

CARACTERIZACION DEL DNA Y DE
ACTIVIDADES DESOXIRIBONUCLEASICAS DE LAS
MITOCONDRIAS DE *Euglena gracilis* VAR. BACILLARIS

Tesis

Presentada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

LILIAN ELENA JARA SOSA

Enero 1986

Director de Tesis: Dr. Guido Mora Longa
Laboratorio de Microbiología e Inmunología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Lilian Elena Jara Sosa

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de octubre de 1985.

Director de Tesis

Dr. Guido Mora L.



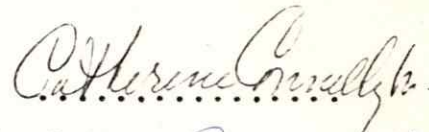
Prof. Patrocinante

Dr. Carlos Valenzuela Y.



Comisión Informante de Tesis

Dra. Catherine Connelly M.



Dra. Liliana Cardemil O.



Dr. Norbel Galanti G.



A mis padres y a Hernán

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guido Mora L., que fue mi guía y en quien encontré a un gran amigo. Creo que no olvidaré mi permanencia en su laboratorio; la ciencia es más llevadera si se realiza en un ambiente de camaradería y amistad.

Agradezco a mi esposo y a mis hijos quienes soportaron con paciencia eterna mis depresiones y las prolongadas ausencias de mi hogar.

A mi padre, quien ha sido un gran ejemplo y un impulsor en mi vida, y a mi madre por su constante preocupación.

A la Sra. Carmen Gloria Balmaceda, quien trabajó a mi lado durante dos años y quien compartió mis angustias y alegrías a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Manuel Rodríguez, Jefe del Departamento de Biología Celular, por las innumerables facilidades otorgadas.

Al Dr. Ernesto Oberhauser, Director del Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina División Sur, Universidad de Chile, por otorgar las facilidades necesarias para mi permanencia en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Al Dr. Carlos Valenzuela y a la Dra. Liliana Cardemil, por el gran interés que ellos demostraron en este trabajo y por sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Norbel Galanti de todo corazón.

Al Director del Instituto de Salud Pública de Chile, Coronel (R) Dn. Joaquín Larraín Gana, por haber autorizado el uso de los fermentadores de la sección DPT.

Al Dr. Darío Pinto, quien supervigiló los crecimientos de *Euglena gracilis*.

A la Dra. Adriana Contreras por la ayuda en los crecimientos de *Euglena gracilis*, por su interés en mi trabajo y por brindarme su amistad.

Al sr. José Calderón, quien tuvo trabajo extra más de una vez por culpa de mis algas.

A las Dras. Inés Calderón y Graciela Cofré, quienes siempre estuvieron dispuestas a ayudarme.

A la Dra. Eliana Canelo por sus valiosas sugerencias en la revisión de este manuscrito.

A mis colegas y grandes amigos Lautaro Pérez y Jorge E. Villanueva, quienes me dedicaron mucho tiempo y me brindaron su ayuda.

A Sergio Pichuantes por su atención y consejos.

A los señores José Peña, Honorindo Ladino, Orlando Ortíz y Omar Mellado, por su excelente asistencia técnica y su buena voluntad.

A todos mis compañeros del Programa de Doctorado en Biología con mención en Genética, por el apoyo brindado.

Agradezco finalmente, a todas aquellas personas que de uno u otro modo contribuyeron a mi formación y a quienes omití en este momento de retrospección.

Esta investigación fue financiada por la Dirección de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (DIUC), por los fondos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología y por el Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, División Sur, Universidad de Chile, del cual soy académico. La Dirección de este Departamento otorgó grandes facilidades para mi permanencia en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Católica de Chile.

PROPOSITO

Estudiar el peso molecular y la forma del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris* mediante electroforesis de geles de agarosa, tratamiento con endonucleasas de restricción y microscopía electrónica. Demostrar la existencia de actividades desoxirribonucleásicas en la mitocondria de *Euglena gracilis* y establecer su ubicación dentro de los comportamientos mitocondriales con el objeto de plantear una posible explicación a las variaciones de forma y tamaño encontradas para este DNA. Finalmente clonar el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

RESUMEN

Estudios realizados sobre la caracterización del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris* no son concordantes con respecto a su peso molecular, forma y contenido de GC.

En este trabajo se determinó que este DNA mitocondrial presenta una configuración lineal con extremos 5' P protuberantes. Por medición del largo de contorno de las moléculas de DNA mitocondrial observadas al microscopio electrónico y por su movilidad electroforética en geles de agarosa, se propone para este DNA un peso molecular aproximado de 12×10^6 - 15×10^6 daltons.

El DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se clonó en el plasmidio pUC18 y el peso molecular del inserto fue de $6,4 \times 10^6$ daltons o de 8×10^6 daltons.

El DNA purificado a partir de mitocondrias intactas, se sometió a la acción de 22 endonucleasas de restricción, siendo refractario a 18 de ellas. Esta refractariedad se relacionó con la presencia de bases modificadas en el DNA mitocondrial, detectándose 5-metilcitosina y posiblemente 6-metiladenina.

En ambas cámaras mitocondriales se detectó actividades de desoxirribonucleasas y en la cámara externa, una

actividad enzimática termosensible a 55°C, capaz de relajar
DNA circular covalentemente cerrado.

SUMMARY

Studies already described on the characterization of DNA from *Euglena gracilis* var. *bacillaris*'s mitochondria show some disagreement about its molecular weight, shape and GC content.

The present work establishes that this DNA has a linear configuration with protruding 5'P ends. The measured of the contour lengths of mitochondrial DNA molecules observed by electron microscopy and the electrophoretic mobility in agarose gels suggest that this DNA has an approximate molecular weight of 12×10^6 - 15×10^6 daltons.

This DNA was cloned into the plasmid pUC18 and an approximate molecular weight of 6.4×10^6 or 8.0×10^6 daltons was observed for the insert.

DNA obtained from intact mitochondria was digested with 22 restriction endonucleases being insensitive to 18 of them. This might be explained by the presence of 5-methylcytosine and possibly 6-methyladenine in its nucleotide sequence.

Deoxyribonuclease activities were detected in *Euglena* mitochondria. They were found in the intermembrane and matrix compartments. One of them, found in the intermembrane

space, was able to relax circular, covalently closes DNAs
and its activity was thermostable up to 55°C.

INDICE DE MATERIAS

	página
AGRADECIMIENTOS	i
PROPOSITO	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
INDICE DE MATERIAS	x
LISTA DE TABLAS	xx
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS	xxv
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	15
I. MATERIALES	15
1. Material biológico	15
2. Reactivos químicos y material cromato- gráfico	16
3. Medios de cultivo	18
II. METODOS	20
1. Obtención de una cepa blanqueada de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	20
2. Mantención de las cepas de <i>Euglena</i> <i>gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	20
3. Criterios de pureza de los cultivos ...	21

	página
4. Cultivo celular	21
5. Cosecha de las células	22
6. Ruptura celular y obtención de la fracción mitocondrial	24
7. Tratamiento de la fracción mitocon- drial con desoxirribonucleasa pan- creática	30
8. Purificación de la fracción mitocon- drial	32
9. Obtención de mitoplastos por trata- miento con digitonina	33
10. Purificación de DNA mitocondrial	34
11. Purificación de núcleos de <i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	37
12. Purificación de DNA de núcleos de <i>Euglena gracilis</i>	38
13. Eliminación de RNA y otras molécu- las contaminantes de la preparación de DNA mitocondrial utilizando colum- nas de Bio-gel A50m	39
14. Caracterización de DNA mitocondrial mediante gradientes de cloruro de cesio	40

15.	Marcación de DNA mitocondrial por incorporación <i>in vitro</i> de $ ^{32}\text{P-}\alpha \text{TTP}$ en mitocondrias purificadas en gra dientes de sacarosa	41
16.	Electroforesis en geles de agarosa	43
17.	Visualización del DNA en geles de agarosa	44
18.	Mediciones de densidad óptica de ácidos nucleicos	45
19.	Autorradiografía de geles	45
20.	Tratamiento del DNA mitocondrial con endonucleasas de restricción	46
21.	Curva de calibración	47
22.	Extracción de DNA mitocondrial con bromuro de cetil-trimetil amonio luego de electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión	48
23.	Tratamiento del DNA mitocondrial con el fragmento de Klenow de la DNA po- limerasa I de <i>E. coli</i>	50
24.	Tratamiento del DNA mitocondrial con la DNA polimerasa del bacteriófago T ₄	51

25.	Tratamiento del vector de clonamiento pUC18 con fosfatasa alcalina	53
26.	Tratamiento con DNA ligasa del bacteriófago T ₄	54
27.	Transformación genética de las células	55
	27.1 Obtención de células competentes..	55
	27.2 Transformación genética	56
	27.3 Detección de los recombinantes ...	57
28.	Preparación de extractos proteicos de la mitocondria	60
29.	Preparación de extractos proteicos de la cámara mitocondrial externa	63
30.	Detección de actividades desoxirribonucleásicas en extractos proteicos de la mitocondria y de la cámara externa	65
31.	Hidrólisis cualitativa del DNA	66
32.	Cromatografía en papel	67
	32.1 Solventes cromatográficos	67
	32.2 Cromatografía monodimensional	68
	32.3 Cromatografía bidimensional	68
	32.4 Detección de las bases nitrogenadas en el cromatograma	69

	página
33. Determinación de la concentración de proteínas	70
34. Microscopía electrónica	70
34.1 Observación de sedimentos mito- condriales al microscopio elec- trónico de transmisión	70
34.2 Observación de moléculas de DNA mitocondrial al microscopio elec- trónico de transmisión	72
34.3 Análisis Cuantitativo	73
RESULTADOS	74
I. Criterios de pureza de la fracción mitocon- drial e integridad estructural y funcional de las mitocondrias	74
A. Microscopía electrónica de la fracción mitocondrial	74
B. Obtención de DNA intacto, a partir de mitocondrias tratadas con DNAsa pancreá- tica	77
C. Incorporación <i>in vitro</i> de [³² P-α] TTP por mitocondrias aisladas de <i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	82

II.	Obtención y caracterización de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	84
	A. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales crudas en gradientes de cloruro de cesio ...	84
	B. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales tratadas con DNAsa pancreática en gradientes de cloruro de cesio	87
	C. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales tratadas con DNAsa pancreática en geles de agarosa	88
	D. Caracterización mediante autorradiografía de DNA marcado con $ ^{32}\text{P}-\alpha $ TTP purificado a partir de preparaciones mitocondriales incubadas <i>in vitro</i> con dicho nucleótido	91
III.	Comportamiento del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilaris</i> var. <i>bacillaris</i> frente a endonucleasas de restricción	94

	página
A. Control de la actividad de endonucleasas de restricción	94
B. Acción de endonucleasas de restricción sobre el DNA mitocondrial	95
C. Detección de una posible actividad <u>inhi</u> bitoria sobre las endonucleasas de restricción	101
D. Digestión de DNA mitocondrial marcado con $ ^{32}\text{P-}\alpha $ TTP con endonucleasas de restricción	102
E. Determinación del peso molecular del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	104
IV. Análisis cualitativo de la composición de bases nitrogenadas del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	107
V. Determinación de la forma del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	112
VI. Clonamiento del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	118
A. Determinación del tipo de extremos <u>pre</u> sentés en la molécula de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	118

	página
B. Retransformación de <i>E. coli</i> C600 con los plasmidios recombinantes	125
C. Análisis de los plasmidios recombinantes por electroforesis en geles de agarosa y por digestión con endonucleasas de restricción	126
VII. Actividades nucleásicas presentes en la mitocondria	131
A. Actividades desoxirribonucleásicas presentes en el extracto de proteínas mitocondriales totales	131
B. Actividades desoxirribonucleásicas presentes en el extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa	132
B.1 Detección de desoxirribonucleasas inespecíficas presentes en la cámara mitocondrial externa	132
B.2 Detección de una actividad endonucleásica (NMEE) presente en la cámara mitocondrial externa	136
B.2.1 Efecto de la temperatura sobre la acción de la actividad endonucleásica (NMEE) presente en la cámara mitocondrial externa	143

B.2.2 Purificación de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> en condiciones que pueden impedir la actividad de las desoxirribonucleasas presentes en el organelo	143
a) DNA purificado de mitocondrias desprovistas de cámara externa ...	143
b) DNA purificado de mitocondrias intactas con lisis del organelo a 55°C	147
DISCUSION	150
Forma y tamaño del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	150
Comportamiento refractario del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>ba</i> <i>cillaris</i> a la acción de endonucleasas de restricción	153
Clonamiento del DNA mitocondrial de <i>E<u>u</u></i> <i>glena gracilis</i>	163
Actividades desoxirribonucleásicas presentes en la mitocondria de <i>E<u>u</u></i> <i>cilis</i>	166

		página
CONCLUSIONES	171
APENDICE 1	173
APENDICE 2	174
BIBLIOGRAFIA	175

LISTA DE TABLAS

	página
Tabla 1 Rendimiento de ruptura celular y preservación de la fracción mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	29
Tabla 2 Resultados esperados y obtenidos según el tipo de extremos presentes en el DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i>	123

LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 1	Curva de crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	23
Figura 2	Esquema de la técnica para el aislamiento de la fracción mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> descrita por Krawiec y Eisenstadt (1970)	25
Figura 3	Esquema de la técnica establecida en este trabajo para el aislamiento de la fracción mitocondrial	31
Figura 4	Microfotografía electrónica de sedimentos mitocondriales crudos de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	75
Figura 5	Microfotografía electrónica de un corte de <i>Euglena gracilis</i> var. <i>bacillaris</i> silvestre	78
Figura 6	Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias de <i>Euglena gracilis</i> tratadas con DNAsa pancreática 100 µg/ml y sedimentadas a 7.000 x g ó a 10.000 x g	80
Figura 7	Incorporación <i>in vitro</i> de $ ^{32}\text{P}-\alpha $ TTP por mitocondrias aisladas de <i>Euglena gracilis</i>	83
Figura 8	Centrifugación preparativa en gradiente de CsCl de DNA purificado a partir de preparaciones crudas de mitocondrias y purificadas en una gradiente discontinua de sacarosa	86
Figura 9	Electroforesis en geles de agarosa de distintas concentraciones de DNA purificado de mitocondrias de <i>Euglena gracilis</i> tratadas con DNAsa pancreática ...	90

	página
Figura 10	Autorradiografía de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> marcado con $^{32}\text{P-}\alpha$ TTP. 92
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con las endonucleasas de restricción: HpaI, XbaI, BglI y BglII 96
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratados con las endonucleasas de restricción SacII y SmaI.... 98
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con la endonucleasa de restricción XmaI 99
Figura 14	Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con la endonucleasa de restricción XhoI 100
Figura 15	Análisis electroforético de las digestiones con las endonucleasas de restricción, BamHI, BglI, BglII, HaeIII y HinfI de una mezcla de DNA del bacteriófago λ y DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> 103
Figura 16	Autorradiografía de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> marcado con $^{32}\text{P-}\alpha$ TTP y tratado con endonucleasas de restricción 105
Figura 17	Cromatograma unidimensional de bases nitrogenadas y de un hidrolizado de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> 110
Figura 18	Cromatograma bidimensional de un hidrolizado de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> 111

	página
Figura 19 Electroforesis de DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> en gel de agarosa (1%), luego de extracción con CETAB	113
Figura 20 Microscopía electrónica del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> ...	115
Figura 21 Mapa genético del plasmidio pUC18 .	120
Figura 22 Estrategia de clonamiento del DNA mitocondrial de <i>Euglena gracilis</i> ...	124
Figura 23 Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los plasmidios obtenidos de TK1, TK2, TK5 y TK6	128
Figura 24 Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los productos de digestión de los plasmidios obtenidos de TK2 y TK5 con las endonucleasas de restricción EcoRI, SallI, SstI y XhoI	129
Figura 25.1 Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales	133
Figura 25.2 Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales	134
Figura 25.3 Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales	135
Figura 26.1 Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa...	137

	página
Figura 26.2 Electroforesis de DNA del bacteri ϕ fago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa....	138
Figura 26.3 Electroforesis de DNA del bacteri ϕ fago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa ...	139
Figura 27 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos obtenidos luego de la acción de la actividad NMEE sobre el DNA del plasmidio pBR322	142
Figura 28 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de pBR322 tratado con NMEE a 37°C y 55°C	144
Figura 29 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias de <i>Euglena gracilis</i> desprovistas de cámara externa (mitoplastos)	146
Figura 30 Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias intactas de <i>Euglena gracilis</i> lisadas a 55°C	149

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AS	agar Sabouraud
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
ATP	adenosina 5' trifosfato
BAC	cloruro de bencildimetilalquilamonio
C	citosina
CC	caldo corriente
cel	célula
CETAB	bromuro de cetil-trimetilamonio
CL	caldo Luria
CsCl	cloruro de cesio
cm	centrímetero
cpm	cuentas por minuto
CTP	citidina 5' trifosfato
DA	daltons
DEAE	dietilaminoetil
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gramo

G	guanina
GTP	guanosina 5' trifosfato
hrs	horas
I	índice
Kpb	miles de pares de bases
KV	miles de voltios
l	litro
M	molar
m	metilación
mA	miliampere
mg	milígramo
ml	mililitro
mM	milimolar
2-ME	2-mercaptoetanol
N	normal
nm	nanómetro
NP-40	nonidet P-40
P	peso
pb	pares de bases
PM	peso molecular
PPO	2,5-difenil oxazole
POPOP	(1,4-bis 2-(4-fenil-2-oxazolil) benceno; 2,2'-p-fenileno-bis 5-fenil oxazol)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
T	timina

TCA	ácido tricloroacético
TTP	timidina 5' trifosfato
TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
tRNA	ácido ribonucléico de transferencia
μCi	microcurie
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
v	volumen
ρ	densidad

INTRODUCCION

Euglena gracilis var. *bacillaris* es un eucarionte unicelular flagelado y fotosintetizador. Desde un punto de vista taxonómico se ha clasificado como protozoo y en este caso se le ubica en la clase Phytomastigophorae, orden Euglenida (Comité de Taxonomía y Problemas Taxonómicos de la Sociedad de Protozoólogos, 1964). Alternativamente, en una clasificación botánica moderna, propuesta por Christensen (1962), se le ha ubicado en la clase Euglenophyceae, orden Euglenales.

Con posterioridad a las clasificaciones mencionadas, Stanier (1970), reactualizó en forma definitiva el reino Protista propuesto por Haeckel en 1866. Según Stanier, *Euglena* constituye un género de la sub-división algas de los protistas superiores.

El estudio taxonómico del género *Euglena* muestra que su ubicación filogenética es poco clara, ya que los microorganismos pertenecientes a este género poseen características que permiten se les considere como organismos "semejantes a vegetales" o "semejantes a animales". Entre las características fundamentales que poseen estos organismos podemos citar las siguientes (Buetow, 1968):

- a) realizan fotosíntesis vegetal, ya que poseen cloroplastos;
- b) no poseen pared celular, pero sí una cubierta externa denominada película o periplasto, cuya rigidez es variable;
- c) son organismos móviles, en los que se pueden encontrar uno, dos y hasta tres flagelos por célula;
- d) todos son unicelulares.

Casi todos los estudios experimentales con el género *Euglena*, se han desarrollado en la cepa denominada *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, dado que presenta la capacidad de sobrevivir y crecer heterotróficamente, por un número indefinido de generaciones.

En *Euglena gracilis* el núcleo es octaploide y no se ha observado reproducción sexual (Schiff y Epstein, 1966), lo que ha impedido realizar los análisis genéticos convencionales. Estos hechos han determinado que el interés de los investigadores se haya orientado hacia el estudio de los 3 sistemas genéticos extracromosómicos de este organismo: el DNA cloroplástico, el DNA mitocondrial y un pequeño DNA circular plasmidial.

Las mitocondrias de *Euglena* son organelos de 0,5 a 1,0 μm de ancho y de 1,0 a 3,0 μm de largo y en este organismo existen 200 a 500 mitocondrias por célula. (Edelman y cols., 1966). En estos organelos tiene lugar la fosforilación oxidativa que constituye la fuente principal de producción de

energía celular en la forma de ATP.

Desde un punto de vista estructural las mitocondrias están formadas por dos membranas distintas, externa e interna, las que definen dos compartimientos a los que se les denomina cámara mitocondrial externa e interna respectivamente (Tzagoloff, 1982; Hanson y Day, 1980). La membrana interna se invagina formando las denominadas crestas mitocondriales las que son variables en forma y número.

Se ha observado que la estructura y función de las mitocondrias se han mantenido virtualmente invariables a través de la evolución (Grivell, 1983).

Existen claras evidencias que las mitocondrias poseen sistemas de mantención, replicación y expresión de la información codificada en un genoma residente en el organelo (Borst, 1972). Ellas tienen su propio DNA (Van Brugen y cols., 1966; Nass, 1969; Leaver y Gray, 1982), ribosomas (Kuntzel y Noll, 1967), t-RNA sintetasas (Heckman y cols., 1978; Leaver y Gray, 1982) y parte del resto de los componentes de la maquinaria de síntesis proteica (Schatz y Nason, 1974; Leaver y Pope, 1976). A pesar de esto, genéticamente las mitocondrias son organelos semi-autónomos ya que son independientes del genoma nuclear sólo parcialmente. Experimentos *in vivo* en levaduras indican que la formación de mitocondrias capaces de respirar, requiere de la síntesis de proteínas dentro de la mitocondria (Clark-Walker y Linnane, 1966) y de la cooperación

de la maquinaria de síntesis proteica citoplasmática (Sebald y cols., 1969; Schatz y Saltzaber, 1969; Schatz y Nason, 1974).

El DNA mitocondrial se ha caracterizado aproximadamente, sólo en un 20% de los organismos eucariontes y de este porcentaje la mayoría de los estudios detallados se han hecho en metazoarios (Gillham y Boynton, 1981). Por lo tanto, hay una carencia de información importante, respecto de las características de los genomas mitocondriales de protistas y eumetazoos inferiores.

El estudio de secuencias de algunos DNA mitocondriales a diferentes niveles de la escala filogenética ha revelado que este sistema genético no sigue la regla de la universalidad del código genético, ya que existen codones cuya decodificación es diferente. Las mitocondrias tienen su propia versión del código genético, la que además presenta variaciones en diferentes organismos. Así por ejemplo, las mitocondrias de mamíferos utilizan AGA y AGG como señales de término de lectura, en vez de codificar para el aminoácido arginina y traducen AUA como metionina en vez de isoleucina. En cambio, en las mitocondrias de *Neurospora* y *Aspergillus* los codones AGA, AGG y AUA se traducen de acuerdo a las reglas que establece el código universal (Borst y Grivell, 1981; Grivell, 1983). Este mismo tipo de estudios, ha mostrado además que las mitocondrias utilizan un número menor de tRNA(s) que

el mínimo necesario (32 tRNA(s)) para leer los 64 codones del código (Grivell, 1983). Este hecho contraviene lo establecido por la hipótesis oscilatoria de Crick (Grivell, 1983; Watson, 1974).

Los datos sobre DNA mitocondrial de eucariontes unicelulares, demuestran que estos DNAs son muy variables en forma, tamaño y organización genética (Douglas, 1982). Por el contrario, en metazoarios presentan forma y tamaño uniformes y los genes están organizados siguiendo un mismo patrón de ordenamiento, lo que ha permitido estudiar en detalle su capacidad de codificación genética (Douglas, 1982).

Hasta ahora, en el DNA mitocondrial de eucariontes unicelulares se han descrito tres tipos de configuraciones: circular, lineal y agregados de círculos pequeños y grandes. La forma monomérica circular es la más común y ha sido encontrada en el DNA mitocondrial de hongos (Clark-Walker y cols., 1973; O'Connor y cols., 1975; Cummings y cols., 1979), mohos (Bohnert, 1977), algas (Ryan y cols., 1978) y algunos protozoos (Mery-Drugeon y cols., 1981). Moléculas lineales se han observado en los protozoos ciliados *Tetrahymena pyriformis* (Goldbach y cols., 1979) y *Paramecium aurelia* (Godbard y Cummings, 1975) y en el hongo *Hansenula mrakii* (Clark-Walker y cols., 1978). Finalmente, se ha encontrado DNA mitocondrial compuesto por agregados muy complejos de círculos grandes y pequeños exclusivamente en el cinetoplasto de los

Tripanosomatidae (Borst y cols., 1979). A diferencia de lo observado en los unicelulares, en metazoarios todos los DNAs mitocondriales estudiados son circulares (Douglas, 1982). En eucariontes unicelulares, las variaciones de tamaño del DNA mitocondrial son también muy amplias. A modo de ejemplo, se puede citar el peso molecular (PM) de los genomas mitocondriales de: *Saccharomyces cerevisiae* con 46 a 52 x 10⁶ daltons (Gillham, 1978); *Chlamydomonas reinhardtii*, con 9.8 x 10⁶ daltons (Gillham, 1978); *Kloeckera africana* con 17.9 x 10⁶ daltons (Clark-Walker y cols., 1981) y *Trypanosoma brucei*, cuyos círculos grandes tienen un peso molecular de 13 x 10⁶ daltons y los círculos pequeños de 0.56 x 10⁶ daltons (Borst y Fase-Fowler, 1979; Borst y Hoeijmakers, 1979). Esta variación no se presenta en el caso de los organismos pluricelulares, cuyos DNA mitocondriales son muy homogéneos y sus pesos moleculares están dentro de un rango de tamaño que va desde 9.4 a 12.35 x 10⁶ daltons. Por ejemplo, el DNA mitocondrial de *Drosophila melanogaster* tiene un peso molecular de 12.35 x 10⁶ daltons (Fauron y Wolstenholme, 1976), el de *Ratus norvegicus* es de 9.8 x 10⁶ daltons (Brown y cols., 1979) y el de *Homo sapiens* es de 9.6 a 10.2 x 10⁶ daltons (Brown y cols., 1979; Ojala y Attardi, 1977).

En los eucariontes unicelulares la organización de los genes mitocondriales también es variable; en cambio, los metazoarios tienen esencialmente la misma organización

(Douglas, 1982).

En general, entre las características o propiedades del material genético necesarias de establecer están el peso molecular (PM), composición de bases, secuencia, forma y organización de los genes. Todas ellas permiten configurar una interpretación más exacta del rol del DNA mitocondrial en la función celular de un determinado organismo. Por ejemplo, la determinación del tamaño del DNA en un organelo es fundamental, en relación con la información potencial que pueda codificar, lo cual indicaría su grado de independencia frente a la información que proviene del DNA nuclear.

En el caso de *Euglena gracilis*, un análisis crítico de la literatura científica referente al DNA mitocondrial de muestra la existencia de diferencias marcadas en las determinaciones de peso molecular, forma y contenido de GC.

Así, las determinaciones del peso molecular de este DNA mitocondrial realizadas analizando su velocidad de sedimentación en gradientes de densidad de sacarosa, dieron un valor estimado en 3.5 a 3.7×10^6 daltons (Ray y Hanawalt, 1965; Crouse, 1974). Por otra parte, Schori y cols. (1970) midieron el largo de contorno de este DNA mediante microscopía electrónica y obtuvieron valores de 0.6 a $1.9 \mu\text{m}$, con una distribución media de 0.9 a $1.7 \mu\text{m}$, lo que corresponde a un peso molecular de 1.86 a 3.52×10^6 daltons. Estos valores difieren de lo encontrado posteriormente por Manning y cols.

(1971), quienes empleando el mismo tipo de estudio, encontraron que el DNA mitocondrial de *Euglena* presenta moléculas con una amplia distribución de tamaño que va desde 1 a 19° μm , con una longitud promedio de 13 μm , a la que corresponde un peso molecular de 27.3×10^6 daltons. Los estudios por microscopía electrónica de Nass y cols. (1972) y de Margit y cols. (1974), encontraron moléculas de 0.9 a 1.0 μm de largo, lo que equivale a un peso molecular de 1.9×10^6 a 2.1×10^6 daltons.

Talen y cols. (1974) determinaron la complejidad genética del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, basándose en experimentos de renaturación de DNA. Según estos autores, a esta complejidad genética corresponde un peso molecular de 36 a 45×10^6 daltons.

Por otra parte, Crouse y cols. (1974) establecieron un peso molecular de 43×10^6 daltons para el DNA mitocondrial de *Euglena*. Este valor lo obtuvieron suponiendo que por cada molécula de DNA mitocondrial existe un sólo cistrón para RNA ribosomal, molécula que tiene un peso molecular de 1.6×10^6 daltons y cuyo porcentaje de hibridización con el DNA mitocondrial es de 3.7%. Posteriormente, Crouse y cols. (1974 a) determinaron un peso molecular aún más alto, cuyo valor fue de 100×10^6 daltons.

El análisis de estos resultados permite ubicar el DNA mitocondrial de *Euglena* en los extremos de los rangos de

tamaño descritos para los DNA mitocondriales. Si se acepta un peso molecular de 2×10^6 daltons, este DNA sería el más pequeño entre los DNA mitocondriales conocidos. Contraponiéndose a lo anterior, aceptar un peso molecular de 100×10^6 daltons ubicaría a este genoma dentro de los mayores DNA de mitocondrias de protistas superiores. Estos dos extremos podrían implicar capacidades de codificación muy diferentes

También se han realizado experimentos para establecer la forma del DNA mitocondrial de *Euglena*. Diferentes investigadores han demostrado la existencia sólo de moléculas lineales (Schori y cols., 1970; Nass y Ben-Schaul, 1974; Manning y cols., 1971). Coincidentemente, todos estos investigadores emplearon shock osmótico para romper las mitocondrias.

La utilización de otros métodos para purificar el DNA mitocondrial, permitió a Nass y cols. (1974) mostrar que éste es lineal bajo la mayoría de las condiciones de estudio, existiendo sin embargo, un pequeño porcentaje de minicírculos de $1 \mu\text{m}$ de tamaño. En consecuencia, estos autores plantean la posibilidad que en la mitocondria de *Euglena* coexistan tanto moléculas lineales como circulares.

El contenido de bases púricas y pirimídicas en este DNA también es discrepante, presentando variaciones según el método usado en las determinaciones. El porcentaje de G + C calculado a partir de la temperatura de fusión del DNA, es

de 19%. En cambio, cuando el cálculo se hace considerando la densidad de flotación del DNA en un gradiente de cloruro de cesio, se obtienen porcentajes que van desde 25 - 33%. Estas diferencias, según Fonty y cols. (1975), pueden ser consecuencia de un raro efecto que producirían los abundantes segmentos de secuencias A + T presentes en el DNA mitocondrial de *Euglena*.

La existencia de segmentos ricos en A + T podría también explicar que este DNA no muestra una cinética clásica de renaturación. Más aún, este hecho ha impedido estudiar el largo de secuencias únicas con la metodología que generalmente se aplica a DNAs de organelos, problema que en el caso del DNA de mitocondrias de *Euglena*, necesariamente deberá ser abordado empleando otras técnicas (Edelman, 1981). Por lo tanto, de la revisión bibliográfica referente al DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se concluye que: 1) se han descrito distintos valores de peso molecular y contenido de G + C, 2) no hay acuerdo respecto a su forma, 3) no existen estudios de las características de migración de este DNA por electroforesis en geles de agarosa y, 4) no se dispone de un mapa físico de este DNA.

Considerando lo anteriormente dicho, es importante y de interés lograr la caracterización completa y precisa de las propiedades del genoma mitocondrial de *Euglena gracilis*, ya que sólo sobre la base de estos datos se puede llegar a

una interpretación más exacta de la función del DNA mitocondrial en la fisiología celular de este organismo.

Con el objeto de estudiar el peso molecular y la forma del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* en esta tesis, se propone como primer objetivo:

Analizar el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris* por electroforesis en geles de agarosa y someterlo a la acción de endonucleasas de restricción.

La determinación de la capacidad codificante del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* es importante para estudiar su rol genético. Si el genoma mitocondrial de *Euglena* tiene un peso molecular de 3×10^6 daltons, podría codificar para 10 proteínas de peso molecular 15.000. Si el peso molecular fuera de 40×10^6 daltons, podría codificar para 133 proteínas de peso molecular 15.000. Por lo tanto, la resolución de las discrepancias en el peso molecular de este genoma, deben ser rigurosamente investigadas.

De la bibliografía existente, no se deduce ninguna explicación para las variaciones encontradas en el tamaño de este DNA. Todos los investigadores han empleado técnicas de aislamiento del DNA que contemplan precauciones para evitar la acción de nucleasas endógenas y la ruptura de la molécula

por causas mecánicas.

A pesar de ésto, en ningún caso se puede excluir la posibilidad de degradación o ruptura del DNA durante el proceso de purificación.

Se ha demostrado la presencia de desoxirribonucleasas en las mitocondrias de levaduras (Zeman y Lusena, 1975), de *Neurospora crassa* (Linn y Lehman, 1965a, Linn y Lehman, 1965) y de células de mamíferos (Durphy y cols., 1974).

En la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito diferentes actividades enzimáticas que rompen el DNA endonucleolíticamente. En 1975, Zeman y Lusena describieron una actividad DNásica similar a la nucleasa microcócica, la cual digiere diferencialmente los segmentos ricos en A + T presentes en la molécula. Los autores plantean que esta endonucleasa podría estar involucrada en el proceso de recombinación del material genético mitocondrial en la levadura.

Posteriormente, Jacquemin-Sablón y cols. (1979) describieron tres actividades DNásicas distintas presentes en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*. Dos de ellas actúan sobre DNA de doble hebra y la tercera corta una sola de las hebras de un DNA circular covalentemente cerrado. Estas tres DNAsas corresponden a endonucleasas y forman un complejo enzimático que está fuertemente ligado a fracciones de membrana de la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*. El rol de

ellas, parecería estar relacionado con la inducción de la mutación "petite" por brumuro de etidio en éste organismo.

En el año 1980, Morosoli y Lusena aislaron otra endonucleasa en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*, la que también está ligada a fracciones de membrana, pero cuyas características demostraron que era distinta de las anteriores. El rol fisiológico de esta endonucleasa es difícil de determinar y según los autores podría estar involucrada en la eliminación de errores de apareamiento o para romper las uniones de las regiones espaciadoras ricas en A + T.

Considerando lo anteriormente dicho, como una posibilidad para explicar las variaciones encontradas en el tamaño y la forma del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, en esta Tesis se propone que la mitocondria de *Euglena gra*-*cilis* posee un(os) sistema(s) enzimático(s) "modificador(es)" el(los) que podría(n) eventualmente linearizar o degradar la especie nativa de este DNA. Como consecuencia de ésto, podrían obtenerse DNAs con diferentes formas y tamaños.

Basándose en esta proposición, se plantea como segundo objetivo:

Demostrar la existencia de desoxirribonucleásicas en la mitocondria de *Euglena gracilis* y establecer su ubicación dentro de los compartimientos mitocondriales.



Finalmente, se propone como tercer objetivo:

Clonar el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

Al disponer de clones con esta molécula integrada aumentan las posibilidades de estudiar la estructura y función del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

1. Material Biológico

1.1 Cepas: *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; el organismo utilizado en los estudios realizados en esta tesis fue donado por el Dr. Jerome Schiff, Brandeis University.

E. coli JM83 (*ara*, Δ *lac-pro*, *strA*, *thi*, ϕ 80 *dlacZ*, Δ M15, *amp^S*) y *E. coli* C-600 (*F⁻*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ^-), se obtuvieron del laboratorio del Dr. Antonio Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

1.2 Enzimas: las endonucleasas de restricción: *AvaII*, *BamHI*, *BglI*, *BglII*, *DdeI*, *EcoRI*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaI*, *HaeIII*, *MboI*, *MspI*, *PstI*, *SacII*, *SalI*, *SmaI*, *SstI*, *TthI*, *XbaI*, *XmaI* y *XhoI*, en concentraciones que variaron entre 500 - 2000 unidades/ml, fueron obtenidas de Bethesda Research Laboratories,

Inc. De este mismo laboratorio se obtuvieron DNA polimerasa de T₄, fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, DNA ligasa de T₄ y Fosfatasa alcalina. RNasa A de páncreas de bovino, Proteínasa K y Lisozima de Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A. DNasa I de páncreas de bovino se obtuvo de Worthington Biochemical Corporation.

- 1.3 Acidos desoxirribonucleicos: DNA de timo de ternera se obtuvo de Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.; DNA de *E. coli* K12 de General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio; DNA del bacteriófago λ de Bethesda Research Laboratories, Inc.; DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII se obtuvo de Bio. Labs. Inc., U.S.A.; DNA de pBR322 y de pBR325 fueron obsequiados por el Profesor Sergio Pichuantes, Departamento de Biología Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile. DNA de pUC18 se obtuvo del laboratorio del Dr. Antonio Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

2. Reactivos Químicos y Material Cromatográfico.

De Sigma, St. Louis, U.S.A., se obtuvo: agarosa, bromuro de etidio, bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cesio, cloruro de magnesio, celulosa fosfato, dodecil

sulfato de sodio, DEAE celulosa DE-52, digitonina, Tritón X-100, X-gal, ATP, CTP, GTP, TTP, 5-metilcitosina, 6-metilaminopurina y 2-mercaptoetanol.

De Merck, Darmstadt, Alemania: acetato de amonio, acetato de potasio, acetato de sodio, alcohol butílico secundario, alcohol isoamílico, alcohol isopropílico, acetona, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, butanol, cloruro de calcio, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, dietiléter, EDTA, etanol absoluto, glicerol, glucosa, hidróxido de sodio, molibdato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de magnesio, sulfato de zinc, trizma base y tetróxido de osmio.

De BDH Chemical Ltd., Poole England, se obtuvo: albúmina de suero de bovino, cloruro férrico, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloroformo y fenol.

De BBL se obtuvo caldo corriente.

Fosfato monoácido de amonio se compró a Riedel-De Hæn A.G.

Extracto de levadura, Triptona y agar Sabouraud se adquirieron a Difco.

A Matheson Coleman y Bell se adquirió fosfato monobásico de potasio.

Ampicilina, cianocobaloamina y penicilina G-sódica se compraron en el comercio local.

La sacarosa se adquirió a Schwarzmann, U.S.A.

Bio Gel A50 m fue comprado a Bio Rad, California, U.S.A. Adenina, citosina, guanina y timina se obtuvieron de California Foundation for Biochemical Corporation, U.S.A. Filtro de nitrocelulosa de Millipore Filter Corporation. Tiamina de NBC, U.S.A.

$|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP de New England Nuclear, Boston, Mass., fue gentilmente donado por la Dra. Liliana Cardemil, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

De Poly Sciences se obtuvo: acetato de uranilo, cacodilato, citrato de plomo y epón.

3. Medios de cultivo

3.1 Medio de cultivo de *Euglena gracilis* (M. de Cramers y Myers).

El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Cramer y Myers (1952) y modificado por Buetow y Paddilla (1963).

Dicho medio contiene: 1.0 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, 1.0 g de KH_2PO_4 , 0.2 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2.3 mg de $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mg de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 645 mg de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3.0 mg de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1.8 mg de $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.17 g de CaCl_2 , 0.2 M etanol, 0.02 mg de

tiamina-HCl, 0.01 mg de vitamina B₁₂, 48 mg de penicilina sódica G y agua destilada hasta completar 1 litro. Los componentes del medio de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 30 minutos, con la excepción de las vitaminas y la penicilina que lo fueron por filtración a través de Millipore y las que fueron agregadas en el momento de inocular el cultivo.

Este medio de cultivo se puede preparar sólido agregando agar al 1% final.

3.2 Caldo corriente (CC): contiene 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne y 5 g de cloruro de sodio por litro de agua destilada. En el caso del caldo corriente Difco que viene con todos los componentes se utilizó 8 g para 1 litro de agua destilada.

3.3 Caldo Luria (CL): contiene 10 g de triptona, 5 g de cloruro de sodio y 5 g de extracto de levadura por litro de agua destilada.

3.4 Agar Sabouraud (AS): contiene 10 g de peptona, 40 g de glucosa y 15 g de agar por litro de agua destilada. En el caso del agar Sabouraud Difco que viene con todos los componentes se utilizó 65 g para 1

litro de agua destilada.

II. METODOS

1. Obtención de una cepa blanqueada de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

En todos los experimentos se utilizó una cepa blanqueada de *Euglena gracilis* var. *bacillaris* (EgB1) que se obtuvo a partir de la cepa fotosintética silvestre.

La cepa EgB1 se obtuvo creciendo la cepa silvestre en 10 ml de medio de cultivo, en ausencia de luz y a 20°C y transfiriendo el cultivo tantas veces como fue necesario, hasta que no recuperó su color verde al ser expuesta nuevamente a la luz. Este cultivo, mantuvo su calidad de cepa blanqueada a lo largo del desarrollo de los experimentos.

2. Mantención de las cepas de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

La cepa silvestre y la cepa EgB1 de *Euglena gracilis* se mantuvieron en el medio de Cramers y Myers (Materiales, Sección 3.1) en cultivo líquido o sólido, a 20°C. La cepa EgB1 se mantuvo en ausencia de luz.

3. Criterios de pureza de los cultivos.

Los cultivos utilizados fueron rutinariamente examinados para descartar la posibilidad de contaminación con bacterias, levaduras y hongos. Este exámen consistió en tomar muestras y realizar tinción de Gram y observar al microscopio para descartar la presencia de bacterias y levaduras. En los casos que se estimaron dudosos se procedió a sembrar una muestra en caldo corriente (Materiales, Sección 3.2), incubando a 37°C por 24 horas, para inducir el desarrollo de bacterias o levaduras contaminantes, después de lo cual se procedió a hacer una nueva tinción de Gram.

La presencia de hongos se descartó por observación del cultivo al fresco, o por cultivo de muestras a 32°C por 48 horas en Agar Sabouraud (Materiales, Sección 3.4), un medio especial para el desarrollo de estos microorganismos.

4. Cultivo Celular

Las células se cultivaron en ausencia de luz a 25°C en un fermentador Microferm Fermentor (New-Brunswick Scientific Co. Inc.), con agitación (2.000 rpm/min) y aireación (4 litros/min) constantes.

Se inocularon 12 litros de medio de Cramers y Myers con EgB1 proveniente de un cultivo en fase estacionaria temprana de crecimiento. La concentración inicial de células en los 12 litros fue de 1×10^4 cel/ml; el recuento celular se determinó en la cámara de Neubauer para recuento de glóbulos rojos.

En estas condiciones se obtuvo una curva estandar de crecimiento, en la que la fase exponencial duró hasta el sexto día. La fase estacionaria presentó una concentración de 8.5×10^6 cel/ml al noveno o décimo día (Fig. 1). En todos los cultivos realizados en este trabajo, las células se cosecharon en fase exponencial cuando la concentración llegó a 2×10^6 cel/ml (día 5).

5. Cosecha de las células

La cosecha se realizó mediante centrifugación a $8.000 \times g$, usando el rotor SS-34 equipado con un sistema KSB de flujo continuo, en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. Una vez sedimentadas, las células se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), EDTA 0.1 mM (Tampón 1) y se lavaron 2 veces con la misma

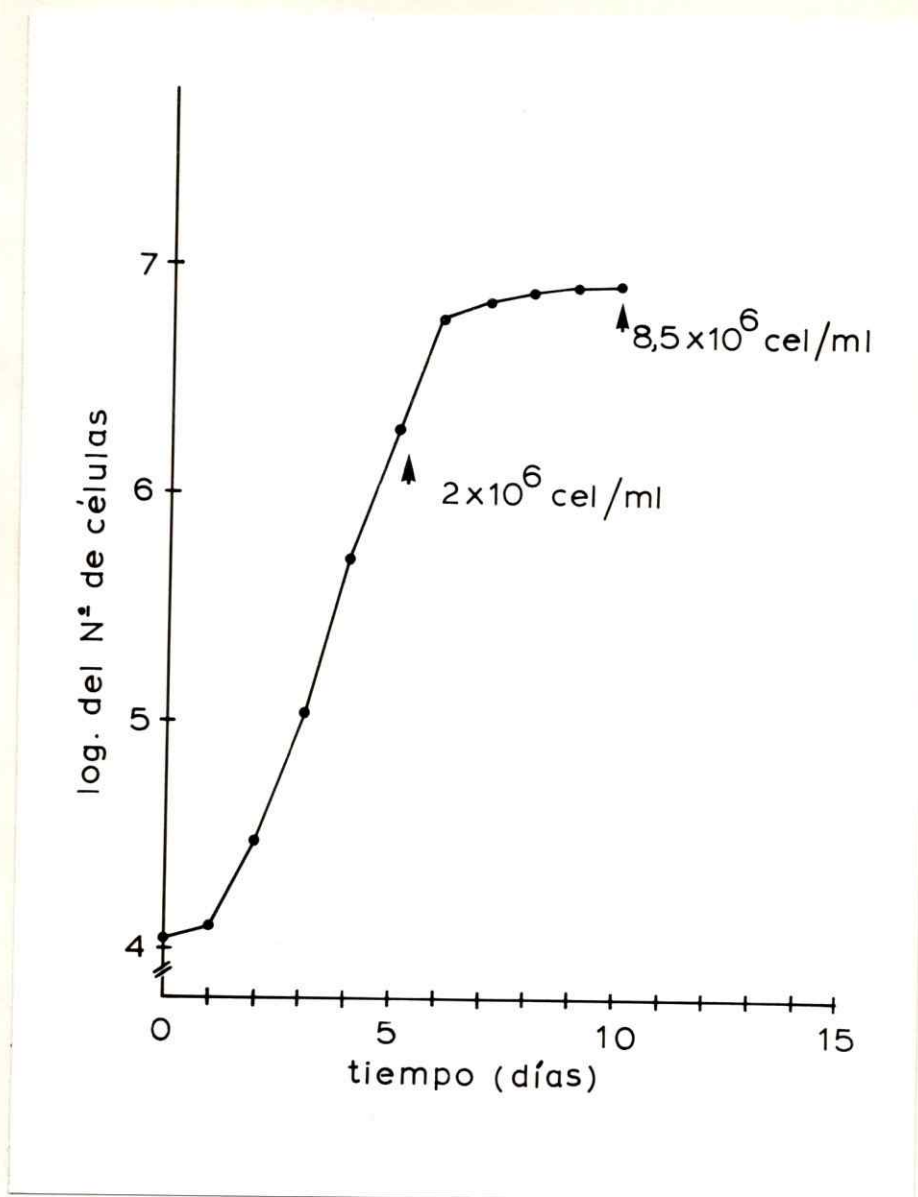


FIG. 1. Curva de crecimiento de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

Se utilizó el medio de cultivo descrito por Crammer y Myers (1952), modificado por Buetow y Padilla (1963). A distintos tiempos se contó el número de células en una cámara de Neubauer. El número de células inoculadas en el tiempo 0 fue de 1×10^4 células/ml y se alcanzó un máximo de $8,5 \times 10^6$ células/ml después de 10 días de incubación a 25°C en ausencia de luz. La fase de crecimiento logarítmica alcanzó su máximo al 6° día de incubación. En todos los ensayos realizados las células fueron cosechadas al 5° día, cuando la concentración alcanzó 2×10^6 células/ml.

solución. Después de sedimentarlas a 1.000 x g, las células se congelaron a -20°C , en los casos en que no se utilizaron de inmediato.

6. Ruptura celular y obtención de la fracción mitocondrial.

Después de revisar la literatura con el objeto de encontrar la técnica adecuada para obtener la fracción mitocondrial de *Euglena gracilis* se constató que dentro de los métodos descritos no existía acuerdo en cuanto a los valores de presiones utilizados en Prensa French (Aminco) para la ruptura de las células, ni en los g empleados para la sedimentación de la fracción mitocondrial. Debido a esto, se procedió a escoger aquella técnica que permitiera obtener una fracción mitocondrial lo más preservada posible y que presentase al mismo tiempo un buen rendimiento.

Se eligió la técnica descrita por Krawiec y Eisens-tadt (1970), cuyo protocolo se presenta en la Fig. 2. Sin embargo, se le introdujo modificaciones sustanciales en las etapas de ruptura celular y sedimentación de la fracción mitocondrial, luego de diversos ensayos para determinar las condiciones óptimas. Los

asteriscos de la Fig. 2, indican las etapas modificadas, lo que fue posible después del estudio que se detalla a continuación:

a) Ruptura celular.

Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0°C y 4°C.

El sedimento celular se resuspendió a razón de 0.5 g de células (peso húmedo) por ml en una solución de sacarosa 0.25 M preaprada en Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), EDTA 0.1 mM y ajustada con HCl 1 N a pH 9.0 final (Tampón 2). Al pasar esta suspensión por Prensa French a 1.000 libras/pulgada² de presión según la técnica de Krawiec y Eisenstadt (1970), se observó una ruptura celular muy pobre. Por lo tanto, se optó por efectuar nuevos ensayos a 1.100, 1.200, 1.300, 1.600, 2.000 y 3.000 libras/pulgada², verificándose el éxito de cada uno de ellos mediante la observación de la suspensión resultante al microscopio óptico. Se estimó el porcentaje de ruptura, comparando el número de células enteras que quedaban con el de la suspensión original (6×10^8 células/ml). Más aún, con el fin de optimizar al máximo el rendimiento de las preparaciones, algunas de ellas

fueron pasadas dos veces por la misma presión, lo que condujo a una mayor ruptura.

De las presiones ensayadas, las que dieron mejor resultado fueron las de: 1.200 libras/pulgada² una y dos veces; 1.300 libras/pulgada² una y dos veces; 2.000 libras/pulgada² una vez y 3.000 libras/pulgada² una vez.

b) Fraccionamiento sub-celular y obtención de la fracción mitocondrial.

Cada uno de los extractos obtenidos a las diferentes presiones de ruptura seleccionadas (1.100, 1.200, 1.300, 1.600, 2.000 y 3.000 libras/pulgada²) se diluyó con 5 volúmenes de una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1. Las suspensiones se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min en una centrifuga refrigerada Sorvall RC2-B, para eliminar núcleos y restos celulares. Esta operación se repitió hasta que no hubo sedimento, o éste se consideró despreciable.

En la etapa siguiente, a partir del sobrenadante de 1.000 x g se realizó la sedimentación de mitocondrias. Se ensayaron diferentes velocidades de sedimentación, ya que a 5.000 x g como se indicaba en

la técnica de Krawiec y Eisenstadt, se obtenía un rendimiento mitocondrial pobre, según se verificó mediante observación al microscopio electrónico de cortes ultrafinos de estas preparaciones, realizadas de acuerdo a la técnica detallada en Métodos (Sección 34.1).

Las velocidades de sedimentación ensayadas fueron de 5.000 x g, 7.000 x g y 10.000 x g durante 20 minutos. La observación de estos sedimentos al microscopio electrónico, permitió decidir las condiciones bajo las cuales el rendimiento y preservación de la fracción mitocondrial fueron las óptimas. Estos datos se resumen en la Tabla 1.

Con respecto a la ruptura celular, se estableció que valores de presión de 1.000 libras/pulgada² y 1.100 libras/pulgada² eran insuficientes para obtener un buen rendimiento, a pesar que la preservación de las mitocondrias era adecuada. Por otra parte, presiones de 1.200 libras/pulgada² por una o dos veces eran las más apropiadas; mientras que aquellas sobre 1.200 libras/pulgada² provocaban una buena ruptura celular pero dañaban las mitocondrias.

En cuanto al fraccionamiento celular, se obtuvo sedimentos a las 3 velocidades señaladas siendo la de óptimo rendimiento aquella de 10.000 x g.

TABLA N° 1

Rendimiento de ruptura celular y preservación de la fracción
mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*

Presión de ruptura celular (libras/pulgada ²)	N° de veces presionadas	% de células rotas en una muestra de 6×10^8 cel/ml	observación de mitocondrias al microscopio electrónico													
			Mitocondrias enteras.	Mitocondrias rotas.												
1.000	1	20 %	no hay preparación	no hay preparación												
1.100	1	30 %	+	+												
1.100	2	50 %	++	+												
1.200	1	60 %	+++	+												
1.200	2	99 %	++++	+												
1.300	1	100 %	+++	++												
1.600	1	100 %	++	+++												
2.000	1	100 %	+	++++												
3.000	1	100 %	-	+++++												
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 15%;">+</td> <td style="width: 15%;">= 0-10%</td> <td style="width: 15%;">+++</td> <td style="width: 15%;">= 50%</td> <td style="width: 15%;">+++++</td> <td style="width: 15%;">= 100%</td> </tr> <tr> <td>++</td> <td>= 10-40%</td> <td>++++</td> <td>= 75%</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>					+	= 0-10%	+++	= 50%	+++++	= 100%	++	= 10-40%	++++	= 75%		
+	= 0-10%	+++	= 50%	+++++	= 100%											
++	= 10-40%	++++	= 75%													

Para todos los ensayos posteriores se decidió utilizar una presión de 1.200 libras/pulgada² por dos veces para romper las células y una centrifugación del sobrenadante de 1.000 x g a 10.000 x g durante 20 minutos, después de lo cual se obtuvo la fracción mitocondrial cruda.

Esta fracción se resuspendió en una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1 y se lavó dos veces en las mismas condiciones.

En la Fig. 3 se presenta el protocolo establecido en este trabajo para el aislamiento de la fracción mitocondrial de *Euglena gracilis*.

Las fracciones mitocondriales fueron usadas de inmediato o congeladas a -20°C, para ser usadas en experimentos posteriores. Las mitocondrias pueden mantenerse a -20°C durante 3 a 6 meses, sin pérdida de la gran mayoría de las actividades mitocondriales, según lo descrito por Kislev y Eisenstadt (1972).

7. Tratamiento de la fracción mitocondrial con desoxirribonucleasa pancreática.

Con el objeto de degradar el DNA exógeno contaminante, se realizó un tratamiento enzimático de los sedimentos mitocondriales crudos con

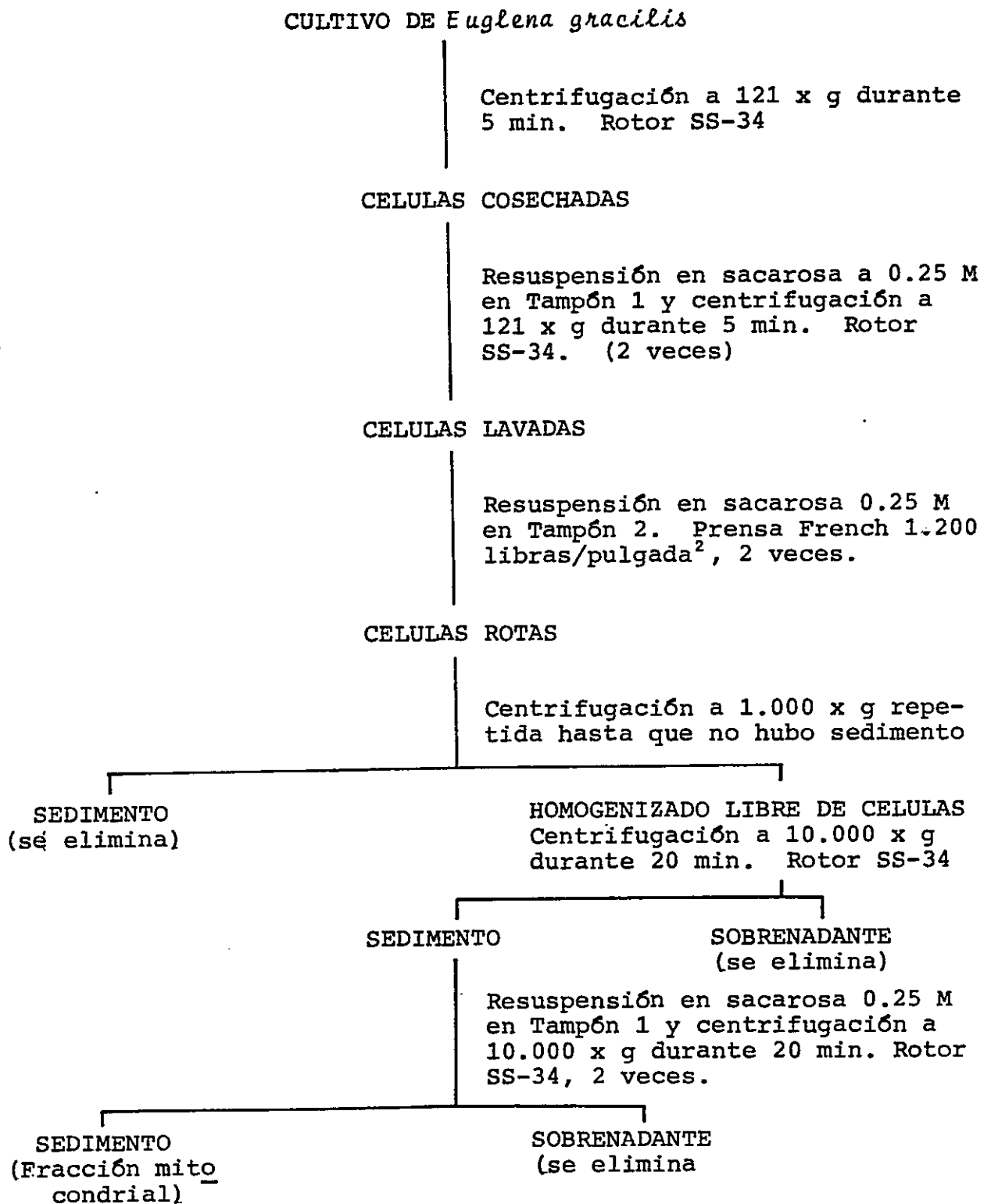


FIG. 3. Esquema de la técnica establecida en este trabajo para el aislamiento de la fracción mitocondrial.

desoxirribonucleasa pancreática, de acuerdo a lo descrito por Edelman y cols. (1966) y Talen y cols. (1974). Estos fueron resuspendidos a razón de 20 mg de proteína en 1 ml de sacarosa 0.25 M, 5 mM $MgCl_2$ al que se le agregó 100 $\mu g/ml$ de desoxirribonucleasa I de páncreas de bovino. Cada suspensión se incubó a 37°C durante 60 minutos. La reacción se detuvo agregando dos volúmenes de solución de sacarosa 0.3 M preparada en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM (Tampón 3) a cada uno de ellos. Las suspensiones se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos para sedimentar las mitocondrias, repitiéndose el lavado una vez más.

8. Purificación de la fracción mitocondrial.

Sedimentos mitocondriales equivalentes a 120 mg de proteína, tratados con desoxirribonucleasa pancreática o sin éste tratamiento, se resuspendieron en un volumen de 18 ml final de una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1. Tres mililitros de esta suspensión se colocaron sobre la capa superior de una gradiente de sacarosa discontinua de 12 ml, formada por 3 ml de sacarosa 2.2 M, 4 ml de sacarosa 1.45 M y 4 ml de sacarosa 1.15 M. Todas

las soluciones de sacarosa se prepararon en Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), EDTA 3.0 mM, 2-mercaptoetanol 1.0 mM (Tampón 4). Las fracciones se centrifugaron a 111.000 x g (25.000 rpm) durante 45 minutos a 4°C en el rotor SW40 en una ultracentrífuga Beckman L2-65B.

Las mitocondrias purificadas se recuperaron de cada tubo, utilizando una pipeta Pasteur, desde la interfase entre las capas de sacarosa 1.45 M y 1.15 M. Esta fracción se diluyó agregando lentamente dos volúmenes de solución de sacarosa 0.44 M, preparada en Tampón 4. La suspensión se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Estos sedimentos mitocondriales se utilizaron posteriormente para obtener DNA mitocondrial

9. Obtención de mitoplastos por tratamiento con digitonina.

La membrana externa de las mitocondrias se eliminó mediante un tratamiento con digitonina, utilizando la técnica descrita por Cristophe y cols. (1981). Las mitocondrias exentas de membrana externa se denominan mitoplastos. Las mitocondrias purificadas (Métodos, Sección 8), se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1, a una

concentración de proteínas de 1 mg/ml. A esta suspensión se agregó digitonina a una concentración final de 0.5 mg de digitonina/mg de proteína mitocondrial; luego de mezclar se incubó entre 0-4°C durante 5 minutos. El tratamiento con digitonina se detuvo por dilución, agregando 5 volúmenes de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos obteniéndose un sedimento correspondiente a mitoclastos.

10. Purificación de DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial se purificó a partir de sedimentos mitocondriales tratados con desoxirribonucleasa pancreática o con digitonina. Todo el material que contuvo el preparado mitocondrial fue esterilizado. Para establecer las condiciones de lisis de los organelos se ensayó una variedad de tipos y concentraciones finales de detergentes como SDS 1% y 2%; Tritón X-100 0.2% y 1%; Nonidet P-40 1% y mezcla de Tritón X-100 1% y SDS 1%, luego de lo cual se procedió como se detalla a continuación: mitocondrias o mitoplastos se resuspendieron a razón de 10 mg de proteína/ml en Tampón 5 consistente en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), EDTA 4 mM,

2-mercaptoetanol 40 mM, Tritón X100 1%, glicerol 25%.

En algunos casos este Tampón se preparó sin glicerol. A la suspensión se agregó proteinasa K preparada en agua destilada a una concentración final de 100 µg/ml y 72 µl de EDTA 0.1 M por mililitro de suspensión. Luego se incubó a 37°C o 45°C durante 20 minutos; después se adicionó SDS 1% concentración final y se prolongó la incubación por 10 minutos. Luego de enfriar en hielo, el lisado obtenido fue desproteínizado mediante la adición de un volumen de fenol bidestilado y saturado en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 5 mM (Tampón 6) y de un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción de 24:1. La suspensión se mezcló suavemente por inversión del tubo y vuelta a su posición original, durante 15 minutos, después de lo cual se centrifugó a 16.300 x g en el rotor HB-4, en una centrifuga refrigerada Sorval RC2-B. Como resultado de esta etapa se obtuvo la formación de 3 fases, una inferior conteniendo la solución de fenol-cloroformo, una interfase que contuvo las proteínas y una superior conteniendo una suspensión acuosa de ácidos nucleicos (Fase acuosa I). La fase superior se retiró con una pipeta Pasteur estéril, se puso en otro tubo de centrifuga y se le agregó 1 volumen de la

solución de fenol y 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló y se centrifugó en las mismas condiciones ya indicadas en el párrafo anterior.

Se retiró la fase superior (Fase acuosa II) mediante pipeta Pasteur estéril. Con el objeto de eliminar el fenol que hubiese quedado en la Fase acuosa II, se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 mezclando suavemente en la forma ya descrita y centrifugando nuevamente en idénticas condiciones.

Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa III obtenida del paso anterior, se precipitaron agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% mantenido a -20°C . La mezcla se colocó en un congelador a -20°C durante 2 hrs como mínimo o toda la noche, después de lo cual se dejó a temperatura ambiente por 60 minutos, se centrifugó a $16.300 \times g$ por 30 minutos en el rotor HB-4 en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. El sedimento obtenido se secó al vacío durante 10 minutos y se resuspendió en un volumen de 100 μl de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (Tampón 7) o de agua destilada estéril, según el uso que se le fuera a dar a la preparación obtenida.

11. Purificación de núcleos de *Euglena gracilis*.

Las células se resuspendieron en un vaso de precipitado a razón de 3×10^7 cel/ml en una solución de sacarosa al 10% (p/v) y Tritón X-100 al 1% (v/v), preparada en Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), MgCl₂ 6.0 mM (Tampón 8), y agitadas suavemente utilizando un agitador magnético a baja velocidad durante 30 a 60 minutos a 4°C. Transcurrido este período, la suspensión celular se pasó dos veces a través de una Prensa French bajo una presión de 1.500 libras/pulgada². Todo el escurrido se colocó sobre un colchón de sacarosa 40% (p/v), preparado en Tampón 8 y se centrifugó a 1.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento nuclear se resuspendió con una solución de sacarosa al 8% (p/v) y Tritón X-100 al 1% (v/v) preparada en Tampón 8 y se colocó nuevamente sobre un colchón de sacarosa al 40% (p/v) preparado en el mismo Tampón. Luego se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. El sedimento obtenido se resuspendió en una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 8 y se centrifugó por dos veces a 800 x g durante 10 minutos a 4°C.

12. Purificación de DNA de núcleos de *Euglena gracilis*.

Los sedimentos de núcleos obtenidos a partir de 5 g de células (peso húmedo) se resuspendieron en 3 ml de Tampón 5 al que se le agregó una solución de SDS 1% final (p/v). La suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos. El lisado resultante se desproteí nizó mediante la adición de un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. La mezcla se agitó suavemen te por inversión del tubo y vuelta a su posición original durante 15 minutos y se centrifugó a 16.300 x g por 10 minutos en el rotor HB-4 en centrífuga Sorvall refrigerada RC2-B. Luego se extrajo la fase superior acuosa (Fase acuosa I) mediante pipeta Pasteur estéril y se repitió una vez más esta etapa. A la fase acuosa II se le agregó acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% mantenido a -20°C. La suspensión se colocó en un con gelador a -20°C durante toda la noche y luego se centrifugó a 16.300 x g durante 30 minutos en el rotor HB-4 en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. El sedimento obtenido se secó al vacío durante 10 minutos y se resuspendió en 100 μ l de Tampón 7 estéril (*). A esta solución se le agregó ribonucleasa A, previamente calentada a 90°C por 5 minutos, a una

concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. La muestra se desproteinizó nuevamente, para eliminar la enzima, con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 como se describió anteriormente. Con la fase acuosa III resultante del segundo tratamiento se procedió como se indica para la fase acuosa II hasta la resuspensión indicada con asterisco.

13. Eliminación de RNA y otras moléculas contaminantes de la preparación de DNA mitocondrial utilizando columnas de Bio-gel A50m.

Con el objeto de eliminar el RNA contaminante de las preparaciones de DNA mitocondrial obtenidas (Métodos, Sección 10), éstas se resuspendieron a razón de 200 μg de ácidos nucleicos en 300 a 500 μl de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), cloruro de sodio 0.6 M, EDTA 2.5 mM (Tampón 9) y se cargó en una columna de Bio-gel A50m equilibrada con el mismo tampón, el cual fue también utilizado para su elución. Se colectaron fracciones de 1 ml, a las cuales se les midió la densidad óptica a 260 nm, colectándose el primer pico de los dos eluidos. Cuando fue necesario, se cargaron alícuotas de 20 μl de cada una de las fracciones de

este pico en geles de agarosa al 1%, para verificar la presencia e integridad del DNA. Las fracciones que contenían el DNA se mezclaron y precipitaron agregando 2.5 volúmenes de etanol al 95% enfriado a -20°C . La suspensión se colocó en un congelador a -20°C durante toda la noche y luego se centrifugó a $16.300 \times g$ durante 30 minutos en el rotor HB-4 en una centrifuga refrigerada Sorvall RC2-B. El precipitado obtenido se secó al vacío durante 10 minutos y se resuspendió en 100 - 200 μl de agua destilada estéril.

14. Caracterización de DNA mitocondrial mediante gradientes de cloruro de cesio.

100 a 300 μg de DNA mitocondrial fueron disueltos en 7,0 ml de Tampón 7 al que se le agregó 8.9 g de cloruro de cesio según la técnica descrita por Krawiec y Eisenstadt (1970). La suspensión se centrifugó a $139.000 \times g$ (40.000 rpm) durante 40 hrs en el rotor Tipo 65 en una ultracentrifuga Beckman L2-65B. La temperatura de la centrifugación fue de 15°C , y una vez finalizada, se colectaron fracciones de 5 gotas cada una, por punción del fondo del tubo. Con una pipeta Pasteur se tomó una gota de cada fracción y

se le determinó el índice de refracción utilizando un refractómetro Bausch y Lomb ABBE-3L. Luego se agregó a cada una de las fracciones 0.5 ml de cloruro de sodio 0.15 M, citrato de sodio 15 mM (pH 7.5) y se midió la densidad óptica a 260 nm.

Los valores de índice de refracción fueron transformados a valores de densidad utilizando la siguiente fórmula.

$$\rho^{25^{\circ}\text{C}} = 10.8601 \times I \text{ de refracción} - 13.4974$$

La densidad óptica se graficó versus el número de fracciones para relacionar los picos de ésta con la densidad.

15. Marcación de DNA mitocondrial por incorporación *in vitro* de $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP en mitocondrias purificadas en gradientes de sacarosa.

0,8 mg de mitocondrias purificadas (Métodos, Sección 8), fueron resuspendidas en un volumen final de 1 ml de: Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), ditioneitol 2 mM, cloruro de magnesio 20 mM, cloruro de potasio 40 mM, ATP 2 mM, albúmina de suero de bovino 100 μg , dCTP 50 μM , dGTP 50 μM , dATP 50 μM

y $^{32}\text{P-}\alpha$ TTP 200 μCi (actividad específica 2.000 Ci/mM). Después de incubar a 37°C durante 30 minutos, se le agregó TTP sin marcar a una concentración de 10 μM final y se continuó la incubación a la misma temperatura por otros 20 minutos. Luego las mitocondrias se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B y se lavaron dos veces con 600 μl de sacarosa 0.25 M, preparada en Tampón 1.

Para determinar la radioactividad incorporada se tomaron 25 μl de la mezcla anterior y se agregó 1 ml de ácido tricloroacético frío al 10% (p/v) conteniendo pirofosfato de sodio 100 mM. Este material radioactivo se fijó a membranas de nitrocelulosa, por filtración al vacío. Las membranas se lavaron tres veces con un volumen total de 150 ml de ácido tricloroacético al 2% (p/v) conteniendo pirofosfato de sodio 100 mM y luego se secaron bajo una lámpara de luz infrarroja. Las membranas secas se colocaron en frascos que contenían 5 ml de mezcla de centelleo consistente en tolueno-PPO-POPOP.

Para determinar las cuentas por minuto incorporadas, se utilizó un contador de centelleo Beckman LF 100 C, en el canal del fósforo.

16. Electroforesis en geles de agarosa.

Dependiendo del objetivo del experimento, se utilizaron geles de agarosa (Johnson y Grossman, 1977), de distintas concentraciones (0.6 a 1.5%). La cantidad requerida de agarosa se disolvió en Tris-HCl 50 mM, acetato de sodio 40 mM, EDTA 1.0 mM ajustado a pH 8.1 con ácido acético glacial (Tampón 10), calentando hasta ebullición en un ba^ño de agua. Una vez enfriada a 65 - 70°C, la aga^{ra}rosa fue vertida en placas de vidrio (16.5 x 18 cm), se colocó la peineta y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La cantidad de agarosa requerida para un gel del tamaño indicado y con espaciadores de 1.5 mm fue de 50 ml. Una vez que la agarosa solidificó se procedió a sacar la pei^{ne}teta. El gel se colocó en una cámara para electroforesis vertical, y se le puso el Tampón 10 para efectuar la electroforesis. Las muestras en un volumen final de 20 - 50 μ l cada una se mezclaron con 1/10 de su volumen de glicerol 50%, SDS 5%, EDTA 12 mM, azul de bromofenol 0.05% (Tampón 11), se calentaron por 1 a 2 minutos a 65°C y se aplicaron cada una de ellas en un bolsillo del gel. Las muestras se hicieron entrar al gel a 200 mA

por 2 minutos y luego se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA. Cuando la electroforesis se realizó durante la noche, ésta se efectuó a 10 mA.

17. Visualización del DNA en geles de agarosa.

Los geles de agarosa en que se corrieron las muestras con fines analíticos, fueron sumergidos por 10 - 15 minutos en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml en agua destilada, preparada en el momento de usar. Transcurrido este tiempo, los geles se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar el bromuro de etidio libre, después de lo cual se observaron bajo luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron utilizando películas Polaroid tipo PN-55, cuando se necesitó dejar un registro. Se usaron tiempos de exposición variables 1 - 10 min, dependiendo de la intensidad de fluorescencia de las bandas de DNA presentes en el gel.

18. Mediciones de densidad óptica de ácidos nucleicos.

Para determinar la concentración de ácidos nucleicos presentes en las muestras, se midió la densidad óptica a 260 nm, en una celda de 1 cm de largo, en un espectrofotómetro Varian Techtron, modelo 635. Se consideró que 1 unidad de absorban-
cia (OD) a 260 nm corresponde a 50 µg de ácidos nucleicos (Maniatis y cols., 1982).

19. Autorradiografía de geles.

A los geles en los que se analizó el DNA marcado con ^{32}P -α una vez terminada la electrofore-
sis, se les quitó uno de los vidrios y se procedió a cubrirlos con papel de polietileno (Saran Wrap, Unión Carbide Corp., N.Y., U.S.A.) y a sellarlos con cinta adhesiva. Se marcó en ellos el inicio y el final de la corrida. La radiación emitida se imprimió en placas autorradiográficas Kodak X-Omat R con pantalla intensificadora y en sobres negros sellados. La exposición se realizó a -70°C por tiempos variables, dependiendo de la intensidad de emisión de la marca radioactiva. Cumplido el pazo de exposición, las placas se revelaron en un

cuarto oscuro durante 5 minutos con revelador Kodak D-11. Luego de eliminar el exceso de revelador mediante lavados sucesivos con agua destilada, las placas se sumergieron durante 5 minutos en fijador Kodak y se volvieron a lavar varias veces en agua destilada, secándose a temperatura ambiente.

20. Tratamiento del DNA mitocondrial con endonucleasas de restricción.

Un μg de DNA se incubó durante 2 - 4 hrs con 2 - 3 unidades de la enzima utilizada. En algunos casos se usaron hasta 12 unidades de la enzima. Todas las digestiones se realizaron en presencia de 2-mercaptoetanol 0.1% final y las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura fueron las recomendadas por los catálogos correspondientes según el caso. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final máximo de 60 μl , utilizándose de preferencia volúmenes de 10 a 30 μl .

En todos los casos, los productos de las di - gestiones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (Métodos, Sección 16).

Para controlar la funcionalidad de cada una de las endonucleasas de restricción utilizadas, se

empleó DNA del bacteriófago λ como sustrato. En el Apéndice 1 se detalla en número de bandas producto de la digestión de cada enzima sobre el DNA del bacteriófago λ de acuerdo a los patrones descritos y sus secuencias de reconocimiento.

21. Curva de calibración.

Para determinar el peso molecular de los productos de digestión del DNA tratado con las endonucleasas de restricción, en cada electroforesis se utilizó como estándar de peso molecular el DNA del bacteriófago λ después de ser digerido con la enzima de restricción HindIII, (Fiandt y cols., 1977), que da 8 fragmentos de peso molecular conocidos (Apéndice 2). El procedimiento consistió en graficar el peso molecular de cada fragmento del estándar contra su movilidad electroforética en un papel semi-logarítmico. De este modo se obtuvo una curva en donde se interpolaron las migraciones electroforéticas de los fragmentos de peso molecular desconocido.

22. Extracción de DNA mitocondrial con bromuro de cetil-trimetil amonio luego de electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión.

Con el objeto de purificar el DNA mitocondrial a usar en microscopía electrónica y en la obtención de plasmidios recombinantes, éste se sometió a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión desde donde se extrajo con cetil-trimetil amonio (CETAB) (Langridge y cols., 1980). El DNA a purificar se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. La cantidad de agarosa requerida se disolvió en Tris-HCl (pH 7.9) 40 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM y bromuro de etidio 0.5 µg/ml (Tampón 12) y se procedió a preparar el gel según Métodos, Sección 16. El gel se colocó en una cámara para electroforesis horizontal y se usó Tampón 12 para efectuar la electroforesis, la cual se realizó durante la noche a 10 mA. Una vez finalizada, el DNA se visualizó bajo luz ultravioleta de onda corta y se procedió a cortar con un bisturí la banda correspondiente al DNA mitocondrial, la que se depositó en un tubo Eppendorf estéril. El tubo se colocó en un baño a 65°C durante 30 min, para fundir la

agarosa, agitando 2 o 3 veces en un vortex para asegurar la homogeneidad de la fusión. Desde este momento, todas las operaciones se realizaron a 37°C y las soluciones empleadas se mantuvieron a esta misma temperatura. Al tubo se le agregó 1 volumen de una solución de agua-CETAB y 1 volumen de una solución de butanol-CETAB, se mezcló en un vortex y se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 1 min a 37°C. Con una pipeta Pasteur se recogió la fase superior (Fase I) a la que se agregó 1/4 de volumen de acetato de sodio 0.3 M.

La suspensión se agitó en vortex y se centrifugó en las mismas condiciones ya descritas, retirando ahora la fase inferior (Fase II). A la Fase II se le agregó 1 volumen de cloroformo puro, se mezcló en vortex, se centrifugó en una centrífuga Eppendor, durante 2 min a 4°C y se retiró la fase superior (Fase III). A ésta se agregó acetato de sodio 3 M a una concentración final de 2 - 4% (v/v) y 3 volúmenes de etanol al 95% mantenido a -20°C. Esta mezcla se colocó en un congelador a -70°C durante 30 min, luego de lo cual se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 15 min a 4°C. El sedimento obtenido se secó al vacío durante 10 min y se resuspendió en 20 μ l de agua

destilada estéril.

Las soluciones agua-CETAB y butanol-CETAB se obtuvieron de la siguiente forma: se equilibró 125 ml de butanol + 125 ml de agua mezclándolos repetidas veces. Se disolvió 1 g de CETAB en 100 ml de butanol saturado en agua y se agregó 100 ml de agua saturada en butanol. Se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente, hasta que se separaron las fases. Cada fase se pasó a una botella; la fase superior constituyó la solución butanol-CETAB y la fase inferior constituyó la solución agua-CETAB.

23. Tratamiento del DNA mitocondrial con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*.

Con el objeto de estudiar el tipo de extremos presentes en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, se realizó un tratamiento con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Klenow y cols., 1970). Un μg de DNA mitocondrial purificado según la técnica de CETAB (Métodos, Sección 22), se incubó con 1 unidad de fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, durante 1 hora a temperatura ambiente (20°C), en

un volumen final de 20 μ l de: Tris-HCl (pH 7.2) 50 mM, $MgSO_4$ 10 mM, ditiotreitól 0.1 mM, albúmina de suero de bovino 50 μ g/ml (Tampón 13), dATP 120 μ M, dCTP 120 μ M, dGTP 120 μ M y dTTP 120 μ M. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó acetato de amonio 2 M concentración final para precipitar selectivamente el DNA. La mezcla se colocó en un congelador a -70°C durante 30 min y luego se centrifugó en una centrifuga Eppendorf durante 15 min. El sedimento obtenido se secó al vacío durante 10 min y se resuspendió en 100 μ l de agua destilada estéril. El DNA se volvió a precipitar agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% mantenido a -20°C . La mezcla se colocó en un congelador a -70°C durante 30 min, luego de lo cual se centrifugó en las mismas condiciones ya descritas. El sedimento obtenido se resuspendió en 10 μ l de agua destilada estéril.

24. Tratamiento del DNA mitocondrial con la DNA polimerasa del bacteriófago T_4

Con el objeto de estudiar el tipo de extremos presentes en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se realizó un tratamiento con DNA polimerasa

del bacteriófago T₄. Un µg de DNA mitocondrial purificado según la técnica de CETAB (Métodos, Sección 22), se incubó con 0.5 unidades de DNA polimerasa T₄ durante 5 min a 37°C, en un volumen final de 20 µl de Tris-acetato (pH 7.9) 33 mM, acetato de potasio 66 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 0.5 mM, albúmina de suero de bovino 100 µg/ml (Tampón 14), dATP 2 mM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM y dTTP 2 mM. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1 µl de una solución de EDTA 0.5 M y acetato de amonio 2 M final para precipitar selectivamente el DNA. La mezcla se colocó en un congelador a -70°C durante 30 minutos y luego se centrifugó en una centrifuga Eppendorf durante 15 minutos. El sedimento obtenido se secó al vacío durante 10 min y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril. La suspensión se volvió a precipitar agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95% mantenido a -20°C. La mezcla se colocó en un congelador a -70°C durante 30 min, luego de lo cual se centrifugó en las mismas condiciones ya descritas. El sedimento obtenido se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril.

25. Tratamiento del vector de clonamiento pUC18 con fosfatasa alcalina.

Este tratamiento se utilizó con el objeto de eliminar los terminales 5' fosfato del DNA para evitar que el vector linealizado volviese a circularse. Un μg del vector pUC18 (Vieira y Joachim, 1982) linealizado por tratamiento con la endonucleasa de restricción SmaI (Métodos, Sección 20) se incubó con 1 unidad de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) a 37°C durante 30 min, en un volumen final de 20 μl de: Tris-HCl (pH 9.0) 50 mM, MgCl_2 1 mM, ZnCl_2 0.1 mM y espermidina 1 mM (Tampón 15). Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 30 μl de agua destilada estéril y la suspensión se desproteinizó mediante la adición de 1 volumen de fenol bidestilado y saturado (Métodos, Sección 10) y de 1 volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción de 24:1. Luego de mezclar, se centrifugó a temperatura ambiente (20°C), durante 3 min en una centrífuga Eppendorf para separar fases. Con una pipeta Pasteur estéril se recuperó la fase superior (aproximadamente 80 μl) la que cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Luego de efectuada la electroforesis en las condiciones descritas en Métodos (Sección 22) se procedió a extraer el DNA del gel con CETAB (Métodos, Sección 22).

26. Tratamiento con DNA ligasa del bacteriófago T₄

Se utilizó DNA ligasa de T₄ para preparar plasmidios híbridos. Se utilizó 0.2 µg del DNA del vector previamente linearizado, tratado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) (Métodos, Sección 25) y purificado en agarosa de bajo punto de fusión (Métodos, Sección 22) y 1 µg de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* purificado por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. Se realizaron dos mezclas de ligado. En la primera se utilizó el vector y el DNA mitocondrial tratado con Klenow (Métodos, Sección 23) y en la segunda se empleó el vector y la fracción de DNA mitocondrial tratado con DNA polimerasa del bacteriófago T₄ (Métodos, Sección 24). Para obtener las mezclas de ligado, en ambos casos el DNA de vector + el DNA mitocondrial se trataron con 1 unidad de DNA ligasa de bacteriófago T₄ (Weiss y cols., 1968) durante toda la noche a 12°C, en un volumen final de 15 µl de: Tris-HCl (pH 7.5) 66 mM, MgCl₂ 5 mM, ditiotreitól 5 mM y ATP 1 mM (Tampón 16). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla de ligado se diluyó 5 veces con Tampón 7 y se mantuvo a 4°C.

27. Transformación genética de las células.

27.1 Obtención de células competentes.

Como célula receptora de los plasmidios recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* JM83, la cual se cultivó en 3 ml de CL durante toda la noche. De este cultivo se tomaron 0.5 ml para inocular 25 ml de CL., los que se incubaron a 37° C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.3 a 660 nm. Las células se centrifugaron a 6.780 x g en el rotor SS-34 en una centrífuga Sorvall RC2-B, durante 5 min y a 0°C. El sedimento celular (sedimento 1) se resuspendió en 25 ml de MgSO₄ 10 mM estéril y frío (4°C). La suspensión se dejó en hielo durante 30 min, luego de lo cual, se centrifugó a 6.780 x g en el rotor SS-34, durante 5 min, a 0°C. El sedimento obtenido (sedimento 2) se resuspendió en 12.5 ml de Tris-HCl (pH 7.8) 10 mM, CaCl₂ 50 mM (Tampón 17), frío (4°C) y estéril. La suspensión obtenida se dejó en hielo durante 15 min, luego de lo cual se procedió a centrifugar a 3.020 x g en el rotor SS-34 durante 5 min y a 0°C obteniéndose el sedimento 3, el que se resuspendió en

2.5 ml de Tampón 17.

27.2 Transformación genética.

La mezcla de transformación contuvo 0.2 ml de células competentes (Métodos, Sección 27.1) y 7 μ l (1 μ g) de la mezcla de ligado diluida (Métodos, Sección 26). La suspensión se homogenizó por inversión del tubo varias veces y se dejó en hielo durante 20 min. Luego se sometió a un pulso térmico de 42°C durante 2 min. Transcurrido este período de tiempo la mezcla se dejó a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min; posteriormente se agregó 1 ml de CL y se incubó a 37°C durante 1 hr con agitación. Luego de esta incubación, el cultivo se centrifugó a 1.085 x g durante 5 min en el rotor SS-34 a 0°C y el sedimento se resuspendió en 0.2 ml de CL. El total del volumen se sembró en placas de CL solidificadas con agar al 2% que contenían además el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina), a una concentración final de 50 μ g/ml (Cohen y cols., 1972). En este caso en particular, a las placas se les agregó inmediatamente antes de usarlas, 50 μ l/placa de Xgal (Miller, 1972) de un stock al 2%.

27.3 Detección de los recombinantes.

La detección de las colonias de JM83 que con tuvieron plasmidios recombinantes se realizó por el color que presentaron las colonias en las placas de selección que contenían Xgal (Métodos, Sección 27.2). En presencia de este agente de selección, las colonias de color azul corresponden a bacterias con plasmidios sin inserto y las colonias blancas pueden corresponder a bacterias con plasmidios recombinantes. Las colonias que resultaron blancas se volvieron a sembrar en placas con Xgal y sólo se consideró bacterias con posibles plasmidios recombinantes a aquellas que nuevamente fueron blancas.

Con el objeto de verificar que efectivamente las colonias bacterianas que representaban recombinantes contenían inserto en el vector de clonamiento, se procedió a realizar minipreparaciones de plasmidios. Para ello, las bacterias se inocularon en 3 ml de CL más ampicilina a una concentración final de 40 µg/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación. De este cultivo se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron durante 1 min en una centrifuga Eppendorf y a 4°C.

El sobrenadante se eliminó por aspiración dejando el sedimento lo más seco posible. A éste se agregó 50 μ l de Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (Tampón 18) y se resuspendió agitando en un vortex. Luego se adicionó 50 μ l de una solución de Tampón 18 más lisozima a una concentración final de 4 mg/ml, preparada en el momento de ser usada. La mezcla se incubó durante 5 min a 25°C, después de lo cual se añadió 200 μ l de una solución de NaOH 0.2 N, SDS 1% fría (4°C) y preparada en el momento de ser usada. Los tubos se agitaron, por inversión del tubo 10 veces, y se dejaron en hielo durante 5 min. Transcurrido este período de tiempo, se agregó 150 μ l de acetato de potasio 5 M (pH 4.8) (*), frío (4°C). El tubo con la solución se tapó y se agitó en un vortex a velocidad baja y en posición invertida durante 10 segundos y luego se dejó en hielo durante 5 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min en una centrífuga Eppendorf y a 4°C. De esta centrifugación se recogió el sobrenadante (aproximadamente 400 μ l) al que se le agregó 1 volumen de una solución de fenol-cloroformo (1:1). Se mezcló en un vortex y se centrifugó durante 2 min en una centrífuga Eppendorf y a temperatura

ambiente. Se recogió la fase superior a la que se añadió 1 volumen de cloroformo puro, se mezcló en un vortex y se centrifugó en las mismas condiciones ya descritas. De esta centrifugación se recogió la fase superior a la que se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 95% mantenido a temperatura ambiente, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó durante 10 min en una centrífuga Eppendorf y a la temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y al sedimento se agregó 1 ml de etanol al 70% preparado en Tampón 7. El tubo se agitó para resuspender el sedimento y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones ya descritas. El sedimento obtenido se secó durante 10 min en un desecador al vacío y se resuspendió en 50 μ l de Tampón 7 con RNAsa pancreática a una concentración final de 20 μ g/ml. El DNA así obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa (Métodos, Sección 16), cargando 10 μ l de cada preparación. La solución de acetato de potasio (pH 4.8) (*) se preparó de la siguiente forma: a 60 ml de acetato de potasio 5 M se adicionó 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución obtenida

resulta 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

28. Preparación de extractos proteicos de la mitocondria.

Los extractos proteicos mitocondriales se prepararon a partir de mitocondrias purificadas según Métodos (Sección 8). Se empleó una combinación de columnas de DEAE celulosa y celulosa fosfato que son los materiales de uso más general, que ofrecen mayores ventajas en la purificación de nucleasas y que han sido utilizadas en la purificación de endonucleasas de restricción (Pirrota y cols., 1982; Hamilton y cols., 1982).

Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0°C y 4°C.

Las mitocondrias a una concentración de 4 mg de proteína/ml, se resuspendieron en 2.84 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (Tampón 7). A la suspensión se le adicionó 0.96 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M (lo que corresponde a una concentración del 25%) y Tritón X-100 a una concentración final de 0.2% (v/v). La mezcla se incubó entre 0°C y 4°C durante 30 minutos para

permitir la lisis del organelo. Las membranas se eliminaron por ultracentrifugación a 139.000 x g (40.000 rpm) en el rotor Tipo 65 en una ultracentrífuga Beckman L2-65B por 30 minutos. El sobrenadante de alta velocidad se diluyó con 6 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), acetato de Mg 1.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.1 mM y ditiotreitól 0.5 mM (Tampón A) e inmediatamente se aplicó a una columna de DEAE celulosa (Whatman DE-52) de 1.5 x 6.0 cm, previamente equilibrada con Tampón A sin KCl.

La columna se lavó con dos volúmenes de columna (24 ml) de Tampón A sin KCl y luego se eluyó con una gradiente lineal de KCl 0.1 a 1.0 M, preparada en Tampón A sin KCl. El flujo de la columna fue de 15 ml/hr. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, a las que se les midió la densidad óptica a 280 nm, en un espectrofotómetro Varian Techtron 635.

Las fracciones que contenían proteínas se reunieron y éstas se precipitaron adicionando lentamente 0.277 mg/ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos.

El sedimento se disolvió en 5 ml de Tampón A. Se colocó en bolsas de diálisis previamente hervidas con Tampón 7 y se dializó por 12 hrs contra

1 litro de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 0.1 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM y glicerol 50% v/v (Tampón B), el que se cambió cada 4 hrs. Del dializado se tomaron 10 μl que se diluyeron 100 veces con agua destilada para medir su conductividad, en un conductímetro Radiometer (Copenha-gen). Los valores obtenidos se compararon con una curva estandar para KCl, considerándose como muestras negativas en conductividad aquellas en las que el valor dado resultó menor que 0.08 M de KCl. En los casos en que este valor fue superior, se continuó la diálisis hasta llegar al valor ya indicado.

Luego el extracto se aplicó a una columna de fosfocelulosa de 1.5 x 6.0 cm previamente equilibrada con Tampón A sin KCl. Luego de la absorción, la columna se lavó con dos volúmenes de columna (24 ml) y se eluyó con una gradiente lineal de KCl 0.1 a 1.0 M, preparada en Tampón A sin KCl. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, las cuales se ensayaron para la detección de actividades desoxi-rribonucleásicas, según Métodos (Sección 30).

29. Preparación de extractos proteicos de la cámara mitocondrial externa.

Los extractos proteicos de la cámara mitocondrial externa se prepararon a partir de mitocondrias purificadas y tratadas con digitonina según Métodos (Sección 9). Los mitoplastos (mitocondrias exentas de membrana externa) se sedimentaron y el sobrenadante (100 ml) se utilizó para la preparación de extractos proteicos de la cámara mitocondrial externa. Este se ultracentrifugó a 139.000 x g (40.000 rpm) durante 30 minutos, en el rotor Tipo 65 en una ultracentrífuga Beckman L2-65B, para eliminar los restos de membrana externa. Al nuevo sobrenadante obtenido se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una saturación de 50% y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 4 ml de Tampón A sin KCl y se dializó contra 1 litro de Tampón B por 12 hrs, el que se cambió cada 4 hrs. Luego se aplicó a una columna de DEAE celulosa de 1.5 x 6.0 cm previamente equilibrada con Tampón A sin KCl. La columna se lavó con dos volúmenes de columna (24 ml) de Tampón A sin KCl y se eluyó pasando soluciones de KCl desde 0.1 M hasta 2.0 M (12 ml

cada uno) preparadas en Tampón A sin KCl. El flujo de la columna fue de 15 ml/hr. Se colectaron fracciones de 1.5 ml a las que se les midió la densidad óptica a 280 nm, en un espectrofotómetro Varian Techtron, modelo 635. De cada una de las fracciones y del Tampón de lavado, se tomaron 10 μ l para determinar la presencia de actividades desoxirribonucleásicas según Métodos (Sección 30). Las fracciones con actividad desoxirribonucleásica positiva eluidas en cada una de las molaridades de KCl, se juntaron y se colocaron en bolsas de diálisis, previamente hervidas con Tampón 7, dializándose por 12 hrs contra 1 litro de Tampón B, el que se cambió cada 4 hrs. De cada uno de los dializados se tomaron 10 μ l que se diluyeron 100 veces con agua destilada para medir su conductividad, utilizando un Conductímetro Radiometer (Copenhagen). La diálisis se dio por finalizada una vez que las muestras tuvieron una concentración menor que 0.08 M KCl.

Cada uno de los extractos se aplicó a una columna de fosfocelulosa de 1.5 x 6.0 cm previamente equilibrada con Tampón A sin KCl. Posteriormente, la columna se lavó con dos volúmenes (24 ml) y se eluyó en cada uno de los casos con una

gradiente lineal de KCl 0.1 a 1.0 M, preparada en Tampón A sin KCl. Se colectaron fracciones de 1.5 ml, las cuales se ensayaron para la detección de actividades desoxirribonucleásicas, según Métodos (Sección 30).

30. Detección de actividades desoxirribonucleásicas en extractos proteicos de la mitocondria y de la cámara externa.

Para la detección de actividades desoxirribonucleásicas se utilizó como sustrato DNA del bacteriófago λ y en algunos casos DNA del plasmidio pBR322. El ensayo se efectuó en una solución compuesta por 10 μ l de cada eluido obtenido según Métodos (Secciones 28 y 29); 6 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y ditioneitol 10 mM (Tampón 19); 3 μ l de 2-mercaptoetanol 1%, 2 μ l de una solución de DNA de bacteriófago λ (0.2 mg/ml preparado en agua destilada estéril) y 39 μ l de agua destilada estéril. En aquellos casos en que se usó DNA del plasmidio pBR322, se utilizó 1 μ l de una solución 1 mg/ml en agua destilada estéril y 40 μ l de agua destilada estéril. Las incubaciones se realizaron a 37°C por 1, 3 o

5 hrs, dependiendo del experimento, después de lo cual se realizó con las muestras electroforesis en geles de agarosa, según lo descrito en Métodos (Sección 16).

31. Hidrólisis cualitativa del DNA.

Para este propósito, se utilizó la metodología descrita por Wyatt (1951). Se colocó 1.0 mg de DNA de *E. coli* K-12 o 1.0 mg de timo de ternera o 150 µg de DNA de mitocondrias de *Euglena gracilis*, en ampollas de vidrio y se suspendieron en 0.3 ml de ácido fórmico al 98%. Cada una de las ampollas se selló a la llama del mechero y se colocó en una estufa a 175°C, durante 30 minutos. Luego de enfriarlas a temperatura ambiente y mantenerlas a 4°C durante 5 hrs como mínimo, las ampollas se abrieron cuidadosamente bajo campana, ya que los vapores de ácido fórmico son altamente reactivos al contacto con el aire. El hidrolizado se evaporó hasta sequedad, calentando suavemente a la llama de un mechero en la misma ampolla. Luego se agregaron 100 µl de HCl 1 N, para disolver el hidrolizado de los dos primeros DNAs y 50 µl de HCl 1 N en el caso del DNA mitocondrial de

Euglena gracilis. De estos hidrolizados se tomó 10 μ l en los dos primeros casos y 50 μ l en el tercer caso, para cargar el cromatograma.

Los estándares usados en las cromatografías fueron las cuatro bases nitrogenadas normales, además de 5-metilcitosina y 6-metilaminopurina. Estos fueron procesados en las mismas condiciones que los DNAs de *E. coli*, de timo de ternera y de mitocondrias de *Euglena gracilis*, excepto que la concentración inicial en ácido fórmico fue de 0.01 M.

32. Cromatografía en papel.

32.1 Solventes cromatográficos.

En las cromatografías se utilizaron dos sistemas de solventes, que se consideraron los más adecuados para la separación entre las 4 bases nitrogenadas normales y las metiladas, según Fink y cols. (1953).

El primer sistema fue una solución acuosa de isopropanol 65% (v/v) y HCl 2.0 N (Solvente A) y el segundo la fase superior de una mezcla de alcohol butílico secundario (50 ml) y agua (60 ml)

(Solvente B).

32.2 Cromatografía monodimensional.

Este sistema se utilizó para el estudio de las bases nitrogenadas normales y metiladas (5-metil-citosina y 6-metilaminopurina); y de los hidrolizados de DNAs de *E. coli*, timo de ternera y mitocondrial de *Euglena gracilis* (Métodos, Sección 31).

Se utilizaron tiras de papel Whatman N° 1 de 5 cm de ancho por 20 cm de largo. A 5 cm del borde inferior se colocaron 10 μ l de muestra resuspendida en HCl 0.1 N, en alícuotas de 1 μ l, esperando que se secase cada vez, hasta completar el volumen. La tira de papel se colocó en un tanque de 30 cm de frente x 37 cm de alto y 15 cm de fondo, saturado con el solvente escogido por 2 hrs. Se realizó cromatografía ascendente, con una duración de 12 hrs, a temperatura ambiente.

32.3 Cromatografía bidimensional.

Para esto se utilizó un cuadrado de papel Whatman de 30 x 30 cm en el que se aplicó 10 μ l de hidrolizado de DNA de timo de ternero o de *E. coli*

o 50 μ l de hidrolizado de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, en uno de los ángulos equidistando 5 cm de cada lado.

El primer desarrollo se realizó con el solvente A, después de lo cual el papel se secó a temperatura ambiente durante 24 hrs para permitir la evaporación total del primer sistema solvente. Luego, el papel se giró en 90° alrededor del punto en que se colocó la muestra original y se realizó un nuevo desarrollo, utilizando el sistema de solvente B.

32.4

Detección de las bases nitrogenadas en el cromatograma.

Para visualizar las purinas y pirimidinas en el papel cromatográfico, después de desarrolladas las cromatografías, se utilizó una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (High-Intensity-UV Lamp UVG-54), marcándose los lugares en que se visualizaron las manchas de las bases nitrogenadas. Para el cálculo del Rf de cada una de ellas, se midió la distancia existente entre el centro del punto de aplicación de la muestra y el centro de la mancha correspondiente a cada una de las bases

nitrogenadas y se dividió por la distancia migrada por el solvente.

33. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos:

a) En las fracciones mitocondriales, se utilizó el método de Lowry y cols., (1951) o el método descrito por Bradford (1976). En ambos casos se utilizó albúmina de suero de bovino como estándar.

b) En los extractos proteicos mitocondriales eluidos de columnas, se midió absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Varian Techtron, modelo 635.

34. Microscopía electrónica.

34.1 Observación de sedimentos mitocondriales al microscopio electrónico de transmisión.

De los sedimentos mitocondriales obtenidos por centrifugación a 10.000 x g y lavados dos veces en una solución de sacarosa 0.25 M preparada en Tampón 1, se tomaron muestras con una punta de espátula,

las que se incluyeron en agar al 3% (p/v) preparado en Tampón 1. Los bloques de agar de 3 mm de arista, que contenían las muestras, se fijaron durante 15 minutos en glutaraldehído al 3%, preparado en una solución de cacodilato 0.2 M (pH 7.4) (Tampón 20) y luego se lavaron dos veces durante 2 a 5 minutos en el mismo Tampón. Posteriormente, los bloques se sometieron a una segunda fijación durante 1 hr, con tetróxido de osmio, preparado en Tampón 20 y se lavaron dos veces, durante 2 minutos cada vez con agua destilada. Luego los bloques de agar se trataron con acetato de uranilo al 1% en agua destilada, durante 90 minutos. Posteriormente, las muestras se deshidrataron por inmersiones sucesivas de 10 minutos cada una, en soluciones de acetona 50%, 70% y 95% y con tres inmersiones sucesivas en acetona 100%, durante 15 minutos cada vez. Una vez finalizado el proceso de deshidratación, los bloques se incluyeron primero en una mezcla de acetona:epón: 1:1 durante toda la noche, luego en epón al 100%, en donde se mantuvieron por 2 hrs a temperatura ambiente y luego por 48 hrs a 60°C. De los bloques seleccionados, se realizaron cortes finos en un ultramicrotomo Sorvall MT2-B. Los cortes se trataron con acetato

de uranilo al 4% preparado en metanol puro y posteriormente con citrato de plomo (Stempak y Ward, 1964), luego de lo cual se observaron en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 102, con una aceleración de voltaje de 80 KV y se fotografiaron con película Scientia de Agfa-Gevaert.

34.2 Observación de moléculas de DNA mitocondrial al microscopio electrónico de transmisión.

Se utilizó la técnica descrita por Sogo y cols., (1979). A 250 μ l de una muestra de DNA a una concentración de 0.4 μ g/ml, se agregó 80 μ l de formamida al 90% preparada en acetato de sodio 180 mM (pH 8.5) y 3 μ l de una solución stock de BAC 0.2% preparada en formamida. Esta solución se extendió sobre una hipofase de agua bidestilada. La película de DNA-BAC se colocó sobre grillas de cobre de 200 mesh (Pelco, Ted Pella Inc., USA) cubiertas con carbón, las que habían sido pretratadas durante 15 min, por flotación sobre gotas de bromuro de etidio 30 μ g/ml. El exceso de bromuro de etidio se eliminó secando las grillas sobre papel filtro o lavando brevemente en agua bidestilada. Después de la absorción del DNA, las grillas

se lavaron por flotación en agua bidestilada durante 15 min y se tiñeron con acetato de uranio. Luego se sombrearon a alto vacío, con una aleación de platino/carbón (Pelco, Ted Pella Inc. USA) en un sombreador rotatorio al vacío DV-502 (Denton Vacuum Evaporator), se analizaron en un microscopio electrónico Jeol 100B, a 80 KV, a un aumento de 10.000 y se fotografiaron con película Scientia de Agfa-Gevaert.

34.3 Análisis Cuantitativo.

Luego de amplificar los negativos de las microfotografías, el largo de contorno de las moléculas se midió con un curvómetro Sakurai Tokio, Japan. Los datos se procesaron utilizando un STAT Package (Statistical Analyze for Technician) en un computador Commodore C-64.

RESULTADOS

I. CRITERIOS DE PUREZA DE LA FRACCION MITOCONDRIAL E INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS MITOCONDRIAS.

A. Microscopía electrónica de la fracción mitocondrial.

Con el objeto de evaluar el estado de los se dimentos mitocondriales obtenidos por centrifugación a 7.000 x g o a 10.000 x g, se observó al microscopio electrónico cortes finos de inclusiones de mitocondrias obtenidas bajo estas dos condiciones.

La Fig. 4 muestra una microfotografía electrónica de un sedimento mitocondrial crudo obtenido a 10.000 x g. En esta fracción sub-celular, se observa la presencia de mitocondrias en buen estado de pre servación con su morfología característica, evidencia da por la presencia de ambas membranas, crestas mitocondriales y la matriz que presenta un aspecto granular fino y distribución homogénea. Simultáneamente se observan mitocondrias con distintos grados de alte ración, las que se manifiestan específicamente a nivel

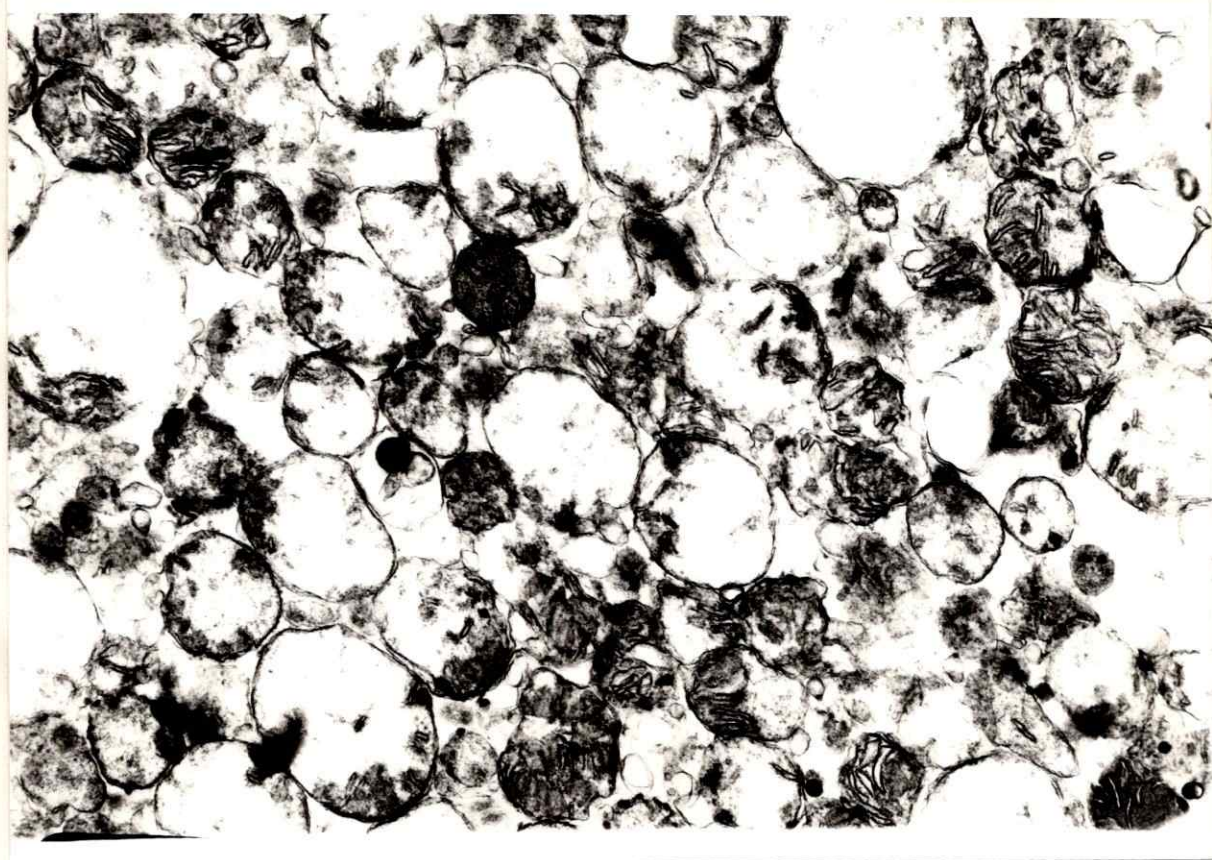


Fig. 4. Microfotografía electrónica de sedimentos mitocondriales crudos de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

Las mitocondrias fueron obtenidas a partir de células cosechadas en fase logarítmica de crecimiento (2×10^6 cel/ml), rotas en Prensa French (1.200 libras/pulgada², dos veces) y sometidas a centrifugación diferencial. La fracción mitocondrial cruda se obtuvo por centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos. El sedimento se incluyó de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 34.1), y se observó al microscopio electrónico con un aumento de 30.000 x.

de sus crestas, en las cuales se apreciaba una reducción del número y longitud. Además, la matriz mitocondrial ha desaparecido parcialmente en unas y totalmente en otras. En algunas mitocondrias se aprecia un aumento aparente de volumen, que se acompaña con pérdida del aspecto granular de la matriz y de las crestas mitocondriales.

No se observa contaminación importante con otros organelos celulares. Específicamente, la microfotografía revela que no hay contaminación con cloroplastos ni leucoplastos. Este hecho pudo verificarse en todos los cortes observados, lo que permitiría plantear que los sedimentos obtenidos a 10.000 x g corresponden a preparaciones enriquecidas en mitocondrias.

El aspecto que muestran estas preparaciones al microscopio electrónico es similar al que presentan los sedimentos mitocondriales crudos de *Euglena gracilis* obtenidos por otros investigadores (Krawiec, S. y Eisenstadt, 1970; Edelman y cols., 1966) y en general corresponden al aspecto que presentan los sedimentos mitocondriales crudos obtenidos a partir de células vegetales (Christophe y cols., 1981).

La Fig. 5 muestra un corte transversal de *Euglena gracilis* var *bacillaris* silvestre, en la que se observa la diferencia de tamaño entre cloroplastos y mitocondrias. Este hecho facilita la separación de ambos tipos de organelos durante la centrifugación diferencial. Por otra parte, considerando que se usó una cepa de *Euglena* blanqueada, este problema se minimiza aún más.

En esta microfotografía se aprecia además, la diferencia en tamaño y forma de las mitocondrias, lo que es concordante con lo observado en la microfotografía de la Fig. 4.

B. Obtención de DNA intacto, a partir de mitocondrias tratadas con DNAsa pancreática.

Para purificar el DNA mitocondrial se utilizaron sedimentos crudos obtenidos por centrifugación a $7.000 \times g$ ó a $10.000 \times g$, los que se incubaron con DNAsa pancreática $100 \mu g/ml$ como se describe en Métodos (Sección 7). A partir de estos sedimentos se obtuvo el DNA según Métodos (Sección 10). En la Fig. 6 (A y B) se observa una sola banda de DNA. En

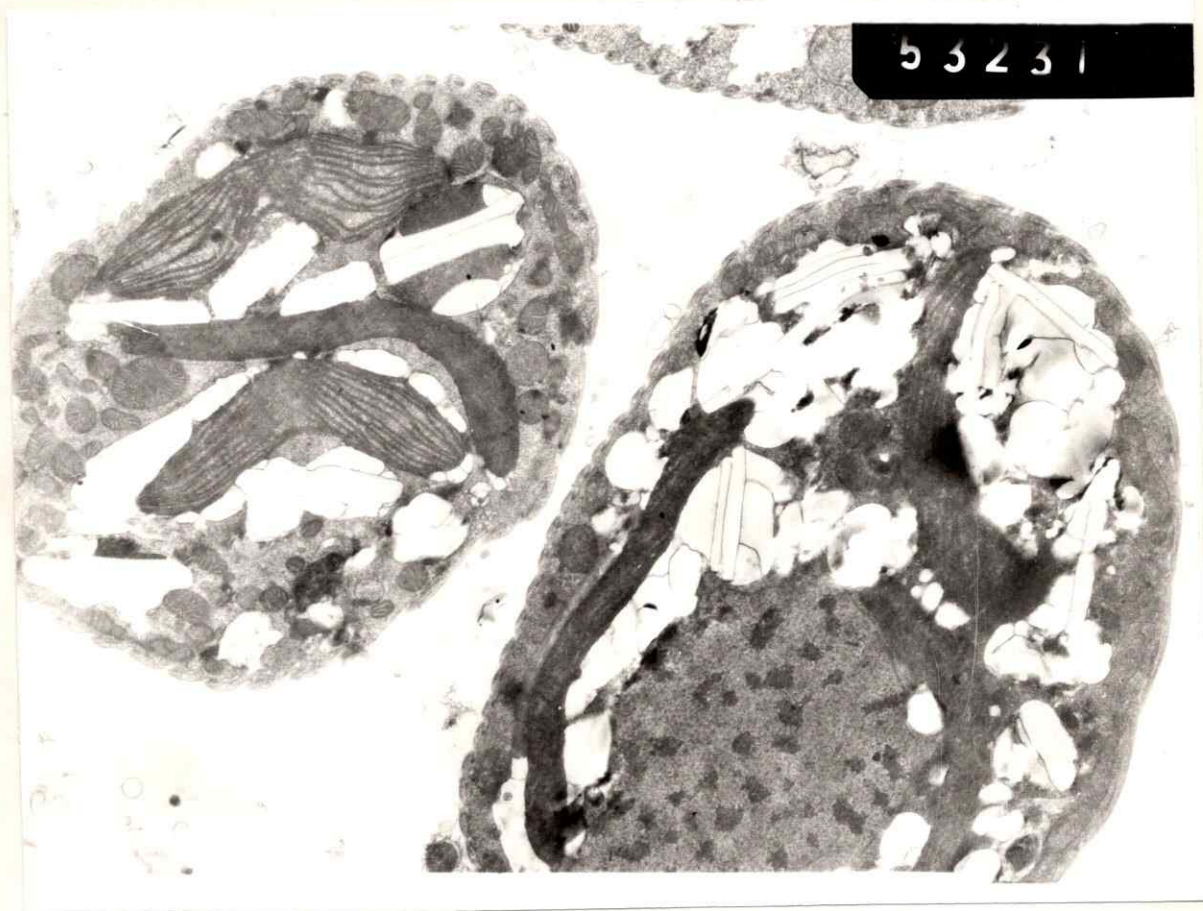


Fig. 5. Microfotografía electrónica de un corte de *Euglena gracilis* var. *bacillaris silvestre*.

Las células fueron cosechadas en fase logarítmica de crecimiento (2×10^6 cel/ml), procesadas para microscopía electrónica de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 34.1) y observadas con un aumento de 10.000 x.

el origen se aprecia DNA que no entró al gel, el que correspondería a moléculas ligadas a proteínas (Maniatis y cols., 1982). La presencia de tales moléculas podría ser consecuencia de la utilización de una preparación de DNA obtenida de sedimentos mitocondriales crudos, la que además no fue purificada posteriormente en columnas de Bio-gel. El material que se observa en la parte inferior de las columnas A y B corresponde a RNA.

El tratamiento enzimático de las mitocondrias de *Euglena gracilis* con DNAsa pancreática, permite eliminar el DNA celular contaminante adherido a la superficie de las mitocondrias. Antecedentes presentados en la literatura han demostrado que si las membranas mitocondriales se encuentran intactas, el DNA del organelo no es degradado por este tratamiento enzimático (Krawiec y Eisenstadt, 1970; Edelman y cols., 1966; Talen y cols., 1974). Por lo tanto, el tratamiento con DNAsa permite confirmar que las preparaciones obtenidas a 7.000 x g, y a 10.000 x g, están enriquecidas con organelos en buen estado de preservación; lo que hace posible el aislamiento de DNA mitocondrial intacto.

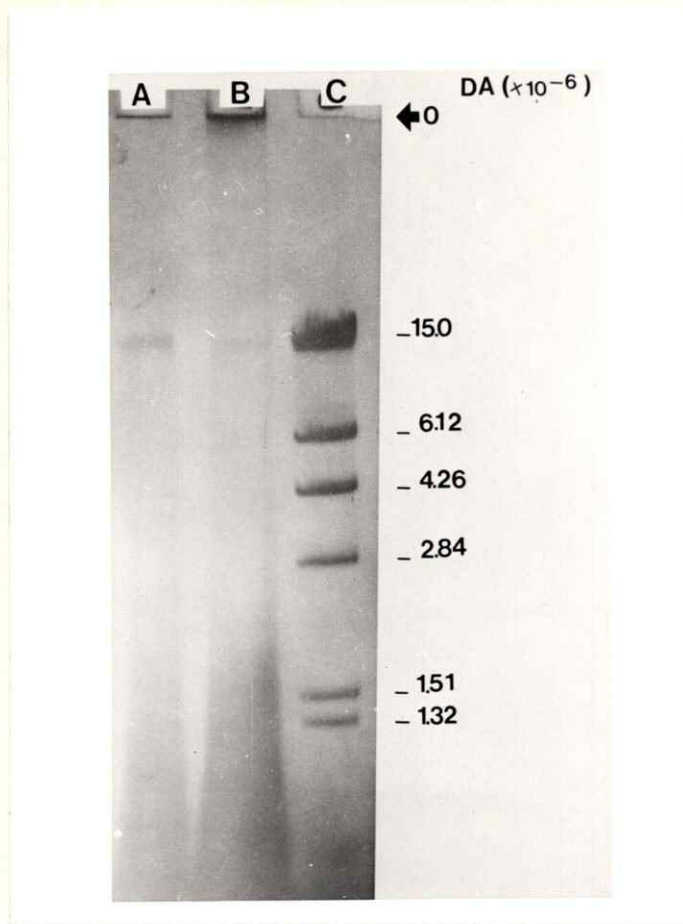


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias de *Euglena gracilis* tratadas con DNAsa pancreática 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y sedimentadas a 7.000 x g ó a 10.000 x g.

A) DNA mitocondrial (0,2 μg) purificado de mitocondrias sedimentadas a 7.000 x g. B) DNA mitocondrial (0,2 μg) purificado de mitocondrias sedimentadas a 10.000 x g. C) DNA del bacteriófago λ (0.5 μg) digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

0 = origen del gel.

La especie molecular de DNA aislada a partir de mitocondrias tratadas con DNAsa pancreática (Métodos, Sección 7), se sometió a la acción de esta enzima, con el objeto de comprobar que el DNA mitocondrial no era refractario a la enzima utilizada. La concentración de DNAsa empleada fue 500 veces menor (0.2 µg/ml) que la usada en el tratamiento de los organelos, manteniéndose el resto de las condiciones descritas en Métodos (Sección 7). Tanto el DNA mitocondrial aislado, como el DNA cromosómico obtenido de núcleos de *Euglena gracilis*, fueron completamente digeridos por la enzima (no mostrado). Estos resultados confirman la inaccesibilidad del DNA mitocondrial a la acción de la DNAsa pancreática durante la eliminación del DNA celular contaminante, consecuencia de la integridad de las membranas de las mitocondrias presentes en la preparación.

C. Incorporación *in vitro* de $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP por mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*.

Con el objeto de apreciar el estado funcional y estructural de las mitocondrias aisladas, se midió la incorporación de un precursor radioactivo en el DNA. Este criterio había sido previamente aplicado en mitocondrias de *Euglena gracilis* por Klislev y Eisenstadt (1972).

La incorporación de $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP en sedimentos mitocondriales purificados fue seguida tomando alícuotas de la mezcla de reacción cada 10 minutos, las que se precipitaron con TCA al 10%. Se midió luego la radioactividad retenida en filtros de Millipore, según Métodos (Sección 15).

En la Fig. 7 se observa la incorporación del $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* en el tiempo, comparada con la incorporación en las mitocondrias de germen de trigo, utilizadas como control.

Se observa que hasta los 30 minutos las mitocondrias de *Euglena gracilis* continúan incorporando el precursor radioactivo, demostrándose que las preparaciones mitocondriales obtenidas son fisiológicamente activas.

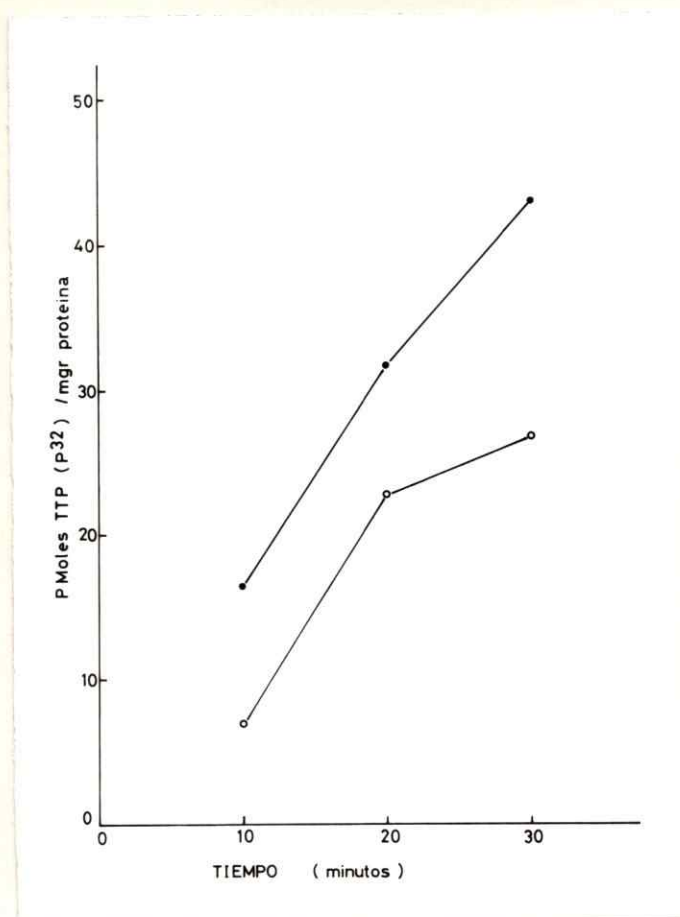


Fig. 7. Incorporación *in vitro* de $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP por mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*.

La incubación de la muestra con $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP se hizo en un volumen de 1 ml, a una concentración de 0.8 mg de proteínas mitocondriales totales, con 200 μCi del nucleótido radioactivo, a 37°C durante 30 min. Se tomaron alícuotas cada 10 minutos para determinar la incorporación de la marca en las mitocondrias.

- o = mitocondrias de germen de trigo
- = mitocondrias de *Euglena gracilis* var. bacillaris

II. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis*.

Para obtener DNA mitocondrial, se usaron mitocondrias crudas o tratadas con DNAsa pancreática, las que habían sido sedimentadas a 10.000 x g y purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa, como se indica en Métodos (Sección 8).

La lisis de mitocondrias y obtención del DNA mitocondrial de ambos tipos de muestras se realizaron según lo descrito en Métodos (Sección 10).

El DNA obtenido de ambas poblaciones de mitocondrias se caracterizó mediante gradientes de cloruro de cesio y electroforesis en geles de agarosa.

A. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales crudas en gradientes de cloruro de cesio.

Después de la centrifugación de la muestra de DNA, proveniente de sedimentos mitocondriales crudos, en una gradiente de cloruro de cesio se determinó que éste estaba constituido por dos tipos de DNA, caracterizados por su densidad de flotación en la gradiente, una vez alcanzado el equilibrio de densidad.

La Fig. 8 muestra un pico de absorbancia a 260 nm (B) correspondiente a un DNA, cuya densidad (ρ) fue de 1.689 g/cm³ y que coincide con la densidad descrita para el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* (Edelman y cols., 1965; Uzzo y Lyman, 1972; Nass y cols., 1974; Richards y Ryan, 1974; Manning y cols., 1971; Krawiec y Eisenstadt, 1970). Se observa además, un segundo pico de absorbancia (A), cuya densidad (ρ) fue de 1.707 g/cm³, que corresponde a las cifras dadas para el DNA nuclear (Krawiec y Eisenstadt, 1970).

No se observó ningún pico de absorbancia que correspondiese a la densidad descrita para el DNA cloroplástico. Para dicho DNA se han determinado densidades (ρ) de: 1.684 g/cm³ (Brawman y Eisenstadt, 1964), 1.685 g/cm³ (Manning y Richards, 1972b) y de 1.686 g/cm³ (Shiff, 1973). En la Fig. 7 se indica con una flecha la posición de una densidad de 1.686 g/cm³ en la gradiente de CsCl. Esto indicaría la ausencia de esa especie molecular en las preparaciones de DNA mitocondrial utilizadas. Este resultado concuerda con las observaciones al microscopio electrónico de la preparación mitocondrial y con los resultados obtenidos luego del tratamiento con DNAsa pancreática.

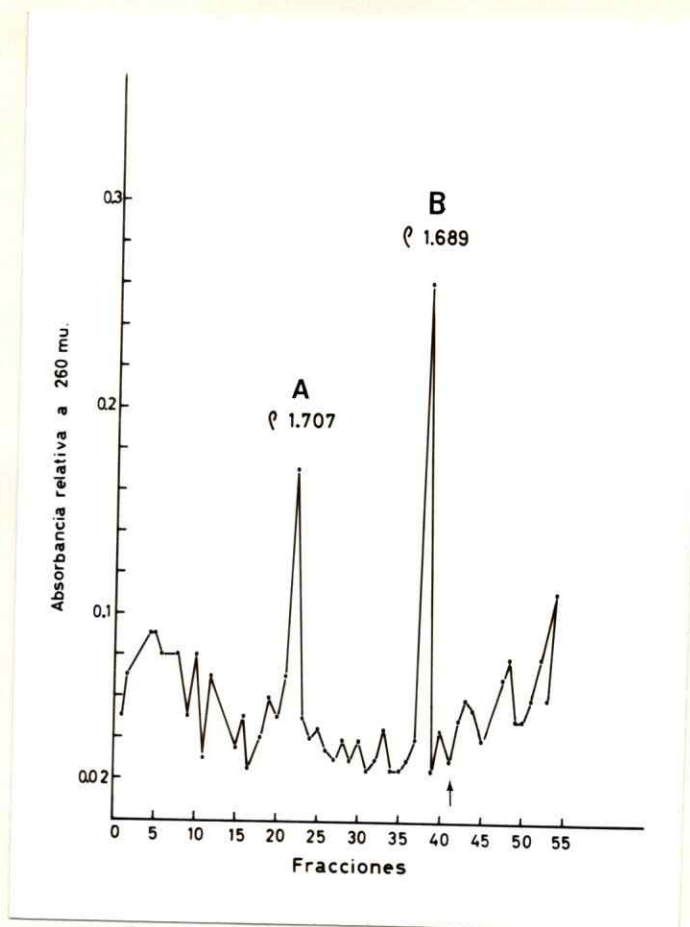


Fig. 8. Centrifugación preparativa en gradientes de CsCl de DNA purificado a partir de preparaciones crudas de mitocondrias y purificadas en una gradiente discontinua de sacarosa.

Las gradientes se centrifugaron a 40.000 rpm, durante 40 hrs, en el rotor Tipo 65 en ultracentrífuga Beckman L2-65B, a 15°C. Se colectaron 5 gotas por fracción, mediante punción del fondo del tubo. Se determinó la absorban- cia a 260 nm y el índice de refracción de cada una de ellas en un refractómetro Bausch y Lomb ABBE-3L según Métodos (Sección 14). Se observa un pico de absorban- cia A con una densidad de 1,707 g/cm³ que corresponde al DNA nuclear y un pico B con una intensidad de 1.689 g/cm³ que co- rresponde al DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*. La fle- cha indica la posición de la densidad correspondiente al DNA cloroplástico.

B. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales tratadas con DNAsa pancreática en gradientes de cloruro de cesio.

Los sedimentos mitocondriales crudos, se trataron con DNAsa pancreática, con la finalidad de eliminar el DNA nuclear contaminante. Después de la centrifugación en gradientes de cloruro de cesio, de la muestra de DNA proveniente de estas mitocondrias y de DNA de *E. coli* K-12 agregando como estandar de densidad, se determinó la existencia de un solo pico correspondiente a un DNA de densidad (ρ) 1.689 a 1.690 g/cm³.

No se observó pico de absorbancia en la densidad que corresponde al DNA nuclear (1.707 g/cm³), lo que comprueba que éste fue degradado por el tratamiento con DNAsa pancreática. Se obtuvo un pico de absorbancia con una densidad de 1.701 g/cm³ que corresponde al DNA de *E. coli* K-12 agregado a la preparación como estandar de densidad (datos no mostrados).

C. Caracterización de DNA purificado a partir de preparaciones mitocondriales tratadas con DNAsa pancreática en geles de agarosa.

Los sedimentos mitocondriales crudos fueron tratados con DNAsa pancreática, con el objeto de degradar el DNA nuclear contaminante. La lisis de estos organelos se realizó utilizando una variedad de tipos y concentraciones finales de detergentes como: SDS 1% y 2%; Tritón X-100 0.2% y 1.0%; Nonidet P-40 1% y mezcla de Tritón X-100 1% y SDS 1%, esta última a dos temperaturas diferentes: 37°C y 45°C. Una vez lisados los organelos, la purificación del DNA mitocondrial se realizó como se indica en Métodos (Sección 10). El DNA obtenido, se sometió a electroforesis en geles de agarosa (Métodos, Sección 16 y 17) a diferentes concentraciones: 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5%. Esta técnica no había sido utilizada aún por otros investigadores, para visualizar el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

La Fig. 9, muestra que en todos los casos se obtuvo una sola banda ubicada a la altura del primer fragmento del DNA del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa de restricción HindIII.

Idéntico resultado con respecto a la migración de este DNA se obtuvo, usando cualesquiera de los

detergentes ya mencionados en la etapa de lisis (no mostrado). Se eligió aquel formado por la mezcla de Tritón X-100 1% y SDS 1% porque arrojó un mejor rendimiento. Con respecto a la temperatura de lisis, el uso de una u otra no mostró ninguna diferencia y en cuanto a la concentración de los geles de agarosa utilizada en las electroforesis, se pudo comprobar que en ningún caso varió la migración de la banda de DNA mitocondrial respecto a la del primer fragmento del estándar usado.

En las columnas 4 y 6 (Fig. 9) correspondientes al DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII, se observa la presencia de una banda tenue de un peso molecular mayor que 15×10^6 daltons. Dicha banda de DNA correspondería a la asociación de algunos fragmentos de digestión, debido a la presencia de los extremos cohesivos generados por la acción de la enzima HindIII.

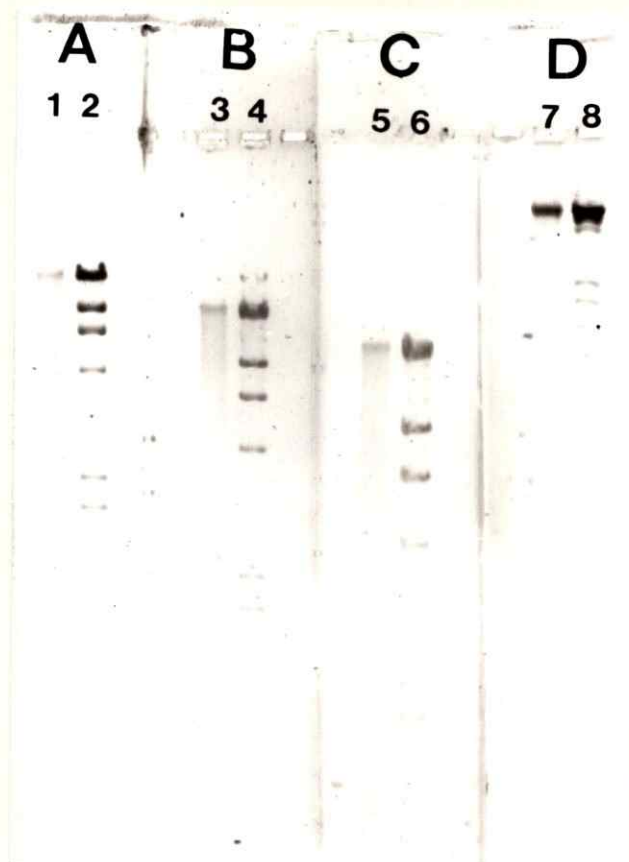


FIG. 9. Electroforesis en geles de agarosa de distintas concentraciones de DNA purificado de mitocondrias de *Euglena gracilis* tratadas con DNAsa pancreática.

El DNA se obtuvo de mitocondrias sedimentadas a 10.000 x g tratadas con DNAsa pancreáticas y luego purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa. La lisis de los organelos se realizó a 45°C utilizando Tritón X-100 1% y SDS 1% como está descrito en Métodos (Sección 10). Las condiciones de electroforesis fueron señaladas en Métodos (Sección 18). La Fig. muestra las electroforesis en geles de agarosa: A al 1.0%; B al 0.8%; C al 0.6% y D al 1.5%. Las columnas 1, 3, 5 y 7 muestran la banda de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* (0.3 µg); las columnas 2, 4, 6 y 8 muestran las bandas de DNA del bacteriófago λ (0.5 µg) digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

0 = origen del gel

D. Caracterización mediante autorradiografía de DNA marcado con $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP purificado a partir de preparaciones mitocondriales incubadas *in vitro* con dicho nucleótido.

Los sedimentos mitocondriales crudos, se incubaron *in vitro* en presencia de $|^{32}\text{P}-\alpha|$ TTP, según Métodos (Sección 15). La lisis de los organelos se llevó a cabo a 37°C, con mezcla de Tritón X-100 1% y SDS 1% y la purificación del DNA mitocondrial se realizó según Métodos (Sección 10).

El DNA mitocondrial se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% y se autorradiografió de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 19).

Como se observa en la Fig. 10, se obtuvo una sola banda de DNA. En esta electroforesis se utilizó un tiempo de corrida de 2.0 hrs con el objeto de visualizar bandas de menor peso molecular que pudiesen eluir del gel con un mayor tiempo. Como consecuencia de lo anterior, la banda correspondiente al DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se ubicó más cerca del origen. Siendo éste un método muy sensible, ya que detecta cantidades de DNA mucho menores que aquellas que se pueden visualizar en agarosa teñida con bromuro de etidio, se confirma con su uso, los resultados

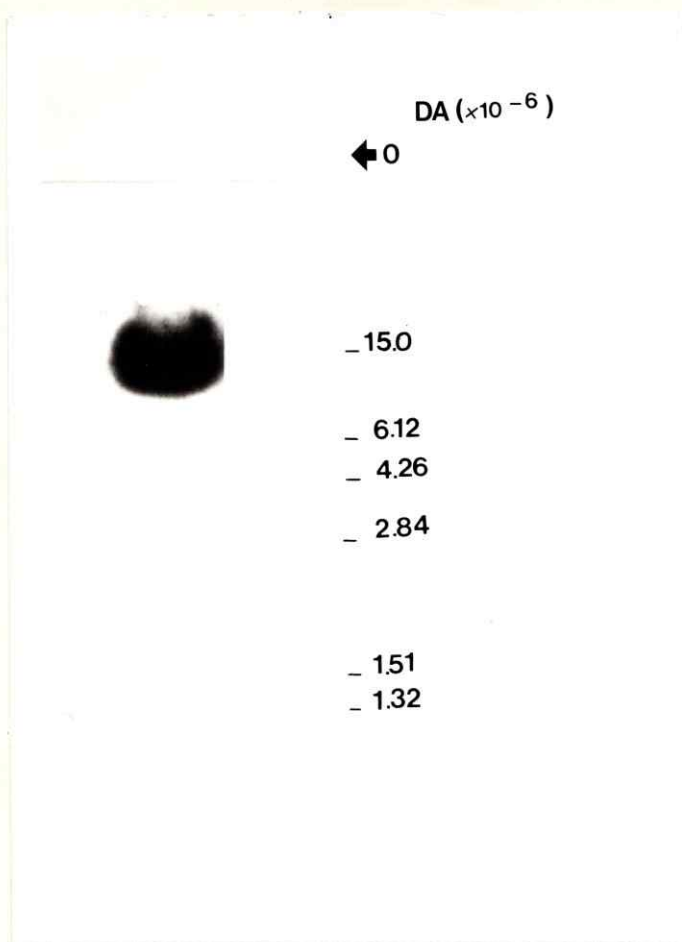


Fig. 10. Autorradiografía de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* marcado con $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP.

El DNA se extrajo a partir de preparaciones mitocondriales incubadas *in vitro* con $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP. La purificación del DNA se realizó según Métodos (Sección 10). El DNA mitocondrial (10.000 cpm) se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Luego se realizó autorradiografía de los gels de acuerdo a Métodos (Sección 19). La placa autorradiográfica se expuso por 30 días a -70°C . En la Fig. se indican las posiciones de los fragmentos del DNA del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa HindIII y teñidos con bromuro de etidio. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

0 = origen del gel

encontrados en las electroforesis anteriores (Fig. 6), que indicaban la presencia de una sola banda para el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

III. COMPORTAMIENTO DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis* VAR. BACILLARIS FRENTE A ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

A. Control de la actividad de las endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas bacterianas que actúan sobre DNA de doble hebra, reconociendo secuencias específicas y generando fragmentos de tamaño definido. Es por ello que son muy útiles en el análisis de genomas de procariontes como de eucariontes. Consecuentemente, se examinó la acción de las siguientes enzimas de restricción sobre el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*: AvaII, BamHI, BglI, BglII, DdeI, EcoRI, HindIII, HincII, HinfI, HpaI, HaeIII, MspI, MboI, PstI, SacII, SmaI, SalI, SstI, TthI, XbaI, XhoI y XmaI.

La funcionalidad de cada una de ellas se controló utilizando DNA del bacteriófago λ como sustrato. Las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica fueron las descritas en los catálogos respectivos para cada uno de los casos y el ensayo se realizó según lo descrito en Métodos (Sección 20). Los productos de la digestión se analizaron por

electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En todos los casos se comprobó la funcionalidad de estas enzimas.

B. Acción de endonucleasas de restricción sobre el DNA mitocondrial.

Las preparaciones de DNA fueron obtenidas de mitocondrias tratadas con DNAsa pancreática y luego purificadas en gradiente discontinua de sacarosa. Este DNA fue purificado en una columna de Bio-gel A50m para eliminar el RNA y otras moléculas contaminantes, luego de lo cual fue tratado con las diferentes enzimas de restricción, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica descritas en los catálogos respectivos para cada uno de los casos. En ensayo se realizó según lo descrito en Métodos (Sección 20). El producto de la digestión con cada enzima se analizó por electroforesis en geles de agarosa.

La Fig. 11, muestra el resultado de las digestiones de DNA mitocondrial con las siguientes enzimas: HpaI, XbaI, BglI y BglII. Se observa que el DNA tratado no fue sustrato para estas enzimas, permaneciendo como una sola banda con migración

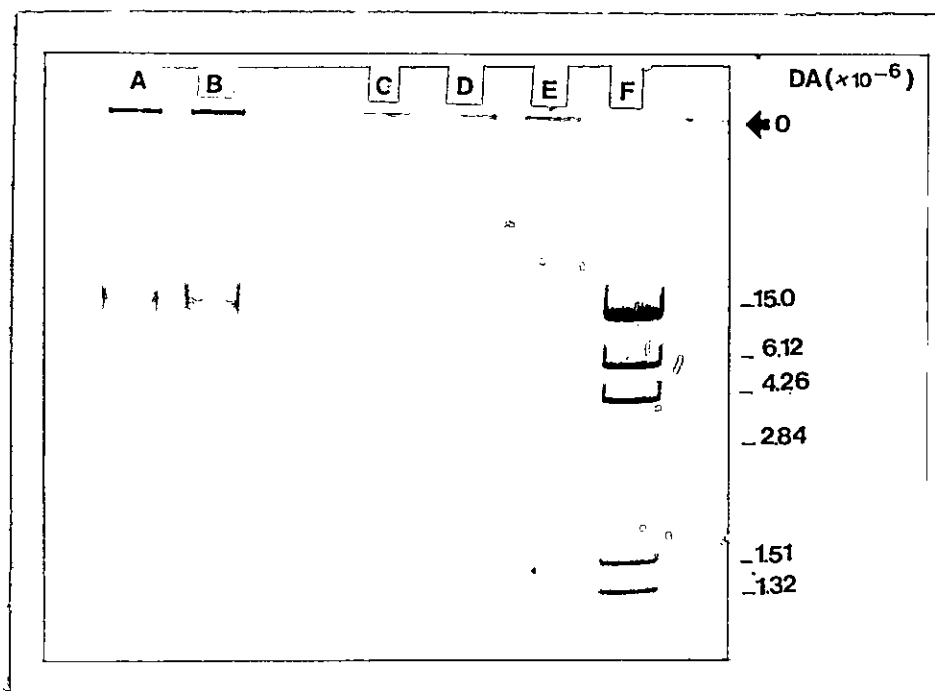


Fig. 11. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con las endonucleasas de restricción: HpaI, XbaI, BglI y BglII.

Se incubaron 0.3 μg de DNA (columna A y B) y 0.15 μg de DNA (columnas C, D y E) con 3 unidades de cada enzima durante 3.5 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas para cada una de ellas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 hrs.

Columnas: A) DNA mitocondrial + HpaI; B) DNA mitocondrial + XbaI; C) DNA mitocondrial + BglI; D) DNA mitocondrial + BglII; E) DNA mitocondrial sin digerir; F) DNA de bacteriophage λ (0.5 μg) digerido con HindIII usado como estandar de PM. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

0 = origen del gel

idéntica a aquella del control sin digerir.

Las digestiones con las enzimas: *AvaII*, *BamHI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HindIII*, *HincII*, *HinfI*, *HaeIII*, *MspI*, *MboI*, *PstI*, *SalI*, *SstI* y *TthI* arrojaron los mismos resultados (no mostrado).

Las Figs. 12, 13 y 14 muestran el resultado de la digestión de DNA mitocondrial con las siguientes enzimas: *SacII* y *SmaI* (Fig. 12), *XmaI* (Fig. 13) y *XhoI* (Fig. 14), observándose la aparición de distintos fragmentos como resultado de la acción de estas enzimas.

La digestión del DNA mitocondrial con la enzima *SacII*, originó dos bandas cuyos pesos moleculares aproximados, calculados de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 21), fueron: 6.12×10^6 y 4.9×10^6 daltons respectivamente (Fig. 12 A). La digestión con *SmaI* originó dos bandas cuyos pesos moleculares aproximados fueron de: 15×10^6 y 6.12×10^6 daltons respectivamente (Fig. 12 B). La digestión con la endonucleasa *XmaI* originó 3 bandas de digestión, cuyos pesos moleculares aproximados fueron de: 15×10^6 , 14×10^6 y 7.2×10^6 daltons respectivamente (Fig. 13). Finalmente, el tratamiento con la enzima *XhoI*, produjo dos bandas de digestión con pesos moleculares de 15×10^6 y 6.85×10^6 daltons respectivamente (Fig. 14).

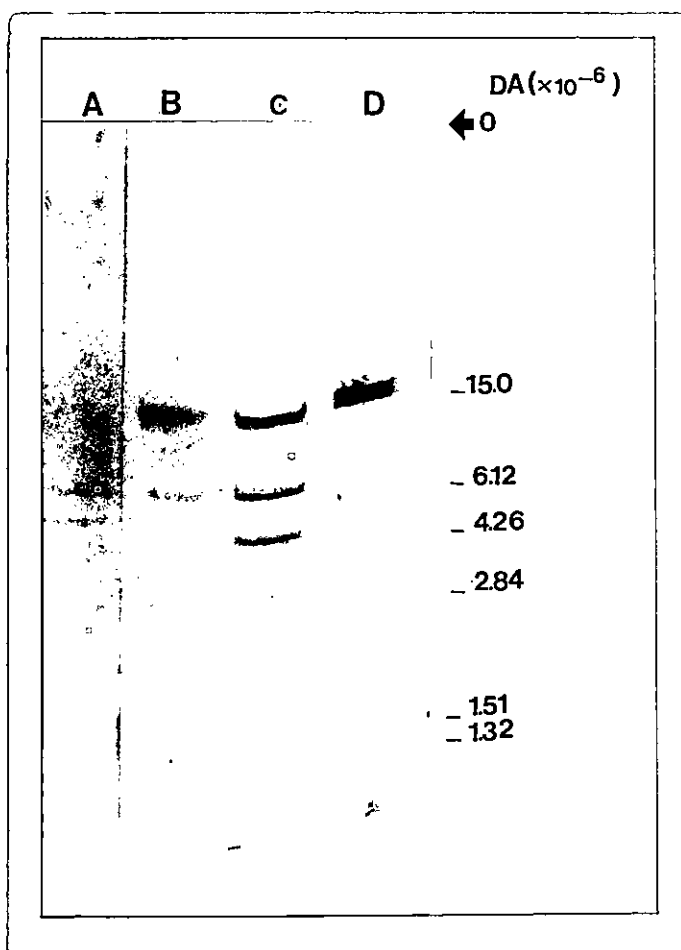


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con las endonucleasas de restricción SacII y SmaI.

Se incubaron 0.3 μg de DNA con 3 unidades de cada enzima durante 3.5 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas para cada una de ellas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3.5 hrs.

A) DNA mitocondrial + SacII; B) DNA mitocondrial + SmaI; C) DNA del bacteriófago λ (0.5 μg) digerido con HindIII; D) DNA mitocondrial sin digerir. Los valores indican el peso molecular de los fragmentos del bacteriófago λ digerido con HindIII.

0 = origen del gel

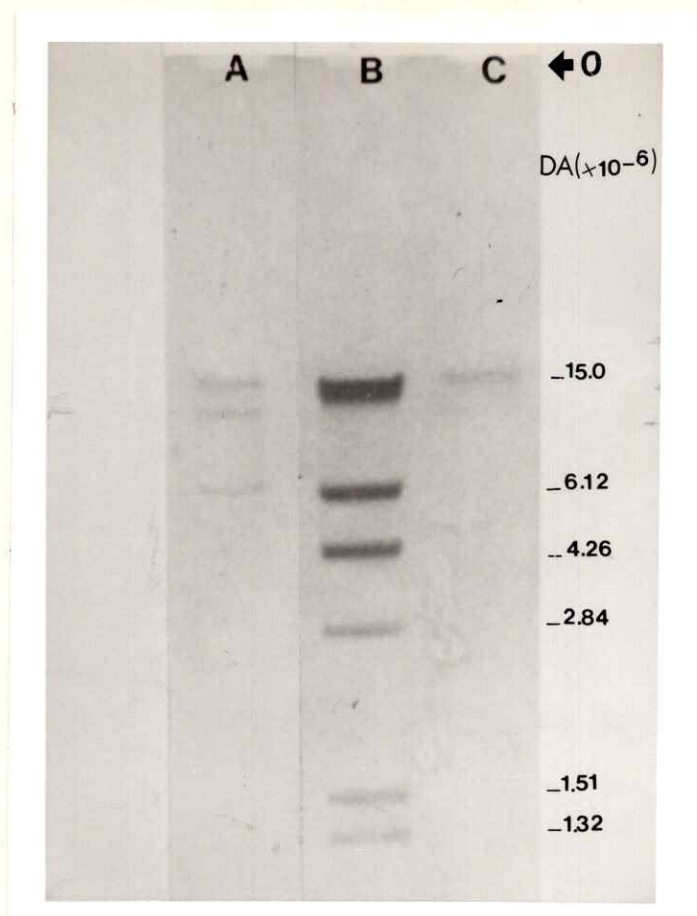


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con la endonucleasa de restricción XmaI.

Se incubaron 0.3 μg de DNA con 3 unidades de la enzima durante 3.5 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 hrs. A) DNA mitocondrial + XmaI; B) DNA del bacteriófago λ (0.5 μg) digerido con HindIII; C) DNA mitocondrial sin digerir. Los valores indican el peso molecular de los fragmentos del bacteriófago λ digerido con HindIII.

0 = origen del gel

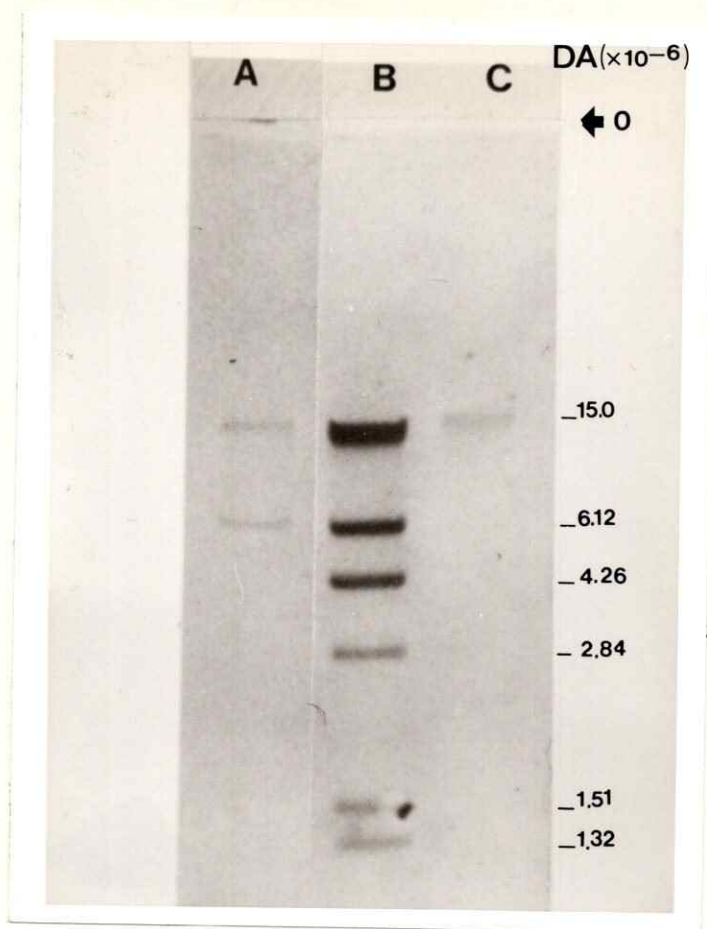


Fig. 14. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de los productos de digestión de DNA mitocondrial tratado con la endonucleasa de restricción XhoI.

Se incubaron 0.3 μg de DNA con 3 unidades de la enzima durante 3.5 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 hrs. A) DNA mitocondrial + XhoI; B) DNA del bacteriófago λ (0.5 μg) digerido con HindIII; C) DNA mitocondrial sin digerir. Los valores indican el peso molecular de los fragmentos del bacteriófago λ digerido con HindIII.

0 = origen del gel.

De las cuatro endonucleasas que cortaron el DNA mitocondrial, sólo se obtuvo digestión completa con la enzima SacII en las condiciones experimentales usadas. En el tratamiento con las enzimas SmaI y XhoI, la banda de 15×10^6 daltons probablemente corresponde al DNA no digerido. En el caso de XmaI, la banda de 15×10^6 daltons también podría corresponder al DNA no digerido y la de 14×10^6 daltons podría explicarse debido a una digestión parcial bajo las condiciones experimentales empleadas.

C. Detección de una posible actividad inhibitoria sobre las endonucleasas de restricción.

Debido a que 18 enzimas de restricción, de las 22 ensayadas, no tuvieron acción sobre el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, se buscó una posible actividad inhibitoria de dichas enzimas en las preparaciones de DNA mitocondrial. Con este objeto se hizo una mezcla de 0.3 μ g de DNA mitocondrial purificado y 0.4 μ g de DNA intacto de bacteriófago λ , la que se sometió a la acción de las enzimas BamHI, BglI, BglII, HaeIII y HinfI. Se utilizó entre 3 a 10 unidades de enzima según el caso, considerando el

número de bandas que debieran obtenerse en una digestión completa del DNA del bacteriófago λ .

En la Fig. 15 se observa que el DNA del bacteriófago λ fue digerido por las enzimas utilizadas, lo que no ocurrió con el DNA mitocondrial. Las bandas producidas en las digestiones corresponden solamente a aquellas del DNA del bacteriófago λ productos de la acción de las endonucleasas empleadas. Por lo tanto, se puede concluir que la refractariedad del DNA mitocondrial frente a las endonucleasas de restricción no se debe a la presencia de un inhibidor en las preparaciones de DNA.

D. Digestión de DNA mitocondrial marcado con $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP con endonucleasas de restricción.

Con el fin de detectar con un método más sensible, bandas de DNA muy finas que no hubiesen podido ser visualizadas con la tinción con bromuro de etidio, se digirió DNA mitocondrial marcado con ^{32}P , que se detectó mediante autorradiografía.

El DNA marcado con ^{32}P se obtuvo de mitocondrias marcadas *in vitro* por incorporación de $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP al organelo, como se describe en Métodos (Sección

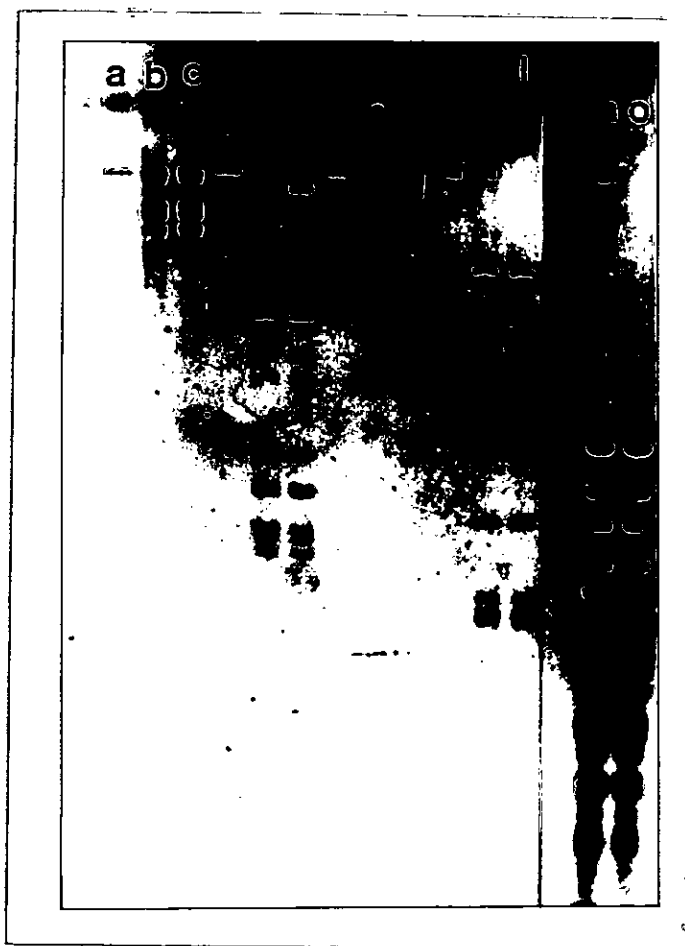


Fig. 15. Análisis electroforético de las digestiones con las endonucleasas de restricción, BamHI, BglI, BglII, HaeIII, HinfI de una mezcla de DNA del bacteriófago λ y DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

0.3 μ g de DNA mitocondrial y 0.4 μ g de DNA del bacteriófago λ se incubaron con 3 a 10 unidades de cada enzima durante 3,5 hrs en las condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH requeridas para cada una de ellas según Métodos (Sección 20). El resultado de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA.

a) DNA mitocondrial + BamHI; b) DNA mitocondrial + DNA de λ + BamHI; c) DNA de λ + BamHI; d) DNA mitocondrial + BglII; e) DNA mitocondrial + DNA de λ + BglII; f) DNA de λ + BglII; g) DNA mitocondrial + BglIII; h) DNA mitocondrial + DNA de λ + BglIII; i) DNA de λ + BglIII; j) DNA mitocondrial + HinfI; k) DNA mitocondrial + DNA de λ + HinfI; l) DNA de λ + HinfI; m) DNA mitocondrial + HaeIII; n) DNA mitocondrial + DNA de λ + HaeIII; o) DNA de λ + HaeIII.

15).

El DNA marcado se ensayó con las siguientes enzimas de restricción: AvaII, BamHI, BglI, BglII, DdeI, EcoRI, HindIII, HincII, HinfI, HpaI, HaeIII, MspI, MboI, PstI, SalI, SstI, TthI y XbaI, incluyendo también un control de acción de RNasa sobre el DNA y un control sin digerir.

La Fig. 16, muestra una autorradiografía obtenida luego de la electroforesis de las muestras marcadas y tratadas con las endonucleasas de restricción: BamHI, HindIII, HincII, AvaII, HpaI, HaeIII, EcoRI y HinfI. Se observa que el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* no fue sustrato para ninguna de las enzimas ensayadas.

Las digestiones con las enzimas: BglI, BglII, DdeI, PstI, MspI, MboI, SalI, SstI, TthI y XbaI, arrojaron los mismos resultados (no mostrado).

E. Determinación del peso molecular del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*.

El cálculo del peso molecular del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, se hizo en base a la migración de las bandas resultantes del

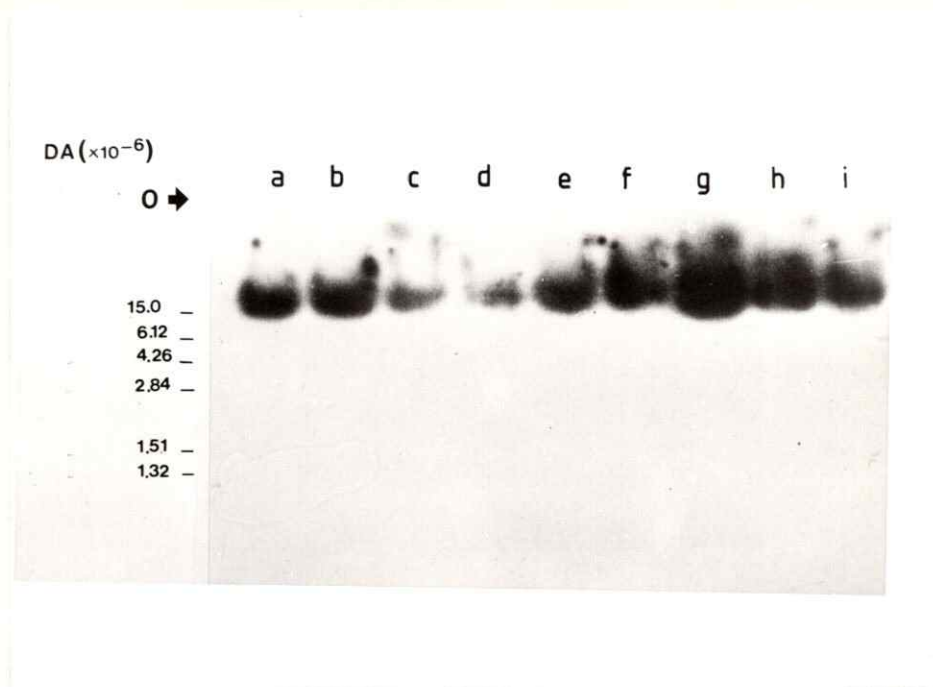


Fig. 16. Autorradiografía de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* marcado con $^{32}\text{P}-\alpha$ TTP y tratado con endonucleasas de restricción.

El DNA (10.000 cpm) fue incubado con 3 unidades de cada una de las enzimas durante 3.5 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas para cada una de ellas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 horas. Luego se realizó autorradiografía de los geles de acuerdo a Métodos (Sección 19). La placa autorradiográfica se expuso por 30 días a -70°C . En la Fig. se indican las posiciones de los fragmentos del DNA del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa HindIII y teñidos con bromuro de etidio. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos. 0= origen del gel.

a) DNA mitocondrial + BamHI; b) DNA mitocondrial + HindIII
c) DNA mitocondrial + HincII; c) DNA mitocondrial + AvaII;
e) DNA mitocondrial + HpaI; f) DNA mitocondrial + HaeIII;
g) DNA mitocondrial + EcoRI; h) DNA mitocondrial + HinfI;
i) DNA mitocondrial sin digerir.

tratamiento de este DNA con la endonucleasa de restricción SacII. Para construir la curva de calibración se emplearon las bandas originadas por la digestión del DNA del bacteriófago λ con la endonucleasa de restricción HindIII (Apéndice 2) y se procedió según lo descrito en Métodos (Sección 21). El peso molecular calculado para el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se obtuvo sumando los pesos moleculares de los fragmentos de restricción originados con esta enzima y fue de aproximadamente 11×10^6 daltons.

IV. ANALISIS CUALITATIVO DE LA COMPOSICION DE BASES NITROGENADAS DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis*.

Debido a la refractariedad mostrada por el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* a 18 de las 22 endonucleasas de restricción ensayadas se analizó este DNA mediante cromatografía en papel en un sistema bidimensional, con el objeto de determinar la presencia de bases metiladas en este DNA que pudieran ser responsables de este fenómeno.

Para ésto, el DNA mitocondrial purificado y libre de RNA, se sometió a hidrólisis con ácido fórmico (Métodos, Sección 31), luego de lo cual las bases nitrogenadas se separaron por cromatografía en una y en dos dimensiones (Métodos, Sección 32).

Para estandarizar el método, se utilizaron las bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina y 6-metilaminopurina y los hidrolizados de DNA comercial de timo de ternera y de *E. coli* K-12. La Fig. 17 muestra las manchas correspondientes a los estándares de adenina, citosina, guanina y timina y las manchas que corresponden al hidrolizado del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, en un cromatograma unidimensional. Se

observa la presencia de adenina, citosina, guanina y timina en el DNA mitocondrial. Las manchas correspondientes a estas bases nitrogenadas migraron en la misma posición de los estándares y no se observó ninguna mancha adicional, lo que indicaría que el DNA mitocondrial utilizado no presentaba contaminación con RNA.

En experimentos no mostrados se observó que las bases metiladas no podían separarse de las no metiladas en una cromatografía unidimensional y por ello se empleó cromatografía en dos dimensiones.

La Fig. 18 muestra el cromatograma bidimensional realizado con el hidrolizado del DNA mitocondrial en el que se observa la presencia de dos manchas, en el segundo desarrollo, en la línea de migración de citosina. Por sus Rf se concluye que una de estas manchas corresponde a citosina y la otra a 5-metilcitosina. Muy tenuemente se pudo observar la presencia de otra mancha que podría corresponder a 6-metilaminopurina, la que por su baja intensidad no se resolvió fotográficamente. Por lo tanto, se podría concluir que en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* existirían bases modificadas, además de las 4 bases esperadas. Una de las manchas que aparecen al realizar el segundo

desarrollo podría corresponder a 5-metilcitosina y la otra, posiblemente, 6-metilaminopurina o a otra base modificada.

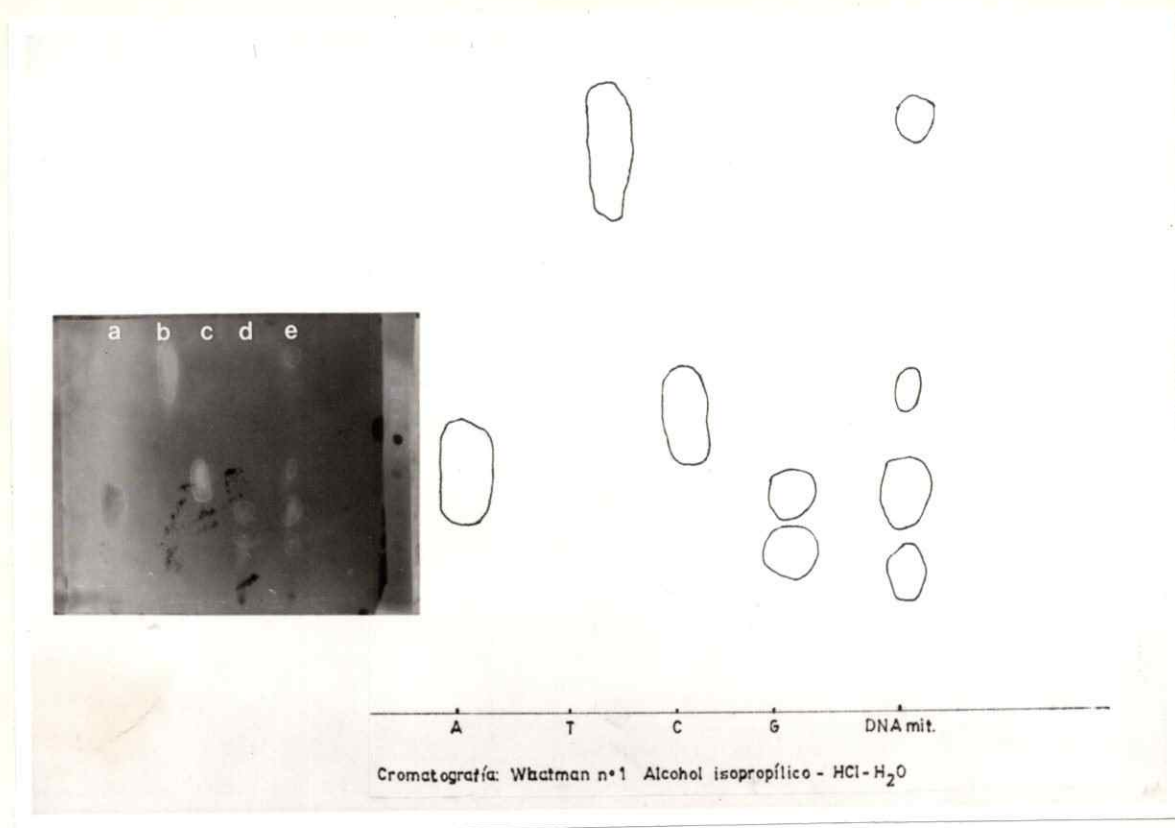


Fig. 17. Cromatograma unidimensional de bases nitrogenadas y de un hidrolizado de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

El desarrollo se realizó en papel Whatman N°1, utilizando como solvente alcohol isopropílico-HCl-agua según lo descrito en Métodos (Sección 32). De cada una de las bases se colocaron 10 μ l de una solución 10 mM y del hidrolizado de DNA mitocondrial se colocó 10 μ l lo que correspondió a 50 μ g de DNA. a) Adenina; b) Timina; c) Citosina; d) Guanina; e) Hidrolizado de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

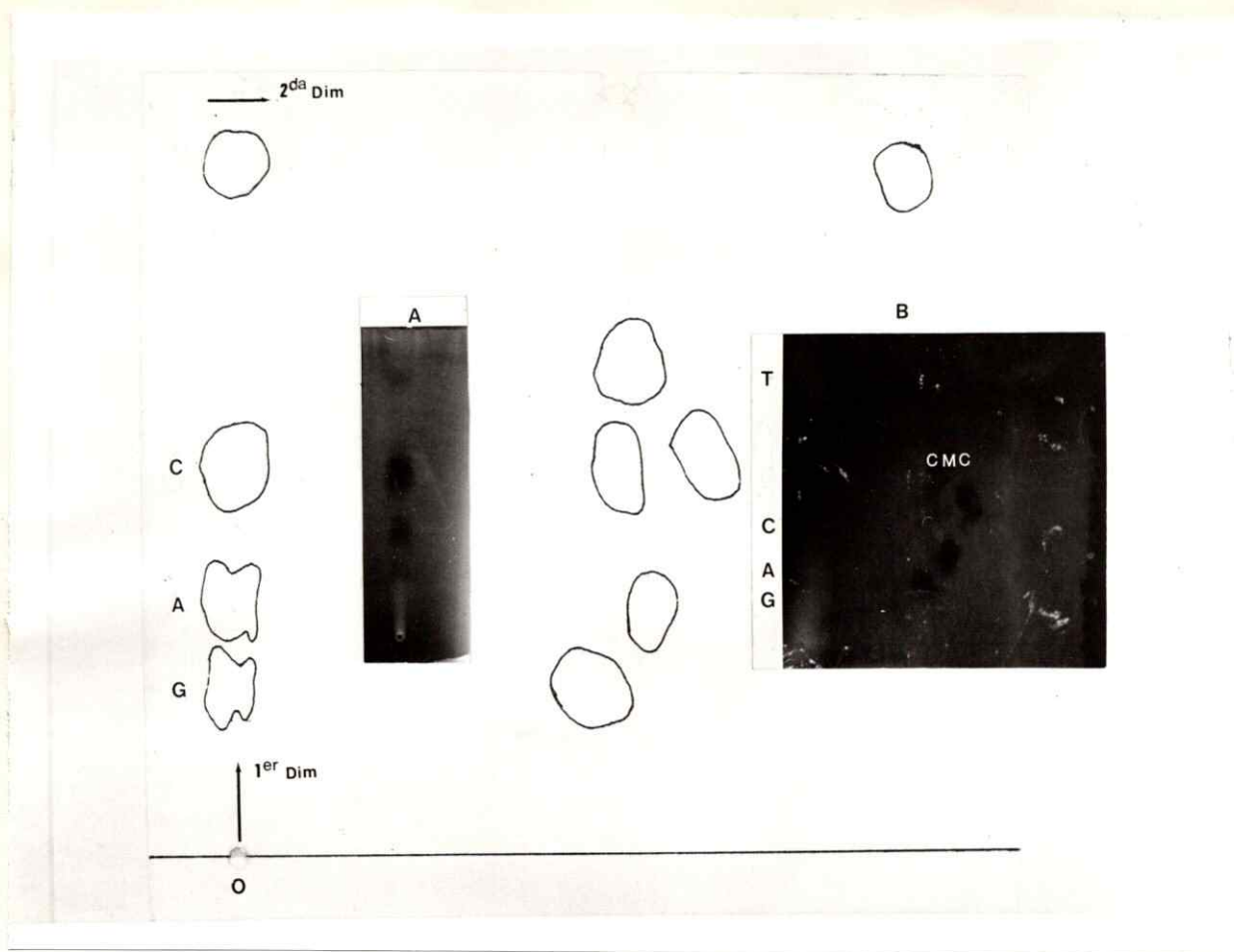


Fig. 18. Cromatograma bidimensional de un hidrolizado de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

El desarrollo se realizó en papel Whatman N° 1 utilizando como 1er. sistema de solvente alcohol isopropílico-HCl-agua y como 2° sistema de solvente la fase superior de una mezcla de alcohol butílico secundario-agua de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 32). En el cromatograma se colocó 50 μ l de hidrolizado de DNA mitocondrial lo que correspondía a aproximadamente 70 μ g de DNA. Las flechas indican las direcciones de corrida de la primera (1er Dim., A) y segunda (2da Dim., B) dimensión. A = adenina; C = citosina; G = guanina; T = timina; MC = metilcitosina. 0 = origen de aplicación de la muestra.

V. DETERMINACION DE LA FORMA DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis*.

Uno de los aspectos importantes en el estudio del DNA mitocondrial de *Euglena* es la investigación de su forma. Para ello, el DNA mitocondrial se obtuvo a partir de mitocondrias sedimentadas a 10.000 x g, tratadas con DNAsa pancreática y purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa. La purificación del DNA se realizó según Métodos (Sección 10). El DNA obtenido se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión, en la cual el DNA mitocondrial presentó una sola banda que migró a la altura del primer fragmento del DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima HindIII. Esta banda se extrajo del gel mediante la técnica de CETAB (Métodos, Sección 22). El DNA así obtenido se volvió a someter a electroforesis en agarosa al 1%. La Fig. 19 muestra que la banda de DNA mitocondrial obtenida luego del tratamiento con CETAB, no presentó degradación y mantuvo su nivel de migración con respecto al DNA estandar. Este DNA se procesó según la técnica de Sogo y cols. (1979) para su observación al microscopio electrónico (Métodos, Sección 34.2).

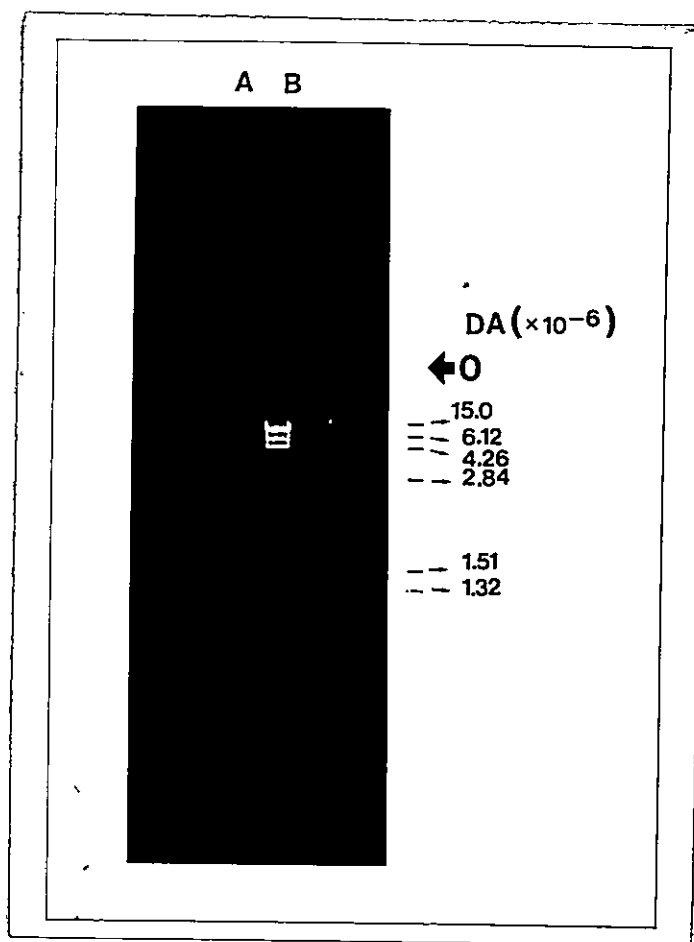


Fig. 19. Electroforesis de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* en gel de agarosa (1%), luego de extracción con CETAB.

El DNA mitocondrial se sometió a electroforesis en gel de agarosa (1%) de bajo punto de fusión, desde donde se extrajo mediante la técnica de CETAB (Métodos, Sección 22). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 1.5 horas.

A) DNA (0.8 ng) mitocondrial; B) DNA (0.3 μ g) del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

0 = origen del gel

En todas las preparaciones examinadas al microscopio electrónico, el DNA mitocondrial de *Euglena*, mostró una configuración lineal (Fig. 20); no se observó ninguna molécula de configuración circular. Este hecho está de acuerdo con lo observado en las electroforesis de DNA mitocondrial, realizadas en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio (resultados no presentados). Estos experimentos mostraron que el DNA mitocondrial presentó solo una banda, a pesar de haber utilizado concentraciones de bromuro de etidio del orden de 10 µg/ml, las que permiten separar y diferenciar DNA circular cerrado de DNA lineal y de DNA circular abierto (Aaij y Borst, 1972). El análisis del DNA mitocondrial en gradientes de cloruro de cesio en presencia de bromuro de etidio, tampoco permitió detectar la presencia de DNA circular. Los resultados obtenidos permiten concluir que el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* corresponde a una molécula de configuración lineal.

Se fotografiaron campos de las muestras procesadas para microscopía electrónica. Se midió el largo de contorno de 54 moléculas utilizando un curvímeter y los valores obtenidos se analizaron con un programa estadístico, usando un computador

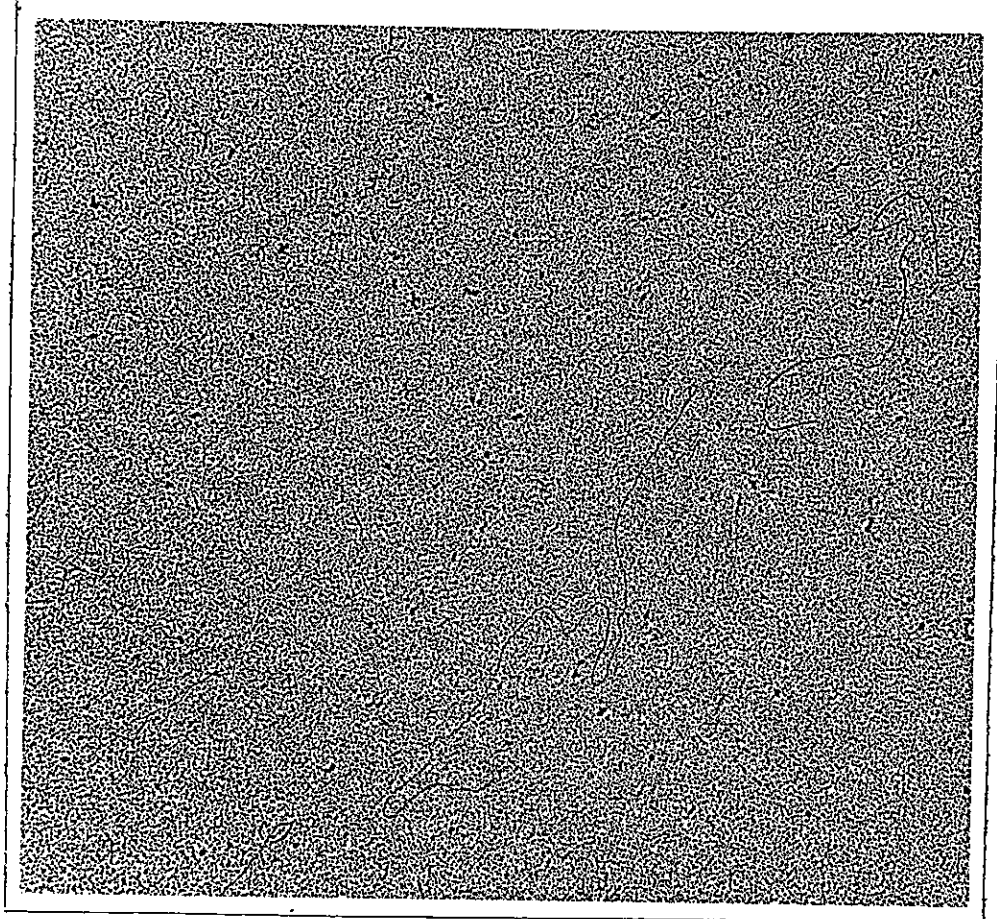


Fig. 20. Microscopía electrónica del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

El DNA mitocondrial se obtuvo a partir de mitocondrias sedimentadas a 10.000 x g, tratadas con DNAsa pancreática y purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa. El DNA se purificó por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión y las preparaciones para microscopía electrónica se obtuvieron según la técnica de Sogo y cols. (1979), y se observaron al microscopio electrónico con un aumento de 10.000 x.

Commodore C-64.

Los largos contornos de las moléculas se distribuyeron en dos grupos y no dieron una curva de distribución Gaussiana, lo que implica que el DNA visualizado al microscopio electrónico no correspondería a productos de degradación. Este hecho concuerda con la ausencia de degradación que presenta en la electroforesis, el DNA mitocondrial utilizado para microscopía electrónica (Fig. 19).

En el primer grupo se observan moléculas con un tamaño promedio de $3.5167 \pm 0.4488 \mu\text{m}$, a las que corresponde un peso molecular de aproximadamente 6.33×10^6 daltons. Este grupo representa el 64% de la población analizada. El segundo grupo reúne moléculas con un tamaño promedio de $6.9077 \pm 1.2840 \mu\text{m}$, valor que es aproximadamente igual al doble del tamaño de las moléculas del primer grupo, correspondiéndoles un peso molecular aproximado de 12×10^6 daltons. Las moléculas de este grupo representan un 36% de la población analizada. Es interesante notar que al largo de contorno de las moléculas del segundo grupo le corresponde un peso molecular muy cercano al determinado sumando los fragmentos obtenidos luego de la digestión del DNA mitocondrial con la endonucleasa de

de restricción SacII.

Estos resultados podrían permitir proponer la existencia en éste DNA mitocondrial de una unidad monomérica de aproximadamente 3.5 μm . Estas unidades podrían asociarse dando origen a moléculas con un peso molecular aproximado de 12×10^6 daltons. Luego del tratamiento para microscopía electrónica, las uniones se rompen dando origen a moléculas con un peso molecular promedio de 6.33×10^6 daltons.

VI. CLONEAMIENTO DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis*.

A. Determinación del tipo de extremos presentes en la molécula de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

Con el objeto de determinar el tipo de ex extremos presentes en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, fracciones de este DNA se trataron con la DNA polimerasa del bacteriófago T₄ y con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*.

El fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, es una enzima que tiene una actividad polimerizante 5' → 3' y una actividad exonucleásica de 3' → 5'. Por lo tanto, se puede usar para rellenar terminales 3'OH, lo que implica la presencia de extremos 5'P protuberantes. La DNA polimerasa del bacteriófago T₄ posee una actividad polimerizante de 5' → 3' y una actividad exonucleásica 3' → 5'. Sin embargo, la actividad exonucleásica de la polimerasa de T₄ es alrededor de 200 veces más activa que la correspondiente a la DNA polimerasa I, y por lo consiguiente, esta enzima se

usa para digerir extremos 3'OH protuberantes.

La acción de estas enzimas sobre el DNA mitocondrial dependerá del tipo de extremos presentes en él. Si la molécula tiene extremos 5'P protuberantes sólo actuará el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, dando como resultado la formación de extremos romos. Si los extremos presentes en el DNA mitocondrial son 3'OH protuberantes, sólo podrá actuar la DNA polimerasa de T₄, originando extremos romos. Finalmente, si la molécula tiene extremos romos ninguna de las dos enzimas tendrá acción sobre ella.

Para evidenciar la acción de estas enzimas, las moléculas de DNA mitocondrial tratadas con fragmentos de Klenow o con DNA polimerasa T₄ se ligaron al vector de clonamiento pUC18 linearizado con SmaI, enzima cuyo sitio de reconocimiento es único en el vector y que origina extremos romos. Luego se transformó *E. coli* JM83 con los ligados obtenidos y se aisló de la población total aquellas bacterias que contenían plasmidios recombinantes. Estas bacterias se seleccionaron sembrando sobre agar-ampicilina-X-gal (Métodos, Sección 27.3). La cepa JM83 es sensible a ampicilina (amp^S) y lactosa negativa (lac⁻). El plasmidio pUC18 (Fig. 21)

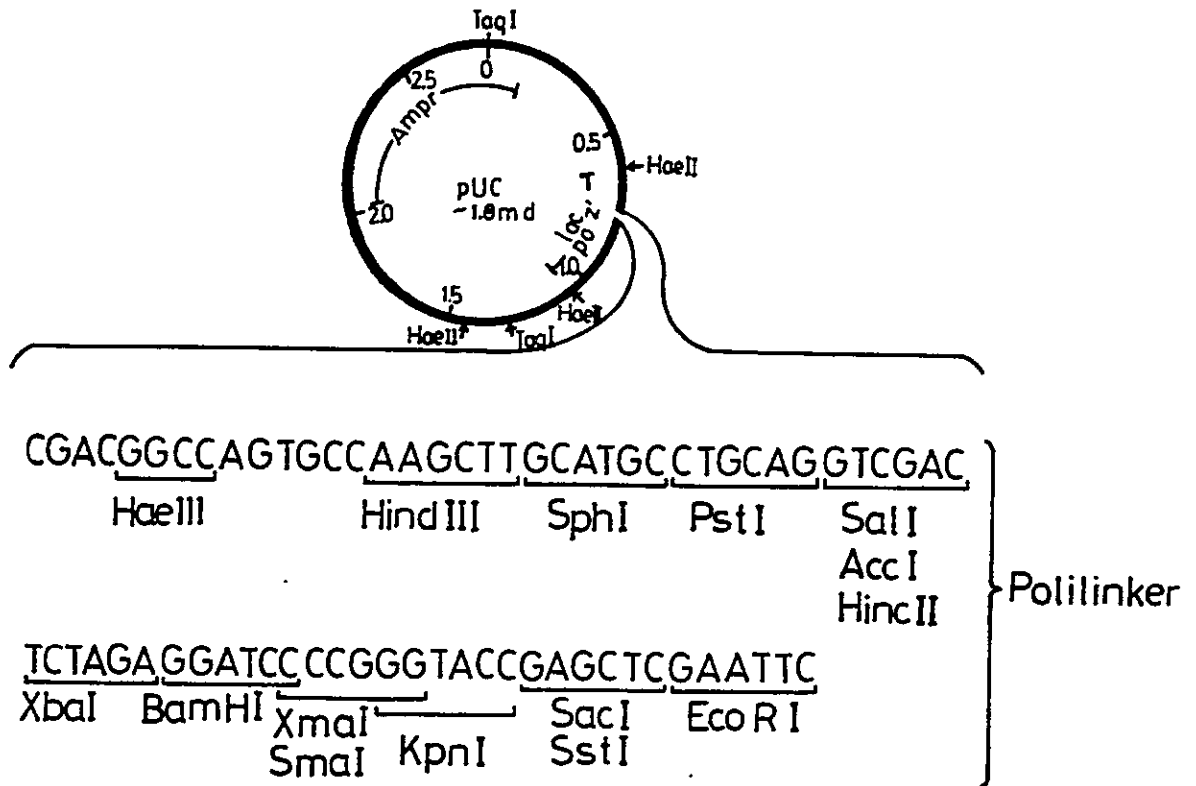


Fig.21. Mapa genético del plasmidio pUC18

lleva un marcador de resistencia a ampicilina, el gen de la β -galactosidasa del operón lactosa y dentro de este último un "polilinker" con sitios únicos de restricción. La inserción de un fragmento en el "polilinker", interrumpe la secuencia del gen de la β -galactosidasa. Al sembrar una bacteria que posea pUC18, ésta es capaz de crecer en presencia de ampicilina, originando además colonias azules como resultado de una reacción química. Esta última es producto de la degradación del galactosido sintético X-gal, presente en las placas de selección. No obstante si la bacteria tiene un plasmidio con inserto, será capaz de crecer en presencia de ampicilina, pero dará colonias blancas ya que el inserto interrumpe la secuencia del gen de la β -galactosidasa.

Considerando lo planteado anteriormente, podemos postular que:

a) Si el DNA mitocondrial tiene extremos 5'P protuberantes se deberían encontrar colonias blancas solo en las transformaciones en que se ligó al vector de clonamiento DNA mitocondrial tratado con fragmentos de Klenow.

b) Si la molécula tiene extremos 3'OH protuberantes se debería encontrar colonias blancas

solo en las transformaciones en que se ligó al pUC18 DNA mitocondrial tratado con la DNA polimerasa de T₄.

c) Finalmente, si el DNA mitocondrial tiene extremos romos sería posible encontrar colonias blancas en ambos tipos de transformaciones (Tabla 2).

Los experimentos de transformación mostraron que al usar una mezcla de ligado entre el vector y la fracción de DNA mitocondrial tratado con fragmento de Klenow, se obtuvo transformantes entre los cuales hubo colonias blancas, las que corresponden a bacterias que contienen plasmidios que podrían tener inserto. Cuando se usó la mezcla de ligado entre el pUC18 y la fracción de DNA mitocondrial tratado con DNA polimerasa de T₄, sólo se obtuvo colonias azules, que corresponden a transformantes que contienen el vector de clonamiento recircularizado. De acuerdo con lo anterior, es posible concluir que el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, posee extremos 5'P protuberantes (Tabla 2).

Alternativamente, este experimento permitió clonar el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* según la estrategia que se muestra en la Fig. 22.

TABLA N° 2

Resultados esperados y obtenidos según el tipo de
extremos presentes en el DNA mitocondrial
de Euglena gracilis

A) Esperado

Extremos	Fragmento de Klenow	DNA Polimerasa de T ₄
5'P	+	-
3'OH	-	+
Romos	+	+

B) Obtenido

	Fragmento de Klenow	DNA Polimerasa de T ₄
	+	-

+ = presencia de colonias blancas

- = ausencia de colonias blancas

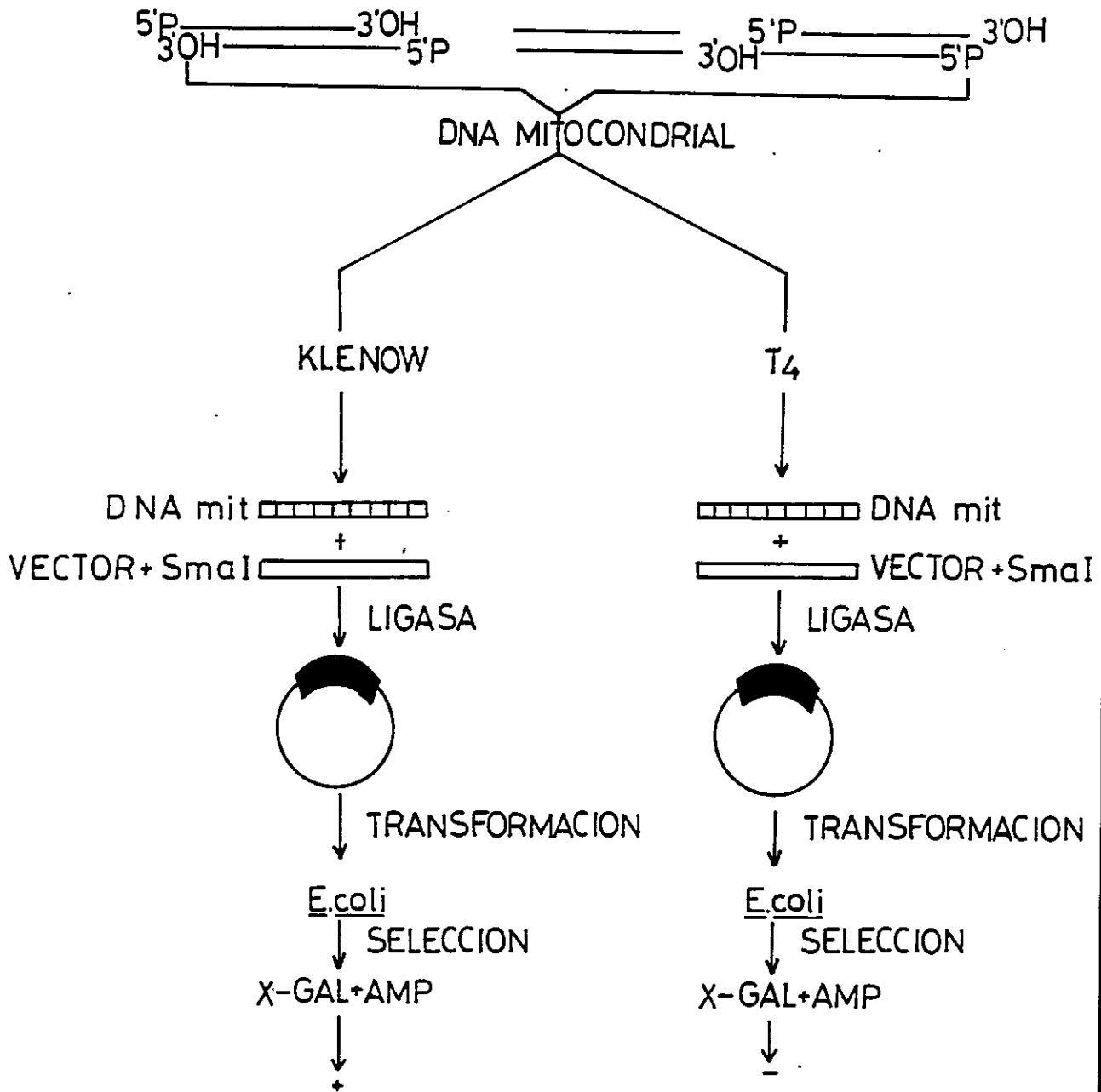


Fig. 22. Estrategia de clonamiento del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

+ = presencia de colonias blancas
 - = ausencia de colonias blancas

B. Retransformación de *E. coli* C600 con los plasmidios recombinantes.

En los experimentos en que se usó una mezcla de ligado entre el vector y la fracción de DNA mitocondrial tratado con fragmento de Klenow, para transformar *E. coli* JM83, se obtuvo del total de transformantes solo 8 que dieron colonias blancas. Estos se denominaron TK (transformantes Klenow) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

Con el objeto de verificar que las colonias blancas de *E. coli* JM83 contenían el vector pUC18, se realizaron minipreparaciones de DNA según Métodos (Sección 27.3). Con el DNA obtenido se transformó *E. coli* C600. Esta cepa es sensible a la ampicilina, por lo que se seleccionó por resistencia a este antibiótico ya que el plasmidio pUC18 lleva un gen de resistencia a ampicilina. Luego de transformar *E. coli* C600 con el DNA obtenido de TK1, TK2, TK5 y TK6, se obtuvo transformantes de C600 con una frecuencia de 600 transformantes/ μ g de DNA. Con lo anterior se demuestra que a lo menos TK1, TK2, TK5 y TK6 corresponden a bacterias que contienen al plasmidio pUC18.

C. Análisis de los plasmidios recombinantes por electroforesis en geles de agarosa y por digestión con endonucleasas de restricción.

Con el objeto de verificar que las colonias blancas obtenidas por transformación de *E. coli* JM83, efectivamente contenían inserto en el vector de clonamiento, se realizó mimipreparaciones de DNA según Métodos (Sección 27.3). El DNA obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa. La Fig. 23 muestra la migración electroforética de los plasmidios presentes en los transformantes TK1, TK2, TK5 y TK6. Los cuatro plasmidios (Fig. 23, columnas a, b, d y e) tuvieron una migración similar, la que fue menor con respecto a la del vector sin inserto (Fig. 23, columna f). La columna f de la Fig. 23 muestra la posición de las formas circular cerrada, lineal y circular abierta del vector pUC18 sin inserto. El resto de las bandas que presenta el vector, corresponden a formas multiméricas de este plasmidio. En el caso de los plasmidios recombinantes TK5 y TK6 (Fig. 23, columnas d y e) se observa la presencia de una banda de menor migración que la banda correspondiente a la forma circular abierta. Estas bandas

podrían corresponder a formas multiméricas de estos plasmidios. El nivel de migración de los plasmidios TK1, TK2, TK5 y TK6 con respecto a la del pUC18 sin inserto, indicaría la presencia del inserto en dichos plasmidios.

Para determinar el tamaño del fragmento de DNA mitocondrial insertado en los plasmidios TK5 y TK2, éstos se trataron con endonucleasas de restricción. El plasmidio TK5 se trató con las endonucleasas EcoRI, SstII y Sali y el plasmidio TK2 se trató con la enzima XhoI. El cálculo del peso molecular de las bandas originadas por digestión se hizo en base a la migración de los fragmentos resultantes. De esta forma se determinó que el plasmidio recombinante presente en TK5 contiene un inserto de aproximadamente 6.4×10^6 daltons. En el caso TK2 el pUC18 recombinante contiene un inserto de aproximadamente 8.0×10^6 daltons. La Fig. 24, muestra la electroforesis de los productos de digestión de los plasmidios presentes en TK2 y TK5 con las endonucleasas indicadas.

Es importante hacer notar que el DNA mitocondrial clonado es susceptible a la acción de endonucleasas de restricción. Las enzimas EcoRI y Sali no cortaron este DNA (Cap. III, Sección B).

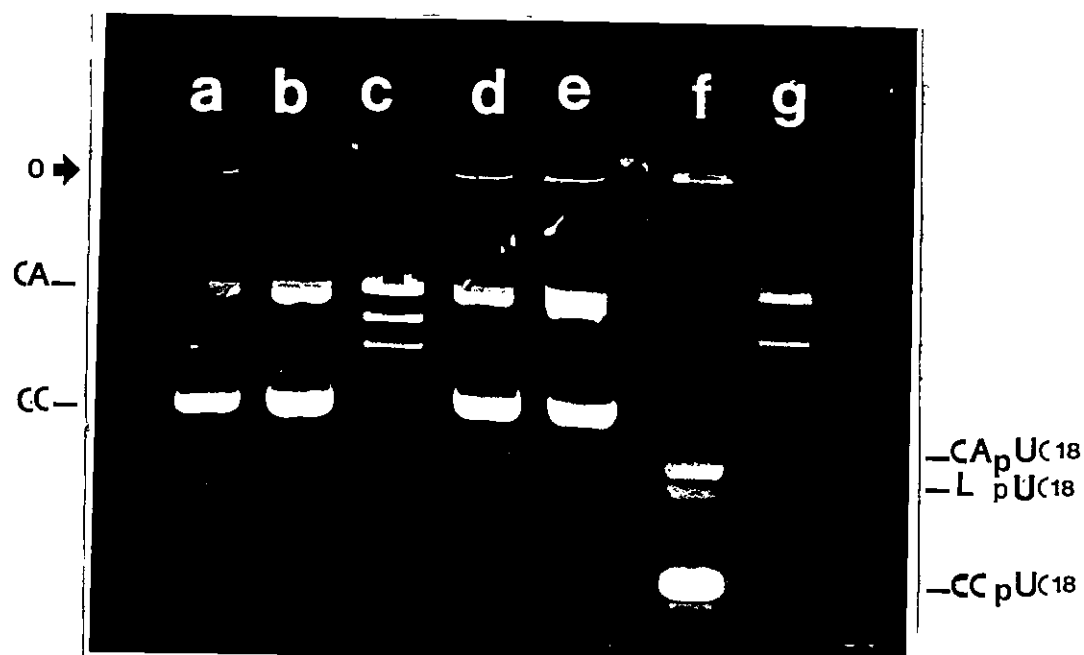


Fig. 23. Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los plasmidios obtenidos de TK1, TK2, TK5 y TK6.

Los DNA(s) plasmidiales se obtuvieron por minipreparaciones de DNA (Métodos, Sección 27.3) a partir de los transformantes TK1, TK2, TK5 y TK6. El DNA obtenido (1 μ g) se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 hrs.

a) DNA de TK1; b) DNA de TK2; c) DNA del bacteriófago λ (0.5 μ g) + HindIII; d) DNA de TK5; e) DNA de TK6; f) pUC18 sin digerir; g) DNA del bacteriófago λ (0.5 μ g) + HindIII (control de migración de columna f). 0 = origen del gel; CA = forma circular abierta; CC forma circular cerrada; L = forma lineal.

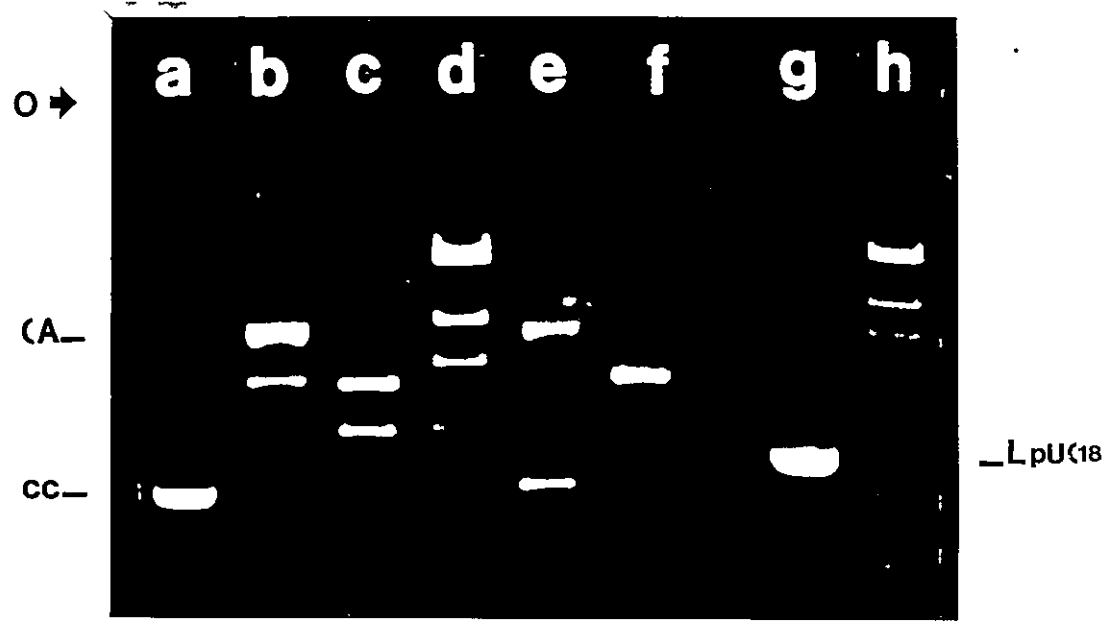


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de los productos de digestión de los plasmidios obtenidos de TK2 y TK5 con las endonucleasas de restricción EcoRI, SallI, SstI y XhoI.

Los DNA(s) plasmidiales se obtuvieron por minipreparaciones de DNA (Métodos, Sección 27.3) a partir de los transformantes TK2 y TK5. El DNA obtenido (0.5 μ g) se sometió a la acción de 5 unidades de cada una de las enzimas durante 3 hrs, en las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica requeridas, según Métodos (Sección 20). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 hrs.

a) DNA de TK5 sin digerir; b) DNA de TK2 + XhoI; c) DNA de TK5 + EcoRI; d) DNA del bacteriófago λ (0.5 μ g) + HindIII; e) DNA de TK5 + SstI; f) DNA de TK5 + SallI; g) DNA de pUC18 + SallI; h) DNA del bacteriófago λ (0.5 μ g) + HindIII (control de migración de columna g). 0 = origen del gel; CA = forma circular abierta; CC = forma circular cerrada; L = forma lineal.

Luego de clonarlo y replicarlo en *E. coli*, el inserto de DNA mitocondrial es sustrato para estas enzimas. Esto confirma la relación existente entre la refractariedad de este DNA a las endonucleasas y la presencia de bases nitrogenadas modificadas en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* (Cap. IV).

VII. ACTIVIDADES NUCLEASICAS PRESENTES EN LA MITOCONDRIA.

A. Actividades desoxirribonucleásicas presentes en el extracto de proteínas mitocondriales totales.

A partir de mitocondrias obtenidas por centrifugación a 10.000 x g, purificadas en gradientes discontinuas de sacarosa y rotas en Tritón X-100 0.2% final, se obtuvo un extracto de proteínas mitocondriales totales.

Este extracto total se fraccionó por cromatografía en columnas de intercambio iónico de DEAE celulosa y fosfato de celulosa, el que fue eluído con una gradiente lineal de KCl 0.1 a 1.0 M.

De la columna de fosfato celulosa, se recolectaron 40 fracciones, en cada una de las cuales se ensayó actividad de desoxirribonucleasa usando DNA del bacteriófago λ como sustrato, según lo descrito en Métodos (Sección 30). En varias fracciones se encontró actividad de desoxirribonucleasa, lo que se puede apreciar en las electroforesis en geles de agarosa, por la ausencia total o parcial de la banda de DNA intacto del bacteriófago λ ,

(Figs. 25.1, 25.2 y 25.3).

En las fracciones 16, 28 y 29 el efecto de las desoxirribonucleasas mitocondriales sobre el DNA del bacteriófago λ , dio como resultado bandas nítidas y de menor peso molecular, semejantes a las que se obtienen por la acción de las enzimas de restricción bacterianas. Las fracciones restantes activas mostrarían la acción de desoxirribonucleasas inespecíficas.

B. Actividades desoxirribonucleásicas presentes en el extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa.

B.1 Detección de desoxirribonucleasas inespecíficas presentes en la cámara mitocondrial externa,

Un sedimento mitocondrial obtenido por centrifugación a 10.000 x g y purificado en gradientes discontinuos de sacarosa, se trató con digitonina para destruir la membrana mitocondrial externa. Las mitocondrias exentas de su cámara externa se sedimentaron y el sobrenadante se fraccionó por

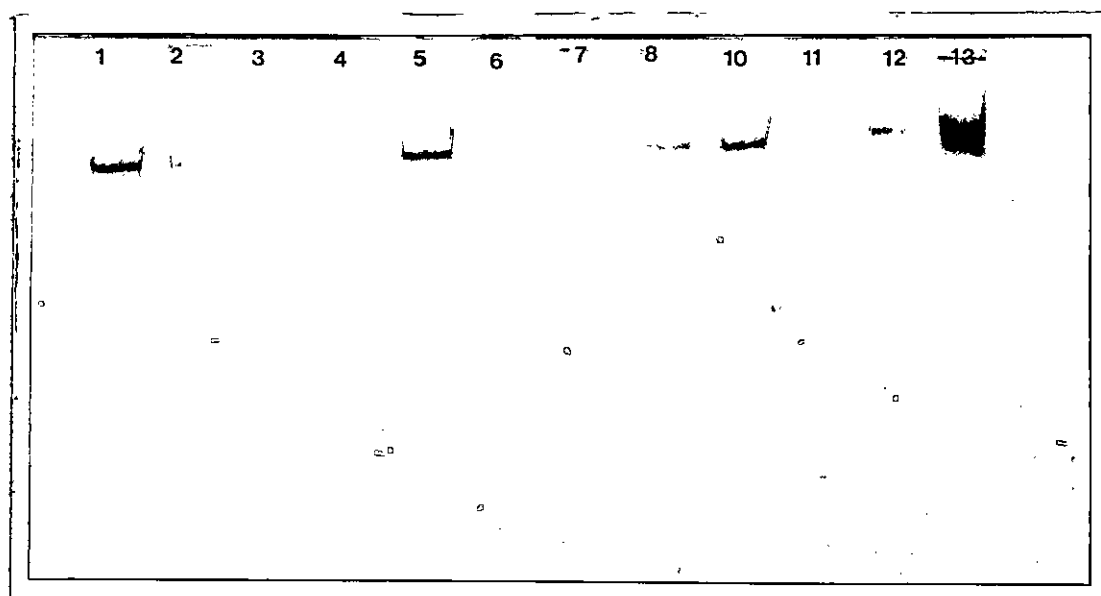


Fig.25.1. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales.

El extracto proteico se fraccionó por cromatografía de afinidad y se usaron columnas de DEAE celulosa y celulosa fosfato. El DNA (0.5 ug) del bacteriófago λ se incubó a 37°C durante 3.5 hrs. con 10 ul de cada una de las fracciones. La figura muestra el resultado de la acción de las fracciones N° 1 a la N° 13.

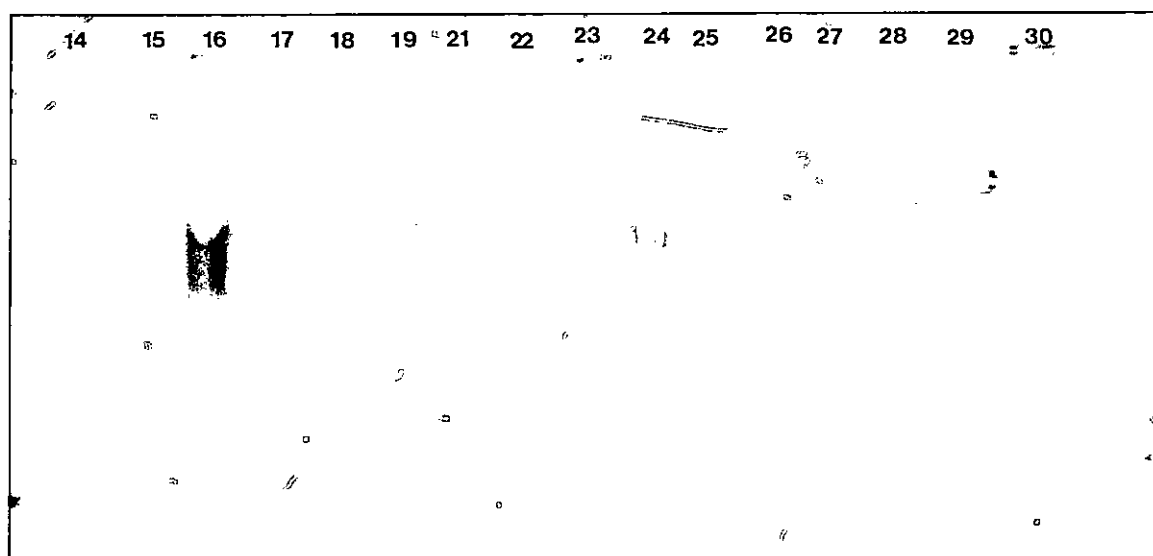


Fig.25.2. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales.

La figura muestra el resultado de la acción de las fracciones N° 14 a la N° 30.

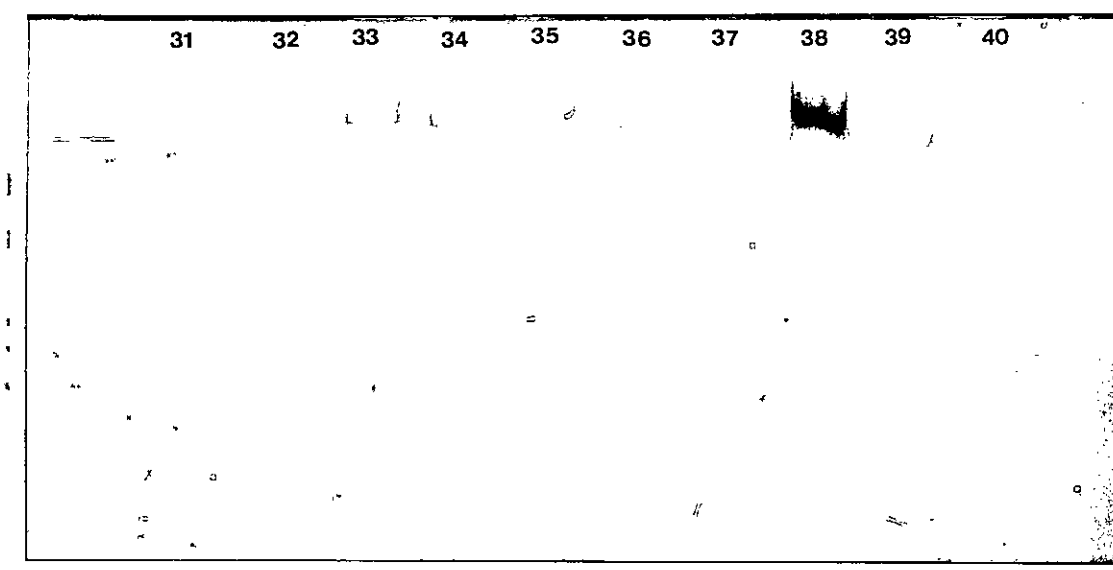


Fig.25.3. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas mitocondriales totales.

La figura muestra el resultado de las acción de las fracciones N° 31 a la N° 40.

cromatografía de afinidad, usando columnas de DEAE celulosa y celulosa fosfato. Las fracciones se ensayaron utilizando DNA del bacteriófago λ intacto, de acuerdo a lo descrito en Métodos (Sección 30).

En los eluidos ensayados se detectó actividades nucleásicas en las fracciones 6-7-8-16-18-30-35 y 42. Estos resultados se muestran en las Figs. 26.1, 26.2 y 26.3.

Se detecta un menor número de fracciones con actividades nucleásicas en las proteínas obtenidas de la cámara mitocondrial externa, si se las compara con las fracciones activas obtenidas de la mitocondria total. Esto indicaría que existen actividades nucleásicas en ambos compartimentos mitocondriales, sin descartar que aquellas que se repiten en los fraccionamientos descritos puedan corresponder a enzimas idénticas.

B.2. Detección de una actividad endonucleásica (NMEE) presente en la cámara mitocondrial externa.

Con el objeto de detectar endonucleásicas en las fracciones anteriormente

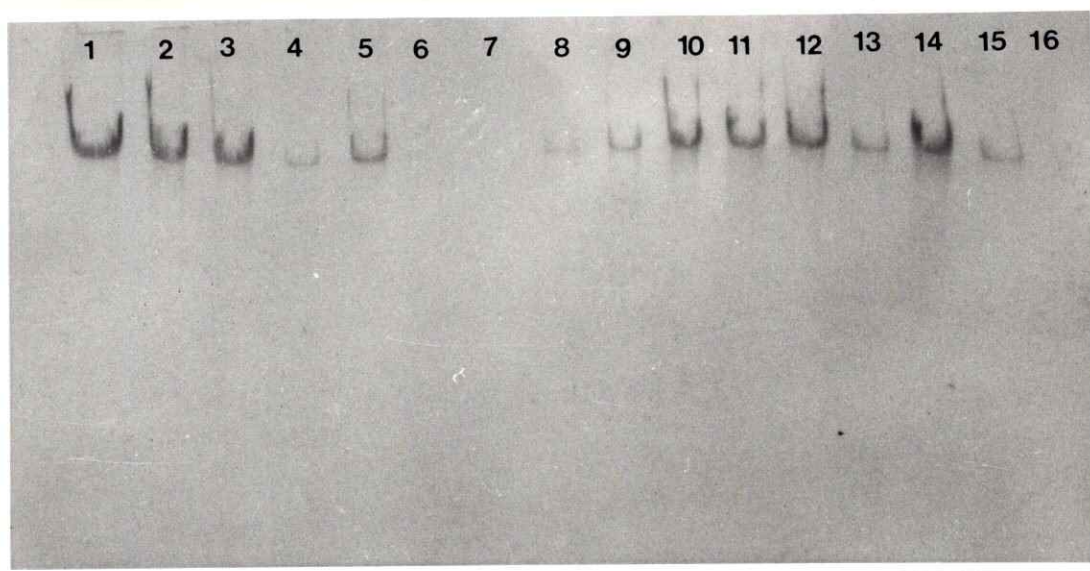


Fig.26.1. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa.

El extracto proteico se fraccionó por cromatografía de afinidad y se usaron columnas de DEAE celulosa y celulosa fosfato. El DNA (0.5 ug) del bacteriófago λ se incubó a 37°C durante 3.5 hrs. con 10 ul de cada una de las fracciones. La figura muestra el resultado de la acción de las fracciones N° 1 a la N° 16.

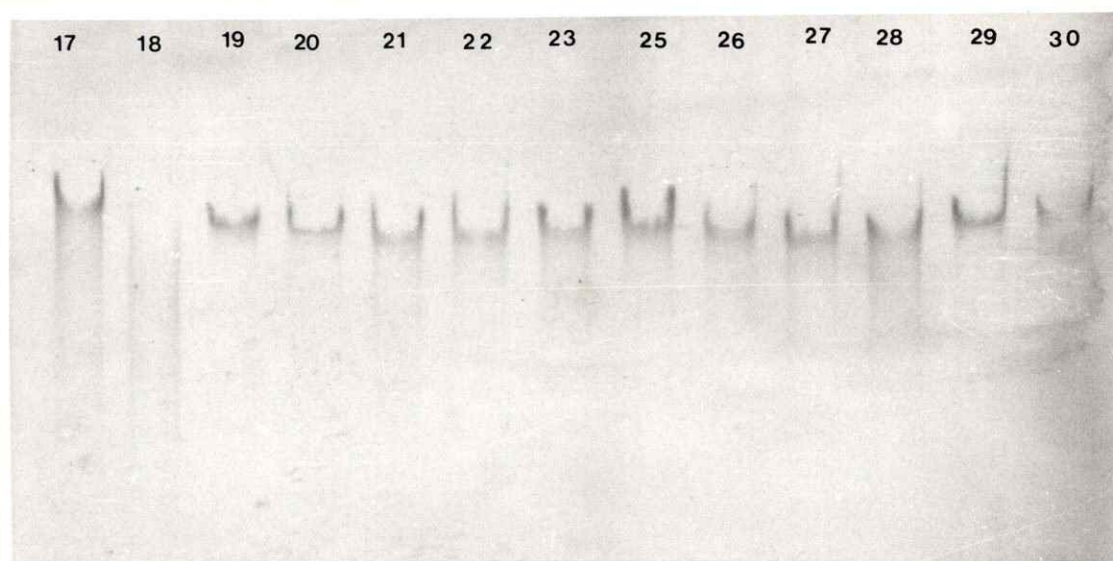


Fig.26.2. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa.

La figura muestra el resultado de la acción de las fracciones N° 17 a la N° 30.

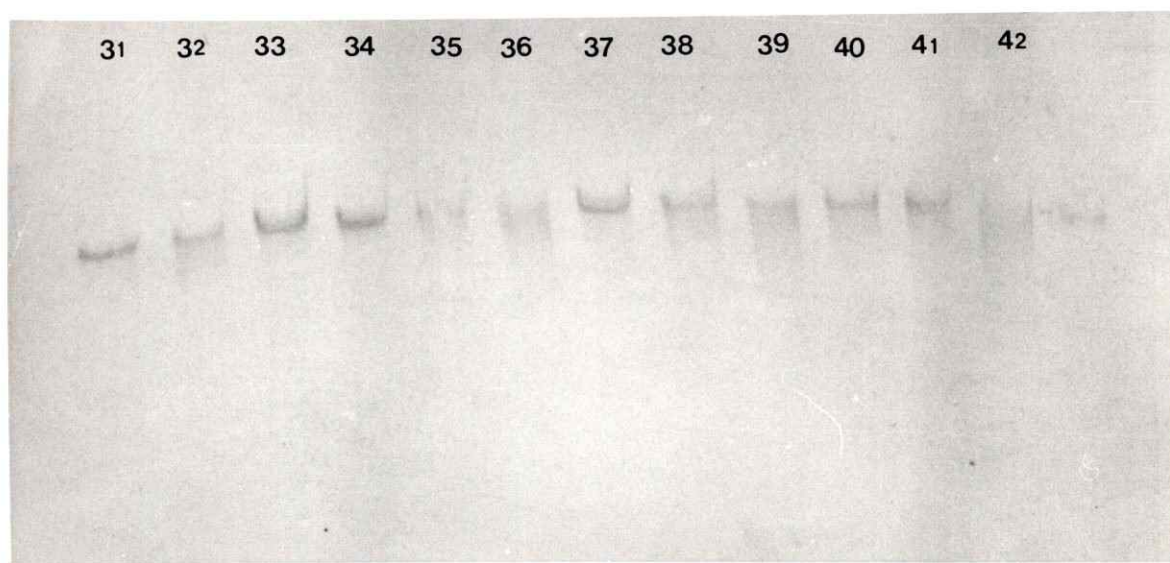


Fig.26.3. Electroforesis de DNA del bacteriófago λ tratado con fracciones provenientes de un extracto de proteínas de la cámara mitocondrial externa.

La figura muestra el resultado de la acción de las fracciones N° 31 a la N° 42.

descritas, obtenidas de la cámara mitocondrial externa, se utilizó como sustrato el DNA del plasmidio pBR322. En geles de agarosa, este DNA puede presentar tres posiciones correspondientes a las formas circular sobreenrollada (forma de mayor migración), lineal (forma de migración intermedia) y circular relajada (forma de menor migración); esta última forma presenta al menos un corte en una de las hebras. El DNA del plasmidio pBR322 se ensayó con las fracciones obtenidas de la cámara mitocondrial externa, eluidas de la columna de celulosa fosfato, en las condiciones descritas en Métodos (Sección 29). Se detectó que la fracción 32 del extracto obtenido de la cámara mitocondrial externa, que eluyó a una molaridad de 0.6 M KCl tenía una actividad endonucleásica como puede observarse en la Fig. 27 (columna A).

Esta actividad endonucleásica se denominó NMEE ("nickasa" de cámara mitocondrial externa de *Euglena gracilis*), la cual es capaz de transformar la forma sobreenrollada del DNA de pBR322 a la forma relajada.

Como una manera de comprobar que el sustrato para la actividad nucleásica descrita efectivamente debe ser un DNA sobreenrollado se

realizaron dos controles: primero se incubó el DNA de pBR322 con la enzima BamHI la cual lo lineariza y posteriormente se le incubó con NMEE. Como se muestra en la Fig. 27, columna B, no existe cambio en la forma adquirida por el DNA sustrato después de la acción de la primera enzima utilizada en este tratamiento. Como segundo control, el DNA de pBR322 se incubó primero con NMEE y luego se le agregó la enzima BamHI. Como se observa en la Fig. 27, columna C, el DNA tratado con NMEE produjo una banda correspondiente al DNA en su estado relajado, apareciendo además, el estado lineal producto de la acción de la enzima BamHI en condiciones de digestión parcial.

Se determinó la acción de esta fracción a los 30, 60 y 180 minutos, para lo cual se incubó a 37°C con DNA del plasmidio pBR322 como sustrato. Ya a los 30 minutos se había producido la relaja - ción del DNA usado como sustrato (no mostrado).

Todo este estudio detectó la existencia de una actividad endonucleásica muy particular, similar a la acción de las enzimas denominadas "nickasas", que cortan una sola de las hebras de un DNA de doble hebra, otorgando a la molécula un estado de relaja - ción manifestado claramente con el DNA de pBR322.

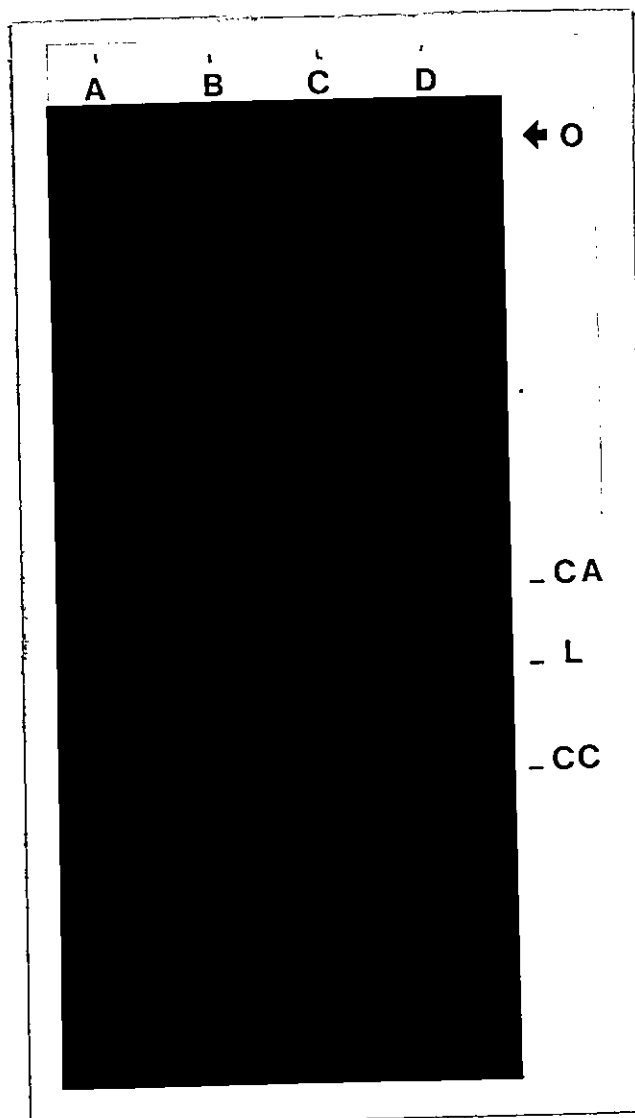


Fig. 27. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos obtenidos luego de la acción de la actividad NMEE sobre el DNA del plásmido pBR322.

Electroforesis en gel de agarosa (1%). La actividad NMEE fue obtenida a partir de proteínas de cámara mitocondrial externa y finalmente eluída de una columna de celulosa fosfato. El ensayo se efectuó con 20 μ l de la fracción 32 en la solución Tampon 19, utilizando DNA de pBR322 (1 μ g) como sustrato, según Métodos (Sección 28) a 37°C durante 2 hrs.

A) DNA de pBR322 + fracción 32; B) DNA de pBR322 + endonucleasa BamHI (3 unidades) durante 1 hr y luego fracción 32 durante 1 hr más; C) DNA de pBR322 + fracción 32 durante 1 hr y luego endonucleasa BamHI (3 unidades) durante 1 hr más; D) DNA de pBR322 sin tratar. 0 = origen del gel; CA = forma circular abierta; L = forma lineal; CC = forma circular cerrada.

B.2.1. Efecto de la temperatura sobre la acción de la actividad endonucleásica (NMEE) presente en la cámara mitocondrial externa.

Para comprobar si la acción de la actividad de NMEE era afectada por la temperatura, se realizó un ensayo con DNA de pBR322 tratado con 10 μ l de NMEE a dos temperaturas: 55°C y 37°C. En la columna A de la Fig. 28 se muestra que la incubación a 55°C inhibe la actividad de NMEE expresada a 37°C (columna B), en la cual desaparece la forma de migración más rápida (forma sobre enrollada de pBR322).

B.2.2. Purificación de DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* en condiciones que pueden impedir la actividad de las desoxirribonucleasas presentes en el organelo.

a) DNA purificado de mitocondrias desprovistas de cámara externa.

La digitonina es un esteroide glicosilado capaz de destruir la membrana externa de la

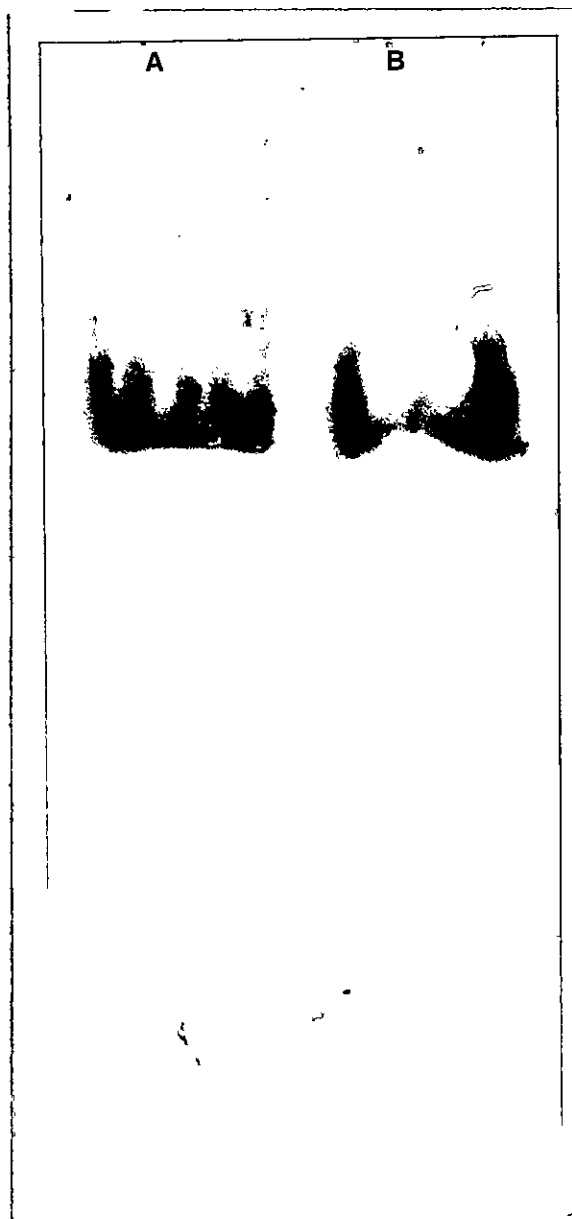


Fig. 28. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de pBR322 tratado con NMEE a 37°C y 55°C.

El ensayo se efectuó con 10 μ l de la fracción 32 en la solución Tampón 19, utilizando DNA del plasmidio pBR322 (1 μ g) como sustrato, incubado a 55°C y 37°C durante 2 hrs, según Métodos (Sección 30).

DNA de pBR322 + fracción 32 incubados a: A) 55°C; B) 37°C.

mitocondria, liberando de esta forma las proteínas localizadas en la cámara mitocondrial externa. Por lo tanto, con este tratamiento se obtiene una condición en la que no está presente la actividad de NMEE, ni las otras actividades de desoxirribonucleasas de la cámara mitocondrial externa.

Para obtener los mitoplastos, las mitocondrias obtenidas por centrifugación a 10.000 x g y purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa, se trataron con 0.5 mg de digitonina por mg de proteína mitocondrial como se indica en Métodos (Sección 9). El DNA mitocondrial se purificó a partir de estos mitoplastos como se indica en Métodos (Sección 10), el cual fue analizado en geles de agarosa al 1%. En la columna A de la Fig. 29 se muestra el DNA obtenido a partir de mitocondrias intactas, el cual presenta una sola banda que migra a la altura de la primera de las bandas del DNA del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. En la columna B, el DNA mitocondrial obtenido a partir de mitoplastos el cual presenta dos bandas; una de ellas se ubicó a la altura de la primera banda del estandar utilizado con HindIII y la otra, entre la segunda y la tercera banda del mismo estandar.

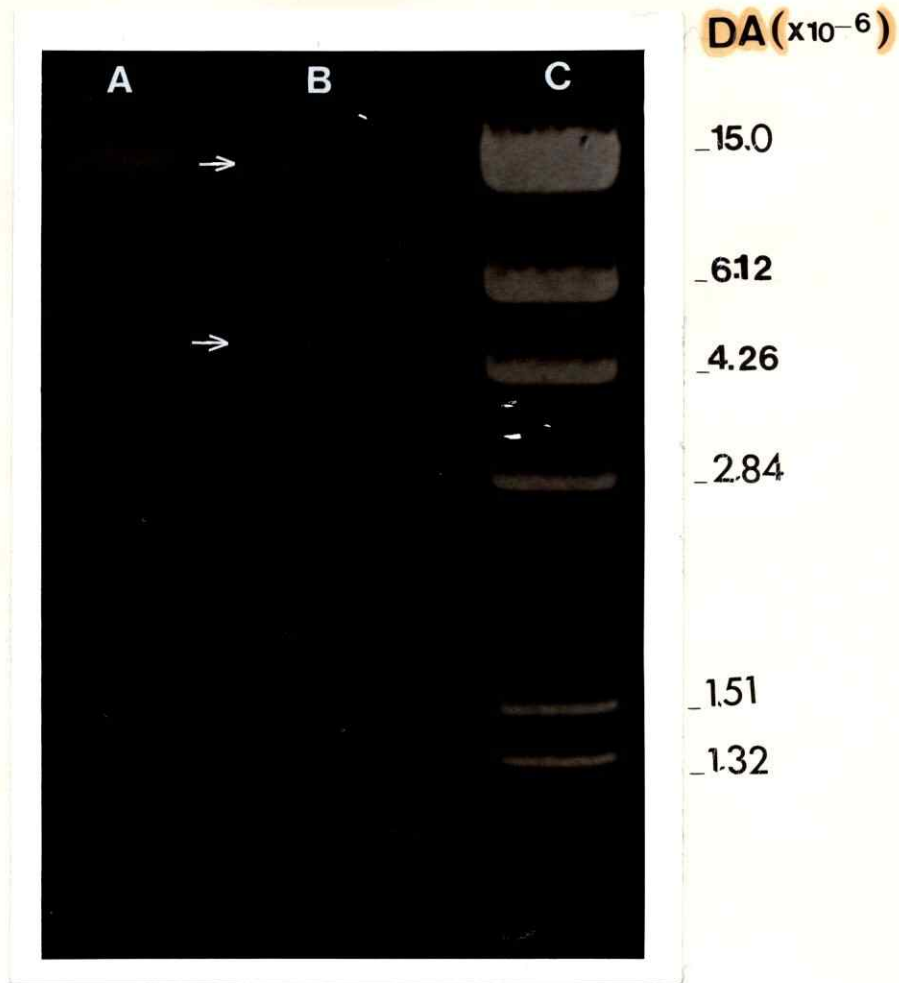


Fig. 29. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias de *Euglena gracilis* desprovistas de cámara externa (mitoplastos).

Las mitocondrias se sedimentaron a $10.000 \times g$, se trataron con DNAsa pancreática y se purificaron en gradiente discontinuas de sacarosa. Los mitoplastos se obtuvieron con digitonina 0.5 mg/mg de proteína mitocondrial, como se indica en Métodos (Sección 9). El DNA mitocondrial se obtuvo según se indica en Métodos (Sección 10). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 horas.

A) DNA ($0.3 \mu\text{g}$) purificado de mitocondrias intactas; B) DNA ($0.3 \mu\text{g}$) purificado de mitoplastos; C) DNA ($0.5 \mu\text{g}$) del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

Este resultado representa una importante diferencia con respecto al DNA obtenido de mitocondrias intactas, el que correspondería solo a la banda que se ubica a la altura de la primera banda del patrón utilizado.

- b) DNA purificado de mitocondrias intactas con lisis del organelo a 55°C.

De acuerdo a los experimentos realizados con DNA de plasmidio pBR322 tratado con NMEE, se determinó que una condición limitante de la actividad de esta fracción era la temperatura por sobre 55°C, resultado que se muestra en la Fig. 28.

Considerando lo anterior se procedió a purificar DNA, empleando mitocondrias intactas tratadas con DNAsa pancreática y purificadas en gradientes discontinuos de sacarosa, lisadas a la temperatura de 55°C durante 30 minutos. Al analizar el DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se observó nuevamente la presencia de dos bandas (Fig. 30, columna B). Tal como ocurría con digitonina, en este caso también una de las bandas se ubicaba a la altura de la primera banda del estandar digerido con HindIII, y la

otra entre la segunda y la tercera banda del estandar (Fig. 30, column C).

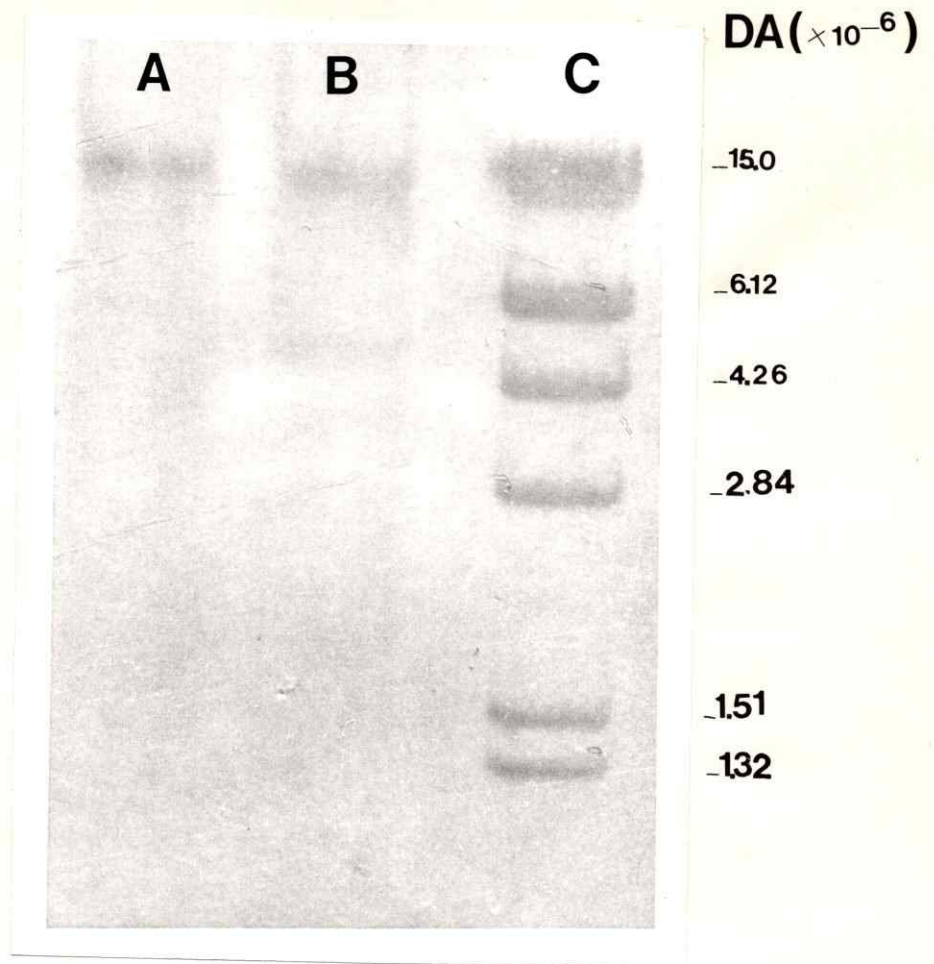


Fig. 30. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de DNA purificado de mitocondrias intactas de *Euglena gracilis* lisadas a 55°C.

Las mitocondrias se sedimentaron a 10.000 x g, se trataron con DNAsa pancreática y se purificaron en gradiente discontinua de sacarosa. La lisis se realizó a 55°C utilizando Tritón X-100 y luego SDS como está descrito en Métodos (Sección 10). El DNA mitocondrial se obtuvo según Métodos (Sección 10). Las muestras entraron al gel a 200 mA y se continuó la electroforesis a una corriente constante de 100 mA durante 3 horas.

A) DNA (0.3 μ g) purificado de mitocondrias intactas lisadas a 37°C; B) DNA (0.3 μ g) purificado de mitocondrias intactas lisadas a 55°C; C) DNA (0.5 μ g) del bacteriófago λ digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Los valores indican el peso molecular de estos fragmentos.

DISCUSION

FORMA Y TAMAÑO DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis* VAR. BACILLARIS.

Un análisis de la literatura referente al DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* demuestra que no hay acuerdo respecto a su forma y a su peso molecular.

Con respecto a la forma de este DNA, los resultados obtenidos en esta Tesis mediante microscopía electrónica indican que la molécula presenta una configuración lineal; no se observó ninguna molécula de configuración circular. Este resultado está de acuerdo con lo observado por otros investigadores (Schori y cols., 1970; Nass y Ben-Schaul, 1974; Manning y cols., 1971). Tales hallazgos difieren de lo descrito por Nass y cols. (1974) quienes detectaron la presencia de formas circulares en el DNA mitocondrial. Sin embargo, el porcentaje de círculos encontrados por ellos fue de un 3% siendo el 97% restante moléculas de configuración lineal. Es importante señalar que estos autores emplearon shock osmótico para romper las mitocondrias y que el DNA obtenido no fue visualizado en geles de agarosa para confirmar la integridad de las moléculas aisladas.

En este trabajo, el DNA mitocondrial utilizado para microscopía electrónica se visualizó por electroforesis en geles de agarosa, en donde se observó una sola banda que no mostró degradación, lo que avala la integridad de la preparación de DNA empleada.

Los resultados del análisis de la forma de este DNA por microscopía electrónica, concuerdan con lo encontrado en los experimentos en los que se sometió al DNA mitocondrial a centrifugación en gradientes de cloruro de cesio en presencia de bromuro de etidio. En estos se visualizó sólo una banda, no encontrándose ninguna otra de mayor migración, correspondiente a un DNA circular. Alternativamente, las electroforesis en geles de agarosa con 10 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, mostraron que el DNA mitocondrial presentó sólo una banda de migración. De acuerdo a Aaij y Borst (1972), éste último método permite una buena separación de las formas lineal, circular cerrada y circular abierta de igual peso molecular para DNAs de doble hebra. En consecuencia, con distintas técnicas se concluye que el DNA mitocondrial de *E. gracilis* es lineal.

Respecto del tamaño del DNA mitocondrial medido por el largo de contorno de moléculas analizadas al microscopio electrónico, se observó una distribución en dos grupos. El primero presentó moléculas de 3.5 μm de largo, que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 6.33×10^6 daltons.

El segundo grupo reunió moléculas con un largo de contorno promedio de $6.9 \mu\text{m}$, lo que equivale aproximadamente a 12×10^6 daltons de peso molecular. Este resultado es sorprendente, por cuanto en los geles de agarosa se observó una sola banda que corresponde a un peso molecular aproximado de 15×10^6 daltons. Sin embargo, el valor de 12×10^6 daltons estimado por microscopía electrónica corresponde estrechamente con el calculado sumando los fragmentos de digestión del DNA mitocondrial obtenidos con SacII. Por lo tanto, en esta Tesis se postula que el peso molecular del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* es de 12×10^6 a 15×10^6 daltons. El DNA de tamaño 6.33×10^6 daltons observado con el microscopio electrónico podría ser consecuencia de la técnica de preparación del material para su observación.

COMPORTAMIENTO REFRACTARIO DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis* VAR. BACILLARIS A LA ACCION DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

El DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* fue tratado con 22 endonucleasas de restricción. Cada una de estas enzimas fue examinada en su funcionalidad utilizando DNA del bacteriófago λ como sustrato, obteniéndose patrones de corte idénticos a los descritos para cada una de ellas. De las 22 enzimas utilizadas sólo 4 cortaron el DNA mitocondrial y las 18 restantes no tuvieron acción sobre este sustrato.

Ante la posibilidad que la falta de actividad de 18 enzimas de restricción, se debiera a la presencia de un inhibidor en las preparaciones de DNA mitocondrial, se ensayó la acción de las enzimas HindIII, BamHI, BglI, BglII, HaeIII y HinfI sobre una mezcla de DNA mitocondrial purificado y DNA de bacteriófago λ . En todos los casos se observó que el DNA de bacteriófago λ fue cortado por estas enzimas de restricción, las que no actuaron sobre el DNA mitocondrial. Este resultado sugiere que no existe un inhibidor capaz de inactivar las enzimas, lo que estaría además apoyado por el hecho que al menos 4 de las 22 enzimas ensayadas, tuvieron efecto sobre el DNA mitocondrial. Por lo tanto, cabría admitir que existe en el DNA mitocondrial algún tipo de

"impedimento" que no hace posible la acción de estas 18 enzimas, que éste estaría asociado al DNA mitocondrial y no sería difusible. Una posibilidad es que el DNA mitocondrial forme un complejo estable con metales pesados tales como cobre, plata y mercurio, los cuales poseen alta afinidad por bases nitrogenadas (Tu y Reinoso, 1966). En esta interacción está involucrada la guanina, pudiendo además el mercurio formar un complejo con adenina. Considerando que las cuatro enzimas de restricción que producen cortes en este DNA mitocondrial, reconocen secuencias en que está presente guanina, es poco probable que la inaccesibilidad del DNA mitocondrial a enzimas restrictivas se deba a su interacción con estos metales pesados.

Sin embargo, existiría la posibilidad que este DNA estuviese formando complejos con otros metales pesados que tuviesen alta afinidad por timina y adenina, lo que impediría la acción de las enzimas de restricción. Cabe recordar que el medio de cultivo de *Euglena gracilis* contiene metales tales como molibdeno, cobre, zinc, cobalto y hierro en cantidades trazas.

La unión de metales pesados a ácidos nucleicos debería realizarse con la misma probabilidad al DNA cloroplástico, al mitocondrial y al nuclear. Los resultados obtenidos de ensayos realizados con DNA nuclear mostraron que éste fue digerido con BamHI, HindIII y EcoRI, enzimas que no

actuaron sobre el DNA mitocondrial. Esto haría poco consistente la explicación planteada para la refractariedad del DNA mitocondrial a las endonucleasas de restricción, por interacción con metales pesados. A pesar de lo anterior, esta es una posibilidad que no puede descartarse totalmente.

Otra posibilidad que explicaría la refractariedad del DNA mitocondrial a estas 18 enzimas de restricción, estaría dada por la ausencia de las secuencias específicas de reconocimiento para ellas.

La mayoría de las enzimas de restricción reconocen en el DNA una secuencia muy específica, que generalmente puede ser un tetra o un hexanucleótido. En un DNA con distribución de sus bases nitrogenadas al azar, es decir, 50% de G + C y 50% de A + T, se ha calculado que en promedio debería existir a lo menos una vez un determinado tetranucleótido cada 256 pares de bases (pb) e igualmente un determinado hexanucleótido cada 4096 pb (Malcom, 1981).

Una gran parte de los DNAs estudiados no presentan una distribución al azar de sus bases nitrogenadas. Tal es el caso de los DNAs mitocondrial y cloroplástico de *Euglena gracilis*, que poseen un contenido aproximado de 75% de A + T y 25% de G + C. Por ejemplo, se ha calculado que un DNA en el cual exista esta última forma de distribución de bases nitrogenadas, la secuencia de reconocimiento para SmaI (CCCGGG) podría existir sólo una vez cada 262.144 pb (Malcom, 1981).

Por lo tanto, el DNA cloroplástico de *Euglena gracilis* que posee 130.000 pb, teóricamente no debería presentar ningún sitio de reconocimiento para SmaI, lo que fue comprobado experimentalmente por Gray y Hallick (1978).

Este hecho avalaría que no se encuentren las secuencias de reconocimiento para algunas enzimas de restricción en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*, cuya proporción de bases nitrogenadas es semejante a la del DNA cloroplástico, siendo además su tamaño inferior.

Según Mac Clelland (1981), algunos DNAs están protegidos de la acción de endonucleasas de restricción debido a metilaciones existentes dentro de las secuencias de reconocimiento. Así, podría inferirse que existe una tercera alternativa para explicar la refractariedad mostrada por el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* a 18 de las 22 endonucleasas de restricción ensayadas.

Las metilaciones encontradas en los DNAs se producen en la posición N⁶ de la adenina o en la posición C⁵ de la citosina (Nathans y Smith, 1975), siendo posible encontrarlas tanto en una como en las dos hebras. La metilación en una de las hebras (hemi-metilación) es ya suficiente para impedir la acción de una endonucleasa de restricción (Rubin y Modrich, 1977).

Para analizar los resultados obtenidos con las enzimas de restricción ensayadas sobre el DNA mitocondrial de

Euglena gracilis, considerando la posibilidad que éste se encuentre metilado, se hará una relación de los datos de la literatura hasta ahora reportados.

- HindIII no actúa, si existe metilación en la segunda adenina (AAGCTT) de su secuencia de reconocimiento (Roy y cols., 1973).
- HincII es inhibida en su acción por la presencia de 6-me₂tiladenina en su secuencia de reconocimiento (GTPyPuAC) (Gruenbaum y cols., 1981).
- BamHI no actúa, siempre que la metilación ocurra en la citosina interna de su secuencia de reconocimiento (GGATCC), no así si la metilación ocurre en la adenina ó en la citosina externa (Hattman y cols., 1978).
- PstI no actúa en el caso que haya metilación en la citosina presente en su secuencia de reconocimiento (CTGCAG) (Mc Clelland, 1981).
- AvaII no produce corte si presenta metilación en su citosina interna (GG^A_TCC) de su secuencia de reconocimiento (Mc Clelland, 1981).
- HaeIII es incapaz de actuar si la secuencia de reconocimiento (GGCC) está metilada en la citosina interna (Mc Clelland, 1981).
- HpaI, se sabe que es capaz de cortar si la metilación ocurre en la citosina presente en su secuencia específica de reconocimiento (GTTAAC), pero no se tienen antecedentes

de lo que ocurre si las metilaciones afectan a cualesquiera de las adeninas de su secuencia de reconocimiento (Mc Clelland, 1981).

- BglII actúa cuando su secuencia específica de reconocimiento está metilada en la adenina interna (AGATCT), pero no se tienen antecedentes de lo que podría ocurrir si hubiese metilaciones en la adenina externa o en la citosina (Mc Clelland, 1981).
- HinfI actúa cuando la metilación afecta a la citosina presente en su secuencia de reconocimiento (GATC). Pero no se tiene antecedentes sobre su acción cuando está metilada la adenina (Mc Clelland, 1981).
- EcoRI, no corta el DNA, al existir metilación en la adenina ubicada en el dinucleótido ApT de la secuencia de reconocimiento (GAATTC), no conociéndose el efecto de las metilaciones en la citosina o en la adenina ubicada en el dinucleótido GpC.
- MspI, es capaz de cortar si existe metilación en la citosina interna de su secuencia (CCGG), pero no tiene acción si la metilación ocurre en la citosina externa (Mc Clelland, 1981).
- MboI, no es capaz de cortar un DNA si su secuencia de reconocimiento (GATC) se encuentra metilada en la adenina y se desconoce su acción cuando la citosina se encuentra metilada.

- SallI, no puede cortar secuencias metiladas en la citosina interna de su secuencia de reconocimiento (GTCGAC), pero se desconoce el efecto de la metilación de la citosina externa ó de la adenina.
- TthI, puede actuar si la secuencia de reconocimiento (TCGA) se encuentra metilada en la citosina, pero no corta si es que la metilación afecta a la adenina.
- Para las enzimas BglI (GCCNNNNNGGC), XbaI (TCTAGA), DdeI (CTNAG) y SstI (GAGCTC) no existen datos en la literatura acerca del efecto que tendría sobre sus actividades, la presencia de bases nitrogenadas metiladas en sus secuencias de reconocimiento.

Dada la relación que existe entre la inactividad de algunas enzimas de restricción sobre el DNA y la presencia de bases nitrogenadas metiladas en las secuencias de reconocimiento para estas enzimas según los autores citados, se investigó la existencia de 6-metiladenina y 5-metilcitosina en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

Los resultados de las cromatografías en papel de hidrolizados de DNA mitocondrial indicaron la presencia de una mancha que corresponde por su Rf en el solvente utilizado a 5 metilcitosina, y otra muy débil que se ubica con un Rf correspondiente a 6-metiladenina. La primera evidencia de la presencia de bases metiladas en un DNA mitocondrial fue informada por Evans y Evans (1970). Estos autores

encontraron en *Physarum polycephalum* un 2% de 5-metilcitosina en su DNA mitocondrial.

En el caso del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* el método empleado no permitió cuantificar el porcentaje de bases metiladas presentes. Sin embargo, es importante hacer notar que dicho método permite discriminar cantidades mayores de 5 μ g de cada compuesto. Considerando que la cantidad de G + C representa un 25% o menos en este DNA mitocondrial, la visualización clara de una mancha que representa a la citosina metilada, permite suponer que esta base está presente en un porcentaje significativo. Por otro lado, tomando en consideración que el porcentaje de A + T en este DNA es del 75% o mayor y que la mancha con Rf correspondiente a 6-metiladenina es muy débil, puede suponerse que su porcentaje es muy bajo y en tal caso la comprobación de la presencia de esta base requeriría de un método de mayor resolución.

La presencia en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* de 5-metilcitosina y la posible existencia de 6-metilaminopurina sumada a la posible falta de las secuencias de reconocimiento para algunas de las endonucleasas utilizadas, podrían constituir una explicación de la inactividad de 18 de las 22 enzimas ensayadas frente al DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*.

Cuatro de las endonucleasas mostraron actividad frente a este DNA mitocondrial; XmaI (CCCGGG), SmaI (CCCGGG), XhoI (CTCGAG) y SacII (CCGCGG).

Los datos publicados en la literatura señalan que:

XmaI puede cortar un DNA aunque su secuencia de reconocimiento esté metilada en la citosina ubicada en el dinucleótido CpG, pero se ignora lo que ocurre si las metilaciones existen en cualesquiera de las otras dos citosinas.

SmaI no corta el DNA si la metilación existe en la citosina ubicada en el dinucleótido CpG, ignorándose su acción sobre el DNA cuando las otras citosinas están metiladas.

Las enzimas XmaI y SmaI son isoquísómeros ya que reconocen la misma secuencia; sin embargo, SmaI rompe simétricamente el hexanucleótido (CCC↓GGG), mientras que XmaI lo hace asimétricamente (C↓CCGGG). Se ha comprobado experimentalmente que si el dinucleótido CpG no está metilado, las dos enzimas producen idénticos patrones de corte, pero si hay metilación, los patrones de corte son distintos en ambos casos como consecuencia de la inhibición parcial de SmaI por metilación de su secuencia de reconocimiento (Youssofian y Mulder, 1981). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis, las dos enzimas dieron patrones de corte diferentes con el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis*. Si bien en ambos casos hubo digestión incompleta, en el caso de SmaI se obtuvo una sola banda de digestión, y en el caso de XmaI hubo

dos bandas de digestión. El comportamiento de estas enzimas sobre el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* estaría avalando la existencia de 5-metilcitosina en este DNA y confirmaría el hallazgo de esta base nitrogenada metilada en los estudios cromatográficos realizados con este DNA.

Sin embargo, la prueba más concluyente de que la refractariedad del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* está relacionada con la presencia en este DNA de bases nitrogenadas modificadas, la dio la acción de las endonucleasas EcoRI y Sall sobre el DNA mitocondrial clonado. Las enzimas EcoRI y Sall no tuvieron acción sobre el DNA mitocondrial aislado de mitocondrias intactas. Pero estas mismas endonucleasas fueron capaces de digerir el DNA mitocondrial luego que éste se insertó en pUC18 y se replicó en *E. coli* C600.

CLONAMIENTO DEL DNA MITOCONDRIAL DE *Euglena gracilis*

Para clonar el DNA mitocondrial de *Euglena* se utilizó como vector el plasmidio pUC18, dado que presenta la ventaja de que mediante un solo paso de selección pueden detectarse los transformantes que contienen plasmidios recombinantes. Con el empleo de este método, las colonias bacterianas transformantes presentan un color blanco, determinado por la inactivación insercional del gen de la β -galactosidasa.

Con el objeto de verificar la presencia del plasmidio pUC18 en los transformantes de *E. coli* JM83, se retransformó *E. coli* C600 con DNA extraído de transformantes de JM83. La aparición de colonias de *E. coli* C600 ampicilina resistentes demostró la transferencia de un marcador genético plasmidial como es la resistencia a ampicilina.

Además, las colonias blancas pueden producirse como consecuencia de la pérdida de la fase de lectura del gen de la β -galactosidasa, hecho éste que sucede luego de la pérdida de 1 o 2 bases nitrogenadas en la secuencia nucleotídica del gen. Como resultado se obtienen colonias blancas, que contienen plasmidios sin inserto. El análisis electroforético de los plasmidios presentes en los transformantes obtenidos (TK1, TK2, TK5 y TK6) mostró que ellos tienen una migración electroforética comparada con la del pUC18 sin

inserto, lo que está indicando la presencia de inserto en el vector de clonamiento.

El empleo de endonucleasas de restricción en el análisis de estos plasmidios permitió corroborar la presencia del inserto, al utilizar sitios únicos de corte en el vector. Esto permitió calcular el tamaño del fragmento insertado y determinar la presencia de sitios de reconocimiento para estas enzimas en el DNA clonado.

El clonamiento del DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* abre nuevas perspectivas para su estudio. En primer lugar, dado que el clonamiento permite su replicación en *E. coli*, posibilita la demetilación de la molécula. Esto hace factible realizar su mapa de restricción y permite lograr disponer de marcadores físicos que facilitaren la ubicación de genes dentro de fragmentos definidos de la molécula. En segundo lugar, soluciona el problema de bajo rendimiento al purificar este DNA a partir de *Euglena*, problema vital para el estudio de este DNA. En tercer lugar, el clonamiento facilitaría la realización de experimentos de hibridización que permitan determinar homología con otros DNAs mitocondriales y establecer relaciones de filogenia mitocondrial.

En la presente Tesis se determinó que este DNA presenta extremos 5'P protuberantes. En el DNA mitocondrial del protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis* se ha descrito

la presencia de terminales invertidos repetidos (Goldbach
y cols., 1977)

ACTIVIDADES DESOXIRRIBONUCLEASICAS PRESENTES EN LA MITOCONDRIA
DE *Euglena gracilis*.

Las desoxirribonucleasas (DNAsas) han sido estudiadas detalladamente en procariontes dado que en estos organismos son componentes esenciales de la replicación, reparación y recombinación del DNA (Oishi y Smith, 1978). En eucariontes estas enzimas se han aislado y caracterizado sólo en algunos organismos, como es el caso de levaduras (Pinón, 1970). Respecto a las DNAsas mitocondriales se conoce poco y se les ha descrito en levaduras (Zeman y Lusena, 1975), *Neurospora crassa* (Linn y Lehman, 1965a; Linn y Lehman, 1965b) y en células de mamíferos (Durphy y cols., 1974). Las DNAsas mitocondriales presentan gran interés debido a la relativa simplicidad del sistema mitocondrial en relación al núcleo.

Los experimentos realizados con extractos mitocondriales totales y con extractos proteicos de la cámara mitocondrial externa, permitieron detectar la existencia de actividad desoxirribonucleásica en la mitocondria de *Euglena gracilis*. La validez de estas observaciones está asociada con la eliminación de cualquier fuente de contaminación extramitocondrial. Una posible fuente de contaminación estaría dada por la presencia de otros organelos celulares en la fracción mitocondrial. Sin embargo, el examen al microscopio electrónico de los sedimentos mitocondriales no

demonstró contaminación importante con otras fracciones subcelulares. Otra posibilidad de contaminación podría presentarse por adsorción de nucleasas extramitocondriales a la superficie de las mitocondrias. Bajo estas condiciones podría demostrarse una actividad desoxirribonucleásica en mitocondrias intactas. Los resultados obtenidos indican que al incubar DNA exógeno con mitocondrias intactas, la degradación que se observa es mínima, lo que sugiere que no existe DNAsa unida a la superficie de la mitocondria. La posibilidad de contaminación de la fracción mitocondrial con nucleasas citoplasmáticas o nucleares no puede ser excluida totalmente. Podría proponerse alternativamente, que las contaminaciones pudieran estar asociadas con vesículas que sedimenten con la fracción mitocondrial, lo cual requeriría que dichas vesículas tuviesen la misma densidad que las mitocondrias en las gradientes de sacarosa utilizadas en la purificación de la fracción mitocondrial.

En relación al elevado número de fracciones proteicas que presentan actividad desoxirribonucleásica en el extracto de proteínas mitocondriales totales, es muy probable que alguna de ellas correspondan a una misma actividad enzimática, que haya continuado eluyendo al aumentar la concentración de sal en el tampón de elución. Por lo tanto, la determinación del número y tipo de estas actividades requeriría de mayores análisis. No obstante, es probable que

existan varias actividades desoxirribonucleásicas diferentes. De hecho, en fracciones mitocondriales de hígado de conejo se han determinado, a lo menos, 5 actividades desoxirribonucleásicas distintas según Durphy y cols. (1974).

Especial atención merece la presencia en la mitocondria de *Euglena gracilis* de actividades enzimáticas cuya acción es semejante a la de las endonucleasas de restricción, si se considera que todos los sistemas de restricción-modificación han sido descritos en procariontes. Sin embargo, Sager (1981) describió un sistema de restricción-modificación en el cloroplasto del alga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii*, el que está relacionado con la herencia materna del DNA cloroplástico. Los eventos de restricción y modificación ocurren en el cloroplasto, al que podría considerársele como un organelo de tipo procariótico; sin embargo, el sistema es regulado por un locus de apareamiento, dependiente del núcleo. De manera que, un sistema de restricción-modificación, previamente descrito sólo en bacterias, está presente en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* y relaciona estrechamente ambos genomas, nuclear y cloroplástico.

Parece probable por tanto, que sistemas de restricción-modificación puedan encontrarse ampliamente distribuidos, no solo en procariontes sino también en eucariontes. Si tales sistemas tuvieron significación en la evolución temprana, y si de ellos se pudiese obtener claves sobre

relaciones evolutivas, es un hecho de gran interés.

La presencia de actividad desoxirribonucleásica en la mitocondria de *Euglena gracilis* junto con la resistencia mostrada por este DNA a las endonucleasas de restricción, son dos hechos que adquieren en la actualidad especial relevancia, ya que se conocen transferencias de material genético desde la mitocondria al núcleo. Así, esto ocurre en *Neurospora crassa* (Van-der Boogaart y cols., 1982), *Saccharomyces cerevisiae* (Farrely y Buetow, 1983), maíz (Kemble y cols., 1983), *Locusta migratoria* (Gellisen y cols., 1983) y erizo de mar (Jacobs y cols., 1983). Por lo tanto, la presencia de desoxirribonucleasas y posibles endonucleasas restrictivas en los compartimentos mitocondriales podría resultar ser, elementos de restricción de la entrada o salida de DNA desde o hacia el organelo.

Además de la actividad desoxirribonucleásica de tipo inespecífico encontrada en la mitocondria de *Euglena gracilis*; se puede detectar, la presencia de una actividad endonucleásica (NMEE) en un extracto proteico de la cámara mitocondrial externa. Actividades enzimáticas de este tipo han sido observadas, en extractos mitocondriales de hígado de conejo por Durphy y cols. (1974). Por otra parte, Fairfield y cols., (1979) describieron una actividad topoisomérica en las mitocondrias de hígado de rata.

Se ha planteado que la organización de las secuencias A + T en el DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* sería

muy similar a la que presentan estas secuencias en *Saccharomyces cerevisiae* (Fonty y cols., 1975). Esto permitiría suponer que en la mitocondria de *Euglena gracilis* existiese una endonucleasa capaz de digerir diferencialmente los segmentos ricos en A + T presentes en la molécula, en homología al rol asignado a la endonucleasa descrita por Morosoli y Lusena (1980) en *Saccharomyces cerevisiae*. Este paralelismo, estaría avalado por la existencia en levaduras de una actividad endonucleásica capaz de cortar una sola de las hebras de un DNA de doble hebra, cuyo sistema homólogo en *Euglena gracilis* estaría representado por la actividad NMEE descrita en esta Tesis. Por ahora no nos es posible relacionar, sin mayores evidencias, el rol de la endonucleasa de *Saccharomyces cerevisiae* con el que pudiera tener la enzima descrita en la mitocondria de *Euglena gracilis*.

CONCLUSIONES

1. El DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* var. *bacillaris* presenta una configuración lineal con extremos 5'P protuberantes.
2. Por medición del largo de contorno de las moléculas de DNA mitocondrial observadas al microscopio electrónico y por su movilidad electroforética en geles de agarosa, se propone para este DNA un peso molecular aproximado de 12×10^6 - 15×10^6 daltons.
3. El DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* se clonó en el plasmidio pUC18 y el fragmento insertado tiene un peso molecular de aproximadamente 6.4×10^6 daltons o 8.0×10^6 daltons.
4. El DNA mitocondrial de *Euglena gracilis* es refractario, por lo menos, a 18 endonucleasas de restricción. La refractariedad se puede relacionar con la existencia en su secuencia nucleotídica de 5-metilcitosina y posiblemente 6-metilaminopurina.

5. Se detectó actividades de desoxirribonucleasas inespecificas en ambas cámaras mitocondriales.

6. En la cámara mitocondrial externa se detectó una fracción con actividad enzimática específica que resultó ser termosensible a 55°C. Esta actividad enzimática se denominó NMEE y fue capaz de relajar un DNA circular covalentemente cerrado.

APENDICE 1

Secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción utilizadas y número de cortes que ellas producen sobre el DNA del bacteriófago λ

ENZIMA	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	Nº DE CORTES SOBRE EL DNA DE λ
AvaII	G \downarrow G ^A _T CC	17
BamHI	G \downarrow GATCC	5
BglI	GCC(N) ₄ \downarrow NGGC	2
BglIII	A \downarrow GATCT	5
DdeI	C \downarrow TNAG	<50
EcoRI	G \downarrow AATTC	5
HaeIII	GG \downarrow CC	<50
HincII	GTPy \downarrow PuAc	34
HindIII	A \downarrow AGCTT	8
HinfI	G \downarrow ANTC	<50
HpaI	GGT \downarrow AAC	11
MspI	C \downarrow CGG	<50
MboI	\downarrow GATC	<50
PstI	CTGA \downarrow G	18
SacII	CCGG \downarrow GG	4
SmaI	CCC \downarrow GGG	3
SalI	G \downarrow TCGAC	2
SstI	GAGCT \downarrow C	2
TthI	T \downarrow CGA	<50
XbaI	T \downarrow CTAGA	1
XhoI	C \downarrow TCGAG	1
XmaI	C \downarrow CCGGG	3

APENDICE 2

Tamaño y peso molecular de los fragmentos obtenidos
al tratar el DNA del bacteriófago λ con HindIII

N° del fragmento	Tamaño molecular (pb x 10^{-3})	Peso molecular (daltons x 10^{-6})
1	23.13	15
2	9.419	6.12
3	6.557	4.26
4	4.371	2.84
5	2.322	1.51
6	2.028	1.32
7	0.564	0.37
8	0.125	0.08

BIBLIOGRAFIA

- Aaij, C. y Borst, P. (1972)
The Gel Electrophoresis of DNA. *Biochem. Biophys. Acta* 269, 192-200.
- Bohnert, H.J. (1977).
Size and Structure of Mitochondrial DNA from *Physarum polycephalum*. *Exp. Cell Res.* 106(2), 426-430.
- Borst, P. (1972)
Mitochondrial Nucleic Acids. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 333 - 376.
- Borst, P. y Fase-Fowler, F. (1979)
The Maxi-Circle of *Trypanosoma brucei* Kinetoplast DNA. *Biochem. Biophys. Acta* 565, 1-12.
- Borst, P. y Grivell, L. (1981)
Small is beautiful-portrait of a Mitochondrial Genome. *Nature* 290, 443 - 444.
- Borst, P. y Hoeijmakers, J.H. (1979)
Kinetoplast DNA. *Plasmid* 2(1), 20-40.
- Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brawerman, G. y Eisenstadt, J.M. (1964)
Deoxyribonucleic acid from the chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 91, 477-485.
- Brown, W.M., George, M. y Wilson, A.C. (1979)
Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1967 - 1971.
- Buetow, D.W. (1968)
The Biology of *Euglena*. Vol. I. General Biology and Ultrastructure.

- Buetow, D.E. y Padilla, G.M. (1963)
Growth of *Astasia longa* on Ethanol. I. Effects of Ethanol on Generation Time, Population Density and Biochemical Profile. *J. Protozool* 10(1), 121-123.
- Clark-Walker, G.D. y Linnane, A.W. (1966)
In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 8-13.
- Cristensen, T. (1962)
En "Botanik". Vol. II, N° 2, pp. 1-178. Masson, Paris.
- Christophe, L., Tarragó-Litvak, L., Castroviejo, M. y Litvak, S. (1981). Mitochondrial DNA Polymerase from Wheat Embryos. *Plant Science Letters* 21, 181-192.
- Clark-Walker, G.D. y Mc Arthur, C.R. (1978)
Structure and Functional Relationships of Mitochondrial DNAs from various yeasts. In "Bacila", B.L. Horecker and A.O.M. Stoppani (eds). *Biochemistry and Genetics of the Yeasts*. Academic Press, Inc., New York, pp. 255-272.
- Clark-Walker, G.D., Mc Arthur, C.R. y Spriprakash, K.S. (1981)
Partial Duplication of the Large Ribosomal RNA Sequence in an inverted repeat in Circular Mitochondrial DNA from *Kloeckera africana*: implications for mechanisms for the petite mutation. *J. Mol. Biol.* 147, 399-415.
- Cohen, S., Chang, A. y Hsa, L. (1972)
Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.
- Comité sobre Taxonomía y Problemas Taxonómicos de la Sociedad de Protozoólogos (1964). A revised classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.* 11, 7-21.
- Cramer, M. y Myers, J. (1952)
Grown and Photosynthetic Characteristics of *Euglena gracilis*. *Arch. Mikrobiol.* 17, 384-402.
- Crouse, E.J., Vandrey, J.P. y Stutz, E. (1974)
Hybridization Studies with RNA and DNA isolated from *Euglena gracilis* chloroplast and mitochondria. *FEBS Letters* 42, 262-266.

- Crouse, E.J., Vandrey, J.P. y Stutz, E. (1974a)
Comparative analysis of chloroplast and mitochondrial DNA
from *Euglena gracilis*. 3rd. Internat. Congress Photosynth.,
ed. Avron M.
- Cummings D.J., Belcour, L. y Grandchamp, C. (1979)
Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of
mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures.
Mol. Gen. Genet. 171(3), 239-250.
- Douglas, C.W. (1982)
Structure and Evolution of Organelle Genomes. Microbiological
Reviews 46(2), 208-240.
- Durphy, M., Manley, P.N. y Friedberg, E.C. (1974)
A demonstration of Several Desoxyribonucleases activities in
mammalian cell Mitochondria. The Journal of Cell Biology 62,
695-706.
- Edelman, M. (1981)
Nucleic Acids of Chloroplast and Mitochondria. En "The
Biochemistry of Plants". Vol. 6. Proteins and Nucleic Acids.
Marcus, A. (ed). Academic Press, pp. 249-301.
- Edelman, M., Schiff, J.A. y Epstein, H.T. (1965)
Studies of Chloroplast development in *Euglena*. II. Two types
of satellite DNA. J. Mol. Biol. 11, 769-774.
- Edelman, M., Epstein, H.J. y Schiff, J.A. (1966)
Isolation and characterization of DNA from the mitochondrial
fraction of *Euglena*. J. Mol. Biol. 17, 463-469.
- Fairfield, F.R., Bauer, W.R. y Simpson, M.V. (1979)
Mitochondria contain a Distinct DNA Topoisomerase. The
Journal of Biological Chemistry 19, 9352-9354.
- Fianndt, M., Honigman, A., Rosenvold, E. y Seybalski, W. (1977)
Precise Measurement of the b2 Deletion in Coliphage Lambda.
Gene 2, 289-293.
- Farrely, F. y Buetow, R.A. (1983)
Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome.
Nature 301, 296-301.
- Fauron, C.M.R. y Wolstenholme, D.R. (1976)
Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within
the genus *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73,
3623-3627.

- Fink, K., Cline, R.E. y Fink, M. (1963)
Paper Chromatography of Several Classes of Compounds:
Correlated Rf Values in a Variety of Solvent Systems.
Science 143, 769 - 779.
- Fonty, G., Crouse, J.E., Stutz, E. y Bernardi, G. (1975)
The Mitochondrial Genome of *Euglena gracilis*. *Eur. J. Biochem.* 54, 367-372.
- Gellisen, G., Bradfield, J.Y., White B.N. y Wyatt, G.R. (1983)
Mitochondrial DNA Sequences in the Nuclear Genome of a Locust. *Nature* 301(5901), 631-633.
- Gillham, N.W. (1978)
Organelle Heredity. Raven Press, New York.
- Gillham, N.W. y Boynton, J.E. (1981)
Evolution of Organelle Genomes and Protein-Synthesizing Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 361, 20-43.
- Goldbach, R.W., Arnberg, A.C., Van Bruggen, E.F.J., Defyze, J. y Borst, P. (1977) The structure of *Tetrahymena pyriformis* DNA-I: Strain differences and occurrence of inverted sequences repetition. *B.B.A.* 477 (1), 37-50.
- Goldbach, R.W., Bollen-de Boer, J.E., Van Bruggen, E.F. y Borst, P. (1979) Replication of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem. Biophys. Acta* 562 (3), 400-417.
- Goddard, J.M. y Cummings, D.J. (1975)
Structure and Replication of Mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. *J. Mol. Biol.* 97, 593-609.
- Gray, P.W. y Hallick, R.B. (1978)
Physical Mapping of the *Euglena gracilis* Chloroplast DNA and Ribosomal RNA Gene Region. *Biochemistry* 17(2), 284-289.
- Grivell, L.A. (1983)
Mitochondrial DNA. *Scientific American* 248(3), 78-89.
- Gruenbaum, Y., Cedar, H. y Razin, A. (1981)
Restriction enzyme digestion of hemimethylated DNA. *Nucleic Acids Research* 9(11), 2509-2515.

- Hamilton, O., Smith, M. y Marley, G. (1982)
Purification and Properties of HindII and HindIII Endonucleases from *Haemophilus influenzae* Rd. Methods of Enzymology 65, 104-108. Nucleic Acids. Part I. Academic Press.
- Hanson, J.B. y Day, D.A. (1980)
Plant Mitochondria. In: The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise (N.E. Tolbert, ed.), Vol. 1, pp. 315-358, Academic Press, New York.
- Heckman, J.E., Hecker, L.I., Schwartzbach, S.D., Barnett, E.W., Baumstark, B. y Raj Bhandary, U.L. (1978). Structure and function of initiator methionine tRNA from the mitochondria of *N. crassa*. Cell 13, 83-95.
- Hattman, S., Kiester, T. y Gotterhrer, A. (1978)
A Sequences specificity of DNA methylases from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus brevis*. J. Mol. Biol. 124, 701-711.
- Jacobs, H.T., Posakony, J.W., Grula, J.W., Roberts, J.W., Xin, J.H., Britten, R.J. y Davidson, E.H. (1983). Mitochondrial DNA Sequences in the Nuclear Genome of *Strongylocentrotus purpuratus*. J. Mol. Biol. 165, 609-632.
- Jacquemin-Sablon, H., Jacquemin-Sablon, A. y Paoletti, C. (1979). Yeast Mitochondrial Deoxyribonuclease Stimulated by Ethidium Bromide. I. Purification and Properties. Biochemistry 18(1), 119-127.
- Johnson, P.H. y Grossman, L.I. (1977)
Electrophoresis of DNA in Agarose Gels. Optimizing Separations of conformational Isomers of double and single-stranded DNAs. Biochemistry 16(19), 4217 - 4224.
- Kemble, R.J., Mans, R.J., Gabay-Saughnan, S. y Gabay-Saughnan, I.R. (1983) Sequences Homologous to Episomal Mitochondrial DNAs in the Maize Nuclear Genome. Nature 304 (5928), 744 - 745.
- Kislev, N. y Eisenstadt, J.M. (1972)
Protein Synthesis in Mitochondria of *Euglena gracilis*. Eur. J. Biochem. 31, 226-229.
- Klenow, H. y Henningsen, I. (1970)
Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from *Escherichia coli* B by limited Proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65, 168-175.

- Krawiec, S. y Eisenstadt, J.M. (1970)
Ribonucleic Acids from the Mitochondria of Bleached *Euglena gracilis* I. Isolation of Mitochondria and Extraction of Nucleic Acids. *Biochem. Biophys. Acta* 217, 120-131.
- Kuntzel, H. y Noll, H. (1967)
Mitochondrial and cytoplasmic polysomes from *N. crassa*. *Nature*, 215, 1340-1345.
- Landgridge, J., Landgridge, P. y Berquist, P.L. (1980)
Extraction of Nucleic Acids from Agarose Gels. *Analytical Biochemistry* 103, 264-271.
- Leaver, C.J. y Gary, M.W. (1982)
Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 373-402.
- Leaver, C.J. y Pope, P.K. (1976)
Biosynthesis of plant mitochondrial protein. In: *Nucleic acids and protein synthesis in plants* (Bogorad, L. y Weil, J.H., eds.), pp. 213-237, Plenum Press, New York.
- Linn, St. y Lehman, I.R. (1965a)
An Endonuclease from *Neurospora crassa* specific for Polynucleotides Lacking and Ordered Structure. I. Purification and Properties of the Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 240 (3), 1287-1293.
- Linn, St. y Lehman, I.R. (1965b)
An Endonuclease from *Neurospora crassa* specific for Polynucleotides Lacking and Ordered Structure. II. Studies of the Enzyme Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 240 (3), 1294-1304.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951)
Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Mol. Chem.* 193, 265-279.
- Malcom, A.D.B. (1981)
The Use of Restriction Enzymes in Genetic Engineering. En "Genetic Engineering". 2. Williamson, R. (ed). Academic Press, pp, 129-173.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 468.

- Manning, J.E. y Richards, O.C. (1972b)
Isolation and molecular weight of circular chloroplast DNA of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 259, 285-296.
- Manning, J.E., Wolstenholme, D.R., Ryan, R.S., Kunter, J.A. y Richards, O.C. (1971) Circular Chloroplast DNA from *Euglena gracilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 68, 1169-1173.
- Mc Clelland, M. (1981)
The effect of Sequence Specific DNA Methylation on Restriction Endonuclease Cleavage. *Nucleic Acids Research* 9(22), 5859-5866.
- Mery-Drugeon, E., Crouse, E.J., Schmitt, J.M., Bohnert, H.J. y Bernardi, G. (1981) The Mitochondrial Genomes of *Ustilago cynodontis* and *Acanthamoeba castellanii*. *Eur. J. Biochem.* 114, 577-583.
- Miller, J.H. (1972)
Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morosoli, M. y Lusena, Ch. V. (1980)
An Endonuclease from Yeast Mitochondrial Fractions. *Eur. J. Biochem.* 110, 431-437.
- Nass, S. (1969)
The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria. *Int. Rev. Cytol*, 25, 55-63.
- Nass, M.K. y Ben-Schaul, Y. (1972)
A novel Closed Circular Duplex DNA in Bleached Mutant and Green Strains of *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta* 272, 130-136.
- Nass, M.K., Ben Schaul, Y. y Edelman, M. (1974)
Size and Configuration of Mitochondrial DNA in *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta* 374, 283-291.
- Nathans, D. y Smith, H.O. (1975)
Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 273-293.
- O'Connor, R.M., Mc Arthur, C.R. y Clark-Walker, G.D. (1975)
Closed-Circular DNA from Mitochondrial-Enriched Fractions of Four Petite Negative Yeast. *Eur. J. Biochem.* 53, 137-144.

- Ojala, D. y Attardi, G. (1977)
A Detailed Physical Map of *Hela* Cell Mitochondrial DNA and its Alignment with the Position of known Genetic Markers. *Plasmid* 1, 78-105.
- Oishi, M. y Smith, C.L. (1978)
Inactivation of Phage Repressor in a Permeable Cell System. Role of *recBC* DNAsa in Induction. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 75(8), 3569-3573.
- Piñón, R. (1970)
Characterization of a Yeast Endonuclease. *Biochemistry* 9 (14), 2839-2845.
- Pirrotta, V. y Bickle, T.A. (1982)
General Purification Schemes for Restriction Endonucleases. *Methods of Enzymology* 65, 89-95. *Nucleic Acids, Part I.* Academic Press.
- Ray, D.S. y Hanawalt, P.C. (1965)
Satellite DNA Components in *Euglena gracilis* Cells Lacking Chloroplast. *J. Mol. Biol.* 11, 760-768.
- Richards, O.C. y Ryan, R.S. (1974)
Synthesis and Turnover of *Euglena gracilis* Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 82, 57-75.
- Riy, P.H. y Smith, H.O. (1973)
DNA Methylase of *Hemophylus influenzae* R.D. *J. Mol. Biol.* 81, 445-459.
- Rubin, R.A. y Modrich, P.J. (1977)
Physical and Catalytic Properties of the Homogeneous Enzyme. *J. Biol. Chem.* 252, 7265-7272.
- Ryan, R., Grant, D., Kwen-Shang, Ch. y Swift, H. (1978)
Isolation and Characterization of Mitochondrial DNA from *Chlamydomona reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 75(7), 3268-3272.
- Sager, R. (1981)
The Application of DNA Methylation Studies to the Analysis of Chloroplast. En "Origins and Evolution of Eukariotic Intracellular Organelles". *Annals of the New York Academy of Sciences* 361, 209-218.

- Schatz, G. y Mason, T.L. (1974)
The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 51-87.
- Schatz, G. y Saltzagaber, J. (1969)
Protein synthesis in yeast promitochondria *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 996-1001.
- Schiff, J.A. (1973)
The development, inheritance, and origin of the plastid in *Euglena*. *Adv. Morphogenesis.* 10, 265-312.
- Schiff, J.A. y Epstein, H.T. (1965)
The Continuity of the Chloroplast in *Euglena*. En "Reproduction: Molecular, Subcellular and Cellular". Locke, M. (ed). Academic Press, New York, pp. 131-189.
- Schori, L., Ben-Schaul, Y. y Edelman, M. (1970).
The Size of Mitochondrial DNA in *Euglena gracilis*. *Israel J. Chem.* 8, 117-123.
- Sebald, W., Schwab, A.J. y Bucher, Th. (1969)
Cycloheximide resistant amino acid incorporation into mitochondria *in vivo*. *FEBS Lett.* 4, 243-246.
- Sogo, J.M., Inciarte, M.R., Corral, J., Viñuela, E. y Salas, M. (1979) RNA Polymerase Binding Sites and Transcription Map of the DNA of *Bacillus subtilis* Phage $\phi 29$. *J. Mol. Biol.* 127, 411-436.
- Stanier, R. y Doudoroff, M. (1970)
En "El Mundo de los Microbios". Aguilar S.A., Madrid.
- Stempak, J.G. y Ward, R.T. (1964)
An Improved Staining Method for Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 22, 697 - 701.
- Talen, J.L., Sanders, J.P.M. y Flavell, R.A. (1974) Genetic Complexity of Mitochondrial DNA from *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys. Acta* 374, 129-135.
- Tu, A.T. y Reinoso, J.A. (1966)
The interaction of silver, ion with guanosine guanosine for monophosphate and related compounds determination of possible sites of complexing. *Biochemistry* 5, 3375-3380.

- Tzagoloff, A. (1982)
Mitochondria. pp. 15-38; 131-156; 235-319. Plenum Press,
New York.
- Uzzo, A. y Lyman, H. (1972)
The Nature of the Chloroplast Genome of *Euglena gracilis*.
2nd International Congress Photosynth. Res. Stresa, Italy,
pp. 2585-2599.
- Van Bruggen, E.F.J., Borst, P., Ruttenberg, G.J.C.M., Gruber,
M. y Kroom, A.M. (1966) Circular Mitochondrial DNA.
Biochem. Biophys. Acta 119, 437-439.
- Van-Den Boogart, P., Samallo, J. y Agsteribbe, E. (1983)
Similar Genes for a Mitochondrial ATPase subunit in the
Nuclear and Mitochondrial Genomes of *Neurospora crassa*.
Nature 298, 187-189.
- Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Van Leen, R.W., Van Arkel, G.A.,
Duyvesteyn, M. y De Waard, A. (1983) Sequence-Specific
nucleases from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*,
restriction enzymes. FEMS Microbiology Letters 16, 7-12.
- Watson, J.D. (1974)
Biología Molecular del Gen. Ed. Fondo Educativo Interameri-
cano, S.A.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T., Fereed, G. y
Richardson, C. (1968) Enzymatic Breakage and Joining of
Deoxyribonucleic Acid. VI Further Purification and
Properties of Polynucleotide Ligase from *Escherichia coli*
Infected with Bacteriophage T₄. J. Biol. Chem. 243, 4543-
4545.
- Wyatt, G.R. (1951a)
The Purine and Pyrimidine Composition of Deoxypentose Nucleic
Acids. Biochemical Journal 48, 584-590.
- Wyatt, G.R. (1951b)
Recognition and Estimation of 5-Methylcytosine in Nucleic
Acids. Biochemical Journal 48, 581-583.
- Youssoufian, H. y Mulder, C. (1981)
Detection of Methylated Sequences in Eukariotic DNA with
the Restriction Endonucleases SmaI and XmaI. J. Mol. Biol.
150, 133-136.
- Zeman, L.J. y Lusena, Ch. V. (1975)
Preferential Digestion of (A + T)-Rich Stretches of the Yeast
Mitochondrial DNA in Isolated Mitochondria. Eur. J. Biochem.
57, 561 - 567.