



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**ENEP-IZTACALA**

**CARACTERIZACION DE ESPECIES DE ARN DE BAJO  
PESO MOLECULAR EN LA LEVADURA**

*Saccharomyces cerevisiae.*

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A

**MAGDALENA IVONNE MARQUEZ GARCIA**

---

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la dirección del Dr. Samuel Zinker Ruzal.*

*"Nosotros somos los descendientes de esos hombres. Es de ellos sin duda que hemos heredado la existencia de la explicación, la angustia que nos impulsa a buscar el sentido de la existencia. Angustia creadora de todos los mitos, de todas las religiones, de todas las filosofías y de la ciencia misma. No dudo por mi parte que esta imperiosa necesidad sea innata, que esté inscrita en alguna parte del lenguaje del código genético y que se desarrolle espontáneamente"*

*Jacques Monod.*

A MIS PADRES

*... Mírame y por tu amor no llores si esclavo de mi edad  
y mis doctrinas tu martir corazón llene de espinas, piensa que nacen  
entre espinas flores...*

*José Martí*

A MIS HERMANOS por el gran apoyo que me han dado siempre:

*Gina, Aida, Alma, Marco, Liz, Mauricio y Octavio.*

*A LUIS con todo mi amor*

*A MIS AMIGOS por la amistad y el impulso para seguir adelante:  
Pillú, Adriana, Cristina, Mary Tere, Lorena y Miriam, Gerardo, David,  
Pilar y Neto, Normita, Jaime, Blanca, Rosa María, Paco y Toño, Sigi,  
Silvia y Roberto.*

*Agradezco al Dr. Samuel Zinker por su paciencia en la dirección de mi trabajo de tesis y por la formación tanto académica como personal.*

*Agradezco también a Javier Flores por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo y por su amistad y cariño.*

# I N D I C E

	Pág.
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	1
<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1. Generalidades de Ribosomas .....	2
1.1.1. ARN Ribosomal .....	4
1.1.2. Proteínas ribosomales .....	6
1.2 Fosfoproteínas ribosomales .....	8
<b>2. OBJETIVO</b> .....	14
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b>	
3.1 Cepa .....	15
3.2 Medios de cultivo .....	15
3.3 Crecimiento de las células .....	15
3.4 Extracción de ARN total .....	16
3.5 Extracción de ARN de bajo peso molecular .....	16
3.6 Electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 2.75% y 10% .....	17
3.7 Extracción de proteínas ribosomales ácidas y proteína ribosomal total a partir de los ribosomas citoplásmicos de <u>S. cerevisiae</u> .....	19
3.8 Análisis de las proteínas ribosomales mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS .....	21
3.9 Obtención de las fracciones poli (A) + por medio de columnas de oligo-dT celulosa a partir del ARN total y ARN extraído a 60°C .....	23
3.10 Cuantificación de la radioactividad incorporada a macromoléculas .....	24
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 Tiempo de duplicación de la cepa A364A de <u>S. cerevisiae</u> .....	26
4.2 Síntesis de macromoléculas .....	28
4.3 Cuantificación del ARN extraído a 25, 45 y 60 grados centígrados .....	30
4.4 Electroforesis en geles de acrilamida .....	33
4.5 Traducciones <u>in vitro</u> de ARN extraído a diferentes temperaturas y electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS.....	39
4.6 Columnas de oligo-dT celulosa .....	41

5. <i>DISCUSION</i> .....	48
6. <i>CONCLUSIONES</i> .....	51
7. <i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	52

## LISTA DE TABLAS

		Pág
TABLA 1	<i>Características de los ribosomas procariontes y eucariontes .....</i>	3
TABLA 2	<i>Efecto de la temperatura sobre la extracción de ARN ...</i>	31
TABLA 3	<i>Efecto de la temperatura sobre la extracción de ARN ...</i>	32
TABLA 4	<i>Incorporación de adenina - <sup>14</sup>C a especies de ARN de bajo peso molecular extraídas a diferentes temperaturas..</i>	37
TABLA 5	<i>Incorporación de metionina - <sup>35</sup>S durante la traducción <u>in vitro</u>.....</i>	47

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Fig. 1	Curva de crecimiento de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	27
Fig. 2	Cinética de incorporación de aminoácidos - <sup>3</sup> H a macromoléculas .....	29
Fig. 3	Patrón de separación de las especies de ARN total .....	35
Fig. 4	Patrón de separación de las especies de bajo peso molecular .....	36
Fig. 5	Electroforesis en geles de poliacrilamida de los ARN extraídos a diferentes temperaturas .....	38
Fig. 6	Electroforesis en gel de pliacrilamida-SDS del producto de traducción <i>in vitro</i> del ARN extraído a 60°C .....	43
Fig. 7	Curva de incorporación de metionona - <sup>35</sup> S durante la traducción <i>in vitro</i> .....	44
Fig. 8	Perfil de elución del ARN extraído a 60°C .....	45
Fig. 9	Perfil de elución del ARN de <i>S. cerevisiae</i> marcado radioactivamente .....	46

## R E S U M E N

Los ribosomas eucariontes a diferencia de los procariontes tienen fosforiladas algunas de sus proteínas. De las 5 fosfoproteínas ribosomales descritas en levadura Saccharomyces cerevisiae son de gran interés el grupo de las ácidas L44, L44' y L45 cuya importancia dentro de la célula involucra el proceso de traducción. Se piensa además que estas proteínas son el equivalente eucariontico de las proteínas ribosomales L7/L12 de las bacterias, lo que implica la conservación evolutiva de estas proteínas. En este trabajo se obtuvo una poza enriquecida de ARN mensajeros que codifican para las proteínas ribosomales ácidas a partir de la extracción de ARN con cloroformo-fenol(1:1) y una temperatura de 60°C.

## INTRODUCCION

### *1.1 Generalidades de Ribosomas.*

Los ribosomas constituyen el componente catalítico fundamental en la biosíntesis de proteínas y juegan, por tanto un papel central en el crecimiento y la fisiología celular. Su importancia funcional se refleja en el hecho de que los ribosomas han sido altamente conservados a lo largo de la evolución (1). Los ribosomas son organelos complejos cuya síntesis involucra una serie de interacciones nucleocitoplasmáticas. Desde el punto de vista químico son partículas de ribonucleoproteína formadas por la unión no covalente de partículas de ARN y proteínas; cada monosoma ribosomal está formado por dos subunidades de diferente tamaño.

La distancia evolutiva entre procariontes y eucariontes se ve reflejada en las diferencias estructurales de los ribosomas, que a pesar de ellas, catalizan esencialmente las mismas reacciones (2). Los ribosomas eucariontes son de mayor tamaño que los procariontes; su contenido protéico es mayor y presentan una molécula adicional de ARN (3) (ver tabla 1). La correlación entre estructura y función ribosomales, a nivel molecular, ha sido estudiada tanto en procariontes (4) como en eucariontes (5, 6) y pone de manifiesto el grado de conservación evolutiva que presenta la organización funcional del ribosoma. Las diferencias en cuanto a contenido protéico y ribonucleoprotéico, así como las variaciones estructurales sugieren una mayor complejidad funcional y regulatoria en eucariontes (3).

TABLA I

CARACTERISTICAS	PROCARIOTES	EUCARIOTES
MONOSOMA RIBOSOMAL		
Coefficiente de sedimentación	70 S	80 S
Peso molecular	$2.7 \times 10^6$ D	$3.6 \times 10^6$ D
Número de proteínas	50 - 60	70 - 80
SUBUNIDAD MAYOR		
Coefficiente de sedimentación	50 S	60 S
Peso molecular	$1.7 \times 10^6$ D	$2.6 \times 10^6$ D
Número de proteínas	$30 \pm 5$	$40 \pm 5$
ARN	23 S ( $1.1 \times 10^6$ D) 5 S ( $3.9 \times 10^4$ )	25 S ( $1.3 \times 10^6$ D) 5.8 S ( $5.1 \times 10^4$ D) 5.0 S ( $3.9 \times 10^4$ D)
SUBUNIDAD MENOR		
Coefficiente de sedimentación	30 S	40 S
Peso molecular	$1 \times 10^6$ D	$1.1 \times 10^6$ D
Número de proteínas	$20 \pm 5$	$30 \pm 5$
ARN	16 S ( $0.55 \times 10^6$ D)	18 S ( $7.0 \times 10^5$ D)

### 1.1.1. ARN RIBOSOMAL

La mayor parte del ARN celular (80 - 90%) forma parte de los ribosomas y se localiza en los ribosomas citoplasmáticos. En procariontes existen tres moléculas de ARN ribosomal (ARNr) (7). En la subunidad mayor (50 S) están presentes el ARNr 23 S y el 5 S, y en la subunidad menor (30 S) en ARNr 16 S. En eucariontes hay una molécula adicional de rARN con coeficiente de sedimentación 5.8 S (3). En la subunidad mayor (60 S) se encuentran los ARNr 25-28 S, 5.8 S y 5.0S, y en la menor (40 S) el ARNr 18 S.

La biosíntesis del rARN involucra a polinucleótidos de una longitud mayor que los productos finales. El ARNr de las células eucariontes deriva del rompimiento (procesamiento) de un producto primario de transcripción denominado pre-ARNr (8,9). Este producto primario es sintetizado en el nucleolo por la ARN polimerasa Pol I. El pre-ARNr se metila, durante (10) o después (9) de la transcripción, y la metilación se limita a las regiones que van a dar lugar a los ARNr maduros (25 S y 18 S). Los fragmentos no metilados son degradados rápidamente (9). Como resultado del procesamiento y maduración del producto primario de transcripción se producen 3 ARN estables: los ARN 25-28 S y 5.8S de la subunidad mayor, y el ARN 18 S de la subunidad menor (11). El ARNr 5 S aunque forma parte de la subunidad ribosomal mayor (11), está codificado por genes distintos a los del pre-ARNr y es transcrito por la ARN Pol III (12). El ARN 5.8 S, deriva del ARN precursor 27 S, mientras que el ARN 5 S es sintetizado de novo (11). La síntesis del ARN ribosomal en la levadura se lleva a ca-

bo de acuerdo al siguiente esquema (11):

Levadura		
		- 5.8 S
35.0 S	27.0 S	25.0 S
	20.0 S	18.0 S

El proceso básico es idéntico al de células de mamífero. La única diferencia estriba en que los intermediarios son de mayor tamaño y el ARN de la subunidad 60 S tiene un coeficiente de sedimentación de 28 S.

Células de Mamífero		
	32 S	5.8 S
		28.0 S
45 S	41 S	
	20 S	18.0 S

La maduración del pre-ARNr requiere de la síntesis continua de proteínas (13). La síntesis y maduración del ARNr es esencialmente idéntico en los diferentes eucariontes incluyendo mamíferos, anfibios, plantas, protozoarios y levaduras (9).

Existen evidencias experimentales a favor de que entre los procariontes hay secuencias homólogas de la molécula de ARNr 16 S (14,15). Asimismo se ha encontrado que regiones de la secuencia primaria del ARNr 5 S

se han conservado durante la evolución (16, 17, 18). Recientemente se reportó que las proteínas L18 y L25 de E. coli se unen al ARNr 5.8 S de la levadura y no al ARN 5 S (19). Esto podría sugerir que es el ARN 5.8 S y no el ARN 5 S, en eucariontes, el equivalente al ARNr 5 S de procariontes.

### 1.1.2. PROTEINAS RIBOSOMALES

Las proteínas ribosomales se sintetizan en el citoplasma y son transportadas al nucleolo donde se ensamblan a la cadena nascente del pre-ARN (3). En el ribosoma, tanto las moléculas de ARN como las de las proteínas, se asocian adoptando una configuración tridimensional específica que requiere de la biosíntesis y ensamblaje sincronizados de todos los componentes (20). La gran mayoría de las proteínas que componen al ribosoma son sintetizadas de manera coordinada (21). La síntesis coordinada de las proteínas ribosomales se regula a nivel de la transcripción (22) y la síntesis de los ARNm para las proteínas ribosomales depende de la síntesis continua del pre-ARNr. Por otra parte, la síntesis del pre-ARNr depende, a su vez, de la síntesis total de las proteínas celulares, pero no de la síntesis de proteínas ribosomales específicamente (22).

El aislamiento, purificación y caracterización de las proteínas ribosomales es un prerrequisito para el análisis de la estructura y función del organelo (23). En 1966 Warner definió 3 clases de proteínas ribosomales: Clase 1, son proteínas que se ensamblan con el ARN en el núcleo y permanecen unidas a la molécula pudiéndose detectar en el citoplasma; Clase 2,

son proteínas de recambio, esto es, proteínas que recambian con otras homólogas presentes en el citosol, después de inhibir la síntesis de ribosomas de novo; Clase 3, son proteínas adventicias que son removidas del ribosoma después de su lavado con 0.5 M de KCl.

El análisis y purificación de las proteínas ribosomales en organismos eucariontes se ha logrado mediante la utilización de técnicas desarrolladas anteriormente para los ribosomas de procariontes. La mayor basicidad de las proteínas ribosomales eucarióticas ha dificultado la obtención de cantidades adecuadas a nivel preparativo, con algunas excepciones como son las de D. melanogaster, la levadura y el hígado de la rata (24, 25, 26). La identificación rutinaria de las proteínas presentes en los ribosomas, o en las subunidades ribosomales se ha llevado a cabo mediante la utilización de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (27) y electroforesis bidimensional mixta poliacrilamida - SDS (28). El número correspondiente a cada proteína se asigna de acuerdo a la posición que ocupan en los mapas electroforéticos y la nomenclatura asignada depende del organismo. Para los organismos eucarióticos se han propuesto nomenclaturas y numeraciones unificadas (29, 30).

Las proteínas ribosomales presentan ciertas características que se han conservado durante la evolución de los organismos procariontes y eucariontes (31). Debido a esto, la movilidad electroforética no muestra grandes diferencias y los mapas de distribución son semejantes (32).

Los exámenes inmunoquímicos han sido de gran utilidad para hacer

comparaciones entre las proteínas ribosomales de diferentes organismos, ya sea para establecer homologías entre organismos evolutivamente distantes (33, 34) o bien para reconocer diferencias estructurales en los ribosomas de especies cercanas (35, 36).

Algunas proteínas ribosomales pueden presentar modificaciones químicas posteriores a la síntesis de la cadena polipeptídica, que se llevan a cabo en el citoplasma celular (37). In vivo se ha descrito la metilación, la acetilación y la fosforilación (38). El significado funcional de estas modificaciones químicas es prácticamente desconocido. Mientras la metilación y la acetilación de las proteínas ribosomales toma lugar tanto en bacterias como en células eucariotas, la fosforilación es una modificación que se presenta sólo en los ribosomas eucariontes (38).

## 1.2 FOSFOPROTEINAS RIBOSOMALES

El significado biológico de la fosforilación en las proteínas ribosomales es todavía una cuestión abierta. Sin embargo, hay dos posibilidades: a) que esta modificación se requiera para el funcionamiento del ribosoma en la biosíntesis de las proteínas, o b) que juegue un papel en el ensamblaje del ribosoma (38).

Debido a que las fosfoproteínas ribosomales no están asociadas a las partículas pre-ribosomales, incluso en estadios tardíos del ensamblaje ribosomal, la fosforilación podría estar involucrada en el funcionamiento ribosomal más que en su ensamblaje (38). El descubrimiento de la

fosforilación en proteínas ribosomales fué hecho por Kabat (1970). Más tarde se encontró que las proteínas ribosomales podían ser fosforiladas in vitro tanto por protefnas cinasas endógenas (39, 40) como exógenas (41).

Los ribosomas eucariónticos, a diferencia de los procarionticos, tienen la capacidad de fosforilar proteínas ribosomales in vivo. La fosforilación de las proteínas ribosomales de eucariontes in vivo está condicionada por diferentes estímulos fisiológicos (42). Aunque se puede establecer una correlación entre estos estímulos y la fosforilación de proteínas ribosomales específicas, no se ha podido encontrar que la fosforilación in vitro afecte la actividad ribosomal.

El hecho de que sólo los ribosomas de eucariontes puedan estar fosforilados in vivo sugiere una relación entre fosforilación y complejidad celular. Probablemente la fosforilación responde a una necesidad de regulación más fina en la maquinaria de síntesis protéica. Se han detectado fosfoproteínas ribosomales en plantas y en eucariontes primitivos como Saccharomyces cerevisiae, Artemia salina, Physarum polycephalum y Tetrahymena pyriformis, así como en mamíferos tales como el humano, el conejo, la rata, el ratón, los hamsters y los bovinos (42).

Los estudios de la fosforilación in vivo de los ribosomas de células superiores, han puesto de manifiesto la incorporación de grupos fosfato, principalmente a una de las proteínas de la subunidad menor denominada S6 de peso molecular 36000 D (43). Además de S6 se han detectado, en la

subunidad mayor, proteínas de carácter muy ácido. La fosforilación de estas últimas se ha comprobado in vivo en el hígado de la rata (44) en células de tumor ascítico (45), en Artemia salina (46) y en S. cerevisiae (23).

En la levadura S. cerevisiae se han descrito 5 fosfoproteínas ribosomales (23). La localización de éstas es: 2 en la subunidad ribosomal menor (40 S) denominadas S6 y S27; en la subunidad mayor (60 S) denominadas P1 y el grupo de las ácidas (L44, L44' y L45); y P4 que es una fosfoproteína ribosomal que sólo se detecta en los polisomas. Si bien no se ha podido establecer con claridad el papel que juega la fosforilación en el funcionamiento de estas proteínas, se sabe que en la levadura sólo las especies fosforiladas se encuentran unidas al ribosoma y que los equivalentes no fosforilados de la subunidad 60 S tienen una poza citoplasmática (47).

Existen proteínas que durante la electroforesis migran hacia el ánodo en las condiciones de primera dimensión (pH 8.6) del sistema de electroforesis bidimensional de Kaltschmidt y Wittmann (27). Por su carácter marcadamente ácido (pI 3-5), destacan entre éstas, unas proteínas que se encuentran en la subunidad mayor de organismos tanto procariontes como eucariontes. Por sus características tan peculiares y su posible conservación a lo largo de la evolución han logrado ser el centro de la atención de numerosos trabajos (3, 42). Cawthon y cols. (48) detectaron en geles monodimensionales una proteína de bajo peso molecular correspondiente a la subunidad mayor que presentaba niveles altos de fosforilación. Posteriormente se comprobó la fosforilación de proteínas ribosomales ácidas en el hígado de rata (44), en la levadura (23), en las células de tumor ascítico,

en Artemia salina (46, 50) y en reticulocitos de conejo (51).

En los ribosomas de E. coli existen 2 proteínas de carácter muy ácido, designadas como L7/L12, susceptibles a ser fosforiladas in vitro por cinasas de células eucarióticas (52) pero que no están fosforiladas in vivo. L7/L12 presentan características que las distinguen de las demás proteínas ribosomales como son a) su bajo peso molecular; b) carácter muy ácido; c) elevada hidrofobicidad; d) riqueza en alanina (53); e) alto contenido de alfa-hélice; f) formación de dímeros de gran estabilidad (54); y g) fácil separación y reconstitución del ribosoma (55).

A diferencia de la mayoría de las proteínas ribosomales presentes en cantidades estequiométricas, L7/L12 está presente en 4 copias por ribosoma, siendo L7 la contraparte acetilada, en el alfa amino terminal, de L12. Las 4 copias de L7/L12 se localizan en el tallo mayor de la subunidad ribosomal 50 S formando un complejo con la proteína L10 (56).

Se ha sugerido que en eucariontes, L44/L45, son las fosfoproteínas ribosomales ácidas análogas a L7/L12 (57). Esto se debe a la similitud en cuanto a la movilidad en geles bidimensionales de poliacrilamida, la semejanza en peso molecular, la localización en la subunidad mayor y por algunos datos de la secuencia primaria. La diferencia que existe en este equivalente eucariótico es la fosforilación (23, 46).

El estudio de las proteínas ácidas de los ribosomas eucarióticos ha permitido demostrar no sólo la existencia de proteínas similares a

L7/L12 si no su probable equivalencia estructural y funcional. La similitud de propiedades dentro de este grupo de proteínas solo puede responder a una rigurosa conservación evolutiva.

La utilización de anticuerpos específicos, obtenidos a partir de proteínas ribosomales de E. coli purificadas a homogeneidad, ha permitido llevar a cabo reacciones inmunológicas cruzadas con las proteínas homologas correspondientes de otros organismos (33, 58). Los resultados de estos experimentos mostraron una fuerte reacción cruzada contra proteínas ribosomales del genero Enterobacteriaceae pero una reacción cruzada significativamente menor contra proteínas ribosomales de otra clase de bacterias como Bacillaceae (33, 58). Al hacer pruebas similares contra las proteínas ribosomales de la levadura y del hígado de la rata se observó una reacción cruzada pobre con casi todas estas proteínas a excepción del antisuero contra las proteínas L7/L12 de E. coli (2). Esta unión sugiere que estas últimas proteínas han sido conservadas durante la evolución. Sin embargo, este tipo de experimentos deben tomarse con reserva, pues recientemente se demostró que las preparaciones de L7/L12, utilizadas para obtener los antisueros, estaban contaminadas con L15. Aparentemente esta última es la responsable de las reacciones inmunológicas cruzadas (59).

Asimismo se han encontrado homologías entre secuencias primarias de proteínas ribosomales ácidas de Halobacter cutirubrum y las proteínas L7/L12 de E. coli. Las proteínas ácidas de Halobacter son homólogas a las proteínas correspondientes de la levadura y de Artemia salina (7).

Se ha reportado que la proteína ribosomal L12 de E. coli es necesaria para el funcionamiento del factor de alargamiento G (EF-G) (47). Se demostró también que ésta misma proteína era necesaria para el funcionamiento del factor de alargamiento Tu (EF-TuTs) (61). Actualmente se acepta que la principal función de L12 dentro del ribosoma, es el reconocimiento de los factores solubles que participan en la catálisis de la síntesis de proteínas en todos los estadios de la misma dependientes de la hidrólisis del GTP, puesto que interacciona con los factores EF-G, EF-Tu, IF-2 y RF-2.

El estudio de las fosfoproteínas ribosomales de eucariotes ha mostrado que muy probablemente sean funcionalmente equivalentes a L7/L12 de E. coli. En la levadura y en Artemia salina se ha reportado que las proteínas ácidas participan en la hidrólisis del GTP, dependiente del factor de alargamiento 2 (EF-2) (62, 63, 64, 65), y se ha reportado una dependencia de proteínas ácidas para funciones dependientes de eEF-1 en Artemia salina y en los ribosomas de la levadura (63).

## OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar las especies de ARNs que se extraen de la levadura íntegra tratadas con cloroformo-fenol (1:1) a diferentes temperaturas.
- 2.- Si se extraen ARNs poli (A) + caracterizar los productos de traducción in vitro.

## MATERIAL Y METODOS

### 3.1. CEPA

Para la elaboración de este trabajo fué empleada la cepa de Saccharomyces cerevisiae A364A (gal 1, ade 1, 2, ura 1, his 7, lis 2, tir 1.).

### 3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- a) Sintético completo (SC). Concentraciones por litro: 10 g de ácido succínico, 6 g de hidróxido de sodio, 6.7 g de YNB (Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos), 20 g de glucosa, 20 mg de adenina, 20 mg de uracilo, 63 mg de lisina, 50 mg de histidina y 50 mg de tirosina.
- b). Medio completo (YM-1). Contenido por litro: 5g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de ácido succínico, 6 g de hidróxido de sodio, 6.7 g de YNB y 10 g de glucosa.

El YNB y la glucosa se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore HA de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro. El resto de los componentes, disueltos en agua bidestilada, se esterilizaron a 20 lb/in durante 20 minutos a 120°C.

### 3.3. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS

Para el desarrollo de los experimentos se empleó el medio SC o YM-1, según se indique, inoculado a una dilución 1:100 con un stock de la cepa

A364A en fase estacionaria. Los cultivos se incubaron a 23°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad de población de  $1-2 \times 10^7$  cel/ml (40-80 unidades klett U.K.) que se determinó por nefelometría utilizando un fotocolorímetro Klett Summerson (mod 800-3).

### 3.4. EXTRACCION DEL ARN TOTAL

La cepa A364A se desarrolló en 50 ml de medio SC en presencia de adenina  $^{14}C$  (0.2  $\mu$ c/ml). Las células se cosecharon por centrifugación a 2000 x g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces por resuspensión en agua bidestilada y centrifugación. El paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de LETS (LiCl 0.1M, EDTA 0.001M, Tris 0.01M de pH 7.4) agregándose perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro). Las células se rompieron mecánicamente utilizando un agitador vortex (4°C). El rompimiento celular se verificó al microscopio. Una vez rotas las células se añadió 1 ml de LETS y 1.5 ml de cloroformo-fenol-isoamílico (48:48:2); se agitó a temperatura ambiente 10 minutos y se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos. La fase acuosa, donde se encuentra solubilizado el ARN, se transfirió a un tubo que contenía 2 ml de la mezcla de cloroformo-fenol-isoamílico. A la fase orgánica se le agregó 1 ml de LETS; ambos tubos se agitaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 minutos. Se mezclaron las fases acuosas resultantes y se les agregó 2 volúmenes de etanol (95%, -20°C) y 0.1 vol de LiCl 5M. Las muestras se dejaron reposar a -20°C hasta que precipitó el ARN.

### 3.5. EXTRACCION DEL ARN DE BAJO PESO MOLECULAR

La cepa A364A se desarrolló en 150 ml de SC con 1  $\mu$ c/ml de adenina

<sup>14</sup>C. Las células se centrifugaron a 2000 x g durante 5 minutos, el paquete celular se lavó dos veces con agua bidestilada, se resuspendió en 9 ml de LETS y se dividió en tres partes iguales de 3 ml. A cada parte se le añadió el mismo volumen de cloroformo-fenol (1:1) saturado con LETS. Las mezclas se agitaron hasta formar una emulsión y se incubaron en baño maría durante 10 minutos a 25, 45 y 60°C respectivamente, sin dejar de agitar para evitar el rompimiento de la emulsión. Posteriormente se sacaron del baño y se mantuvieron a temperatura ambiente 10 minutos con agitación ocasional. Se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente para acelerar la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se colocó en un tubo que contenía 1 ml de cloroformo-fenol y a la fase orgánica se le añadió 1 ml de LETS. Se agitaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos. Ambas fases acuosas se juntaron en un tubo corex y se les añadió 0.1 vol de LiCl y 2 vol de etanol (95%, -20°C). El ARN se precipitó a -20°C durante 16-18 horas.

Después de precipitado, el ARN se centrifugó durante 10 minutos a 4000 x g a 4°C. El sobrenadante se decantó y después de evaporado el exceso de etanol, el ARN se resuspendió en 1 ml de LETS y se cuantificó la concentración por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (DU-7 Beckmann), o bien midiendo la radioactividad como material TCA precipitable.

### 3.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA SDS AL 2.75% y 10%

a) Preparación de los geles al 2.75% y condiciones de corrida. Se

colocaron en un matraz 5.5 ml de solución A (acrilamida 10%, bisacrilamida 0.5% en agua bidestilada), 1 ml de solución amortiguadora PD (Tris 0.9M, EDTA 0.027M, ácido bórico 0.9M, en agua bidestilada), 11.1 ml de agua bidestilada, 0.2 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol al 50%, 10  $\mu$ l de TEMED y 0.1 ml de persulfato de amonio al 10%. La solución se mezcló a 4°C y se desgasificó al vacío durante 1 minuto. Posteriormente se colocó en tubos de vidrio de 80 x 6 mm de diámetro. La superficie se aplanó estratificando SDS al 1% y se permitió que los geles polimerizaran a temperatura ambiente. Los geles se precorrieron durante 15 minutos a 1 mA por tubo en una solución amortiguadora de corrida (Tris 0.06 M, EDTA 0.002M, ácido bórico 0.06M y SDS al 10% en agua bidestilada). Las muestras se corrieron a 5 mA por tubo durante 120 minutos.

b) Preparación de los geles al 10% y condiciones de corrida. En un matraz se colocaron 6.6 ml de solución B (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8% en agua bidestilada), 1 ml de solución amortiguadora PD, 10.2 ml de agua bidestilada, 0.2 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol al 50%, 10  $\mu$ l de TEMED y 0.1 ml de persulfato de amonio al 10%. Esta solución se mezcló a 4°C se desgasificó al vacío durante 1 minuto y se transfirió a tubos de vidrio de 80 x 6 mm de diámetro. La superficie se aplanó estratificando SDS al 1% y después de polimerizados los geles se precorrieron a 2.5 mA por tubo durante 30 minutos en la solución amortiguadora de corrida descrita en el párrafo anterior. Posteriormente se colocó la muestra sobre la superficie del gel y se corrió a 5 mA por tubo durante 2:30 horas.

Una vez terminada la electroforesis los geles se sacaron de los tu-

bos, se congelaron en hielo seco y se fraccionaron transversalmente en secciones de 1 mm de grosor.

c) Preparación de las muestras de ARN. Se tomó una alícuota de ARN precipitado en etanol, se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se secó al vacío y se resuspendió en 100 µl de solución amortiguadora para muestras (azul de bromofenol al 0.01%, sacarosa al 5%, solución amortiguador PD al 20% y SDS al 0.1% en agua bidestilada). Se dejó reposar 10 minutos y se colocó sobre la superficie del gel.

### 3.7. EXTRACCION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS Y PROTEINA RIBOSOMAL TOTAL, A PARTIR DE LOS RIBOSOMAS CITOPLASMICOS DE Saccharomyces cerevisiae.

Para la preparación de la levadura se siguió el procedimiento descrito por Battaner y Vazquez (66) y para la extracción de proteínas ácidas se siguió el método de Hamel E. (60), modificado por Zinker S. (47).

Se inoculó la cepa A364A en medio YM-1 (dilución 1:200) y se creció a 23°C durante 18 hrs. El cultivo se cosechó por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos. A partir de este punto todas las operaciones se realizaron a 4°C. La pastilla se lavó con agua bidestilada y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 x g. El paquete celular se resuspendió en 10 ml de Tampón I (Tris-HCl 100 mM de pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, KCl 80 mM y β-mercaptoetanol 5mM). Se aforó a 20 ml y se transfirió a

botellas del homogeneizador tipo Braun conteniendo 35 g de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro). Las células se rompieron con 4 pulsos de 30 seg de agitación por 15 seg de reposo (la ruptura celular se verificó al microscopio). Las perlas de vidrio se lavaron con 30 ml de Tampon I, la solución se transfirió a tubos Corex y se centrifugó durante 10 min a 40000 x g, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 16000 x g durante 3 hr a 4°C en la ultracentrifuga IEC. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en Tampón II (Tris HCl de pH 7.4 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, acetato de amonio 500 mM y β-mercaptoetanol 5 mM). La solución se centrifugó a 40000 x g durante 10 min para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se centrifugó a 16000 x g durante 14 hr. a través de un gradiente discontinuo de sacarosa al 40% en Tampón II y 8 ml de sacarosa al 20% en Tampón II. La pastilla ribosomal obtenida se resuspendió en 1 ml de solución SP 0.5 (Tris-HCl 10 mM de pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NH<sub>4</sub>Cl 500 mM, β-mercaptoetanol 3 mM). Se midieron las densidades ópticas a 260 nm en un espectrofotómetro Beckmann (modelo DU-7) y se ajustaron a 100 D.O./ml con la solución SP 0.5. En este paso, cuando se requirió, se agregaron los productos de traducción in vitro y se agitó durante 20 minutos.

*Extracción de Proteínas Acidas.* A la mezcla anterior se le agregó ½ volumen de etanol al 95% y se agitó durante 10 min. Después se agregó otro ½ volumen de etanol y se agitó durante 5 minutos más. Se centrifugó a 40000 x g durante 10 minutos (la pastilla se dejó secar para la posterior extracción de la proteína ribosomal total). Al sobrenadante se le añadió 2.5 volúmenes de acetona a -20°C y se dejó reposar a esta

temperatura hasta la formación de grumos de proteína.

*Extracción de Proteína Ribosomal Total.* La pastilla de 40000 x g se resuspendió en 2 ml de amortiguador  $10^{-5}$  (NaCl 100 mM, 10 mM HEPES,  $1 \times 10^{-5}$  M  $MgCl_2$ ), se le añadió 4.2 ml de ácido acético glacial y 8  $\mu$ l de  $MgCl_2$  y se agitó 30 minutos a 4°C. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 40000 x g, el sobrenadante se dializó a 4°C contra 500 ml de ácido acético 0.5 N y posteriormente se liofilizó.

### 3.8. ANALISIS DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

#### 3.8.1. Electroforesis Unidimensional en Geles de Poliacrilamida-SDS.

a) Preparación de los geles y condiciones de corrida. La técnica de electroforesis unidimensional empleada fue la reportada por Maizel J. V. Jr. (69). Se utilizó un gel resolutivo al 12% de acrilamida y un gel concentrador al 4%.

El gel resolutivo se preparó mezclando 12 ml de solución de acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8% disueltas en agua bidestilada, 11.25 ml de tris-HCl 1 M de pH 8.8, 0.3 ml de SDS al 10%, 6.25 ml de agua bidestilada, 25  $\mu$ l de TEMED y 120  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%. Esta mezcla que se encontraba ya a 4°C se agitó y degasificó al vacío por 1 minuto y se depositó entre las placas de vidrio del aparato para electroforesis en placa. La superficie se aplanó estratificando SDS al 1%. Una vez polimerizado el gel resolutivo se retiró el SDS y se preparó el gel concentrador mezclando 1.33 ml de solución de acrilamida 30%-bisacri

lamida 0.8% disuelta en agua bidestilada, 1.25 ml de tris HCl 0.49 M de pH 6.8, 0.3 ml de SDS al 10%, 7.2 ml de agua bidestilada, 5  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%. Todo esto se mezcló y desgasificó al vacío y se depositó sobre el gel resolutivo. Se introdujo el peine formador de pocillos y se permitió la polimerización a temperatura ambiente. Una vez polimerizado el gel se retiró el peine y se llenaron las cámaras superior e inferior, con 500 ml cada una, con la solución amortiguadora de corrida (Glicina 0.19 M, Tris-base 0.024 M de pH 8.8 y SDS al 0.01% disuelto en agua bidestilada).

El gel se precorrió a 100 V durante 30 minutos. Se apagó la fuente de poder y se colocaron las muestras. Se inició la electroforesis de 50 V hasta que el frente del colorante llegó al gel resolutivo. En este momento se aumentó el voltaje a 100 V y se dejó hasta que el colorante llegó a 1 cm por arriba del fondo del gel.

b) Preparación de las muestras de proteína. Las muestras liofilizadas se disolvieron en urea 8M, se les determinó la radioactividad TCA precipitable incorporada y se tomó la cantidad necesaria que tuviera 50000 cpm que se mezcló con 100  $\mu$ l de la solución amortiguadora para muestra (1 ml de Tris-HCl 1 M de pH 6.8, 1 ml de SDS al 10%, 1 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%, glicerol al 10% y rojo de fenol al 0.1%). Las muestras se dejaron reposar 10 minutos y posteriormente se depositaron dentro de los pocillos del gel concentrador.

c) Tinción de las proteínas ribosomales. Una vez terminada la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.25% disuelto en metanol al 50%-ácido acético al 7% en agua, durante 1 hora con agitación constante. Los geles se destiñeron con metanol al 30%-ácido acético al 7% en agua.

d) Autorradiografía. Los geles de poliacrilamida ya destañados se secaron sobre un papel Whatman de 3 mm en un secador de geles (BIO-RAD mod 224). Una vez secos se pusieron en contacto con una placa de rayos X (Kodak) dentro de un reforzador de placas y se mantuvieron a  $-10^{\circ}\text{C}$  por diferentes intervalos de tiempo, de acuerdo a la cantidad de radioactividad presente en cada gel. Las placas de rayos-X se revelaron a temperatura ambiente sumergiéndolas por 3 minutos en la solución reveladora (Kodak), 5 minutos en agua corriente, 5 minutos en solución fijadora (Kodak). Al final del proceso se lavaron con agua corriente y se dejaron secar.

### 3.9. *Obtención de las Fracciones POLI (A) Por Medio de Columnas de Oligo-DT Celulosa a Partir del ARN Total y el ARN Extraído a $60^{\circ}\text{C}$ .*

La muestra de ARN se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  del amortiguador oligo-dT-0.5 M (0.1 ml de tris de pH 6, 0.5 M de NaCl). La muestra se colocó en baño maría a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos para eliminar la estructura secundaria del ARN, y se pasó a través de la columna 6 veces consecutivas para asegurar la adsorción. La elusión se llevó a cabo lavando 3 veces con 2 ml del amortiguador oligo-dT-0.5 M, y se colectaron 6 fracciones

de 1 ml cada una, posteriormente se lavó con 6 ml de amortiguador oligo-dT-0.25 M (0.1 ml de tris de pH 6, 0.25 M de NaCl) y se colectaron las siguientes 6 fracciones, finalmente se añadió 6 ml de amortiguador oligo-dT y se colectaron fracciones de 1 ml. A todas las muestras colectadas se les determinó las densidades ópticas a 260 nm, o las cpm como material TCA precipitable para las muestras radioactivas. A los tubos que contenían las fracciones poli A+ se les añadió por mililitro de muestra 0.1 ml de acetato de sodio 5 M, 2 ml de etanol al 95% y 6 µg de tARN como acarreador, y se dejó precipitar durante toda la noche a -70°C.

#### 1.10. *Cuantificación de la Radioactividad Incorporada a Macromoléculas.*

Se tomaron muestras alicuotas del cultivo celular en experimentación y se mezclaron con 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y 0.1 ml de albúmina de suero de bovino (1 mg/ml) y se incubaron 30 minutos a 4°C. El precipitado se filtró al vacío a través de membranas Millipore (HA, 0.45 µm), y tanto las membranas como los tubos se lavaron sucesivamente con 2 a 3 ml de TCA al 5% y etanol al 30%. Las membranas se secaron a 30°C durante 20 minutos y se introdujeron, cada una por separado, en un vial que contenía 7 ml de omnifluor-tolueno (omnifluor 4% en tolueno). La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Packard, mod. Minaxi-8).

Los geles en tubo que contenían ARN marcado radioactivamente se seccionaron de manera transversal en rebanadas de 1 mm y cada una se colocó en un vial que contenía 7 ml de protosol-omnifluor-tolueno (30 ml de protosol 0.5 M, 4 g de omnifluor aforados a 1 lit con tolueno). Los vía-

les se incubaron a 37°C durante 14 a 16 horas y después de este tiempo se cuantificó la radioactividad en el contador de centelleo líquido.

Las proteínas radioactivas se visualizaron por autorradiografía. Los geles que contenían proteínas radioactivas se deshidrataron en un secador de geles y se pusieron en contacto con una placa de rayos-X (Kodak). Los geles tipo Maizel que contenían proteínas radioactivas se sometieron a autorradiografía para verificar la incorporación de marca a las proteínas ribosomales.

## RESULTADOS

### 4.1. Tiempo de Duplicación de la Cepa A364A de *Saccharomyces cerevisiae*.

La duplicación de las estructuras y organelos celulares lleva al crecimiento y reproducción de los microorganismos. Si el crecimiento, en medio de cultivo líquido, se mide en un fotocolorímetro, se observa que la velocidad de crecimiento es variable con respecto al tiempo. Las fases típicas de crecimiento que presentan los microorganismos, se pueden dividir en: a) Fase lag o fase de adaptación; b) Fase exponencial, cuando la velocidad de duplicación de las células es de tipo geométrico c) Fase estacionaria temprana, en esta fase los nutrientes del medio se van agotando y los productos de desecho del metabolismo se van acumulando, de modo que el medio se va haciendo menos favorable para el crecimiento celular; d) Fase estacionaria tardía, cuando el número de células permanece constante en el cultivo.

Para poder calcular el tiempo de duplicación, la cepa A364A, se desarrolló en medio SC a 23 grados centígrados durante la noche y se tomaron lecturas a diferentes tiempos en un fotocolorímetro Klett Summerson. Durante el desarrollo del cultivo se presentaron las fases típicas del crecimiento como se muestra en la figura 1. Durante la fase lag, se tomaron tres lecturas a los tiempos 0, 3 y 4 horas, observándose el comportamiento de adaptación característico. La fase logarítmica tuvo una duración de 6 horas, con un rango de 20 a 100 unidades Klett (U.K.). La fase estacionaria temprana, presentó una variación de 100 a 125 U.K., con una duración de tres horas, y finalmente la fase estacio-

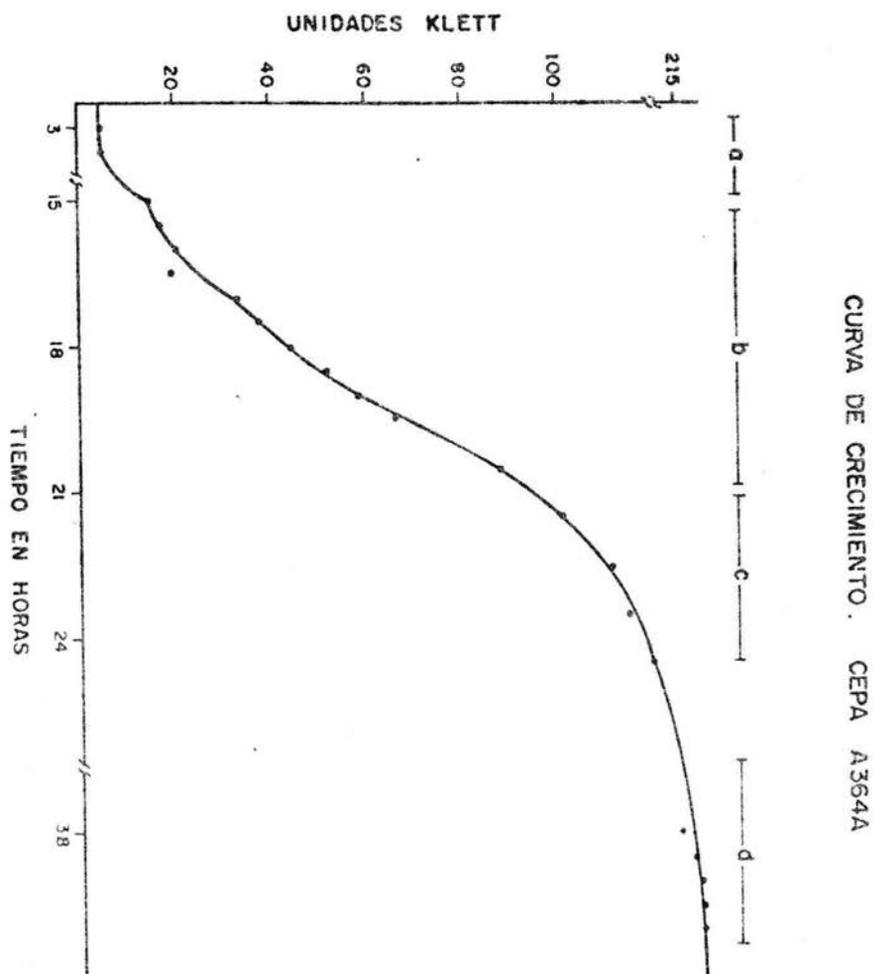


Fig. 1. Curva de crecimiento de la cepa A364A. La cepa se desarrolló en medio SC y el crecimiento se midió en Unidades Klett a diferentes intervalos de tiempo, mediante un fotocolorímetro Klett Summerson. a) fase lag; b) fase logarítmica; c) fase estacionaria temprana; d) fase estacionaria tardía.

naria tardía que se siguió presentando después de 38 horas, sin cambios aparentes en el número de U.K. El tiempo de duplicación para esta cepa de S. cerevisiae, calculada a partir de la fase exponencial de la figura 1, fue de 2.8 horas.

#### 4.2. SINTESIS DE MACROMOLECULAS

Debido a que los cultivos manejados crecieron en forma asincrónica y que la nefelometría sólo indica las variaciones de una población celular en suspensión a través del tiempo sin proporcionar datos acerca del estado metabólico de las células y con el fin de conocer este último se hizo una evaluación de la síntesis de proteínas de la cepa A364A. Para ello a un cultivo que se encontraba en una fase logarítmica de crecimiento (70 U.K.; ver figura 1) se le agregó 0.1  $\mu$ ci/ml de una mezcla de aminoácidos tritados ( $^3$ H). A partir de este momento se tomaron muestras alícuotas por duplicado y se les determinó la radioactividad incorporada a macromoléculas como material TCA precipitable.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 2, la curva se siguió durante 240 min. Se puede observar que durante los primeros 90 minutos la cinética de incorporación ( $1-9.7 \times 10^{-3}$  CPM) sigue una tendencia de tipo exponencial, después de este tiempo la incorporación no muestra aumentos significativos, lo cual podría deberse al agotamiento, en el medio, de los aminoácidos marcados radioactivamente, o bien, al estado metabólico de las células. Este resultado muestra que las células se encuentran en un buen estado metabólico y que la síntesis de

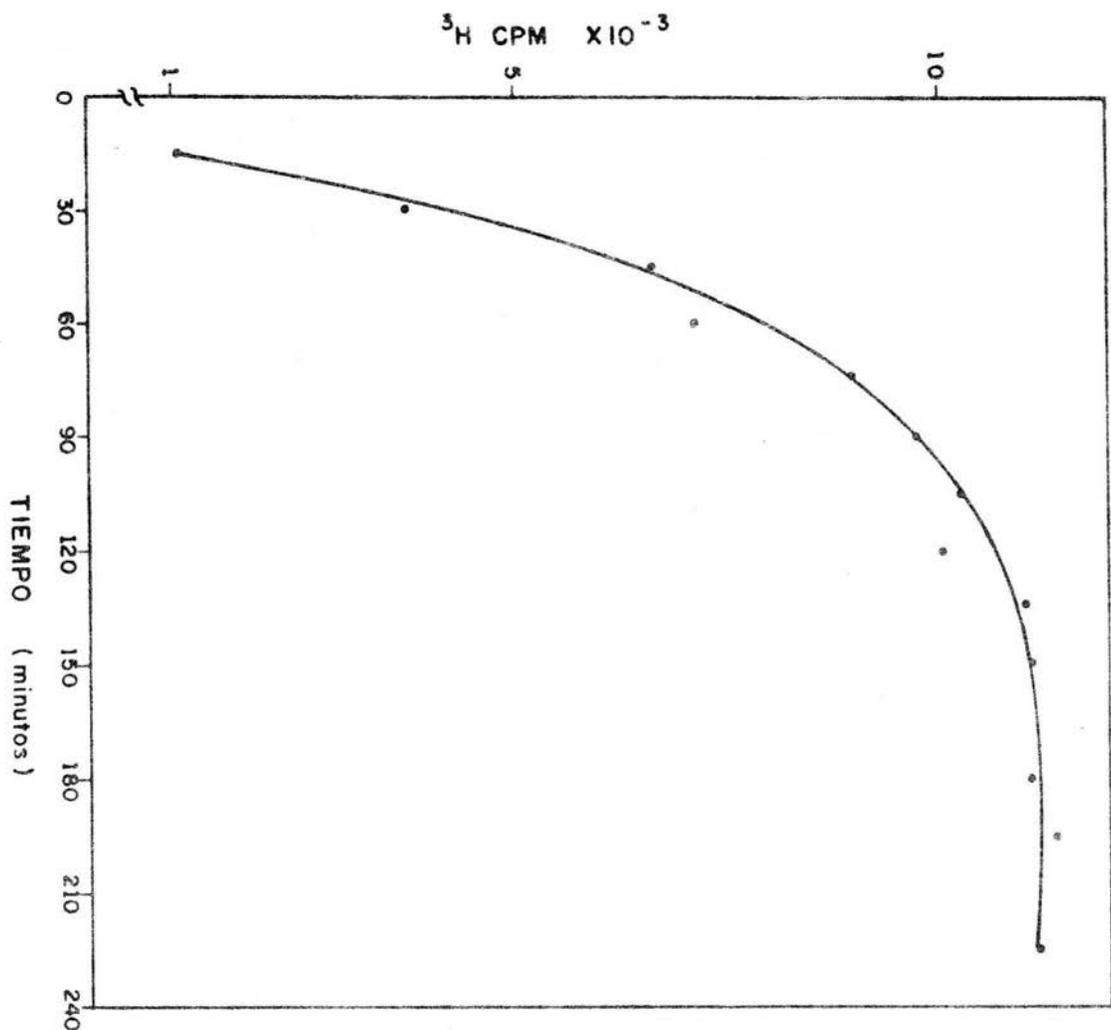


Fig. 2. Cinética de incorporación de aminoácidos  $^3\text{H}$  a macromoléculas. La cepa A364A se desarrolló en medio SC; cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento se le añadió 0.1  $\mu\text{Ci/ml}$  de una mezcla de aminoácidos  $^3\text{H}$  y se midió la incorporación a macromoléculas como material TCA precipitable.

proteínas es eficiente.

#### 4.3. Cuantificación del ARN extraído a 25, 45 y 60 grados centígrados.

La cantidad de ARN que se extrae de un cultivo puede ser determinada por densidades ópticas (D.O.) a 260 nm, o bien, determinando la radioactividad incorporada a macromoléculas como material TCA precipitable, cuando se trata de un cultivo marcado radioactivamente. Con el fin de estimar la cantidad de ARN obtenida mediante tres diferentes tratamientos con temperatura (25, 45 y 60°C) y poder hacer una comparación de los rendimientos, se hizo una cuantificación por los dos métodos mencionados (densitometría y radioactividad). En ambos casos se partió de cultivos con el mismo volumen y aproximadamente igual número de células. Posteriormente cada uno se dividió en tres partes iguales para los diferentes tratamientos (ver Material y Métodos). Por densitometría se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 2, la cantidad de ARN extraída en cada muestra se calculó considerando que 1 D.O. (260 nm) equivale a 45 µg de ARN. Los resultados muestran que la temperatura es un factor que influye sobre la célula en el momento en el que se lleva a cabo la extracción del ARN. La temperatura actúa al mismo nivel que la mezcla de cloroformo-fenol, produciendo poros en las membranas celulares permitiendo de esta forma la salida de los ácidos nucleicos. Se indica además que conforme se incrementa la temperatura la cantidad de ARN extraído aumenta, lo cual sugiere que a mayor temperatura hay formación de más número de poros o bien, poros de mayor tamaño. Con este método encontramos que la cantidad de ARN extraído a 60°C fue ocho veces superior a la obtenida a 25°C, y sólo dos veces mayor que a 45°C.

TABLA 2

TEMPERATURA DE EXTRACCION	D. O. 260 nm	ARN µg	ARN %
25°C	2.85	128	13.5
45°C	9.75	438	46.5
60°C	21.00	945	100.0

Las densidades ópticas se midieron en un fotocolorímetro Klett Summerson, y a partir de estas se obtuvo la cantidad de ARN en µg, tomando en cuenta que 1 D.O. equivale a 45µg de ARN. Se tomó como 100% el ARN extraído a 60°C.

TABLA 3

TEMPERATURA DE EXTRACCION	cpm INCORPORADAS a ARN	ARN %
25°C	$3.53 \times 10^5$	22
45°C	$5.83 \times 10^5$	37
60°C	$1.59 \times 10^6$	100

Se determinó la cantidad de radioactividad incorporada a macromoléculas como material TCA precipitable. La extracción de ARN a 60°C se tomó como el 100%.

Resultados similares se observaron al cuantificar la cantidad de ARN que se extrajo de células marcadas radioactivamente con adenina  $^{14}\text{C}$  (1  $\mu\text{ci/ml}$ ). En la tabla 3 se puede observar que la cantidad de ARN que se extrajo a 25°C es alrededor de cinco veces menor que la obtenida a 60°C, y que la de 45°C es casi tres veces inferior respecto a la de 60°C. Debido a que el método utilizado para la extracción de ARN es selectivo para especies de bajo peso molecular y, que los resultados muestran que conforme se incrementa la temperatura aumenta también la cantidad de ARN extraído, debido probablemente a un mayor tamaño o número de los poros, se sugiere que a mayor temperatura sería posible obtener otro tipo de ARN además de los ARN 5.8 S (51000 D), 5S (39000 D) y 4S (23000 D) y que posiblemente fueran especies de ARN mensajeros.

#### 4.4. Electroforesis en Geles de Acrilamida.

El patrón de separación del ARN total de *S. cerevisiae* que se muestra en la figura 3A se obtuvo sometiendo una muestra de ARN a electroforesis en gel de acrilamida al 2.75% (ver Material y Métodos). En la figura se pueden observar las especies de ARN 25S, 18S, y una población heterogénea que corresponde a las especies de bajo peso molecular, que no puede resolverse utilizando esta concentración de acrilamida. Del total del ARN el 15% corresponde a ARN 25S, el 60% a ARN 18S y 25% a las especies de bajo peso molecular.

El patrón característico de separación del ARN de bajo peso molecular se obtuvo sometiendo la muestra a electroforesis en gel de acrilamida al 10% y se muestra en la figura 3B. De las tres especies que se

muestran en esta figura solamente la 4S es heterogénea; corresponde a los ARN de transferencia (tARN), de los que existen por lo menos 20 especies diferentes y cuya falta de resolución no afecta los propósitos del presente trabajo.

Con el objeto de analizar las especies de ARN extraídas con los 3 diferentes tratamientos (25, 45 y 60°C), las muestras se corrieron electroforéticamente en geles de acrilamida al 10%. Este tipo de geles separa a las diferentes especies de acuerdo a su peso molecular. En la figura 4 se muestran los resultados de la electroforesis. Se puede observar que en los tres tratamientos se extrajeron las 3 especies de ARN de bajo peso molecular, pero en distintas proporciones. En el patrón de ARN extraído a 25°C (Fig. 5 A) se ve claramente que la cantidad correspondiente a ARN 5.8S es muy pequeña respecto a las otras 2 especies extraídas. Del total de marca incorporada a las 3 especies sólo el 5.5% corresponde a ARN 5.8S, el 40% se encuentra en ARN 5S y el 54.5% restante corresponde a ARN 4S (Tabla 4). El patrón de ARN extraído a 45°C (Fig. 4B) muestra que las 3 especies se extrajeron en cantidades proporcionales.

Los resultados indican que a 25°C la extracción de ARN 5.8S es poco eficiente, lo que sugiere que los poros formados en las membranas celulares, debido a la acción de la mezcla de cloroformo-fenol y la temperatura no fueron suficientemente grandes para permitir la salida de esta especie, por lo que sería difícil encontrar otras especies de ARN cuyo peso molecular fuera mayor al del ARN 5.8S. Por otro lado a 45°C el ARN 5.8S se extrajo con buena eficiencia, y se obtuvo en igual proporción que las otras 2 espe-

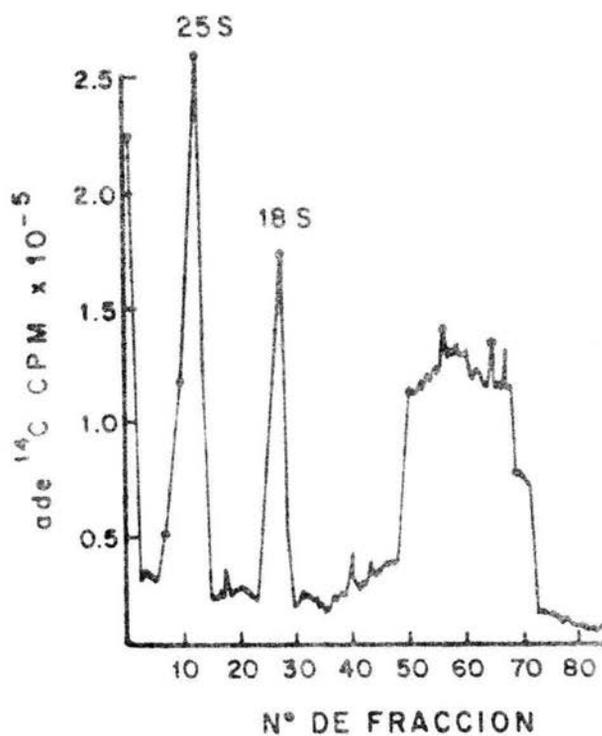


FIG. 3. Electroforesis en gel de acrilamida al 2.75%, que muestra el patrón característico de ARN de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenido a partir de una muestra de ARN total marcado radioactivamente con adenina - <sup>14</sup>C.

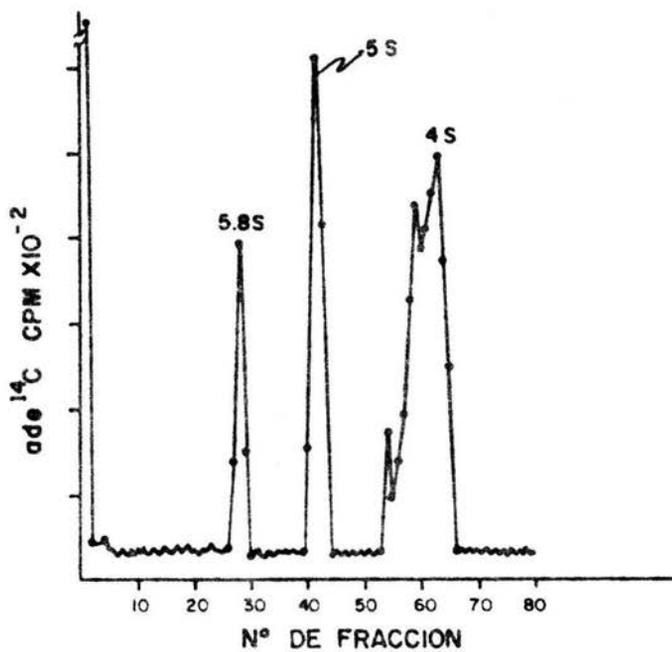


FIG. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% que muestra el patrón característico de los ARN's de bajo peso molecular de la levadura *S. cerevisiae*, obtenidos a partir de una muestra de ARN total marcado radioactivamente con adenina <sup>14</sup>C.

TABLA 4

TEMPERATURA DE EXTRACCION	CPM INCORPORADAS A ARN 5.8S (%)	CPM INCORPORADAS A ARN 5S (%)	CPM INCORPORADAS A ARN 4S (%)
25°C	5.5	40	54.5
45°C	33.0	33	33.0
60°C	30.0	25	45.0

Se determinó la cantidad de radioactividad incorporada a macromoléculas como material TCA precipitable. El total de radioactividad en las tres especies se tomó como el 100%.

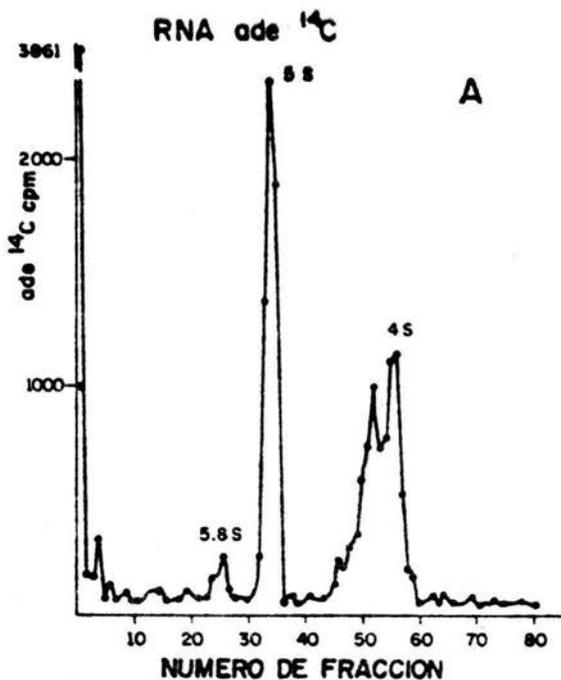
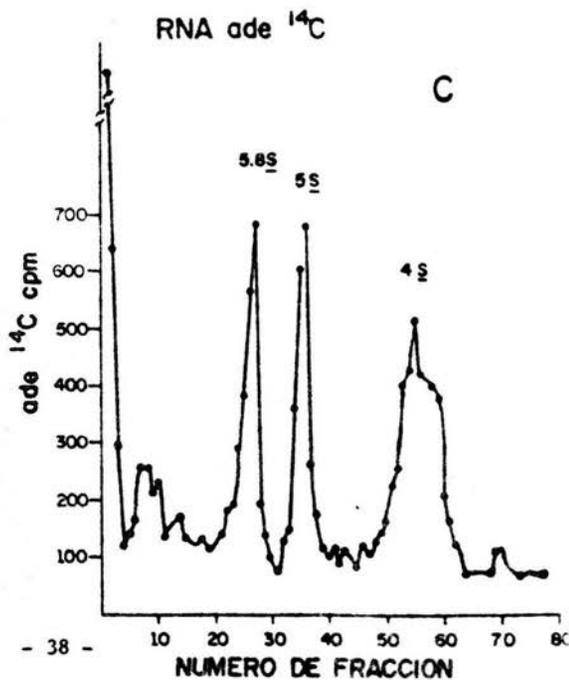
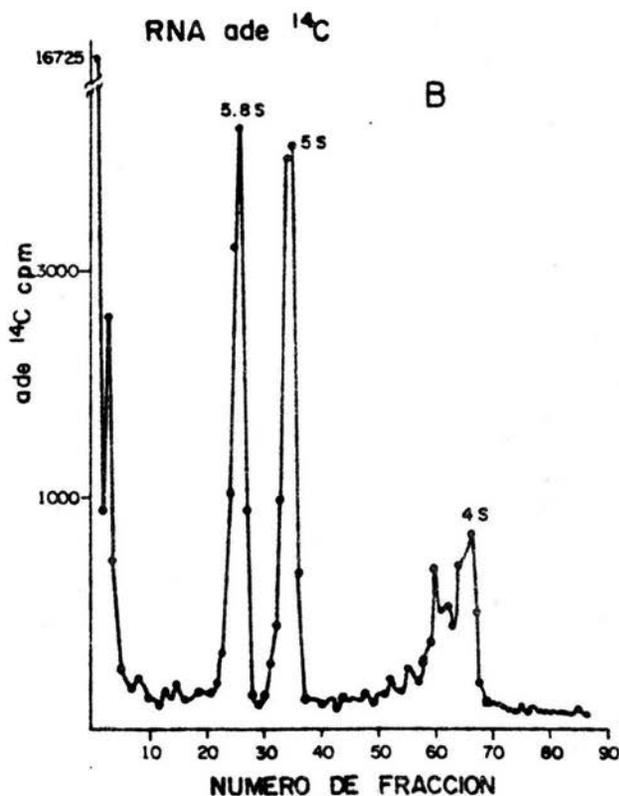


FIG. 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% de los ARN marcados radioactivamente con adenina  $^{-14}\text{C}$ , extraídos a diferentes temperaturas. A) 25°C; B) 45°C; C) 60°C



cies, lo que reafirma que el incremento en la temperatura de extracción aumenta el tamaño de los poros. Del total de ARN, extraído a esta temperatura, que se introdujo en el gel (5000 CPM) únicamente el 45% se incorporó a las especies 5.8S, 5S y 4S, lo que sugiere que a esta temperatura se pudieron haber extraído otro tipo de ARN de mayor peso molecular, que no fueron capaces de penetrar y resolverse en este tipo de gel y bajo las condiciones manejadas (ver Material y Métodos). En el caso del ARN extraído a 60°C (Fig 4C), del total de la muestra solamente el 22.4% del material se incorporó a las 3 especies (5.7, 5 y 4S) y se puede observar que entre las primeras 7 y 15 fracciones hay una población que representa el 23.9% (tomando como 100% la suma de las cuentas incorporadas a las 3 especies de bajo peso molecular y a esta última) y cuyo peso molecular calculado es de 80000 d. El hecho de que el 61.2% restante no se hubiera incorporado a las 3 especies y se quedara en el origen del gel, sugiere la presencia de especies de mayor peso molecular y que podrían corresponder a especies de ARNm. En comparación con este resultado, el material que quedó en el origen del gel cuando se analizó la muestra extraída a 25°C representa el 16%. Este porcentaje, así como parte del material que no penetró al gel, de las otras 2 muestras, no implica necesariamente que sea ARN de mayor peso molecular, ya que es posible que se hayan formado agregados de ARN cuyo tamaño no permitió la penetración en el gel.

#### 4.5. Traducciones *in vitro* de ARN Extraído a Diferentes Temperaturas y Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS

Para conocer si en alguna de las muestras de ARN se habían extraído mensajeros se hicieron traducciones *in vitro* utilizando 5 µg de ARN de

cada muestra (ver Material y Métodos). Los resultados se cuantificaron midiendo la incorporación de L-metionina -  $^{35}\text{S}$  como material TCA precipitable, y mostraron que únicamente la muestra de ARN extraída a  $60^{\circ}\text{C}$  había incorporado marca radioactiva, es decir la traducción fue positiva para esta muestra (Tabla 5). Para poder caracterizar el tipo de mensajeros que habían sido extraídos, el producto de traducción se agregó a una pastilla ribosomal obtenida previamente (ver Material y Métodos) y se procedió a hacer la extracción de proteína ribosomal total (PRT) y proteínas ácidas. Al finalizar cada extracción se midió la cantidad presente en cada una y se encontró que el 10% de la marca se había incorporado a proteínas ácidas y el resto se encontraba en PRT. Para conocer el tipo de ARNm, se preparó un gel de poliacrilamida-SDS para PRT (ver Material y Métodos), se colocó la muestra en uno de los pozos y se permitió que la electroforesis se llevara a cabo, posteriormente el gel se tiñó, se secó y se sometió a autorradiografía, con el fin de visualizar en qué región habían migrado las proteínas marcadas con metionina  $^{35}\text{S}$ , los resultados de este gel se muestran en la figura 5. Los pesos moleculares calculados para las proteínas marcadas van de 12000 a 14000 d, estos pesos moleculares concuerdan con los de las proteínas ribosomales ácidas. Del total de la metionina -  $^{35}\text{S}$  ( $7.02 \times 10^5$  cpm) incorporada durante la traducción in vitro, el 10% ( $6.2 \times 10^4$  cpm) se incorporó a las proteínas ribosomales ácidas durante la extracción. Este dato y el hecho de que en el gel de poliacrilamida - SDS se encontrara marca radioactiva únicamente en la zona correspondiente a estas proteínas sugiere fuertemente que con la extracción de ARN a  $60^{\circ}\text{C}$  se pueden extraer mensajeros específicos para este tipo de proteínas ácidas.

Con el objeto de conocer cual era la concentración de ARN con la que la incorporación de la traducción in vitro era más eficiente se hizo la curva de concentraciones que se muestra en la figura 7, y se encontró que 10  $\mu$ g de ARN era la concentración óptima para llevar a cabo las traducciones. Las muestras procedentes de este experimento también fueron analizadas en geles de poliacrilamida - SDS, y los resultados muestran la aparición de una banda en la región de las proteínas ácidas.

#### 4.6. Columnas de Oligo - DT Celulosa

Otro método para comprobar la presencia de mensajeros en las muestras de ARN es purificar ésta a través de una columna de oligo - dT celulosa (ver Material y Métodos) la cual tiene afinidad por las especies que contengan una fracción de poli (A)+, es decir, especies de ARNm. Para no descartar la presencia de mensajeros en las muestras de 25 y 45°C se tomaron 845  $\mu$ g de cada una de las tres muestras y se pasaron a través de la columna. Los resultados indicaron la presencia de mensajeros únicamente en la muestra de ARN extraída a 60°C (ver Fig. 8). La población de poli (A)+ ( $4.36 \times 10^4$  cpm) se obtuvo entre las fracciones 12 y 14 cuando se eluyó la columna con el amortiguador oligo-dT sin sal y representa el 1.28% del total del ARN extraído a ésta temperatura. Iguales resultados se obtuvieron al pasar por la columna de oligo - dT celulosa, ARN extraído a 60°C marcado radioactivamente con adenina -  $^{14}$ C (Fig. 9A). ARN total de S. cerevisiae marcado radioactivamente con 1  $\mu$ ci de adenina -  $^{14}$ C, se pasó por la columna de oligo - dT celulosa, el resultado se observa en la figura 9B. El fragmento de poli (A)+ que eluyó entre las fracciones 12 y 15 ( $1.1 \times 10^5$  CPM) corresponde al 4.6% del ARN total.

Después de haber extraído las fracciones poli A+ (68 µg de la muestra del ARN que se extrajo a 60°C se hicieron traducciones in vitro para corroborar si se trataba de los mismos mensajeros. Los productos de traducción se agregaron a una pastilla ribosomal y se procedió a hacer la extracción de PRT y proteínas ácidas, como se indica en Material y Métodos. Posteriormente, las muestras se corrieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida - SDS y los resultados mostraron la presencia de bandas correspondientes a proteínas ribosomales ácidas (Fig. 6).

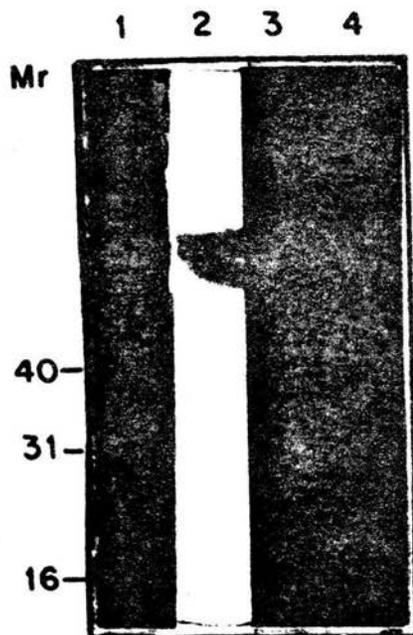


FIG. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. 845  $\mu\text{g}$  de ARN extraídos a  $60^\circ\text{C}$  se pasaron a través de una columna de oligo - dT celulosa y el ARN poli (A)+ fue traducido in vitro en presencia de metionina -  $^{35}\text{S}$ , el producto se agregó a una pastilla ribosomal total sin marca y se hizo la extracción de proteínas ribosomales. 1) Tinción con azul de Coomassie; 2) Autorradiografía de 1. e) Autorradiografía de ARN celular total. 4) Autorradiografía de la traducción sin ARN.



FIG. 7. Curva de incorporación de metionina - <sup>35</sup>S durante las traducciones in vitro, en presencia de concentraciones crecientes de ARN de S. cerevisiae extraídos a 60°C.

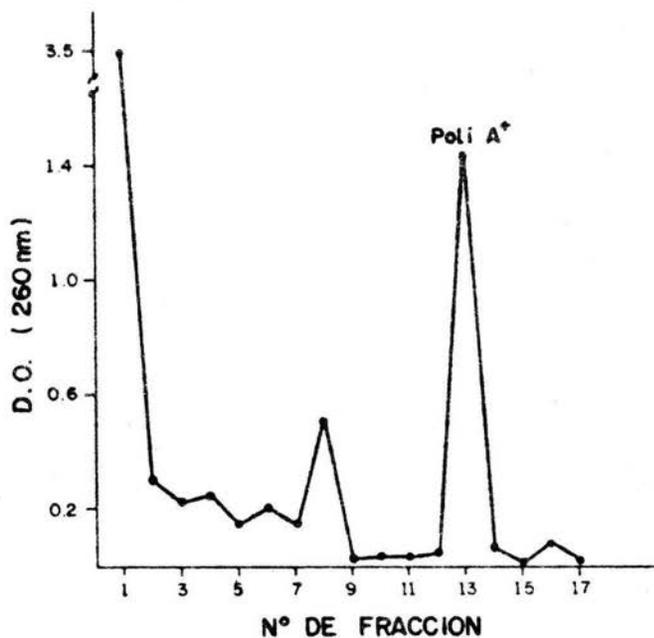


FIG. 8. Perfil de elución del ARN extraído a 60°C, de la cepa A364A de *S. cerevisiae*. 845  $\mu\text{g}$  de ARN se pasaron a través de una columna de oligo - dT celulosa. La absorción de cada fracción se cuantificó en un espectro fotómetro Beckman.

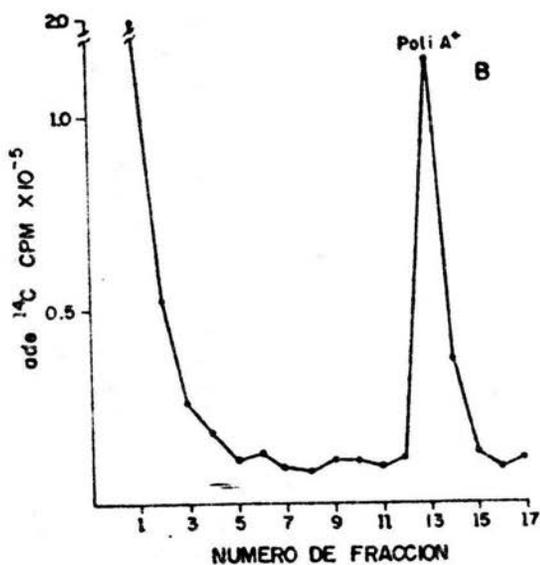
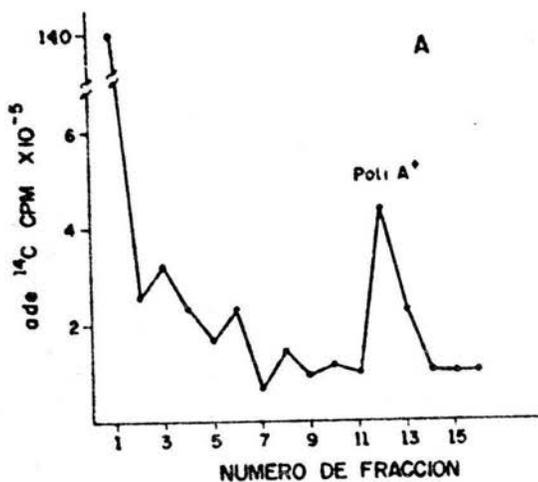


FIG. 9. Perfil de elución del ARN de la cepa A364A de *S. cerevisiae* marcado radioactivamente con 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de adenina -  $^{14}\text{C}$ , eluido en una columna de oligo-dT celulosa. La radioactividad incorporada a macromoléculas se determinó como material TCA precipitable. A) ARN extraído a 60°C; B) ARN total.

TABLA 5

REACCION <u>in vitro</u>	CONCENTRACION DE ARN EN LA MEZCLA DE REACCION	METIONINA - <sup>35</sup> S INCORPORADA A PROTEINA
sín ARN	-	11662
ARN 25°C	5 µg	11238
ARN 45°C	5 µg	6135
ARN 60°C	5 µg	35550

Los ARNs de la levadura Saccharomyces cerevisiae extraídos a 25, 45 y 60°C fueron introducidos in vitro en el sistema de reticulocitos en presencia de metionina - <sup>35</sup>S. Después de la incubación se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción para determinar la incorporación de aminoácidos radioactivos a proteínas. Los resultados se expresan en cpm incorporados en 2 µl de la mezcla de reacción.

## DISCUSION

Las fosfoproteínas ribosomales ácidas son indispensables para la síntesis de proteínas, ya que son las responsables de situar en el seno del ribosoma a los complejos ternarios dependientes de GTP durante el proceso de traducción.

Los ARN ribosomales de bajo peso molecular de la levadura S. cerevisiae, se extraen con una mezcla de cloroformo - fenol (1:1), que produce poros en la membrana celular. Si postulamos que el diámetro del poro está directamente relacionado con la temperatura a la que se incuban las células con la mezcla, y si nuestra hipótesis es cierta, existiría una temperatura en la que se pudieran extraer además de los ARN ribosomales de bajo peso molecular (5.8S, 5S y 4S), especies de ARN mensajeros de bajo peso molecular pero mayores a aquellos. Mediante la utilización de la técnica antes mencionada, y a una temperatura de 60°C logramos el objetivo del presente trabajo: Obtener una fracción enriquecida de ARN mensajeros para las fosfoproteínas ribosomales ácidas.

Por medio de columnas de Oligo - dT - celulosa, comprobamos que entre las especies de ARN de bajo peso molecular, extraídas bajo las condiciones ya mencionadas, estaba presente una fracción correspondiente a ARN mensajeros (Fig. 9). Por otro lado estos mensajeros eluidos de las columnas se sometieron a un proceso de traducción in vitro, y los resultados fueron positivos. Las proteínas resultantes de esta traducción, marcadas radioactivamente con metionina - <sup>35</sup>S, se sometieron a electroforesis en geles

de poliacrilamida - SDS, junto con proteína fría como acarreador. Las autorradiografías de estos geles muestran bandas correspondientes por peso molecular, a las proteínas ribosomales ácidas (Fig. 6).

Estos resultados dan lugar al estudio de diferentes eventos fisiológicos en la levadura, como por ejemplo, la regulación de la transcripción. Para poder realizarlo es necesario, primero, detectar y clonar los genes de estas proteínas.

Existen diferentes técnicas para la clonación de genes:

- a) Mediante la obtención de anticuerpos monoclonales o policlonales, dirigidos contra las proteínas deseadas. Sin embargo, para la obtención de anticuerpos contra las proteínas ribosomales ácidas, este no es el método más adecuado, debido a que topográficamente las proteínas ribosomales ácidas se encuentran en el tallo de la subunidad ribosomal 60 S, lo que produciría una reacción cruzada contra esta subunidad y no sólo contra la proteína buscada.
  
- b) Inmunoprecipitación de polisomas. Este método requiere de anticuerpos contra las proteínas deseadas, las cuales se ponen a reaccionar con polisomas que estén traduciendo a los mensajeros. Los anticuerpos deben reaccionar con las proteínas contra las que estén dirigidos y que en ese momento se estén traduciendo, sin embargo, como en el caso anterior, los anticuerpos también reaccionarían contra el tallo de la subunidad mayor y el precipitado de los polisomas acarrearía a otros mensajeros además de los que codifican para las proteínas ribosomales ácidas.

c) Un gene puede ser sintetizado enzimáticamente haciendo una cDNA copia del ARN mensajero maduro, que codifique para las proteínas de las cuales se busca el gene. En el presente trabajo, obtuvimos una fracción enriquecida de ARN mensajero para las proteínas ribosomales ácidas a partir del cual podría sintetizarse el cDNA que posteriormente puede ser introducido a un plasmido y ser amplificado en E. coli.

Una vez clonados los genes puede estudiarse la regulación de la transcripción de los mensajeros correspondientes. Cuantificando la concentración de los ARN mensajeros de L44, L44<sup>2</sup> y L45, podemos saber si la transcripción se lleva o no a cabo de manera coordinada.

## CONCLUSIONES

- 1.- La temperatura es un factor que aunado a la mezcla de cloroformo fenol produce poros en la superficie celular que permite la salida de ARN.
- 2.- La cantidad de ARN extraído es proporcional a la temperatura.
- 3.- La extracción de ARN a 60°C permite la salida de ARN mensajeros de bajo peso molecular además de las especies 5.8S, 5S y 4S.
- 4.- Mediante la elusión de ARN poli (A)+ en columnas de oligo - dT celulosa, un sistema de traducción in vitro y un sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida se comprobó que los ARN mensajeros extraídos a 60°C codifican para proteínas ribosomales ácidas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Warner, J. R. (1982). en *The Yeast Ribosomes: Structure, function and synthesis* (J. N. Strathern, E. W. Jones y J. R. Broach. ed.) p 529 - 560. Cold Spring Harbor Lab. N. Y.
2. Wool, I. G. and Stoffler, G. (1974). en *Ribosomes* (Nomura, A., Tissiers, A. and Lengyel P. ed.) p 417-460. Cold Spring Harbor Lab. C. S. H.
- 3.- Wool, I. G. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48: 719-754.
- 4.- Lake, J. A., Sabatini, D. D. y Nomura, Y. (1974). en *Ribosomes* (Nomura A., Tissiers, A. and Lengyel, P. ed.) p 543-557 Cold Spring Harbor Lab.
- 5.- Emanuilov, I., Sabatini, D. D., Lake, J. A. y Freienstein, C. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1389-1393.
- 6.- Boublik, M. y Hellmann, W. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2829-2833.
- 7.- Brimacombe, R., Stooffler, G. y Wittmann, H. G. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47:217-249.
- 8.- Weinberg, R. A. y Penman, S. (1970). *J. Mol. Biol.* 47: 169.
- 9.- Udem, S. A. y Warner, J. R. (1972). *J. Mol. Biol.* 65: 227-242
- 10.- Greenberg, H. y Penman, S. (1968). *J. Mol. Biol.* 38:289-304.
- 11.- Udem, S. A., Kaufman, K. y Warner, J. R. (1971). *J. Bact.* 105: 101-106.
- 12.- Mc. Reynolds, L. y Penman, S. (1974). *Cell.* 1:139.
- 13.- Roth, R. M. y Dampier, C. (1972). *J. Bact.* 109: 773.
- 14.- Woese, C. r., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J. y Stahl, D. (1975). *Nature* 254: 83-86.
- 15.- Fischel, J.L., Krol, A., Ehresmann, C., Fellner, P. y Ebel, J. P. (1975). *Biochem.* 57: 885-897.
- 16.- Hori, H. (1975). *J. Mol. Evol.* 7: 75-86.
- 17.- Hori, H. (1976). *Mol. Gen. Genet.* 145: 119-123.
- 18.- Erdmann, V. A. (1976). *Mol. Gen. Genet.* 18: 45-90.
- 19.- Wrede, P. y Erdmann, V. A. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2706-2709.

- 20.- Planta, R. (1979). en Ribosomes (Nomura, A., Tissieres, A. y Lengyel, P. ed.) Cold Spring Harbor Lab.
- 21.- Gorenstein, C. y Warner, J. R. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 1547-1551.
- 22.- Gorenstein, c. y Warner, J. R. (1977). Molec and Cell Biol. Acad. Press. Inc. N. Y. 7: 203-211.
- 23.- Zinker, S. y Warnwer, J. R. (1976). J. Biol. Chem. 251: 1799-1807.
- 24.- Wesermenn, P. y Bielka, H. (1973). Mol. Gen. Genet. 111: 224.
- 25.- Higo, K. y Otoka, E. (1979). Bioch. 18: 419.
- 26.- Ithoh, T., Higo, K. y Otoka, E. (1979). Biochem. 18: 5787.
- 27.- Kaltsschmidt, E. y Wittmann, H. G. (1970). Anal. Biochem. 36: 401-412.
- 28.- Otoka, E. y Kobata, K. (1978). Mol. Gen. Genet. 162: 259.
- 29.- Mc Conkey, E. H., Bielka, H., Gordon, J., Lastick, S. M., Lin, A., Ogata, K., Reboud, J.P., Tlaugh, J.A., Traut, R. R., Warner, J., Welfle, H. y Wool, I. G. (1976). Mol. Gen. Genet. 169: 1.
- 30.- Otoka, E. y Osawa, S. (1981). Mol. Gen. Genet. 181: 176.
- 31.- Osawa, S. y Hori, H. (1980). en Ribosomes: Structure, Function and Genetics. (G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan y M. Nomura, ed.) University Park Press, Baltimore. p 333.
- 32.- Martini, O. M. W. y Gould, H. J. (1975). Mol. Gen. Genet. 142: 317.
- 33.- Stoffler, G., Fischer, N., Rak, K. H. y Ehrlich, R. (1978). Mol. Gen. Genet. 127: 111.
- 36.- Adoutte-Panvier, A., Davies, J. E., Gritz, L. R. y Littlewood, B. S. (1980). Mol. Gen. Genet. 179: 273.
- 37.- Allfrey, U. G. (1968). en Regulatory mechanisms for Protein Synthesis in Mamalian Cells (San Pietro A., Lanborg M. Keney, F. T. Eds.) Acad. Press. N. Y. p 65.
- 38.- Kruiswijk, T., De Hey, J. T. y Planta, R. J. (1978). Biochem. J. 175: 213-219.
- 39.- Kabat, D. (1971) Biochem. 9: 4160.
- 40.- Li, C. C. y Amos, H. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 45: 1389.

- 41.- Eil, C. y Wool, I. G. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1001.
- 42.- Leader, D. P. (1980) en *Molecular aspects of cellular regulation.* (Cohen P. ed.) Elsevier Amsterdam. Vol. I.
- 43.- Gressner y Wool, I. G. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 6917-6925.
- 44.- Tsuguri, K., Collatz, E., Todo Koro, K. Ulbrich, N., Lightfoot, H. N. y Wool, I. G. (1978). *J. Biol. Chem.* 253: 946-955.
- 45.- Leader, D. P. y Coia, A. A. (1977) *Biochem. J.* 162: 199-200.
- 46.- Van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R. y Moller, W. (1978). *Eur. J. Biochem.* 91: 553-565.
- 47.- Zinker, S. (1980). *Biochim. et Biophys. Acta.* 606: 76-82.
- 48.- Cawthon, M. L., Bitte, L. F., Krystosek, A. y Kabat, D. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 275-278.
- 49.- Rankine, A. D., Leader, D. P. y Coia, A. A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 474: 293-307.
- 50.- Van Agthoven, A., Maassen, J. A. y Moller, W. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 9898-998.
- 51.- Issinger, O. G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* 477: 185-189.
- 52.- Issinger, O. G. y Traut, R. R. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 829.
- 53.- Moller, W., Groene, A., Terhorst, C. y Amons, R. (1972). *Eur. J. Biochem.* 25: 5.
- 54.- Luer, C. A. y Wrong, K. P. (1980) *Bioch. J.* 19: 176.
- 55.- Hamel E. y Nakamoto T. (1972). *J. Biol. Chem.* 247: 6810.
- 56.- Tewari, D. S., Sommer, A. y Traut R-R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 6919-6923.
- 57.- Amons, R., van Agthoven, A., Pluijms, W. and Moller, W. (1978). *FEBS Letters.* 86: 282-284.
- 58.- Geisser, M., Tischendorf, G. W. y Stoffler, G. (1973). *Mol. Gen. Genet.* 123: 129-145
- 59.- Sánchez-Madrid, F., Vidales, J. F. y Ballesta J.P.G. (1981). *Biochem.* 20: 3263.
- 60.- Hamel, E., Koka, M. y Nakamoto, T. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 805-814.

- 61.- Sander, G., Marsh, R. C. y Parmeggiani, A. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 866-873.
- 62.- Moller, W., Stobin, L. I., Amos, R. y Richter, D. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 4744-4748.
- 63.- Sánchez-Madrid, F., Reyes, R., Conde, P. y Ballesta, J.P.G. (1979). Eur. J. Biochem. 98: 409.
- 64.- Kay, A., Sander, G. y Grunberg-Manago, M. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. 51: 979-986.
- 65.- Lockwood, A. H., Maitra, U., Brot, N. y Weissbacxh, H. (1973). J. Biol. Chem. 249: 1213-1218.
- 66.- Battaner, E. y Vázquez, D. (1971). Meth. Enzymol. 20:446
- 67.- Maizel, U. U. (1971) en Methods in Virology. eds. Maramorosch, K. y Koprowski, H. (Academic Press, N.Y.) Vol V. p 179-246.
- 68.- Vidales, F. J., Sánchez-Madrid, F. y Ballesta, J.P.G. (1981). Biochim. Biophys. Acta. 656: 28-35.