

CARACTERIZACION GENETICA Y BIOQUIMICA DE LA  
D-ARABINOSA DESHIDROGENASA DE Neurospora crassa

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

Alicia del Carmen Carrasco Aldoney

Mayo 1979

Director de Tesis: Dr. Guido Pincheira V.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

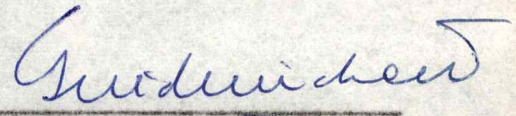
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

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

ALICIA CARRASCO ALDONEY

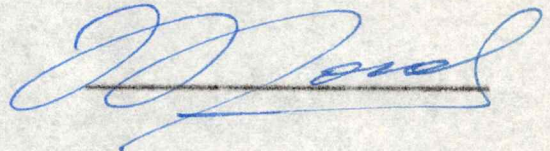
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Mayo de 1979.

Dr. Guido Pincheira  
Patrocinante de Tesis



---

Dr. Guido Mora  
Comité Informante de Tesis



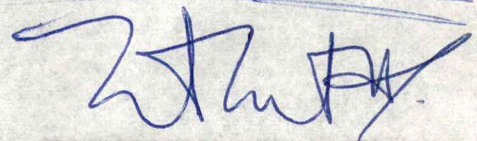
---

Dra. Liliana Cardemil  
Comité Informante de Tesis



---

Dr. Tito Ureta  
Comité Informante de Tesis



---

Dr. Danko Brncic  
Comité Informante de Tesis



---

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
Sede Santiago-Oriente

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 el can-  
didado

Alicia del Carmen Carrasco Aldoney

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

Director de Tesis .....

Comisión Informante de Tesis .....

.....

.....

.....

*A mi madre*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas, cuya contribución ha sido de gran valor durante el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Guido Pincheira V., por el patrocinio de esta tesis y por su apoyo en la realización de la misma.

Al Dr. Tito Ureta A., por su valioso apoyo crítico y por su constante estímulo.

Al Dr. Hermann Niemeyer F., por las facilidades otorgadas para la utilización de los instrumentos de su laboratorio.

Al Dr. Alfredo De Ioannes, por las facilidades para realizar algunos de los experimentos inmunológicos en su laboratorio.

A la señora Nora Loyarte R., por realizar los experimentos de fraccionamiento subcelular; y a todas aquellas personas que de un modo u otro, han permitido el desarrollo de este trabajo.

Esta investigación fue financiada en parte, por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y Cooperación Internacional de la Universidad de Chile, a través de los Proyectos N°3076 (1976), 4320-R (1977) y B 260-783 (1978). Contó además, con el apoyo del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, del cual el autor de esta tesis es académico.

## RESUMEN

En este trabajo se presentan resultados de los estudios genéticos y bioquímicos realizados para caracterizar diferencias de niveles de D-arabinosa-NAD-deshidrogenasa (EC 1.1.1.117) en las cepas 74-A, col-15a y col-16a de Neurospora crassa.

La enzima de las tres cepas fue purificada 280 veces y se obtuvo una preparación homogénea según criterios electroforéticos. La actividad específica de las preparaciones puras de la enzima de diferente origen fluctuó entre 1,11 a 1,17 U/mg. La caracterización de la enzima se realizó por medición de algunos parámetros cinéticos y físicoquímicos. Los parámetros estudiados son similares en las tres cepas. El punto isoeléctrico de  $6,23 \pm 0,017$ , indica que se trata de una proteína ácida y el comportamiento electroforético frente a agentes desnaturantes (SDS y urea) indica que la enzima nativa es un monómero de peso molecular  $52000 \pm 2000$ .

Los estudios inmunológicos realizados con preparaciones enzimáticas provenientes de las tres cepas demostraron identidad antigénica, sugiriendo que probablemente se trata de la misma enzima.

La cuantificación de la enzima en los respectivos extractos crudos, realizada mediante inmunodifusión radial simple, mostró que las cepas coloniales col-15a y col-16a tienen el doble de enzima que la cepa silvestre 74-A. Por lo tanto, la mayor actividad enzimática evidenciada en la electroforesis en gel de poliacrilamida corresponde a un mayor contenido de proteína-enzima en estas mutantes morfológicas.

La caracterización genética realizada mediante el análisis de productos meióticos, heterocariosis y reversiones de mutantes indicó que la diferencia de actividad Ara-DH detectada entre 74-A, col-15a y col 16-a está determinada probablemente por un solo gen. El control genético, es estructural o regulatorio, de la enzima es diferente al de los genes que determinan las alteraciones morfológicas exhibidas por col-15 ó col-16.

## ABSTRACT

This investigation presents results of the genetic and biochemical studies performed to characterize differences of levels of D-arabinose-dehydrogenase (EC 1.1.1.117) in the strains 74-A, col-15a and col-16a of Neurospora crassa.

The enzymes from the three strains were purified 280 fold and were shown to be homogenous by electrophoretic criteria. The specific activity of the pure preparations was between 1.11 to 1.17 U/mg. The enzymes were characterized by measurement of several kinetic and physicochemical parameters. These parameters were similar in the three strains. The isoelectric point of  $6.23 \pm 0.017$  shows that D-arabinose dehydrogenase is an acidic protein and the electrophoretic behaviour in the presence of denaturing agents (SDS and urea) shows that the native enzyme is a monomer of  $52000 \pm 2000$  molecular weight.

Immunological studies performed with enzyme preparations from the three strains showed antigenic identity, suggesting that the enzyme is probably the same in all cases.

Quantitation of the enzyme in crude extracts, performed by single radial immunodiffusion showed that the colonial strains col-15a and col-16a have twice the level of enzyme when compared to the wild strain 74-A. For that reason, the higher enzymatic activity detected in polyacrylamide gels corresponds to a higher content of enzyme-protein in these morphological mutants.

Genetic characterization performed by analysis of meiotic products, heterokaryosis and reversions, indicated that the difference in Ara-DH activity detected among 74-A, col-15a and col-16a is probably determined by one gene. The



genetic control, structural or regulatory, of this enzyme activity is different to that determining the morphological alterations exhibited by col-15 or col-16.

## INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS .....	
LISTA DE FIGURAS .....	
LISTA DE ABREVIATURAS .....	
INTRODUCCION .....	1
PROPOSITO DE LA TESIS .....	4
MATERIALES Y METODOS	
I MATERIALES	
A Reactivos .....	5
B Proteínas .....	6
C Materiales cromatográficos .....	6
II METODOS	
A Cepas y métodos de cultivo .....	6
B Preparación de extractos crudos .....	7
C Determinación de proteínas .....	8
D Electroforesis en geles de poliacrilamida ..	8
E Tinción de actividad enzimática en geles de poliacrilamida .....	10
F Medición de la actividad Ara-DH .....	10
G Fraccionamiento subcelular .....	11
H Purificación de la enzima:	
1 Cromatografía en DEAE-celulosa .....	12
2 Filtración en Sephadex G-100 .....	13
3 Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida .....	13
I Efecto de la concentración de sustratos sobre la valocidad de reacción .....	14
J Especificidad de sustrato .....	14
K Determinación de pH óptimo .....	15

	Página
L Inactivación del punto isoeléctrico .....	16
M Determinación del punto isoeléctrico.....	16
N Electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio .....	17
O Electroforesis en presencia de urea .....	19
P Obtención de suero inmuno antides - hidrogenasa de D-arabinosa-NAD <sup>+</sup> .....	19
Q Inmunodifusión doble .....	20
R Determinación del punto de equivalencia .....	21
S Inmunodifusión radial simple .....	21
T Caracterización genética:	
1 Cruzamientos .....	22
2 Revertantes .....	23
3 Heterocariones .....	24

## RESULTADOS

I Detección preliminar de la actividad Ara-DH en cepa silvestre y mutantes morfológicas de <u>N. crassa</u> .....	25
II Caracterización bioquímica de la enzima aislada de la cepa silvestre y de las mutantes <u>col-15a</u> y <u>col-16a</u>	
A Purificación de la enzima hasta homogeneidad .....	32
B Constantes de Michaelis para sustrato y cofactor .....	41
C Especificidad de sustrato .....	41
D Estudios de pH óptimo .....	45
E Inactivación por calor .....	45
F Determinación del punto isoeléctrico .....	45
G Peso molecular y estructura de subunidades .....	51
H Electroforesis en presencia de urea .....	56

	Página
III Análisis inmunoquímico .....	56
IV Caracterización genética	
A Análisis de segregación .....	62
B Reversiones .....	68
C Heterocariosis .....	68
 DISCUSION	
I Características bioquímicas de la Ara-DH de las cepas <u>74-A, col-15a y col-16a</u> de <u>Neurospora crassa</u> .....	77
II Cuantificación y caracterís- ticas inmunológicas .....	80
III Caracterización genética .....	82
IV Probable rol morfogenético de la Ara-DH .....	83
V Proyecciones futuras .....	85
 BIBLIOGRAFIA .....	 87

## LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1-1	Purificación de Ara-DH de la cepa silvestre <u>74-A</u> .....	33
Tabla 1-2	Purificación de Ara-DH de la cepa <u>col-15a</u> .....	34
Tabla 1-3	Purificación de Ara-DH de la cepa <u>col-16a</u> .....	35
Tabla 2	Especificidad de sustrato de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> .....	44
Tabla 3	Resumen de las características cinéticas, físicoquímicas y estructurales de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> .....	55
Tabla 4	Concentración de enzima en extractos crudos de las cepas <u>74-A</u> , <u>col-15a</u> y <u>col-16a</u> de <u>Neurospora crassa</u> .....	61
Tabla 5	Recombinantes entre fenotipo enzimático y morfológico de cruzamientos <u>cepa silvestre x cepa colonial</u> .....	67

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Actividad Ara-DH en extracto crudo de <u>Neurospora crassa</u> , cepa <u>74-A</u> procesado por electroforesis en gel de poliacrilamida .....	26
Figura 2	Actividad Ara-DH en extractos crudos de varias cepas de <u>Neurospora crassa</u> cultivadas durante 48 horas, procesados por electroforesis en gel de poliacrilamida en placa .....	27
Figura 3	Morfología de cepas de <u>Neurospora</u> cultivadas a 25°C durante 48 horas, en medio mínimo N-Vogel adicionado de sacarosa al 1,2% e inositol (5 mg/ml, <u>col-15a</u> ) .....	28
Figura 4-A	Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) proveniente de la cepa <u>74-A</u> de <u>Neurospora</u> , fraccionadas en columna de DEAE-celulosa (2,5 x 25) .....	29
Figura 4-B	Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) proveniente de la cepa <u>col-15a</u> de <u>Neurospora</u> .....	30
Figura 4-C	Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) de la cepa <u>col-16a</u> de <u>Neurospora</u> .....	31
Figura 5-A	Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa .....	36
Figura 5-B	Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa .....	37
Figura 5-C	Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa .....	38

Figura 6	Separación electroforética de Ara-DH de <u>Neurospora</u> .....	39
Figura 7	Electroforesis en gel de poli acrilamida de Ara-DH obtenida de los geles tipo preparativo .....	40
Figura 8-1	Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción de la Ara-DH de <u>Neurospora crassa</u> .....	42
Figura 8-2	Efecto de la concentración de NAD <sup>+</sup> en la velocidad de reac- ción de la Ara-DH de <u>Neurospo</u> <u>ra crassa</u> . .....	43
Figura 9	Efecto del pH sobre la velo- cidad de reacción de la Ara-DH de <u>Neurospora crassa</u> . .....	46
Figura 10	Inactivación por calor de Ara-DH parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) de <u>Neurospora</u> <u>crassa</u> .....	47
Figura 11-A	Electroenfoque de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> en geles de poliacri- lamida .....	48
Figura 11-B	Electroenfoque de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> en geles de poliacri- lamida .....	49
Figura 11-C	Electroenfoque de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> en geles de poliacri- lamida .....	50

Figura 12	Electroforesis de la Ara-DH de <u>Neurospora crassa</u> en geles de poliacrilamida en presencia de SDS .....	52
Figura 13	Determinación del peso molecular de la Ara-DH de <u>Neurospora</u> mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .....	53
Figura 14	Electroforesis de la Ara-DH de <u>N. crassa</u> en presencia de urea .....	54
Figura 15	Reacción de precipitación entre suero antideshidrogenasa de D-arabinosa de <u>N. crassa</u> (cepa <u>74-A</u> ) y Ara-DH de cepas <u>74-A</u> , <u>col-15a</u> y <u>col-16a</u> de <u>Neurospora</u> .....	57
Figura 16	Inhibición de la actividad Ara-DH de <u>N. crassa</u> por suero antideshidrogenasa de D-arabinosa de <u>N. crassa</u> ( <u>74-A</u> ) .....	58
Figura 17	Inhibición de la actividad Ara-DH de <u>N. crassa</u> por suero antideshidrogenasa de D-arabinosa de cepa <u>74-A</u> de <u>N. crassa</u> .....	59
Figura 18	Curva de calibración para determinar la concentración de Ara-DH por el método de inmunodifusión radial simple .....	60
Figura 19-1	Actividad Ara-DH en la progenie del cruzamiento <u>74-A x col-16a</u> .....	63



Figura 19-2	Morfología de la progenie del cruzamiento <u>74-A x col-16a</u> .....	64
Figura 20-1	Actividad Ara-DH en la proge nie del cruzamiento <u>74-A x col-15a</u> .....	65
Figura 20-2	Morfología de la progenie del cruzamiento <u>74-A x col-15a</u> .....	66
Figura 21-1	Actividad Ara-DH en la proge nie del cruzamiento <u>74-A x col-16a</u> .....	69
Figura 21-2	Morfología de la progenie del cruzamiento <u>74-A x col-16a</u> .....	70
Figura 22-1	Actividad Ara-DH en la proge nie del cruzamiento <u>7415-125-1A x col-16a</u> .....	71
Figura 22-2	Morfología de la progenie del cruzamiento <u>7415-125-1A x col-16a</u> .....	72
Figura 23-1	Actividad Ara-DH en micelios revertantes .....	73
Figura 23-2	Morfología de la cepa <u>col-16a</u> y de uno de los micelios re - vertantes .....	74
Figura 24-1	Actividad Ara-DH en heteroca- riones <u>col-15a + col-16a</u> .....	75

Figura 24-2	Morfología de las cepas <u>col-15a</u> , <u>col-16a</u> y de uno de los heterocariones <u>col-15a + col-16a</u> .....	76
Figura 25	Actividad Ara-DH en fracciones subcelulares de <u>N. crassa</u> .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

BICINE	(N,N bis (2 hidroxietil) glicina)
HEPES	(N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico)
MES	(2 (N-morfolino) ácido etanosulfónico)
PIPES	Piperazina-N-N'-bis (2-ácido etanosulfónico)
SDS	dodecil sulfato de sodio
DEAE-celulosa	dietil-amino etil celulosa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
DTT	ditiotreitól
NBT	p-nitroazul de tetrazolio
FM	fenazina metosulfato
Ara-DH	D-arabinosa-NAD-deshidrogenasa de <u>Neurospora crassa</u>
G-6P-DH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

## INTRODUCCION

Entre los organismos eucarióticos, Neurospora crassa, hongo de la clase Ascomicetes, ofrece características favorables para investigar aspectos morfogenéticos. Así por ejemplo:

a) sus características citológicas, la organización de su material genético y muchos de sus procesos bioquímicos han sido descritos en la literatura (1-3). Durante su ciclo de vida desarrolla aspectos de diferenciación que producen estructuras citológicas bien definidas y sobre cuya composición química se tiene alguna descripción (4);

b) es un organismo haploide con reproducción vegetativa, lo cual facilita la mantención de stocks de características genéticas determinadas. También posee reproducción sexual lo que permite el análisis genético de diferentes mutantes mediante la caracterización de los productos meióticos y la obtención de heterocariones (5-11);

c) puede ser cultivado en condiciones ambientales controladas, lo que posibilita la producción de fenocopias de variantes genéticas mediante la manipulación de factores nutricionales (12-15). Esto permite además, estudiar la participación del medio ambiente en los procesos de regulación génica.

Debido a las características mencionadas, Neurospora ha sido utilizada con éxito por diferentes investigadores (16, 22-33) para realizar estudios de tipo genético-bioquímico orientados a conocer las bases bioquímicas de los

procesos relacionados con su morfogénesis.

Uno de los factores morfogenéticos importantes en la diferenciación de Neurospora es su pared celular, la cual está constituida por un alto porcentaje de hidratos de carbono (16-21). Estudios comparativos de la composición química de la pared celular de mutantes morfológicos y las cepas silvestres que los han originado han puesto en evidencia la relación de dicha estructura con las características morfológicas del hongo. Esto aparece corroborado por los trabajos de Brody y Tatum (22-24), de Scott (25-31), de Lechner et al (32, 33) que han demostrado que algunas alteraciones enzimáticas se relacionan con cambios de la morfología del hongo. En la revisión realizada por Mishra (34), se mencionan diferentes enzimas involucradas en cambios morfológicos en Neurospora crassa. Algunas de estas enzimas están directa (fosfoglucomutasa, EC 2.7.5.1) o in directamente (glucosa 6-P deshidrogenasa, EC 1.1.1.49 ; 6-P-gluconato deshidrogenasa, EC 1.1.1.47) implicadas en las reacciones de biosíntesis de los componentes del complejo pared-membrana celular.

Las alteraciones que presentan estas enzimas son de tipo cinético, de termoestabilidad, de comportamientos electroforético y de electroenfoque, características que reflejan cambios estructurales de la proteína.

Considerando conveniente la detección de nuevas alteraciones bioquímicas, especialmente de tipo regulatorio, que pudieran tener importancia morfogenética en Neurospora, se realizó un estudio preliminar de diferentes deshidrogenasas de azúcares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en doce mutantes morfológicas. Las claras diferencias de tipo cuantitativo que fueron detectadas en la actividad de la D-arabinosa-NAD-deshidrogenasa (EC 1.1.1.117) en algunas de las mutantes morfológicas estudiadas,

sugirieron la conveniencia de conocer los mecanismos de control genético de esta enzima y su probable rol morfogenético en Neurospora.

La información existente en la literatura sobre esta enzima es escasa. Se conocen los estudios de Palleroni y Doudoroff (35), y de Cline et al (36-38), que comunicaron su aislamiento en el género Pseudomonas; de Metzger et al (39-41); de Ureta y Radojković (42); de Schachter (43) y de Maijub et al (44) en hígado de mamíferos. En Neurospora crassa, Pincheira, León y Ureta (45) informaron de la purificación parcial y caracterización de la Ara-DH en la cepa 74-A.

En general, los estudios mencionados informan del aislamiento y purificación de la enzima y la determinación de parámetros cinéticos o propiedades físicas de la proteína. Para el caso de Neurospora, no existe información sobre las características cinéticas y estructurales de la Ara-DH ni de sus centros de control genético.

## PROPOSITO DE LA TESIS

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido explicar los factores determinantes de las diferencias de una enzima (Ara-DH) en dos cepas mutantes morfológicas de Neurospora crassa en comparación con los niveles de una cepa standard del mismo organismo y su probable relación con mecanismos morfogenéticos.

Para ello el plan de trabajo ha sido enfocado primeramente a tener una clara definición fenotípica de las diferencias de actividad Ara-DH mediante la purificación y caracterización y cuantificación de la enzima proveniente de las diferentes cepas. Clarificado el fenotipo enzimático, la experimentación ha sido orientada a detectar los centros de control genético, mediante técnicas de análisis genético y la posible dependencia e interrelación con las alteraciones morfológicas a las que aparece asociado.

En la búsqueda de respuestas definitivas al problema planteado, fue necesario utilizar una variada gama de técnicas de genética-bioquímica, algunas de las cuales fueron afinadas en alto grado para salvar el inconveniente del bajo contenido de la enzima en las cepas estudiadas.

## MATERIALES Y METODOS

### I. MATERIALES

#### A. Reactivos

D-arabinosa, L-arabinosa, L-fucosa, D-fucosa, D(+)glucosa, 2-desoxi-D (+) glucosa, L-ramnosa, D-ribosa, L-sorbosa, 2-desoxi-ribosa, sacarosa, L-xilosa, D-xilosa, 6-fosfogluconato, Biotina, riboflavina, BICINE, HEPES, MES, PIPES, TRIS (Trizma base), fenazina metosulfato, nitroazul de tetrazolio, DTT, SDS, glicina, fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, USA).

Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amonio (todos grado electroforesis), agarosa, provinieron de Calbiochem (San Diego, Calif. USA).

Azul de bromofenol, Azul de Coomassie R-250, Amido Black 10B, ácido acético glacial, metanol, isopropanol, arena de mar, ácido ortofosfórico, hidróxido de sodio, citrato de sodio, fosfato monopotásico anhidro, fosfato dipotásico, nitrato de amonio anhidro, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, ácido bórico, sulfato cúprico, yoduro de potasio, molibdato de amonio, cloruro férrico, sulfato de zinc, urea, inositol, reactivo de Folin, extracto de levadura, extracto de malta, provenían de Merck.

Ampholine R (anfólito), provenía de LKB Produkter AB (Stockholm, Sweden).

Todos los otros reactivos químicos usados fueron del mejor grado analítico.



## B. Proteínas

Aldolasa, catalasa, deshidrogenasa láctica, glucosa-6-P-deshidrogenasa, ovoalbúmina, seroalbúmina de bovino, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

## C. Materiales cromatográficos

DEAE-celulosa provenía de Sigma Chemical Company. Sephadex G-100 y Sephadex G-200 provenían de Pharmacia Fine Chemicals Inc. (Uppsala, Sweden).

## II. METODOS

### A. Cepas y Métodos de Cultivo

Las cepas de Neurospora crassa estudiadas fueron: cepa silvestre 74-A (St. Lawrence) y las mutantes morfológicas col-10A (FGSC N° 2286), col-15a (FGSC N°1391) y col-16a (FGSC N°1349), todas provenientes del Fungal Genetics Stock Center (Humbolt State University Foundation, Arcata, USA) (46-51).

Además, se utilizaron las siguientes cepas obtenidas durante la experimentación: 7416-97A de fenotipo colonial, obtenida del cruzamiento 74-A x col-16a; 7415-125-1A y 7415-135-43A de fenotipo colonial, obtenidas del cruzamiento 74A x col-15a.

Las cepas fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de medio mínimo N-Vogel (52) con 1,2% de sacarosa y 0,05 mg/ml de inositol cuando era requerido. La incubación se hizo a 25°C, durante 48 a 72 horas, con aireación proporcionada por agitador rotatorio Eberbach a una velocidad constante de 140 rpm. Como inóculo se usó conidios o fragmentos de micelio.

Alternativamente, el micelio fue cultivado en frascos de 15 litros (con 6 a 8 litros de medio), durante 48 a 72 horas a 25°C, con aireación proveniente de una bomba de aire.

El micelio cultivado en medio líquido se cosechaba por filtración al vacío y se lavaba con varios volúmenes de agua destilada para eliminar las sales y el azúcar del medio N-Vogel. Se eliminaba el exceso de agua del micelio con papel adsorbente.

#### B. Preparación de Extractos Crudos

El micelio húmedo, congelado durante unos 30 minutos, fue molido en mortero previamente enfriado y ayudado de arena estéril hasta obtener una pasta fina. Se adicionó buffer Tris-Cl, 50 mM pH 7,2 en una relación de 2:1 con respecto al peso húmedo. Se agitó durante una hora en agitador magnético a 4°C y se sometió a dos centrifugaciones: una a 4000 rpm, durante 10 minutos en centrífuga Sorvall RC-2 refrigerada y, otra a 40000 rpm, por 60 minutos en ultracentrífuga Hitachi refrigerada.

El precipitado fue descartado y se utilizó el sobrenadante para la detección de actividad enzimática en geles de poliacrilamida o para purificación posterior.

### C. Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos:

- a. En extractos crudos, se utilizó el método de Lowry et al (53) y el método modificado de Müller según Schachterle y Pollack (54). Se usó sero-albúmina de bovino como standard.
- b. En las fracciones obtenidas de cromatografías, los niveles relativos de proteínas se detectaban por absorbancia a 280 nm.
- c. En las fracciones seleccionadas después de cada cromatografía, la concentración de proteínas se determinaba por el método de Warburg y Christian (55), en que se mide la absorbancia a 260 y 280 nm.

### D. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

La electroforesis analítica en geles de poliacrilamida, se realizó de acuerdo a la técnica de Davis (56, 57), utilizando geles de 7 y 10% en acrilamida con una relación de concentración entre acrilamida y N-N'-metilen bisacrilamida de 40:1.

La electroforesis se realizó en tubos verticales de 80 x 6 mm, utilizando una solución de buffer Tris-glicina 0,04 M, pH 8,3 en ambos electrodos, con una intensidad de 4 mA/gel, hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol 0,01% p/v) migraba un 90% del largo total del gel.

La preparación de los geles se hacía a partir de una mezcla de soluciones para el gel separador y otra para el gel concentrador.

Para el gel separador se utilizaban las siguientes soluciones acuosas:

Solución A : Tris 36,6%, TEMED 0,23%, HCl 1,5% pH 8,9

Solución C : Acrilamida 28%, bisacrilamida 0,7% (p/v)

Solución G : Persulfato de amonio 0,14% (p/v)

Las soluciones A, C y G se mezclaron con agua destilada en una relación 1:2:4:1 para los geles de acrilamida al 7% y la polimerización se hizo en presencia de luz fluorescente blanca en los tubos de electroforesis, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

El gel concentrador se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

Solución B : Tris 5,98%, HCl 1,5%, TEMED 0,46% pH 6,7

Solución D : Acrilamida 10%, bisacrilamida 2,5% (p/v)

Solución E : Riboflavina 0,004% (p/v)

Solución F : Sacarosa 40% (p/v)

Las soluciones B, D, E y F se mezclaron en una relación 1:2:1:4. Se colocó 0,2 ml de la mezcla sobre el gel separador en cada tubo de electroforesis y se polimerizó a temperatura ambiente.

Las soluciones se mantuvieron en frascos oscuros separados, protegidos de la luz, a 4°C, desaereándose antes de la preparación de los geles.

Las soluciones de proteína para la electroforesis se dializaron durante una hora contra 250 ml de la solución de los electrodos y se colocaron sobre los geles en presencia de azul de bromofenol 0,01% p/v. Ocasionalmente, se mezcló la proteína con el gel concentrador en una relación de 1:2 y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Realizada la electroforesis, los geles eran retirados de los tubos por extrusión con agua proveniente de una jeringa, fijándose y tiñendo en una solución de Amido Black

0,25% (p/v) en ácido acético 7% (v/v) durante 60 minutos.

Los geles se destiñeron en ácido acético al 7% (v/v), por cambios frecuentes de la solución. Algunas veces se utilizó la tinción con Azul Brillante de Coomassie al 0,025% (p/v), disuelto en una solución acuosa de isopropanol al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), durante 12 horas. Los geles se desteñían en el mismo solvente.

#### E. Tinción de Actividad Enzimática en Geles de Poliacrilamida

La tinción de actividad Ara-DH se hizo por inmersión del gel durante 10 minutos, a 37°C, en una mezcla que contenía en un volumen de 2,5 ml: buffer Bicine 50 mM, pH 9,0; D-arabinosa 100 mM; NAD<sup>+</sup> 0,5 mM, fenazina metosulfato 0,04 mg/ml y nitroazul de tetrazolio 0,4 mg/ml.

Como blanco se utilizó un gel con la misma mezcla de reacción en la que se omitía D-arabinosa.

#### F. Medición de la Actividad Ara-DH

La actividad enzimática de Ara-DH se midió por la velocidad de reducción de NAD<sup>+</sup>, registrando el cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2400 provisto de un termostato para mantener la temperatura a 30°C. Del aumento de absorbancia se calcularon los umoles de NADH formados por umol de D-arabinosa oxidada.

El medio de reacción contenía los siguientes componentes (concentración final) en un volumen de 0,5 ml: Bicine 50 mM, pH 9,0; D-arabinosa 100 mM; NAD<sup>+</sup> 0,5 mM y de enzima 50 ul.

Se utilizó como blanco un sistema que contenía la misma composición de la mezcla de ensayo, sin D-arabinosa.

Se define la unidad de enzima como la cantidad capaz de catalizar la formación de un umol de NADH por minuto a 30°C. Se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADH (y NADPH) que es de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  a 340 nm para cubetas de 1 cm (58).

#### G. Fraccionamiento Subcelular

El fraccionamiento subcelular de micelios de Neurospora crassa se realizó según el método de Fleischer et al (59). El homogeneizado (H) 20% (p/v) con solución de sacarosa 0,25 M en buffer Tris 10 mM, pH 7,4 se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos en centrífuga Sorvall refrigerada y se separaron las fracciones  $P_1$  y  $S_1$ . La fracción  $S_1$  fue centrifugada a 14000 rpm durante 10 minutos en centrífuga Sorvall refrigerada y se obtuvieron las fracciones  $P_2$  y  $S_2$ . Esta última fracción fue sometida a una centrifugación a 39000 rpm en centrífuga Hitachi refrigerada durante 60 minutos y se obtuvieron las fracciones  $P_3$  y  $S_3$ . La fracción  $P_2$  fue resuspendida en la solución de sacarosa y se centrifugó a 16000 y 12000 rpm durante 10 minutos. El  $S_2'$  obtenido fue descartado.

Se separaron alícuotas de cada una de las fracciones para realizar la determinación de proteínas totales por el método de Lowry et al (53); de fósforo orgánico según el método de Chen et al (60) y para la detección de la actividad Ara-DH mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La pureza de las fracciones fue estimada por el cociente ugP/mg proteínas.

## H. Purificación de la Enzima

Para la purificación de la enzima se adoptó el siguiente procedimiento:

1. Cromatografía en DEAE-celulosa microgranular equilibrada en buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT, pH 7,0 y elución mediante gradiente lineal de KCl 0,0 - 0,5 M en buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT, pH 7,0.
2. Filtración en Sephadex G-100 y elución con buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT, 100 mM KCl, pH 7,0.
3. Electroforesis tipo preparativo en geles de poliacrilamida.

### 1. Cromatografía en DEAE-celulosa

En columna de DEAE-celulosa (2 x 25 cm) equilibrada a pH 7,0 en buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT se adsorbían  $150 \pm 30$  ml de extracto crudo proveniente del homogeneizado de  $50 \pm 10$  g de micelio húmedo en buffer Tris-HCl 50 mM, 1 mM DTT, pH 7,2 con una concentración de proteínas de  $1300 \pm 400$  mg. En seguida, se lavaba con 300 - 400 ml del mismo buffer para eliminar las proteínas no retenidas y se conectaba el gradiente lineal de KCl 0 - 0,5 M en el mismo tampón de equilibrio. El volumen del gradiente era de 350 ml por lado. Se colectaron alícuotas de 4,5 ml en microfraccionador Gilson con un flujo de 12 ml/hora.

La absorbancia a 280 nm fue leída en espectrofotómetro Gilford, la actividad Ara-DH se determinó por el método descrito anteriormente y la conductividad fue leída en conductímetro Radiometer tipo CDM 2f. El conjunto de fracciones

con actividad Ara-DH fue concentrado por diálisis en contra de sacarosa sólida.

## 2. Filtración en Sephadex G-100

Alrededor de 4 ml de la fracción con actividad Ara-DH proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa fueron colocadas en columna de Sephadex G-100 de 2 x 60 cm, previamente equilibrada en buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT, 100 mM KCl, pH 7,0. Se lavó con varios volúmenes del mismo buffer y se eluía con la misma solución tampón. Se colectaron alícuotas de 2,25 ml en microfraccionador Gilson con un flujo de 8 ml/hora.

La determinación de proteínas se realizó por lectura de la absorbancia a 280 nm y la actividad Ara-DH según el método descrito con anterioridad. Las fracciones con actividad se concentraron mediante sacarosa sólida y se dializaron en contra de 500 ml de buffer Tris-glicina 0,04 M, pH 8,3.

## 3. Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida

Los geles fueron preparados en tubos de 10 x 120 mm, utilizando acrilamida al 7% como gel separador en la parte inferior del tubo (5 ml) y acrilamida al 8% en la parte superior (4 ml). Se usaron las mismas soluciones de la metodología de Davis (56, 57). Sobre el gel separador se colocaron 0,5 ml de gel concentrador preparado a partir de las soluciones B, D, E y F mencionadas en Métodos (D). Cada columna fue cargada con alrededor de 4 mg de proteínas provenientes de las fracciones concentradas con actividad Ara-DH de la cromatografía en Sephadex G-100. La electroforesis se realizó utilizando buffer Tris-glicina 0,04 M, pH 8,3 en ambas cámaras, con una intensidad de 6 mA/gel, hasta que



el marcador de corrimiento migraba alrededor del 90% de la longitud del gel.

La actividad Ara-DH se reveló en un segmento de gel en la mezcla de reacción indicada en Métodos (E) y se cortaba en seguida el disco correspondiente. La enzima era eluída del gel mediante incubación de los segmentos con actividad en buffer Tris-EDTA 1 mM, 1 mM DTT, pH 7,0 durante 48 horas a 4°C.

#### I. Efecto de la Concentración de Sustratos sobre la Velocidad de Reacción

Se estudió el efecto de la concentración de D-arabinosa y  $\text{NAD}^+$  sobre la velocidad de reacción con enzima parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) proveniente de las tres cepas: 74-A, col-15a y col-16a. Las concentraciones de D-arabinosa fueron: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; y 100 mM con una concentración constante de  $\text{NAD}^+$  de 0,5 mM.

Las concentraciones de  $\text{NAD}^+$  utilizadas fueron: 0,05; 0,1; 0,125; 0,20; 0,50 y 5,0 mM a una concentración constante de D-arabinosa de 100 mM.

Se graficó la velocidad de reacción expresada en mUnidades/ml versus la concentración de sustratos y los valores recíprocos correspondientes. Del gráfico de los dobles recíprocos se calcularon las constantes de Michaelis aparentes.

#### J. Especificidad de Sustrato

Se estudió la especificidad de sustrato utilizando enzima parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) de

las tres cepas. Fueron ensayados los siguientes compuestos: D-arabinosa, L-fucosa, D-ribosa, L-arabinosa, D-glucosa, L-xilosa, L-ramnosa, 2-desoxi-D-glucosa, D-xilosa, 6-fosfogluconato y 2-desoxi-D-ribosa.

La actividad enzimática se midió por la velocidad de reducción de  $\text{NAD}^+$ , registrando el cambio de absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro Gilford provisto de termostato para mantener la temperatura a 30°C. Al aumento de absorbancia en presencia de D-arabinosa se le asignó el valor 1,0 (ó 100), calculando para los otros sustratos las actividades relativas.

La mezcla de reacción contenía en un volumen de 0,5 ml los siguientes reactantes (concentración final): Bicine 50 mM, pH 9,0;  $\text{NAD}^+$  0,5 mM; sustratos 100 mM y enzima 50 ul. Se utilizó como blanco una mezcla que contenía los mismos componentes, pero sin sustrato.

#### K. Determinación de pH Optimo

Para la enzima parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) en las tres cepas estudiadas se determinó el efecto del pH sobre la velocidad de reducción de  $\text{NAD}^+$ , medida en espectrofotómetro Gilford a 340 nm. Se utilizaron los siguientes tampones en una concentración final de 50 mM y a los valores de pH que se indican: MES 5,2; 6,01; 7,1; PIPES 6,2 HEPES 6,8; 7,5; 7,8; 8,05 y BICINE 7,75; 8,4; 9,0; 9,4; 9,85 y 10,0.

En un volumen de 0,5 ml la mezcla de reacción contenía los siguientes componentes: tampón 50 mM,  $\text{NAD}^+$  0,5 mM, D-arabinosa 100 mM y enzima 50 ul. Se utilizó como blanco una mezcla que contenía los mismos componentes, sin D-arabinosa.

Se graficó la velocidad de reacción versus pH y se calculó el valor de pH óptimo.

#### L. Inactivación por Calor

Se estudió el efecto de la temperatura (50°C) sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) proveniente de las tres cepas. Se procedió a incubar a 50°C, una alícuota del preparado enzimático con una concentración de proteínas de 1 mg/ml durante 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15 y 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se colocaron los tubos en hielo y se procedió a leer la actividad enzimática por el método espectrofotométrico ya descrito. La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes, en un volumen final de 0,5 ml: BICINE 50 mM, pH 9,0;  $\text{NAD}^+$  0,5 mM; D-arabinosa 100 mM y 50  $\mu$ l de enzima.

A la preparación enzimática sin tratar, se le asignó el valor de 100% de actividad y se calculó el porcentaje de actividad remanente para los tiempos correspondientes. Se graficó el porcentaje de actividad remanente versus el tiempor de incubación y se calculó  $t_{1/2}$  de pérdida de actividad para cada preparación enzimática.

#### M. Determinación del Punto Isoeléctrico

La determinación del punto isoelectrico de las preparaciones purificadas de Ara-DH se hizo mediante electrofocalización en geles de poliacrilamida (61-63).

El electroenfoque se realizaba en tubos verticales de 80 x 6 mm, utilizando ácido ortofosfórico al 0,2% (v/v)

como anólito y NaOH al 0,215 (p/v) como católito y con un voltaje de 350 V.

Los geles se prepararon mezclando los reactivos de polimerización, la acrilamida, el anfólito y la proteína dializada en contra de agua bidestilada pH 7,0 y se dejó polimerizar durante 60-80 minutos.

La composición de cada gel en un volumen de 2 ml era el siguiente: acrilamida 7%, bisacrilamida 0,175%, persulfato de amonio 0,07%, solución Ampholine<sup>R</sup> al 1% (pH 3-10), TEMED 0,032% y la enzima activa en el volumen adecuado para obtener una concentración de 50 ug.

Finalizado el electroenfoque, los geles se tiñeron con azul de bromofenol al 0,2% (p/v) en una mezcla que contenía etanol, ácido acético y agua en una relación de 50:5:45 y se destiñeron hasta fondo claro en una mezcla de etanol, ácido acético y agua en una relación de 30: 5: 65.

Un grupo de geles se cortó en trozos de 2 mm en orden correlativo y se midió el pH correspondiente a cada fracción después de incubar las fracciones con 2 ml de agua bidestilada durante una hora a temperatura ambiente.

Una vez desteñidos los geles, se midieron y se determinó el pH correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína.

Se graficó el gradiente de pH versus longitud del gel.

#### N. Electroforesis en Presencia de Dodecilsulfato de Sodio

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) con la enzima pura y preparaciones altamente purificadas se hizo de acuerdo a la técnica de Shapiro et al (64), modificada según Weber (65).

Los geles se prepararon mezclando las soluciones A, C y G mencionadas en Métodos (D) con una solución de fosfato de sodio 0,44 M pH 7,1 con SDS 0,44% en una proporción de 1: 2: 4: 1. La polimerización se realizó en presencia de luz fluorescente blanca durante 60 minutos.

La enzima proveniente de las tres cepas de Neurospora crassa y proteínas marcadoras fueron incubadas durante dos horas a 37°C, en una mezcla que contenía buffer fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,0; 0,1% SDS y 1% DTT. Después del período de incubación, las muestras se diluyeron en buffer fosfato de sodio 0,01 M y se calentaron durante dos minutos en un baño de agua hirviendo (66-68).

Las proteínas, a una concentración de 50-100 ug, se mezclaron con 3 ul de azul de bromofenol, 1 gota de glicerol, 5 ul de DTT y 50 ul de buffer fosfato 0,01 M y se colocaron sobre los geles. Se utilizó una solución de buffer fosfato de sodio 0,1 M en ambas cámaras y una intensidad de 8 mA/gel, hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol 0,01% p/v) migraba un 90% del largo total del gel. Los geles se cortaron en la posición del colorante de referencia y se midió su longitud.

Previo a la tinción los geles se fijaron durante 60 minutos en una mezcla de isopropanol 50% (v/v) y ácido tricloroacético 20% (p/v) a temperatura ambiente (69). En seguida los geles se tiñeron durante doce horas en una solución de Azul Brillante de Coomassie 0.025% en isopropanol 25% (v/v) y ácido tricloroacético 20% (p/v). Los geles se destiñeron en el mismo solvente o en ácido acético al 7% (v/v). También se usó la tinción con Amido Black al 0,1% en ácido acético al 7% (v/v).

Para el estudio de los pesos moleculares se midió la migración relativa de las bandas en los geles desteñidos. Se calculó la movilidad relativa y se graficaron estos

valores versus el logaritmo del peso molecular de la subunidad de las proteínas de referencia.

#### O. Electroforesis en Presencia de Urea

Para la preparación de los geles se utilizaron las mismas soluciones indicadas en Métodos (D), excepto la solución C formada por acrilamida al 40% y bisacrilamida al 0,5%. Se utilizó sólo el gel separador con una concentración de acrilamida al 10% obtenida al mezclar las soluciones A, C, G y agua en la relación 1: 2: 4: 1. En el gel se obtiene una concentración de urea 6,25 M cuando la solución G y el agua contienen urea 10 M. Las soluciones eran cuidadosamente desaeradas y los geles se prepararon en tubos de 80 x 6 mm, se polimerizaron a la luz y se usaron inmediatamente. Para la electroforesis se usó buffer Tris-glicina 0,04 M, pH 8,3 en ambas cámaras y una intensidad de 3 mA/gel.

Los geles fueron teñidos con Amido Black 0,25% (p/v) en ácido acético al 7% durante 30 minutos y fueron destañados mediante cambios sucesivos de la solución de ácido acético al 7%.

#### P. Obtención de Suero Inmune Antideshidrogenasa de D-Arabinosa-NAD<sup>+</sup>

El suero antideshidrogenasa de D-arabinosa fue obtenido mediante inyección de dos conejos hembra, de dos kilos de peso, con un milígramo de enzima de la cepa silvestre (74-A) obtenida por la metódica descrita (H), mezclada con coadyuvante de Freund completo en proporción 1:1. A

intervalos de 10 días, se colocaron dos nuevas inyecciones de 1 mg de enzima con coadyuvante de Freund incompleto en proporción 1: 1. Transcurridos 12 días de la última inyección, se obtuvo sangre mediante punción cardíaca. La obtención del suero control se hizo mediante la extracción de 50 ml de sangre de la arteria de la oreja antes de iniciar la inmunización.

Los sueros, inmune y control, fueron obtenidos por centrifugación a 4000 g durante 15 minutos después de haber incubado la sangre durante 24 horas a 4°C. Las gamma globulinas del suero se aislaron por precipitación con sulfato de amonio al 33% (p/v), lavadas con buffer fosfato-cloruro de sodio 0,01 M, pH 7,0 y reprecipitadas con sulfato de amonio al 33% (p/v) (70). Ambos sueros se mantuvieron a 4°C en buffer fosfato-cloruro de sodio 0,01 M, pH 7,0 con azida sódica al 0,1% (p/v).

#### Q. Inmunodifusión Doble

Se prepararon placas de agarosa al 1% (p/v) en buffer barbital pH 8,6 (fuerza iónica 0,05) ó en buffer fosfato salino pH 7,0. Se hicieron orificios de 2 mm de diámetro en forma de roseta utilizando un molde metálico y en el orificio central se colocó antisuero (dilución 1/2 ó 1/4) y en los orificios laterales 10 ul de antígeno (71). Para tinción de proteínas se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente y para la detección de actividad enzimática se incubó 48 horas a 4°C. Al término del período de incubación se procedió a lavar exhaustivamente con solución de suero fisiológico y después con agua bidestilada. Las placas fueron secadas a 37°C y teñidas con Amido Black al

0,1% (p/v) para proteínas. Para la detección de actividad Ara-DH las placas fueron primero teñidas con la mezcla indicada en Métodos (E) y en seguida secadas (72, 73).

#### R. Determinación del Punto de Equivalencia

El punto de equivalencia fue determinado en condiciones de antisuero constante y de antígeno constante.

##### a. Antisuero constante:

Se utilizó una concentración de antisuero de 1 mg, en un volumen de 100 ul, y se mezcló con 100 ul de antígeno con actividad Ara-DH entre 0 - 120 mU. Se incubó durante 96 horas a 4°C y se centrifugó a 10000 rpm en centrífuga Micro-hematocrito durante 3 minutos y se determinó actividad enzimática en el sobrenadante según Método (F).

##### b. Antígeno constante:

Se utilizó una concentración de antisuero de 0,0156 - 2,0mg en un volumen de 100 ul y se mezcló con 100 ul de antígeno con actividad Ara-DH de 10 mU. Se incubó durante 96 horas a 4°C y se centrifugó a 10000 rpm en centrífuga Micro-hematocrito durante 3 minutos y se determinó actividad enzimática en el sobrenadante según Método (F).

#### S. Inmunodifusión Radial Simple

Se prepararon placas de agarosa al 1% (p/v) en buffer barbital pH 8,6 (fuerza iónica 0,05) con concentración de antisuero de 1/12. Como soporte se utilizaron portaobjetos tamaño standard. Se hicieron orificios de 2 mm de diámetro y de 10 ul de capacidad mediante un molde metálico. En cada orificio se colocó antígeno en concentraciones de 1/1,



1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 preparado a partir de una solución de antígeno de 1 mg/ml y con actividad Ara-DH de 35 mU/ml. Se incubó a 4°C durante 96 horas. Terminado este período, se lavó con NaCl 0,2 M durante 24 horas y se enjuagó con repetidos cambios de agua bidestilada. Se detectó la actividad Ara-DH en el inmunoprecipitado con la misma mezcla utilizada para la detección de la enzima en geles de poli-acrilamida (E).

Se midió el diámetro del anillo de precipitación utilizando papel milimetrado y lupa, y se graficó el cuadrado de este valor versus la concentración de enzima expresada en mg/ml, obteniéndose la curva standard para cuantificar la concentración de enzima en los respectivos extractos crudos (74).

## T. Caracterización Genética

### 1. Cruzamientos

Diferentes cruzamientos entre las cepas estudiadas fueron realizados en tubos de ensayo (1,5 x 20 cm) ó en placas Petri (10 cm de diámetro) que contenían el medio Westergaard y Mitchell (75) y que fueron incubados a 25°C durante 12 a 15 días. En aquellos casos en que se utilizaba una cepa de crecimiento lento, ésta era inoculada primero e incubada a 25°C durante una semana. En seguida se fertilizaba con conidios del sexo opuesto.

El análisis genético de los cruzamientos se hizo mediante aislamiento de esporas al azar o caracterización de tetradas. Para la activación de las esporas se utilizó el shock térmico a 60°C durante 30 minutos.

Las esporas fueron catalogadas fenotípicamente de acuerdo a las características morfológicas del micelio. Las variantes respecto a la deshidrogenasa de D-arabinosa fueron determinadas mediante el análisis electroforético de los extractos preparados del micelio derivado de dichas ascosporas y obtenidos en cultivos en medio mínimo N-Vogel líquido más sacarosa.

El análisis de la segregación génica fue realizado en cruzamientos en duplicado como los siguientes:

74-A x col-16a

74-A x col-15a

77-a x col-10A

La obtención y caracterización de micelios dobles mutantes se realizó por técnicas similares. Se aislaron y caracterizaron en cuanto a sexo, fenotipo morfológico y enzimático los micelios denominados 7415-125A, 7415-135A y 7416-97A. Para este efecto los cruzamientos, en duplicado, fueron los siguientes:

7415-125A x col-16a

7415-135A x col-16a

7416-97A x col-15a

## 2. Revertantes

Se realizaron experimentos de mutagénesis mediante irradiación de conidios de la cepa col-16a, con radiación ultravioleta corta (253 nm), proveniente de una lámpara Multirayo ubicada a 20 cm de la suspensión de conidios, durante 120 segundos. La concentración inicial de conidios fue

$2 \times 10^7$  conidios por ml y la energía aplicada fue de 36 - 48 erg/mm<sup>2</sup>/seg.

El material mutagenizado fue diluído en medio mínimo N-Vogel para obtener una concentración de  $10^3$  ó  $10^4$  conidios por ml y una alícuota de 0,1 ml fue dispersada en placa Petri con medio completo adicionado de L-sorbose e incubada a 25°C durante 24 ó 48 horas en la oscuridad.

Posibles revertantes fueron aislados en tubos con medio completo y fueron incubados a 25° y 34°C. Los micelios de fenotipo silvestre fueron cultivados en medio mínimo N-Vogel líquido con agitación constante de 140 rpm en agitador rotatorio Eberbach durante 48 horas, a 25°C. El micelio se cosechó mediante filtración al vacío, se preparó el extracto crudo y se analizó el fenotipo enzimático según técnica descrita (D).

### 3. Heterocariones

La obtención de heterocariones entre diferentes cepas se realizó mediante la inoculación de conidios en medio mínimo sólido en placas Petri, las que fueron incubadas a 25°C durante 24 - 48 horas. Los heterocariones formados por las cepas col-15a + col-16a fueron denominados h-1, h-2 y h-3.

## RESULTADOS

### I. Detección preliminar de la actividad Ara-DH en cepa silvestre y mutantes morfológicas de Neurospora crassa

La electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos crudos de la cepa 74-A de Neurospora crassa y posterior tinción de actividad deshidrogenásica (como se describió en Métodos) reveló la presencia de actividad con D-arabinosa y  $\text{NAD}^+$  como aceptor de hidrógenos.  $\text{NADP}^+$  no actúa como aceptor (Fig.1). El hallazgo de esta actividad D-arabinosa deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  confirmó resultados previos obtenidos en este laboratorio (45).

En análisis electroforético comparativo de varias cepas de Neurospora crassa mostró diferencias cuantitativas importantes respecto a la actividad de Ara-DH, existiendo una mayor actividad de dicha enzima en las cepas col-15a y col-16a respecto a la cepa silvestre 74-A y una menor actividad Ara-DH en la cepa col-10A (Fig. 2). Otras mutantes morfológicas examinadas presentaron una actividad Ara-DH similar a la cepa 74-A. En la Figura 3, se muestra la morfología de las cepas de N. crassa, utilizadas en el presente estudio.

La actividad Ara-DH analizada mediante cromatografía en DEAE-celulosa muestra diferencias cuantitativas similares a las detectadas por electroforesis en las diferentes cepas (Figs. 4-A, 4-B, 4-C).

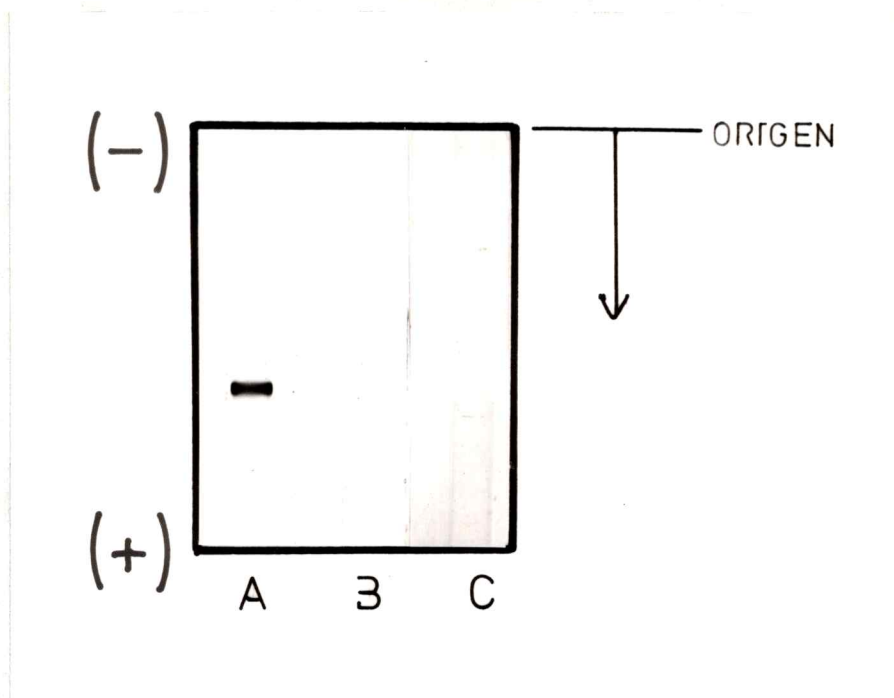


Figura 1 Actividad Ara-DH en extracto crudo de *Neurospora crassa*, cepa 74-A procesado por electroforesis en gel de poliacrilamida. En cada columna se colocaron 100  $\mu$ l de extracto (400  $\mu$ g de proteínas totales). Después de electroforesis los geles fueron sumergidos durante 10 minutos en la mezcla de ensayo indicada en Métodos (E) y fijados en ácido acético al 7%.

A : arabinosa-NAD<sup>+</sup> B : arabinosa-NADP<sup>+</sup>  
 C : NAD<sup>+</sup>-NADP<sup>+</sup>

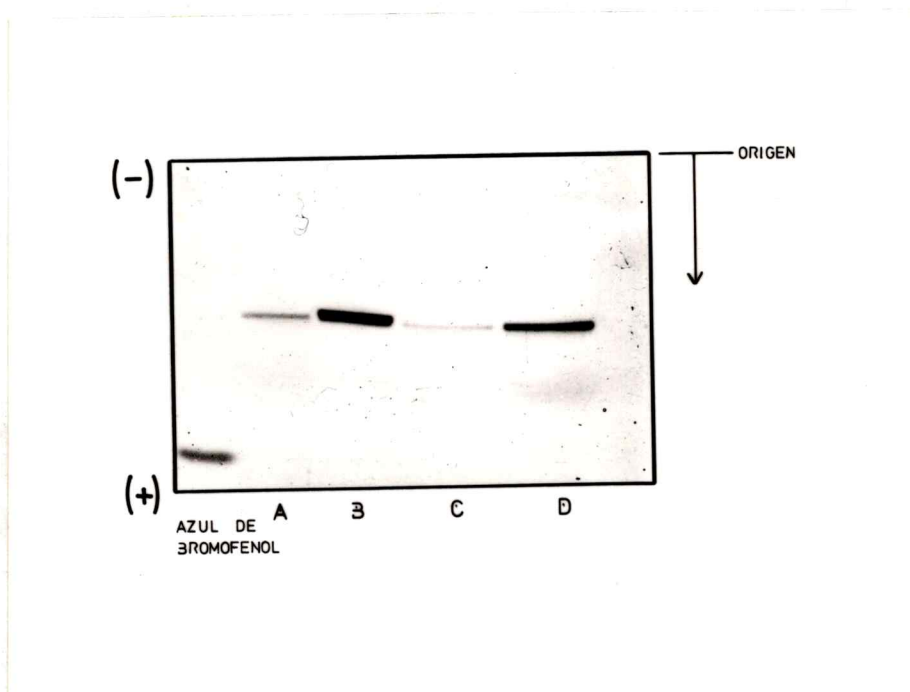


Figura 2 Actividad Ara-DH en extractos crudos de varias cepas de *Neurospora crassa*, cultivadas durante 48 horas, procesados por electroforesis en gel de poliacrilamida en placa. En cada ranura (A, B, C y D) se colocaron 100 ul de extracto (500 ug de proteínas totales). Después de la electroforesis la placa fue sumergida durante 10 minutos en la mezcla de ensayo indicada en Métodos (E) y fijada en ácido acético al 7%.

A : cepa 74-A B : col-15a C : col-10A D: col-16a

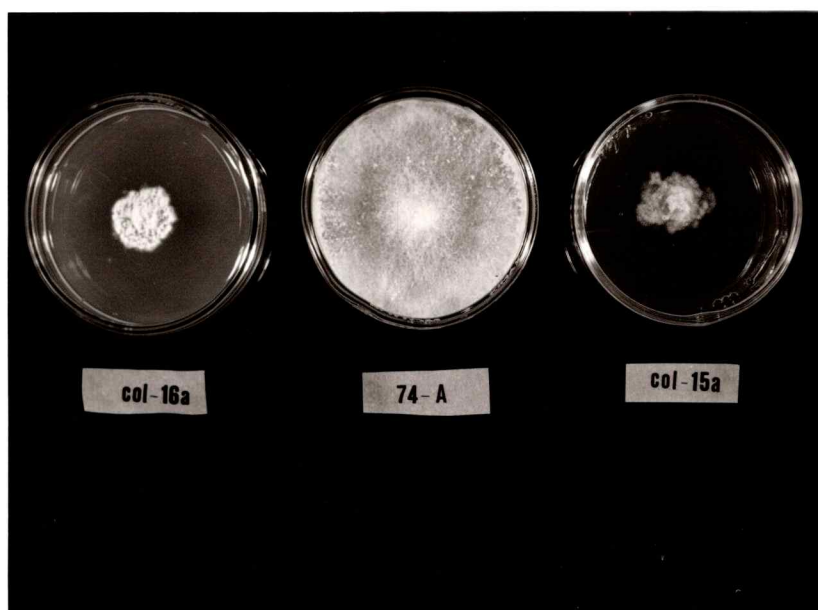


Figura 3 Morfología de cepas de Neurospora cultivadas a 25°C durante 48 horas, en medio mínimo N-Vogel adicionado de sacarosa al 1,2% e inositol (5 mg/ml, col-15a).

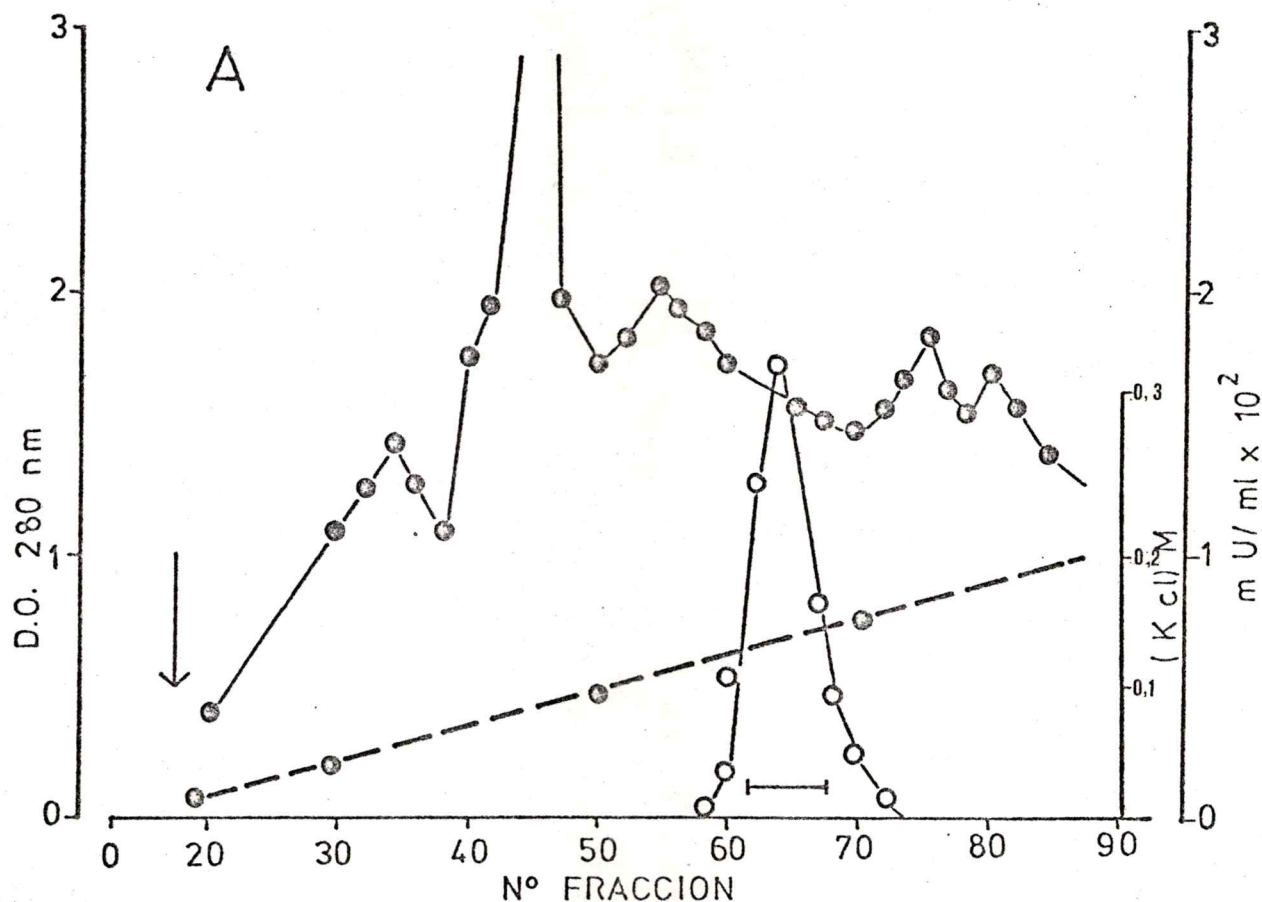


Figura 4-A Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) proveniente de la cepa 74-A de *Neurospora*, fraccionada en columna de DEAE-celulosa (2,5 x 25). La separación se hizo mediante un gradiente lineal de KCl 0---0,5 M en buffer Tris-EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,0 (350 ml por lado). Se colectaron fracciones de 4,5 ml y cada dos tubos se determinó la actividad Ara-DH por medición de la velocidad de reducción de  $\text{NAD}^+$  a 340 nm (○) y el nivel de proteínas por absorbancia a 280 nm (●). Cada diez tubos se leyó la conductividad (---). La flecha indica el inicio del gradiente. La línea bajo el pico de actividad indica las fracciones utilizadas para estudios posteriores.



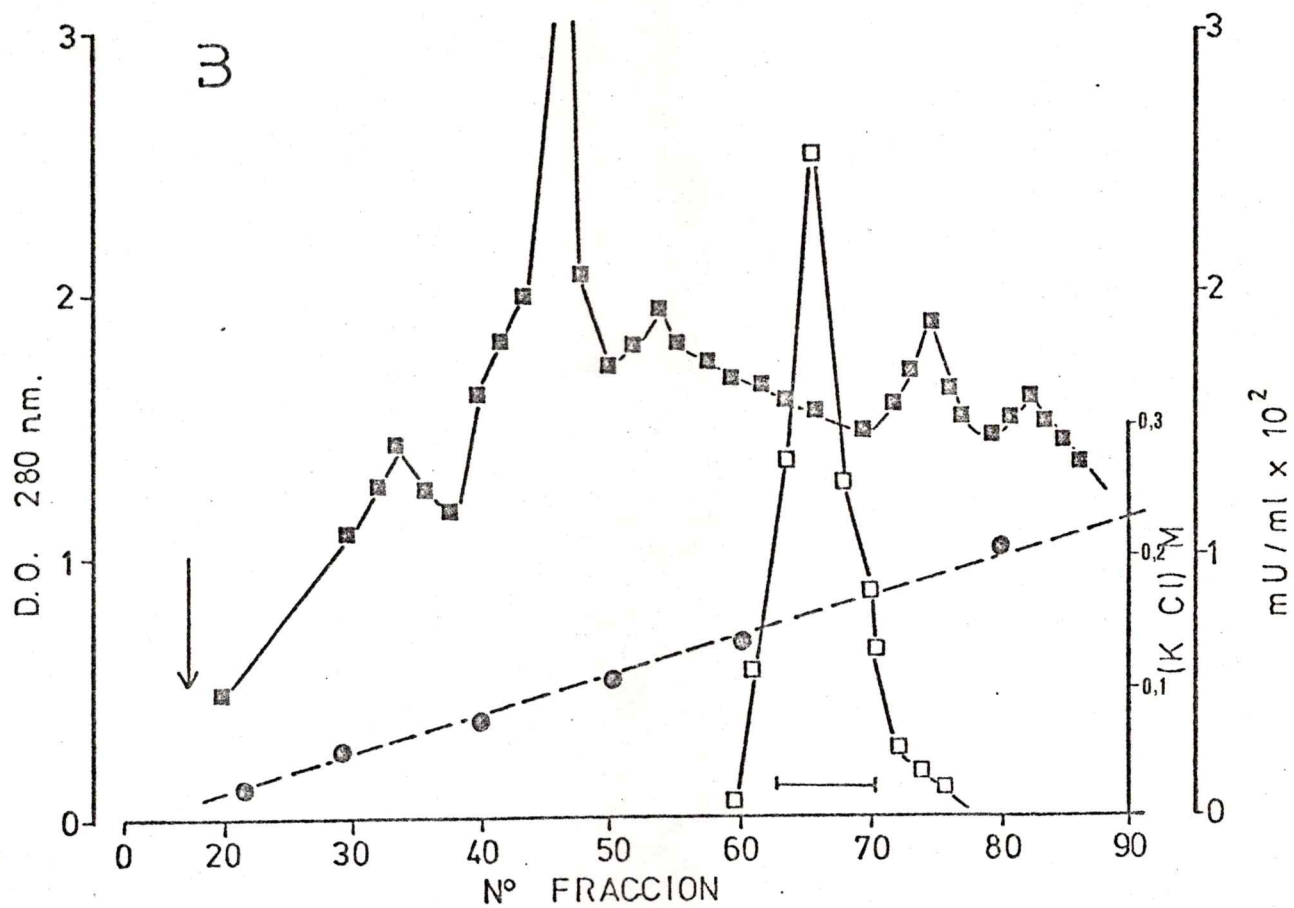


Figura 4-B Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) proveniente de la cepa col-15a de Neurospora. Las condiciones experimentales son idénticas a las mencionadas en la Figura 4-A.

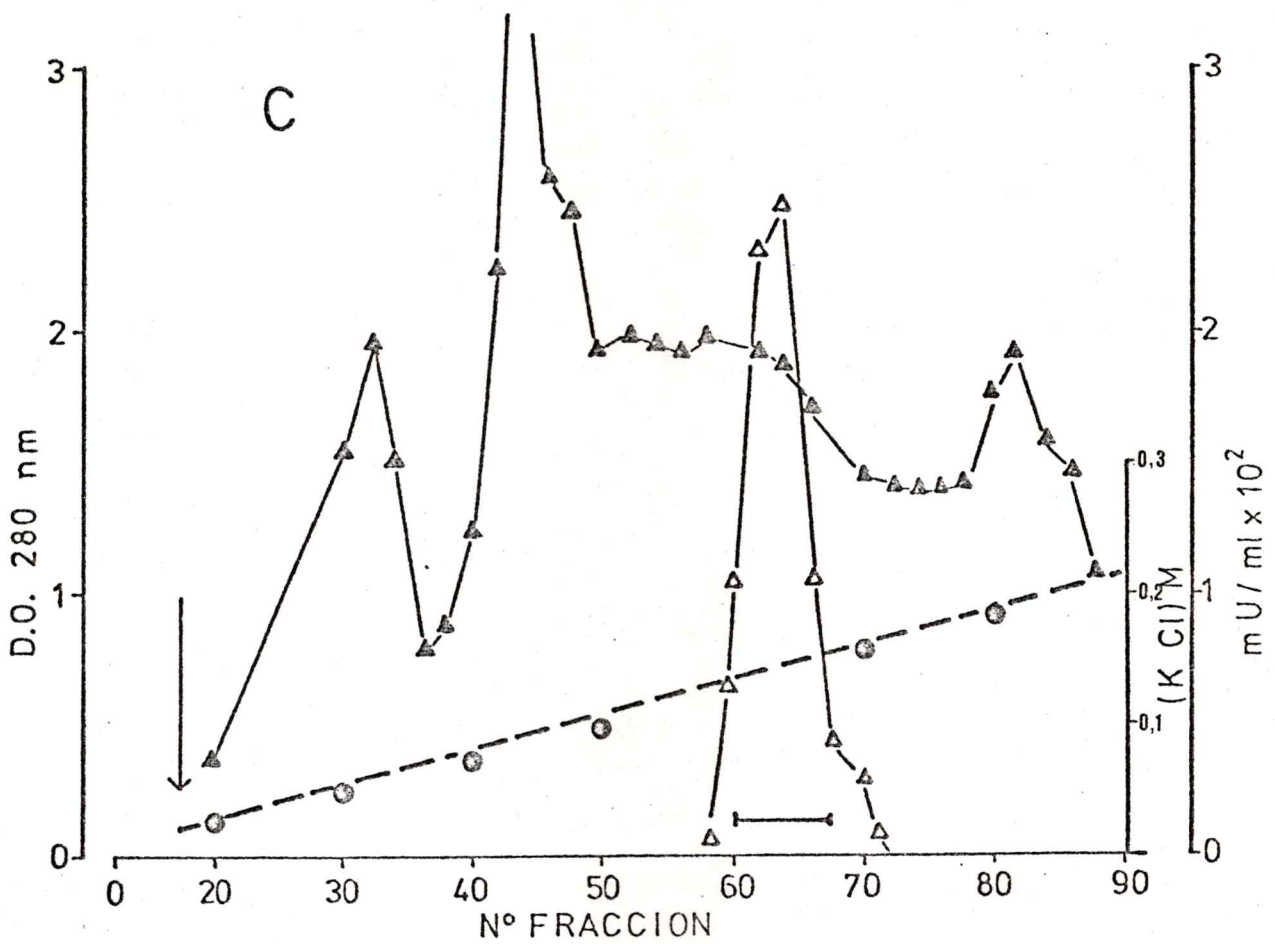


Figura 4-C Actividad Ara-DH en líquido sobrenadante (105000 g) de la cepa col-16a de Neurospora. Las condiciones experimentales son idénticas a las mencionadas en la Figura 4-A.

## II. Caracterización bioquímica de la enzima aislada de la cepa silvestre y de las mutantes col-15a y col-16a

### A. Purificación de la enzima hasta homogeneidad

La cromatografía en DEAE-celulosa permitió separar una fracción de actividad Ara-DH como un pico simétrico y estrecho, a una concentración de KCl 130-140 mM. La movilidad cromatográfica de la enzima proveniente de las diferentes cepas estudiadas es similar (Figs. 4-A, 4-B, 4-C). La actividad específica de las fracciones fluctuó entre 0,022 y 0,026 U/mg (Tablas 1-1, 1-2, 1-3). La cromatografía de exclusión en Sephadex G-100, resultó ser más adecuada ya que el peso molecular de la enzima es de 52-53000 y permitió eliminar contaminantes de mayor peso molecular (Figs. 5-A, 5-B, 5-C). La actividad específica de las preparaciones fluctuó entre 0,048 y 0,052 U/mg (Tablas 1-1, 1-2, 1-3). La electroforesis en gel de poliacrilamida tipo preparativo, con dos concentraciones de acrilamida como gel separador, proporcionó una buena separación y purificación de la Ara-DH (Fig. 6). La actividad específica de las preparaciones purificadas de las tres cepas es similar, y fluctuó entre 1,11 y 1,17 U/mg (Tablas 1-1, 1-2, 1-3). Debe hacerse notar, que cuando fue necesario se realizó electroforesis en geles preparativos.

La enzima ha sido purificada 280 veces y se obtuvo una preparación homogénea como lo demuestra la electroforesis en gel de acrilamida al 8% y 10% en que se observó una banda de proteínas y la correspondiente banda de actividad Ara-DH (Fig. 7).

La homogeneidad de los preparados fue confirmada en los experimentos de electroforesis en presencia de agentes desnaturantes (Figs. 12, 14).

Tabla 1-1 Purificación de Ara-DH de la cepa silvestre 74-A

Procedimiento	Volumen ml	U totales x 10 <sup>-3</sup>	Proteínas totales mgs	A.E. U/mg	Rendimiento etapa %	Rendimiento total %	Purif. veces	Purif. total
Extracto crudo	120	4200	1220	0,0034 <sup>#</sup>	100	100		
DEAE-celulosa	60	4015	180,9	0,022	95,6	95,6	6,5	6,5
Diálisis, concen- ración sacarosa	5,5	3856	172,1	0,0230	96	91,8	6,8	
Sephadex G-100	54	3288	67,6	0,0483	85,3	78,3	2,1	14,3
Diálisis, concen- tración sacarosa	10	3252	66	0,0492	98,8	77,4	2,1	14,3
Electroforesis preparativa	1,1	941	0,820	1,11	28	21,6	20,7	296

<sup>#</sup>Estimada a partir de la actividad enzimática utilizada en experimentos de inmunodifusión radial simple (35 mU/ml). Se inició la purificación utilizando 80 grs de micelio húmedo.

Tabla 1-2 Purificación de Ara-DH de la cepa col-15a

Procedimiento	Volumen ml	U totales x 10 <sup>-3</sup>	Proteínas totales mgs	A.E. U/mg	Rendimiento etapa %	Rendimiento total %	Purif. vecçs	Purif. total
Extracto crudo	110	7700	1560	0,0049 <sup>#</sup>	100	100		
DEAE-celulosa	80	6583	182	0,040	85,5	85,5	7,3	7,3
Diálisis, concen tración sacarosa	6,5	6319	174	0,045	96	82,1	7,3	7,3
Sephadex G-100	60	5750	95,8	0,060	91	74,8	1,7	12,4
Diálisis, concen tración sacarosa	10	5514	91,8	0,060	95,9	71,7	1,7	12,4
Electroforesis preparativa	1,5	1654	1,48	1,17	30	21,4	19,5	242

<sup>#</sup> Estimada a partir de la actividad enzimática utilizada en experimentos de inmunodifusión radial simple (70 mU/ml). Se inició la purificación con 78 grs. de micelio húmedo.

Tabla 1-3 Purificación de Ara-DH de la cepa col-16a

Procedimiento	Volumen ml	U totales x 10 <sup>-3</sup>	Proteínas totales mgs	A.E. U/mg	Rendimiento etapa %	Rendimiento total %	Purif. veces	Purif. total
Extracto crudo	120	8400	1830	0,0045 <sup>#</sup>	100	100		
DEAE-celulosa	80	8064	242	0,033	96,7	96,7	7,3	7,3
Diálisis, concen- tración sacarosa	6,5	7741	240	0,032	97,7	94,5	7,3	7,3
Sephadex G-100	52,5	6192	103	0,06	80,4	76,1	1,9	13,9
Diálisis, concen- tración sacarosa	11	4739	102	0,06	98,9	75,2	1,9	13,9
Electroforesis preparativa	1,2	1734	148	1,17	22	20,6	19,5	270

# Estimada a partir de la actividad enzimática utilizada en experimentos de inmunodifusión radial simple (70 mU/ml). Se purificó a partir de 78 grs de micelio húmedo.

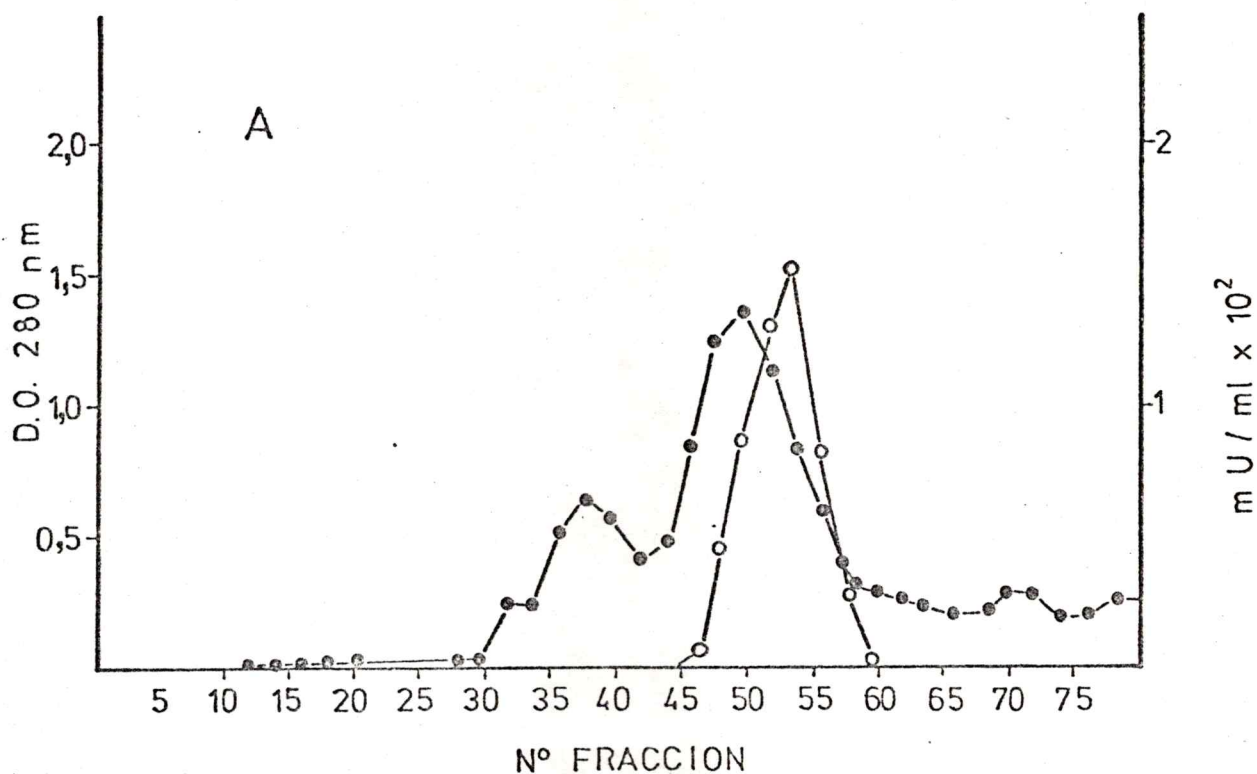


Figura 5-A Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. Sobre una columna de Sephadex G-100 (2 x 60 cm), equilibrada en buffer Tris-EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM, pH 7,0 se colocaron 4 ml de fracción concentrada con actividad Ara-DH proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa. La elución se realizó con el mismo buffer de equilibrio y se colectaron fracciones de 2,25 ml. Cada dos tubos se determinó la actividad Ara-DH (O) y la absorbancia a 280 nm (●).

A : 74-A

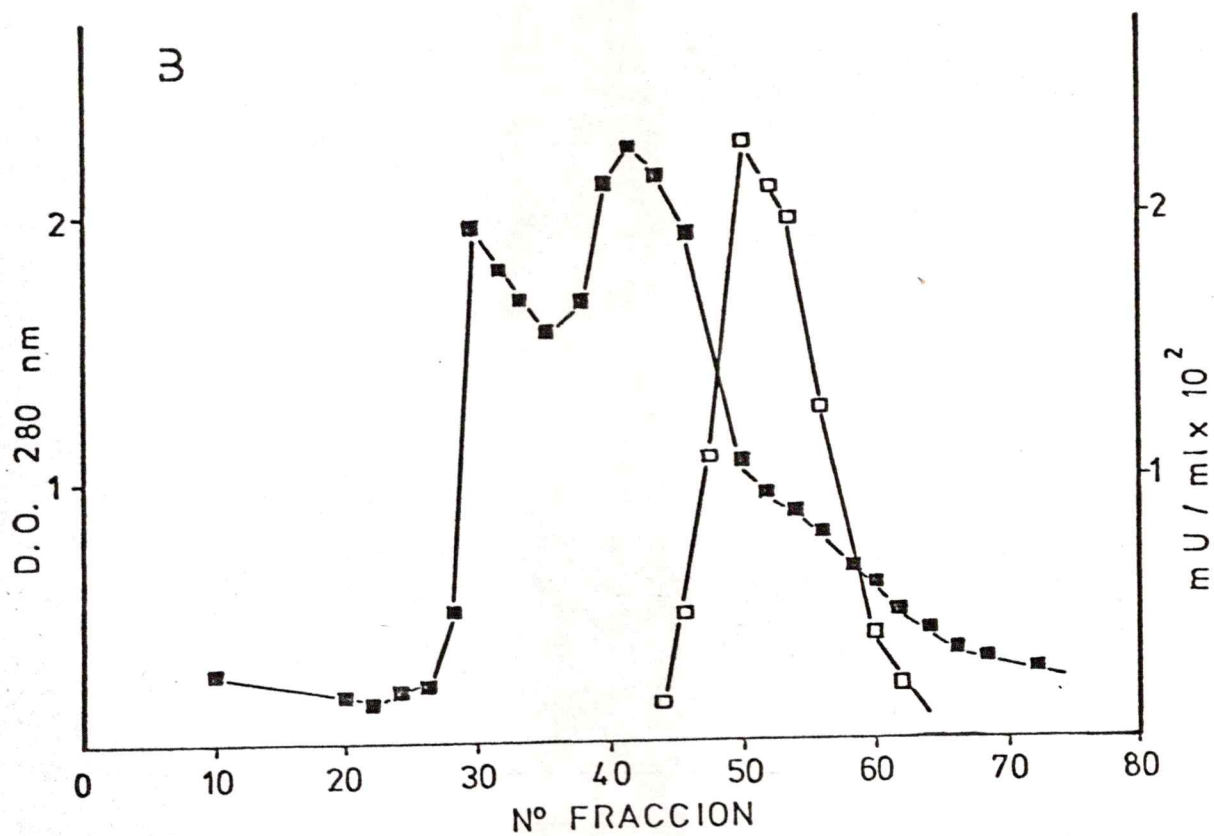


Figura 5-B Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa. Las condiciones experimentales son idénticas a las mencionadas en la Figura 5-A.

B : col-15a



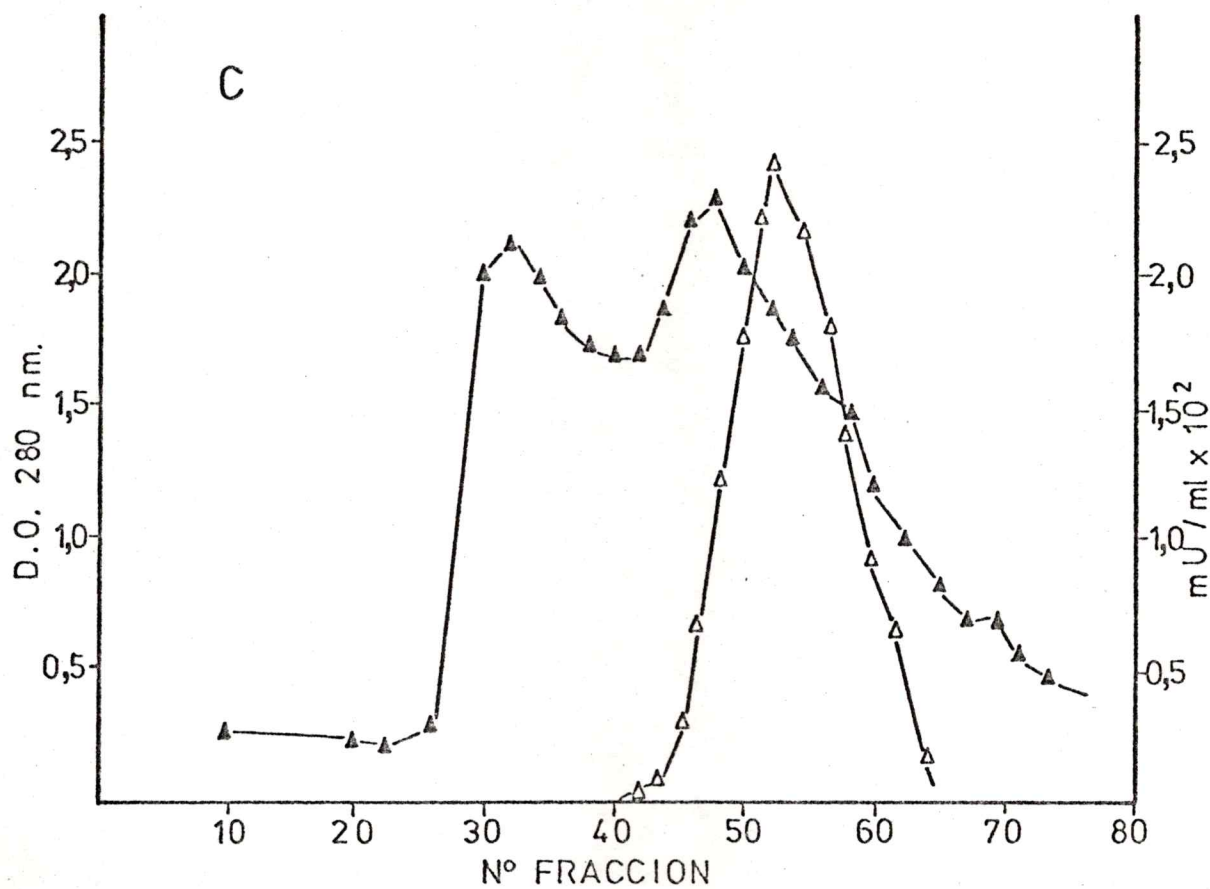


Figura 5-C Cromatografía en Sephadex G-100 de las fracciones con actividad Ara-DH provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. Las condiciones experimentales son idénticas a las mencionadas en la Figura 5-A.

C : col-16a

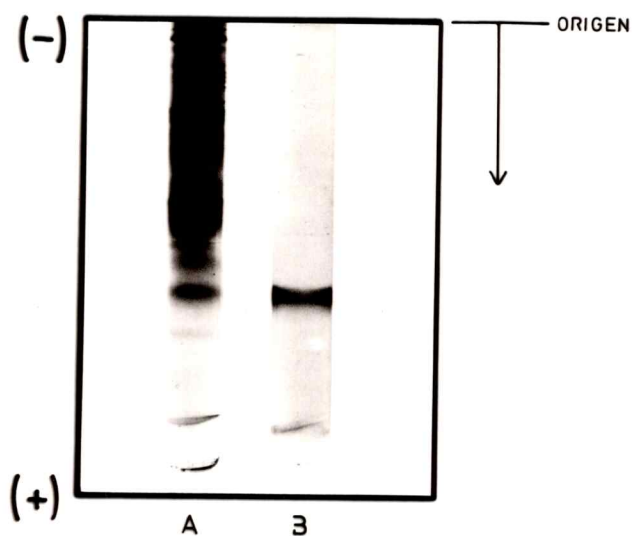


Figura 6 Separación electroforética de Ara-DH de *Neurospora*. Los geles se prepararon en tubos de 100 x 12 mm con dos concentraciones de acrilamida (7% y 8%) como gel separador. En cada columna se colocó alrededor de 4 mg de proteínas totales provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa o en Sephadex G-100. Terminada la electroforesis los geles fueron teñidos para proteínas con Amido Black 0,25% (p/v) durante 30 minutos y para actividad Ara-DH con la mezcla de reacción indicada en Métodos (E) durante 10 minutos. Se fijaron en ácido acético al 7%.

A : proteínas B : actividad Ara-DH



Figura 7 Electroforesis en gel de poliacrilamida de Ara-DH obtenida de los genes tipo preparativo. Electroforesis de la enzima (30 y 60 ug) en geles al 10% (A, B) y 8% (C, D), según se describió en Métodos. Después de la tinción los geles se fijaron en ácido acético al 7%.

A - C : proteínas      B - D : actividad  
Ara-DH

La reproducibilidad de los experimentos cromatográficos fue confirmada en forma aceptable realizando al menos diez experimentos para cada una de las cepas, con un rendimiento de 21% de enzima pura.

#### B. Constantes de Michaelis para sustrato y cofactor

La Ara-DH de Neurospora presenta cinética michaeliana típica (Figs. 8-1, 8-2). Los valores de  $K_m$  arabinosa para la enzima de las tres cepas, calculados mediante la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk fluctúan entre 0,67 y 0,69 mM con un valor promedio de  $0,68 \pm 0,015$  mM. Los valores de  $K_{mNAD^+}$  son similares en las tres cepas y fluctúan entre 0,30 y 0,31 mM con un valor promedio de  $0,30 \pm 0,003$  mM.

#### C. Especificidad de sustrato

La enzima aislada de las cepas 74-A, col-15a y col-16a presenta especificidad de sustrato un tanto restringida, ya que, además de D-arabinosa, es capaz de oxidar a L-fucosa con una eficiencia de 45% y a D-ribosa sólo en un 10%. Los otros azúcares ensayados: L-arabinosa, D-glucosa, D-xilosa, D-fucosa, L-xilosa, L-ramnosa, 2-desoxi-D-glucosa, 6-fosfogluconato, 2-desoxi-D-ribosa no son sustratos de la enzima (Tabla 2).

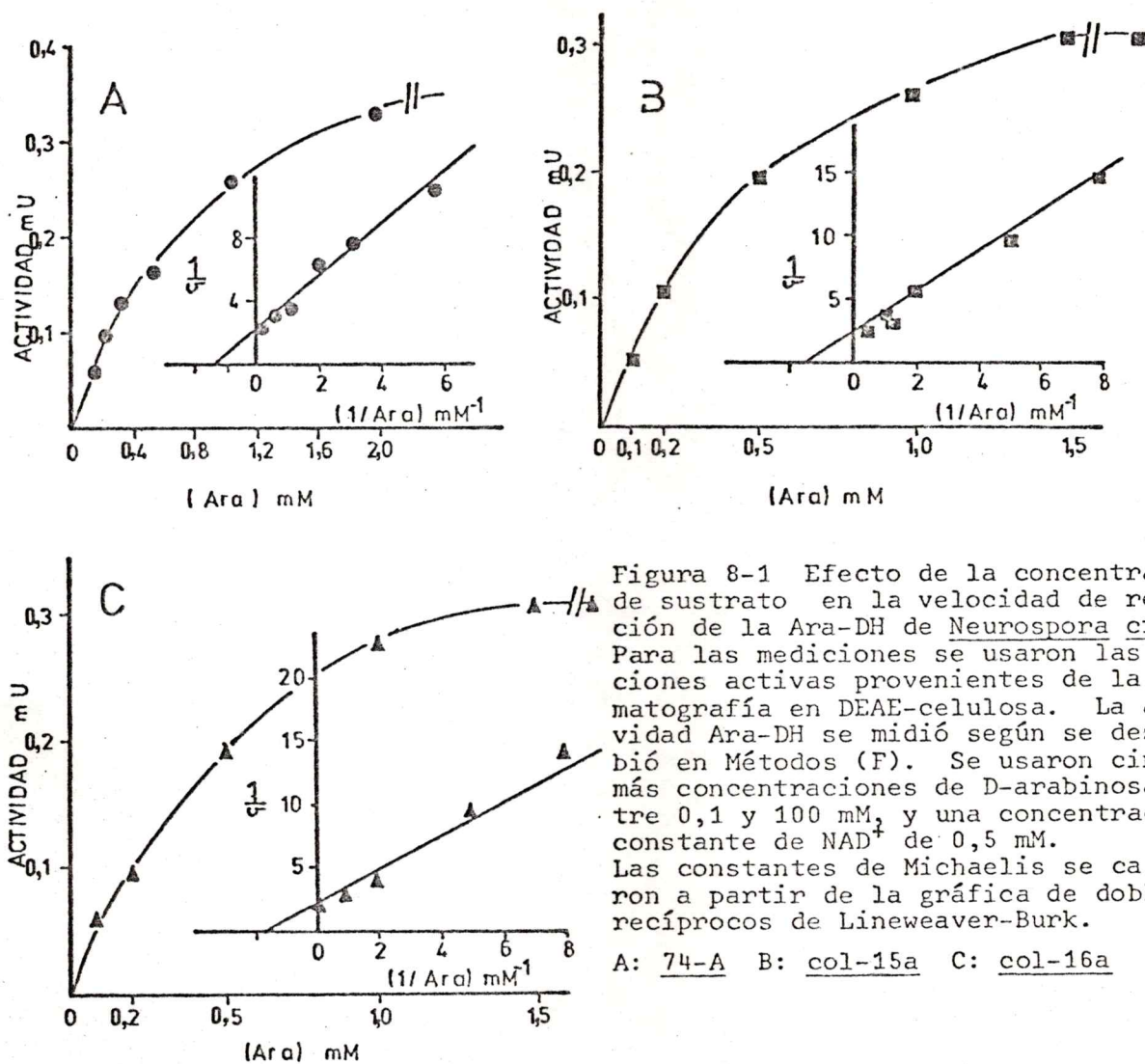


Figura 8-1 Efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de reacción de la Ara-DH de *Neurospora crassa*. Para las mediciones se usaron las fracciones activas provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. La actividad Ara-DH se midió según se describió en Métodos (F). Se usaron cinco o más concentraciones de D-arabinosa entre 0,1 y 100 mM, y una concentración constante de  $\text{NAD}^+$  de 0,5 mM. Las constantes de Michaelis se calcularon a partir de la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

A: 74-A B: col-15a C: col-16a

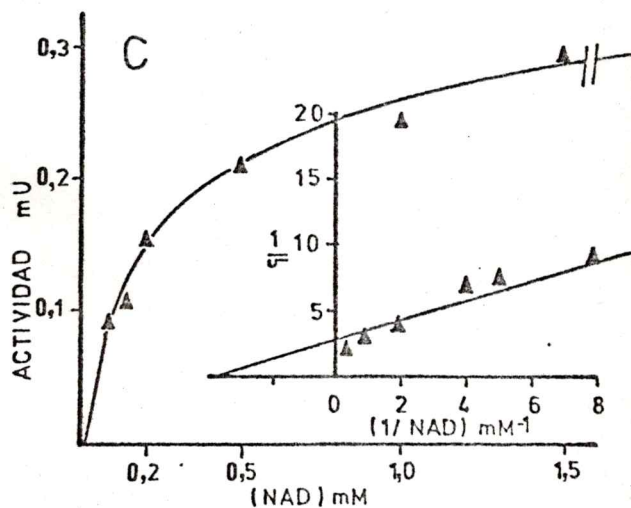
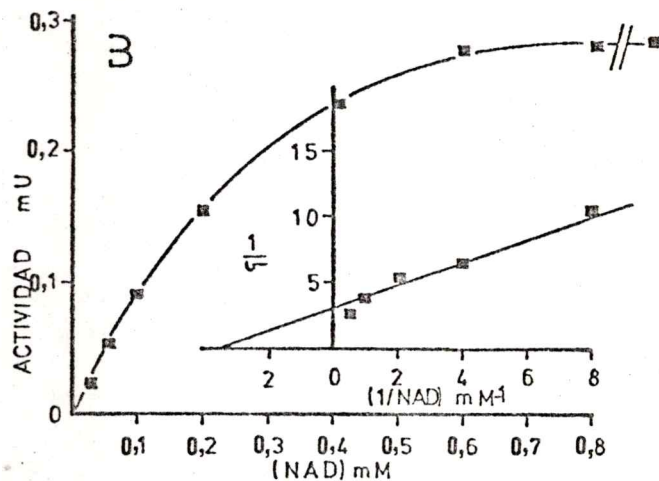
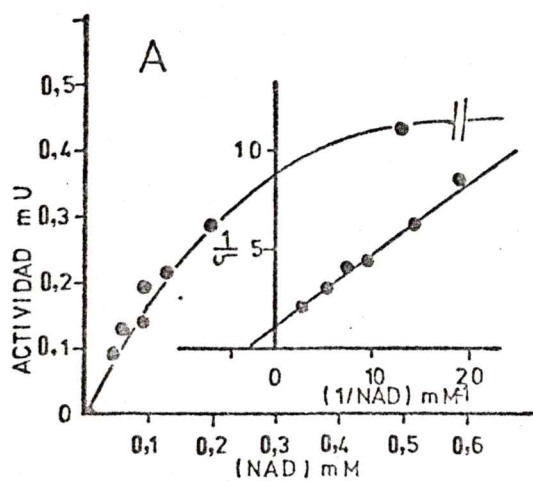


Figura 8-2 Efecto de la concentración de  $\text{NAD}^+$  en la velocidad de reacción de la Ara-DH de *Neurospora crassa*. Para las mediciones se usaron las fracciones activas provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. La actividad Ara-DH se midió según se describe en Métodos (F). Se usaron cinco o más concentraciones de  $\text{NAD}^+$  entre 0,05 y 5,0 mM y una concentración constante de D-arabinosa de 100 mM. Las constantes de Michaelis se calcularon a partir de la gráfica de doubles recíprocos de Lineweaver-Burk.

A: 74-A B: col-15a C: col-16a

Azúcar	Velocidad relativa		
	<u>74-A</u>	<u>col-15a</u>	<u>col-16a</u>
D-arabinosa	1,00	1,00	1,00
L-fucosa	0,45	0,44	0,45
D-ribosa	0,06	0,10	0,10
L-arabinosa	0,03	0,04	0,03
D-glucosa	0,05	0,02	0,02
D-xilosa	0,02	0,02	0,02
2-desoxi-D-glucosa	0	0	0
D-fucosa	0	0	0
L-xilosa	0	0	0
L-ramnosa	0	0	0
6-fosfogluconato	0	0	0
2-desoxi-D-ribosa	0	0	0

Tabla 2 Especificidad de sustrato de la Ara-DH de Neurospora. Se utilizaron las fracciones activas provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. La concentración de sustratos fue de 100 mM y la concentración de NAD<sup>+</sup> de 0,5 mM. La actividad enzimática se determinó según se describió en Métodos (F). Se asignó el valor 1,0 a la actividad con D-arabinosa como sustrato.

#### D. Estudios de pH óptimo

La velocidad de reacción de Ara-DH a diferentes pH se muestra en la Figura 9, observándose que el pH óptimo es igual a 9,0.

#### E. Inactivación por calor

El estudio realizado de esta característica con la enzima parcialmente purificada no muestra diferencias en el  $t_{1/2}$  de pérdida de actividad. Este es de  $2,38 \pm 0,0106$  minutos (Fig. 10).

#### F. Determinación del punto isoeléctrico

Al estudiar esta característica mediante electroenfoque en geles de poliacrilamida (61, 62, 63) con la Ara-DH purificada de las tres cepas en estudio y al relacionar el gradiente de pH y la posición de la banda proteica en el gel respectivo, se encontró que el punto isoeléctrico es de 6,22; 6,25; y 6,21. Estos valores son similares, de modo que este parámetro también puede designarse con un valor promedio de  $6,23 \pm 0,017$  (Figs. 11-A, 11-B; 11-C). El hecho de que esta característica sea común sugiere similitud de carga eléctrica y probablemente de estructura para la enzima proveniente de estas cepas de Neurospora.



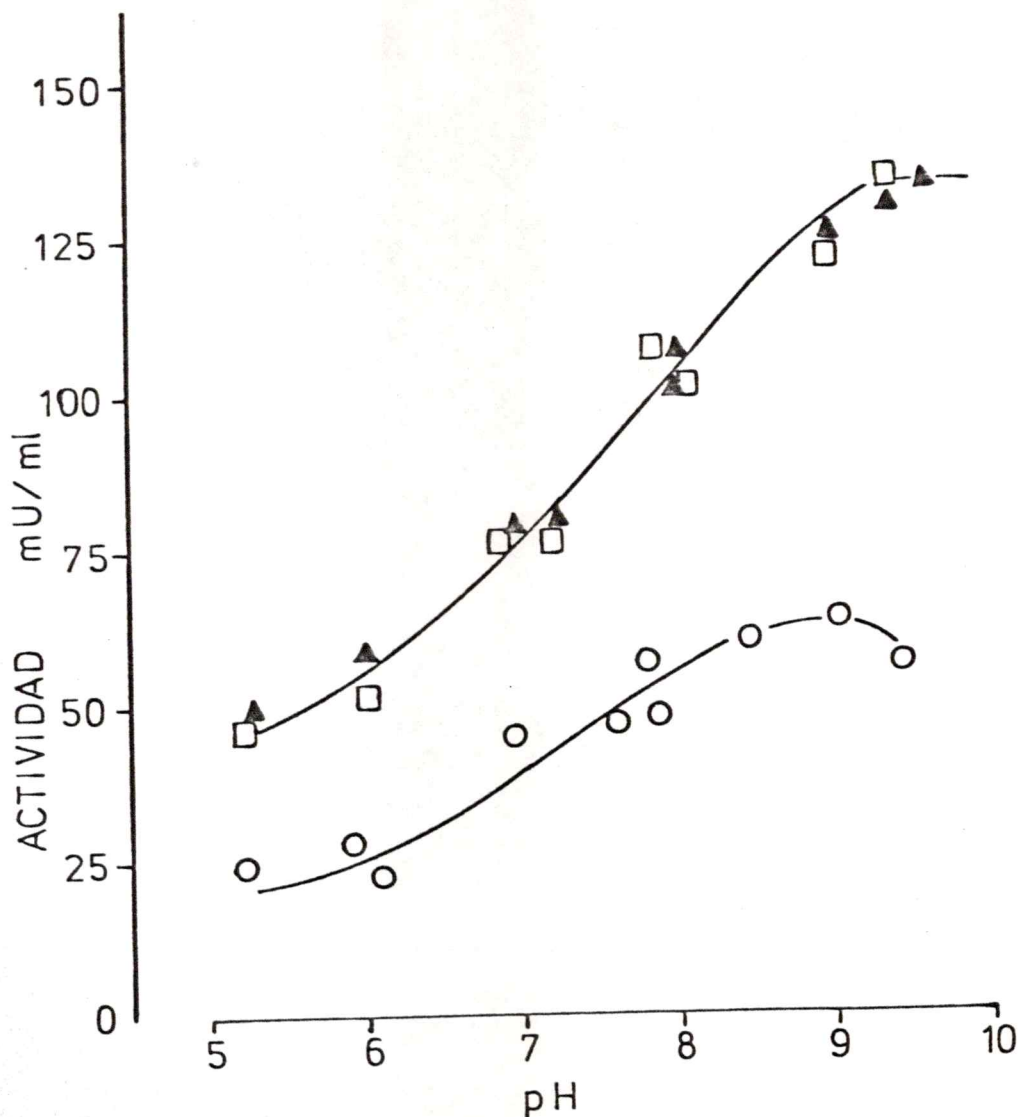


Figura 9 Efecto del pH sobre la velocidad de reacción de la Ara-DH de Neurospora crassa. Se utilizaron las fracciones activas provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa. La actividad enzimática se midió según se describió en Métodos (F). Se usaron los siguientes tampones, a una concentración final de 50 mM: MES (5,2-7,2); PIPES (6,2) HEPES (6,8-8,05); BICINE (7,75-10,0).

74-A (o) col-15a (▲) col-16a (□)

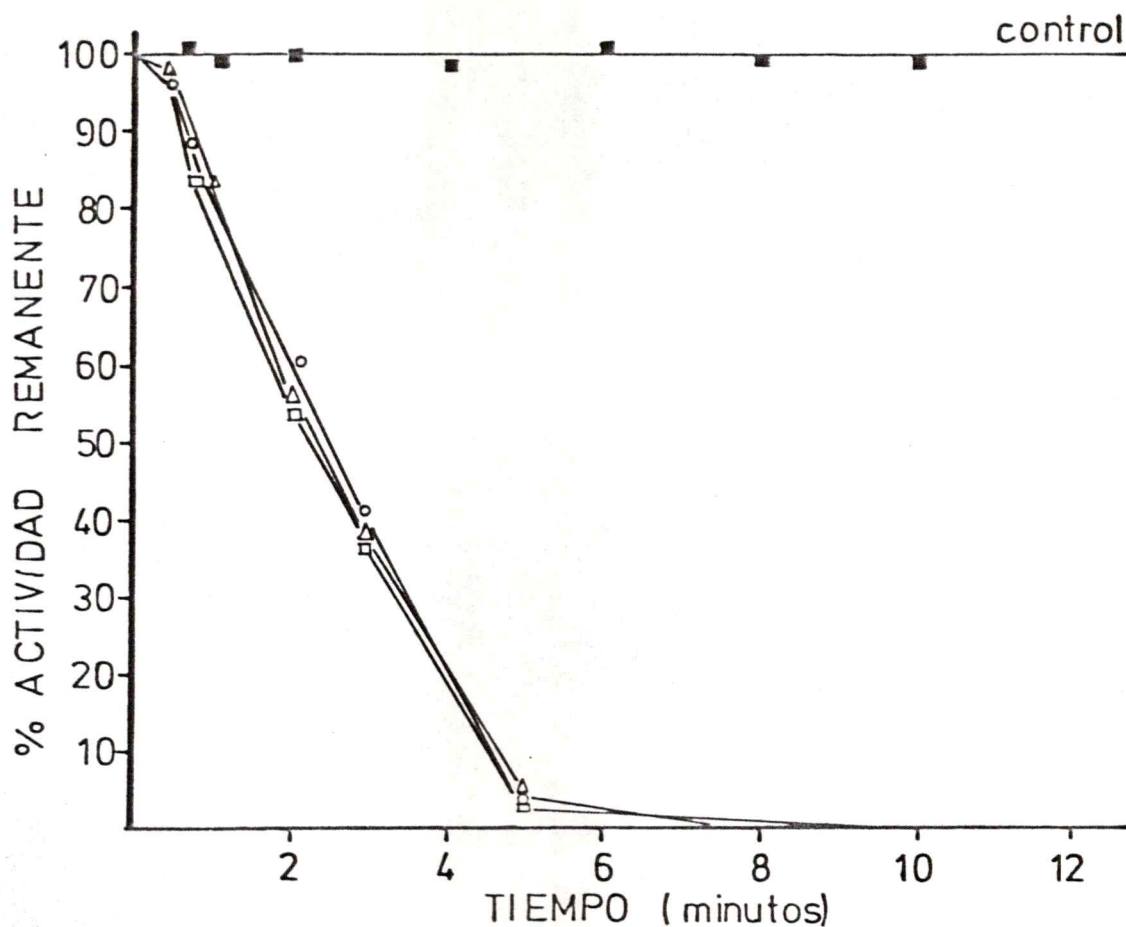


Figura 10 Inactivación por calor de Ara-DH parcialmente purificada (etapa DEAE-celulosa) de *Neurospora crassa*. Alícuotas de la preparación enzimática se calentaron a 50°C durante los tiempos indicados, se enfriaron inmediatamente en hielo y se determinó la actividad Ara-DH según se describió en Métodos (F). Experimentos realizados en duplicado, se graficó el promedio de tres preparaciones diferentes.

74-A (o)    col-15a (Δ)    col-16a (□)

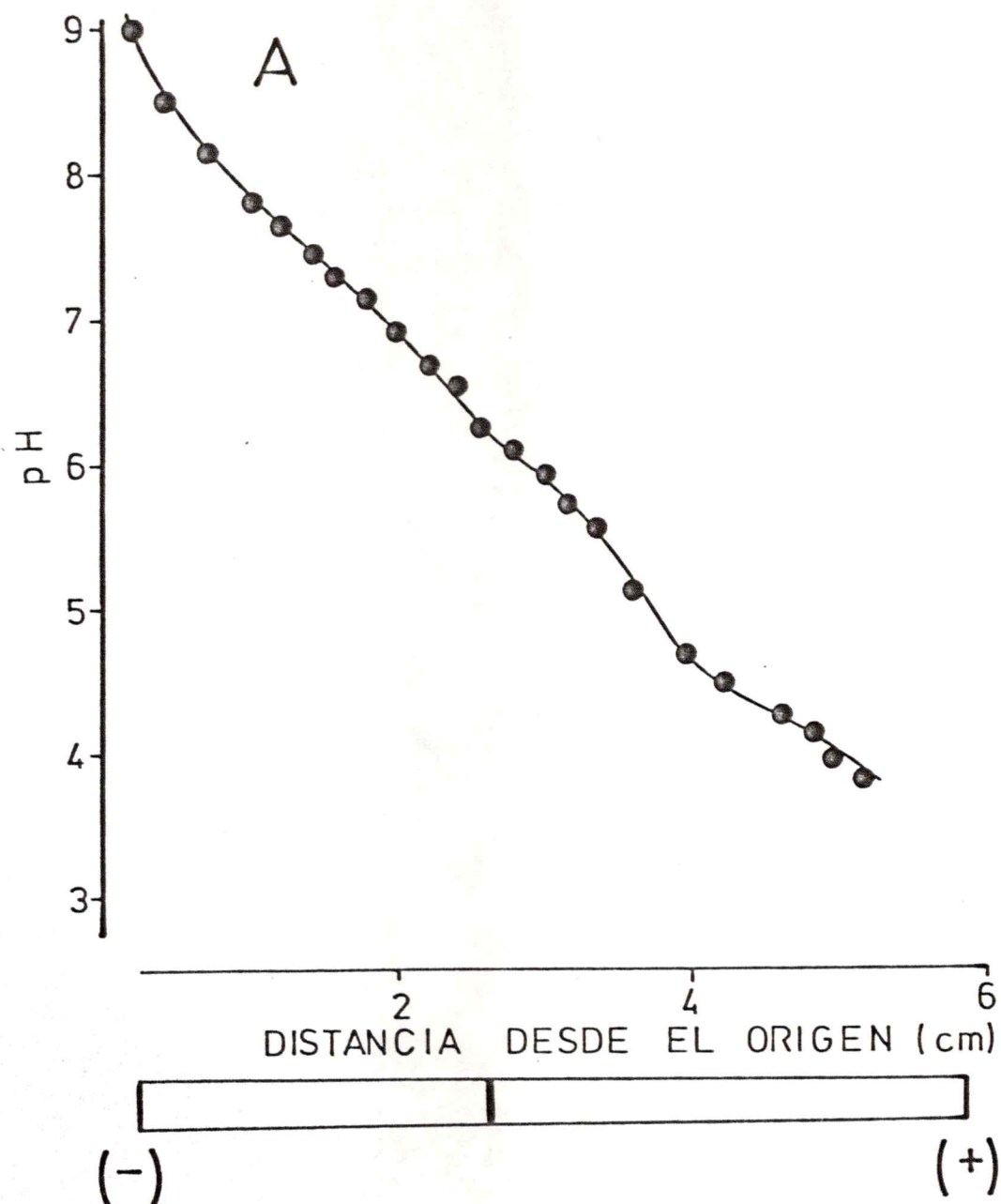


Figura 11-A Electroenfoque de la Ara-DH de Neurospora en geles de poliacrilamida.

La electrofocalización de la Ara-DH (50 ug) se realizó según se describió en Métodos (M). En la figura se muestra el gradiente de pH y debajo un esquema del gel después de electroenfoque.

A : 74-A

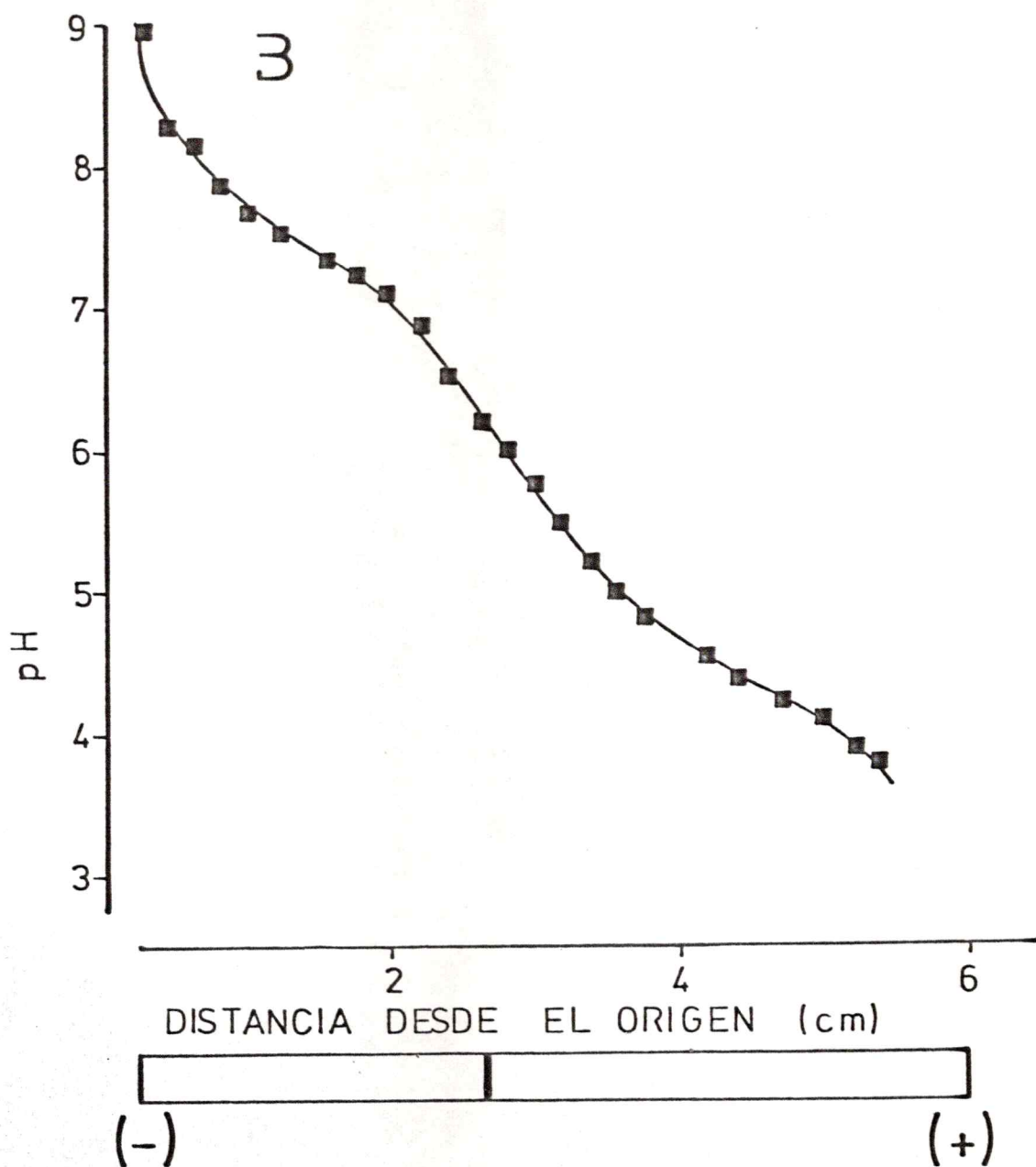


Figura 11-B Electroenfoque de la Ara-DH de *Neurospora* en geles de poliacrilamida. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las indicadas en la Figura 11-A.

B : col-15a

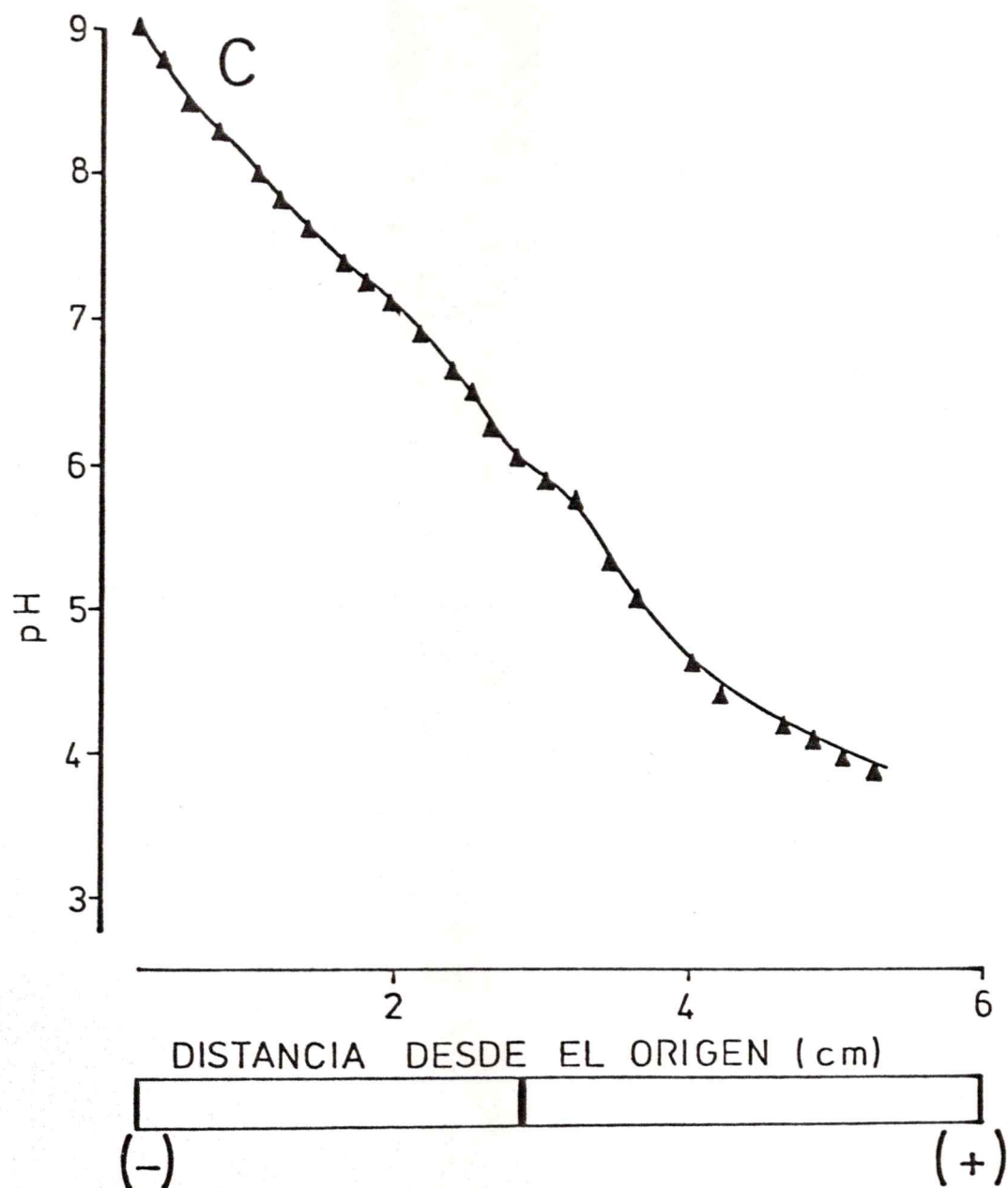


Figura 11-C Electroenfoque de la Ara-DH de *Neurospora* en geles de poliacrilamida. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las indicadas en Figura 11-A.

C : col-16a

### G. Peso molecular y estructura de subunidades

El peso molecular de la enzima nativa fue determinado por el método de Hedrick et al (76). Este método indicó que el peso molecular es de  $60000 \pm 2000$  (no se muestra).

El peso molecular en condiciones desnaturaladas y la estructura de subunidades fueron estudiadas al realizar experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método de Osborn et al (63). Los geles teñidos con azul de Coomassie revelaron una banda de proteínas (Fig. 12) y al graficar los valores de movilidad relativa versus el peso molecular de las subunidades proteicas utilizadas como referencia (65, 76) se calculó un peso molecular de  $52000 \pm 2000$  para la Ara-DH de Neurospora (Fig. 13).

### H. Electroforesis en presencia de urea

La electroforesis en presencia de urea 6,25 M, reveló una sola banda de proteínas para la enzima purificada de las diferentes cepas (Fig. 14), lo cual sugiere que la enzima está constituida por una sola cadena polipeptídica.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las características cinéticas, físicoquímicas y estructurales de la Ara-DH en las cepas 74-A, col-15a y col-16a de Neurospora crassa.

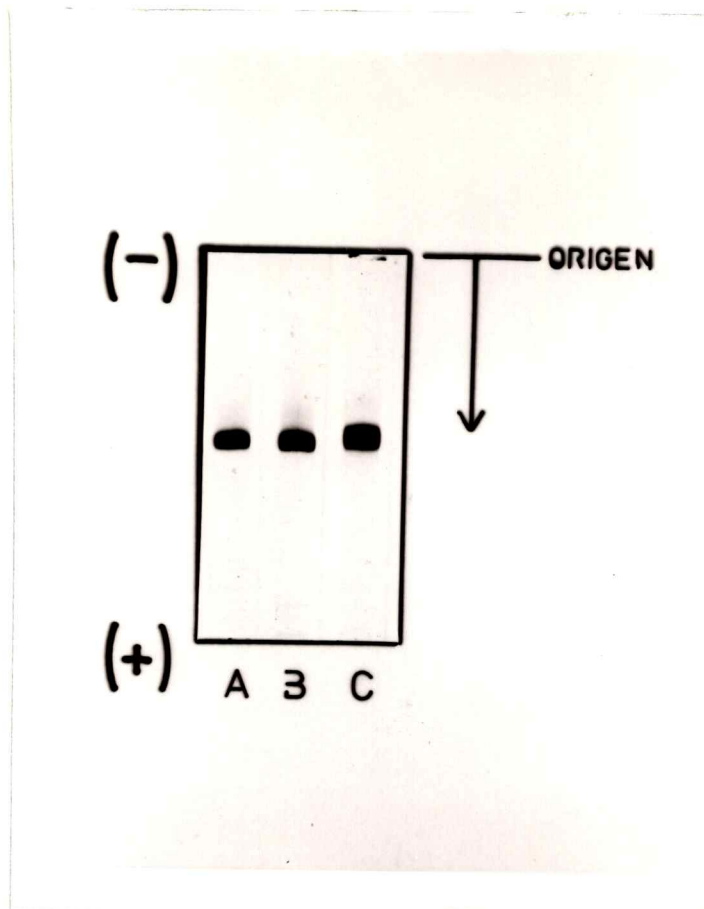


Figura 12 Electroforesis de la Ara-DH de Neurospora crassa en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Electroforesis de la Ara-DH (100 ug) en geles con acrilamida al 7% y SDS 0,44%, según se describió en Métodos (N).

A : 74-A    B : col-15a    C : col-16a

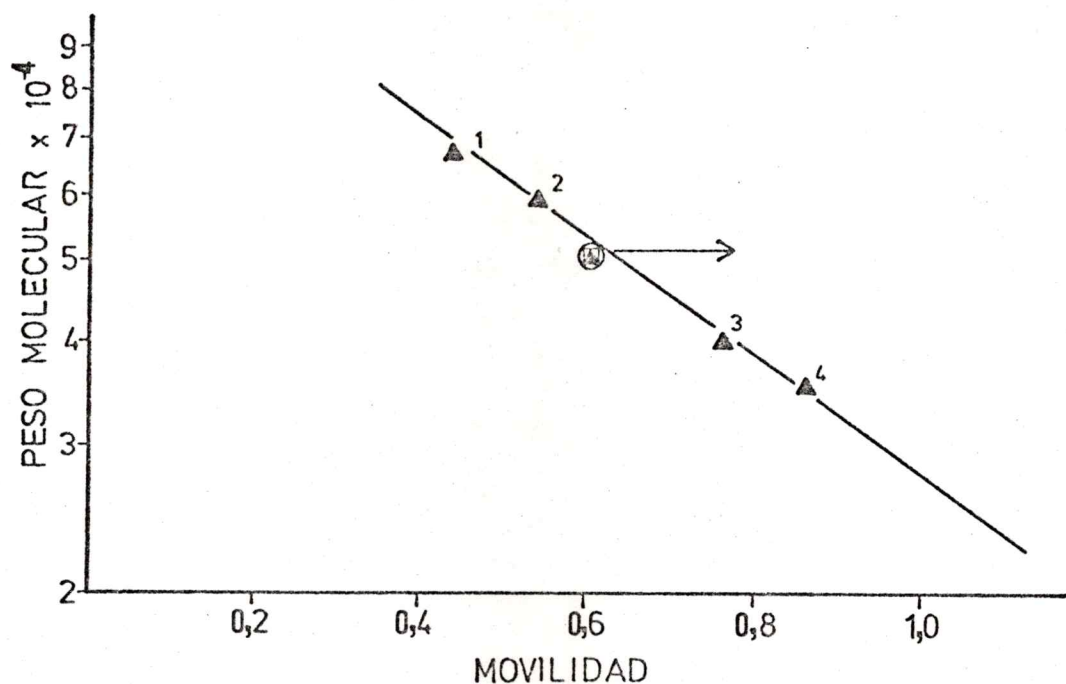


Figura 13 Determinación del peso molecular de la Ara-DH de Neuros pora mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. La Ara-DH pura y las proteínas de referencia fueron sometidas a electroforesis a pH 7,1 según se describió en Métodos (N). El gráfico semilogarítmico muestra el peso molecular de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de referencia en función de su migración relativa al colorante de referencia (azul de bromofenol). La flecha indica la movilidad relativa de la Ara-DH de diferente origen.

Las proteínas de referencia fueron: 1) monómero de la seroalbúmina de bovino (68000); 2) catalasa (60000); 3) aldolasa (40000); 4) láctico deshidrogenasa (36000).



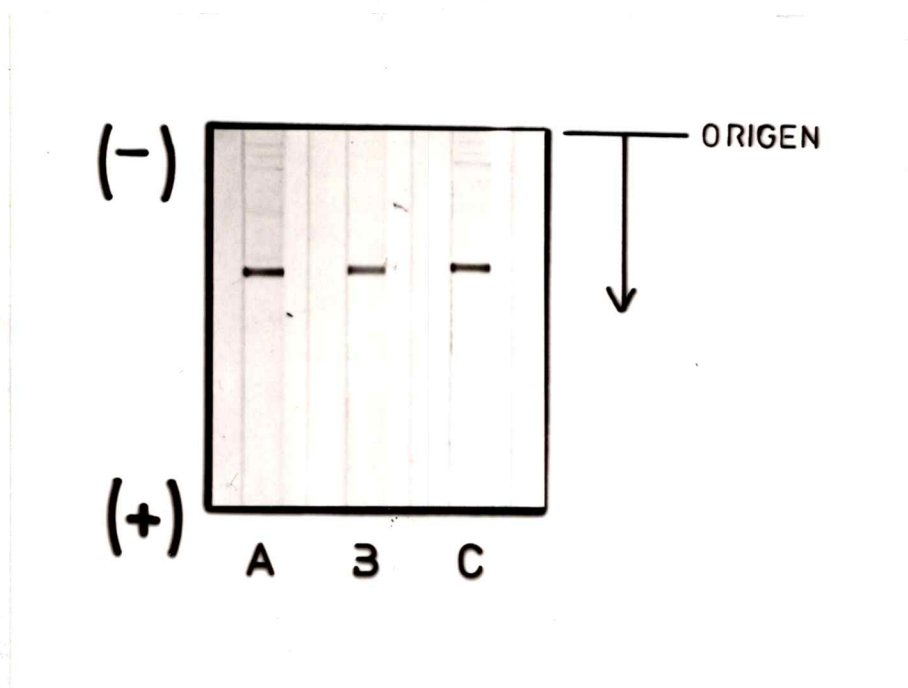


Figura 14 Electroforesis de la Ara-DH de *N. crassa* en presencia de urea. Electroforesis de la Ara-DH (40 ug) en geles con acrilamida al 10% y urea 6,25 M, según se describió en Métodos (0).

A : 74-A    B : col-15a    C : col-16a

Parámetro	<u>74-A</u>	<u>col-15a</u>	<u>col-16a</u>
Constantes de Michaelis		mM	
D-arabinosa	0,67	0,69	0,68
NAD-	0,30	0,30	0,31
pH óptimo	9,0	9,0	9,0
t <sub>1/2</sub> a 50°C (min)	2,25	2,4	2,3
Especificidad de sustrato		<u>V relativa</u>	
D-arabinosa	1,0	1,0	1,0
L-fucosa	0,45	0,44	0,45
D-ribosa	0,06	0,10	0,10
L-arabinosa	0,03	0,04	0,05
D-glucosa	0,05	0,02	0,02
D-xilosa	0,02	0,02	0,02
Movilidad cromatográfica (mM KCl)	130-140	130-140	130-140
Punto isoeléctrico	6,22	6,25	6,21
Peso molecular			
desnaturado	52000 ± 2000	52000 ± 2000	52000 ± 2000
nativo	60000 ± 3000	60000 ± 3000	60000 ± 3000
Estructura subunidades			
SDS	1	1	1
urea	1	1	1

Tabla 3 Resumen de las características cinéticas, físicoquímicas y estructurales de la Ara-DH de Neurospora crassa.

Las preparaciones usadas fueron fracciones activas de cromatografía en DEAE-celulosa. Las constante de Michaelis se calcularon a partir de los gráficos de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. Los resultados sobre especificidad de sustrato se expresa como velocidad relativa V azúcar / V arabinosa con concentraciones de sustratos de 100 mM. El peso molecular (desnaturado), el punto isoeléctrico y estructura de subunidades fueron estudiados con preparaciones enzimáticas puras.

### III. Análisis inmunoquímico

Los estudios cinéticos y físicoquímicos sugieren que la Ara-DH es cualitativamente similar en las tres cepas utilizadas en esta investigación. Para determinar si existen diferencias en los niveles de proteína-enzima en los respectivos extractos crudos se realizó la cuantificación utilizando métodos inmunoquímicos, específicamente la técnica de inmunodifusión radial simple.

Para ello, se obtuvo suero antideshidrogenasa de D-arabinosa, usando como antígeno la preparación enzimática pura proveniente de la cepa 74-A. El suero anti-Ara-DH de Neurospora, precipitó a la enzima de las tres cepas estudiadas en experimentos de doble difusión en agar y mostró un anillo de precipitación continuo como se observa en la Fig. 15. Esta reacción revela identidad inmunológica y sugiere similitud estructural de la enzima de las cepas en estudio.

El punto de equivalencia determinado en condiciones de antisuero constante (Fig. 16) y de concentración de antígeno constante (Fig. 17) es de 45 mU/mg, para las preparaciones enzimáticas de las tres cepas. Estos resultados indican identidad antigénica y enzimática.

Para la cuantificación de los niveles de Ara-DH, se obtuvo una curva de calibración al graficar el cuadrado del diámetro del anillo de precipitación de la actividad enzimática versus la concentración de enzima expresada en mg/ml (Fig. 18). A partir de la curva de calibración, se determinó una concentración de enzima en los respectivos extractos crudos de 0,35 ug/mg de peso seco para la cepa 74-A; de 0,74 ug/mg de peso seco para la cepa col-15a y de 0,77 ug/mg de peso seco para la cepa col-16a (Tabla 4). Estos resultados demuestran que las mutantes morfológicas

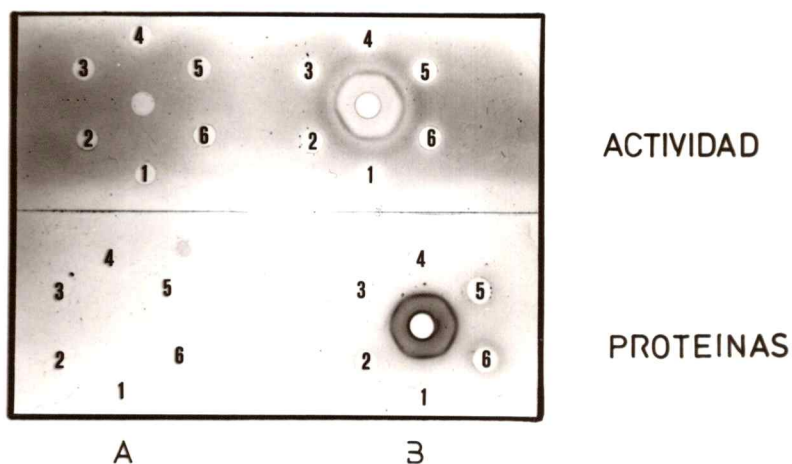


Figura 15 Reacción de precipitación entre suero antideshidrogenasa de D-arabinosa de *N. crassa* (cepa 74-A) y Ara-DH de cepas 74-A, col-15a y col-16a de *Neurospora*. La reacción inmunológica se realizó como se describió en Métodos utilizando 10 ul de suero control (A) y 10 ul de antisue-ro (B) colocados en los orificios centrales y en los orificios laterales se colocaron 10 ul de preparación enzimática de cepas 74-A (1, 2), col-15a (3, 4) y col-16a (5, 6). Terminado el período de incubación se tiñó para proteínas con Amido Black (0,25% p/v) y para actividad enzimática con la mezcla de reacción indicada en Métodos (E). En seguida, se fijaron las placas en ácido acético al 7% y se secaron a temperatura ambiente.

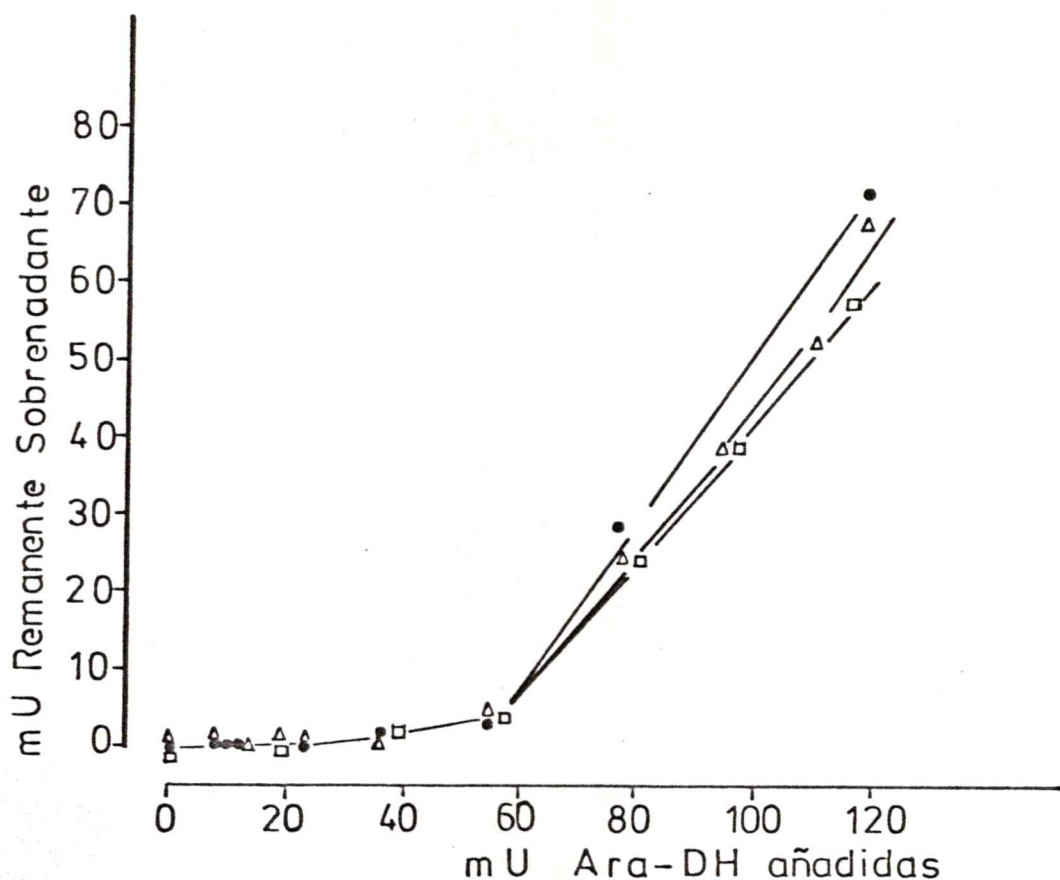


Figura 16 Inhibición de la actividad Ara-DH de *N. crassa* por suero antideshidrogenasa de D-arabinosa de *N. crassa* (74-A). La reacción inmunológica se realizó como se describió en Métodos utilizando de 2-120 mU de enzima (100 ul) de las cepas 74-A (●), col-15a (Δ) y col-16a (□) y cantidad constante de antisuero (100 ul). Después del período de incubación se midió la actividad Ara-DH según se indicó en Métodos (F).

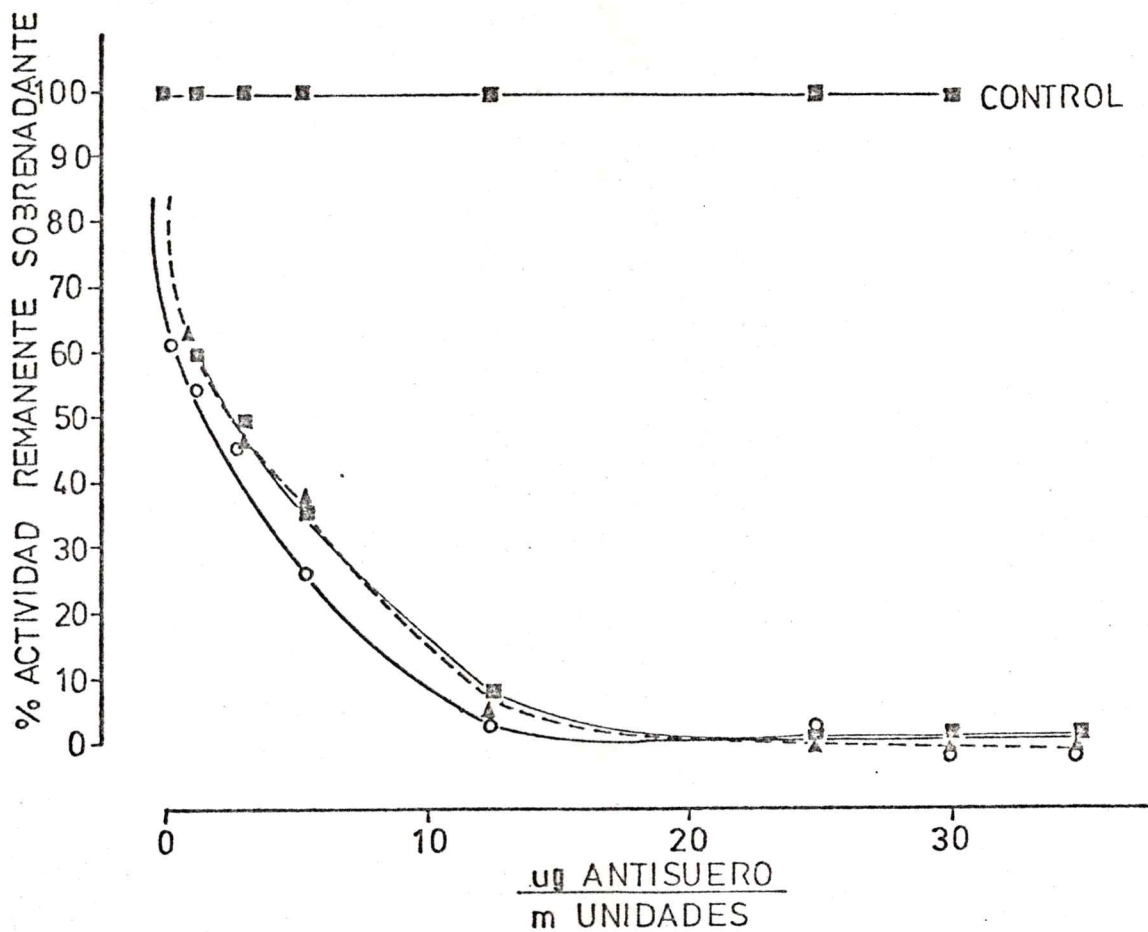


Figura 17 Inhibición de la actividad Ara-DH de *N. crassa* por suero antitideshidrogenasa de D-arabinosa de cepa 74-A de *N. crassa*. La reacción inmunológica se realizó como se describió en Métodos utilizando 10 mU de enzima de las cepas 74-A (○), col-15a (▲) y col-16a (■) y cantidades variables de antisuero (0,0156-2,0 mg) en un volumen total de 200 ul. Después de incubación se midió la actividad Ara-DH remanente según se indicó en Métodos (F).

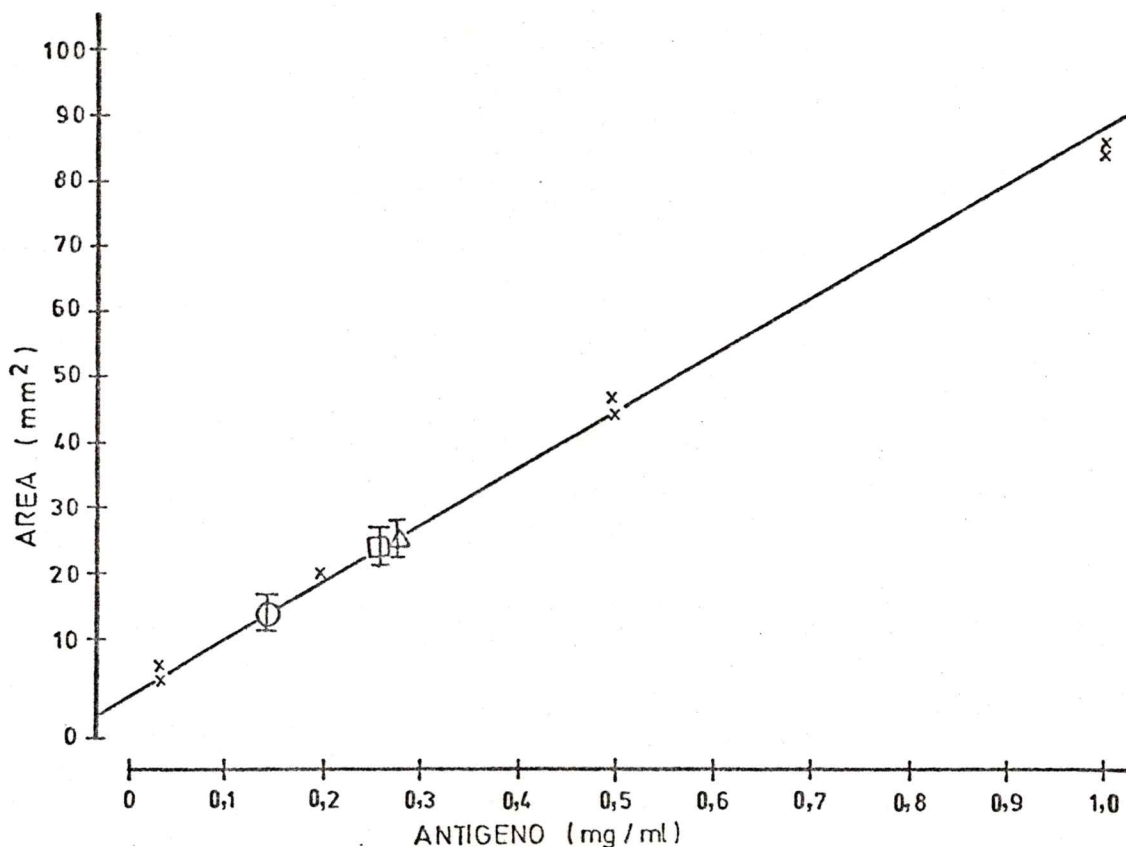


Figura 18 Curva de calibración para determinar la concentración de Ara-DH por el método de inmunodifusión radial simple. La reacción inmunológica se realizó según se describió en Métodos utilizando una dilución de antisuero de 1/12 y 10  $\mu$ l de enzima (1 mg/ml) en diluciones de 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. Después de incubación se reveló la actividad Ara-DH con la mezcla de reacción indicada en Métodos (E) y se fijó en ácido acético al 7% y se secó a temperatura ambiente. Se muestra la cuantificación de la concentración de enzima en extractos crudos de cepas 74-A (o), col-15a ( $\Delta$ ) y col-16a ( $\square$ ). Se graficó la media  $\pm$  la desviación standard de 10 valores.

<u>Cepa</u>	<u>Area (mm<sup>2</sup>)</u>	<u>Concentración</u>	
		<u>mg/ml</u>	<u>ug/mg peso seco</u>
74-A	15,21 ± 2,94	0,14	0,35
col-15a	27,56 ± 3,69	0,26	0,74
col-16a	28,20 ± 4,06	0,27	0,77

Tabla 4 Concentración de enzima en extractos crudos de las cepas 74-A, col-15a y col-16a de Neurospora crassa.



col-15a y col-16a tienen el doble de proteína-enzima que la cepa silvestre.

#### IV. Caracterización genética

##### A. Análisis de segregación

El análisis electroforético de la Ara-DH en micelios o riginados por la germinación de las ocho ascosporas aisladas en orden de ascos provenientes de cruzamientos de la cepa 74-A con las mutantes col-15a ó col-16a mostró la segregación de las variantes del carácter enzimático en proporción 1:1 (Figs. 19-1, 20-1, 21-1). En las Figuras 19-1 y 20-1, los geles numerados 1, 2, 3 y 4 corresponden a la detección de la Ara-DH en los micelios originados de las esporas 1, 2, 3 y 4 del asco, de morfología tipo silvestre (Figs. 19-2 y 20-2) y muestran el nivel enzimático tipo silvestre. Los geles 5, 6, 7 y 8, corresponden a la detección de la actividad enzimática en los micelios originados de las esporas 5, 6, 7 y 8 del asco, de morfología colonial (Figs. 19-2 y 20-2) y muestran el fenotipo enzimático colonial.

El cruzamiento de cepa silvestre x cepa mutante permitió detectar clases recombinantes entre variantes del fenotipo enzimático y variantes del fenotipo morfológico. La frecuencia de recombinantes es 10% (Tabla 5). En la Figura 21-1, los geles 1, 2, 5 y 6 muestran el nivel de enzi - mas de la cepa silvestre y los geles 3, 4, 7 y 8 el nivel enzimático tipo colonial. Respecto a las características morfológicas, los micelios 1, 2, 3 y 4 son tipo silvestre



Figura 19-1 Actividad Ara-DH en la progenie del cruzamiento 74-A x col-16a. Los extractos crudos de los micelios originados de la germinación de cada una de las esporas de un asco fueron procesados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%. Los geles fueron cargados con 400 ug de proteínas totales y revelados para actividad Ara-DH según se describe en Métodos (E). Debajo de la fotografía de los geles se presenta el perfil densitométrico obtenido por medición de la absorbancia a 600 nm.

A : 74-A    B : col-16a    1-8 : progenie

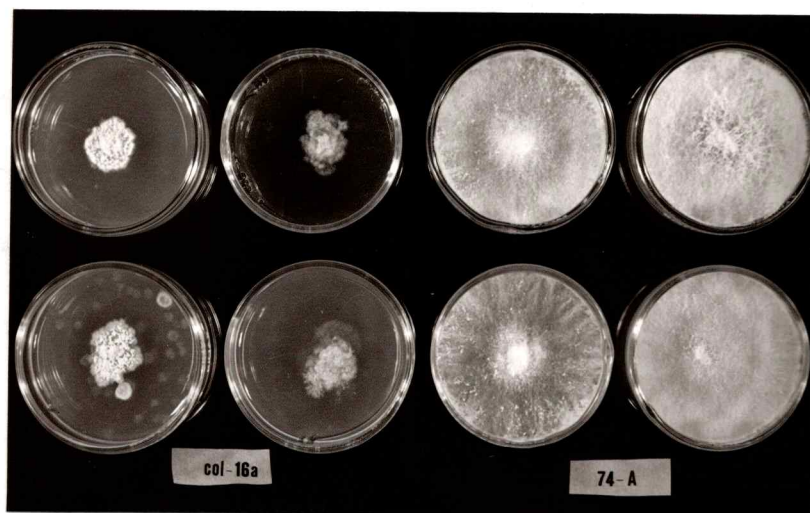


Figura 19-2 Morfología de la progenie del cruzamiento 74-A x col-16a. Los micelios fueron cultivados a 25°C durante 48 horas en medio mínimo N-Vogel.

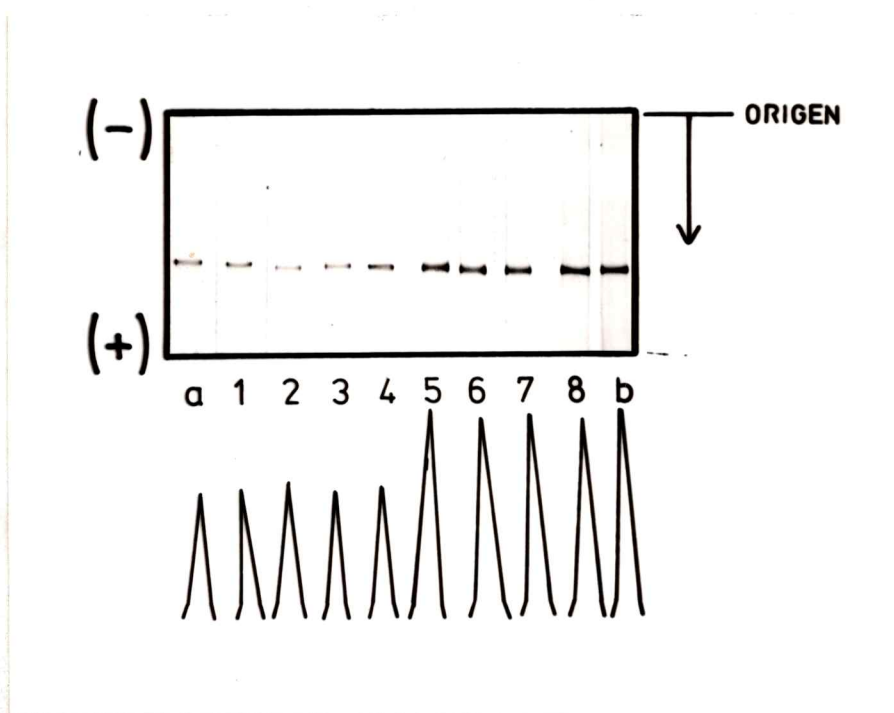


Figura 20-1 Actividad Ara-DH en la progenie del cruzamiento 74-A x col-15a. Los extractos crudos de los micelios originados de la germinación de cada una de las esporas de un asco fueron procesados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%. Los geles fueron sembrados con 400 ug de proteínas totales y revelados para actividad Ara-DH según se describió en Métodos (E). Se muestra el perfil densitométrico de cada gel obtenido por medición de la absorbancia a 600 nm.

A : 74-A    B : col-15a    1-8 : progenie

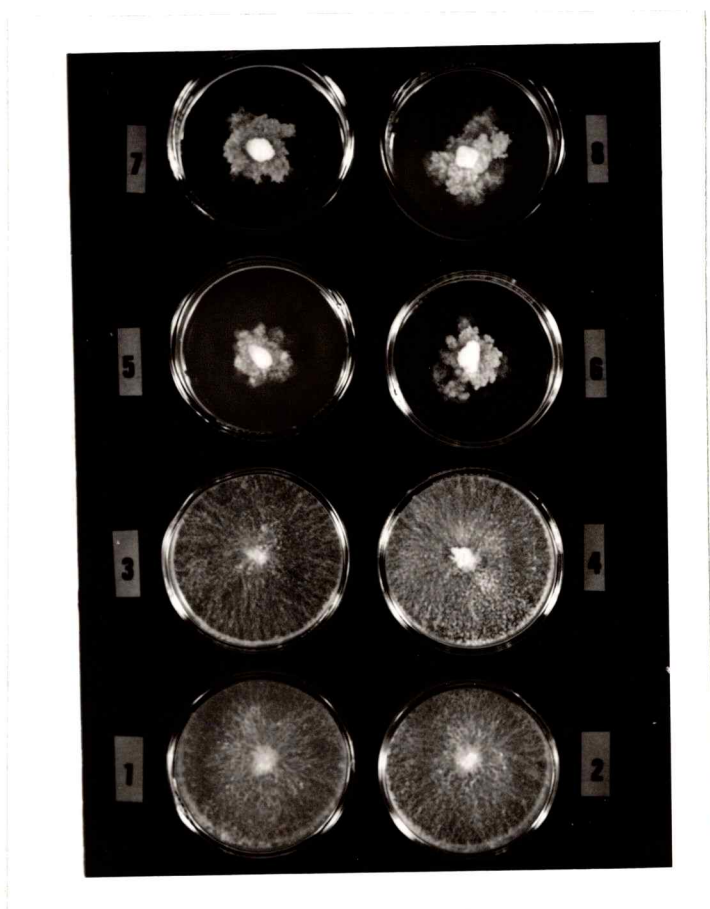


Figura 20-2 Morfología de la proge  
nie del cruzamiento 74-A x col-15a.  
Los micelios fueron cultivados a  
25°C durante 48 horas en medio míni  
mo N-Vogel adicionado de inositol  
(5 mg/ml).

---

Análisis al azar

<u>Morfología</u>	<u>Fenotipo enzimático</u>	<u>Número</u>
silvestre	silvestre	40
silvestre	colonial	12
colonial	silvestre	12
colonial	colonial	48

Análisis de tetradas

<u>Número de ascos analizados</u>	<u>Número de ascos recombinantes</u>
100 ( <u>74-A</u> x <u>col-16a</u> )	6
50 ( <u>74-A</u> x <u>col-15a</u> )	1

---

Tabla 5 Recombinantes entre fenotipo enzimático y morfológico de cruzamientos cepa silvestre x cepa colonial. El análisis al azar se realizó con la progenie del cruzamiento col-16a x 74-A.

y los micelios 5, 6, 7 y 8 son de típico crecimiento colonial (Fig. 21-2).

El análisis electroforético de la progenie de un cruzamiento entre col-7415-125-1A x col-16a (col-15A x col-16a) (Fig. 22-1) reveló que tanto los micelios dobles mutantes morfológicos (geles 3 y 4) como los micelios de morfología tipo silvestre (geles 5 y 6) poseen niveles de enzima similar a los padres (geles 1, 2, 7 y 8). La morfología de los micelios de la progenie de este tipo de cruzamiento se muestra en la Fig. 22-2.

### B. Reversiones

Experimentos de mutagénesis en conidios de cepa col-16a permitieron obtener diferentes revertantes morfológicos a los que se les analizó el nivel de Ara-DH.

Los revertantes morfológicos denominados r-1 y r-2 presentaron el nivel de enzima característico de la cepa silvestre y los revertantes r-3, r-4 y r-5, mostraron el nivel enzimático de la cepa colonial mutagenizada, es decir, en este último caso la reversión afecta sólo a la característica morfológica (Figs. 23-1; 23-2).

### C. Heterocariosis

Los heterocariones (h-1, h-2, h-3) formados por las cepas coloniales col-15a + col-16a, fueron caracterizados respecto a la actividad Ara-DH y mostraron un nivel de enzima similar al de los micelios participantes (Fig. 24-1), aunque exhiben una complementación en las características morfológicas (Fig. 24-2).

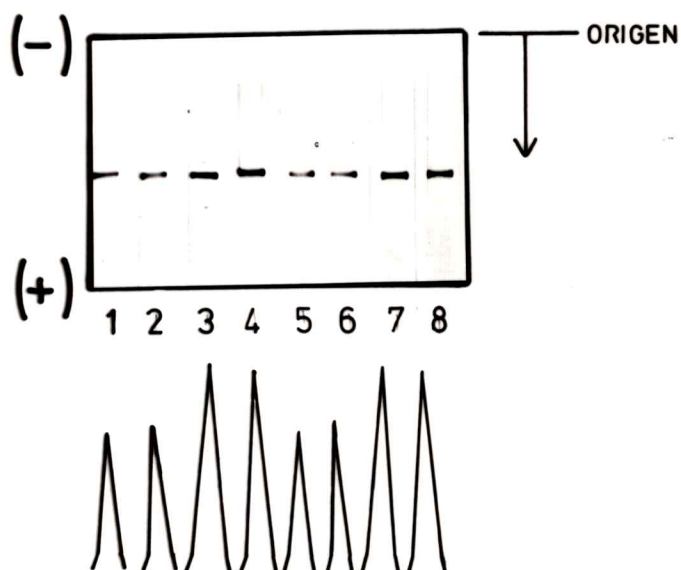


Figura 21-1 Actividad Ara-DH en la progenie del cruzamiento 74-A x col-16a. Electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) de extractos crudos de los micelios originados de la germinación de las ocho esporas de un asco. Los geles fueron cargados con 400 ug de proteínas totales y revelados para actividad Ara-DH según la técnica descrita en Métodos (E). Debajo de la fotografía de los geles se presenta el perfil densitométrico obtenido por medición de la absorbancia a 600 nm.

1-8 : progenie



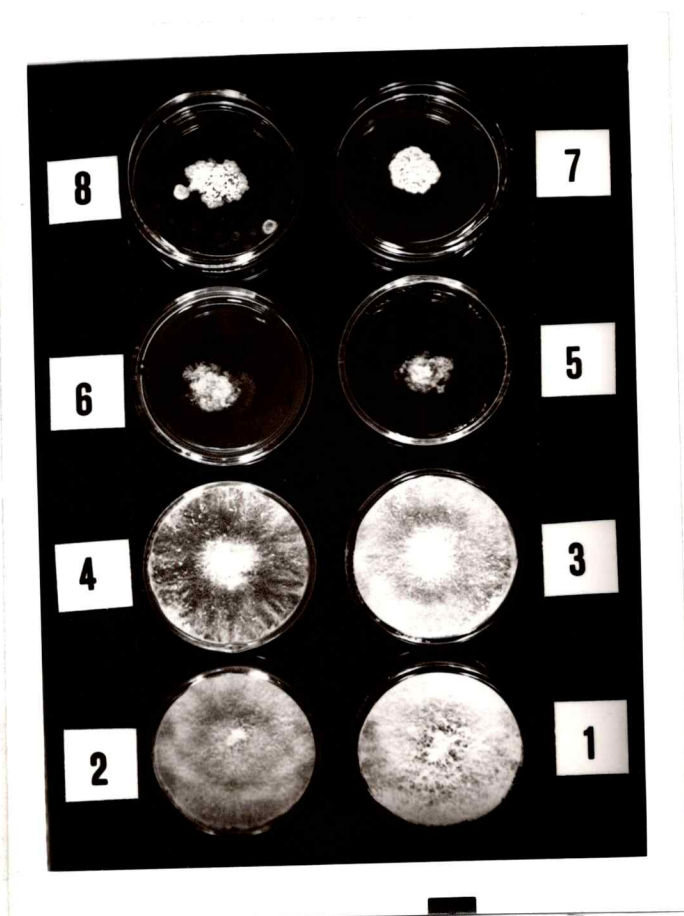


Figura 21-2 Morfología de la progenie del cruzamiento 74-A x col-16a. Los micelios fueron cultivados a 25°C durante 48 horas en medio mínimo N-Novel.

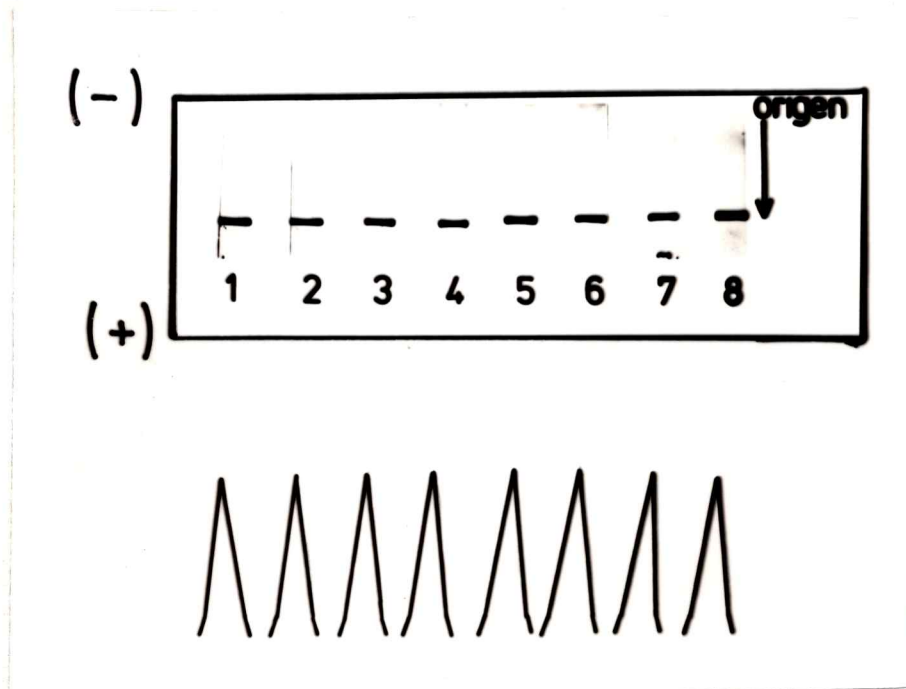


Figura 22-1 Actividad Ara-DH en la progenie del cruzamiento 7415-125-1A x col-16a. Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos crudos de los micelios originados de la germinación de las ocho esporas de un asco. Los geles fueron cargados con 500 ug de proteínas totales y revelados para actividad Ara-DH según la técnica descrita en Métodos (E). Se presenta el trazado densitométrico obtenido por medición de absorbancia a 600 nm.

1-8 : progenie

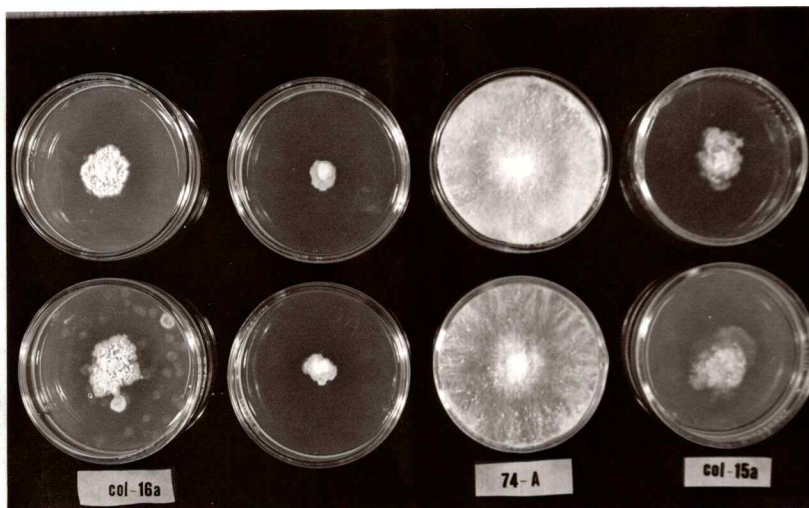


Figura 22-2 Morfología de la progenie del cruzamiento col-7415-125-1A x col-16a. Los micelios fueron incubados a 25°C durante 48 horas en medio mínimo N-Vogel adicionado de inositol (5 mg/ml).

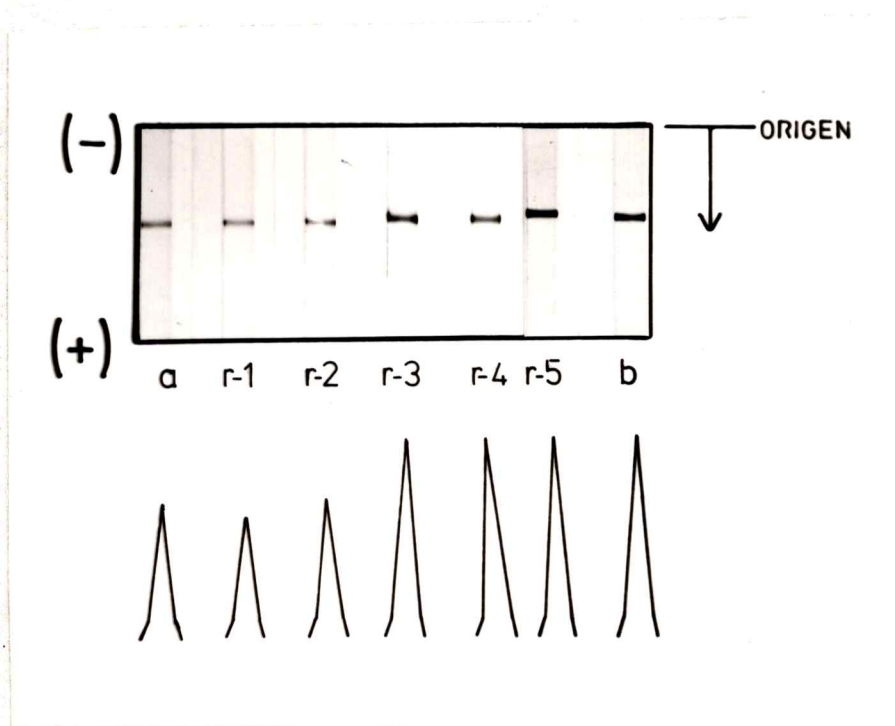


Figura 23-1 Actividad Ara-DH en micelios revertantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos crudos de micelios revertantes morfológicos. Cada columna fue cargada con 400 ug de proteínas totales y terminada la electroforesis se reveló la actividad Ara-DH según la técnica descrita en Métodos (E). Se muestra el trazado densitométrico obtenido por medición de la absorbancia a 600 nm.

A : 74-A    B : col-16a    r: 1-5: revertantes

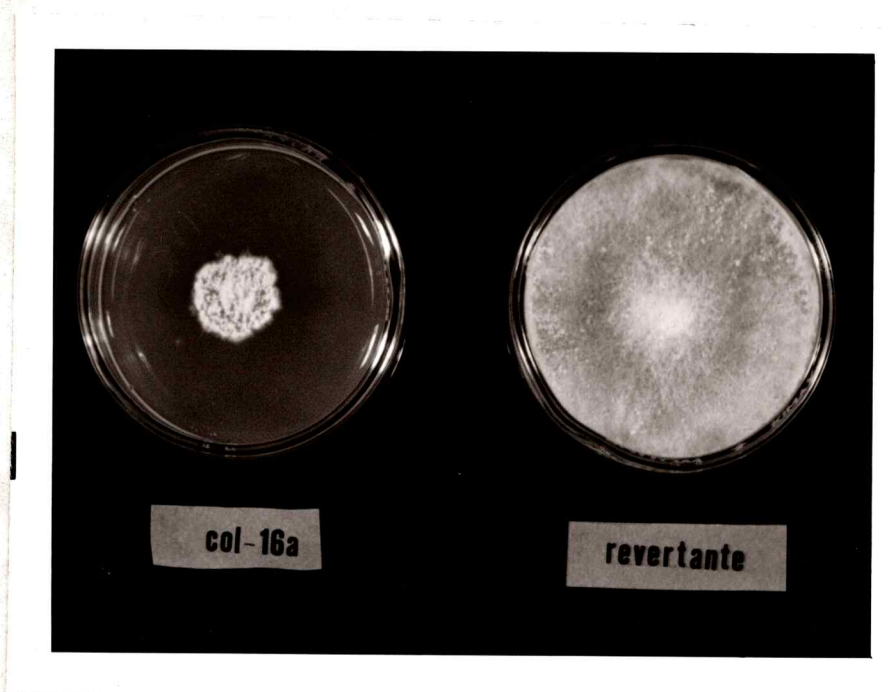


Figura 23-2 Morfología de la cepa col-16a y de uno de los micelios revertantes. Estos fueron crecidos a 25°C durante 48 horas en medio mínimo N-Vogel.

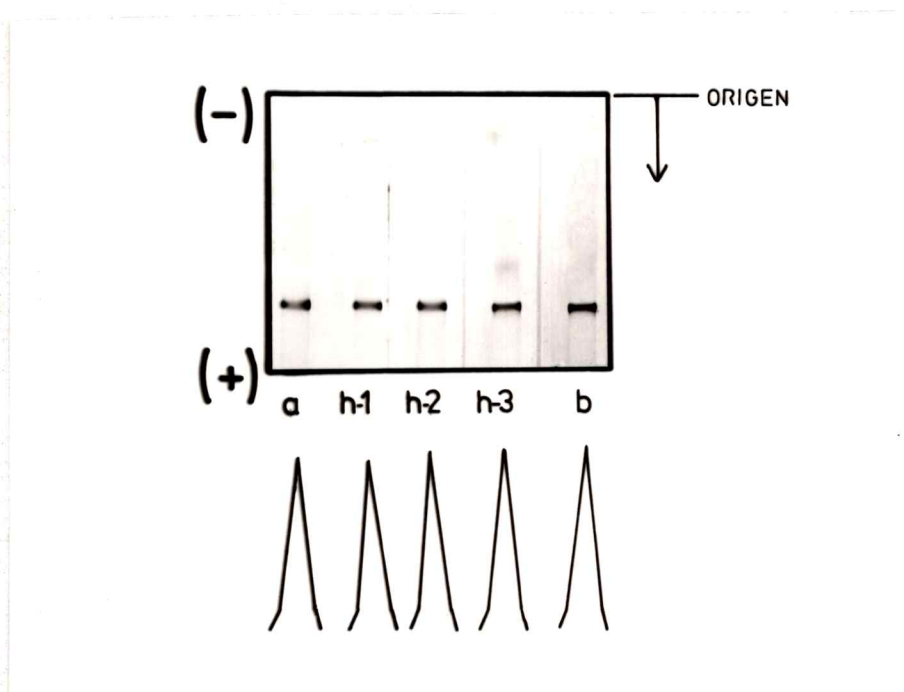


Figura 24-1 Actividad Ara-DH en heterocariones col-15a + col-16A. Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos crudos de los micelios heterocarióticos. En cada gel se colocó 400 ug de proteínas totales y después de electroforesis se reveló la actividad Ara-DH según se describe en Métodos (E). En la parte inferior se muestra el perfil densitométrico obtenido por medición de la absorbancia a 600 nm.

A : col-15a B : col-16a, 1, 2, 3: heterocariones (h-1, h-2, h-3)

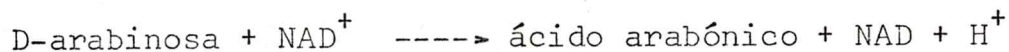


Figura 24-2 Morfología de las cepas col-15a y col-16a y de uno de los heterocariones col-15a + col-16a. Los micelios fueron crecidos a 25°C durante 48 horas en medio mínimo N-Vogel adicionado de inositol (5 mg/ml, col-15a).

## DISCUSION

### I. Características bioquímicas de la Ara-DH de las cepas 74-A, col-15a y col-16a de Neurospora crassa

La D-arabinosa deshidrogenasa de Neurospora crassa, cataliza la oxidación de D-arabinosa en presencia de  $\text{NAD}^+$ , según la reacción:



La presencia de esta enzima en Neurospora permite suponer que la degradación de arabinosa podría ocurrir por una vía metabólica similar a la descrita en Pseudomonas saccharophila (35), pero no se han realizado los estudios pertinentes.

La electroforesis analítica en geles de poliacrilamida, tanto en disco como en placa, de extractos crudos de las cepas de Neurospora crassa 74-A, col-15a y col-16a, demuestran la existencia de claras diferencias en los niveles de actividad de la enzima D-arabinosa deshidrogenasa.

Las diferencias detectadas podrían deberse a diferentes factores. Una posibilidad es que se deba a fenómenos de activación o inhibición de la actividad enzimática. Sin embargo, la medición de los niveles de Ara-DH en mezclas de extractos crudos provenientes de cepas de alta y baja actividad enzimática, sólo mostró la suma de las actividades individuales de los extractos. Por otra parte, puede pensarse que la enzima tiene diferente localización



intracelular en las diferentes cepas y que el procedimiento de preparación de los extractos resulta en la extracción diferencial de la proteína. Estudios de fraccionamiento subcelular realizados con las cepas 74-A, col-15a y col-16a muestran que en los tres casos la enzima es soluble, recuperándose toda la actividad en el líquido sobrenadante de 106000 g (Fig. 25). Más aún, el tratamiento de los extractos crudos de las tres cepas con Tritón X - 100 no produce aumento de los niveles de actividad enzimática.

La posible alternativa que la enzima fuese excretada diferencialmente al medio en las diferentes cepas aparece descartado mediante el análisis de la enzima en el medio de cultivo, no detectándose actividad extracelular en ninguno de los casos.

La posibilidad que las cepas mutantes contengan Ara-DH con características diferentes no concuerda con el hecho que las preparaciones obtenidas a partir de las tres cepas estudiadas exhiban similares propiedades catalíticas y físicoquímicas. En efecto, la Tabla resumen (Tabla 3) demuestra que los parámetros analizados:  $K_m$  arabinosa;  $K_m$  NAD<sup>+</sup> pH óptimo; especificidad de sustrato  $t_{1/2}$  de pérdida de actividad, punto isoeléctrico; estructura de subunidades, peso molecular en condiciones desnaturadas y en forma nativa y movilidad cromatográfica, son similares.

Estos resultados sugieren una probable similitud estructural de la enzima en las cepas 74-A, col-15a y col-16a. Además, las preparaciones enzimáticas puras obtenidas de cada una de las cepas tienen igual actividad específica (expresada en U/mg), por lo tanto, la actividad catalítica de la Ara-DH de diferente origen es la misma.

Al efectuar la electroforesis en geles de poliacrilamida de una preparación pura de la Ara-DH de las tres cepas, se observó la presencia de una sola especie molecular. El

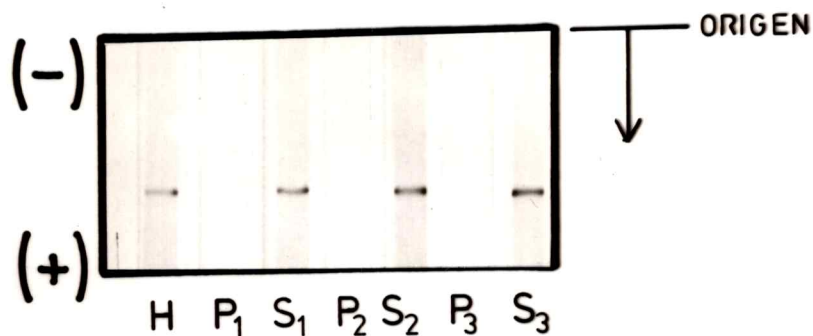


Figura 25 Actividad Ara-DH en fracciones subcelulares de *N. crassa*. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones obtenidas por la técnica indicada en Métodos (G). Los geles fueron cargados con 100  $\mu$ g de proteínas totales y revelados para actividad Ara-DH según se describió en Métodos (E). Los geles fueron fijados en ácido acético al 7%.

H : homogeneizado

P<sub>1</sub> : precipitado 1; S<sub>1</sub> sobrenadante 1;

P<sub>2</sub> : precipitado 2; S<sub>2</sub> sobrenadante 2;

P<sub>3</sub> : precipitado 3; S<sub>3</sub> sobrenadante 3

experimento de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS descarta la posibilidad de que la Ara-DH tenga subunidades de diferentes pesos moleculares y la posibilidad de que la enzima esté compuesta por subunidades diferentes, aunque de igual peso molecular queda descartada por el experimento en presencia de urea, donde el efecto de la carga neta de la molécula es importante. Estos resultados indican que la Ara-DH es probablemente monomérica. Una buena prueba experimental para demostrar que la enzima tiene una estructura monomérica, la proporcionará la determinación del número de péptidos de un digerido tríptico de la Ara-DH. La determinación de grupos carboxilo y amino terminales, proporcionaría información adicional acerca de la estructura cuaternaria de esta enzima.

## II. Cuantificación y características inmunológicas

Los resultados analizados indican que la D-arabinosa-NAD-deshidrogenasa en las cepas de Neurospora crassa estudiadas presenta características cinéticas, físicoquímicas y estructurales similares. Las diferencias en nivel enzimático evidenciadas en geles de poliacrilamida, en las respectivas densitometrías y en las cromatografías podrían ser causadas por un mayor número de moléculas de enzima normal en las cepas col-15a y col-16a. Los estudios realizados con técnicas inmunoquímicas favorecen esta idea.

Los experimentos de inmunodifusión doble exhiben una línea de precipitación continua en placas teñidas para proteínas o para actividad enzimática, lo que demuestra la similitud o relación inmunológica de la enzima proveniente de las cepas de Neurospora en estudio. Del mismo modo, se

encontró que el antisuero de Ara-DH precipita iguales actividades de las preparaciones enzimáticas de las tres cepas, lo que apoya la idea de identidad antigénica y enzimática de la Ara-DH de las cepas 74-A, col-15a y col-16a. Si la mayor actividad de la enzima en las cepas coloniales proviniese de la cantidad normal de moléculas más activas, una unidad de antisuero debería precipitar más actividad Ara-DH en las cepas col-15a y col-16a que en la cepa silvestre.

Los estudios inmunológicos revelan que no existen diferencias en la enzima de diferente origen, corroborando la falta de diferencias cinéticas, físicoquímicas y estructurales encontradas.

Mediante la técnica de inmunodifusión radial simple, fue posible cuantificar el nivel de enzima en las diferentes cepas. Los resultados obtenidos demuestran que en las cepas coloniales el nivel de Ara-DH, expresado en ug enzima/mg de micelio seco es el doble. Podemos concluir que las cepas mutantes estudiadas contienen más enzima y no enzima más activa.

Respecto a la naturaleza de la mutación que exhiben estas mutantes morfológicas en cuanto a la Ara-DH, existen varias explicaciones posibles:

- a) podría ser una mutación en el promotor, que aumenta la transcripción génica (promotor-up) (84);
- b) podría ser un sistema regulado, con una mutación en el operador de tipo constitutivo;
- c) podría ser el resultado de fusión del gen de la Ara-DH con otro gen constitutivo expresado a una velocidad mayor;
- d) podría reflejar una degradación protéica reducida.

Por el momento, no se dispone de elementos de juicio para probar las diferentes alternativas mencionadas.

### III. Caracterización genética

Los estudios de estructura de subunidades realizados con preparaciones enzimáticas puras de las tres cepas, indican que la Ara-DH es monomérica. Esta situación, desde el punto de vista genético, sugiere que la estructura primaria de la enzima estaría determinada por un solo gen.

El análisis genético mediante la caracterización de tetradas o el aislamiento de ascosporas al azar en cruzamientos entre cepa silvestre y cepas mutantes, muestra claramente una segregación 1:1, sugiriendo una determinación genética de las variables del carácter enzimático por un par de alelos. Al mismo tiempo, al considerar las variables de fenotipos morfológicos y las variables de fenotipos enzimáticos en cruzamientos de cepa silvestre con cepa col-15 ó col-16, es posible obtener recombinantes de estas variables, lo cual sugiere que los genes que afectan la morfología de dichas cepas no son los mismos centros de control que afectan a la enzima. La demostración que la alteración de la Ara-DH obedece a factores genéticos aparece corroborada además por los resultados del experimento de mutagénesis que permitió obtener micelios revertantes a partir de conidios de col-16a. El hecho que ninguno de los revertantes obtenidos demostró poseer actividad Ara-DH termosensible in vitro, sugiere que la alteración presentada por esta enzima no es de tipo estructural, pues sería factible obtener revertantes con Ara-DH alterada parcialmente en su estructura primaria.

El análisis genético mediante heterocariones entre las cepas mutantes permite comprobar la complementación de fenotipos en lo morfológico, pero no muestran una complementación para normalizar la alteración que afecta a la Ara-DH en las mutantes. La falta de complementación en la

característica enzimática estudiada refuerza la idea de que el alelo determinante del fenotipo enzimático es el mismo en las cepas mutantes, ya que la alternativa de no complementación es considerada casi una prueba de alelismo funcional (78). Debe hacerse notar que en nuestros estudios sólo se cumplen dos de los cuatro criterios adoptados por Barrat et al (46), para la definición de alelos. Estos son: 1. los fenotipos deben ser similares; 2. el test heterocarión debe ser negativo.

Los heterocariotes fueron obtenidos con relativa facilidad, pues aparte de la compatibilidad necesaria en las cepas que los forman (47-51), se dispuso de marcadores bioquímicos (inos) en la cepa col-15a, lo que permitió la selección en medio mínimo N-Vogel (52).

#### IV. Probable rol morfogenético de la Ara-DH

Las conclusiones acerca del rol morfogenético de enzimas relacionadas con el metabolismo de hidratos de carbono (31, 34, 77), están basadas en los hechos siguientes:

1. el defecto enzimático y la morfología alterada se transmiten asociados a la progenie de cruzamientos entre el mutante morfológico y la cepa silvestre;
2. una reversión simple en el mutante conduce a la restauración simultánea de las características enzimáticas y morfológicas de la cepa silvestre;
3. un supresor de cualquiera de las mutaciones morfológicas conduce a la restauración de la morfología y de la enzima tipo silvestre;
4. existe correlación entre la severidad del defecto enzimático y el grado de anormalidad morfológica en

heterocariones y dobles mutantes.

Además, las enzimas relacionadas con morfología muestran alteraciones consistentes en variaciones en estabilidad térmica, afinidad por sustrato, comportamiento en electroforesis y electroenfoque. Por ejemplo, las mutantes frost, balloon y col-2, tienen la glucosa 6-P-DH defectiva (25-27), col-3 y col-10 poseen 6-P-gluconato-DH alterada (23, 28, 29).

Dado que la Ara-DH obtenida de las mutantes col-15a y col-16a no presentan diferencias en ninguno de los parámetros cinéticos y físicoquímicos estudiados, es posible pensar que tanto la cepa silvestre como las mutantes tienen una Ara-DH cualitativamente similar. La transmisión de las características morfológicas y enzimáticas de las cepas estudiadas a la progenie de cruzamientos 74-A x col-15a y 74-A x col-16a, permite la obtención de recombinantes entre las características morfológicas y enzimáticas en una frecuencia que sugiere que los centros de control de la Ara-DH son diferentes a los determinantes de las alteraciones morfológicas que se presentan en col-15 y col-16.

El micelio doble mutante (col-15 / col-16) presenta una morfología más restringida que en los mutantes simples, pero el nivel de enzima no experimenta variaciones significativas comparada con el de cada uno de los mutantes que le dan origen.

Los heterocariones formados por las cepas mutantes presentan la morfología característica de la cepa silvestre sin normalización del nivel enzimático.

En cuanto a los micelios revertantes, algunos muestran normalización tanto de la morfología como de la actividad de la enzima similar a la de la cepa silvestre; otros revertantes lo son sólo en cuanto a la morfología (Fig. 23-1). Aquellos revertantes para ambas características podrían

ser revertantes dobles. Aquellos revertantes morfológicos que presentan Ara-DH mutante refuerzan la idea que el control genético de la enzima no está asociado a los centros de control de las características morfológicas.

Por otro lado, experimentos no descritos con L-sorbose, agente paramorfogenético (12, 14, 15, 79), produce en Neurospora tipo silvestre una fenocopia de la mutante morfológica con actividad Ara-DH similar a la exhibida por las cepas col-15a ó col-16a.

Si bien algunos revertantes y las fenocopias muestran la asociación morfología-enzima, no es posible concluir aún el verdadero rol de Ara-DH en la diferenciación morfológica de Neurospora y los cambios que ella exhibe en algunas de las mutantes morfológicas podrían deberse a efectos pleiotrópicos de las lesiones genéticas primarias (16, 30).

## V. Proyecciones futuras

1. El conocimiento de las cepas coloniales col-15a y col-16a contienen el doble de Ara-DH que la cepa silvestre 74-A, facilitará el estudio de los mecanismos de regulación de cantidad de enzima y que pueden afectar a la síntesis y/o la degradación enzimática (80-83).

2. Aparte de Pseudomonas, la Ara-DH no ha sido estudiada en otros organismos inferiores. La Ara-DH aislada de Neurospora presenta diferencias y similitudes con la enzima de Pseudomonas (36, 37), sugiriendo la conveniencia de realizar estudios comparativos en este grupo de organismos tendientes a establecer relaciones evolutivas.



3. Desde el punto de vista metabólico, es factible abordar el rol de Ara-DH en relación a las vías de utilización de D-arabinosa en Neurospora crassa y su importancia como probable vía de alternativa para satisfacer requerimientos nutricionales.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hickman, C.J. 1965  
Fungal Structure and Organization. Chapter II, 21-41  
En: The Fungi: an Advanced Treatise Vol. I The Fungal Cell. Edited by: Ainsworth, G.C., Sussman, A.S.  
Academic Press, New York and London.
2. Fincham, J.R.S., Day, P.R. 1971  
"Fungal Genetics" 3rd Edition. Blacknell, Oxford,  
Philadelphia
3. Burnett, J.H. 1975  
"Mycogenetics" Fungi as organism for genetic study.  
Chapter I, 3-22. 1st Edition. John Wiley and Sons.
4. Zalokar, M. 1959  
Enzyme activity and cell differentiation in Neurospora.  
Amer. J. Bot. 46, 555 - 559
5. Srb, A.M., Nasrallah, J., Basl, M. 1974  
Genetic control of the sexual reproductive apparatus of  
Neurospora. Brookhaven Symp. 25, 40-50
6. Beadle, G.W., Coonradt, V.L. 1944  
Heterocaryosis in Neurospora crassa. Genetics 29, 291-  
308.
7. Zeuthen, D. 1975  
Heterocaryons in the analysis of genes and gen regulation.  
Humangenetik Dtch. 27, 275 - 301
8. Gowridge, BM. 1956  
Heterocaryons between strains of Neurospora crassa with  
different cytoplasms. Genetics 41, 780 - 789
9. Pittenger, T.H., Atwood, K.C. 1956  
Stability of nuclear proportions during growth of Neu -  
rospora heterocaryons. Genetics 41, 227 - 241.

21. Abramsky, T, Tatum, E.L. 1976  
Differential inhibition of branching enzyme in a morphological mutant and in wild type *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta* 421, 106 - 114
22. Brody, S., Tatum, E.L. 1966  
The primary biochemical effect of amorphological mutation in *N. crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 1290 -1296
23. Brody, S., Tatum, E.L. 1967  
Phosphoglucumutase mutants and morphological changes in *N. crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58 923 - 930
24. Brody, S. 1970  
Correlation between reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate levels and morphological changes in *N. crassa*. *J. Bact.* 101, 802 - 807
25. Scott, W.A., Tatum, E.L. 1970  
Glucose-6-phosphate dehydrogenase and *Neurospora* morphology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 515 - 522
26. Scott, W.A, Tatum, E.L. 1971  
Purification and partial characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *N. crassa*. *J. Biol. Chem.* 246, 6347 -6352
27. Scott, W.A. 1971  
Physical properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *N. crassa*. *J. Biol. Chem.* 246, 6353 - 6359
28. Scott, W.A., Abramsky, T. 1973  
*Neurospora* 6-phosphogluconate dehydrogenase. I Purification and characterization of the wild type enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 3535 - 3541
29. Scott, W.A., Abramsky, T. 1973  
*Neurospora* 6-phosphogluconate dehydrogenase. II Properties of two purified mutants enzymes. *J. Biol. Chem.* 248, 3542 - 3545

30. Scott, W.A., Mahoney, E. 1976  
Defects of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Neurospora* and their pleiotropic effects. *Cellular Reg.* 24, 1854
31. Scott, W.A. 1976  
Biochemical genetics of morphogenesis in *Neurospora*. *Ann. Rev. Microbiol.* 30, 85 - 101
32. Fuscaldo, K.E., Lechner, J.F., Bazinet, G. 1971  
Genetic and biochemical studies of the hexose monophosphate shunt in *N. crassa*. I The influence of genetics defects in the pathway on colonial morphology. *Can. J. Microbiol.* 17, 781 - 788
33. Lechner, J.F., Fuscaldo, K.E., Bazinet, G. 1971  
Genetic and biochemical studies of the hexose monophosphate shunt in *N. crassa*. II Characterization of biochemical defects of the morphological mutants col-2 and col-3. *Can. J. Microbiol.* 17, 789 - 793
34. Mishra, N.C. 1977  
Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Adv. Genetics* 19, 341 - 405
35. Palleroni, N.J., Doudoroff, M. 1957  
Metabolism of carbohydrate by *Pseudomonas saccharophila* I Oxidation of D-arabinose. *J. Bact.* 74, 180 - 185
36. Hu, A.S.L., Cline, A.L. 1964  
The regulation of some sugar dehydrogenases in a *Pseudomonad*. *Biochim. Biophys. Acta* 93, 237 - 245
37. Cline, A.L., Hu, A.S.L. 1965  
The isolation of three sugar dehydrogenases from a *Pseudomonad*. *J. Biol. Chem.* 240, 4488 - 4492
38. Cline, A.L., Hu, A.S.L. 1965  
Enzymatic characterization and comparison of three sugar dehydrogenases from a *Pseudomonad*. *J. Biol. Chem.* 240, 4493 - 4502
39. Metzger, R.P., Wick, A.N. 1967  
Partial purification of rat liver D-arabinose dehydrogenase. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 26, 742 - 747

40. Mobley, P.Wm., Metzger, R.P., Wick, A.N. 1970  
NAD-dependent L-fucose dehydrogenase from sheep liver.  
Arch. Biochem. Biophys. 139, 93 - 96
41. Mobley, P.Wm., Metzger, R.P. 1978  
The physical properties of NAD-dependent L-fucose  
dehydrogenase from sheep liver. Arch. Biochem.  
Biophys. 196, 184 - 188
42. Ureta, T., Radojković, J. 1970  
Chromatographic and electrophoretic evidence for several  
sugar dehydrogenases in mammalian liver. FEBS Letters  
9, 57 - 60
43. Schachter, H., Sarney, J., Mc.Guire, E.J., Roseman, S.  
1969. Isolation of diphosphopyridine nucleotide depen  
dent L-fucose dehydrogenase from pork liver. J. Biol.  
Chem. 244, 4785 - 4792
44. Meijub, A.G., Pecht, M.A., Miller, G.R., Carper, W.R.  
1973. Arabinose (fucose) dehydrogenase from pig liver.  
I Isolation and characterization. Biochim. Biophys.  
Acta 315, 37 - 42
45. Pincheira, G., León, G., Ureta, T. 1973  
Aldosugar dehydrogenases from Neurospora crassa.  
Partial purification of D-arabinose: NAD dehydrogenase.  
FEBS Letters 30, 111 - 114
46. Barratt, R.W., Newmeyer, D., Perkins, D.D., Garnjobst,  
L. 1954. Map construction in Neurospora crassa. Adv.  
Genetics 6, 1 - 91
47. Barrat, R.W., Perkins, D. D. 1965  
Neurospora genetic nomenclature. Neurospora Newsletter  
8, 23 - 24
48. Barratt, R.W., Perkins, D.D. 1965  
Notes on nomenclature and origin of Neurospora stocks.  
Neurospora Newsletter 8, 23 - 24
49. Radford, A. 1972  
Revised linkage maps of Neurospora crassa.  
Neurospora Newsletter 19, 25 - 26
50. Radford, A. 1975  
Concise linkage maps of Neurospora crassa  
Neurospora Newsletter 22, 17 - 19

51. Barrat, R.W., Ogata, W.N. 1976  
Neurospora stock list.  
Neurospora Newsletter 23, 29 - 93
52. Vogel, H.J. 1956  
A convenient growth medium for Neurospora (Medium N)  
Microbial. Genet. Bull. 13, 42 - 43
53. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951  
Protein measurement with the Folin-phenol reagent  
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
54. Schacterle, G.R., Pollack, R.L. 1973  
A simplified method for the quantitative assay of  
small amounts of protein in biological material.  
Anal. Biochem. 51, 654 - 655
55. Warburg, O., Christian, W. 1941  
Protein and nucleic acid estimation by ultraviolet  
absorption. Bioch Z. 310, 384  
Method Enzymol. 3, 454 - 456
56. Ornstein, L., Davis, B.J. 1962  
Disc electrophoresis. Reprinted by Distillation  
Products Industries, Rochester
57. Davis, B.J. 1964  
Disc electrophoresis. II Method and application to  
human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121,  
404 - 427
58. Horecker, B.L., Kornberg, A. 1948  
The extinction coefficients of the reduced band of  
pyridine nucleotides. J. Biol. Chem. 175, 385 - 390
59. Fleischer, S., Kervina, M. 1974  
Subcellular fractionation of rat liver. Methods  
Enzymol. 31 (2), 6 - 41. Biomembranes, Part A
60. Chen, P.S. Jr, Toribara, T.Y., Warner, H. 1956  
Microdetermination of phosphorus.  
Anal. Chem. 28, 1756 - 1758

61. Ui Nobuo, 1971  
Isoelectric points and conformation of proteins.  
I. Effect of urea on the behavior of some proteins  
in isoelectric focusing.  
Biochim. Biophys Acta 229, 567 - 581
62. Ui Nobuo, 1971  
Isoelectric points and conformation of proteins.  
II. Isoelectric focusing of chymotrypsin and its  
inactive derivative. Biochim. Biophys. Acta 229,  
582 - 589
63. Salaman, M.R., Williamson, A.R. 1971  
Isoelectric focusing of proteins in the native and  
denatured states. Biochem. J. 122, 93 - 99
64. Shapiro, A., Viñuela, E., Maizel, J. 1967  
Polyacrylamide gel electrophoresis: SDS gels.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815
65. Weber, K., Osborn, M. 1969  
The reliability of molecular weights determinations  
by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412
66. Laemmli, V.K. 1970  
Cleavage of structural proteins  
Nature 227, 680 - 684
67. Nelson, A.C. 1971  
The binding of detergents to proteins  
J. Biol. Chem. 246, 3895 - 3901
68. Laemmli, V.K., Favra, M. 1973  
Maturation of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>  
J. Biol. Chem. 80, 575 - 599
69. A. De Ioannes.  
Comunicación personal.
70. Kabat, E.A., Mayer, M.M. 1967  
En Experimental Immunochemistry, Charles C. Thomas  
(Publisher). Third Edition, pp 762 - 763. Springfield,  
Illinois, USA.

71. Muñoz, J. 1971  
Double diffusion in plates.  
En: Methods in Immunology and Immunochemistry  
Vol. III, 146 - 160. Editores: Williams, C.A.  
and Chase, M.W. Academic Press, New York
72. Ouchterlony, O. 1949  
Antigen-antibody reaction in gels  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507 - 515
73. Uriel, J. 1971  
Characterization of precipitates in gels.  
En: Method in Immunology and Immunochemistry.  
Vol. III, 294 - 321. Editores: Williams, C.A.  
and Chase, M.W. Academic Press, New York
74. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. 1965  
Immunochemical quantitation of antigens by single  
radial immunodiffusion.  
Immunochem. 2, 235 - 254
75. Westergaad, M., Mitchell, H.K. 1947  
A synthetic medium favouring sexual reproduction  
Amer. J. Bot. 34, 573 - 577
76. Hedricks, J.L., Smith, A.L. 1968  
Size and charge isomer separation and estimation of  
molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.  
Arch. Biochem. Biophys. 126, 155 - 164
77. Scott, W.A., Mishra, N.C., Tatum, E.L. 1974  
Biochemical genetics of morphogenesis in Neurospora  
Brookhaven Symp. Biol. 25, 1 - 18
78. Gillie, O.J. 1966  
The interpretation of complementation data  
Genet. Res. Camb. 8, 9 - 31
79. Crocken, B., Tatum, E.L. 1967  
Sorbose transport in Neurospora crassa  
Biochim. Biophys. Acta 135, 100 - 105
80. Heston, W.E., Hoffman, H.A., Rechcigl, M. Jr. 1965  
Genetic analysis of liver catalase activity in two  
substrains of C57BL mice. Genet. Res. 6, 387 - 397



81. Rechcigl, M. Jr., Heston, W.E. 1967  
Genetic regulation of enzyme activity in mammalian system by the alteration of the rates of enzyme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27. 119 - 124
82. Schimke, R.T., Doyle, D., Ganschow, R.E. 1969  
Mutation in inbred strains and the study of enzyme regulatory mechanisms. En: *Problems in Biology: RNA in development*. Ed. Hanley, E.W. University of Utah Press, Salt Lake City
83. Schimke, R.T., Doyle, D. 1970  
Control of enzyme levels in animal tissues  
*Ann. Rev. Biochem.* 39, 929 - 976
84. Fraenkel, D.G., Parola, A. 1972  
"Up-promoter" mutations of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in E. coli. *J. Mol. Biol.* 71, 107 - 111