	5
INDUCCIÓN DEL GEN <i>brlA</i>	7
<b>LAS CLONAS CAN DE cDNA</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>COMPARACIONES DE SECUENCIAS PARCIALES</b>	<b>17</b>
<i>Aspergillus nidulans</i> , MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	19
EXTRACCIÓN DE RNA DE <i>Aspergillus nidulans</i>	21
ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA	22
PREPARACIÓN DE LA SONDA	23
HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN BLOT	24
<b>AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS</b>	<b>25</b>
TRANSFORMACIÓN	25
EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS POR LISIS ALCALINA	27
<b>SECUENCIACIÓN PARCIAL DE CAN3</b>	<b>27</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>PATRONES DE EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LAS CLONAS</b>	<b>32</b>
TRANSCRITOS QUE NO SE ACUMULAN EN LAS CONDICIONES ESTUDIADAS	32
TRANSCRITOS REGULADOS POR PRIVACIÓN DE NITRÓGENO O CARBONO	33
TRANSCRITOS REGULADOS POR LA PRIVACIÓN DE NITRÓGENO Y CARBONO	38
TRANSCRITOS REGULADOS POR LA PRIVACIÓN DE CARBONO	39
TRANSCRITOS NO REGULADOS POR LA PRIVACIÓN DE CARBONO O NITRÓGENO	42
<b>METABOLISMO DEL ACETATO DURANTE LA ESPORULACIÓN</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>APÉNDICE I</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>

## INTRODUCCIÓN

### La conidiación en *Aspergillus nidulans* como modelo de diferenciación celular

#### La diferenciación celular

El entender cómo varias células, todas con la misma información genética, pueden generar conjuntos de células con formas y funciones muy diferentes, forma parte de las preguntas fundamentales de la biología actual. Este problema puede ser abarcado desde diferentes puntos de vista, por ejemplo, entendiendo cómo una célula consigue expresar diferencialmente ciertos genes, o bien, analizando el resultado de dicho proceso. Con el auge de la biología molecular y la publicación de lo que ahora se considera el paradigma de la regulación transcripcional (Jacob y Monod, 1961), una parte de los esfuerzos por entender la diferenciación celular se ha centrado en identificar genes específicos de ciertas etapas de diferenciación y entender los mecanismos de su regulación.

Dado que la diferenciación celular es un proceso que se presenta en todos los organismos, es posible estudiarlo en una amplia variedad de sistemas que van desde los procariotes más simples hasta organismos multicelulares como plantas, insectos y vertebrados. La expresión genética diferencial se encuentra regulada por muchos factores genéticos y medioambientales, siendo necesario en numerosos casos, una combinación entre varios de éstos para que el proceso se dispare. Así mismo, se ha observado que diferentes estímulos pueden llevar a una misma ruta de expresión genética.

Para los microorganismos, se ha propuesto que la diferenciación celular resulta de un estado de tensión. En esta proposición, la tensión tendría un efecto negativo sobre el crecimiento, generando un estado hiperoxidante inestable, el cual llevaría al inicio de los procesos de diferenciación celular, consiguiéndose así otro estado estable (Hansberg y Aguirre, 1990).

#### El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

El hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* fue reconocido por el Dr. Guido Pontecorvo y colaboradores en 1953, como un organismo que presenta importantes ventajas genéticas y fisiológicas para su estudio. El Dr. Pontecorvo encontró al hongo cuando buscaban un microorganismo adecuado para realizar estudios genéticos y fisiológicos. *A. nidulans* es un modelo

muy útil porque tiene las ventajas de que puede ser sujeto a propagación clonal, presenta alternancia de generaciones asociada con el ciclo sexual (Martinelli, S.D., 1994), así como un ciclo parasexual, el cual permite realizar estudios genéticos con relativa facilidad. En particular, resulta útil para estudiar el proceso de la diferenciación celular, ya que la esporulación asexual (conidiación) puede ser inducida a voluntad, ocurre en tiempos relativamente cortos y durante la misma, se producen distintos tipos celulares. Presenta otras ventajas, como la capacidad de crecer en medios de cultivo definidos formando colonias compactas. También posee ventajas genéticas y fisiológicas, ejemplos de las cuales son su homotalismo y los conidios uninucleados que pueden ser mutagenizados y transformados utilizando técnicas de biología molecular y genética clásica. Esto ha permitido que se cuente con un gran número de cepas mutantes afectadas en diversas funciones metabólicas y/o en su morfología (Aguirre, 1992).

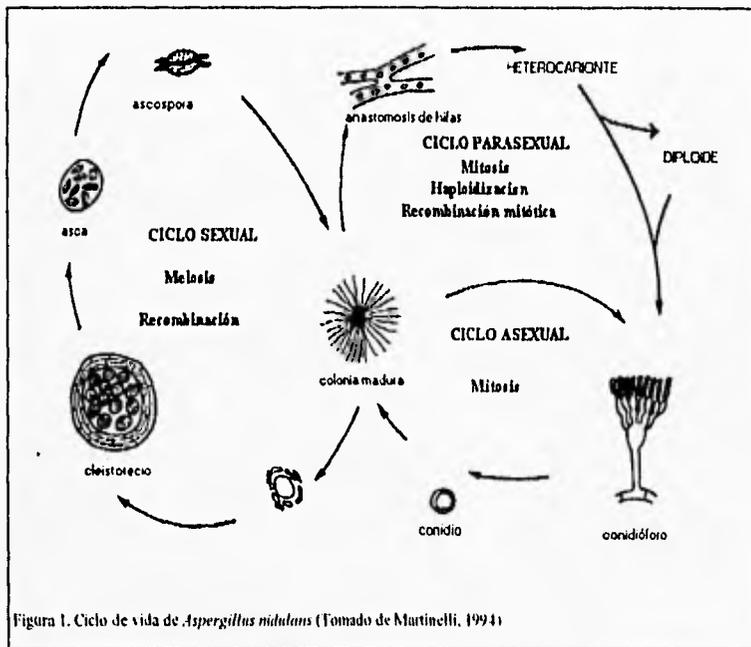


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* (Tomado de Martinelli, 1994)

El ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* (figura 1) presenta alternancia de generaciones y dos ciclos: el sexual y el asexual. La parte haploide del ciclo asexual es la que normalmente se utiliza en el laboratorio para propagar al organismo. El micelio vegetativo crece por extensión apical y ramificación de las hifas, utilizando los nutrimentos adquiridos del medio ambiente. Los núcleos de las hifas pueden ser genéticamente iguales (homocariosis) o bien pueden coexistir núcleos diferentes (heterocariosis). Así mismo, los núcleos pueden fusionarse, adquiriendo así la condición de diploidismo. Los individuos diploides responden a tratamientos que impiden la polimerización de los microtúbulos con lo cual se haploidizan, esto es, pierden gradualmente cromosomas hasta llegar a la condición haploide. Esta fase del ciclo de vida ha resultado particularmente útil ya que permite la asignación de una mutación a un cromosoma determinado. El ciclo sexual requiere de la fusión de hifas e involucra cariogamia y meiosis, procesos que se llevan a cabo en hifas especializadas ascogénicas, localizadas en unas estructuras multicelulares especializadas llamadas cleistotecios. Dentro de los cleistotecios se forman las ascas, cada una de las cuales contiene ocho ascosporas, o esporas sexuales, formadas como resultado de una división meiótica seguida de una mitótica. Rodeando los cleistotecios o cuerpos fructíferos, se encuentran las células Hülle o células cáscara (Timberlake y Marshall, 1988; Yager, 1992).



Figura 2. Fases del desarrollo del conidióforo de *Aspergillus nidulans* (tomado de Timberlake, 1993). La figura se compone de micrográficos tomadas por medio de microscopía electrónica de barrido. Las abreviaturas usadas son: s, tallo del conidióforo; v, vesícula del conidióforo; m, mitulos; p, filídes; e, conidios. En el texto se encuentran las descripciones detalladas de los eventos que se presentan en cada etapa.

Durante la reproducción asexual se forman esporas uninucleadas (los conidios) por medio de una serie de divisiones mitóticas en una estructura especializada (el conidióforo). La reproducción asexual puede ser inducida por factores externos como son la exposición al aire y la privación de nitrógeno o de glucosa (Skromne *et al.*, 1995). El proceso de la conidiación puede ser dividido en 5 etapas, mismas que se muestran en la figura 2. En la etapa A, la hifa, que después será el tallo del conidióforo, emerge de la célula pie y crece hacia la fase aérea hasta llegar a un momento en el cual el crecimiento apical se detiene y en la punta de dicha hifa comienza a formarse una vesícula (etapa B). Durante la etapa C se generan una serie de gemas, llamadas métulas, a cada una de las cuales penetra un núcleo. Finalmente éstas son separadas físicamente de la vesícula por medio de la formación de *septa*. En las métulas ocurre una división nuclear, a partir de la cual se forman las filídes (etapa D), células que originan las esporas por medio de repetidas divisiones mitóticas, de manera que el conidio más joven de cada cadena se encuentra en la posición proximal al conidióforo (etapa E; Timberlake y Clutterbuck, 1994).

## La genética de la conidiación en *Aspergillus nidulans*

### Regulación genética de la conidiación

Las células de *A. nidulans* que crecen como micelio vegetativo, llegan a un determinado momento en el cual, ante ciertos estímulos, pueden cambiar el tipo de desarrollo, e iniciar el proceso de la conidiación. Axelrod y colaboradores (Axelrod, 1972, Axelrod *et al.*, 1973) han demostrado que para esto es necesario que el micelio haya alcanzado un estado de "capacitación", una vez que ha crecido en forma vegetativa por alrededor de 18 horas. La naturaleza de este fenómeno es desconocida; sin embargo, se ha demostrado que existe una reducción en los niveles de nitrato reductasa y proteasa extracelular, dos enzimas que no presentan una conexión obvia con el proceso de la conidiación (Gealt y Axelrod, 1974). Una colonia que no ha alcanzado el estado de capacitación no responde inmediatamente a la inducción de la diferenciación celular. Tradicionalmente la conidiación se desencadena por medio de la exposición del micelio al aire, aunque recientemente se ha demostrado que la privación de nutrimentos en un medio líquido también induce la conidiación (Martinelli, 1976; Skromne *et al.*, 1995).

Es posible diseccionar el proceso de la diferenciación celular en *A. nidulans* por medio del análisis de diferentes mutantes afectadas específicamente en la esporulación (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Timberlake y Marshall, 1988). A. J. Clutterbuck (1969, 1977) ha analizado mutantes que presentan fenotipos alterados en la conidiación con el propósito de identificar los genes esenciales para la formación del conidióforo. El autor identificó de esta manera dos genes cuya ausencia origina fenotipos aconidiales: *hrlA* y *abaA* ("bristle" o cerdas y "ábaco"). Las cepas que presentan mutaciones en el gen *hrlA* son capaces de llevar a cabo la etapa A de la conidiación, esto es, producen hifas que tienen crecimiento aéreo; sin embargo este crecimiento es indefinido y no se alcanza la etapa B (formación de la vesícula). Las cepas con mutaciones en *abaA* producen conidióforos en los que las filídes y los conidios son reemplazadas por estructuras que dan la apariencia de un ábaco, siendo la etapa E (producción de los conidios por la filídes) la que falla. Otras mutaciones que tienen efectos en la conidiación incluyen "wet-white conidia" (conidios blancos-húmedos), fenotipo que se debe a la mutación de *wetA*, indispensable para el desarrollo normal de los conidios; en su ausencia, los conidios se hidratan y se lisan (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1977).

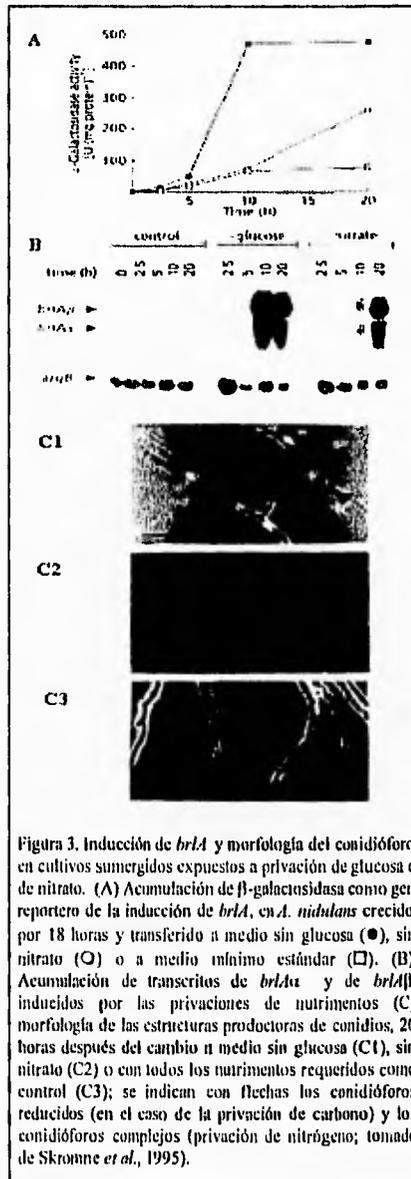
Así mismo se han aislado genes estructurales específicos de la conidiación, como los genes "ivory" (*ivoA* e *ivoB*), cuyas mutaciones originan cambios en los pigmentos del conidióforo; los genes "yellow" (amarillo, *yA*) y "white" (blanco, *wA*) que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de los pigmentos que otorgan el color amarillo y verde a los conidios; el gen *rodA* ("rodletless") cuya mutación origina la ausencia de una hidrofobina de la pared conidial que otorga la característica hidrofóbica de las mismas, al igual que la mutación en el gen *dewA* ("detergent wettable", se humedece al contacto con un detergente) que codifica para otra hidrofobina de la pared conidial (Stringer y Timberlake, 1995). Estos y otros genes se encuentran bajo el control de *brlA*, *abaA* y *wetA* de manera directa o indirecta (Boylan *et al.*, 1987; Mirabito *et al.*, 1989; Aguirre *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1991; Timberlake, 1991; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Miller, 1992).

La sobreexpresión de *brlA* lleva a la activación transcripcional de algunos genes específicos de la conidiación, a una disminución en el crecimiento apical de las hifas y al desarrollo de los conidios a partir de las puntas o ramificaciones de las mismas, sin que se produzca un conidióforo normal. Esto puede deberse a la falta de participación de otras rutas bioquímicas que no están siendo estimuladas (Adams *et al.*, 1988). También existen evidencias de que los efectos del gen *brlA* sobre otros genes pueden ser dosis-dependiente (Skromne *et al.*, 1995). El gen *brlA* es considerado el regulador central de la reproducción asexual. El producto de este gen tiene homología con los factores transcripcionales del tipo "dedos de Zinc" y su presencia es necesaria de manera continua desde la formación de las vesículas hasta la producción de los conidios, aunque no se detecta su mRNA en los conidios aislados (Aguirre, 1993).

## Inducción del gen *brlA*

Cuáles son los elementos genéticos y ambientales que actúan sobre el gen *brlA*, es tema de investigación actual. Estudios realizados por J. Aguirre (comunicación personal) en el promotor de *brlA* sugieren que existen una amplia serie de factores transcripcionales que actúan sobre *brlA*, ya sea de manera positiva o negativa. Parece improbable que este gen responda a un solo factor transcripcional, ya que escisiones consecutivas en el promotor originan una disminución gradual en la expresión, sin que sea posible localizar una secuencia específica cuya eliminación lleve a la falta total de la expresión. Otra evidencia a favor de esta interpretación es que en todas los estudios mutagénicos que se han realizado, el fenotipo acondial característico de la mutante en *brlA* no se ha asociado con mutaciones en otros genes.

Se ha demostrado que la privación de nutrimentos lleva a la conidiación, incluso en ausencia de la exposición aérea del micelio. Utilizando un protocolo que consiste en cambiar al micelio de un medio líquido con todos los nutrimentos requeridos, a otro en el cual hace falta algún nutrimento (carbono y/o nitrógeno), se demostró que dichas privaciones llevan a la inducción del gen *brlA* y a la formación de los conidios (Skromne *et al.*, 1995).



Las respuestas a la privación de nutrimentos son interesantes puesto que, a pesar de que los dos estímulos mencionados llevan a la expresión de *brlA* y a la conidiación, todo parece indicar que no lo hacen por la misma vía. En respuesta a la privación de carbono, la inducción del gen *brlA* es rápida alcanzándose niveles elevados del transcrito, mientras que la privación de nitrógeno induce al gen de manera más lenta y a niveles menores (figura 3B). También se observan diferencias en la producción de los conidios; en el primer caso, los conidios se forman en las puntas de las hifas (conidióforos reducidos) sin pasar por la formación de los conidióforos elaborados. En respuesta a la privación de nitrógeno, se forman conidióforos complejos donde todos los tipos celulares característicos se encuentran representados (figura 3C; Skromme *et al.*, 1995).

La represión catabólica por carbono en *A. nidulans* está a cargo del gen *creA* que, en presencia de glucosa, reprime la expresión de las enzimas del metabolismo del carbono (Arst y Bailey, 1977). Se ha observado que, al utilizar fuentes de carbono no represoras en lugar de glucosa, la esporulación no se induce. Esto sugiere que el producto del gen *creA* no forma parte de la ruta de respuesta a la privación de glucosa y no parece tener un efecto sobre *brlA* de manera directa o indirecta en respuesta a la privación de glucosa. Paradójicamente, una cepa que no contiene una copia silvestre del gen *creA*, no esporula en respuesta a la privación de nitrógeno (Sánchez y Aguirre, comunicación personal).

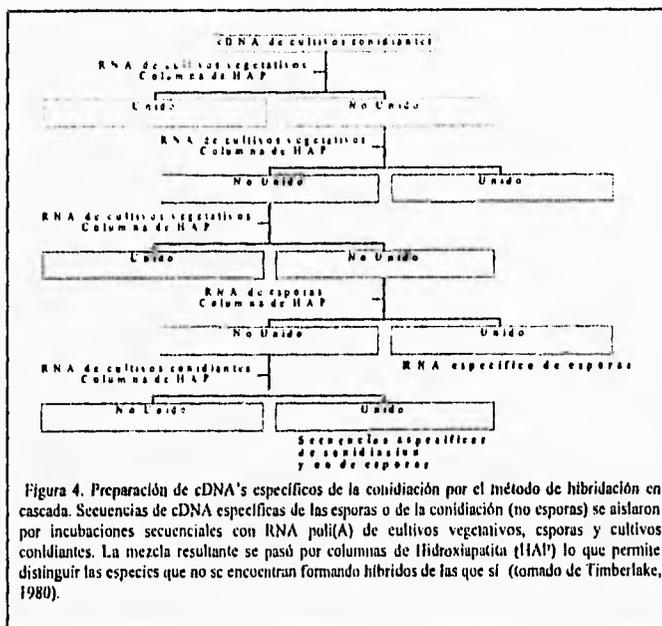
La represión catabólica por nitrógeno está mediada por el gen *areA* que codifica para un factor transcripcional que, en ausencia de amonio, activa los genes involucrados en el catabolismo de fuentes alternativas de nitrógeno (Caddick, 1994). Una cepa que carece de una proteína *AreA* funcional es incapaz de conidiar en respuesta a la privación de nitrógeno, lo que sugiere que *brlA* está sujeto directa o indirectamente, a regulación por parte de *AreA* (Sánchez y Aguirre, comunicación personal).

A la luz de estos estudios, se comenzó a considerar la posibilidad de que diferentes mutaciones, que afectan la conidiación, formaran parte de las rutas de respuesta a la privación de nutrimentos. Existe un grupo de mutaciones en diferentes loci que otorgan el fenotipo "fluffy" o algodonoso, consistente en un cambio en el crecimiento y la ramificación de las hifas, dando una apariencia algodonosa a las colonias y un notable retraso en la esporulación. Resulta particularmente interesante que muchas de estas mutantes adquieren un fenotipo casi silvestre cuando crecen en un medio sólido con privaciones nutricionales (Aguirre y Tapia, 1991; Adams *et al.*, 1992; Lee y Adams 1994A y Lee y Adams, 1994B). En trabajos realizados por R. Tapia, O.

Sánchez y J. Aguirre (en proceso) se ha observado que las mutantes en los genes *fluF*, *fluG* y *fluH* producen conidios en respuesta a la privación de carbono, pero no así en respuesta a la privación de nitrógeno. El gen identificado como *flhA*, cuya sobreexpresión lleva a la conidiación (Wieser *et al.*, 1994), es necesario, tanto para la respuesta a la privación de nitrógeno, como para la de carbono (Lee y Adams, 1995).

### Las clonas CAN de cDNA

El número de genes involucrados en el proceso de la conidiación ha sido calculado por diferentes métodos. En el primero de ellos, utilizando genética clásica (Martinelli y Clutterbuck, 1971), se estimó que entre 45 y 100 genes se encuentran involucrados directamente en la conidiación. Esta aproximación se basa en el número de cepas obtenidas tras un proceso de mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG) que mostraron un fenotipo afectado en la conidiación, en comparación con la frecuencia de mutantes auxotróficas obtenida.



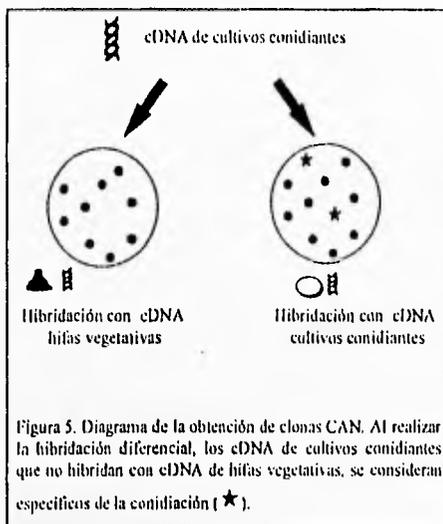
El segundo estudio involucró el método de hibridación diferencial, o en cascada, de RNA (figura 4; Timberlake, 1980). Basándose en la cantidad de transcritos de mRNA que se encuentran presentes en un cultivo conidiante y ausentes en uno vegetativo, se estimó que aproximadamente el 20% de las especies de RNA poli(A) que se encuentran en cultivos conidiantes se transcriben específicamente durante la conidiación. El 80% restante corresponde a los genes cuyos productos se encuentran presentes también durante el crecimiento vegetativo. De acuerdo con estos datos, de los

700-1100 genes que se transcriben específicamente durante el proceso de esporulación asexual, el 11.4% representan mensajes que son específicos de los conidios.

Las discrepancias que existen entre ambas aproximaciones pueden deberse a varias razones: parece probable que en los estudios de genética clásica, el número de genes se haya subestimado, ya que no se consideraron las colonias que presentaban defectos tanto en la conidiación como en el crecimiento vegetativo, tampoco se consideraron las colonias cuyo fenotipo era poco claro o que presentaran alteraciones sutiles (Martinelli y Clutterbuck, 1971). Es posible además que algunos de los productos de los mensajes encontrados mediante el método de hibridación en cascada tengan funciones redundantes, siendo así virtualmente imposible encontrar un fenotipo para su pérdida o bien, que el fenotipo originado no fuese aparente en las condiciones estándares de crecimiento. Por último, algunos de los RNA mensajeros que se hacen evidentes en la hibridación en cascada pueden codificar para enzimas cuyo papel no sea específico para la conidiación, sino que se induzcan de manera paralela a este proceso, probablemente como resultado del metabolismo secundario. La combinación de todos estos factores pudo llevar a la sobreestimación del número de genes cuyo papel es importante en la conidiación (Boylan *et al.*, 1987).

Existen dos bibliotecas que contienen genes cuya expresión está asociada con la conidiación. La primera de ellas consiste en aproximadamente 50 cósmidos que contienen una o más unidades de transcripción específicas de la conidiación. Esta biblioteca se aisló utilizando el método de la figura 4, siendo posible diferenciar entre las clonas de cósmidos Spo (específicas de esporas) y Spn (específicas del proceso de producción de conidiación mas no presentes en esporas; Zimmerman *et al.*, 1980, Orr y Timberlake, 1982).

La segunda biblioteca (figura 5) es una colección de aproximadamente 40 clonas CAN (de Conidiación de *Aspergillus nidulans*) de cDNA que representan especies de mRNA que se acumulan de manera preferencial durante la conidiación. Para obtener esta biblioteca, se partió de dos bibliotecas de cDNA, una hecha con RNA poli(A) obtenido de cultivos conidiantes y la segunda de cultivos vegetativos. Los cDNA de cultivos vegetativos se aplicaron en filtros de nitrocelulosa donde se expusieron a hibridaciones contra el cDNA marcado con <sup>32</sup>P, proveniente de ambas bibliotecas. Las clonas que hibridaron con el cDNA de los cultivos conidiantes pero no con el cDNA de las hifas vegetativas se aislaron como clonas CAN (Boylan *et al.*, 1987).



La regulación transcripcional de muchas de estas clonas CAN, *Spo* y *Spn* durante el proceso de conidiación, inducido por exposición aérea, ha sido estudiado mediante hibridaciones de tipo Northern (Zimmerman *et al.*, 1980; Boylan *et al.*, 1987). Se ha encontrado que, por ejemplo, algunos de los genes codificados por las clonas CAN se expresan en tiempos muy cortos después de la exposición aérea y otros se expresan solamente en los conidios. La dependencia de algunos de estos genes con respecto a los reguladores *brlA*, *abaA* y *wetA* se estudió induciendo

la esporulación por exposición aérea en mutantes que no contienen una copia silvestre de uno de estos genes y analizando si, transcurrido el tiempo en el que una cepa silvestre completa el ciclo de conidiación (25 horas), se encontraban transcritos de algunas clonas CAN (Boylan *et al.*, 1987).

En otra serie de experimentos, por medio de fusiones con el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa, que es inducible con etanol o treonina, se expresaron de manera forzada los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* en hifas vegetativas de cepas con mutaciones en los genes *brlA*, *abaA* o *wetA* y en la cepa silvestre. Se hizo una clasificación de las clonas CAN de acuerdo con su dependencia de estos genes reguladores, analizando su expresión como resultado de la expresión forzada de éstos y durante la conidiación inducida por exposición del micelio al aire. De esta manera, las clonas CAN se dividieron en los siguientes 4 grupos (Mirabito *et al.*, 1989; Marshall y Timberlake 1991):

**Clase A:** Genes que se activan por la inducción forzada de *brlA* y/o *abaA* de manera independiente de *wetA*. Se expresan durante el proceso de producción de los conidios y, por lo general, su mRNA no se encuentra en los conidios (excepto CAN26). Pertenecen a este grupo los genes representados por las clonas CAN41, CAN26 así como el producto del gen *ylA*.

**Clase B:** Genes que se activan por inducción forzada de *abaA* y *wetA* de manera independiente de *brlA*. Se activan una vez que los conidios comienzan a formarse y sus transcritos

se acumulan en éstos. Los genes correspondientes a CAN4, CAN78 y CAN92 pertenecen a este grupo.

**Clase C:** La activación de los genes que pertenecen a este grupo requiere de la combinación de la actividad de *brlA*, *abaA* y *wetA* ya sea por expresión forzada de éstos o durante la conidiación inducida por exposición al aire. El mRNA se encuentra presente en los conidios. Genes representados por CAN102, CAN101, CAN13 y CAN2 pertenecen a este grupo.

**Clase D:** Al igual que los genes de la clase C, se inducen por la actividad combinada de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* durante la inducción artificial de la conidiación. Sin embargo, a diferencia de los genes de la clase C, también se expresan durante la conidiación inducida por exposición aérea en cepas carentes de un gen *brlA* silvestre, lo cual demuestra que pueden ser activados de manera independiente de *brlA*, *abaA* y *wetA*. De manera que la actividad de estos tres genes es suficiente pero no necesaria para la expresión de los genes pertenecientes a la clase D, la única clase que contiene genes independientes, cuando menos parcialmente, de *brlA*. En este grupo se clasificaron los genes correspondientes a las clonas CAN65, CAN63, CAN11, CAN72 y CAN77.

El que los patrones de transcripción de los genes correspondientes a las clonas CAN sean tan regulados, sugiere que tienen una función en la formación del conidióforo. Es posible, sin embargo, que varios de estos genes sean dispensables durante el proceso de conidiación y/o crecimiento, como se demostró para el caso de un grupo de 14 genes específicos de la esporulación asexual que se encuentran formando el *cluster* *spoC1*. Este *cluster* puede ser escindido del genoma sin que esto tenga ningún efecto aparente (Aramayo *et al.*, 1989).

Las clonas CAN se han caracterizado de acuerdo con el tamaño del transcrito del gen que representan por medio de hibridaciones tipo Northern. A la vez, se analizó la presencia del transcrito en hifas vegetativas, para comprobar que los genes son específicos de la conidiación, en cultivos conidiantes (25 horas después de la exposición aérea) y en conidios aislados (Mirabito, 1989).

Mary Stringer secuenció aproximadamente 150 nucleótidos de uno o ambos extremos de las clonas CAN y buscó homologías con secuencias en el GeneBank (sin publicar). De esta manera se observó que el gen representado por CAN8 codifica para la isocitrato liasa (*acuD*) de *Aspergillus nidulans* y que la clona CAN9 es idéntica a un RNA ribosomal de mitocondria. Así mismo, se establecieron identidades entre algunas clonas que contenían transcritos de un mismo gen (tabla 1).

Tabla 1. Clonas CAN equivalentes

CAN11	= CAN67
CAN26	= CAN21
CAN41	= CAN45, CAN48, CAN76
CAN44	= CAN38
CAN77	= CAN65, CAN95
CAN78	= CAN54, CAN92
CAN101	= CAN2, CAN7
CAN102	= CAN12, CAN13

Se han secuenciado y caracterizado de manera completa otros genes representados en las clonas CAN. El correspondiente a CAN5 codifica para una catalasa específica del conidio (Navarro *et al.*, 1996), cuya regulación e importancia son actualmente motivos de

estudio. CAN41 contiene el transcrito del gen *rodA*, una hidrofobina de la pared conidial (Stringer *et al.*, 1991) proteína parecida a *devA*, encontrada en un principio como la clona CAN4. La primera indicación de que los genes representados por las clonas CAN41 y CAN4 codificaban para hidrofobinas de la pared celular provino de las secuenciaciones parciales previamente mencionadas.

Otras comparaciones revelan datos interesantes sobre posibles identidades. La secuencia parcial de CAN11 es similar a un gen específico de la conidiación del hongo filamentoso *Neurospora crassa*, *con10*, cuya interrupción no originó ningún fenotipo apreciable y su regulación continúa siendo objeto de estudios (Springer y Yanofsky, 1992; Springer *et al.*, 1992; Lauter y Yanofsky, 1993; Madi *et al.*, 1994 y Corrochano *et al.*, 1995). Tanto CAN46 como CAN71, que entre su secuencia parcial comparten una homología del 71%, son similares a otro gen de *N. crassa*, aislado como *grg-1* ("glucose repressible gene" o gen reprimible por glucosa) y como *ccg-1* ("clock controled gene" o gen controlado por el reloj interno en un ritmo circadiano) por dos grupos independientes (McNally & Free, 1988 ; Loros *et al.*, 1989 ; Aronson *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1994 y Arpaia *et al.*, 1995). La transcripción de este gen se encuentra reprimida cuando existe glucosa como fuente de carbono y se activa cuando se priva a *N. crassa* de carbono; además los niveles del transcrito muestran una oscilación de tipo circadiana. Su función es desconocida y su interrupción no originó ningún fenotipo notable a pesar de la regulación a la que está sujeto por dos proteínas transcripcionales independientes, lo cual parecería sugerir una función importante. La secuencia parcial de CAN77 muestra una fuerte semejanza con un gen de *Saccharomyces cerevisiae* encontrado por dos grupos, *hsp12* ("heat-shock protein" o proteína de choque de calor de 12 kD) o *gpl1* ("proteína regulada por glucosa y lípidos"), cuyo producto polipeptídico se encuentra presente cuando *S. cerevisiae* crece en ausencia de glucosa y presencia de lípidos (Prackelt *et al.*, 1990; Stone *et al.*, 1990 ; Varela *et al.*, 1992; Varela *et al.*, 1995).

El estudio de las clonas CAN es atractivo ya que el entendimiento de su regulación y posible papel en el proceso de la conidiación puede llegar a constituir una poderosa herramienta para comprender mejor el proceso de la diferenciación celular en *Aspergillus nidulans*. Los factores ambientales que pueden tener un papel durante la conidiación inducida por exposición al aire son numerosos, por lo que es posible que en las clonas CAN se encuentren representados genes cuya inducción dependa de la privación de carbono y/o nitrógeno y que pudiesen regular al gen *brlA*.

## **OBJETIVO**

Como objetivo general del presente trabajo se planteó estudiar un conjunto de clonas CAN cuya expresión fuese independiente del gen regulador de la conidiación *brlA* y analizar su patrón de expresión durante la privación de carbono y/o nitrógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COMPARACIONES DE SECUENCIAS PARCIALES

Las secuencias parciales de las clonas CAN, obtenidas por M. Stringer y W. Timberlake (no publicado), consistían en aproximadamente 150 nucleótidos, los que por medio del algoritmo FASTA del Genetics Computer Group (GCG; versión 7, 1991) se compararon con las secuencias contenidas en la base de datos GeneBank. Este algoritmo, diseñado por Pearson y Lipman (Pearson & Lipman, 1985, 1988), consiste en identificar regiones de similitud entre la secuencia y cada una de las secuencias de la base de datos. El primer paso consiste en construir un "diccionario" con todas las posibles "palabras" contenidas en la secuencia por analizar. Las palabras consisten en regiones de la secuencia de un determinado número de nucleótidos (para las búsquedas realizadas en este trabajo, cada "palabra" consistía en 6 "tetras"), y se compila un segundo diccionario a partir de la cadena complementaria (cuando la búsqueda se realiza para un ácido nucleico). Para cada una de las secuencias que existen en la base de datos, hay un diccionario equivalente, por lo que el siguiente paso consiste en comparar las palabras de los tres tipos de diccionarios para establecer una matriz que contiene información sobre la cantidad de palabras similares encontradas para cada una de las secuencias, otorgando una mayor valoración para las comparaciones que tienen un mayor número de palabras en común. El siguiente paso consiste en volver a evaluar las regiones con mayor valor de cada comparación usando una matriz que permite cambios conservados (para el caso de comparaciones de aminoácidos) y analiza identidades para regiones de menor tamaño al considerado para cada palabra. El tercer paso consiste en reevaluar si es posible unir, en regiones contiguas, las regiones de cada comparación que tienen un mayor valor. Finalmente, se define cuáles son los mejores segmentos, esto es, los que presentan mayores semejanzas entre la secuencia para la que se está realizando la búsqueda y cada secuencia de la base de datos que obtuvo un valor alto. En el reporte otorgado por el programa, se listan las secuencias que obtuvieron un mayor valor al realizar las comparaciones.

A partir de las secuencias de nucleótidos, se obtuvieron las 6 posibles secuencias de los péptidos que resultarían de ellas mediante el comando "translate" del GCG. El producto de este comando es un archivo que contiene las secuencias de los péptidos derivados de los 6 marcos de lectura abiertos precedido por 6 líneas en las que se indican los aminoácidos correspondientes a cada uno de los supuestos péptidos, tal como el que se muestra a continuación:

CAN3RT

bases 1 to: 122 translated into: 1 to: 40  
bases 2 to: 122 translated into: 41 to: 80  
bases 3 to: 122 translated into: 81 to: 120  
reverse of bases 1 to: 122 translated into: 121 to: 160  
reverse of bases 1 to: 121 translated into: 161 to: 200  
reverse of bases 1 to: 120 translated into: 201 to: 240

CAN3RT.pdt Length: 240 June 13, 1996 13:29 Type: P Check: 516

```
1 TKVQLVCILD IHR*FSTA*H TRSA*ICLLV HPRRESR*DT RRWWFAF*I
51 YIDNLAOHSI LDOIIRYACSY TLEENQDKIH EGGSGLHFRY T*H*HSIAY
101 *ISIDLART PSKRIKIRYT CVSYLDLARG CTSKHIYADL VCYAVLNYLC
151 ISKMQTRSTF VYLILILFEG VRASISMLI* YAMLC*HYV YLKCKPDPSP
201 CILS*FSSRV YEQAYLC*SS MLCCAKLSMY I*ANQIHLR
```

Así se obtuvieron los archivos para cada una de las secuencias de cDNA, a partir de los cuales se crearon 6 archivos diferentes, cada uno de los cuales contenía otro marco de lectura abierto. Esto se hizo usando el programa "pepdata" realizado por el Dr. Mario Magidin, el cual lee la información sobre cuáles son los aminoácidos correspondientes para cada uno de los péptidos en las primeras líneas y luego los copia de la secuencia principal, generando 6 archivos con nombres idénticos al primero, pero con las extensiones 1, 2...6 indicando así cada uno de los marcos de lectura.

Para los archivos que contenían los presuntos péptidos se realizó una búsqueda de similitud en la base de datos SwissProt mediante el algoritmo FASTP, que funciona con el mismo principio descrito para el algoritmo FASTA.

Para aquellas comparaciones que parecieron significativas, se hizo un análisis por medio del algoritmo "bestfit" del GCG, el cual parte de las dos secuencias que se desea comparar y, usando el algoritmo de semejanza local diseñado por Smith y Waterman (1981), encuentra los segmentos de mayor similitud entre las dos secuencias, asigna un valor a la comparación que es mayor mientras mayor sea la región de similitud y disminuye si es necesario incluir espacios en las secuencias para obtener una mayor similitud. Mediante un método estadístico, al anotar la opción -RANDOMIZACIONES en la línea de comando, se producen varias secuencias como producto de "revolver" las letras de la segunda secuencia, manteniendo el mismo tamaño. Estas secuencias se comparan contra la primera y se hace el cálculo de la calidad promedio. Cuando la calidad de la primera comparación se encontraba dentro del rango de la media  $\pm$  la desviación estándar de la

calidad de las comparaciones con las secuencias generadas al azar, la similitud se consideró como no significativa y se desechó.

### *Aspergillus nidulans*, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Para la realización de este trabajo se empleó la cepa FGSC-26 (Fungal Genetics Stock Center, No. 26) cuyo genotipo es *bia1, veA1*; por lo que es auxótrofa para la biotina y puede esporular sin necesidad de luz. Se obtuvieron esporas de la cepa silvestre inoculando a confluencia en un medio mínimo sólido que contiene glucosa como fuente de carbono y nitrato como fuente de nitrógeno (descrito por Käfer, 1977) en el cual se dejó crecer por 5 días a 37 °C. Las esporas se rasparon utilizando un asa de metal y una solución de Tween 80 al 0.01%, se lavaron 5 veces con agua estéril y se calculó la concentración de esta suspensión utilizando un hemocitómetro.

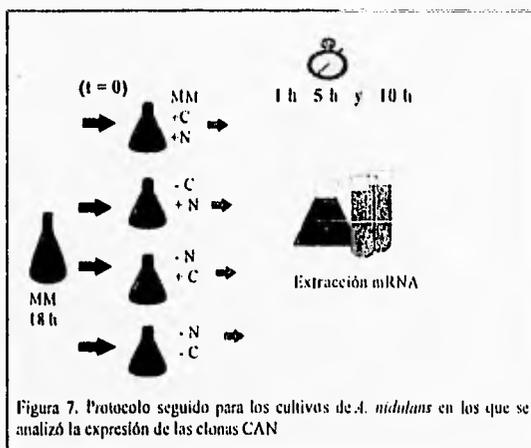


Figura 7. Protocolo seguido para los cultivos de *A. nidulans* en los que se analizó la expresión de las clonas CAN

La privación de nutrientes se realizó en medio líquido, inoculando una concentración de esporas de  $5 \times 10^5$  esporas/ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio mínimo líquido. Se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 18 horas, al término de las cuales el micelio se filtró por Miracloth y se lavó con 50 ml de agua

estéril y 50 ml de medio de cultivo con los mismos nutrientes que el medio al que fueron transferidos posteriormente (+C/+N, -C/+N, +C/-N o -C/-N). Los micelios se transfirieron a medio mínimo sin fuente de carbono, sin fuente de nitrógeno, sin fuente de carbono ni de nitrógeno, o a medio mínimo con todos los requerimientos; cada uno de estos por triplicado (figura 7). Posteriormente se incubaron a 37 °C y 300 rpm por 1, 5 o 10 horas, al término de las cuales se colectó el micelio filtrando los 50 ml del cultivo por Miracloth y lavando con 50 ml de agua estéril. Se eliminó el exceso de líquido y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -

70 °C hasta que se liofilizaron, empleando vacío en una liofilizadora Speed-Vac (Savant) durante 4½ horas. El micelio liofilizado se molió manualmente para luego extraer su RNA.

Para la parte del presente trabajo que involucró el estudio de las cepas afectadas en el metabolismo del acetato, las cepas utilizadas y sus genotipos se representan en la tabla 2

Cepa	Genotipo	Lesión enzimática
A409	<i>pabaA1; facB101, chaA1</i>	-auxotrofia para paba -mutación en el gen que codifica para el regulador de la transcripción ( <i>FacB</i> ) de enzimas asociadas con el metabolismo del acetato -color chatterusse
A649	<i>pabaA1, yA2; acuD254</i>	-color amarillo -Enzima isocitrato liasa ( <i>acuD</i> ) (Armitt <i>et al.</i> , 1970)
A650	<i>pabaA1, yA2; acuE201</i>	-Enzima malato sintasa ( <i>acuE</i> ) (Armitt <i>et al.</i> , 1971)
A651	<i>pabaA1, yA2; acuF205</i>	-Enzima PEP carboxicinasa ( <i>acuF</i> )
A652	<i>pabaA1, yA2; acuG223</i>	-Enzima fructosa 1,6-difosfatasa ( <i>acuG</i> ) (Armitt <i>et al.</i> , 1976)
A653	<i>pabaA1, yA2; acuI233</i>	* no se ha caracterizado el producto del gen <i>acuI</i>
A654	<i>acuJ211, pabaA1, yA2</i>	-Enzima carnitin-acyl transferasa ( <i>acuJ</i> ) (Midgley, 1993)
A655	<i>pabaA1, yA2; acuK248</i>	-Enzima málica ( <i>acuK</i> ) (McCullough & Roberts, 1974)
A656	<i>pabaA1, yA2; acuL217</i>	* no se ha caracterizado el producto del gen <i>acuL</i>
TJA22	<i>metG1; biA1; pbrIA<sup>lacZ</sup>;-lacZ</i>	-auxotrofia para metionina -auxotrofia para biotina -fusión del promotor del gen <i>brlA</i> con el gen reportero <i>lacZ</i> (Aguirre, 1993)

Tabla 2. Cepas utilizadas, genotipos y fenotipos asociados con éstos.

## EXTRACCIÓN DE mRNA DE *Aspergillus nidulans*

Para obtener una buena preparación de RNA es necesario minimizar la actividad de las RNasas liberadas durante la lisis celular, o introducidas a lo largo del proceso de extracción; por esto es que se utiliza material estéril y las soluciones se hacen con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1%, un potente inhibidor de la RNasa o se tratan directamente con el inhibidor. El método utilizado se basa en el uso del fenol ácido para separar el RNA del DNA (Timberlake, 1980).

### Soluciones:

Agua tratada con DEPC al 0.1%	Se agita vigorosamente y se deja toda la noche, al día siguiente se esteriliza en la autoclave.
PAS	Acido <i>p</i> -aminosalicílico de sodio (PAS) 1.2 gr/10 ml
TNS	Acido sulfónico tri-isopropilnaftaleno (TNS) 0.2g/10 ml
5X RNB	TRIS (120 mM)
	NaCl (150 mM)
	EGTA (30 mM)
Cloruro de litio 10M	
Acetato de sodio 3M	Se ajusta el pH a 5.0 con ácido acético glacial.
1X TELS	Tris, pH 6.7, 10 mM
	EDTA 0.1 mM
	SDS 0.2%

Todas las soluciones se tratan con DEPC 0.1% y se esterilizan. En caso de no ser posible, se preparan con agua tratada con DEPC. Las soluciones de PAS y de TNS deben de ser frescas, por lo que se preparan el mismo día, antes de comenzar con la extracción.

1. Se agregó el PAS al TNS y luego se adicionaron 5 ml de 5X RNB. A 15 ml de esta solución se le agregaron 7.5 ml de fenol saturado con agua y se mantuvo en hielo con agitación constante. A cada una de las muestras, previamente liofilizadas y molidas, se le agregaron 600 (900)  $\mu$ l de esta solución procurando que todo el micelio se mojara rápidamente, ya que en este paso se rompen las células y es necesario que la RNasa se inactive.
2. Se agregó un tercio del volumen inicial, de cloroformo a cada muestra y se calentó a 68 °C por 5 minutos. Las muestras se enfriaron en hielo.
3. Se centrifugaron a 4 °C, se recuperó la fase acuosa y se mantuvo en hielo.

4. Las proteínas se extrajeron con fenol-cloroformo, agregando un volumen de éste a cada muestra, agitando vigorosamente y centrifugando a 4 °C. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo para poder repetir el mismo paso 3 veces más.
5. Las muestras se incubaron toda la noche con cloruro de litio, a una concentración final 2M.
6. Al día siguiente, se centrifugaron y las pastillas se resuspendieron en 200 µl de agua tratada con DEPC. Se incubaron en hielo por 20 minutos después de la adición de 20 µl de cloruro de litio 10 M y 500 µl de etanol.
7. Se centrifugaron las muestras y las pastillas se lavaron 2 veces con etanol al 70%, preparado con agua con DEPC. Una vez que se encontraban semisecas, se resuspendieron en TELS.
8. El RNA se cuantificó por medio de un espectrofotómetro, midiendo la absorbencia entre 320 y 230 nm, tomando como consideración que 1.0 unidades de D.O. a 260 nm equivale a 40 mg/ml de RNA.

### ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DEL RNA A UNA MEMBRANA

La electroforesis del RNA se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes con formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989). La composición del gel es la siguiente:

Agarosa	1%	(1.0 gr.)
Formaldehído 37%	2.2 M	(17.8 ml.)
MOPS 10X	10%	(10.0 ml.)

En 100 ml de agua tratada con DEPC se disuelve la agarosa calentando en un horno de microondas. Una vez que se ha disuelto y alcanzado la temperatura para el vaciado, se agrega el formaldehído y el MOPS.

Las muestras de RNA se prepararon, también en condiciones desnaturalizantes, con la siguiente composición:

MOPS 10X	10%
Formamida	50%
Formaldehído	2.2 M
RNA	equivalente a 15 µg
Bromuro de etidio <sup>1</sup>	2 µl
STOP MIX 10X <sup>2</sup>	10% (para que quede a una concentración final de 1X)

<sup>1</sup> Se utiliza Bromuro de etidio preparado a una concentración de 1 mg/ml en agua tratada con DEPC.

<sup>2</sup> El STOP MIX se prepara 10X y consiste en una mezcla de 2.5 ml de glicerol (50%), 0.0125 g de azul de bromofenol (0.25%) y 10 µl de EDTA 0.5M, pH 8 (1mM) en 5 ml de agua tratada con DEPC. Esta solución se esteriliza por calor (autoclave).

Después de calentar las muestras a 68 °C por 15 minutos y enfriar en hielo rápidamente para evitar la formación de estructura secundaria, se cargaron en un gel de 11 x 14 cm, donde migraron por 5 horas a 60 V.

Una vez terminada la electroforesis el gel se agitó por 30 minutos en 20X SSC, con la finalidad de hidratarlo. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con soporte de nylon Hybond-N (Amersham, Inglaterra) siguiendo el protocolo de transferencia de Sambrook *et al.* 1989. Al día siguiente se dejó secar la membrana al aire, se irradió por 5 minutos con luz ultravioleta en un transiluminador, cubierta con plástico Ega-pack, para unir el RNA a la membrana covalentemente, y finalmente se guardó en una bolsa de plástico para su posterior hibridación.

### PREPARACIÓN DE LA SONDA

Los plásmidos pCAN extraídos por lisis alcalina se digirieron con las enzimas correspondientes al sitio de inserción del fragmento CAN (pCAN I a 32 se encuentran insertados en el sitio PstI del plásmido pBR329, mientras que los pCAN del 44 al 98 en el sitio policlonal del plásmido pYcDE8, flanqueados por sitios de restricción para BamHI y EcoRI). El fragmento correspondiente, en cada caso, al inserto CAN se cortó del gel de agarosa y se aisló utilizando el kit GeneClean II de Bio 101 Inc. Este método de purificación de DNA consiste en disolver la agarosa con yoduro de sodio 6M a una temperatura de 55 °C, para luego agregar perlas de sílica (Glass Milk) a las cuales el DNA se une debido a un efecto de cargas. La agarosa se lava con una solución "New Wash" y finalmente se eluye el DNA de las perlas de sílica al resuspenderlas en TE pH 8.

Para marcar la sonda con radioactividad se utilizó el kit Random Primer de BRL y el nucleótido radioactivo dCTP (32- $\alpha$ P) suministrado por DuPont. El sistema de Random Primer consiste en utilizar como cebadores un juego de oligonucleótidos diferentes que se unen al azar con la sonda, que funciona como molde. El volumen equivalente a 25 ng de la sonda que funcionó como molde, se llevó a 20  $\mu$ l y se colocó en un baño maría en ebullición durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar el DNA. Al molde de DNA se le agregaron los siguientes componentes de la reacción de duplicación del DNA:

- 2  $\mu$ l de cada uno de los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP (concentración inicial 0.5mM, suministrados por BRL como parte del kit Random Primer de BRL.)
- 5  $\mu$ l de dCTP (32- $\alpha$ P) (concentración inicial 10mCi/ml)
- 15  $\mu$ l de la mezcla de Random Primers
- 1  $\mu$ l de fragmento Klenow de la DNA polimerasa.

Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 1 hora para permitir la duplicación del molde de DNA con la incorporación del nucleótido marcado con fósforo radioactivo. Finalmente, transcurrido este tiempo se agregaron 5 µl de Stop Buffer (suministrado con el kit de Random Primer) y 45 µl de TE.

Con el fin de separar los nucleótidos no incorporados de la sonda marcada radioactivamente, la mezcla descrita se pasó por una columna de Sephadex G-50 a la cual se adhieren dichos nucleótidos. Obteniéndose como un eluido de la columna las cadenas de DNA marcadas radioactivamente que se utilizaron posteriormente para la hibridación tipo Northern Blot.

### HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN BLOT

La hibridación tipo Northern Blot se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Sambrook *et al.*, 1989. De acuerdo con éste, la membrana con el RNA, previamente fijada, se prehibrida por 2 horas a 65 °C en solución de hibridación y 600 µl de solución de DNA de esperma de salmón, previamente desnaturalizado, en una bolsa de hibridación sellada.

#### SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

5X	Solución Denhardt's 10X
5X	20X SSC
50mM	2 M Fosfato de Sodio, pH 6.5
0.2%	SDS 10X

#### SOLUCIÓN DENHARDT'S 100X

2% Ficoll	20X SSC
2% PVP	3M NaCl
2% BSA	0.3 M Ácido Cítrico

Transcurrido el tiempo de prehibridación, se agregó la sonda marcada radioactivamente a la bolsa de hibridación y se incubó toda la noche a 65 °C con agitación constante.

Al día siguiente, la membrana se lavó con 250 ml de 2X SSC, 0.1% SDS por 30 minutos a 65 °C con agitación constante, y posteriormente con 250 ml de 0.15X SSC, 0.1% SDS en las mismas condiciones. Al terminar estos lavados, la membrana se secó parcialmente, se envolvió en plástico y se expuso en un estuche con una pantalla amplificadora y una placa autorradiográfica (X-OMAT de Kodak) durante el tiempo necesario para observar una señal.

Las membranas se lavaron para su reutilización usando una solución de SDS al 0.1% en agua tratada con DEPC. Esta solución se calentó hasta que comenzó a hervir, momento en el cual fue

vertida sobre la membrana contenida en un recipiente. El recipiente con la membrana y la solución de SDS se volvieron a calentar en un horno de microondas por 4 minutos a temperatura máxima. Para saber si la marca se había eliminado se utilizó un contador geiger y se expuso la membrana con una película autorradiográfica.

### AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

#### Transformación

Las transformaciones de bacterias con los diferentes plásmidos CAN se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. La técnica consiste en dar un choque de calor (heat shock) a 42 °C por 2 minutos, momento en el cual el plásmido se incorpora a las células. Posteriormente, es necesario que las células se recuperen durante una hora en medio LB sin antibiótico, para que comiencen a expresar los genes que después otorgarán las resistencias. Por último, se plaquearon las células en medio LB con el antibiótico correspondiente y se seleccionó una colonia para amplificar el plásmido en un cultivo de 2 ml de medio selectivo para obtener las células que se guardaron con glicerol estéril al 15% a -70 °C. Las cepas de bacterias utilizadas se

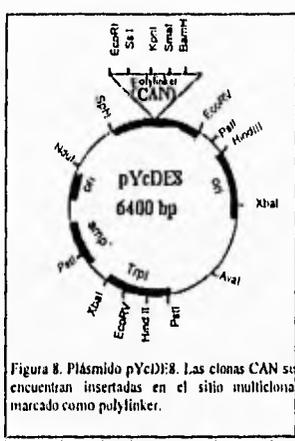


Figura 8. Plásmido pYcDE8. Las clonas CAN se encuentran insertadas en el sitio multiclonal marcado como polylinker.

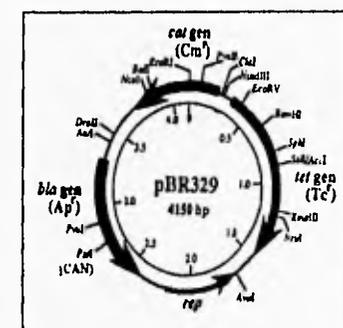


Figura 9. Plásmido pBR329. Las clonas CAN se encuentran insertadas en el sitio PstI, interrumpiendo así el gen que confiere resistencia a ampicilina.

muestran en la tabla 3, junto con los plásmidos que se amplificaron en cada una de estas y la resistencia a antibiótico usada para la selección. Las clonas pCAN se encuentran clonadas en los plásmidos pYcDE8 (insertadas en el sitio multiclonal del plásmido) y pBR329 (insertadas en el sitio PstI). Los mapas de estos plásmidos se encuentran representados en las figuras 8 y 9. En algunos casos, no fue posible seleccionar células que hubieran adquirido resistencia a tetraciclina por medio de la transformación con clonas aisladas en el pBR329, por lo que se aislaron transformantes por medio de la selección en medio

con cloranfenicol. La cepa HB101 se seleccionó en un principio puesto que parecía funcionar como un buen huésped de los plásmidos ya que sólo presenta resistencia a estreptomycin, sin embargo, estas células expresan altos niveles de endonucleasas por lo que la extracción de los plásmidos se hacía más compleja. Cuando fue posible, se utilizaron las células XL1blue que, a pesar de ser resistentes a tetraciclina, ofrecen otras ventajas importantes como la menor cantidad de endonucleasas, lo que permite extraer una mayor cantidad de plásmido por un proceso menos laborioso (no es necesario realizar repetidas extracciones con fenol para inactivar a las nucleasas; Schoenfeld, *et al.*, 1995).

Cepas de bacterias	Plásmidos clonados	Resistencia usada para la selección
<b>HB101</b> <i>(F<sup>-</sup>, thi-1, hsdS20 (r<sub>H</sub><sup>-</sup>, m<sub>H</sub><sup>-</sup>), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, rpsL20 (str<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1)</i>	pCAN44 pCAN46 pCAN63 pCAN67 pCAN71 pCAN72 pCAN77 pCAN87 pCAN98 pCAN101 pCAN102	ampicilina (100 µg/ml)  (otorgada por el vector, pYcDE8)
<b>HB101</b> <i>(F<sup>-</sup>, thi-1, hsdS20 (r<sub>H</sub><sup>-</sup>, m<sub>H</sub><sup>-</sup>), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, rpsL20 (str<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1)</i>	pCAN1 pCAN3 pCAN11 pCAN16	tetraciclina (12.5 µg/ml)  (otorgada por el vector pBR329)
<b>XL1blue</b> <i>(recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F<sup>'</sup>proAB, lacIqZΔM15])</i>	pCAN5 pCAN15 pCAN18 pCAN19 pCAN23 pCAN24 pCAN26 pCAN32	cloranfenicol (100 µg/ml)  (otorgada por el vector pBR329)

Tabla 3. Cepas de bacterias usadas para las transformaciones. Se indican las resistencias propias de los plásmidos que fueron usadas para reconocer a las células transformantes. Los marcadores genéticos indicados implican: *ara-14*: Mutación en el metabolismo de la arabinosa; *endA1*: Mutación en la endonucleasa (mejora la calidad de los plásmidos extralidos); *gyrA96*: Mutación en la DNA girasa; *hsdR17*: No presenta restricción; *hsdS20*: No presenta restricción ni modificación de DNA; *lacY1*: Mutación en el gen de la β-D-galactosidasa; *leuB6*: Mutación en el gen de la β-isopropil malato deshidrogenasa; *mtl-1*: Mutación en el metabolismo del manitol; *recA1*: Mutación en la recombinación (asegura estabilidad de los insertos); *relA1*: Fenotipo "retajado" (permite la síntesis de RNA en ausencia de síntesis de proteínas); *rpsL20*: Mutación en la subunidad S12 del ribosomal 30S, que confiere resistencia a streptomycin; *supE44*: Mutaciones supresoras; *thi-1*: Mutación en el metabolismo de la tiamina; *xyl-5*: Mutación en el metabolismo de la xilosa.

### **Extracción de los plásmidos por lisis alcalina**

Los plásmidos que se clonaron en las células XL1blue se extrajeron siguiendo el protocolo básico descrito por Sambrook *et al.* Para el caso de los plásmidos clonados en las cepas HB101 fue necesario incluir dos extracciones con fenol-cloroformo seguidas de dos extracciones con cloroformo para poder así inactivar a las endonucleasas propias de esta célula. En algunos casos se realizó la extracción de plásmidos partiendo de 50 ml de cultivo, realizando las modificaciones adecuadas en los volúmenes, debido al bajo rendimiento de la extracción cuando se realizan las extracciones con fenol-cloroformo.

### **SECUENCIACIÓN PARCIAL DE CAN3**

La secuenciación parcial del CAN3, en el plásmido pCAN3 se realizó siguiendo el método de terminación de cadena descrito por Sanger *et al.*, (1977). Las reacciones de secuencia se realizaron de acuerdo al protocolo del estuche de Sequenase Version 2.0 de la compañía United States Biochemical (USB).

### **Preparación del molde**

Partiendo del plásmido pCAN3 purificado se preparó DNA de cadena sencilla usando el método de desnaturalización alcalina modificado de Sambrook *et al.*, 1989.

A 5 µg de DNA se les agregaron 4 µl de la solución desnaturalizante, consistente en 5.0 M de NaOH y 0.5 M de EDTA preparado en TE 1X, pH 8. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos al término de los cuales la solución se neutralizó con 2 µl de acetato de sodio 2M pH 5.2 y el DNA se precipitó usando 60 µl de etanol absoluto. Se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% para finalmente centrifugar por 5 minutos y obtener la pastilla que se secó durante 5 minutos en un liofilizador al vacío (Speed vac SAVANT).

### **Alineamiento del cebador**

El DNA se resuspendió en un volumen de 10 µl usando amortiguador para la DNA polimerasa (Sequenase Version 2.0) a una concentración final de 1X, 1.5 pmol de cebador y agua desionizada. Se incubó a 65 °C por 2 minutos y se dejó enfriar en el temp-block a temperatura

ambiente, lentamente hasta que alcanzó una temperatura de 30 °C. Como cebadores se utilizaron oligonucleótidos con secuencias correspondientes a las zonas del plásmido pBR329 que se encuentran cercanas al sitio PstI.

### **Reacción de marcado**

A la mezcla anterior, una vez fría, se le agregaron 1 µl de DTT 0.1M, 2 µl de la mezcla de marcado diluidos 1:5 en agua, 0.5 µl [ $\alpha$ - $^{35}$ S]-dATP (10 µci/µl) y 2 µl de DNA polimerasa (Sequenase Version 2.0) diluida en el buffer de dilución para la enzima. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con el propósito de que se incorporara la marca radioactiva a la cadena polimerizada por la enzima.

### **Reacción de terminación**

Se marcaron 4 tubos como A (para las cadenas que terminan en adenina), C (para las que terminan en citosina), G (guanina) y T (timidina). A cada tubo se le agregaron 2.5 µl de mezcla de terminación del ddNTP correspondiente y 3.5 µl de la mezcla proveniente de la reacción de marcado. Se incubaron a 37 °C por 5 minutos, al término de los cuales se agregaron 4 µl de solución de término (Stop Solution, provista por el proveedor del estuche) a cada tubo y se almacenaron a -20 °C hasta el momento en el cual se cargaron en el gel de secuencia.

### **Gel para secuencia**

Los vidrios se lavaron adecuadamente con agua y etanol del lado que se encontraría posteriormente en contacto con el gel. Para un facilitado manejo del gel los vidrios se tratan con pegamento y con silicón para que el gel se pegue a uno y sea fácil desprenderlo del otro. Esto se hace de la siguiente manera:

El vidrio pequeño se trató con una mezcla consistente en 3 ml de etanol, 50 µl de ácido acético al 10% i 5 µl de  $\gamma$ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (Sigma), la cual se extendió por todo el vidrio utilizando una toalla absorbente. Una vez que se secó (aproximadamente 5 minutos), se aplicaron 5 ml de etanol por todo el vidrio para lograr que el pegamento se extienda por todo el vidrio. Este tratamiento crea una superficie hidrofílica a la que el gel se adhiere.

El vidrio grande se trató con silicón para facilitar que este se despreque del gel al terminar la corrida. Para esto se colocaron 3 ml de silicón Sigmacote (Sigma) en el centro del vidrio y se extendieron por el mismo. Una vez secó se aplicaron 5 ml de etanol comercial. El silicón genera una superficie hidrofóbica lo que facilita que el gel se despreque del vidrio tratado con el mismo.

Una vez tratados los vidrios se colocaron dos espaciadores a cada lado del vidrio grande y se colocó el vidrio pequeño encima del vidrio grande, cuidando que los lados tratados quedaran encontrados. Se puso cinta adhesiva en los extremos largos de los vidrios así como en el extremo inferior, dejando el lado superior libre para agregar el gel.

El gel tenía una concentración de 6% acrilamida/bis-acrilamida preparado en 100 ml de agua con 5.7 g de acrilamida, 0.3 g de bis-acrilamida y 42 g de urea. Una vez que todos los componentes se habían disuelto, se filtró por Millipore y se desgasificó a vacío por espacio de 5 minutos. Finalmente se agregaron 400 µl de persulfato de amonio y 20 µl de TEMED para catalizar la reacción de polimerización que se presenta entre la acrilamida y la bis-acrilamida. Una vez vaciado el gel se pusieron los peines y se dejó toda la noche para que la polimerización fuera total.

### **Electroforesis y tratamiento del gel**

Se usó buffer TBE IX para la electroforesis. El gel, lavado con el fin de limpiar la poli-acrilamida polimerizada fuera de los vidrios, se precalentó por aproximadamente una hora, tiempo en el que llega a una temperatura de 50 °C y las muestras se cargaron una vez desnaturalizadas. El gel corrió manteniendo una temperatura constante de 50 °C, a aproximadamente 70 Watts por una hora y media en el caso de la corrida corta y por el doble de tiempo para la corrida larga.

Al término de la electroforesis los vidrios se separaron y el gel se fijó en ácido acético al 10% por media hora con agitación constante. Se secó en una estufa a 80 °C por una hora y se puso a exponer con una placa para autorradiografía toda la noche a temperatura ambiente. Al otro día se reveló y se leyó la secuencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los plásmidos que incluyen a las clonas CAN que fueron enviados por la Dra. Mary Stringer se listan a continuación:

pCAN1	pCAN18	pCAN44	pCAN77
pCAN3	pCAN19	pCAN46	pCAN78
pCAN8	pCAN23	pCAN63	pCAN87
pCAN11	pCAN24	pCAN67	pCAN98
pCAN15	pCAN26	pCAN71	pCAN101
pCAN16	pCAN32	pCAN72	pCAN102

Se realizó una búsqueda de similitud de las secuencias parciales obtenidas por M. Stringer y W. Timberlake (no publicado) con las bases de datos del GenBank y SwissProt, por medio de los algoritmos FASTA y FASTP del Genetics Computer Group (GCG; versión 7, 1991) utilizando los 6 marcos de lectura posibles para cada una de las clonas secuenciadas. Desafortunadamente esta búsqueda no proporcionó datos nuevos sobre la posible identidad de las clonas CAN, teniendo como resultado solamente los datos que ya se conocían:

- CAN5 contiene cDNA correspondiente al gen *cata* que codifica para la catalasa específica de los conidios de *Aspergillus nidulans* (Navarro *et al.*, 1996).
- En la clona CAN8 se encuentra representado el gen previamente clonado y secuenciado de la isocitrato liasa (*acuD*) de *Aspergillus nidulans* (Gaine *et al.*, 1992).
- La secuencia parcial del cDNA contenido en la clona CAN11 (CAN67) presenta una alta similitud con el gen *con-10* de *Neurospora crassa*, identificado como un gen específico del desarrollo (Roberts *et al.*, 1988).
- Tanto CAN46 como CAN71, que contienen transcritos similares, comparten una alta similitud con el gen *grg-1* (*ecg-1*) de *Neurospora crassa* (McNally & Free, 1988).
- CAN77 representa un gen cuya secuencia parcial tiene una alta similitud con el gen de *Saccharomyces cerevisiae* identificado como *glp1/hsp12* (Stone *et al.*, 1990; Prackelt & Meacock, 1990).

Para el análisis presentado en este trabajo, se eligieron las clonas CAN que se encuentran listadas en la tabla 4. La selección se llevó a cabo eliminando aquellas clonas cuya expresión fuese independiente del gen regulador *brlA* (Baylan *et al.*, 1987) o que hayan sido clasificadas dentro de los grupos A, B o C (ver introducción; Adams *et al.*, 1988).

Clona	Tamaño del transcrito (nt)	Tipo de gen	Expresión en mutantes		
			<i>brlA1</i>	<i>abaA1</i>	<i>wetA6</i>
CAN3	2150	?	?	?	?
CAN5	2050	D	+	+	+
CAN15	1500	D	?	?	?
CAN16	1450	?	±	±	±
CAN44	1600	?	+	+	+
CAN46	1100	D	?	?	?
CAN63	2100	D	+	+	+
CAN11	500	D	+	±	t
CAN67					
CAN71	550	D	?	?	?
CAN77	600	D	+	-	-
CAN95					
CAN65					
CAN87	1400	?	?	?	?
CAN98	500	?	?	?	?

Tabla 4. Clonas CAN analizadas en este trabajo, por expresión en condiciones de privación de nutrientes. Se presentan los datos del tipo de gen (ver introducción), expresión en mutantes de tipo *brlA1*, *abaA1* y *wetA6*, y los tamaños de los transcritos estimados de hibridaciones tipo Northern (Stringer, Mirabito y Timberlake, sin publicar).

## Patrones de expresión y análisis de las clonas

### **Transcritos que no se acumulan en las condiciones estudiadas**

#### CAN5

El gen correspondiente al cDNA que se encuentra clonado en el plásmido CAN5 codifica para una catalasa específica de los conidios de *Aspergillus nidulans* y ha sido designado como *catA*. La transcripción de *catA* no se induce, en los tiempos estudiados, por la privación de nitrógeno y/o carbono.

En cultivos conidiantes la transcripción de este gen comienza a las 12 horas de exposición al aire, de manera independiente de los genes reguladores *brlA*, *abaA* y *wetA*, sin embargo la actividad de la catalasa no concuerda con la presencia del mRNA, por lo que se dedujo que puede existir una regulación post-transcripcional (Navarro *et al.*, en preparación). El mayor tiempo analizado en este trabajo es 10 horas después de la privación de nutrimentos. Es posible que la transcripción ocurra a tiempos más largos.

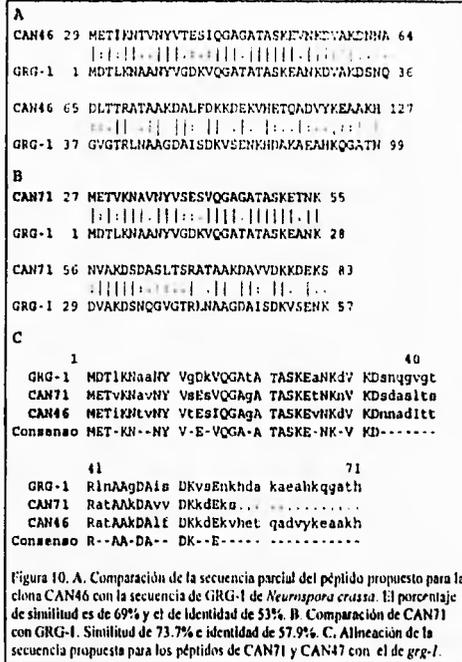
#### CAN98

La secuencia parcial del inserto del plásmido pCAN98 no presentó ninguna similitud significativa con secuencias de otros genes o proteínas conocidas. Representa un transcrito de 500 pb que se encuentra presente en cultivos conidiantes, así como en los conidios aisladas (Mirabito, 1989). Su expresión no se indujo en ninguna de las 4 condiciones estudiadas.

Transcritos regulados por privación de nitrógeno o carbono

CAN46 y CAN71

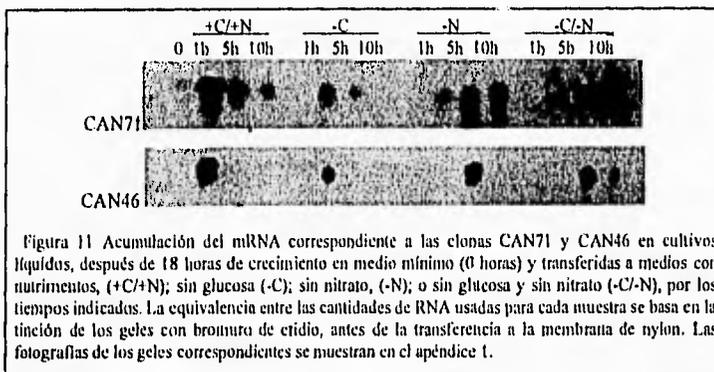
Los genes correspondientes a las clonas CAN46 y CAN71 tienen transcritos de aproximadamente 1100 y 550 nucleótidos, respectivamente. Ambos fueron clasificados dentro de la clase D, esto es, son independientes cuando menos parcialmente del gen regulador *hrlA* (Adams *et al.*, 1988). A pesar de la diferencia en el tamaño del transcrito ambos genes tienen una semejanza grande entre si, que comparten con el gen *grg-1* (gen regulado por glucosa o *glucose repressible gene*) de *Neurospora crassa* (McNally & Free, 1988) que, al igual que CAN71, es un gen pequeño (figura 10)



En la figura 11 se muestran los patrones de acumulación del mRNA para ambas clonas. El transcrito correspondiente a CAN71 se encontró presente a partir de la primera hora después de la transferencia a un medio de cultivo con glucosa y nitrógeno. Esta acumulación se mantiene, aunque de manera menos conspicua hasta las 10 horas. Cuando se transfirió el micelio a un medio carente de glucosa también se observó acumulación del transcrito en la primera hora, sin embargo ésta no es tan alta y disminuye de manera tal que, para las 10 horas, es imperceptible. Cuando el micelio se transfirió a medio carente de nitrógeno, la acumulación se observó hasta las 5 horas y continuó presente a las 10 horas. Esta situación se asemeja a la que se observó al transferir el micelio a un medio de cultivo carente de ambos nutrimentos, donde la acumulación se hizo evidente sólo a las 5 horas.

CAN46 mostró un patrón de acumulación parecido al de CAN71 (figura 11). El mRNA se encontró presente transcurrida 1 hora de cultivo en presencia de nutrimentos así como en ausencia de glucosa, pero a diferencia de lo que se observó para CAN71, esta acumulación es transitoria en ambos tipos de cultivo. Cuando se transfirió el micelio a un medio carente de nitrato, la acumulación del transcrito correspondiente a CAN46 se hizo evidente solamente a la 5 horas de cultivo y cuando se privó de glucosa y nitrato, la acumulación del mRNA se observó desde las 5 horas y continuó hasta las 10 horas.

Resulta interesante que los genes representados por ambas clonas, no sólo compartan semejanzas en sus secuencias parciales, sino que también tengan un patrón de regulación por nutrimentos similar. En ambos casos, hay una acumulación del transcrito al transferir el micelio a medio con nutrimentos (1 h), la cual disminuye o desaparece por completo posteriormente. Esta acumulación se ve afectada por las limitaciones de nutrimentos, siendo menor cuando se priva de glucosa y más tardía al privar de nitrato, en ambos genes.



En experimentos previos, realizados por la Dra. M. Stringer (sin publicar) con el objetivo de analizar si existía una regulación por lípidos de los genes representados en las clonas CAN, se encontró que el gen correspondiente a CAN46 es de los pocos, representados en las clonas CAN, que se transcribieron cuando, después de crecer cultivos sumergidos de *A. nidulans* durante 12 horas, éstos se transfirieron por 2 horas a un medio mínimo o por 2 o 4 horas a un medio mínimo con Tween80 (0.05% v/v). La inducción se observó específicamente en los medios suplementados con glucosa. En esta misma serie de experimentos se encontró que CAN71 se indujo a las 2 horas de crecer en presencia de glucosa y Tween80. No se observó acumulación del transcrito de ninguno de los dos genes cuando los cultivos se transfirieron a un medio de cultivo carente de glucosa y

suplementado con Tween80 y ácido oleico. Esto sugiere que la presencia de glucosa es necesaria para que en los tiempos y condiciones estudiados por la Dra. M. Stringer, se presente la inducción de estos genes.

El gen *grg-1* de *Neurospora crassa* fue aislado también como *cag-1* (gen controlado por el reloj endógeno o *clock controlled gene*) en una búsqueda realizada para encontrar genes que se encontraran bajo el control del ritmo circadiano de *N. crassa* como un gen específico de la mañana (Loros *et al.*, 1989). En este mismo proceso de selección, el gen encontrado como *cag-2* resultó ser el que codifica para la hidrofobina de los conidios, previamente identificado como *eas* (de *easily wettable*) que tiene similitud con *rodA* de *A. nidulans*, también encontrado como clona CAN (Bell-Pedersen *et al.*, 1992, Stringer *et al.*, 1991).

Pese al alto grado de similitud que existe entre *grg-1* y los genes representados por CAN46 y CAN71, sus patrones de regulación por glucosa son totalmente opuestos. Mientras que CAN46 y CAN71 no parecen presentar una acumulación dependiente de la privación de carbono, *grg-1* se induce en respuesta a la privación de glucosa en cuestión de minutos (McNally & Free, 1988).

Los resultados sugieren que los genes representados por CAN46 y CAN71 son regulados por más de un factor al igual que el gen *grg-1* de *N. crassa*. *grg-1* se encuentra sujeto a regulación por el gen específico de la conidiación *acon-2* y por condiciones como el choque de calor. La concentración de la glucosa regula a *grg-1* por medio de dos elementos en su promotor. Todo lo anterior parecería sugerir que *grg-1* tiene una función importante, sin embargo no se ha encontrado un fenotipo para la cepa que tiene este gen interrumpido (Wang *et al.*, 1994).

## CAN77

El gen correspondiente a CAN77 fue clasificado dentro del grupo D (Mirabito *et al.*, 1989; Marshall & Timberlake, 1991) y su independencia de *brlA* se demostró en mutantes carentes de una copia funcional de dicho gen (Boylan *et al.*, 1987; figura 12). Al realizar

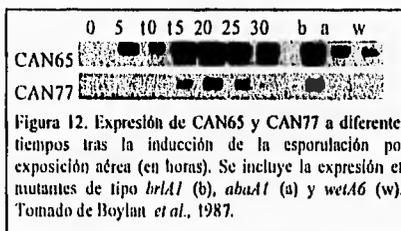
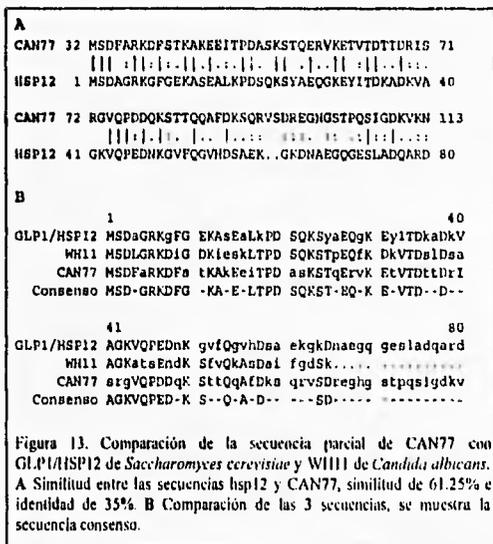


Figura 12. Expresión de CAN65 y CAN77 a diferentes tiempos tras la inducción de la esporulación por exposición aérea (en horas). Se incluye la expresión en mutantes de tipo *brlA1* (b), *abaA1* (a) y *wetA6* (w). Tomado de Boylan *et al.*, 1987.

comparaciones entre las clonas CAN. CAN77 se identificó como equivalente a CAN65, que no tiene un patrón de regulación igual. Estas diferencias podrían deberse a problemas técnicos con las hibridaciones.

La secuencia parcial de CAN77 presenta una alta similitud con una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* que se regula de manera negativa por glucosa y positiva por lípidos, GLP1 (Stone *et al.*, 1990) (figura 13). Esta proteína fue también identificada como HSP12 (proteína de choque de calor, *heat shock protein* 12) debido a la activación de su transcripción en respuesta a este tipo de tensión (Praeckelt & Meacock, 1990). Esta similitud resulta interesante, entre otras cosas, porque también ocurre con el gen *whi1* de *Candida albicans*, un gen específico del estado blanco con crecimiento levaduriforme de dicho organismo, el cual cambia entre fenotipos alternantes por medio de mecanismos desconocidos. Esta transición se estimula por medio de incrementar la temperatura en la cual el organismo crece y se ha observado que se asocia con cambios en el pH intracelular. Se desconoce la función del producto de *whi1* y su interrupción no tuvo ningún efecto en el desarrollo de los diferentes fenotipos del organismo (Kaur *et al.*, 1988; Srikantha & Soll, 1993; Soll *et al.*, 1993; Srikantha *et al.*, 1995; Srikantha *et al.*, 1995B). Así mismo

la interrupción del gen que codifica para GLP1/HSP12 no tuvo ningún efecto observable en el crecimiento de *Saccharomyces* (Praeckelt & Meacock, 1990). GLP1/HSP12 se induce, además de en las condiciones mencionadas, por choque osmótico, tensión oxidativa y al entrar en fase estacionaria, aunque su sobreexpresión no confiere protección a la tensión osmótica (Varela *et al.*, 1992; Varela *et al.*, 1995).



A pesar de esta alta similitud, CAN77 no se regula de manera similar, cuando menos en cuanto a la respuesta a la privación de glucosa (figura 14). En el presente estudio se observó que CAN77 se acumula, además de en otras condiciones, después de transferir el micelio a un medio mínimo, donde todos los nutrientes están presentes. En experimentos previos se observó la inducción de este gen en respuesta al crecimiento por dos horas en presencia de glucosa y Tween80 (Stringer, M. comunicación personal), lo cual parecía sugerir una regulación positiva por lípidos, pero la acumulación que se encontró cuando el micelio creció en media con glucosa, sin lípidos, pone en duda esta inferencia.

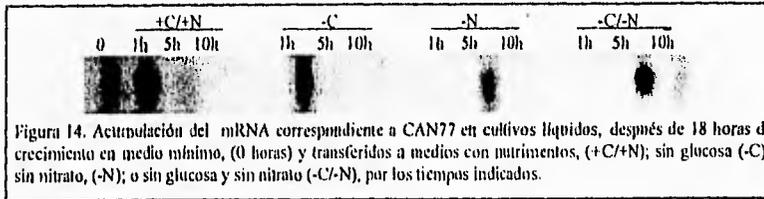


Figura 14. Acumulación del mRNA correspondiente a CAN77 en cultivos líquidos, después de 18 horas de crecimiento en medio mínimo, (0 horas) y transferidos a medios con nutrientes, (+C/+N); sin glucosa (-C); sin nitrato, (-N); o sin glucosa y sin nitrato (-C/-N), por los tiempos indicados.

En presencia o ausencia de glucosa y presencia de nitrógeno, el mRNA se acumuló rápida y transitoriamente siempre y cuando hubiera nitrógeno en el medio. Cuando el micelio se transfirió a medios carentes de fuente de nitrógeno, fue necesario más tiempo (5 horas) para que el mensaje se acumule. Cabe hacer notar la similitud que existe entre este patrón y el observado para CAN71 y CAN46.

### CAN16

CAN16 corresponde a un gen cuya secuencia parcial no tiene similitud con ninguna otra conocida. Con base en su expresión al inducir la conidiación por exposición aérea, así como en mutantes *brlA*, *abaA* y *wetA*, tiene una independencia, al parecer, parcial de *brlA* (figura 15, Boylan *et al.*, 1987). En la figura 16 se muestran los patrones de acumulación del

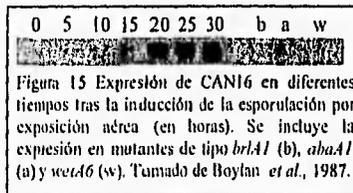
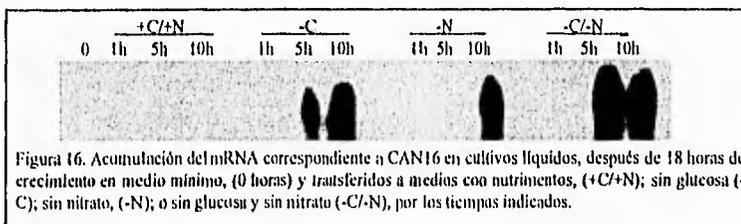


Figura 15 Expresión de CAN16 en diferentes tiempos tras la inducción de la esporulación por exposición aérea (en horas). Se incluye la expresión en mutantes de tipo *brlA1* (b), *abaA1* (a) y *wetA6* (w). Tomado de Boylan *et al.*, 1987.

mRNA para esta clona, donde se puede observar que no hubo expresión en presencia de nutrientes. La privación de carbono y/o de nitrógeno indujeron la expresión y el transcrito comenzó a acumularse más temprano en ausencia de una fuente de carbono (5 horas de privación de carbono o de carbono y nitrógeno). Resulta interesante que, en el caso donde se producen

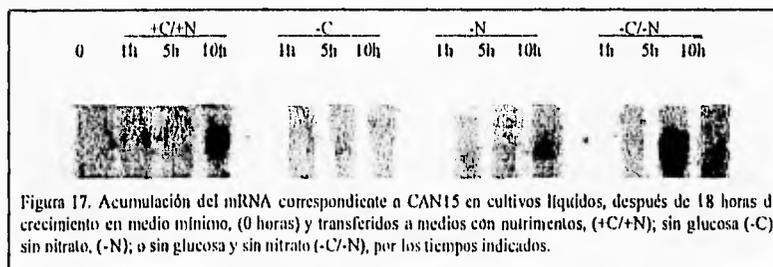
condióforos reducidos, al privar de carbono o de ambos nutrientes, la acumulación del mRNA correspondiente a CAN16, ocurra más temprano. Existe un paralelo en la acumulación del mensaje correspondiente a CAN16 y la expresión de *brlA* (figura 3B), por lo que esta clona es un candidato para analizar con más detalle como posible regulador de *brlA*.



### Transcritos regulados por la privación de nitrógeno y carbono

#### CAN15

El transcrito con el que la sonda de CAN15 hibrida es pequeño, tiene aproximadamente 150 nucleótidos. No presenta similitud con ninguna secuencia conocida. CAN15 fue clasificado como gen tipo D (Mirabito *et al.*, 1989; Marshall & Timberlake, 1991) y resulta interesante su inducción transitoria al crecer *Aspergillus nidulans* en medio carente de fuente de carbono y de nitrógeno por 5 horas, la cual se muestra en la figura 17. El nivel de acumulación del mRNA que se observa en este tiempo es mayor al que hay tras realizar un cultivo en medio mínimo por 10 horas. Dado este patrón de expresión, resulta poco probable que este gen pudiera regular la expresión de *brlA*.



## Transcritos regulados por la privación de carbono

### CAN63

La clona CAN63, cuya secuencia parcial no tiene semejanzas significativas con ninguna proteína en la base de datos SwissProt, representa un gen clasificado como tipo D (Adams *et al.*, 1988). Este dato se corroboró por los estudios de expresión realizados en murantes *brlA1*, *abaA1* y *wetA6* donde también se observó que CAN63 se transcribe desde las 0 horas (figura 18; Boylan *et al.*, 1987).

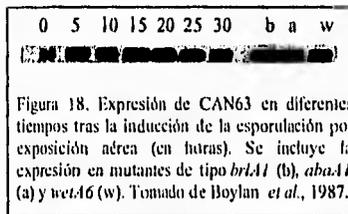


Figura 18. Expresión de CAN63 en diferentes tiempos tras la inducción de la esporulación por exposición aérea (en horas). Se incluye la expresión en mutantes de tipo *brlA1* (b), *abaA1* (a) y *wetA6* (w). Tomado de Boylan *et al.*, 1987.

En el análisis de expresión realizado (figura 19), se observó que hubo una ligera acumulación del transcrito a las 0 horas, así como después de crecer el micelio en medio mínimo por 1 hora. Sin embargo, esta acumulación se incrementó notablemente 5 horas después de la privación de glucosa y de glucosa/nitrato. CAN63 parece estar respondiendo a la privación de la fuente de carbono de manera específica y resulta interesante su expresión transitoria, la cual ocurre antes de que el mensaje de *brlA* se vea acumulado (ver figura 3B).

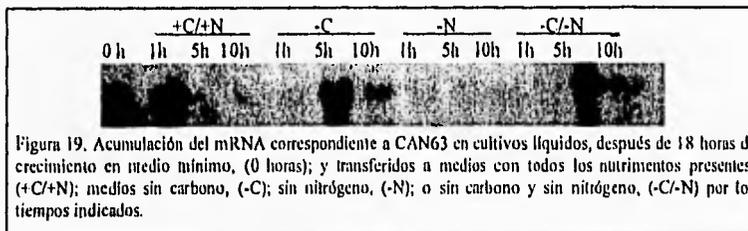


Figura 19. Acumulación del mRNA correspondiente a CAN63 en cultivos líquidos, después de 18 horas de crecimiento en medio mínimo, (0 horas); y transferidos a medios con todos los nutrientes presentes, (+C/+N); medios sin carbono, (-C); sin nitrógeno, (-N); o sin carbono y sin nitrógeno, (-C/-N) por los tiempos indicados.

### CAN67

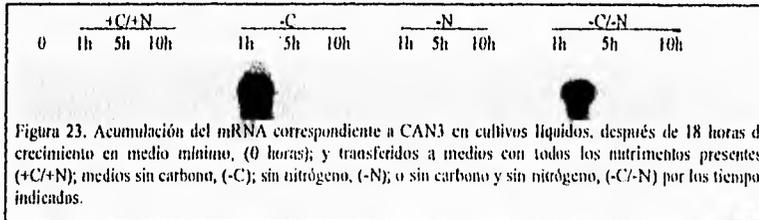
El gen correspondiente a la clona CAN67, que se identificó como igual a CAN11, presenta una expresión independiente de *brlA* (Boylan *et al.* 1987; figura 20) aunque ni la intensidad ni el tiempo de expresión concuerdan en ambas clonas.



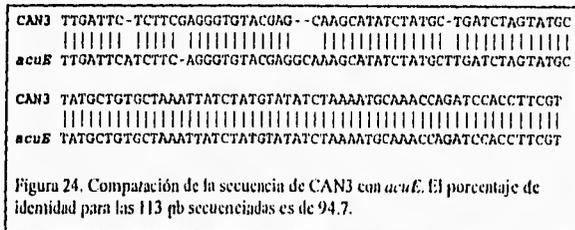
respuestas a tensión. Sin embargo la interrupción de *con-10* no tuvo ningún efecto aparente en la conidación de *N. crassa* (Madi *et al.*, 1994).

### CAN3

Al analizar los patrones de expresión de CAN3, clona que representa un gen sobre el cual no se tenía ningún dato, se encontró que se hay una elevada acumulación, rápida y transitoria en respuesta a la privación de glucosa (figura 23).



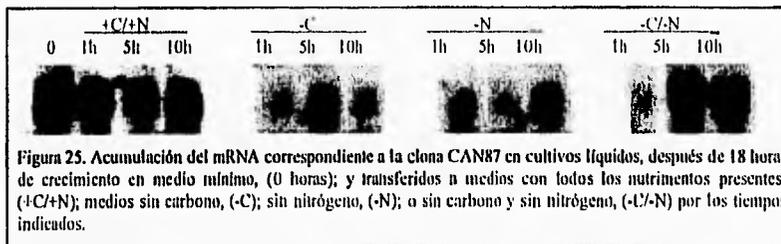
Este dato resultó muy interesante, ya que un gen que se expresa tan rápidamente en respuesta a una condición que induce la conidación, podría estar actuando sobre genes reguladores de la conidación transmitiendo una señal externa. Debido a que no existía ningún otro dato con respecto a esta clona, se secuenció parcialmente (figura 24). La secuencia mostró un 94.7% de identidad con el gen *acuE* de *Aspergillus nidulans* que codifica para la enzima malato sintetasa del ciclo del glioxalato (Armitt *et al.*, 1976). Las diferencias que se observan entre ambas secuencias pueden deberse a que solamente se corrió una reacción de secuenciación y es probable que existan errores en la lectura.



## Transcritos no regulados por la privación de carbono o nitrógeno

### CAN87

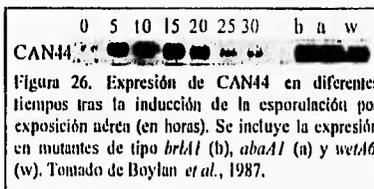
CAN87 se incluyó en este estudio debido a que no se sabía nada acerca de su regulación y su secuencia parcial no presenta semejanzas significativas con ninguna otra conocida. En la figura 25 se muestra la hibridación tipo Northern, en la que se observa la acumulación del transcrito en todas las condiciones estudiadas.



Por su expresión en un medio mínimo, donde *brlA* no se transcribe (Skromne *et al.*, 1994), se puede apreciar que es independiente de este gen regulador. Su expresión es, al parecer, constitutiva cuando menos después de las 18 horas de crecimiento. En estudios realizados se comprobó que los genes representados por las clonas CAN analizadas en el presente trabajo no se expresan en hifas vegetativas (Strüger, M. com. personal) pero cabe mencionar que las clonas CAN se aislaron de cultivos que fueron inducidos a conidiar por exposición aérea, creciendo en medio de cultivo suplementado con extracto de levadura. En este trabajo, el micelio se transfirió a medio mínimo de cultivo por lo que la contradicción que se presenta entre estos y los datos previos puede deberse al medio de cultivo.

### CAN44

La clona CAN44 corresponde a un gen independiente de *brlA* cuya expresión alcanza niveles muy altos entre las 5 y 20 horas posteriores a la inducción de la conidiación por medio de la exposición aérea (figura 26; Boylan *et al.*, 1987).



En este estudio se observó que el transcrito correspondiente a CAN44 se encontró presente a partir de las 18 horas de crecimiento en medio mínimo. Su expresión es independiente del medio al cual se transfirió el micelio aunque hay diferencias entre la acumulación en los diferentes medios de cultivo (figura 27).

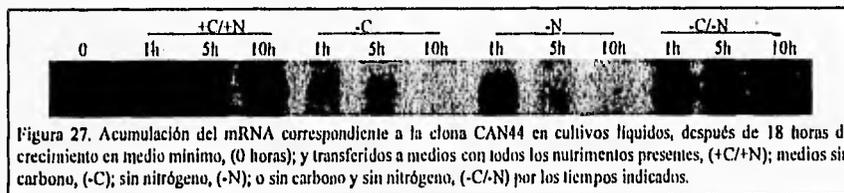


Figura 27. Acumulación del mRNA correspondiente a la clona CAN44 en cultivos líquidos, después de 18 horas de crecimiento en medio mínimo, (0 horas); y transferidos a medios con todos los nutrientes presentes, (+C/+N); medios sin carbono, (-C); sin nitrógeno, (-N); o sin carbono y sin nitrógeno, (-C/-N) por los tiempos indicados.

### Metabolismo del acetato durante la esporulación

Tomando en cuenta que dos de los genes clonados como transcritos específicos de la conidiación resultaron codificar para la isocitrato liasa (CAN8; M. Stringer, comunicación personal) y para la malato sintasa (CAN3; este trabajo), se planteó analizar el papel que el ciclo del glioxalato y, en general, la utilización de los ácidos grasos endógenos durante la conidiación de *Aspergillus nidulans* inducida por privación de nutrimentos. Para este fin, se utilizó una colección de mutantes aisladas por su incapacidad para utilizar el acetato como única fuente de carbono (Armitt *et al.*, 1976). El acetato es utilizado en forma de Ac-CoA, compuesto que a su vez es el producto de la degradación de las reservas de carbono endógenas como los lípidos y precursor de los ácidos grasos entre cuyos derivados se encuentran los factores capaces de inducir la conidiación (factores Psi; Champe *et al.*, 1987). Se exploró la posibilidad de que exista una relación entre la conidiación y el metabolismo del acetato utilizando cepas que poseen mutaciones denominadas en conjunto *acu* (de *Acetate Non-Utilizing*). En algunas de las mutantes se ha determinado la lesión a nivel bioquímico, las cuales han sido asociadas con enzimas que participan en el ciclo del glioxalato o a genes reguladores de esta ruta.

Las cepas "*acu*" se crecieron en un medio mínimo líquido por 18 horas, al término de las cuales se transfirieron a un medio líquido carente de glucosa y se colectaron las muestras 24 horas después, tiempo en el cual la cepa silvestre produce una alta cantidad de esporas (Skromne *et al.*, 1994). Después de 24 horas de crecer en un medio carente de glucosa, fue posible distinguir tres grupos dentro de las mutantes "*acu*" con base en la cantidad de esporas que habían formado, en comparación con la cepa silvestre (en este estudio TJA22):

Cepa	Esporas/mt (x 10 <sup>4</sup> )	mRNA de <i>hrlA</i>
TJA22 (wt)	80	√√√
A409 ( <i>facB</i> )	540	no determinado
A649 ( <i>acuD</i> )	4355	√√√√
A650 ( <i>acuE</i> )	1992	√√√√
A651 ( <i>acuF</i> )	222.5	√√√√
A652 ( <i>acuG</i> )	14	no determinado
A653 ( <i>acuH</i> )	1.5	√
A654 ( <i>acuJ</i> )	0.6	no determinado
A655 ( <i>acuK</i> )	412.5	√
A656 ( <i>acuL</i> )	1190	no determinado

Tabla 4. Producción de esporas y expresión de *hrlA* en las cepas "*acu*", después de 24 horas de cultivo en un medio mínimo carente de glucosa. La expresión de *hrlA* se juzgó de una hibridación tipo Northern usando el fragmento BamIII-Sall del plásmido pBS25, que contiene secuencias específicas del gen *hrlA*.

- Las cepas A649 (*acuD*, isocitrato liasa), A650 (*acuE*, malato sintasa) y A656 (*acuL*, no caracterizado) produjeron cuando menos 15 veces más esporas que la cepa silvestre.

- Las cepas A409 (*facB*), A651 (*acuF*, PEP carboxicinasa), A652 (*acuG*, fructosa 1,6-difosfatasa) y A655 (*acuK*, enzima málica) produjeron una cantidad de esporas similar a la producida por la cepa silvestre.
- Las cepas A653 (*acull*, no caracterizado) y A654 (*acul*, carnitin-acyl transferasa) produjeron una cantidad de esporas al menos 50 veces menor que la cepa silvestre.

En el proceso de la conidiación en *Aspergillus nidulans* el gen *brlA* resulta indispensable (Timberlake & Marshall, 1988); por lo que se realizó un análisis de tipo Northern Blot con el cual fue posible verificar que algunos de los cambios detectados en cuanto al número de esporas correlacionaron con la expresión de este gen. Estos resultados se resumen en la tabla 4.

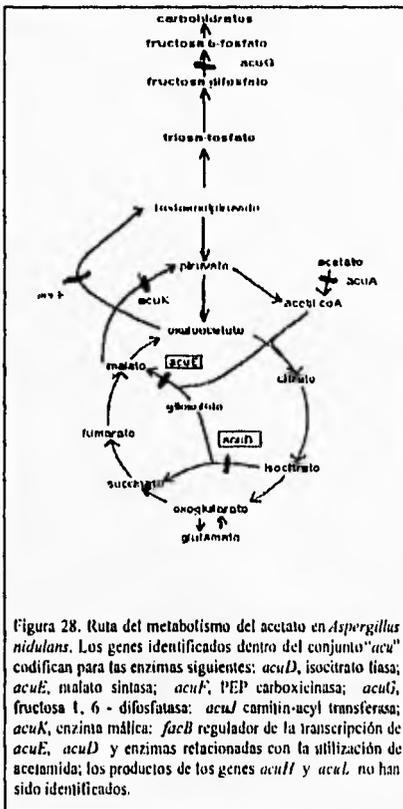


Figura 28. Ruta del metabolismo del acetato en *Aspergillus nidulans*. Los genes identificados dentro del conjunto "acu" codifican para las enzimas siguientes: *acuD*, isocitrato liasa; *acuE*, malato sintasa; *acuF*, PEP carboxicinasa; *acuG*, fructosa 1, 6 - difosfatasa; *acuI* carnitin-acyl transferasa; *acuK*, enzima málica; *facB* regulador de la transcripción de *acuE*, *acuD* y enzimas relacionadas con la utilización de acetamida; los productos de los genes *acull* y *acul* no han sido identificados.

Como ya se mencionó, las cepas "acu" fueron aisladas por su incapacidad de crecer en un medio sólido con acetato como única fuente de carbono. Al crecer en un medio mínimo con glucosa como fuente de carbono el fenotipo de estas mutantes es indistinguible del de una cepa silvestre.

En ausencia de glucosa, la movilización de las reservas endógenas como los lípidos es de suma importancia para sostener el proceso de crecimiento y/o esporulación. La β-oxidación se lleva a cabo en peroxisomas, por lo que es necesario que los ácidos grasos atraviesen las membranas internas. La enzima carnitin-acyl transferasa cataliza la reacción en la cual la carnitina se une al acyl-CoA, permitiéndole así atravesar la membrana con la ayuda de una translocasa (Favell y Fincham, 1968). La deficiencia de dicha enzima puede implicar la imposibilidad de que se lleve a cabo la degradación de los lípidos, debido a que estos no pueden atravesar las

membranas internas. El bajo índice de esporulación que se observó para la cepa A654 (*acuJ211*) se puede explicar como el resultado de una incapacidad permanente para movilizar las reservas lipídicas endógenas. La función del gen *acuH* se desconoce, pero por la similitud de los resultados en condiciones de privación de glucosa podría codificar para la acyl-carnitín transferasa II.

En el caso de las mutaciones en las enzimas isocitrato liasa (*acuD254*), malato sintasa (*acuE201*) y PEP carboxilasa (*acuF205*), el incremento que se observa en la cantidad de esporas producidas por la privación de glucosa puede explicarse si se propone que la interrupción del ciclo del glioxalato (fig. 28) llevaría a una acumulación de AcCoA. La acumulación de AcCoA puede canalizarse a la producción de factores derivados de ácidos grasos, probablemente los factores Psi, los cuales se ha encontrado que inducen la conidiación de manera prematura (Champe *et al.*, 1987). Estos derivados de ácidos grasos, podrían funcionar como una señal que directa, o indirectamente incrementa la expresión del gen *hrlA*. Alternativamente, la inducción rápida y transitoria que se ha observado para los genes *acuD* y *acuE*, ante la privación de glucosa, puede deberse a que en estas condiciones se genera un estado hiperoxidante requiriéndose de la gluconeogénesis para alimentar al ciclo de las pentosas, una de las principales fuentes de poder reductor de la célula, y generar así NADPH. En las cepas que no pueden llevar a cabo la gluconeogénesis la tensión oxidativa es mayor dado que el ciclo de las pentosas no puede generar tanto poder reductor como en una cepa silvestre. Es difícil en este momento, explicar la diferencia que se observó entre estas cepas y la cepa con mutación en *acuG*, la cual tampoco podría llevar a cabo la gluconeogénesis. El producto del gene *acuK* no es esencial para este proceso por lo que, en condiciones de privación de glucosa, la cepa A655 (*acuK*) se comporta de manera similar a la cepa silvestre.

Ya que el gen *facB* actúa como un activador de la transcripción de *acuD* y *acuE*, inducida por acetato, parecería probable que una mutación en *facB* tuviera efectos similares a las mutaciones en *acuD* y *acuE*, lo cual no se observó en los experimentos realizados. Sin embargo, estos genes pueden ser regulados también por otros factores por lo que la ausencia de un *facB* funcional no forzosamente implica la pérdida de función de la isocitrato liasa (*acuD*) o la malato sintasa (*acuE*). Se ha demostrado que la transcripción de *acuD* es reprimida por *creA*, el regulador de la represión catabólica por carbono en *Aspergillus nidulans* (Bowyer *et al.*, 1994) y que la enzima puede ser inactivada, de manera irreversible e independiente de *creA*, por un mecanismo desconocido mediado por la glucosa (De Lucas *et al.*, 1994). Parece probable que otras enzimas,

codificadas por genes "acu" se regulen de manera similar, en particular la malato sintasa codificada por el gen *acuE*.

Los resultados derivados de la inducción de los genes que codifican para la isocitrato liasa (cuyo cDNA se clonó como CAN8) y la malato sintasa (CAN3) ante la privación de glucosa, así como el hecho de que su mutación conduce a una esporulación mayor en cultivos líquidos privados de glucosa, pone de relieve la importancia que las reservas endógenas de lípidos y triglicéridos así como la gluconeogénesis, pueden tener en el proceso de diferenciación celular en *A. nidulans*. En *Streptomyces* se ha demostrado que en a la fase estacionaria de crecimiento se acumulan triacilglicérols, acumulación que es acentuada cuando el organismo crece en un medio con bajas concentraciones, o carencia total, de fuente de nitrógeno. Esto podría deberse a que cuando no hay nitrógeno, existe un exceso de carbohidratos que se convierten en triacilglicérol. Conforme se acaba la fuente de carbono en el medio, disminuye la concentración de triacilglicérols y estos no se sintetizan si el organismo crece en medio carente de carbono. Se ha sugerido que esta reserva de triacilglicéridos puede tener como función la de proveer el carbono necesario para la síntesis de los derivados acetilos como los pigmentos, los cuales se producen durante la esporulación y cuya síntesis coincide con la disminución en la concentración de triacilglicérol encontrada (Olukoshi y Prackter, 1994).

Dado que tanto la privación de la fuente de carbono como la del nitrógeno originan un cambio en los flujos catabólicos, en particular en el ciclo del ácido tricarbóxico (Weete, 1981), parece posible que ambos tipos de privaciones lleven a la acumulación de algún metabolito mensajero. Este podría ser un derivado de la degradación de ácidos grasos o algún derivado acetilo que funcionara dentro de cascadas de fosforilación.

En *Escherichia coli* el acetil fosfato, un derivado del AcCoA, funciona dentro de un sistema de dos componentes ("two component system"). En estos, por medio de cascadas de fosforilación en los que funciona como donador de fosfatos hacia cinasas, regula la expresión de cuando menos 3 operones (Wanner *et al.*, 1992; McCleary *et al.*, 1993; Präß *et al.*, 1994 y Nyström *et al.*, 1994). Se ha sugerido que el acetil fosfato pudiera tener el papel de una señal metabólica que indicara la existencia de un desbalance entre el flujo del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la glucólisis (McCleary *et al.*, 1993).

Aunque en eucariotes no se ha probado un papel equivalente para el acetil fosfato, se ha propuesto la existencia de un metabolito mensajero equivalente en *Saccharomyces cerevisiae* (De Virgilio *et al.*, 1992). En plantas vasculares se ha encontrado que la isocitrato liasa y la malato sintasa, se inducen durante la senescencia y la germinación de manera independiente a la regulación por glucosa. Se ha sugerido que existe una regulación transcripcional por metabolitos relacionados con el catabolismo de carbohidratos (Sarah *et al.*, 1996).

En *A. nidulans* se encontró que al transferir micelio a medios carentes de carbono, nitrógeno, fosfato o azufre, se presenta una inducción rápida y conspicua de la fosfatasa alcalina. Esta inducción parece ser independiente de los reguladores principales de la represión catabólica por estos nutrimentos. Los autores ofrecieron la interpretación de que estos cuatro tipos de privación llevaran a la acumulación de un metabolito que indujera a la fosfatasa alcalina (Caddick, *et al.* 1986). Es posible que este metabolito esté relacionado con derivados de la degradación de las reservas lipídicas endógenas y sería interesante analizar si la privación de fosfato o azufre inducen la conidiación.

## CONCLUSIONES

Como objetivo del presente trabajo se planteó conocer el patrón de acumulación del mRNA, en respuesta a la privación de nutrimentos, de una serie de clonas de cDNA que tienen en común el inducirse durante la conidiación aérea de *Aspergillus nidulans* y ser independientes del gen regulador *brlA*. De acuerdo con el patrón de regulación que se observara, se podrían proponer candidatos para mediar la expresión de *brlA* en respuesta a la privación de nutrimentos.

Con base en el patrón de acumulación observado, las clonas CAN se dividieron en 5 grupos:

- Clonas correspondientes a transcritos que no se acumulan en las condiciones estudiadas (CAN5 y CAN98)
- Clonas correspondientes a transcritos que se regulan por la privación de carbono o nitrógeno, con un patrón de acumulación diferente para estas condiciones en comparación con el patrón de acumulación en medio con nutrimentos (CAN46, CAN71, CAN77 y CAN16).
- Clonas correspondientes a genes que tienen regulación por la privación de carbono y nitrógeno (CAN15).
- Clonas correspondientes a transcritos que se regulan por la privación de carbono (CAN63, CAN67 y CAN3).
- Clonas correspondientes a genes que se transcriben en todas las condiciones y tiempos estudiados. A este grupo corresponden CAN87 y CAN44.

Los genes cuyos transcritos se clonaron como CAN5, CAN98 y CAN15 resultaron irrelevantes para los objetivos del presente estudio. A su vez, el gen correspondiente a CAN87, cuyo transcrito se acumuló en todas las condiciones estudiadas, incluyendo las 0 horas, puede no ser un gen específico de la conidiación. A pesar de que M. Stringer (comunicación personal) comprobó que los transcritos representados en las clonas CAN, incluyendo CAN87, no se acumularan en las hifas vegetativas. Esta contradicción podría deberse a que, al igual que para aislar a las clonas CAN, se utilizó un medio de cultivo suplementado con extracto de levadura, a diferencia del presente trabajo donde los medios de cultivo eran medios mínimos. El transcrito correspondiente a CAN44 se encontró en todas las condiciones estudiadas, aunque el grado de

acumulación varió considerablemente entre éstas. Dados los patrones de expresión observados para CAN87 y CAN44, habría que reevaluar si realmente los genes correspondientes son específicos de la conidiación

El gen correspondiente a CAN67, que se acumuló de manera específica cuando hubo privación de glucosa, parece improbable que pudiese contribuir a la expresión de *brlA* puesto que se acumuló en un tiempo posterior a ésta. El transcrito clonado como CAN63 se acumuló de manera transitoria y específica a las 5 horas de privación de carbono, ya sea que ésta haya estado o no acompañada de la privación de nitrógeno. Se cree que la ruta que lleva hacia la activación de *brlA* en respuesta a la privación de carbono es diferente de la ruta que se activa cuando se priva de nitrógeno; y que en condiciones de privación de nitrógeno, el transcrito de *brlA* está presente a las 10 h. Cabe la posibilidad de que el gen correspondiente a CAN63 se encuentre en la ruta de activación de *brlA* en respuesta a la privación de glucosa. Para analizar más allá esta posibilidad, es necesario caracterizar con más detalle este gen cuya secuencia parcial no tiene similitud con ninguna otra conocida.

Las clonas CAN46, CAN71 y CAN77 presentaron patrones similares entre sí. La acumulación de los mensajes correspondientes se observó después de una hora de transferir el micelio a medio con nutrientes. Al transferir el micelio a un medio carente de glucosa, la cantidad de mRNA presente disminuyó apreciablemente y cuando se expuso el micelio a la privación de nitrato (acompañada o no de la de glucosa) la acumulación se hizo evidente hasta las cinco horas de cultivo. Estas clonas podrían ser tomadas como punto de partida para entender la respuesta a la privación de nutrientes dado que parecen ser reguladas por más de un factor.

Resulta particularmente interesante que, habiéndose encontrado clonas CAN cuya expresión es específica de la privación de carbono, no se hayan encontrado clonas que se expresen en respuesta a la privación exclusiva de nitrógeno. Cabe hacer notar que, en mutantes que no responden a la privación de nitrógeno (mutantes "fluffy"), los genes correspondientes se expresan de manera constitutiva y las mutaciones afectan tanto la morfología de las hifas como la conidiación. La perspectiva de analizar la relación entre estas mutantes y los genes correspondientes a algunas clonas CAN resulta atractiva, ya que podría ayudar a entender la relación entre el metabolismo celular y la conidiación. Es posible que los genes correspondientes a las clonas CAN46, CAN71 o CAN77 puedan constituir blancos de los genes "*fln*".

El gen representado por la clona CAN16 resulta un candidato para regular la expresión de *hrlA*. La acumulación del transcrito correspondiente es específica de las condiciones donde hay conidiación (privación de nutrimentos) y antecede en tiempo a la expresión de *hrlA*. La caracterización de este gen representa una perspectiva del presente trabajo. Dado que su secuencia parcial no comparte similitudes con ninguna otra conocida, la secuenciación completa de este gen, cuyo transcrito consiste aproximadamente en 1400 nucleótidos, puede arrojar datos sobre su identidad, mientras que el fenotipo de una cepa que carezca de una copia funcional podría indicar su función.

Deriva del presente trabajo la perspectiva de estudiar el papel del AcCoA u otros derivados acetilados durante el ciclo de vida de *A. nidulans*. Esta posibilidad se podría estudiar comenzando con el fraccionamiento celular del organismo para analizar las concentraciones de AcCoA en los diferentes compartimentos celulares y realizando una comparación de éstas entre las cepas "*acu*" y la silvestre. También sería interesante analizar los patrones de expresión de los genes como el representado por CAN63, en cepas "*acu*" que no conidian en respuesta a la privación de glucosa.

## APÉNDICE I

El control de cuanto RNA se cargó en cada carril para las hibridaciones mostradas en esta tesis se realizó a partir de la tinción de los geles correspondientes con bromuro de etidio, antes de la transferencia a membranas de nylon. A continuación se muestran las fotografías de estos geles y se indican las sondas con la que, la membrana respectiva, fue hibridada.



Usada con CAN44, CAN63 y CAN67.



Usada con CAN16.



Usada con CAN46.



Usada con CAN77 y CAN3.



Usada con CAN87.



Usada con CAN71 y CAN15.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T.H., Boylan, M.T. & Timberlake W.E. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. Cell 54: 353-362.
- Adams, T.H., Hide, W.A., Yager, L.N. & Lee, B.N. 1992. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell Biol. 12: 3827-3833.
- Aguirre, J. 1992. *Aspergillus nidulans* como sistema experimental y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. Ciencia 43: 445-450.
- Aguirre, J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. Mol. Microbiol. 8: 211-218.
- Aguirre, J., Adams, T.H. & Timberlake, W.E. 1990. Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. Exp. Mycol. 14: 290-293.
- Aramayo, R., Adams, T.H. & Timberlake, W.E. 1989. A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. Genetics 122: 65-71.
- Armitt, B.S., McCullough, W. & Roberts, C.F. 1976. Analysis of acetate non-utilizing (*acu*) mutants in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 92: 263-282.
- Armitt, S., Roberts, C.F. & Kornberg, H.L. 1970. The role of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans* FEBS Letters 7: 231-234.
- Armitt, S., Roberts, C.F. & Kornberg, H. L. 1971. Mutants of *Aspergillus nidulans* lacking malate synthase. FEBS Letters 12: 276-278.
- Aronson, B.D., Lindgren, K.M., Dunlap, J.C. & Loros, J.J. 1994. An efficient method for gene disruption in *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 242: 490-494.
- Arpaia, G., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Morelli, G. & Macino, G. 1995. Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 247: 157-163.
- Arst, H.M. & Bailey, C.R. 1977. The regulation of carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. En Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Ed. Smith, J. & Pateman, J. Academic Press. pp. 131-146.
- Axelrod, D.E. 1972. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 73: 181-4.
- Axelrod, D.E., Gealt, M. & Patushok, M. 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. Dev. Biol. 34: 9-15.
- Bell-Pedersen, D., Dunlap, J.C. & Loros, J.J. 1992. The *Neurospora* circadian clock-controlled gene, *cgg-2* is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required for formation of the conidial rodlet layer. Genes & Dev. 6: 2382-2394.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R. & Timberlake, W.E. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 7: 3113-3118.
- Bowyer, P., De Lucas, J.R. & Turner, G. 1994. Regulation of the expression of the isocitrate lyase gene (*acuD*) of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 242: 484-489.
- Caddick, M.X. 1994. Nitrogen metabolite repression. En *Aspergillus: 50 years on*. Ed. Martinelli S.D. & Kinghorn, J.R. Progress in industrial microbiology, Vol. 29. Edit. Elsevier. Holanda. pp. 323-354.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G. & Arst, H.N. 1986. Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. Genet. Res. 47: 93-102.

Champe, S.P., Kurtz, M.B., Yager, L.M., Butnick, N.J. & Axelrod, D.E. 1981. Spore formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other developmental processes. En: The fungal spore: Morphogenetic controls. Ed. Turian, G. y Hohl, H.R. Academic Press, N.Y., E.U.A. pp: 255-276.

Champe, S.P., Rao, P. & Chang, A. 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 133: 1383-1387.

Clutterbuck, A.J. & Timberlake W.E. 1992. Genetic regulation of the sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. En Development, the molecular genetic approach. Ed. Ruszo, V.E.A., Brody, S., Cove, D.J. & Ottolenghi, S. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Clutterbuck, A.J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. Genetics 63: 317-327.

Corrochano, L.M., Lauter, F., Ebbole, D.J. & Yanofsky, C. 1995. Light and developmental regulation of the gene con-10 of *Neurospora crassa*. Dev. Biol. 167: 190-200.

De Lucas, J.R., Valenciano, S., Laborda, F. & Turner, G. 1994. Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans*. Arch. Microbiol. 162: 409-413.

De Virgilio, C., Bückert, N., Barth, G., Neuhaus, J., Boller, T. & Wiemken, A. 1992. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 8: 1043-1051.

Favell, R.B. & Fincham, J.R.S. 1968. Acetate-nonutilizing mutants of *Neurospora crassa* II. Biochemical deficiencies & the roles of certain enzymes. J. Bac. 95: 1063-1068.

Gainey, L.D., Connerton, I.F., Lewis, E.H., Turner, G. & Ballance, D.J.. 1992. Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of *Aspergillus nidulans* (*acuD*) and *Neurospora crassa* (*acu-3*). Curr. Gen. 21: 43-47.

Gealt, D.A. & Axelrod, D.E., 1974. Coordinate regulation of enzymes inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. Dev. Biol. 41: 224-232.

Hansberg, W. & Aguirre, J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. J. Theor. Biol. 142: 201-221.

Jacob, F. & Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356.

Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. Adv. Genet. 19: 133-131.

Kaur, S., Mishra, P. & Prasad, R. 1988. Dimorphism-associated changes in intracellular pH of *Candida albicans*. Biochimica et Biophysica Acta 972: 277-282

Lauter, F. & Russo, V.E.A. 1991. Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. Nucleic Acids Res. 19(24): 6883-6886.

Lauter, F. & Yanofsky, C. 1993. Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. PNAS. 90: 8249-8253.

Lee, B.N. & Adams, T.H. 1994A. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. Genes Dev. 8: 641-651.

Lee, B.N. & Adams, T.H. 1994B. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. Mol. Microbiol. 14: 323-334.

Lee, B.N. & Adams, T.H. 1995. *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidial prore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. EMBO J. 14:

- Lipman, D.J. & W.R. Pearson. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-1441.
- Loros, J.J., Denome, S.A. & Dunlap, J. C. 1989. Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science*. 243: 385-388.
- Madi, L., Ebbole, D.J., White, B.T. & Yanofsky, C. 1994. Mutants of *Neurospora crassa* that alter gene expression and conidia development. *PNAS*. 91: 6226-6230.
- Marshall, M.A. & Timberlake, W.E. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11: 55-62.
- Martinelli, S.D. & Clutterbuck, A.J. 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69: 261-268.
- Martinelli, S.D. 1976. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 401-410.
- Martinelli, S.D. 1994. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. En *Aspergillus: 50 years on*. Ed. Martinelli S.D. & Kinghorn, J.R. Progress in industrial microbiology, Vol. 29. Edit. Elsevier. Holanda. pp. 33-58.
- McCleary, W.R., Stock, J.B. & Ninfa, A.J. 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bac* 175(10): 2793-2798.
- McCullough, W. & Roberts, C.F. 1974. The role of malic enzyme in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Letters* 41: 238-242.
- McNally, M.T. & Free, S.J. 1988. Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr. Genet.* 14: 545-551.
- Midgley, M. 1993. Carnitine acetyltransferase is absent from *acu1* mutants of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*. 108: 7-10.
- Miller, K.Y., Toennis, T.M., Adams, T.H. & Miller, B.L. 1991. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Genet.* 227: 285-292.
- Miller, K.Y., Wu J. & Miller, B.L. 1992. *stuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Gen. Devel.* 6: 1770-1782.
- Mirabito, P.M. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes define a dependent pathway regulating development during asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. Tesis de doctorado. Universidad de Georgia. Athens, Georgia, E.U.A.
- Mirabito, P.M., Adams, T.H. & Timberlake W.E. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell.* 57: 859-868.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E. & Aguirre, J. 1996. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* 29: 360-367.
- Nyström, T. 1994. The glucose-starvation stimulus of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. *Mol. Microbiol.* 12: 833-843.
- Olukoshi, E.R. & Prackter, N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140: 931-943.
- Orr, W.C. & Timberlake, W.E. 1982. Clustering of spore-specific genes in *Aspergillus nidulans*. *PNAS*. 79: 5976-5980.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS* 85: 2444-2448.

- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Henmons, L.M., MacDonald, K.D. & Bufton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*. 5: 141-249.
- Prackelt, U.M. & Meacock, P.A. 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* 223: 97-106.
- Prüb, B.M. & Solfe, A.J. 1994. Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12: 973-984.
- Robertz, A. & Ynnofsky, C. 1989. Genes expressed during conidiation in *Neurospora crassa*: characterization of con-8. *Nucleic Acids Res.* 17: 197-214.
- Roberts, A.N., Berlin, V.K., Hager, K.M. & Yanofsky, C. 1988. Molecular analysis of a *Neurospora crassa* gene expressed during conidiation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2411-8.
- Sachs M.S. & Yanofsky, C. 1991. Developmental expression of genes involved in conidiation and amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Dev. Biol.* 148: 117-128.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Niklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*. 74: 5473-5467.
- Sarah, C.J., Graham, I.A., Reynolds, S.J., Leaver & C.J., Smith, S.M. 1996. Distinct cis-acting elements direct the germination and sugar responses of the cucumber malate synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* 250: 153-161.
- Schoenfeld, T., Mendez, J., Storts, D.R., Portman, E., Patterson, B., Frederiksen, J. & Smith, C. 1995. Effects of bacterial strains carrying the *endA1* genotype on DNA quality isolated with wizard (TM) plasmid purification systems. *Promega Notes Magazine*. 53: 12-18.
- Skromne, I., Sánchez O. & Aguirre J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans bra1A* regulatory gene. *Microbiology*. 141: 21-28.
- Soll, D.R., Morrow, B. & Srikantha, T. 1993. High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *TIG* 9: 61-65.
- Springer, M.L. & Ynnofsky, C. 1992. Expression of con genes along the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Genes & Dev.* 6: 1052-1057.
- Springer, M.L., Hager, K.M., Garrett-Engle, C. & Yanofsky, C. 1992. Timing of synthesis and cellular localization of two conidiation-specific proteins of *Neurospora crassa*. *Dev. Biol.* 152: 255-262.
- Srikantha, T. & Soll, D.R. 1993. A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* 131: 53-60.
- Srikantha, T., Chandrasekhar, A. & Soll, D.R. 1995b. Functional analysis of the promoter of the phase-specific WH11 gene of *Candida albicans*. *Mol. And Cell. Biol.* 15: 1797-1805.
- Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. & Soll, D.R. 1995. The frequency of integrative transformation at phase-specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol. Gen. Genet.* 246: 342-352.
- Stone, R.L., Matarese, V., Magee, B.B., Magee, P.T. & Bemblor, D.A. 1990. Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene* 96: 171-176.
- Stringer, M.A. & Timberlake W.E. 1995. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* 16: 33-44.
- Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C. & Timberlake, W.E. 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by direct gene inactivation. *Genes Dev.* 5: 1161-1171.

Timberlake W. E. & Clutterbuck A.J. 1994. Genetic regulation of Conidiation. En *Aspergillus: 50 years on*. Ed. Martinelli S.D. & Kinghorn, J.R. Progress in industrial microbiology, Vol. 29. Edit. Elsevier. Holanda. pp. 383-426.

Timberlake, W.E. & Marshall M.A. 1988. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. Trends in Genetics 4 ( 6 ): 162-169.

Timberlake W.E. 1991. Temporal and spatial controls of *Aspergillus nidulans*. Curr. Opin. Genet. Devel. 1: 351-357.

Timberlake, W.E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. Dev. Biol. 78: 497-510.

Varela, J.C.S., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Planta, R.J. & Mager, W.H. 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. Mol. Cell. Biol. 15(11): 6232-6245.

Varela, J.C.S., van Beekvelt, C., Planta, R.J. & Mager, W.H. 1992. Osmostress-induced changes in yeast gene expression. Mol. Microbiol. 6: 2183-2190.

Wang, Z., Deak, M. & Free, S.J. 1994. A cis-acting region required for the regulated expression of *grg-1*, a *Neurospora* glucose-repressible gene. J. Mol. Biol. 237: 65-74.

Wanner, B.L. & Wilmes-Riesenberg, M.R. 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. J. Bac. 174: 2124-2130.

Weete, J.D. 1981. Lipids in fungal growth and reproduction. En The Fungal Spore. Ed. Turian, D. & Hofe, H.R. Londres, Inglaterra.

Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J.W. & Adams, T.H. 1994. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 27: 62-69.

Yager, L.N. 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. En *Aspergillus, biology and industrial applications*. Ed. Bennet, J.W. y Klich, M.A. Butterworth-Heinemann Publications. Londres, Inglaterra. pp: 19-42.