

UCH-FC
DOC-B
D245
c.1

AISLAMIENTO, ESTRUCTURA Y TRANSCRIPCION
 IN VITRO DE UN GEN DE tRNA^{ser} DE
 THERMUS THERMOPHILUS

Tesis

Entregada 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
Básicas y Farmacéuticas



por

JUAN DAVAGNINO GILABERT

Enero, 1985

Profesor Patrocinante: Dr. Alejandro Venegas

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

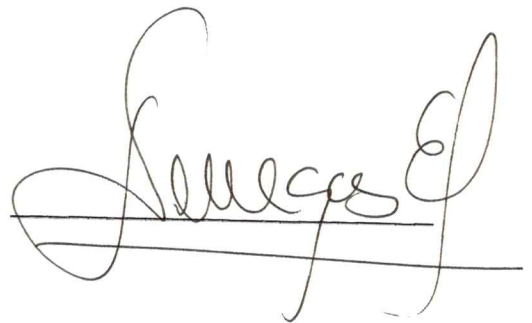
Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

JUAN DAVAGNINO GILABERT

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 23 de Enero de 1985.

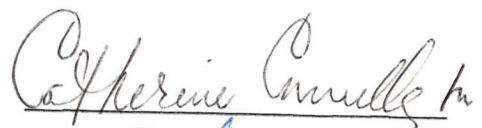
Patrocinante de Tesis:

Dr. Alejandro Venegas



Comisión Informante de Tesis:

Dra. Catherine Connelly M.



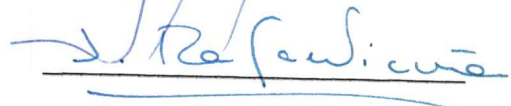
Dr. Aldo Solary



Dr. Eugenio Spencer



Dr. Rafael Vicuña



Agradezco a Alejandro Venegas
por su continua disposición
para planificar y discutir
cada uno de los experimentos
que forman esta Tesis.

Agradezco a todos mis compañeros
del Box 5 por su amistad y su
crítica generosa.

Con mucho cariño

a mi madre, Vicenta

a mis hermanas, Mariana y Carolina

a todas las personas que quiero.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS	
1. Crecimiento de <i>Thermus thermophilus</i> HB8.....	17
2. Mantención de las cepas.....	17
3. Purificación del DNA cromosomal de <i>T. thermophilus</i>	17
4. Formación de una genoteca con el DNA cromosómico de <i>T. Thermophilus</i>	18
5. Crecimiento de <i>E. coli</i> con plasmidios híbridos y amplificación.....	19
6. Purificación de los plasmidios recombinantes.....	19
7. Digestiones del DNA con enzimas de restricción.....	21
8. Electroforesis del DNA.....	21
9. Visualización del DNA.....	22
10. Electroelución.....	23
11. Secuenciación del DNA.....	24
12. Purificación de los tRNAs de <i>T. thermophilus</i>	29
13. Marcación del tRNA de <i>T. thermophilus</i> con (γ - ^{32}P)-ATP.....	30
14. Separación mediante electroforesis bidimensional de los tRNA de <i>Th. thermophilus</i>	31
15. Aminoacilación del tRNA.....	32
16. Hibridación DNA-RNA.....	32
17. Purificación de la RNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i>	34
18. Ensayo de actividad.....	35
19. Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas.....	35

20. Transcripción <i>in vitro</i>	37
21. Ensayo de retención del complejo RNA polimerasa promotor en filtros de nitrocelulosa.....	39
22. Protección del fragmento XhoI a digestion con enzimas de restricción por la unión de la RNA polimerasa.....	41
23. Unión de la RNA polimerasa de <i>Th. thermophilus</i> al clon 111 y visualización de los complejos por microscopía electrónica.....	42

RESULTADOS

1. Análisis de la genoteca formada a partir del DNA cromosomal de <i>Thermus thermophilus</i>	44
2. Mapa físico del clon 111.....	46
3. El trozo que hibrida dentro del fragmento XhoI es una región de 90 pb.....	48
4. Secuencia de DNA alrededor de la región que hibrida.....	50
5. Análisis computacional de la zona que hibrida y plegamiento de la secuencia generando una estructura secundaria para el tRNA.....	51
6. Separación de los tRNA de <i>Th. thermophilus</i>	54
7. Hibridación de algunos tRNAs con el fragmento XhoI..	56
8. Comparación del tRNA codificado en el clon 111 con otros tRNAs aislados de diferentes organismos.....	58
9. Purificación de la RNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i> HB8.....	61
10. Transcripción <i>in vitro</i> del clon 111.....	64
11. Secuencia de la región transcrita.....	68
12. El promotor del gen.....	69
13. La region 3' del tRNA.....	70
14. Formación de complejos entre la RNA polimerasa de <i>thermus thermophilus</i> y el fragmento XhoI.....	72
15. Visualización del complejo por microscopía electrónica.....	76

16. Especificidad de la unión de la RNA polimerasa termofílica al promotor por protección del fragmento XhoI frente a digestión con enzimas de restricción.....	79
17. Efecto de la temperatura sobre la transcripción <i>in vitro</i> del gen de tRNA ^{SER} y sobre la formación de complejos específicos enzima-promotor.....	82
18. Efecto de la heparina sobre la unión de la RNA polimerasa al promotor.....	87

DISCUSION

El problema abordado.....	89
1. Análisis de la genoteca formada a partir del DNA cromosomal de <i>T. thermophilus</i>	89
2. Estructura del segmento de DNA secuenciado.....	92
3. El tRNA ^{SER} termofílico.....	93
4. El promotor.....	98
5. Interacción promotor-RNA polimerasa.....	102
6. Efecto de la temperatura.....	105
7. Homología entre las RNA polimerasas.....	107
8. Terminación de la transcripción.....	108
9. Conclusiones finales.....	109
REFERENCIAS.....	111

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Tamaño de los fragmentos producidos por algunas enzimas de restricción sobre el fragmento XhoI..... 48
- Tabla 2. Incorporación de (^3H)-serina en algunos tRNAs de *T. thermophilus*..... 56
- Tabla 3. Comparación entre la secuencia de diferentes tRNAs y la secuencia del gen termofílico..... 59
- Tabla 4. Comparación del promotor termofílico del tRNA^{SER} con otros promotores de *E. coli*..... 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gel de agarosa al 0,8% en el que se observan plasmidios provenientes de diferentes clones.....	45
Figura 2.	Mapa físico del clon 111 realizado con enzimas de restricción.....	46
Figura 3.	Localización por hibridización Southern de la zona complementaria a una secuencia de tRNA presente en el fragmento XhoI.....	49
Figura 4.	Región del DNA que hibrida con el tRNA.....	50
Figura 5.	Estructura secundaria del tRNA.....	52
Figura 6.	Separación de los tRNA de <i>Thermus thermophilus</i> por electroforesis en dos dimensiones en un gel de poliacrilamida.....	55
Figura 7.	Hibridación Southern de los clones 111 y 112 con el ³² P-tRNA N ^o 4.....	57
Figura 8.	Purificación de la RNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i>	63
Figura 9.	Transcripción de los fragmentos de 3200, 2300 y 900 pb.....	65
Figura 10.	Transcripción del fragmento XhoI intacto y digerido previamente con enzimas de restricción.....	67
Figura 11.	Secuencia de DNA de la región transcrita del fragmento XhoI.....	69
Figura 12.	Secuencia del gen plegada como tRNA ^{SER} correspondiente a parte del fragmento XhoI de <i>Thermus thermophilus</i>	71
Figura 13.	Ensayo de retención del complejo enzima-DNA en filtros de nitrocelulosa.....	73

Figura 14. Formación de complejos RNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i> -fragmento XhoI al aumentar la fuerza iónica.....	75
Figura 15. Visualización al microscopio electrónico del complejo formado entre la RNA polimerasa de <i>T. thermophilus</i> y el inserto BamHI.....	77
Figura 16. Cuantificación de especificidad de la unión de la RNA polimerasa de <i>T. thermophilus</i> al inserto de 3200 pb del clon 111.....	76
Figura 17. Protección del sitio RsaI presente en el promotor del gen de tRNA ^{SER} por formación del complejo con la RNA polimerasa termofílica.....	81
Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la transcripción <i>in vitro</i> del gen tRNA ^{SER}	83
Figura 19. Comparación entre la capacidad de unión de la RNA polimerasa de <i>T. thermophilus</i> al promotor del gen de tRNA ^{SER} y la actividad transcripcional <i>in vitro</i> de la enzima a diferentes temperaturas.....	84
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la formación del complejo enzima-promotor entre la RNA polimerasa de <i>E. coli</i> y el gen de tRNA ^{SER}	86
Figura 21. Efecto de la heparina sobre las RNA polimerasas de <i>T. thermophilus</i> y de <i>E. coli</i> previo a la formación del complejo con el promotor del gen tRNA ^{SER}	88
Figura 22. Distribución de frecuencias de bases G y C en el trecho que separa las regiones -35 y -10.....	99

ABREVIATURAS

A	adenina
Amp ^R	resistencia a ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
b	bases
BICINE	N,N-Bis(2-hidroxietyl)glicina
2-ME	2-Mercaptoetanol
C	citocina
cpm	cuentas por minuto
CTP	citocina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O. ₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
G	guanosina
GTP	guanosina 5'-trifosfato
HEPES	ácido N-2 hidroxietyl piperazina-N'-2-etano- sulfónico
M	molar
mA	miliamper
mM	milimolar
ng	nanogramo
nM	nanomolar
pb	pares de bases
PM	peso molecular
PMSF	fenilmetil sulfonil fluoruro
PPO	2,5-Difeniloxazol
POPOP	2,2 -p-Fenilen bis (5-feniloxaxol)
SDS	dodecilsulfato de sodio
ser	serina

s ² T	2-tioribotimidina
T	timina
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
Tet ^s	sensibilidad a tetraciclina
U	uridina
ul	microlitro
ug	microgramo
UTP	uridina 5'-trifosfato
UV	ultravioleta
V	volt

RESUMEN

A partir del DNA de *Thermus thermophilus* HB8 se hizo una genoteca parcial. Se aisló un clon que contenía un inserto de 3200 pb por hibridación con el ^{32}P -tRNA del mismo organismo. Experimentos tipo Southern nos permitieron acotar al gen dentro de una región de 900 pb. El análisis de la secuencia de esta región, a través de un programa de computación, dió la localización precisa de la región codogénica y en base al triplete anticodon el gen se identificó como uno de tRNA^{SER}. Un análisis comparativo indicó una homología de un 75% con respecto al tRNA₃^{SER} de *Escherichia coli* y una homología más baja al compararlo con otros tRNAs.

El gen aislado hibrida específicamente con un tRNA termofílico que se aisló por electroforesis bidimensional y que se caracterizó como un tRNA con capacidad aceptora de serina. La secuencia de DNA reveló la existencia de un promotor típico en la posición adecuada, con los elementos esperados con la excepción del alto contenido de GC presente en el espaciador que separa las cajas -35 y -10.

Una secuencia del tipo repetición invertida localizada al final del gen puede esquematizarse como una estructura "hairpin" que tiene un tallo rico en GC (8 pb) y un lazo de 4 bases.

Se describe además la purificación de la RNA polimerasa del mismo microorganismo termofílico lo que constituye junto con el gen aislado un modelo atractivo para estudiar la transcripción a altas temperaturas.

Los ensayos de transcripción *in vitro* han revelado que el gen se transcribe eficientemente a 60°C con la polimerasa homóloga, produciendo un transcrito abortivo de 400 bases. El promotor identificado es reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* produciéndose el mismo transcrito. Los resultados de

transcripción indicaron que la estructura terminador postulada parece no ser funcional *in vitro* en las condiciones descritas.

Para analizar el evento de reconocimiento del promotor del gen de tRNA^{SER} por la RNA polimerasa termofílica a diferentes temperaturas se realizaron estudios de microscopía electrónica y experimentos de protección frente a endonucleasas de restricción.

Los estudios de este complejo promotor-enzima realizados mediante ensayos de unión a filtros requerían el uso de un fragmento de restricción de 900 pb y la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* altamente purificada. El gen de tRNA^{SER} fue previamente marcado *in vitro* con (³)d-GTP y (³)d-CTP con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. El complejo promotor-RNA polimerasa fue más estable en KCl 100 mM y la cantidad de complejo disminuyó drásticamente cuando se incrementó la concentración de sal. Esta interacción no requirió de cationes divalentes y no fue afectada por heparina, un compuesto polianiónico que se une fuertemente a la RNA polimerasa de *E. coli* evitando la interacción con el promotor. Esta inhibición se visualizó claramente cuando se incubó inicialmente al enzima de *E. coli* con heparina y luego con el gen de tRNA^{SER}.

Los estudios de microscopía electrónica se realizaron con DNA sobreenrollado y la RNA polimerasa termofílica incubados a 37 y también a 60°C. Luego de la formación del complejo, el DNA se convirtió a la forma lineal con BamHI. El resultado indicó que el complejo se formó por interacción específica ya que existe una unión preferencial a una región del gen.

Una evaluación más precisa de la zona de interacción se dedujo a partir de experimentos de protección frente a una enzima de restricción que corta en el promotor dentro de la secuencia de Pribnow.

La unión de la RNA polimerasa termofílica al promotor del gen del tRNA^{SER} no es afectada por cambios de temperatura ya que la interacción ocurre tanto a bajas temperaturas como a 60°C y temperaturas más altas. Esto se demostró en ensayos de unión a filtros y estudios de microscopía electrónica. Sin embargo, la reacción catalítica global ocurre sólo a temperaturas sobre 45°C. Probablemente el proceso catalítico puede afectarse por bajas temperaturas a nivel de iniciación o elongación del RNA como se ha observado para la reacción global. Estudios estructurales y cinéticos enfocados a este aspecto aportarán información interesante para resolver esta interrogante.

ABSTRACT

A partial genomic library from *Thermus thermophilus* DNA was constructed. A clone carrying a 3200 bp insert was isolated, using total ^{32}P -tRNA as a probe. Southern experiments using ^{32}P -tRNA as a probe, allowed us to localize the gene within a 900 bp fragment. DNA sequencing analysis of this region, assisted by a computer program, gave the precise location of the coding region and based on the anticodon triplet the gene was identified as one coding for a tRNA^{SER}. Comparison analysis indicated 75% homology respect to the *E. coli* tRNA₃^{SER}, and lower homology when compared to other tRNAs.

This gene specifically hybridizes with a thermophilic tRNA which has been isolated by two-dimensional electrophoresis and characterized as a tRNA with serine acceptor activity. The DNA sequence revealed a typical procaryotic promoter at the appropriate position, having the expected elements, except for the high GC content present in the intervening spacer which separates the -35 and -10 boxes.

An inverted repeat located at the end of the gene can be drawn as an hairpin structure having a GC rich stem of 8 bp and a 4 base loop.

The purification of the RNA polymerase from the same thermophilic microorganism is also reported, providing together with the isolated gene an attractive model to study how transcription occurs at high temperatures.

In vitro transcription assays have revealed that the gene is efficiently transcribed at 60°C by the homologous polymerase producing a 400 base run-off transcript. The identified promoter is also recognized by *E. coli* RNA polymerase producing the same transcript. These results indicated that the putative terminator structure seems not to be operating *in vitro* at described conditions.

In order to analyze the recognition event of the tRNA^{SER} gene promoter by the thermophilic RNA polymerase at different temperatures, electron microscopic studies and protection experiments against restriction endonuclease were carried out.

Studies on this promoter-enzyme complex done by filter binding assays involved the use of a 900 bp restriction fragment and the highly purified *Thermus thermophilus* RNA polymerase. The tRNA^{SER} gene was previously *in vitro* labeled with (³H)-dGTP and (³H)-dCTP with the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase. The promoter-RNA polymerase complex was more stable at 100 mM KCl and the amount of complex drastically dropped when salt concentration was increased. This interaction did not require divalent cations and was not affected by heparin, a polyanionic compound which strongly binds to *E. coli* RNA polymerase avoiding the interaction with the promoter. This inhibition was certainly seen when the *E. coli* enzyme was first incubated with heparin and then with the tRNA^{SER} gene.

The electron microscopic studies were done using the supercoiled DNA and the thermophilic RNA polymerase at 37°C and 60°C. After complex formation the DNA was linearized with BamHI. The result indicated that the complex is formed by specific interaction, since there is a preferred binding to a particular region of the gene.

A precise assessment of the interaction was deduced from protection experiments against a restriction endonuclease which cuts within the Pribnow box at the promoter.

The binding of thermophilic RNA polymerase to the promoter of the tRNA^{SER} gene was not affected by temperature changes since interactions occurred at low temperatures as well as 60°C and higher. This was demonstrated by filter binding assays and electron microscopic studies. However, the whole catalytic transcription reaction proceeds only at temperatures over 45°C. Probably the catalytic process may

be affected by low temperature, at the level of initiation or elongation of the RNA chain, as seen in the entire reaction. Structural and kinetic studies focused on this subject will provide interesting information in order to answer this question.

INTRODUCCION

A pesar que la mayoría de los microorganismos se desarrollan en ambientes semejantes a los que vive el hombre, algunos lo pueden hacer en habitats bastante diferentes, como ser ^{son} bajo pH (microorganismos llamados acidófilos), alta salinidad (halófilos) y bajas o altas temperaturas (psicrófilos y termófilos). Se habla de termófilos cuando los microorganismos pueden desarrollarse a temperaturas entre 50 y 90°C. Recientemente se han encontrado en el fondo del mar microorganismos capaces de vivir a 250°C (Baross y Deming, 1983). La existencia de volcanes en fosas submarinas permite que se alcance estas temperaturas y debido a las altas presiones presentes a esas profundidades el agua permanece aún en estado líquido. Brock comenta que el límite superior de temperatura para la vida no está definido, ya que bastaría que el agua estuviera en estado líquido para que pudieran llevarse a cabo las reacciones biológicas requeridas (Brock, 1978).

Los termófilos presentes en la superficie terrestre se desarrollan en diversos lugares tales como aguas termales, o cerca de géiseres que constituyen ambientes naturales, o bien, otros generados artificialmente por el hombre como basurales, minas zonas cercanas a drenajes de aguas calientes, derivadas de procesos industriales (Brock, 1978).

Los termófilos se han dividido en tres grupos, basados en el rango de temperatura al cual pueden vivir. Existen los termófilos obligados o extremos, cuya temperatura óptima de crecimiento se sitúa en el rango de 65-75°C y que no pueden desarrollarse bajo los 40°C; los termófilos facultativos, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 50-65°C y finalmente las bacterias termotolerantes, cuyo máximo crecimiento se observa a 45-50°C, pero que normalmente son capaces de proliferar a inferiores temperaturas.

El organismo del cual se tratará en esta Tesis pertenece

al grupo de los termófilos extremos. Fue aislado de aguas termales en el Japón y es el termófilo extremo que más se ha estudiado a la fecha. Es un bacilo gram negativo, aerobio estricto, pigmentado e incapaz de formar esporas (Oshima e Imahori 1974).

La existencia de vida a altas temperaturas ha dado origen a una serie de teorías que proponen diversos mecanismos para explicarla. Entre ellas las más citadas son:

1) La teoría cinética, propuesta por Allen (1953), la cual sostiene que una biosíntesis de proteínas muy activa podría contrarrestar el daño térmico de proteínas estructurales y enzimas de estas bacterias. Actualmente esta teoría no cuenta con mucho apoyo experimental.

2) La teoría lipídica (Brock, 1967) propone que la membrana celular de estos organismos les conferiría una termoprotección a los componentes internos.

3) La teoría macromolecular (Koffler, Mallet y Adye, 1957) se basa en que los componentes celulares de los termófilos tendrían una termoestabilidad intrínseca. Esta es la teoría más aceptada actualmente, si se considera la gran cantidad de publicaciones relacionadas con este aspecto.

Con respecto a las proteínas presentes en los organismos termofílicos, la gran mayoría de ellas han resultado ser estables *in vitro* a las temperaturas de crecimiento de estas bacterias. Más de un centenar de proteínas han sido purificadas a partir de los organismos termofílicos. En general, las diferencias estructurales entre las proteínas homólogas aisladas de mesófilos y de termófilos son menores, particularmente a nivel de estructura terciaria. (Merkler, Farrington y Wedler, 1981). Esto sugiere que las diferencias que explican estabilidad o sensibilidad al calor reside en cambios sutiles, que dan por resultado interacciones hidrofóbicas más favorables, mayor número de enlaces de hidrógeno, posibilidad de uniones de metales estabilizantes, interacciones iónicas favorables o una combinación de todas ellas. Aunque una de estas interacciones puede ser

cuantitativamente más importante que otra en un caso determinado, se piensa que la estabilidad térmica en proteínas de termófilos no puede ser explicada por uno sólo de esos factores. Estas ideas son consistentes con la descripción termodinámica de los factores que determinan en general la estabilidad de una proteína, ideas que fueron desarrolladas por Kauzmann, Tanford, Brandts y Scheraga, entre otros (Chothia, 1984). Se ha demostrado que la energía neta de estabilización de una proteína se puede resumir como una sumatoria de las contribuciones energéticas aportadas por los enlaces de hidrógeno, "enlaces hidrofóbicos", interacciones electrostáticas, entropía de la cadena lateral, etc. La conclusión importante que surge de esto es que, aunque la suma de las contribuciones energéticas favorables que determinan el plegamiento es grande, (del orden de 100 Kcal/mol para una proteína pequeña) existe una contribución adversa, que favorece la desnaturación de la proteína. Esta proviene del componente entrópico y es del mismo orden de magnitud de tal modo que la energía neta de estabilización es de sólo 5-10 Kcal/mol. No es sorprendente entonces, encontrar que la estructura terciaria de las proteínas termofilicas sea muy semejante a la de sus homólogas mesofilicas. La diferencia neta es pequeña, ya que en ciertos casos equivale al incremento de algunos enlaces de hidrógeno o a interacciones hidrofóbicas como aquellas generadas por la cadena lateral de una leucina (Matthews, 1975).

A modo de ejemplo, consideremos la estabilidad térmica de una proteína mesofilica al reemplazar algún aminoácido en su estructura. Langridge (1968) indujo una serie de mutaciones ambar en la B-galactosidasa de *E. coli* las que posteriormente suprimió mediante la inserción de serina usando un tRNA supresor. De esta manera produjo 52 tipos de mutantes, con serinas insertadas en diferentes posiciones de la enzima. El cambio más significativo que encontró en muchos de los mutantes fue una pérdida de termoestabilidad,

más que una disminución de la actividad enzimática.

Otro ejemplo notable en que el cambio de un aminoácido en una enzima afecta drásticamente su estabilidad es el mutante descrito por Matthews (1975). Es el cambio de la tirosina 88 por una histidina en la lisozima del fago T4. Esta mutación produce una enzima sensible al frío. A 37°C la enzima mutada tiene el 40% de actividad respecto a la enzima silvestre. A 40°C ambas presentan el mismo nivel de actividad y a 20°C el mutante sólo muestra 0,01% de actividad respecto al silvestre. La mutación no se relaciona directamente con el sitio activo (Matthews y Remington, 1974).

Estos ejemplos son una evidencia muy convincente que cambios en termoestabilidad de las enzimas son debidos a pequeñas alteraciones en su estructura primaria. Son, entonces, leves cambios con drásticos efectos en estabilidad de las proteínas los que han sido evitados evolutivamente para la arquitectura de enzimas de termófilos.

Con respecto a estudios estructurales de ácidos nucleicos en relación a su origen termofílico y termoestabilidad, la mayoría de los estudios están dirigidos hacia los RNAs siendo escasos aquellos sobre DNA. En relación a RNA hay análisis químicos realizados con rRNAs y tRNAs que han mostrado la presencia de bases modificadas que confieren una termoestabilidad particular a estas moléculas, lo que se analizará detalladamente en la Discusión. El tRNA total de *E. coli* tiene un T_M de 80°C, mientras que en termófilos los valores están en el rango de los 87°C (Zeikus y col. 1970, Oshima y col. 1971). Recientemente se ha publicado la secuencia del rRNA 5S de *T. thermophilus* (Komiya y col. 1983). El contenido en GC es de un 67%.

La termoestabilidad que presentan estructuras más complejas, como son los ribosomas de algunos termófilos tal vez refleje la termoestabilidad individual de cada uno de sus constituyentes (Ameluxen y Murdock, 1978). Además de la termoestabilidad intrínseca existe, aunque en menor grado,

estabilización por modificación covalente y/o por unión de ligandos pequeños, como algunos iones (Ameluxen y Murdock, 1978).

Otros componentes estructurales analizados incluyen lípidos, algunos con características muy particulares (Oshima, Sasaki, y Oshima, 1978) y componentes de bajo peso molecular como poliaminas las cuales actuarían estabilizando el aparato sintetizador de proteínas (Oshima, 1979).

Es escasa la información que se tiene de los aspectos genéticos del problema de la termofilia. Aparte de unos pocos datos sobre composición y modificación de bases nucleotídicas, no hay mayores antecedentes sobre estructura y función génica en organismos termofílicos extremos.

Con respecto al DNA de los organismos termofílicos extremos, es muy poco lo que se sabe. La mayoría de lo publicado son comparaciones entre cepas del género *Bacillus* con mesófilos, normalmente *E. coli* (Stenesh, Roe y Snyder (1968). En estos casos se ha encontrado que la composición de bases GC es un poco mayor en estos termófilos moderados (53%) que en los mesófilos (45%). Las curvas de desnaturación térmica muestran que el T_m de los termófilos es un poco mayor (92°C) que en los mesófilos (88°C) (Stenesh, Roe y Snyder (1968). Una búsqueda exhaustiva, en el banco de datos Dialog, acerca de parámetros físico químicos del DNA de termófilos extremos no arrojó mayor información, fuera de lo poco que ya se conoce.

El DNA de *Thermus thermophilus* tiene un contenido de GC de 67-70% (Oshima e Imahori, 1974, Vásquez, 1983) y se propone que este enriquecimiento en GC tendría como función incrementar la estabilidad térmica, aumentando el número de puentes de hidrógeno que mantienen su estructura. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre porcentaje de GC y temperatura óptima de crecimiento (Pace, y Campbell, 1967).

Se ha descrito el clonamiento de un gen de *T. thermophilus*

en *E. coli*. Se trata del gen que codifica para la isopropil malato deshidrogenasa (Nagahari, Koshikawa y Sakaguchi, 1980, Kagawa y col., 1984). El producto del gen recombinante se expresa, aunque con dificultad, en *E. coli* produciendo una enzima termoestable. La secuencia del gen se ha publicado (Kagawa y col., 1984), aunque sus regiones de control no se deducen facilmente de un análisis de la secuencia. En la Discusión se darán mayores detalles acerca de la estructura de este gen.

EL PROCESO TRANSCRIPCIONAL

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el aparato transcripcional de *T. thermophilus* como conjunto, con el fin de saber cómo funciona el paso inicial de la expresión génica a altas temperaturas y cómo la estructura de los ácidos nucleicos se ha adaptado a ello.

La importancia de la transcripción está fundada en la extensión y diversidad de los procesos que dependen de ella. Conviene recordar que la síntesis de RNA debe ocurrir en procesos claves como replicación del DNA, biosíntesis de proteínas y de otros componentes celulares, siendo por lo tanto crucial en procesos complejos como morfogénesis, diferenciación celular, desarrollo embrionario, etc.

El proceso de transcripción es modulado cuali y cuantitativamente, es decir no todos los genes son transcritos a un mismo tiempo y con igual eficiencia, sino que de acuerdo a los requerimientos y estado de desarrollo celular. En organismos superiores la regulación es ejercida por proteínas o factores que se unen a secuencias específicas del DNA localizadas cerca o dentro del gen (Matsui y col., 1980; Dynan y Tjian, 1983a y 1983b; Davison y col., 1983). El efecto de esta interacción proteína-DNA resulta en un aumento o represión de la transcripción del o de los genes involucrados. En procariontes, particularmente en *E. coli*, se ha estudiado en forma extensa la regulación de la expresión génica a través de proteínas que actúan como represores o activadores de la transcripción (Plat, 1978; Reznikoff y Abelson, 1978). A diferencia de los organismos eucariontes, gran parte de los estudios se han dirigido hacia la RNA polimerasa y su participación directa en la modulación de la transcripción.

LA RNA POLIMERASA PROCARIOTICA

Esta enzima ha sido estudiada principalmente en *E. coli* y en menor grado en *B. subtilis* (Haldenwang, Lang y Losick, 1981) Se han enfocado diversos aspectos que incluyen la caracterización fina de su estructura (Burgess, 1976; Fukuda y col., 1977), clonamiento y secuenciación de los genes que codifican las subunidades (Jaskunas y col., 1975; Yamamoto y Nomura, 1978; Burton y col., 1981; Linn y Scaife, 1978) y aspectos del sitio activo y mecanismo catalítico (Venegas y col., 1973; Bull y col., 1975).

La enzima en *E. coli* ha sido purificada a homogeneidad por varios métodos (Burgess, 1976; Fukuda y col., 1977), lo que ha facilitado el análisis de los diversos aspectos comentados anteriormente. Estudios de su estructura han permitido establecer la existencia de cuatro subunidades denominadas beta, beta prima, sigma y alfa, con una estequiometría de 1:1:1:2 respectivamente. Se conoce la secuencia de aminoácidos de todas ellas (Ovchinnikov y col., 1977, Ovchinnikov y col. 1981, Ovchinnikov y col., 1982 Burton y col., 1981). Los siguientes son sus pesos moleculares: beta: 155000. beta prima: 160000. sigma: 85000. alfa: 40000. Estos pesos moleculares no difieren mucho entre diferentes especies bacterianas exceptuando el caso de sigma que varía entre 44000 y 92000 (Burgess, 1976). Las subunidades nombradas anteriormente forman lo que puede considerarse la enzima completa u holoenzima. Cuando carece de la subunidad sigma se la denomina "enzima básica" (core enzyme) y difiere grandemente en sus propiedades funcionales. Hay sistemas bacterianos que poseen más de un tipo de subunidad sigma y que varían también en pesos moleculares (Haldenwang, Lang y Losick, 1981). Por otro lado se han descrito diversas otras proteínas que participan en la iniciación o la terminación de la transcripción (Losick y Pero, 1976). La función de la subunidad sigma es hacer que la enzima se una de un modo estable sólo a los promotores, y

no en otros sitios del DNA. La afinidad de la enzima básica por sitios inespecíficos del DNA tiene una constante de asociación de $2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ con vidas medias de 60 min. En cambio la holoenzima tiene una constante de asociación de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ por estos mismos sitios, y su vida media es de 1 s. En contraste, la constante de asociación por el promotor es del orden de 10^{14} M^{-1} con vidas medias, en ciertos casos, de algunas horas (Lewin, 1983).

Con respecto al rol de las otras subunidades, se sabe que la subunidad beta parece ser el sitio de unión de los nucleótidos (Lewin, 1983). La subunidad beta prima es la más básica de las subunidades, con alto contenido en los aminoácidos lys y arg, por lo que se ha propuesto que es responsable de la unión al DNA, mediada por interacciones iónicas. Además se han aislado mutantes con la subunidad beta prima alterada que tienen afectada la propiedad de unión a DNA (Yura y Ishihama, 1979). Las subunidades alfa, a las cuales no se les ha asignado claramente una función, podrían estar involucradas también en el reconocimiento del promotor (Lewin, 1983).

La enzima más estudiada es la de *Escherichia coli*. Es poco lo que se sabe de otras eubacterias y menos aun de arqueobacterias. Hay estudios comparativos estructurales que permiten establecer homologías en la arquitectura de las RNA polimerasas aisladas de diversos procariontes. Entre las más estudiadas después de la de *E. coli*, destaca la enzima de *B. subtilis* (Doi, 1977; Fukuda y col., 1977; Spiegelman y Whiteley, 1978; Wong y Doi, 1982), presentando varias analogías estructurales pero con una subunidad sigma de menor tamaño.

La RNA polimerasa de *T. thermophilus* fue purificada a homogeneidad por Date, Suzuki e Imahori (1975). Los pesos moleculares de las subunidades son: beta: 140000. beta prima: 180000. sigma: 58000 y alfa: 42000. La enzima requiere manganeso para su actividad, y no es inhibida por altas concentraciones de rifampicina.

EL PROMOTOR

Para iniciar la transcripción, la RNA polimerasa debe unirse a una región específica del DNA llamada promotor, que está localizada cerca del inicio del gen. En estas regiones la enzima forma complejos con el DNA, en el que las hebras están aún apareadas entre sí. Estos son denominados complejos cerrados, los que luego, al separarse las cadenas del DNA se transforman en los llamados complejos abiertos, con vidas medias que varían entre algunos minutos a varias horas (Rosenberg y Court, 1979, von Hippel y col., 1984). La estabilidad de algunos de estos complejos ha resultado de utilidad en la identificación de las secuencias de DNA que forman estos complejos, ya que al digerir el DNA con una exonucleasa, como ser DNAasa I, es posible aislar fragmentos que estuvieron protegidos por la polimerasa (Le Talaer & Jeanteur, 1971). El tamaño de estos trozos es de aproximadamente 40 pb, cubriendo una región que abarca entre las bases -20 a +20, siendo +1 la base desde la cual se inicia la transcripción. Al comparar las regiones protegidas de distintos promotores, se encontraron homologías a nivel de secuencia, las que fueron descritas inicialmente por Schaller y col. (1975) y por Pribnow (1975). Ellos señalaron una región conservada, en torno a la base -10, denominada actualmente caja de Pribnow (Pribnow box), la que se muestra a continuación. A medida que se han secuenciado más promotores, se ha podido cuantificar la frecuencia de ocurrencia que presenta cada base; esto también se muestra en la secuencia de la figura, en la que se han incluido los porcentajes en los que se presenta cada base, luego de analizar 105 promotores diferentes (Hawley y McClure 1983). La caja de Pribnow está en negrita:

T G G T A T A A T A C
38 38 31 79 95 44 60 51 96 31 32

Cuando la RNA polimerasa se disocia de estos segmentos de 20 pb, no se vuelve a unir a ellos, (Rosenberg y Court, 1979) lo que indica que existen otras secuencias importantes para el reconocimiento de los complejos. Mediante el método de "foot printing" (Schmitz & Galas, 1979) se ha demostrado que la región que la RNA polimerasa cubre en el promotor del operon lac es de 70 a 80 pb, desde la base -60 a la +20. Dentro de este trozo se ha encontrado otra secuencia conservada, ubicada en torno a la base -35, con las frecuencias de bases que se indican:

T C T T G A C A T
42 38 82 84 79 64 54 45 41

Esta zona ha sido llamada la "región de reconocimiento", ya que no aparece en la secuencia de los complejos protegidos frente a la DNasa I (lo que indica que su unión a la RNA polimerasa no es tan fuerte como la caja de Pribnow) y por otra parte es necesaria su existencia para que la enzima se vuelva a unir al promotor. Por lo tanto, se postuló que su rol sería constituir el elemento reconocido por la RNA polimerasa, la que luego se uniría a la caja de Pribnow. Actualmente este aspecto está en discusión planteándose además de la interacción secuencial con estos elementos, la posibilidad que éste sea un proceso simultáneo.

Además de la alta frecuencia con que se presentan las bases conservadas en las regiones -35 y -10, existen también

evidencias genéticas que indican que esta secuencia de consenso en sí es importante (Hawley & McClure 1983). En efecto, cada vez que ocurre una mutación que aleja al promotor mutado de la secuencia de consenso, el nuevo promotor es más débil que el parental. A la inversa, cuando ocurre una mutación que acerca la secuencia mutada a aquella de consenso, entonces el promotor mutado es más fuerte que aquel del cual deriva. Esto ha sido demostrado sintetizando químicamente la secuencia de consenso y probando su efectividad (Rossi y col., 1983). El promotor diseñado, que tiene ambas regiones de acuerdo a lo que sería un promotor "ideal", es capaz de producir transcripción por un largo tiempo, aún en presencia de heparina, que se sabe inhibe a la enzima no unida al DNA (Walter y col., 1967) impidiendo en condiciones normales que el gen sea copiado más de una vez, lo que no ocurre en este caso.

Se ha estudiado cómo varía la actividad del promotor separando las secuencias -35 y -10 por trozos espaciadores de largos variables (Aoyama y col., 1983). El promotor en este caso estaba controlando el gen que confiere resistencia a tetraciclina, lo que posibilitaba la detección de las colonias que lo expresaran. Se produjeron promotores con longitudes de 15, 16, 17, 18 y 19 bases. Sólo se detectaron colonias resistentes a tetraciclina en aquellos promotores con 16, 17 y 18 bases de espaciamiento. También se estudió la actividad transcripcional de estos promotores artificiales *in vitro*. Se encontró que aquellos con 16, 17 y 18 bases de espaciamiento producían transcritos, pero que el promotor que tenía un trozo de 17 bases separando las dos cajas generaba una cantidad de producto muy superior a los otros (Aoyama y col., 1983).

De acuerdo a estos antecedentes, la afinidad con que un promotor es reconocido por la RNA polimerasa, (lo que también se denomina "la fuerza" de un promotor), está determinada por la participación de tres componentes: la caja de -35, el trozo espaciador y la caja de Pribnow.

ELECCION DE UN SISTEMA GENICO TERMOFILICO PARA CLONAR.

Se eligió clonar un gen que codificara para un tRNA ya que el producto es de pequeño tamaño, en contraste con un gen que codifique para una proteína. Además, es fácil fabricar una sonda (probe) para seleccionar clones que contengan secuencias que hibriden con un tRNA. También está el hecho que a partir de la estructura del DNA es posible plegar fácilmente una secuencia con un significado biológico, no así detectar *a priori* a partir solo de la secuencia un gen que codifique para una proteína. Finalmente, en el laboratorio se cuenta con experiencia en este tipo de genes.

La distribución de los genes de tRNA en el cromosoma de *E. coli* no es homogénea, sino que están agrupados en los llamados "clusters" (Ikemura y Ozeki, 1977), aunque existen casos en que los genes están aislados, con sus respectivos promotor y terminador de la transcripción, como en el caso del gen que codifica para el tRNA^{PHE} (Schwartz y col., 1983). Cuando se grafica la densidad génica (el número de genes que son transferidos por minuto, en un experimento de conjugación) en función de la localización en el mapa cromosómico, se encuentran diez sitios de alta densidad de genes de tRNA (Ikemura y Ozeki, 1977). Otros están formando parte de operones de genes de RNA ribosomales (para una revisión, ver Ozeki, 1977). Se han descrito casos en los que se contrascriben genes para tRNAs y para una proteína (Hudson, Rossi y Landy, 1981, Tamura, Nishimura y Ohki, 1984).

El conocimiento actual de la biosíntesis del RNA de transferencia se ha obtenido del estudio de precursores transcripcionales (Ilgen, Kirk y Carbon, 1976) y del análisis directo de genes que codifican para tRNAs (Hsu y col., 1984). En general, los tRNAs son transcritos como precursores no modificados que contienen las secuencias que

formaran parte del producto maduro, más un cierto número de bases en los extremos 5' y 3' y regiones espaciadoras entre los tRNAs, cuando están integrando un operon. El procesamiento consiste en el corte de los extremos 5' y 3' por enzimas celulares y la posterior modificación de ciertas bases.

En esta Tesis se presenta el clonamiento y secuenciación de un gen cromosomal de *Thermus thermophilus*, que codifica para un RNA de transferencia, el que es aminoacilado por serina. Se analizan su estructura y sus zonas de control y se demuestra que tanto la RNA polimerasa homóloga como la de *E. coli* pueden reconocer el promotor y producir un transcrito "run off" *in vitro* del mismo tamaño. Además se demuestra por una variedad de técnicas que la RNA polimerasa termofílica reconoce específicamente el promotor.

Los resultados encontrados permiten concluir que los mecanismos de expresión génica a nivel molecular vigentes en el termófilo extremo *T. thermophilus*, no difieren de lo descrito para *E. coli*, si bien existen ciertas diferencias en propiedades intrínsecas de la RNA polimerasa, además de la obvia termoestabilidad de esta enzima. El DNA, por su naturaleza como lenguaje genético universal no presenta diferencias respecto al de otros mesófilos, ya que al menos el promotor puede ser reconocido y utilizado por la RNA polimerasa de *E. coli* y el producto génico sintetizado *in vitro*. Los estudios aquí descritos expanden el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la expresión génica y a pesar de leves diferencias, corroboran su universalidad.

MATERIALES

1. Material biológico

Bacterias. *Thermus thermophilus* HB8 (Oshima e Imahori, 1974) fue obtenido de ATCC (Nº 27634). *Escherichia coli* HB101 (F-, hsdS20, r-bm-b, rec A13, ara-14, proA2, lac Y1, gal K2, rpsL20 (Smr), xyl-5, mtl-1, sup E44, Lambda-) (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969) fue el microorganismo utilizado en los experimentos de clonamiento molecular.

Enzimas. Las endonucleasas de restricción AccI, AvaI, AvaII, BamHI, HaeII, Hae III, HindIII, PvuII, RsaI, Sau96AI, Sau3AI y XhoI, en concentraciones que variaron entre 400-5000 unidades/ml, fueron obtenidas de Bio-Labs. Inc. USA y de Bethesda Research Laboratories, Inc., USA. (Se define una unidad de enzima de restricción como la cantidad requerida para digerir completamente 1 ug de DNA en 60 min. en un volumen de 50 ul, en las condiciones que recomienda el proveedor). La RNA polimerasa de *Escherichia coli* fue obtenida de Enzo-Biochem y también fue purificada en este laboratorio de acuerdo a un método descrito (Burgess y Jendrisak, 1975).

2. Reactivos

De Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A., se obtuvieron los siguientes reactivos: ATP, EDTA, Tris, HEPES, PPO, POPOP, 2-ME, SDS, DTT, Sigmacote y cloramfenicol. De Merck, Darmstad, Alemania Federal, se obtuvo glicerol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, glutaraldehido, hidroxido de sodio, cloruro de manganeso, etanol, cloroformo, ácido clorhídrico, ácido acético, metanol, fenol y glucosa. De Fluka AG., Buchs S. G., Suiza se obtuvo L-leucina. N,N'-metilen-bis-acrilamida, acrilamida y persulfato de amonio fueron adquiridos de Bio Rad, California, USA. De MCB, EE.UU., provino formamida. De Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kent, Inglaterra, se obtuvieron los filtros de fibra de vidrio GF/C y discos

de DEAE celulosa DE-81. De Millipore Corporation, Massachusetts, USA, provinieron los filtros de nitrocelulosa HAWP 025. Agarosa se obtuvo de SeaKem, Rockland, USA. A Mallinkrodt Inc., USA se le compró fosfato dibásico de sodio y amonio, cloruro de magnesio, ácido bórico, acetato de sodio y fosfato mono- y dibásico de potasio. De Difco Lab., USA, se obtuvo extracto de levadura, triptona, casaminoácidos y agar; Sacarosa fue de Schwarzmann, USA; alcohol isoamílico de BDH Chemicals Ltd.; bromuro de etidio y ribonucleótidos provinieron de Calbiochem, USA. También de Bio Labs. se obtuvo DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII y DNA del bacteriófago OX174 digerido con HaeIII. De Amersham International Ltd., Inglaterra se obtuvo (α - 32 P)-GTP (410 Ci/mmol), (5,6- 3 H)-UTP (50 Ci/mmol), (α - 32 P)-dCTP (>400 Ci/mmol) y L-(3- 3 H) serina (29 Ci/mmol). Se compró a New England Nuclear, Boston, (8,5'- 3 H)-dGTP (43 Ci/mmol) y (5,5'- 3 H)-dCTP (61,1 Ci/mmol). (γ - 32 P)-ATP se obtuvo de ICN. Las placas X-Omat-AR, revelador D-11 y película Kodak Panatomic fueron compradas a Eastman Kodak, Co., EE.UU. Además se obtuvieron placas autorradiográficas de Fuji Photo Film Co., Ltd., Japón y la Película Polaroid 4x5 Landfilm tipo 55 se adquirió en Polaroid, EE.UU.

1. CRECIMIENTO DE *THERMUS TERMOFILUS* HB8

Este microorganismo fue obtenido de la colección ATCC (Nº27634), y se creció según lo recomienda el proveedor (6 g de polipeptona, 4 g de extracto de levadura y 3 g de cloruro de sodio por litro de solución, pH 7,5 ajustado con hidróxido de sodio). Las bacterias se cultivaron a 60°C hasta fase logarítmica temprana ($D.O._{600nm} = 0,7$) o tardía ($D.O._{600nm} > 1,5$), se colectaron por centrifugación (8000 rpm. por 15 min en el rotor GSA, centrifuga Sorvall) y se guardaron congeladas a -20°C.

2. MANTENCION DE LAS CEPAS

Thermus termophilus HB8 y *Escherichia coli* HB101, se mantuvieron en placas de agar 2% preparadas en medio Luria 2X (1 lt de Luria 2X contiene triptona 2 g, cloruro de sodio 1 g, extracto de levadura 1 g, glucosa 0,5%) incluyendo ampicilina 40 ug/ml, o bien las cepas se guardaron en glicerol al 50% a -20°C siguiendo el siguiente procedimiento: Entre 0,5 y 1 ml de cultivo, crecido hasta fase estacionaria, se mezcló con glicerol, previamente esterilizado, de tal manera de obtener una concentración final de glicerol de 50%. Se dejaron a temperatura ambiente al menos por seis horas y luego a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, las cepas fueron guardadas a -20°C, situación en la cual se mantuvieron viables al menos por 6-8 meses.

3. PURIFICACION DEL DNA CROMOSOMAL DE *T.TERMOFILUS*

Se empleó un procedimiento que corresponde a una variación del método descrito por Marmur (1961). Cantidades variables de células (2-10 g peso húmedo) se resuspendieron en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a razón de 2 ml por gramo de células y se trataron con lisozima 1 mg/ml por 15 min a 0°C. Luego, se agregó EDTA 1 mM final y se prolongó la incubación por otros 5 minutos. A continuación

se adicionó SDS 1% final calentándose la muestra a 60°C por 5 min, la que luego de ser enfriada, se extrajo tres veces con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), separándose las fases por centrifugación. A la fase acuosa resultante, enfriada a 0°C, se añadió acetato de sodio 0,3 M final y luego por las paredes del recipiente, 2,5 volúmenes de etanol enfriado previamente a -10°C, cuidando de no mezclar las fases. Con una bagueta se procedió a enrollar los ácidos nucleicos, que precipitan en la interfase al ir mezclandolas suavemente. El material precipitado fue secado al aire para extraer el alcohol y se resuspendió en 5 ml de TE. A esta solución se agregó ribonucleasa A, previamente hervida por 3 min., a una concentración final de 0,2 mg/ml y se incubó por 20 min. a temperatura ambiente. La muestra se desproteinizó con un volumen de fenol saturado en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y luego con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico como se describió anteriormente. La fase acuosa resultante se precipitó con isopropanol y se resuspendió en solución TE para obtener aproximadamente 1 mg/ml de DNA.

4. FORMACION DE UNA GENOTECA CON EL DNA CROMOSOMICO DE *T. TERMOPHILUS*

Diez microgramos del DNA cromosomal aislado como se ha descrito en 3 se digirieron con la enzima de BamHI. En forma paralela se digirió, también con BamHI, 10 ug del plasmidio pBR322 (Bolívar y col., 1977) y se desforilaron los extremos 5' mediante la enzima fosfatasa alcalina (BAP) de la misma manera que se hace con el DNA para marcarlo con ³²P-ATP (ver Métodos 11.1). Se mezclaron ambos DNA y se ligaron sus extremos agregando DNA ligasa del fago T4. Se detuvo la reacción de ligación mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y el DNA se precipitó con etanol, disolviéndolo finalmente en 50 ul de TE. Se transformó la cepa HB101 de *E. coli* con 1 ug del DNA ligado y se aislaron 150 clones recombinantes resistentes a

ampicilina y sensibles a tetraciclina. La metódica para preparar las células competentes fue la descrita por Morrison (1979). El DNA plasmidial de 125 colonias se purificó como se describe en 6.

5. CRECIMIENTO DE *E. COLI* CON PLASMIDIOS HIBRIDOS Y AMPLIFICACION.

Se inocularon 10 ml de medio Vogel Bonner (0,2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2 g ácido cítrico $\times H_2O$, 10 g KH_2PO_4 anhidro, 3,5 g $NaNH_4HPO_4 \times 4H_2O$) suplementado con 0,5% glucosa, 0,01% L-leucina, 0,002% tiamina, 0,25% casaminoácidos y 0,004% ampicilina, los que fueron esterilizados separadamente en autoclave o por filtración según corresponda. Los inóculos se crecieron a saturación toda la noche a 37°C, con agitación. Los 10 ml de inóculo se incorporaron a 1 litro de medio Vogel Bonner y se siguió creciendo hasta una $D.O._{600nm}$ de 1,0. Se añadió cloramfenicol hasta una concentración de 0,25 mg:ml y se siguió agitando vigorosamente por 16 h. Finalmente, las células se colectaron por centrifugación a 10.800xg por 10 min, siendo usadas de inmediato o congeladas a -70°C.

6. PURIFICACION DE LOS PLASMIDIOS RECOMBINANTES.

El método descrito corresponde al publicado por Meagher y col. (1977). Las células congeladas provenientes de 1 litro de cultivo se resuspendieron en 10 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), sacarosa 25%. Se agregó 4 ml de EDTA 0,25 M, 2 ml de lisozima 5 mg/ml y se agitó suave y periódicamente a 4°C por 15 min. Luego se añadieron 16 ml de mezcla lítica (Tris-HCl 0,15 M pH 8,0, EDTA 0,1 M, Tritón X-100 0,03%) y se mantuvo en hielo por 15 min con agitación suave y ocasional. Las células lisadas fueron centrifugadas a 105.000xg por 60 min a 4°C para separar los restos celulares y el DNA cromosomal de los ácidos nucleicos

extracromosomales. El sobrenadante de la ultracentrifugación se desproteinizó con igual volumen de fenol (saturado en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM, 8-hidroxiquinolina 0,1%) e igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se separaron las fases por centrifugación (1.500xg por 10 min). Se retiró la fase acuosa (donde está el DNA) y se eliminaron los restos de fenol extrayendo con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Los ácidos nucleicos se precipitaron agregando 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,5) y 2,5 volúmenes de etanol al 95%. Se dejó a -70°C al menos por 2 h. Se centrifugó a 16.300xg por 30 min a 0°C y el precipitado seco se resuspendió en TE. Se agregó RNasa 0,25 mg/ml, EDTA 0,25mM y se incubó toda la noche a 37°C .

El DNA extracromosomal se separó del RNA remanente por filtración en una columna de agarosa (Biogel A-5m) de 25x1,5 cm con un flujo de 48 ml/hora, equilibrada con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,6 M, EDTA 2,5 mM, colectándose fracciones de 1 ml. Se localizó el DNA extracromosomal midiendo la O.D_{260} . Se eliminó la posible presencia de RNasa en las fracciones haciendo una extracción con igual volumen de fenol saturado e igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó para separar las fases (1.500xg por 10 min) y, se eliminaron los restos de fenol de la fase acuosa con una nueva extracción con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se precipitó incorporando 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,5) y dejando a -70°C por 2 h. Se centrifugó a 16.300xg por 30 min a 0°C y el precipitado se resuspendió en TE, luego de secarlo al vacío, para obtener una concentración final de DNA de entre 0,5 y 1 mg/ml. Se verificó la pureza del plasmidio mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, observándose una banda principal correspondiente al DNA sobreenrollado y dos bandas menores correspondientes al DNA

relajado y lineal. La concentración del DNA se calculó sabiendo que 1 mg/ml de DNA tiene una D.O._{260nm} de 20 (Maniatis, Fritsch y Sambrook, 1982).

7. DIGESTIONES DEL DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

7.1 Analíticas. Se realizaron incubando 1 ug de DNA con 1-2 unidades de la enzima de restricción, en presencia de la solución amortiguadora que recomienda el proveedor, en un volumen final de 20 ul. Se incubó por 1 h a 37 o 60°C dependiendo de la enzima. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en geles de agarosa, como se describe en 8.1.

7.2 Preparativas. Se incubaron cantidades variables de DNA (0,1-0,3 mg), según los propósitos, con 25-75 unidades de enzima. Esta digestión se realizó por 4-5 hrs. Al cabo de este tiempo se verificó el grado de digestión por electroforesis, para lo cual se tomó una alicuota correspondiente a 1 ug de DNA y se sometió a electroforesis, en un gel de agarosa o de poliacrilamida. Cuando la digestión era incompleta se agregaba más enzima y se continuaba la incubación por 1-2 hrs o más si era necesario, en que se volvía a probar el grado de digestión. En caso de digestión completa, los fragmentos se separaron por electroforesis en geles preparativos.

8. ELECTROFORESIS DEL DNA

8.1 Geles de agarosa. Para separar los fragmentos mayores de DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1,8% en solución TEA (Tris 40 mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM, pH 8,0 ajustado con ácido acético glacial) y de 1,5 mm de espesor (analíticas) o de 3 mm de espesor (preparativas). Los geles se corrieron a 75 mA (160 V) (analíticos) o a 50 mA (50 V) (preparativos) usando TEA como amortiguador de electroforesis. Previo a colocar las

muestras, estas se calentaron durante 10 min a 60°C en presencia de 1/2 a 1/4 del volumen de solución desnaturante (glicerol 25%, SDS 0,5%, azul de bromofenol 0,025%, EDTA 12 mM).

8.2 Geles de poliacrilamida. Para separar los fragmentos de DNA de menor tamaño se usaron geles de poliacrilamida al 5 o 7%. La solución madre contenía 30% de acrilamida y 0,8% de bisacrilamida. Se tomó una alícuota de la solución madre y se adicionó 1/10 del volumen final de TBE 10 X (Tris HCl 0,9 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM, pH 8,3), 1 ml de persulfato de amonio 10% y agua para completar el volumen; el aire atrapado en la solución se extraía con vacío. Luego, se agregó 50 ul de TEMED y se depositó la solución entre las placas de vidrio, donde se dejó polimerizar por 45 min. El tratamiento de las muestras fue similar al descrito en 8.1 y ellas penetraron al gel a 25 mA. La solución amortiguadora de la electroforesis fue TBE 1X y el procedimiento se realizó por 3-4 hrs.

9. VISUALIZACION DEL DNA

Las bandas de DNA se observaron tiñendo los geles con una solución de bromuro de etidio 1 ug/ml, por 10 min, y se observaron en un transiluminador UV. Ocasionalmente se fotografiaron bajo luz UV usando placas Polaroid Tipo 55. Para los geles preparativos se empleó la misma técnica, siendo la solución de bromuro de etidio 0,2 ug/ml y el tiempo máximo de tinción 5 min. Alternativamente se usó la técnica del sombreado de UV depositando el gel sin teñir sobre una placa de TLC de silica gelcon indicador UV e iluminando con una lámpara portátil UV de longitud de onda corta (210 nm). El DNA se observaba como una sombra sobre el fondo coloreado del indicador.

10. ELECTROELUCION

Después de efectuada la electroforesis, la región que contenía el DNA se cortó con un bisturí y se colocó en una bolsa de diálisis de 1/4 de pulgada de diámetro, que contenía TE. La bolsa se colocó en una cámara horizontal con electrodos separados 8 cm y se electroeluyó el material contra 500 ml de TEA 0,25X, durante 16 hrs a 75 mA, a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, la polaridad de la fuente fue invertida brevemente, aplicándose el mismo amperaje por 1 min, luego de lo cual se dejó reposar durante 15-20 min a temperatura ambiente. El electroeluido fue recuperado de la bolsa de diálisis y centrifugado a 12.000xg por 10 min, con el objeto de eliminar los residuos de agarosa o poliacrilamida que permanecen en suspensión. Posteriormente se extrajo el DNA una vez con fenol y una vez con cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y se precipitó con etanol como ya se ha descrito. El precipitado se resuspendió en 100-500 ul de TE y se comprobó la integridad del DNA electroeluido por electroforesis.

11. SECUENCIACION DEL DNA

Se realizó según el método de Maxam y Gilbert (1980), con algunas modificaciones. El método consta de varias etapas que se describen separadamente.

11.1 Marcación de los extremos 5' del DNA

con ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP. La marcación de dichos extremos se realizó mediante un procedimiento que consta de dos etapas:

a) Desforilación. Aproximadamente 50-100 μg de DNA se disolvieron en 250 μl de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Se agregaron 3 U de CIAP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera) o de BAP (fosfatasa alcalina de bacteria), incubándose por 30 min a 60°C. Se volvió a adicionar 3 U de enzima y se repitió la incubación en las mismas condiciones anteriores. Luego se realizaron tres extracciones con fenol saturado y una con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó agregando etanol y acetato de sodio y dejando en hielo seco/etanol por 10 min, después de lo cual se centrifugó a 12.000xg por 10 min en microcentrifuga Eppendorf.

b) Fosforilación con ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP. El precipitado de la etapa anterior se disolvió en 22 μl de agua destilada estéril. Se agregaron 4 μl de amortiguador-quinasa 10 X (Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 MgCl_2 100 mM, DTT 50 mM y espermidina 1 mM). Esta mezcla se agregó a un tubo Eppendorf donde previamente se había concentrado 0,5-1 mCi de ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP hasta aproximadamente 10 μl . Se adicionó dos veces 10 U de polinucleótido quinasa del fago T4 (2 μl) incubando 15 min a 37°C cada vez. Luego de diluir con 160 μl de agua destilada y tomar 2 μl para comprobar la marcación por electroforesis, la reacción se detuvo agregando acetato de sodio y etanol, para precipitar el DNA como se ha descrito. El DNA se centrifugó y se resuspendió en agua y se volvió a precipitar con etanol. El sedimento se secó brevemente en centrifuga-evaporador al vacío (Speed-vac) para retirar el etanol, antes de disolver en la

solución adecuada para la digestión secundaria o la separación de las hebras marcadas del DNA.

c) Obtención del DNA marcado con ^{32}P en un sólo extremo. El DNA con ambos extremos 5' marcados con ^{32}P , se sometió a una digestión preparativa con una enzima de restricción, previamente determinada que producía a partir del fragmento original de DNA, dos subfragmentos con marca en uno sólo de sus extremos 5', los que además eran separables fácilmente mediante geles de agarosa o poliacrilamida. Dichos fragmentos se recuperaron por electroelución y se resuspendieron en 42 ul de agua destilada estéril.

11.2. Reacciones de secuencia.

i) Reacciones para G: En un tubo Eppendorf se preparó la mezcla de reacción compuesta por 300 ul de solución DMS (Cacodilato de sodio 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) y 5 ul de DNA marcado (aproximadamente entre 100.000 y 200.000 cpm Cerenkov). Se enfrió a 0°C y se adicionaron 2 ul de dimetil sulfato, incubándose por 5-6 min a 20°C. Se agregaron 50 ul de solución para detener la reacción de DMS (acetato de sodio 1,5 M, pH 7,0, 2-ME 1 M, tRNA de *E. coli* 100 ug/ml) y 1 ml de etanol. Se dejó precipitar por 5 min en baño de hielo seco/etanol.

ii) Reacción para A+G: En este caso la mezcla de reacción está compuesta por 10 ul de DNA marcado (el doble del usado en la reacción anterior). Se enfrió a 0°C y se agregaron 25 ul de ácido fórmico concentrado, incubándose por 10 min a 20°C. Esta reacción corresponde a una modificación del método de Maxam y Gilbert. Se añadieron 200 ul de solución HZ (Acetato de sodio 0,3 M, EDTA 0,1 mM y tRNA de *E. coli* 1 mg/ml) y 750 ul de etanol, precipitándose por 5 min en baño de hielo seco/etanol.

iii) Reacción para T+C: En un tubo Eppendorf se mezcló 10 ul de DNA marcado y 10 ul de agua destilada estéril. Se enfrió a 0°C y se agregaron 30 ul de hidrazina 100%. Se incubó por 12 min a 20°C, deteniéndose la reacción con 200 ul de la solución empleada para este mismo fin en el

punto anterior. Se precipitó con 750 ul de etanol, manteniéndose por 5 min en baño de hielo seco/etanol.

iv) Reacción para C: La mezcla se compone de 5 ul de DNA marcado y 10 ul de NaCl 5 M. Se enfrió a 0°C y se agregaron 30 ul de hidrazina 100%, incubándose 15 min a 20°C. La reacción se detuvo como en el caso anterior y se precipitó en las mismas condiciones señaladas.

v) Reacción para A+C: A 10 ul de DNA marcado se le agregaron 50 ul de una solución de NaOH 2,4 M, EDTA 2 mM y 40 ul de agua destilada estéril. La mezcla de reacción se calentó a 90°C por 10 min y se detuvo la reacción añadiendo 150 ul de ácido acético 1 M y 5 ul de tRNA de *E. coli* 1 mg/ml. Se precipitó como antes.

Las siguientes etapas de este procedimiento son comunes a todas las reacciones y consisten de los siguientes pasos: Se centrifugaron todas las muestras por 5 min en microcentrifuga Eppendorf. Los tubos se enfriaron en hielo seco/etanol y se centrifugó como antes. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 250 ul de acetato de sodio 0,3 M y se precipitó nuevamente con 750 ul de etanol. Se enfrió en baño seco/etanol por 5 min y se volvió a centrifugar dos veces como antes. Se lavó el sedimento con 1 ml de etanol y después de centrifugar como ya se ha descrito, se secó brevemente al vacío. A cada muestra se le agregó 100 ul de piperidina 1 M y se incubó a 90°C por 30 min. Las muestras se liofilizaron, se agregaron 100 ul de agua destilada estéril a cada muestra y se volvió a liofilizar. Esta última operación se repitió 4 veces. Después de la última liofilización se resuspendió cada muestra en solución de carga (azúl de bromofenol 0,025%, xilencianol 0,025% y formamida desionizada 90%), para iniciar la electroforesis. Las muestras se calentaron 1 min a 90°C, se enfriaron rápidamente y se aplicaron al gel en un volumen no mayor de 3 ul y tal de cargar 10.000 a 20.000 cpm Cerenkov por cada reacción.

11.3 Electroforesis para secuenciación de DNA. Se emplearon geles desnaturantes de poliacrilamida al 10 ó 15% con urea 8 M. En todos los casos se prepararon 100 ml de mezcla, para lo cual se tomó una alícuota de una solución de acrilamida-bisacrilamida 30:1,5%. Se agregaron 10 ml de TBE 10 X, 50 g de urea y agua. Se disolvió calentando a 60°C y se filtró por papel Whatman 3MM. Se adicionó a la mezcla 0,8 ml de persulfato de amonio al 10% y se sometió a vacío para extraer las burbujas de aire. Se añadió a la solución TEMED (15 ul para geles al 15% y 50 ul para geles al 10%), con lo cual se inició la polimerización. La solución fue vertida rápidamente entre las placas de vidrio, una de las cuales había sido previamente siliconizada con sigmacote. El gel se dejó polimerizar por 1 hr. Las dimensiones de los geles fueron 42,5 cm de largo por 34,5 cm de ancho 0,04 cm de espesor. La solución amortiguadora de electroforesis fue TBE 1 X. Previo a la corrida, los geles se precorrrieron por espacio de 30 min a 1500 volts para aumentar su temperatura. Las muestras se trataron como ya se ha descrito, depositándose para la electroforesis 2-3 ul de ellas, y aplicando 1200-1500 volts. Se efectuaron, en cada caso, dos cargas de cada muestra, separadas en el tiempo, efectuándose la segunda aplicación cuando el colorante xilencianol alcanzó la mitad del gel, para los geles al 15% o, en el caso de geles al 10%, cuando el colorante xilencianol llegó al final del mismo. La electroforesis se detuvo cuando el azul de bromofenol de la última carga alcanzó la mitad del gel (para geles al 15%) o el final de este (para geles 8-10%).

11.4 Autorradiografía. Al final de la electroforesis, el gel se desmontó cuidadosamente removiendo el vidrio siliconizado y, luego de cubrirlo con papel de celulosa (Saran Wrap), se lo expuso a autorradiografía a -70°C utilizando un film de rayos XOMat AR o Fuji y una pantalla intensificadora Du Pont. El tiempo de exposición varió entre 2 y 3 días y las películas se revelaron usando revelador

Kodak D-10 por 5 min y fijador universal. La película se lavó con agua destilada por 2-3 horas y se secó.

12. PURIFICACION DE LOS tRNAs DE *T. THERMOPHILUS*

Se resuspendieron 10 g de *Thermus thermophilus* en 10 ml de Tris HCl 1 mM, acetato de magnesio 10 mM, pH 7,4. Se agregaron 20 ml de fenol y se agitó durante 40 min. La emulsión se centrifugó por 20 min a 8.000 rpm en una centrifuga Beckman, rotor SS34. Se removió la fase acuosa superior, que contenía el tRNA, y éste se precipitó agregando 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol (previamente enfriado a -70°C). Se dejó por lo menos una hora a -70°C . El precipitado se colectó por centrifugación a 8.000 rpm por 20 min en el rotor HB4 de la centrifuga Sorvall. Se resuspendió el precipitado en 10 ml de NaCl 1 M, agitando con una bagueta. Se centrifugó en el rotor HB4 a 8.000 rpm por 20 min. Al precipitado se le agregaron 5 ml de NaCl 1 M y se procesó como antes. Se juntaron ambos sobrenadantes. Se agregaron dos volúmenes de etanol y se dejó a -70°C por al menos una hora. El precipitado de la etapa anterior se colectó, centrifugando a 8.000 rpm por 20 min, y se resuspendió en 7 ml de acetato de sodio 0,3 M pH 7,0; se agitó en cámara fría y se le fue agregando, lentamente (una gota por segundo), 0,54 vol de isopropanol. Una vez que se agregó todo el volumen de isopropanol se continuó agitando a 20°C . La suspensión resultante se centrifugó a 8.000 rpm por 10 min (rotor HB4) a 20°C . El sobrenadante se guardó. EL precipitado se resuspendió en 3,5 ml de acetato de sodio 0,3 M pH 7,0 y se agregó nuevamente 0,54 vol de isopropanol y se procedió como antes. Se juntaron ambos sobrenadantes y el tRNA se precipitó agregando 0,09 vol de isopropanol; se enfrió y se centrifugó a 8.000 rpm en rotor HB4 por 10 min; el sobrenadante se descartó; el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. El tRNA se guardó a -70°C . El rendimiento fue de 25 mg a partir de 10 g de células.

13. MARCACION DEL tRNA DE *T. THERMOPHILUS* CON (γ - 32 P)-ATP

Con el fin de sacar el grupo fosfato presente en el extremo 5' del tRNA, se incubaron 20 ug de tRNA con 3 U de fosfatasa alcalina (CIAP) por 1 hr a 37°C, en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM. Para inactivar y extraer la fosfatasa se realizaron tres extracciones con fenol e igual volumen de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1). El tRNA se precipitó con 750 ul de etanol frio. Se mantuvo en baño de hielo seco/etanol por 10 min. Se centrifugó en microcentrifuga Eppendorf por 5 min. El tRNA sedimentado se secó al vacío y se resuspendió en Tris-HCl 0,55 M, pH 7,4, MgCl₂ 0,1 M, DTT 0,05 M.

Por otra parte, se secó aproximadamente 1 mCi de (γ - 32 P)-ATP y se resuspendió en 60 ul de agua destilada. Se agregó el tRNA sobre el ATP radiactivo y se llevó a un volumen final de 200 ul con agua destilada. Se adicionaron 10 U (2 ul) de polinucleótido-quinasa de fago T4 y se incubó por 15 min a 37°C. Al cabo de este tiempo, se agregaron 2 ul más de enzima y se incubó en las mismas condiciones anteriores. La reacción se detuvo adicionando 20 ul de acetato de sodio 3 M y 750 ul de etanol, dejándose precipitar por 1 hr a -70°C. Se centrifugó en microcentrifuga; se secó el sedimento y se resuspendió en 200 ul de SSC 0,1X (SSC 1X es cloruro de sodio 0,15 M, citrato de sodio 15 mM).

Con el fin de separar el tRNA marcado del isótopo libre, se preparó una columna de Sephadex G-75 de 10 ml (pipeta plástica desechable), equilibrada en SSC 0,1 X. Se aplicó la muestra a ella y se eluyó con la misma solución, colectándose fracciones de 10 gotas en tubos Eppendorf. Se contó 1 ul de cada fracción en el contador de centelleo, usando radiación Cerenkov, y las fracciones con mayor radioactividad, correspondientes al primer pico eluido se juntaron (1,2 ml), precipitándose con 2,5 volúmenes de etanol y manteniéndose a -70°C durante la noche. Se centri-

fugó a 11.000 rpm por 40 min en Sorvall RC2B, rotor HB4, después de lo cual el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 0,5 ml de agua destilada. El tRNA marcado se obtuvo con una actividad específica de 80000cpm/ug y se guardó a -20°C.

14. SEPARACION MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LOS tRNA DE *THERMUS THERMOPHILUS*

Los tRNA de *Thermus thermophilus* purificados por el procedimiento anterior se separaron de acuerdo a Burkard y col. (1982) con menores modificaciones. 500 ug de tRNA se sometieron a electroforesis en una primera dimensión en un gel que contenía poliacrilamida al 10%, y en seguida en una segunda dimensión en un gel al 20%.

Primera dimensión: Se utilizó un gel de 30 cm de ancho por 40 de alto y 3 mm de espesor. Gel concentrador: acrilamida 4,8%, bisacrilamida 0,2%, Tris-HCl 0,6 mM, pH 6,8, urea 50%, persulfato de amonio 0,2% y TEMED 15 ul, en un volumen final de 30 ml. Gel separador: acrilamida 9,7%, bisacrilamida 0,5%, TBE 1x, urea 50%, persulfato de amonio 0,07% y TEMED 30 ul, en un volumen final de 150 ml. La electroforesis se realizaba a 900 volts hasta que el colorante xilencianol había migrado 30 cm en el gel separador. La franja de poliacrilamida se cortaba y se ponía longitudinalmente, de tal manera que ahora la electroforesis se realizaba perpendicular a la dirección anterior.

Segunda dimensión: Gel concentrador: acrilamida 2,4%, bisacrilamida 0,1%, Tris-HCl 0,6 mM, pH 6,8, urea 50%, persulfato de amonio 0,2% y TEMED 15 ul, en un volumen final de 30 ml. Gel separador: acrilamida 19%, bisacrilamida 1%, TBE 1x, urea 50%, persulfato de amonio 0,07% y TEMED 23 ul, en un volumen final de 240 ml. La electroforesis se realizaba a 900 volts hasta que el colorante xilencianol había migrado 70 cm en el gel separador.

15. AMINOACILACION DEL tRNA

15.1 Purificación de la sintetasa. Se usó el procedimiento de Nishimura y col. (1967). Se resuspendieron de 10 g de células de *T. thermophilus* en 10 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, MgCl₂·CH₃COO 10 mM, 2-ME 6 mM y KCl 60 mM. Las células se rompieron dándoles 5 golpes en una juguera a la máxima velocidad. El homogeneizado se centrifugó a 30.000 rpm por 180 min en el rotor Ty-35 de la ultracentrifuga Beckman L5-40. El sobrenadante se sometió a cromatografía en una columna de DEAE-celulosa de 1.3x17 cm de alto, equilibrada con la solución anterior. La actividad fue eluida con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Se juntaron las fracciones con mayor absorbancia a 280 nm y se precipitó la actividad aminoacil-sintetasa agregando sulfato de amonio al 75% de saturación. El precipitado se resuspendió con la solución de resuspensión celular y se dializó contra la misma solución por 18 horas. Se mezcló con igual volumen de glicerol y se guardó a -20°C.

15.2 Aminoacilación de los tRNAs. El ensayo se hacía en un volumen de 100 ul que contenía: BICINE 60 mM, pH 7,8 a 60°C, ATP 5 mM, DTT 0,1 M, MgCl₂ 12 mM, tRNA total 0,4 mg, aminoacil-tRNA sintetasa 10 ul y L (3-³H)-serina 1-3 uCi. Se incubaba a 65°C por 15 min. La solución se ponía sobre un círculo de fibra de vidrio, y se lavaba tres veces con TCA al 5%, cada vez por 15 min. Se secaba lavando con etanol y se contaba en un contador de centelleo.

16. HIBRIDACION DNA-RNA

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Southern (1975):

i) Se transfirieron los fragmentos de DNA, producidos en la digestión con las enzimas de restricción y separados en geles de agarosa o poliacrilamida, a filtros de nitrocelulosa (Millipore GSWF304 FO, 45 u). Para ello, después de

la electroforesis, y con el fin de desnaturar el DNA, los geles se someten a un tratamiento con una solución de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M por 1 hr. Luego se neutraliza con Tris-HCl 0,5 M, pH 7,0, NaCl 3M, durante 30 min. El gel así tratado, se coloca sobre papel filtro Whatman 3 MM, cuyos extremos se encuentran inmersos en un recipiente que contiene solución SSC 20 X (cloruro de sodio 3 M, citrato de sodio 0,3 M). El filtro de nitrocelulosa, del mismo tamaño que el gel, se coloca sobre éste y encima de él se pone papel absorbente, creando así un flujo ascendente de SSC 20 X, el cual posibilita el traspaso del DNA del gel al filtro. Esta operación se realizó durante 3 días, a temperatura ambiente. Luego, los filtros se secaron por 3 hrs, en vacío y a 80°C. Cuando el DNA a traspasar es de alto peso molecular es recomendable tratar el gel con HCl 0,1 N por 20 min, previo al proceso de desnaturación. De este modo se rompe el DNA y la eficiencia de la transferencia es mayor.

ii) El filtro tratado de este modo se puso en una bolsa plástica sellable por calor y se agregó una solución de prehibridación cuya composición es: SSC 3 X, Denhardt 1 X (Ficoll 0,02%, albúmina de suero de bovino 0,02%, polivinilpirrolidona-360 0,02%), SDS 0,5%, DNA sonificado de espermio de salmón 0,1 mg/ml, incubando el filtro a 40°C por 6-24 horas. Posteriormente, se reemplazó esta solución por una solución de hibridación igual a la anterior, pero conteniendo además formamida 50% y el tRNA marcado (aproximadamente $3,2 \times 10^7$ cpm), obtenido por el procedimiento descrito en Métodos 13. La hibridación se realizó por 48-72 horas a 42°C. Al cabo de este tiempo, los filtros se sometieron a una serie de lavados que incluyen: una vez en SSC 2 X por una hora a temperatura ambiente; 4 lavados de 30 min cada uno en SSC 6 X con SDS 0,5% a 68°C y de nuevo lavado con SSC 2 X a temperatura ambiente. Luego, se dejaron secar al aire, sobre un papel filtro Whatman 3MM.

iii) Finalmente, se realizó una autorradiografía con pantalla intensificadora por 4-6 días a -70°C.

17. PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA DE *THERMUS THERMOPHILUS*.

17.1. Ruptura celular. Cincuenta gramos de células congeladas de *T. thermophilus* HB8 colectadas en fase estacionaria, se resuspendieron en 220 ml de solución TESM (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 25% ,2ME 5 mM pH 8,0) y se rompieron agregando 94 mg de lisozima y 0,0005% de Brij 58. Se incubó por 30 min en hielo. Para romper el DNA cromosomal, se sonicó la solución, manteniéndola en hielo, con un aparato Biosonic model II, a máxima potencia durante 1 min, con 1 min de descanso, repitiéndose el procedimiento 10 veces. Se centrifugó a 105.000xg durante 60 min en ultracentrífuga Beckman L540, rotor Ti35. El pellet fue descartado.

17.2. Precipitación con protamina. El sobrenadante se diluyó con solución A (Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, 2ME 3 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8,0 a 4°C) para tener 29 mg/ml de proteína y se precipitó agregando sulfato de protamina a una concentración final de 0,1%. Se centrifugó, descartándose el sobrenadante, y el sedimento se extrajo con 500 ml de sulfato de amonio 80 mM en solución A. El extracto fue dializado contra la solución B (Tris-HCl 40 mM, EDTA 0,1 mM, 2ME 5 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8,0 a 4°C).

17.3. Cromatografía en DEAE Sephadex A-50. El extracto fue puesto en una columna ancha (6,5 x 6,8 cm) que contenía DEAE-Sephadex A-50, equilibrada con solución A. Después de cargar la muestra, la columna fue lavada con 2000 ml de solución A + KCl 0,11 M. La actividad fue eluída con un gradiente salino 0,11-0,4 M KCl (600 + 600 ml). Se colectaron fracciones de 8 ml y se juntaron aquellas con mayor actividad enzimática.

17.4. Cromatografía en DNA celulosa. Se usó una columna de 60 ml (jeringa de plástico), la que fue equilibrada con solución A. Se diluyó la enzima que provenía del paso anterior con solución A, con el fin de obtener una conductancia

de 4,9 mmho antes de cargar. La enzima fue eluida con un gradiente lineal de KCl de 0,1 a 1 M (120+120 ml). Se colectaron fracciones de 3,2 ml. Después de este paso la enzima estaba en un estado de pureza mayor de un 95% en base a análisis de geles de poliacrilamida-SDS.

18. ENSAYO DE ACTIVIDAD

La mezcla contenía, en un volumen final de 60 ul: BICINE 50 mM, pH 8,0 (a 60°C), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP, CTP y GTP 0,4 mM, UTP 0,01 mM, (5,6-³H)-UTP (10⁵ cpm/ensayo), DNA de timo de ternera 2,4 ug, MnCl₂ 2 mM, EDTA 0,02 mM y enzima (1-10 ug). Se incubó a 60°C por 10 min. Se tomaron alícuotas de 50 ul, las que se ponían en un disco de papel DE-52. Se retiró del papel el isótopo que no se había incorporado en el RNA, mediante 3 lavados en Na₂HPO₄ 4%, seguidos de 2 lavados en agua y dos lavados en alcohol. Los filtros se secaron bajo luz infrarroja, y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

19. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEINAS

Los geles para la electroforesis de proteínas en condiciones desnaturantes se prepararon según técnica descrita. (Laemmli, 1970). La dimensión de los geles fue de 18 cm X 16 cm X 0,15 cm. EL gel de concentración estuvo compuesto de acrilamida 5 %, N,N'metilenbisacrilamida 0,1%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,05% en Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. La composición del gel de resolución (30 ml) fue la siguiente: acrilamida 10 %, N,N'metilenbisacrilamida 0,27 %, SDS 0,1 %, persulfato de amonio 0,033 % y TEMED 0,03 % en Tris-HCl 0,37 M, pH 8,8. El amortiguador de electroforesis estuvo compuesto de Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% a pH 8,3. La migración en el gel concentrador se realizó a una corriente constante de 8 mA y en el gel de resolución a 25 mA. Las muestras

proteicas se disolvieron en Tris-HCl 0,125 mM, pH 8,0, SDS 4%, glicerol 20%, DTT 0,1 M y azul de bromofenol 0,013%. Las muestras se aplicaron después de calentarlas en a 100°C por 3 minutos. Los geles se tiñeron y fijaron por una hora con azul de coomassie R-250 al 0,1%, disuelto en una solución que contenía ácido acético glacial al 10% y metanol al 45%. Se destiñeron con una solución de ácido acético al 7% y metanol al 20%, por 24 horas aproximadamente, con agitación suave.

20. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

20.1. Ensayo de transcripción. Todos los elementos usados (soluciones, puntas desechables de pipeta, tubos de ensayo) fueron autoclavados a 120°C y 22 lb/pulg² por 30 min. Para el manejo de los materiales se usaron guantes. Para efectuar las transcripciones se emplearon las RNA polimerasas aisladas de *E. coli* y de *T. thermophilus*. La composición de los medios de ensayo para ambas enzimas era diferente, de modo que se detallaran por separado.

i) *E. coli*. La mezcla de reacción es básicamente la descrita por Burgess (1969) y contenía, en un volumen de 50 ul, PIPES 20 mM (pH 8,0 a 20°C), glicerol 20%, EDTA 0,2 mM, NaCl 0,18 M, DTT 1 mM, GTP 0,03 mM, ATP, CTP y UTP 0,6 mM, (α -³²P)-GTP 1 uCi, MgCl₂ 10 mM, DNA entre 0,035 ug y 1 ug y 6 ug de enzima. Se incubó a 37°C por 15 min.

ii) *T. thermophilus*. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 60 ul, BICINE 20 mM (pH 8,0 a 60°C), glicerol 5%, EDTA 0,07 mM, KCl 0,05 mM, DTT 1 mM, GTP 0,05 mM, ATP, CTP y UTP 1 mM, (α -³²P)-GTP 3 uCi, MgCl₂ 6,5 mM, MnCl₂ 3,8 mM, albúmina de suero de bovino 0,21 mg/ml, DNA entre 0,035 ug y 1 ug, y 2 a 3 ug de enzima purificada después de DNA-celulosa. Se incubó a 60°C durante 15 min.

20.2. Purificación del RNA. En ambos tipos de ensayo se siguió el siguiente procedimiento: se detuvo la reacción enfriando en hielo y se agregó 150 ul de TENS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 20 mM, NaCl 150 mM y 0,5% SDS) y 10 ug de tRNA de *E. coli* para ayudar a la precipitación del RNA sintetizado *in vitro*. Las proteínas se eliminaron extrayendo con 200 ul de fenol saturado y 200 ul de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se agitó y se centrifugó a 15.600xg en microcentrífuga Eppendorf por 15 min. La fase orgánica se reextrajo con 100 ul de TENS y se unió a la fase acuosa anterior. Se repitió la extracción con 200 ul de fenol y 200 ul de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. El fenol residual se eliminó con una nueva extracción con

200 ul de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. La fase acuosa se precipitó agregando 1 ml de etanol absoluto, y manteniéndola en hielo seco por 10 min. Se centrifugó a 15.600xg por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 200 ul de SDS 0,2% y 200 ul de acetato de sodio 0,2 M (pH 5,5). La mezcla se precipitó con 800 ul de etanol absoluto como se explicó más arriba. Se secó el precipitado al vacío y se resuspendió en una solución de formamida 90% (la formamida había sido previamente desionizada por agitación con la resina Bio Rex Rb 501-XB1), EDTA 1 mM, pH 8,0, xylene cyanol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%).

20.3. Análisis de los productos de transcripción. Los productos de transcripción fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea de 0,3 mm de espesor. Los geles contenían acrilamida al 5 ó 7%, bisacrilamida al 0,35%, urea 8 M y la solución de electroforesis que fue TBE 1X, la misma que se describe en Métodos 11.3.

Los geles se precorrieron 30 min a una potencia constante de 30 Watts. Previo a la carga, las muestras se desnaturaron calentándolas en un baño a ebullición por un minuto y enfriándolas bruscamente en hielo. La electroforesis se realizó también a 30 Watts hasta que el colorante azul de bromofenol hubo recorrido toda la longitud del gel (30 cm). Luego se desmontó el gel, se protegió con Saran Wrap y se expuso a una placa de rayos X Kodak X-Omat AR o Fuji, con pantalla intensificadora a -70°C.

21. ENSAYO DE RETENCION DEL COMPLEJO RNA POLIMERASA- PROMOTOR EN FILTROS DE NITROCELULOSA

21.1. Preparación de la enzima. Para los ensayos de unión se usó la RNA polimerasa purificada por una columna de DNA-celulosa (Métodos 16.4). La enzima, que corresponde al segundo pico, es la que transcribe específicamente el fragmento XhoI, ya que contendría la subunidad sigma. Fue necesario concentrarla varias veces y ésto se logró poniéndola dentro de una bolsa de diálisis y agregando, por fuera, polietilenglicol 6000, sólido. Posteriormente, y con el objeto de disminuir la concentración de cloruro de potasio, se dializó en un microdializador contra 100 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, EDTA 10 mM, 2ME 5 mM, durante 30 min. a 4°C. El proceso se realizó dos veces, agregando la última vez KCl 100 mM, para evitar precipitación de la enzima. Esta se concentró 13 veces, con un aumento de la actividad específica de 12,9 veces y una recuperación de 99,2%. La concentración de proteína se midió de acuerdo al micrométodo de Lowry modificado (Bensadoun y Weinstein, 1976), usando como patrón la albúmina de suero de bovino. La concentración de enzima que se usó en los ensayos de unión fue de 0,2 ug/ul. La pureza (>95%), se verificó en geles de proteína (Métodos 18), presentando las bandas típicas.

21.2. Preparación del DNA.

i) Marcación uniforme del fragmento XhoI con (³H)-dGTP y (³H)-dCTP. Se resuspendieron 4 ug del fragmento XhoI en solución Klenow (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM). Se agregó 1 ul (1-4 Unidades) del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se incubó a 37°C durante 8 min para permitir la acción de la actividad 3' exonucleasa de esta enzima. De inmediato se agregaron 10 ul de solución Klenow, la cual contenía 50 uCi de (³H)-dGTP, 50 uCi de (³H)-dCTP, dATP 0,1 mM y dTTP 0,1 mM. Se continuó la incubación por 8 min a 37°C. Se detuvo la reacción agre-

gando 30 μ l de una solución que contenía NaCl 0,1 M, SDS 0,5% y EDTA 25 mM y se mantuvo a 65°C durante 3 minutos.

ii) Purificación del fragmento marcado. Los nucleótidos libres fueron separados del DNA marcado mediante filtración en una columna de Biogel P-60, equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM. Se eluyó con la misma solución. Se colectaron fracciones de 200 μ l. Se analizaron alícuotas en el contador de centelleo para determinar la eficiencia de la marcación (aproximadamente 4×10^6 cpm/ μ g). Para verificar la integridad del DNA se realizó electroforesis en geles de agarosa 1%, tiñiendo con bromuro de etidio.

21.3. Formación de complejos RNA polimerasa-DNA. En un volumen de 100 μ l de una solución compuesta de HEPES 10 mM (pH 7,4 a 60°C), EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM y KCl 100 mM, se agregaron 20 ng del fragmento XhoI marcado con tritio (80.000 cpm) y RNA polimerasa concentrada de *Thermus thermophilus* y la mezcla se incubó a 60°C por 15 min. La cantidad de enzima usada en los ensayos posteriores se determinó mediante una curva de saturación de formación de complejos a 60°C (Figura 13). Normalmente se usó una razón molar enzima/DNA de 18/1. En otros casos la temperatura y tiempo de incubación fueron variables, de acuerdo a los objetivos de cada experimento.

21.4. Retención de complejos RNA polimerasa-DNA en filtros de nitrocelulosa. Una vez formados los complejos enzima-DNA, se llevó a 1 ml de volumen agregando 0,9 ml de solución de filtración que contenía HEPES 100 mM (pH 7,4 a 60°C), KCl 100 mM y EDTA 1 mM. Esta solución estaba a la misma temperatura de la mezcla de incubación. Se filtró a través de filtros de nitrocelulosa Millipore HAWP 0025 (diámetro de poro: 0,45 μ m), usando una bomba de vacío a una presión moderada, para facilitar la filtración. Los filtros fueron lavados con 2 ml de la solución de filtración. Luego, se secaron bajo lámpara infrarroja y se contó la radiactividad en solución de centelleo estándar.

22. PROTECCION DEL FRAGMENTO XhoI A DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCION POR LA UNION DE LA RNA POLIMERASA

22.1. Marcación uniforme del fragmento XhoI con (α - ^{32}P)-dCTP. Se empleó el procedimiento descrito en Métodos 21.2, usando esta vez 50 μCi de (α - ^{32}P)-dCTP. El DNA marcado se purificó como se describió antes (21.2). Para verificar la integridad del DNA se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 7%, visualizando las bandas de DNA mediante autorradiografía del gel.

22.2. Formación de complejos RNA Polimerasa-DNA. Se siguió el procedimiento descrito en método 20.3, empleando el fragmento XhoI marcado con ^{32}P (20 ng, 10.000 cpm) y MgCl_2 10 mM. Se hizo además un control negativo de unión agregando RNA polimerasa inactivada por calor.

22.3. Digestión del fragmento XhoI con enzimas de restricción. Después de formar los complejos enzima-DNA se bajó la temperatura a 37°C y se agregaron simultáneamente las enzimas de restricción RsaI y HinfI, incubando durante 30 minutos.

22.4. Procesamiento del DNA obtenido por digestion del fragmento XhoI. Se detuvo la digestión agregando un volumen de fenol, 1/5 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y 10 μg de tRNA total de *E coli*. Se agitó y se centrifugó a 12.000xg por 5 min. La fase orgánica se reextrajo con 100 μl de TE, uniendo las dos fases acuosas. Se hizo una extracción con 200 μl de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se precipitó el DNA de la fase acuosa agregando 3 volúmenes de etanol y 1/30 volumen de acetato de sodio 3 M. Las muestras se mantuvieron a -70°C durante 30 min, se centrifugaron a 12.000xg durante 15 min y se resuspendieron los sedimentos (secados previamente al vacío) en 15 μl de SDS 10% y 15 μl de solución de formamida-azul de bromo fenol. Los fragmentos de DNA obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 7% y se visualizaron por autorradiografía del gel.

23. UNION DE LA RNA POLIMERASA DE *THERMUS THERMOPHILUS* AL DNA DEL CLON 111 Y VISUALIZACION DE LOS COMPLEJOS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

23.1. Obtención de los complejos enzima-DNA. El método empleado corresponde a una modificación del descrito por Sogo y col. (1979) (González y col., 1984). Se incubaron 5,5 ug de RNA polimerasa de *T. thermophilus* con 2 ug del clon 111 (razón molar 50/1) en 300 ul de un medio de unión que contenía trietanolamina 30 mM pH 7.9, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 2 mM y EDTA 1 mM, durante 5 min a 60°C o a 37°C.

23.2. Digestión del DNA de los complejos con BamHI. Se agregó a la solución de complejos enzima-DNA, 2-ME 0,5 mM y 5 U de BamHI, incubando durante 30 min a 37°C. De este modo se liberó el inserto de 3.200 pb de DNA de *T. thermophilus* desde el plasmidio vector pBR322 para analizar sólo la interacción homóloga. Una vez que la digestión con BamHI se completó, se agregó glutaraldehído a una concentración final de 0,3%, incubando durante 15 min a 37°C. Luego los complejos se separaron de la enzima libre a través de una columna de Sepharose 4B de 1 cm de diametro y 7 cm de largo, eluyendo con una solución Tris-acetato 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM. Los complejos fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa 1%. La concentración final de los complejos expresada en DNA fue de 2 a 4 ug/ml.

23.3. Procesamiento para visualizar los complejos a través del microscopio electrónico. El método corresponde al descrito por Portmann y Koller (1976). 100 ul de una solución de complejos a una concentración de DNA 1 a 2 ug/ml fueron absorbidos a un trozo de mica recién cortada durante 5 min. La mica fue lavada en agua bidestilada y filtrada durante 60 min. Luego se sometió al siguiente tratamiento: tinción durante 2 min con acetato de uranilo 2% en etanol 95% y sombreado rotatorio con Platino:Paladio 80:20 a un

ángulo de 60° . Finalmente se obtuvo una réplica de carbón que fue montada sobre una grilla para su observación.

Se tomaron alrededor de 150 fotos de los complejos enzima-DNA en un microscopio electrónico Zeiss EM109 a 50 KV, con un aumento de 30.000 veces y usando película Kodak Panatomic.

RESULTADOS

1. ANALISIS DE LA GENOTECA FORMADA A PARTIR DEL DNA CROMOSOMAL DE THERMUS THERMOPHILUS

Se purificaron los plasmidios como se detalla en Métodos 6, y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. El resultado se muestra en la Figura 1A. Al teñir con bromuro de etidio y observar bajo luz ultravioleta, se pueden ver dos bandas de DNA correspondiendo a la molécula relajada y sobreenrollada. Los plasmidios se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con el tRNA total aislado del mismo organismo y marcado con ^{32}P -ATP en su extremo 5' (Métodos 12 y 13). El resultado de la hibridación se muestra en la Figura 1B. Presentaron hibridación positiva los clones 67, 111, 112 y 114. El vector pBR 322 se incluyó como control negativo. El clon 111 fue elegido para estudios más detallados ya que este recombinante tiene un inserto relativamente pequeño (3200 pb) y es capaz de generar un transcripto de tamaño discreto *in vitro* como se verá más adelante.

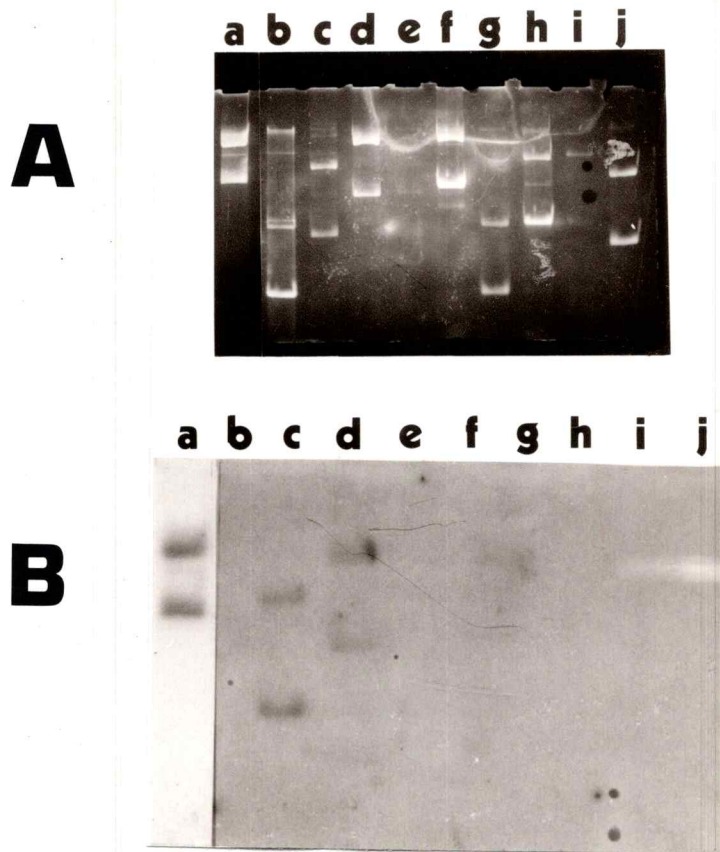


Figura 1. Gel de agarosa al 0,8% en el que se observan plasmidios provenientes de diferentes clones. A: Tinción con bromuro de etidio (1 ug/ml). B: Hibridación Southern de los DNA plasmidiales con tRNA total de *Thermus thermophilus* marcado con (32 P)-ATP. a:clon 67; b: vector pBR 322. c-j: clones 111-118.

2. MAPA FISICO DEL CLON 111

Se construyó un mapa físico del inserto clonado, mediante el uso de enzimas de restricción. Este se muestra en la Figura 2A. Se observa que la enzima XhoI genera un trozo de 2300 y otro de 900 pb. Además, existe un corte XhoI muy cerca del extremo BamHI y que fue identificado luego de secuenciación del DNA. Nuestra atención se dirigió al trozo de 900 pb, llamado de ahora en adelante fragmento XhoI, ya que sólo éste fragmento hibrida con el tRNA del termófilo. Se elaboró un mapa de restricción más detallado del fragmento en cuestión (Fig. 2B).

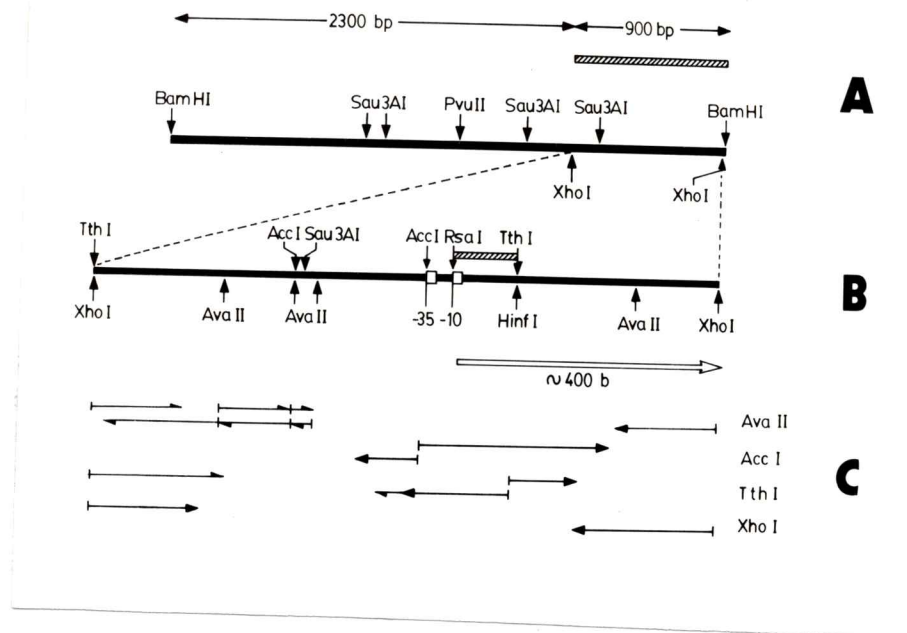


Figura 2. Mapa físico del clon 111, realizado con enzimas de restricción.

A. Inserto total (BamHI-BamHI, 3200 pb). Se observan los dos fragmentos producidos por la enzima XhoI, de 2300 y 900 pb. El fragmento de 900 pb se muestra achurado porque es el trozo que hibrida con el tRNA del termófilo.

B. Mapa físico del fragmento XhoI de 900 pb. La región achurada, entre los cortes RsaI y TthI, indica la zona que hibrida con el tRNA, lo que permitió conocer la ubicación precisa del gen. Los cuadrados blancos muestran las secuencias de -35 y -10 del promotor. La flecha horizontal, bajo el mapa, muestra el lugar y la dirección de la transcripción.

C. Estrategia de secuenciación. Con flecha entera se muestran aquellos fragmentos en los que se separaron los dos extremos 5'-3' cortando con la enzima de restricción mostrada en el extremo derecho. Con flecha con media punta se muestran aquellas regiones en que se realizó la secuenciación después de la separación de las hebras.

Los tamaños de algunos fragmentos de restricción obtenidos del trozo de 900 pb se muestran en la Tabla 1. Esta información será utilizada más adelante.

Tabla 1

Tamaño de los fragmentos producidos por algunas enzimas de restricción sobre el fragmento XhoI.

<u>Enzima</u>	<u>Tamaño (pb)</u>
AccI	430, 270, 200
TthI	300, 600
RsaI	500, 400

3. EL TROZO QUE HIBRIDA DENTRO DEL FRAGMENTO XhoI ES UNA REGION DE 90 pb

Interesaba acotar, dentro del fragmento XhoI, la región que producía la hibridación. Para esto, el DNA fue digerido con enzimas de restricción y se hibridaron los distintos trozos separados en un gel de poliacrilamida con el tRNA total marcado con ^{32}P -ATP.

En la Figura 3a se muestra el resultado de la electroforesis en poliacrilamida al 7% en que se observan, después de la tinción con bromuro de etidio, el fragmento XhoI intacto (A), los trozos producidos por las digestiones con RsaI (C) y TthI (D). Estos fragmentos se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con el tRNA marcado. El resultado se muestra en la Figura 3b. Se observa que, en la digestión con RsaI, sólo hibrida el trozo de 400 pb. En la digestión con TthI, sólo lo hace el fragmento de 600 pb.

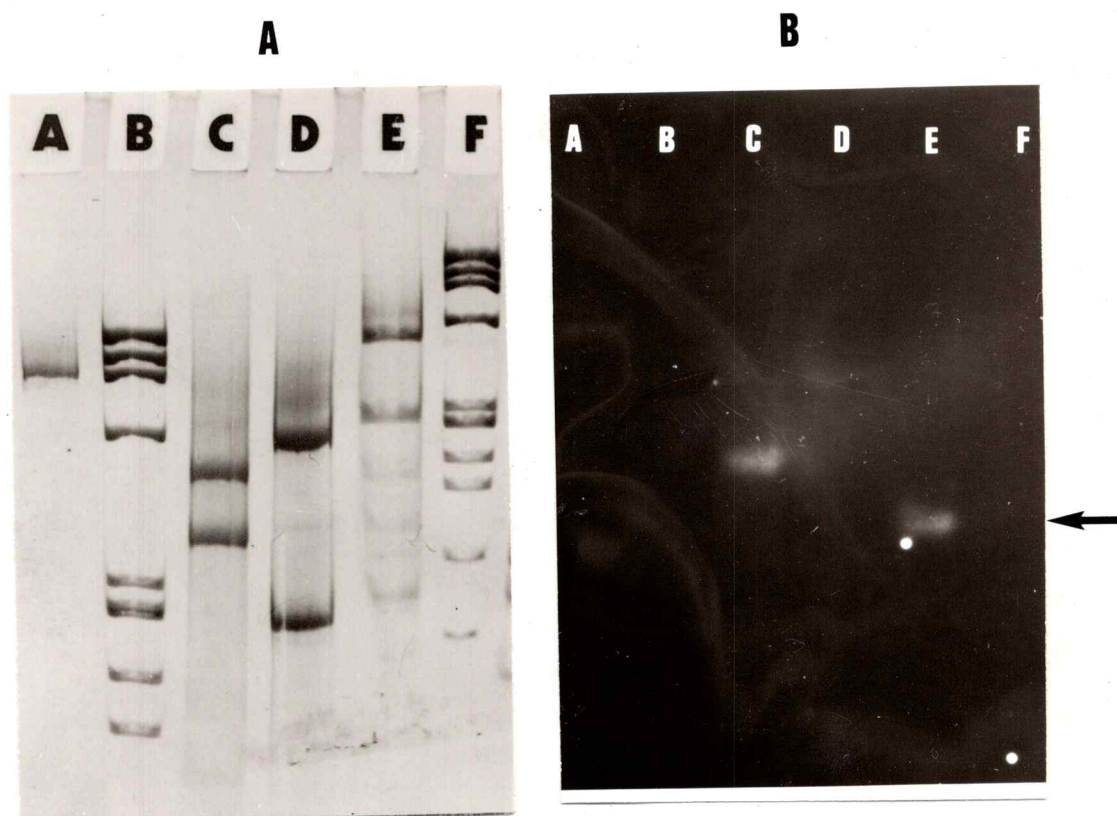


Figura 3. Localización por hibridización Southern, de la zona complementaria a una secuencia de tRNA presente en el fragmento XhoI. **a**: Gel de poliacrilamida al 7% en el que se ha realizado una electroforesis con el objeto de separar los fragmentos producidos en el fragmento XhoI por enzimas de restricción. A: fragmento XhoI. B y F: DNA del fago λ X174 cortado con la enzima HaeIII, usado como estandar de peso molecular. C: fragmento XhoI cortado con RsaI. D: fragmento XhoI cortado con TthI. E: fragmento XhoI cortado con RsaI y con TthI (digestión doble). **b**: Hibridación de estos fragmentos con el tRNA de *T. thermophilus* marcado con $(^{32}\text{P})\text{-ATP}$. E y F se pusieron en el gel tiempo después de haberse iniciado la electroforesis de las otras muestras.

Se puede ver que dan señal de hibridación el fragmento RsaI pequeño (400 pb) y más débilmente el fragmento TthI grande (600). Estos trozos, en base al mapa de la Figura 2B tienen en común una zona de aproximadamente 90 pb. Al observar la digestión doble RsaI/TthI se advierte una señal de hibridación que corresponde a un fragmento de 90 pb (indicado por flecha en la Figura 3B, columna E) Estos datos han sido incorporados en la Figura 2B, indicándose achurada la zona de 90 pb que hibrida. Se concluye que entre los cortes RsaI y TthI debería estar localizada la mayor parte de la región que contiene el gen de tRNA.

4. SECUENCIA DEL DNA ALREDEDOR DE LA REGION QUE HIBRIDA

La secuencia de la región de DNA que contiene la zona responsable de la hibridación de tRNA se realizó de acuerdo a la estrategia mostrada en la Figura 2c. Luego de la marcación de los extremos, el DNA se cortó con AvaII y se separaron los fragmentos marcados en un gel de poliacrilamida. La secuencia se muestra en la Figura 4.

```

5' TCTACCTTGACGGAGGCGGACGGCGCTGGTACACTCCTTTTTGGCACTTGGAGAGG
      RsaI
TGCCCGAGTGGCTGAAGGGACACGACTGGAAATCGTGTAGGGGGCTTAAACCTCCCTC
      TthI
GCGGGGTTTCGAATCCCGCCCTCTCCGCCAAAAGTCCCCGGCGAAGGCCGGGGCTCC3'

```

Figura 4. Región del DNA que hibrida con el tRNA. Las secuencias responsables de la hibridación están entre los cortes RsaI y TthI. Se muestra la secuencia de una sola hebra en sentido 5'-3'.

5. ANALISIS COMPUTACIONAL DE LA ZONA QUE HIBRIDA Y PLEGAMIENTO DE LA SECUENCIA GENERANDO UNA ESTRUCTURA SECUNDARIA PARA EL tRNA

La secuencia obtenida se introdujo en un programa de computación, (diseñado originalmente por Staden, 1980) el cual pliega una secuencia de DNA en la típica estructura de hoja de treból, cuando se cumplen ciertas especificaciones respecto a complementación de bases.

El programa necesita en primer lugar el largo máximo del tRNA que se pretende plegar. En este caso, el largo que se le dió fue de 100 nucleótidos, valor que incluye el largo máximo de tRNAs descrito (Gauss y Sprinzl, 1983). El tRNA que se encontró tiene una longitud de 93 bases. En segundo lugar, hay que proporcionar al computador la información acerca del apareamiento mínimo entre bases que debe tener el tRNA en los distintos brazos. El programa asigna un puntaje de dos cuando la interacción corresponde a un par GC o un par AT y un puntaje de uno cuando forma un apareamiento GT. En el caso del brazo del aminoácido se exigió un apareo mínimo de 12 y se encontró un apareo de 12 en el tRNA detectado; en el del brazo T ψ CG el apareo mínimo solicitado fue de 8 y el encontrado de 10. Para el brazo del anticodon se pidió un apareo de 8 y el encontrado fue de 10. Finalmente, el brazo de la pseudo-uridina se solicitó con un apareamiento mínimo de 6, y se encontró justamente 6. El programa no solicita información acerca del brazo extra. Después de esto se introduce la información del mínimo puntaje general de apareamiento. En este caso fue de 35 y el tRNA que plegó tiene un apareamiento de 38. El programa también permite delimitar cierto rango de longitud del lazo T ψ CG. En este caso la longitud mínima fue de 6 bases y la máxima fue de 8. Además, puede incorporarse máximo y mínimo tamaño del intron, en caso de análisis de una secuencia eucariótica.

Además de estos parámetros, también existe la posibilidad

de buscar ciertas bases definidas de antemano en determinadas posiciones, que están presentes en la mayoría de los tRNA conocidos. En nuestro caso no se utilizó esta modalidad, pero si se la hubiese empleado, los resultados habrían sido los mismos (ver más abajo).

El resultado de la ejecución del programa se muestra en la Figura 5.

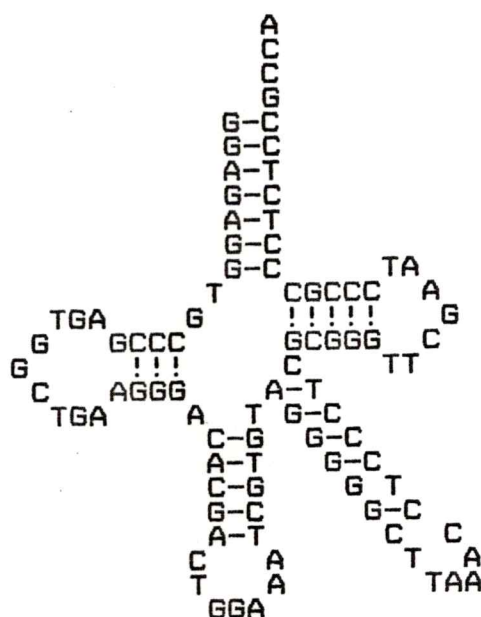


Figura 5. Estructura secundaria del tRNA. Como la estructura se deduce a partir de secuencias de DNA, las bases uridinas y otras modificadas no se indican. Los detalles estructurales se discutirán en base a la estructura de consenso propuesta por Lewin (1978).

-El tallo aceptor del aminoácido contiene normalmente siete pares de bases, los que están en el tRNA termofílico.

-Entre el tallo aceptor del aminoácido y el de la dihidrouridina, siempre existe una uridina, que también lo está en este caso.

-El brazo de la dihidrouridina comienza con un par GC, de acuerdo al modelo generalizado. En el termófilo se encuentra un par CG; este no es el único caso ya que en el tRNA₂^{SER} de *E. coli* se presenta esta misma disposición (Steege, 1983).

El resto del brazo y el tallo de la dihidrouridina tiene la estructura canónica.

-En el tallo del anticodon se presenta un par GC en la posición adecuada y delimitando el anticodon aparecen una T (U en el tRNA) y una A que están en la mayoría de los tRNAs.

-El brazo extra tiene una longitud de 21 bases, lo que lo convierte en un brazo más largo que lo normal (Gauss y Sprinzl, 1981). Esta es una característica de los tRNA que son aminoacilados por serina.

-El brazo (5 pares de bases) y lazo (7 bases) de la pseudouridina del tRNA del termófilo tienen la longitud adecuada, con las bases dispuestas de acuerdo a la estructura modelo.

-Extremo CCA está codificado en el gen, al igual que lo que sucede en *E. coli*, en contraste con lo que ocurre en fagos, (Venkster, 1981). La nucleotidil transferasa tiene como función principal reparar el extremo, más que insertarlo *de novo*. Además, en mutantes deficientes en nucleotidil transferasa, se ha demostrado que los tRNA pueden funcionar normalmente (Deutscher, Lin y Evans, 1977).

Por lo tanto, el programa de Staden ha plegado una secuencia que tiene los rasgos típicos encontrados en los tRNA conocidos.

El anticodon es GGA, de modo que el tRNA sería cargado con el aminoácido serina. La gran longitud del brazo extra

hace que este tRNA tenga un largo de 93 bases, lo que lo convierte en una especie de un tamaño mayor que el común de los tRNA.

6. SEPARACION DE LOS tRNA DE *THERMUS THERMOPHILUS*

Con el fin de proceder a una identificación no ambigua entre el gen clonado y el producto génico, mediante correlación entre un tRNA aislado aminoacilable por serina y que diera hibridación positiva con el gen clonado, se procedió a separar los tRNA por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-urea. El resultado se muestra en la Figura 6. Para efectuar el ensayo de aminoacilación, los tRNA se electroeluyeron del gel y se purificaron a través de una columna de Sephadex G-25 montada en una pipeta de 10 ml, equilibrada con Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0. Se colectaron fracciones de 7 gotas (aprox. 150 ul). La columna se calibró usando tRNA total, para tener suficiente absorbancia. El tRNA eluye entre las fracciones 15 y 30 las que se juntaron (3 ml) y se liofilizaron. En otras ocasiones, los tRNA se purificaron por electroelución en un dispositivo comercial. El ensayo de aminoacilación obtenido a 60°C con las sintetasas aisladas del mismo organismo (Tabla 2) no fue muy eficiente, probablemente debido a los métodos de purificación del tRNA y no dió resultados claramente positivos (la cantidad de radioactividad incorporada estuvo muy cerca del nivel basal). Sin embargo se encontró que una pequeña cantidad de radioactividad era incorporada por los tRNA que se numeraron como Nº 2, 3 y 4. Estos valores se consideraron significativos.

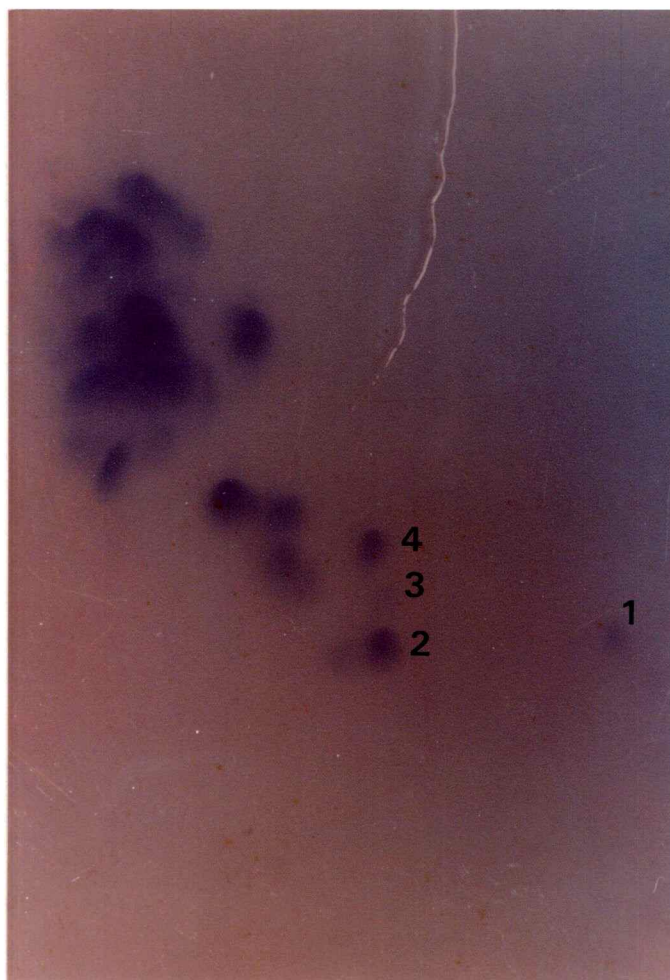


Figura 6. Separación de los tRNA de *Thermus thermophilus* por electroforesis en dos dimensiones en un gel de poliacrilamida. Primera dimensión: gel de poliacrilamida 10%, corrido de derecha a izquierda. Segunda dimensión: poliacrilamida 20% corrido desde abajo hacia arriba. Posterior a la electroforesis, el gel se sometió a tinción con azul de metileno al 0,2% en acetato de sodio 0,4 M, pH 4,5 y se destiñó durante varias horas con agua. Los números 2, 3 y 4 indican los tRNAs aislados que se aminoacilaron con ^3H -serina.

Tabla 2

Incorporación de (^3H)-serina
en algunos tRNAs de *T. thermophilus*.

<u>tRNA</u>	<u>(^3H)-ser</u> (cpm)
1	490
2	1140
3	1530
4	970
5	505
6	480
7	410
8	630
9	390
tRNA total	100000
sin tRNA	310

7. HIBRIDACION DE ALGUNOS tRNAs CON EL FRAGMENTO XhoI

Con este resultado provisorio se procedió a marcar con ^{32}P -ATP los extremos 5' de algunos tRNA, elegidos de acuerdo a la Tabla 2 y a su movilidad en la electroforesis bidimensional. Posteriormente estos se hibridaron con DNA plasmidial de diversos clones. (Métodos 16). De los tRNA ensayados (Nº2, 3, 4, 7 y 9), sólo hibridó el Nº 4. El resultado se muestra en la Figura 7.

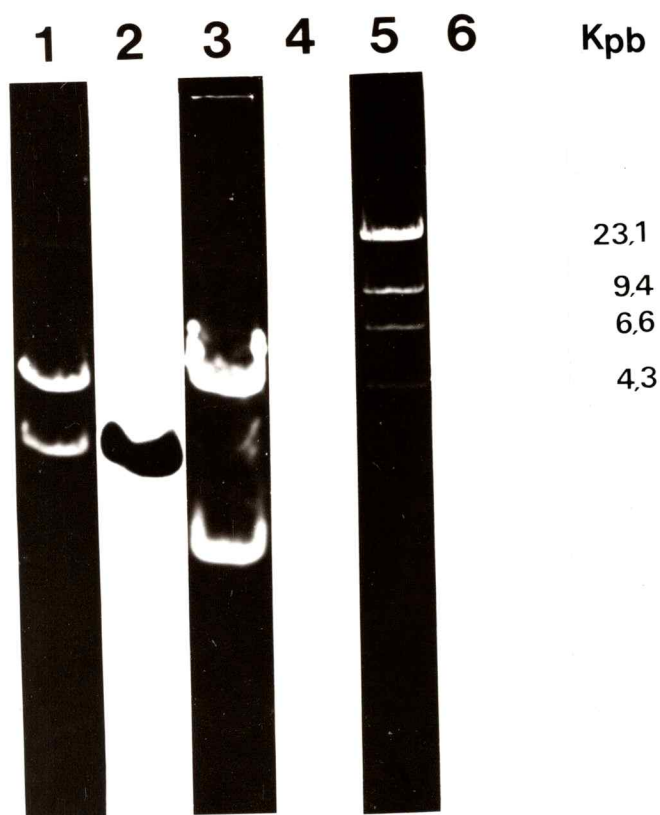


Figura 7. Hibridación Southern de los clones 111 y 112 con el ^{32}P -tRNA N°4. Columnas 1, 3 y 5: tinción con bromuro de etidio. Columnas 2, 4 y 6: hibridación con el tRNA. 1 y 2: clon 111, digerido con BamHI. Se observan el DNA de pBR322 (banda superior, 4300 pb), el inserto (banda inferior, 3200 pb) y un poco de plasmidio no digerido. La hibridación se produce con el inserto. Columnas 3 y 4: clon 112, también digerido previamente con BamHI. No hay hibridación detectable. Columnas 5 y 6: DNA del fago lambda digerido con HindIII, usado como estandar de peso molecular.

B. COMPARACION DEL tRNA CODIFICADO EN EL CLON 111 CON OTROS tRNAs AISLADOS DE DIFERENTES ORGANISMOS

La fuerte hibridación que se encuentra entre este tRNA y el fragmento XhoI indica que este trozo de DNA contiene el gen. El hecho que no se hayan logrado aminoacilar eficientemente los tRNA después de electroeluidos del gel de poliacrilamida resta validez al experimento. Sin embargo la homología de secuencia con otras especies es otro elemento de juicio que indica que el gen contenido en el fragmento XhoI codifica, en efecto, para un tRNA que es aminoacilado con serina. Las secuencias de los tRNA de diferentes organismos, especialmente de *E. coli*, fueron comparadas con la secuencia del gen termofilico. La comparación fue hecha sin considerar el brazo extra, que es muy variable, ni el anticodon. El resultado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación entre la secuencia de diferentes tRNAs y la secuencia del gen termofílico en estudio. Para este análisis se recurrió el programa de computación MATCH que establece una diagonal de homología al disponer en una matriz las secuencias comparadas

tRNA	Fuente	Anticodon	Homología (%)
ser	<i>S. solfatarium</i>	TCG	66,2
ser	<i>H. volcanii</i>	AGC	52,6
ser	<i>H. volcanii</i>	TCN	56,0
ser	<i>S. cerevisiae</i>	TCN	60,3
ser	<i>S. cerevisiae</i>	TCN	60,3
ser ₁	<i>E. coli</i>	TCA	67,6
ser ₃	<i>E. coli</i>	AGC	75,7
ala	<i>E. coli</i>	GCA	45,2
arg	<i>E. coli</i>	GCN	48,0
asn	<i>E. coli</i>	AAN	45,2
asp	<i>E. coli</i>	GAC	63,5
cys	<i>E. coli</i>	TGC	48,6
gln	<i>E. coli</i>	CAG	54,7
glu	<i>E. coli</i>	CAA	48,7
gly	<i>E. coli</i>	GGG	50,0
his	<i>E. coli</i>	CAC	48,0
ile	<i>E. coli</i>	ATN	52,0
leu	<i>E. coli</i>	CTG	51,4
lys	<i>E. coli</i>	AAA	53,1
met	<i>E. coli</i>	ATG	62,2
meti	<i>E. coli</i>	ATG	48,7
phe	<i>E. coli</i>	TTC	43,8
thr	<i>E. coli</i>	ACA	52,1
trp	<i>E. coli</i>	TGG	49,3
tyr	<i>E. coli</i>	ATC	71,6
val	<i>E. coli</i>	GTC	46,0

El gen codifica para un producto que tiene una homología de un 75,7% con el tRNA^{SER} AGC de *E. coli* y de un 67,6% con el tRNA tRNA^{SER} UCA del mismo organismo. El hecho que el tRNA más similar al tRNA termofilico sea uno de serina de *E. coli* es una fuerte indicación que el gen que está clonado corresponde a uno de tRNA^{SER}. El tRNA^{TYR} muestra también una alta homología con el tRNA termofilico. Esto puede ser sólo una coincidencia ya que la secuencia del gen termofilico no es homóloga en grado semejante a las otras secuencias de tRNA^{TYR} de otros organismos, como sí ocurre en el caso de la homología con los de serina.

Uno de los objetivos de la Tesis se ha cumplido con la obtención de estos resultados, cual era el de clonar un gen de un tRNA.

Como se verá más adelante, delimitando al gen se encuentran un promotor, y una señal que podría indicar el término de la transcripción. Sobre estas regiones de control se dirigirá la atención luego de analizar los resultados de los experimentos de transcripción.

9. PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA DE THERMUS THERMOPHILUS HB8

La purificación de la enzima de este termófilo fue descrita inicialmente por Date y col. (1975). Ellos concluyeron que esta polimerasa estaba compuesta, al igual que la mayoría de las polimerasas de eubacterias, por las subunidades beta, beta prima, sigma y alfa en estequiometría 1:1:1:2. Ellos homologan las subunidades en base a pesos moleculares, de modo que la subunidad sigma no está definida por su funcionalidad sino por su tamaño (58.000 daltons), similar al descrito para la subunidad sigma de la RNA polimerasa de *B. subtilis* (Shorenstein y Losick, 1973).

El ensayo de actividad consiste en medir incorporación de (³H)UTP en el RNA, usando DNA de timo de ternero como molde. Esto lo hacen mediante el método de retención del polímero a filtros de nitrocelulosa. Con este tipo de ensayo no es posible diferenciar entre una transcripción específica (que produce sólo algunos tipos de transcritos y de tamaño homogéneo) de una inespecífica (que produce una gran diversidad de transcritos). Es posible diseñar un ensayo de actividad que permita pesquisar aquella subunidad encargada de reconocer el promotor, usando el gen termofílico clonado, como el molde para la RNA polimerasa homóloga. Esto se detecta analizando los productos de transcripción en distintas etapas de purificación de la enzima.

Como se describe en Métodos 17, las etapas de purificación de la RNA polimerasa del termófilo son las siguientes: ruptura celular, ultracentrifugación a 105.000xg, precipitación con sulfato de protamina, luego cromatografía en DEAE-Sephadex A50 y finalmente cromatografía en una columna de DNA-celulosa.

El procedimiento que se ha descrito es más rápido y simple que el de Date y col. El perfil cromatográfico de la última etapa se muestra en la Figura 8a. Cuando se ensaya por

incorporación de (^3H)-UTP (Métodos 18), usando como matriz el DNA de timo de ternera, se encuentran dos picos de actividad. Cuando se hace un ensayo específico (Métodos 20), empleando como molde el DNA que contiene el gen de tRNA (fragmento XhoI), se encuentra lo siguiente: el primer pico no produce transcritos discretos (Figura 8c, fracción 26), lo que sugiere que esta enzima carece de la subunidad sigma; en el caso del segundo pico sí se encuentra un transcrito de 400 b.

Se analizó la composición de subunidades de la RNA polimerasa en los dos picos de actividad, mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (Métodos 17). Se encontró (Figura 8B) que junto con el segundo pico de actividad eluía un péptido de 58.000 daltons, lo cual nos corrobora la suposición anterior en base a la transcripción específica.

Existe la posibilidad de que en el primer pico de actividad exista la subunidad sigma y además alguna RNAsa que degrade el transcrito. Esto se descartó agregando a la mezcla de reacción del tubo 26, que no contenía el DNA, el producto de la transcripción obtenida con la enzima del tubo 44. A continuación se incubó por 10 min. a 60°C . No se degradó el transcrito de 400 b. En el gel de poliacrilamida de la Figura 8B se observan otras bandas de proteína además del péptido de 58000 daltons. Nosotros creemos que la subunidad sigma es el péptido de 58000 daltons porque es el único que coeluye con el perfil de transcripción específica. Además, la mayoría de las otras bandas de proteína son productos de degradación de la RNA polimerasa, ya que en preparaciones de enzima que habían permanecido por algunos meses a 4°C , y se realizaba la electroforesis se encontraban dichas bandas aumentadas. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Date y col (1975).

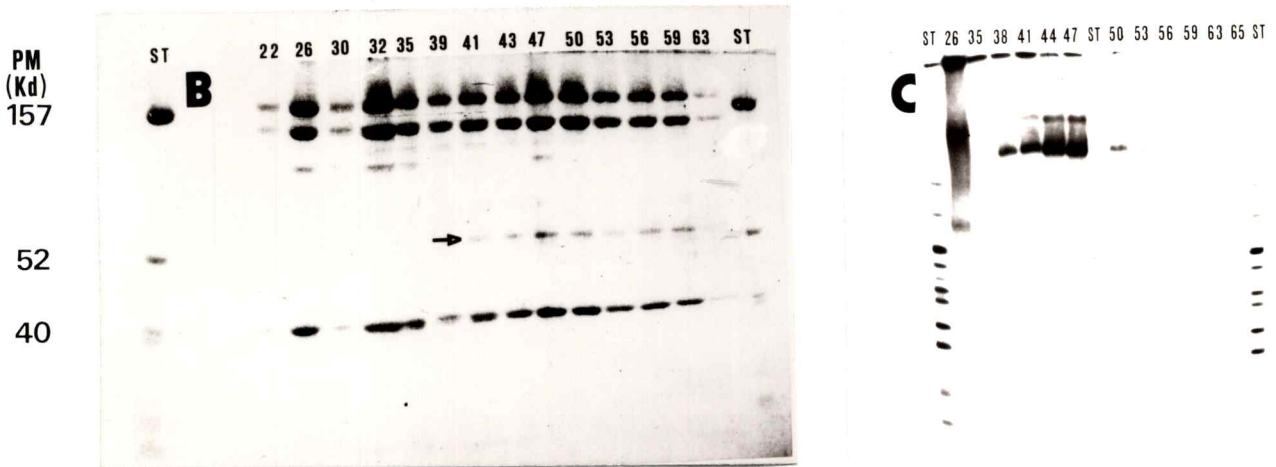
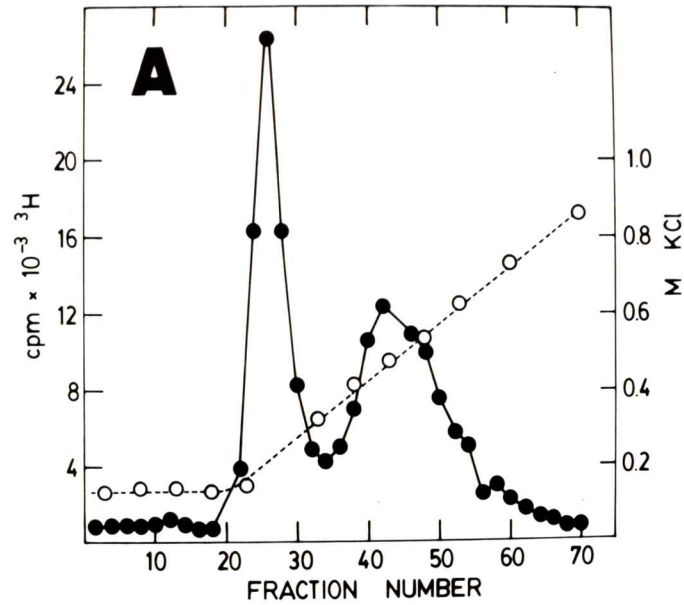


Figura 8. **a**: Purificación de la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* por cromografía en DNA-celulosa. **b**: gel de poliacrilamida-SDS en el cual se han separado las subunidades de la RNA polimerasa purificada por DNA-celulosa. **c**: ensayo de transcripción *in vitro*, usando como molde el fragmento XhoI.

10. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DEL CLON 111

10.1 El inserto BamHI-BamHI (3200 pb) y el fragmento XhoI (900 pb) producen un transcrito de 400 B. Dado que interesaba estudiar la expresión génica en un organismo termofílico, era fundamental saber si el gen clonado tenía las señales de control que permitiesen su expresión. Para esto, se ensayó la transcripción del clon 111 *in vitro* (Métodos 20). Cuando se transcribe el inserto de 3200 pb usando la RNA polimerasa purificada por DNA-celulosa, pico 2, se obtiene un transcrito de aproximadamente 400 b (Figura 9, columna 1), además de otros productos de menor tamaño, cuyo origen aún no hemos identificado. El mismo producto de 400 b se obtiene cuando se transcribe el fragmento XhoI (Figura 9, columna 3), no así cuando se intenta transcribir el fragmento de 2300 pb (Figura. 9, columna 2) en que no se detecta nada. Nótese que el DNA del inserto de 3200 pb produce un transcrito de un tamaño un poco mayor que el que produce el fragmento XhoI. Esto es porque el fragmento de 3200 pb, obtenido con la enzima BamHI tiene bases adicionales en el extremo derecho coparado con el fragmento XhoI, y esta diferencia se manifiesta en el producto "run off".

10.2 Determinación del sitio de inicio y de la dirección de transcripción.

Se quiso acotar la zona específica que produce la transcripción, para lo cual se transcribió el fragmento XhoI, previamente cortado con algunas enzimas de restricción, mencionadas anteriormente (Tabla 1). Al efectuar la transcripción con el fragmento XhoI, digerido con AccI, se encuentra que se sigue produciendo el producto de 400 b (Figura 10A, columna c). La transcripción se hizo en presencia de los tres fragmentos producidos por la enzima AccI en el trozo XhoI. La única posibilidad es que este producto provenga del trozo de DNA de 430 pb (ver Tabla 1).

Este trozo está ubicado en el mapa físico entre el extremo XhoI derecho y el primer corte AccI que se encuentra hacia la izquierda, y es el único que tiene una longitud capaz de servir de molde como para producir un transcrito de 400 b. El mismo resultado se obtiene cuando se transcribe el trozo de 430 pb purificado (no mostrado). Con esto se ha probado que este fragmento es el que produce el transcrito de 400 b.

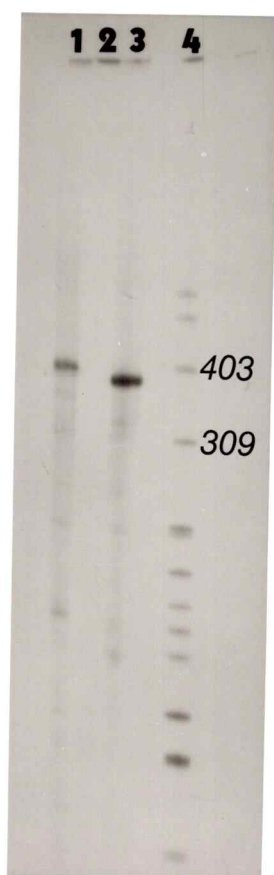


Figura 9. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida 5% en el cual se separaron, mediante electroforesis, los productos de transcripción. La RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* se incubó con el DNA en presencia de (α - 32 P)-GTP, como se detalla en Métodos 20. 1: fragmento de 3200 pb. 2: fragmento de 2300 pb. 3: fragmento XhoI. 4: estándar de peso molecular correspondiente a DNA de pBR322 digerido con HpaII y marcado con 32 P.

Habiéndose acotado la región que produce la transcripción en el segmento derecho del fragmento XhoI, interesaba saber: i) el lugar de inicio de la transcripción (para localizar funcionalmente el promotor); ii) la dirección de la transcripción y iii) la presencia de señales de terminación de la transcripción. Para esto se transcribió el trozo XhoI digerido con RsaI y, en otro experimento, digerido con TthI. Los resultados se muestran en la Figura 10A, columnas b y d. Al transcribir el fragmento XhoI cortado con TthI (d), se encuentra que el tamaño del transcrito se reduce de 400 b, a 80 b. Esto significa que el corte TthI no afecta la funcionalidad del promotor, lo que permite iniciar la transcripción, pero, como el gen está cortado en el sitio TthI, el transcrito es de menor tamaño. Según esto, el inicio de la transcripción estaría entonces a 80 pb de la secuencia que reconoce la enzima TthI. Este punto corresponde a las Gs marcadas con asteriscos en la Figura 12. Por otra parte, al transcribir el DNA previamente digerido con RsaI, no se produce el transcrito de 400 b, ni aparecen nuevos productos. Sólo se encuentra aumentada la transcripción de dos tipos de RNA, que también se transcriben a partir del fragmento no digerido, aunque con menor eficiencia. El hecho que desaparezca el producto de 400 b y no aparezcan nuevos transcritos, indica que el corte RsaI está afectando al promotor, y que la transcripción se iniciaría desde una zona muy cercana a la secuencia reconocida por la enzima RsaI progresando hacia la derecha, por la relación de vecindad de estos sitios, de acuerdo al mapa mostrado en la Figura 2.

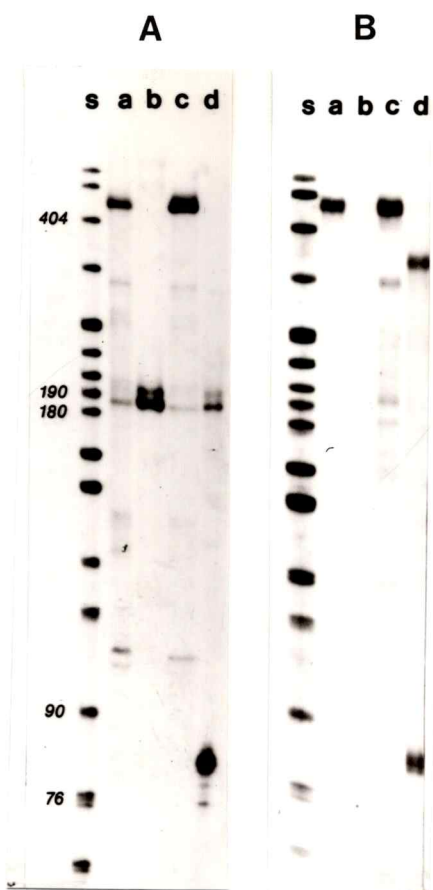


Figura 10. Transcripción del fragmento XhoI intacto y digerido previamente con enzimas de restricción.

A: Transcripción con la RNA polimerasa de *T. thermophilus*.

B: transcripción con la RNA polimerasa de *E. coli*. s: estándar de peso molecular correspondiente a pBR322 digerido con HpaII y marcado con ^{32}P ; a: fragmento XhoI no digerido; b: digerido con RsaI; c: digerido con AccI; d: digerido con TthI. Los productos de transcripción fueron separados en un gel de poliacrilamida al 7%.

10.3. La RNA polimerasa de *Escherichia coli* reconoce el mismo promotor del gen de tRNA^{SER}.

El inserto de 3200 pb, el fragmento XhoI y el trozo de 2300 pb se transcribieron usando la RNA polimerasa de *E. coli*. Al igual que en el caso de la enzima de *T. thermophilus*, el inserto de 3200 pb y el fragmento XhoI producen un transcrito de 400 b (resultado no mostrado). Para acotar la región desde la cual se iniciaría la transcripción se usó el procedimiento empleado con la RNA polimerasa de *T. thermophilus*. Se encontraron cualitativamente los mismos resultados (Figura 10B), excepto que cuando se transcribe el fragmento XhoI, digerido con RsaI, no se detecta ningún transcrito, ni aumento de los dos tipos de RNA que sí se observan en el caso de la enzima termofílica.

Estos datos, al compararlos con aquellos de hibridación concordaron perfectamente, indicando que existe un gen para un tRNA que está ubicado entre los cortes RsaI y TthI, y que la transcripción por las RNA polimerasas se inicia en esta zona y progresa hacia la derecha según se muestra en la Figura 2B.

11. SECUENCIA DE LA REGION TRANSCRITA

El fragmento XhoI se sometió a secuenciación por el método de Maxam y Gilbert (1980), detallado en Métodos 11. La estrategia de secuenciación se muestra en la Figura 2 C. La secuencia de la región transcrita se muestra en la Figura 11.

CTCCCCGGGTAAAGCCGCCCCGCCAAGATCATGGAGCCCAAGGCCTCAAAGTCCAAGTTT
 TCGTGGGCCGCCACGACCCGCACGGCCCCAGTCTACCTT**GACGGAGGGCGGACGGCGCTGG**
TACACTCCTTTTTGGCACTTGAGAGAGGTGCCCGAGTGGCTGAAGGGACACGACTGGAAA
TCGTGTAGGGGGCTTAAACCTCCCTCGCGGGGTTCGAATCCCGCCCTCTCCGCCAAAAGT
 CCCCGGCGAAGGCCGGGGCTCCCTTTTTCCCGTGGGCCCGCGCCGCCTCCGGGGCCCTTTG
 GGCBCGGAAAATGGTATGGTTCTCCCGTGCGGCGCTGGCTCCTGCTTTTGGCCCTGCTCG
 CGGCCCGGGCTTGGGCCAAATGCGCGGACCGACCCTGCGTCCTAGAGACGGAAAGAAGGGC
 TTCTCGCCGGGGAGAACCTGAGCTACGAGGAGGGGGTGTCTCCTCGTGGAGGGCCCTGCCTA
 GAGCGTCCGGGCCCTCGCCCTCGAG

Figura 11. Secuencia de DNA de la región transcrita del fragmento XhoI. La zona correspondiente al gen está subrayada. Los elementos constituyentes del promotor están en negrita.

12. EL PROMOTOR DEL GEN.

El promotor fue localizado por la homología que presenta con la secuencia de consenso propuesta para el promotor procariótico. El promotor presenta los elementos típicos: la región de -35 y la -10, separadas por un trecho de 17 pares de bases. En la Tabla 4 se muestra una comparación entre el promotor encontrado y otros promotores descritos en la literatura.

lac UV 5	GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATATTGT	
trp	CTGTTGACAATTAATCAT CGAACTAGTTAACTAG	
tac I	CTGTTGACAATTAATCAT CGGCTCGTATAATGT	
tac II	CTGTTGACAATTAATCAT CGAACTAGTTTAATGT	
promotor de consenso	TTGACA	TATAAT
promotor tRNA ^{SER} de <i>T. thermophilus</i>	ACCTTGACGGAGGCGGAC	GGCGCTGGTACACTCCTTTTTGG

Tabla 4. Comparación del promotor termofílico del tRNA^{SER} con otros promotores de *E. coli*. Se incluyen las secuencias de los promotores lac UV 5 y trp de *E. coli* y los derivados híbridos sintéticos de los dos anteriores, tacI y tacII (Dahl, 1983). Además se indica la secuencia del promotor de consenso. Las regiones de control -35 y -10 están en negrita.

13. LA REGION 3' DEL tRNA

El programa de computación también encontró una secuencia que resultó tener rasgos muy interesantes desde el punto de vista regulatorio. Existen dos trechos ricos en GC de 8 bases que corresponden a repeticiones invertidas y que pueden aparearse. Esta estructura puede extenderse a 9 pb con un apareo G:T, que también puede contribuir a la estabilización de ella. El posible rol como terminador de la transcripción se discutirán más adelante. En la Figura 12 se muestra la secuencia del gen plegada a modo de estructura del tRNA y la región posterior mostrando la estructura que podría adoptar el tRNA.

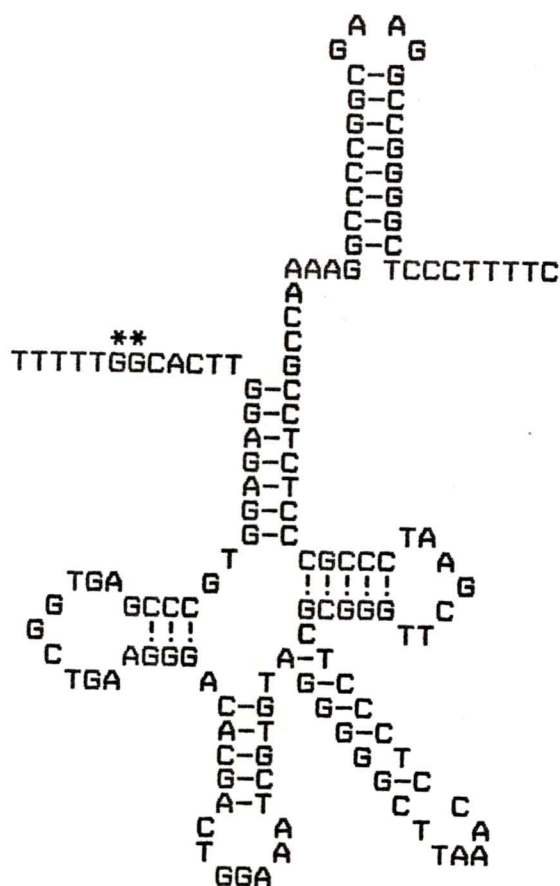


Figura 12. Secuencia del gen plegada como tRNA^{SER} correspondiente a parte del fragmento XhoI de *Thermus thermophilus*. Se muestran, además, las probables bases desde donde se iniciaría la transcripción, indicadas con asteriscos y la estructura posterior al tRNA que podría funcionar *in vivo* como señal de terminación de la transcripción.

14. FORMACION DE COMPLEJOS ENTRE LA RNA POLIMERASA DE *THERMUS THERMOPHILUS* Y EL FRAGMENTO XhoI

Con el fin de caracterizar la interacción entre la RNA polimerasa de *T. thermophilus* y el fragmento XhoI, se diseñaron experimentos para estudiar las características de la unión al promotor. Para este fin se utilizó el método de retención del complejo enzima-DNA en filtros de nitrocelulosa, desarrollado inicialmente por Jones y Berg (1966) y luego modificado por Hinkle y Chamberlin (1972). Se analizaron varios parámetros que afectan esta interacción y que se detallan a continuación.

14.1 Relación molar de enzima y DNA en la formación del complejo. Inicialmente se hizo una curva de saturación usando el fragmento XhoI marcado con tritio (ver Método 21.2) y variando la concentración de RNA polimerasa, con el objeto de buscar la relación enzima:DNA óptima para lograr la máxima formación de complejos. La Figura 13 muestra este resultado, observándose que, al agregar 300 ng de enzima por cada 20 ng de fragmento XhoI y luego de incubación a 60°C, se logra un 75% de retención de la radioactividad presente en el DNA. El peso molecular de la RNA polimerasa de *T. thermophilus* es 5×10^5 (Date y col., 1975), y el del DNA de 584.000 (considerando una longitud de 900 pb para el fragmento XhoI y un peso promedio de 650 por cada par de bases nucleotídicas). Con estos valores se obtiene una relación molar enzima:DNA mínima de 18:1, relación que se usó en experimentos posteriores, a menos que se indique otra cosa.

Se comparó también el comportamiento de unión al gen usando la RNA polimerasa con la de *E. coli*. El resultado es semejante al que se encuentra con la enzima termofílica, si bien el porcentaje de unión es un poco mayor (90%), cuando se incuba en la relación molar 18:1. Este porcentaje no continúa aumentando si se incrementa la relación enzima:DNA,

lo que también se observó con la RNA polimerasa de *T. thermophilus*.

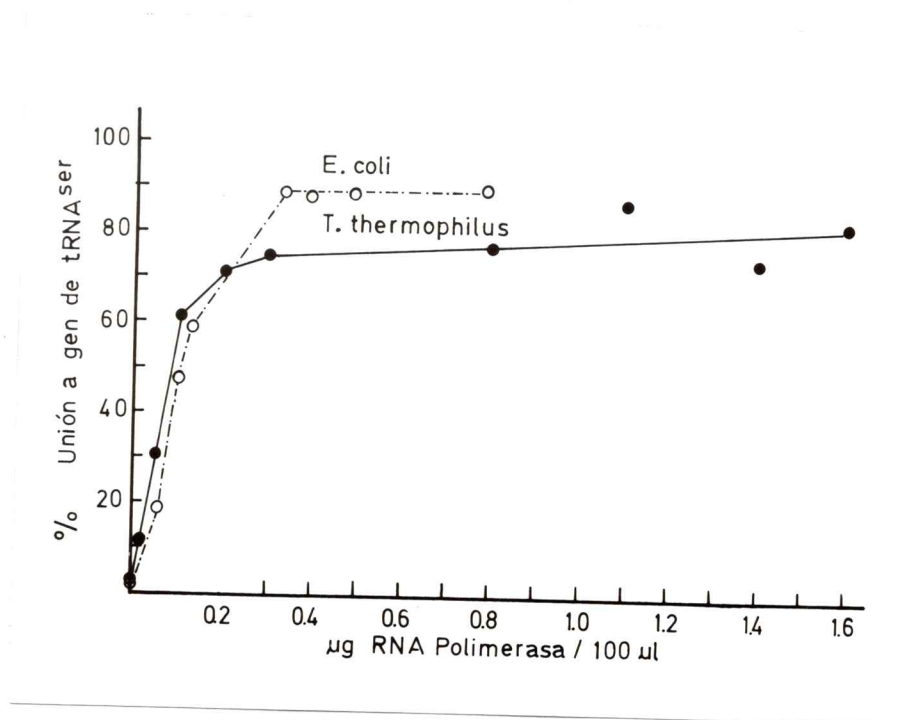


Figura 13. Ensayo de retención del complejo enzima-DNA en filtros de nitrocelulosa. Se incubó el fragmento XhoI (marcado previamente *in vitro* con (^3H) -dGTP y (^3H) -dCTP, ver Método 21.2) junto con la RNA polimerasa de *T. thermophilus* y en un experimento paralelo con la enzima de *E. coli* a 37°C. Después de 15 minutos de incubación, la mezcla fue filtrada a través de una membrana de nitrocelulosa, como se detalla en Método 21.4. La radioactividad retenida en los filtros fue determinada en un contador de centelleo líquido. El 100% son 80000 cpm.

14.2 Efecto de la fuerza iónica y metales en la formación de complejos. En los estudios de interacción *in vitro* entre RNA polimerasas y promotores de bacterias mesofílicas se han encontrado, además de las uniones específicas, otras en las que la enzima se une inespecíficamente a regiones de DNA que no son promotores. Estas últimas pueden ser eliminadas si se aumenta la fuerza iónica del medio de ensayo, o agregando heparina, que desplaza las moléculas de polimerasa unidas débilmente al DNA (Melacon y col., 1982). Con el objeto de encontrar condiciones en las cuales la RNA polimerasa interactuara preferentemente con el promotor del gen de tRNA^{SER}, se hizo un estudio de la dependencia de la unión frente a un aumento de la fuerza iónica. El resultado se muestra en la Figura 14. Al formar el complejo con KCl 0,1 M en el medio de ensayo, se obtiene un aumento de la unión respecto a concentraciones salinas menores. Sin embargo, la cantidad de complejo formado se reduce al aumentar la concentración de sal en los ensayos, llegando a un 10% cuando la concentración de KCl es 0,4 M. El comportamiento del sistema termofílico frente a este parámetro resulta ser similar al descrito para la unión de la RNA polimerasa de *E. coli* a promotores mesofílicos, aunque se han descrito algunos complejos RNA polimerasa-promotor mucho más resistentes al aumento de fuerza iónica (Russell y Bennet, 1981). En experimentos posteriores se utilizó rutinariamente KCl 0,1 M en el ensayo de unión.

Para la transcripción óptima del gen de tRNA^{SER} se necesita la presencia de los metales divalentes magnesio y manganeso. Con el objeto de saber si éstos iones podían estabilizar o mejorar la unión enzima-DNA, se repitió el experimento de variación de la fuerza iónica del medio, agregando simultáneamente MgCl₂ 10 mM y MnCl₂ 4 mM, que son las concentraciones óptimas para el ensayo de transcripción. Se puede observar que el resultado es similar al obtenido en ausencia de metales, por lo que se concluye

que éstos no contribuyen a un aumento del complejo formado y probablemente no afectan su estabilidad en las condiciones ensayadas.

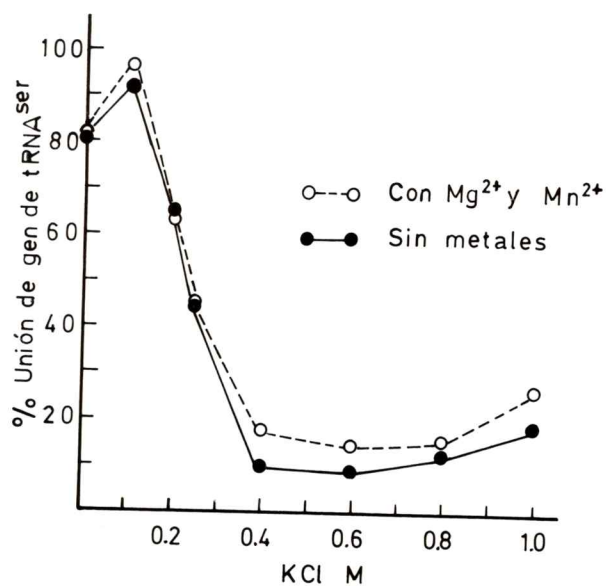


Figura 14. Formación de complejos RNA polimerasa de *Thermus thermophilus*-fragmento XhoI, al aumentar la fuerza iónica. La unión se realizó a 60°C durante 15 min, como se describe en Métodos 21. La concentración de los metales bivalentes fue MgCl₂ 10 mM y MnCl₂ 4 mM.

15. VISUALIZACION DEL COMPLEJO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

El método de retención de complejos enzima-DNA en filtros de nitrocelulosa permite detectar las interacciones específicas e inespecíficas, pero no da información fidedigna acerca de la naturaleza o especificidad de la unión. Aún variando las condiciones de ensayo como fuerza iónica, razón enzima:DNA y otras, es difícil lograr una estimación cuantitativa del complejo formado por reconocimiento específico del promotor. Es necesario recurrir a otras técnicas complementarias para dimensionar el grado de especificidad que existe en el ensayo en filtros de nitrocelulosa y para detectar las regiones del fragmento de DNA donde ocurre la unión específica de la RNA polimerasa. Los resultados anteriormente presentados han permitido localizar indirectamente la posición del promotor dentro del fragmento XhoI (secuenciación del DNA y ensayos de transcripción *in vitro*). Con estos antecedentes iniciales es posible abordar el problema de especificidad mediante visualización directa por microscopía electrónica, como se describe en Métodos 23. El DNA plasmidial sobre enrollado del clon 111 fue incubado con la enzima termofílica permitiendo la formación del complejo a 37 y 60°C durante 5 min. Luego se digirió a 37°C con BamHI para obtener el DNA lineal adecuado para visualización al microscopio electrónico. Posteriormente el complejo se fijó con glutaraldehído y se separó de la proteína libre por filtración en gel. En la Figura 15 se presenta una foto, con un aumento de 30.000 veces, representativa del complejo formado, en la que se muestran tres moléculas de DNA del fragmento de 3200 pb, en las cuales se ven moléculas de RNA polimerasa unidas muy cerca de un extremo del inserto.

Una cuantificación de la especificidad de la unión en los complejos formados a 37 y 60°C se muestra en los histogramas representados en la Figura 16. Se observa que

una gran proporción de las moléculas de polimerasa unidas al DNA lo hacen cerca de un extremo del fragmento, a aproximadamente 400 bases. Esta posición preferida (34,7% de moléculas unidas a 60°C) coincide perfectamente con la localización del promotor. El resultado es similar si se forman los complejos a 37°C (32,5%).

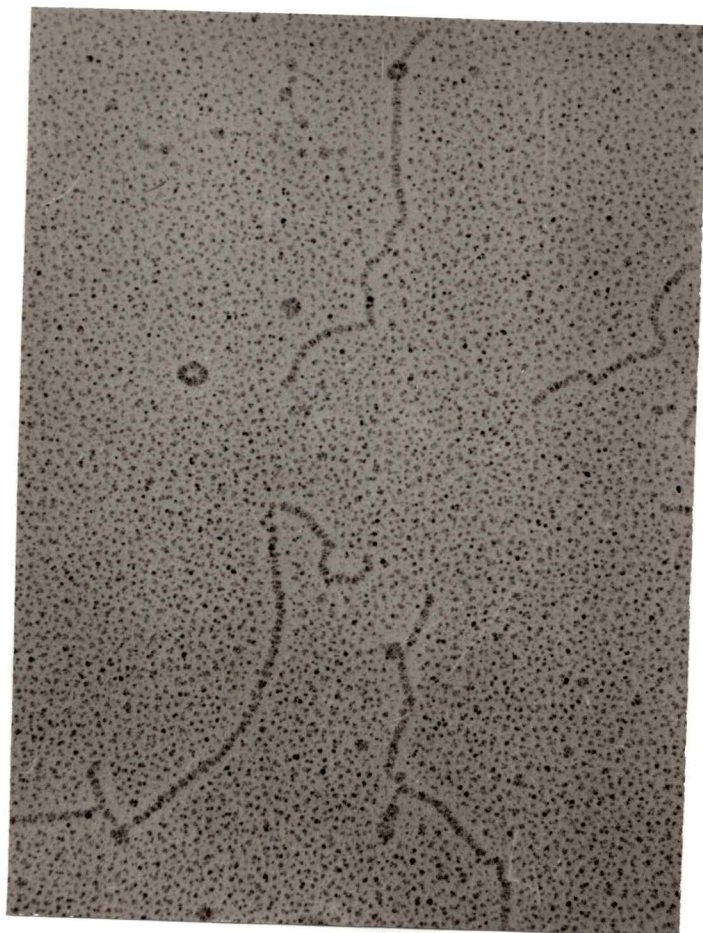


Figura 15. Visualización al microscopio electrónico del complejo formado entre la RNA polimerasa de *T. thermophilus* y el inserto BamHI. En la microfotografía, obtenida por tinción negativa, se muestran tres moléculas del inserto de 3200 pb, con sus respectivas moléculas de RNA polimerasa unidas a una distancia de aproximadamente 400 pb de un extremo. El experimento se hizo a 60°C. El aumento total es de 30000 veces.

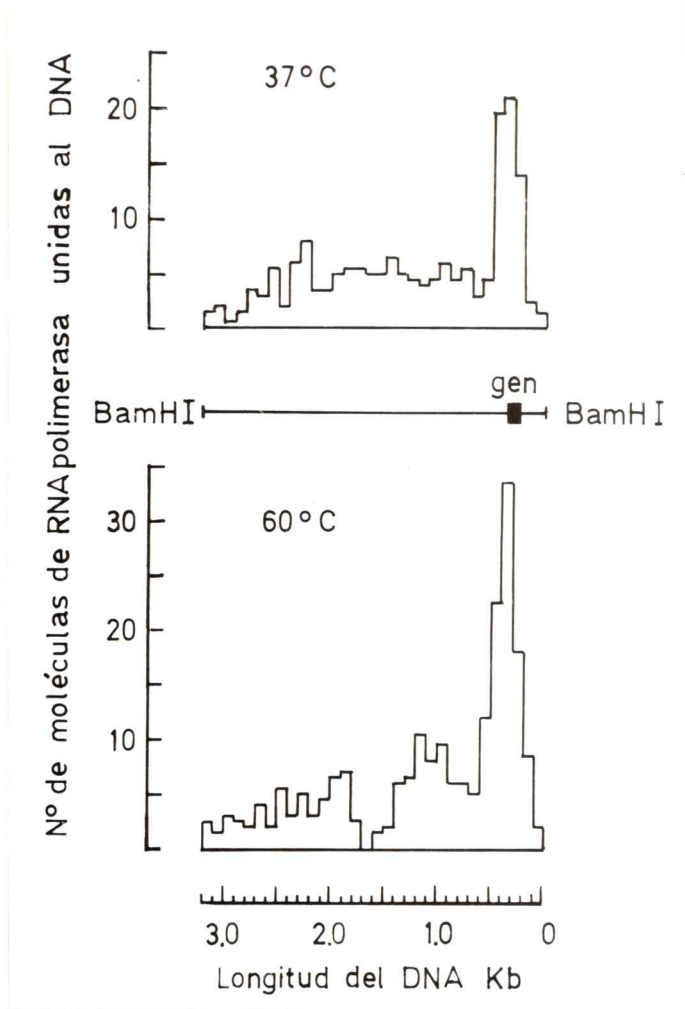


Figura 16. Cuantificación de la especificidad de la unión de la RNA polimerasa de *T. thermophilus* al inserto de 3200 pb del clon 111. En el histograma inferior se resumen los resultados de la unión realizada a 60°C. Se contaron 344 moléculas de DNA, las que tenían unidas 213 moléculas de RNA polimerasa. De éstas, 74 (34,7%) estaban en la región que corresponde al promotor del gen de $tRNA^{SER}$. Alrededor de la posición 1,2 Kb se observa un pequeño pico de unión. Esta región daría cuenta del 11% de las moléculas de enzima unidas, si se abarca una zona similar a la que se consideró para obtener los porcentajes anteriores. Además, este supuesto promotor no es capaz de producir transcripción *in vitro*, ya que está ubicado dentro del fragmento de 2300 pb (Figura 9). En el histograma superior se muestra la cuantificación de un experimento de unión realizado a 37°C. Se contaron 222 moléculas de DNA, que tenían unidas 166 moléculas de enzima. De éstas, 54 (32,5%) estaban ubicadas en la región del promotor.

16. ESPECIFICIDAD DE LA UNION DE LA RNA POLIMERASA TERMOFILICA AL PROMOTOR POR PROTECCION DEL FRAGMENTO XhoI FRENTE A DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCION

Una manera más precisa que la anterior para detectar la especificidad de la interacción entre la RNA polimerasa y el promotor contenido en el fragmento XhoI es a través de la observación del bloqueo del acceso de enzimas de restricción a sitios de corte que están contenidos en el promotor o cerca de él. Esto puede lograrse con la unión previa de la RNA polimerasa justo en esa zona. Para realizar este tipo de estudios se usó el fragmento XhoI marcado uniformemente con (α - 32 P)-dCTP mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Se formaron los complejos a 60°C bajo las condiciones ya descritas (Métodos 22) empleando la RNA polimerasa de *T. thermophilus*. Como control negativo de unión se incubó el fragmento XhoI con la RNA polimerasa inactivada previamente por calor. Una vez realizada la unión se sometió a digestión el DNA con las enzimas de restricción RsaI e HinfI.

De acuerdo al mapa físico del fragmento XhoI, hay una sola secuencia de corte para la enzima RsaI, encontrándose ésta dentro de la región correspondiente a la caja de Pribnow del promotor. Además, hay un solo sitio de reconocimiento para la enzima HinfI, que se encuentra dentro del gen tRNA^{SER}, alejado 82 pb del inicio de transcripción del gen. Así, sólo RsaI corta la región del promotor. La enzima HinfI se incluyó como control interno para ver si existía protección no específica.

En teoría, al realizar la digestión del fragmento XhoI simultáneamente con las endonucleasas RsaI y HinfI, se obtendrán tres trozos, con longitudes de 500, 300 y 96 pb. Si el acceso al sitio RsaI está bloqueado por la unión de la RNA polimerasa al promotor, entonces se obtendrán dos

fragmentos, con tamaños de 600 y 300 pb, generados sólo por la acción de la enzima HinfI sobre el fragmento XhoI. Si sólo el sitio HinfI estuviera protegido por la RNA polimerasa, aparecerían dos fragmentos, de 500 y 400 pb. Si estuvieran ambos protegidos, no habría digestión y el fragmento XhoI permanecería intacto.

En la Figura 17 se observa la autoradiografía de un gel con los fragmentos de DNA marcados obtenidos después de la incubación del complejo RNA polimerasa de *T. thermophilus*-fragmento XhoI, con las enzimas de restricción RsaI e HinfI. La columna 3 corresponde al control usando la RNA polimerasa inactivada por calor, y en donde las dos enzimas de restricción cortaron el DNA. Se observa la presencia de tres bandas de DNA con tamaños de 500, 300 y 92 pb, lo que indica que los sitios que son reconocidos por las enzimas RsaI y HinfI no están protegidos. En la columna 2, que corresponde a la digestión de los complejos formados con la RNA polimerasa activa, se observan sólo 2 bandas de DNA, con el tamaño esperado (600 y 300 pb) ya que sólo HinfI pudo cortar el DNA. Este resultado concuerda con lo predicho anteriormente e indica que efectivamente la RNA polimerasa de *T. thermophilus* se une al promotor del gen, impidiendo todo acceso de la enzima RsaI.

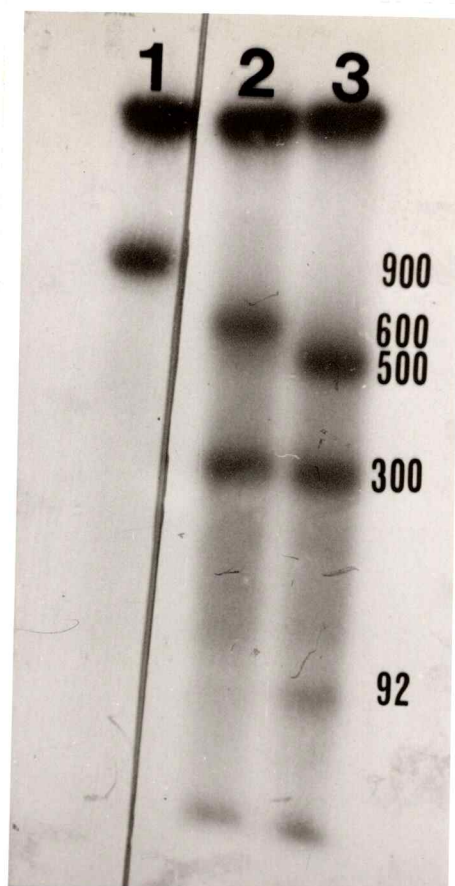


Figura 17. Protección del sitio RsaI presente en el promotor del gen de tRNA^{SER} por formación del complejo con la RNA polimerasa termofílica. Se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida 7% en la que se observan las bandas de DNA marcado. Se formaron los complejos RNA polimerasa de *T. thermophilus*-fragmento XhoI a 60°C durante 10 min y luego se digirió el DNA con 5 U de ambas enzimas de restricción, a 37°C por 30 min. 1: fragmento XhoI no digerido (10 ng, 5.000 cpm). 2: complejo formado con la RNA polimerasa activa. Incubación con RsaI y HinfI. 3: complejo formado con la RNA polimerasa inactivada. Incubación con RsaI y HinfI. Los tamaños de las bandas de DNA fueron medidas por comparación con la migración de DNA de ϕ X174 cortado con HaeIII, que se visualizó por tinción con bromuro de etidio.

17. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DEL GEN DE tRNA^{SER} Y SOBRE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS ESPECÍFICOS ENZIMA-PROMOTOR

La actividad de la RNA polimerasa de *T. thermophilus* es muy dependiente de la temperatura para realizar el proceso global de transcripción. Su óptimo, con el gen de tRNA^{SER} como molde, corresponde a 60°C, como se muestra claramente al hacer experimentos de transcripción *in vitro* usando el fragmento XhoI (Figura 18B). El transcrito de 400 b puede detectarse en un rango de temperatura de 45°C hasta 75°C. A temperaturas inferiores a 45°C no se detecta síntesis de RNA marcado.

La reacción de transcripción puede desglosarse separadamente en cuatro eventos: unión de la RNA polimerasa al DNA, iniciación, elongación y terminación (Chamberlin y Gilbert, 1976). Nuestro interés se dirigió a estudiar si la dependencia de la temperatura en el proceso global se debía a un efecto sobre el primer evento: la unión de la enzima al DNA.

Al visualizar los complejos RNA polimerasa-fragmento de 3.200 pb al microscopio electrónico, se observó que la unión de la enzima no se ve notoriamente afectada por la temperatura, ya que se detecta formación de complejo tanto a 60 como a 37°C. Para analizar más detalladamente el grado de unión de la enzima al promotor en un rango más amplio de temperatura, se empleó la técnica de retención de los complejos en filtros de nitrocelulosa. La Figura 19 muestra que la unión de la polimerasa termofílica al gen de tRNA^{SER} es independiente de la temperatura, lo que contrasta con la dependencia que presenta el proceso de transcripción, incorporado en la misma figura. Esto nos indica que en alguna de las etapas posteriores al proceso de unión al promotor (ya sea iniciación o elongación del RNA) existe al menos un paso que es dependiente de la temperatura.

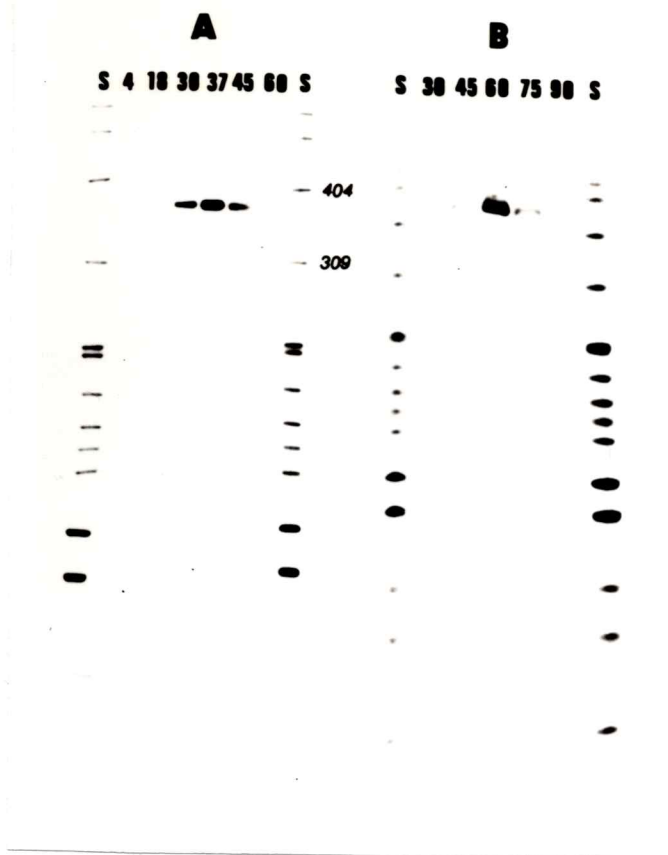


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la transcripción *in vitro* del gen tRNA^{SER}. A: RNA polimerasa de *E. coli*. B: RNA polimerasa de *T. thermophilus*. El experimento se hizo empleando el fragmento XhoI. Los ensayos de transcripción se realizaron como se describe en Métodos 20. Los productos de transcripción se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 7%-urea 8 M y se visualizaron por autorradiografía del gel. Las diversas temperaturas correspondientes a cada ensayo se indican con números sobre cada columna. La columna S corresponde a los fragmentos de pBR322 digerido con HpaII y marcados con ³²P que fueron utilizados como estándar. Algunos tamaños de estos fragmentos se indican en pb.

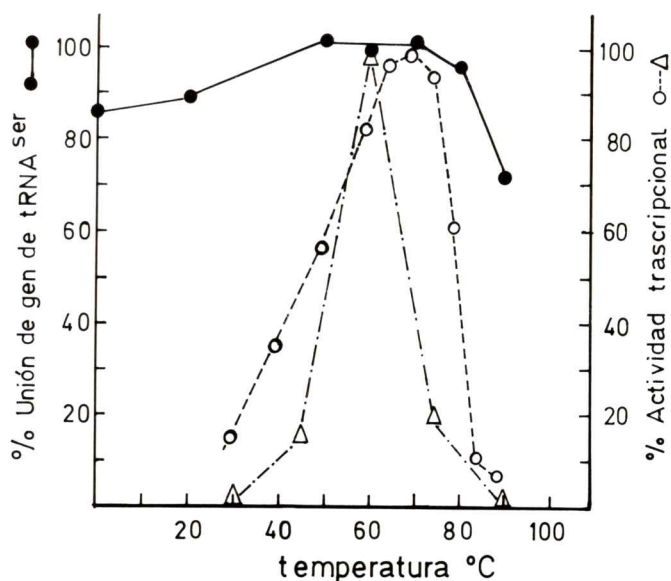


Figura 19. Comparación entre la capacidad de unión de la RNA polimerasa de *T. thermophilus* al promotor del gen de tRNA^{SER} y la actividad transcripcional *in vitro* de la enzima a diferentes temperaturas. (●): formación de complejos enzima-promotor. La unión y la detección del complejo se realizó como se indica en Métodos 21. El 100% de unión al gen de tRNA^{SER} equivale a 60.000 cpm y corresponde a un 75% del total que se usaba en el ensayo. (Δ): transcripción *in vitro* usando como molde el fragmento XhoI, observándose la formación del transcrito de 380 b por incorporación de (α -³²P)-GTP (Método 20). El valor de actividad de obtuvo directamente por densitometría de la Figura 18B. (○): transcripción *in vitro* usando DNA de timo de ternera y midiendo la incorporación de (³H)-UMP en el RNA (Método 18).

El promotor del gen de tRNA^{SER}, además de ser reconocido por la RNA polimerasa de *T. thermophilus*, lo es también por la polimerasa de *E. coli*. La Figura 18A muestra la autorradiografía de un ensayo de transcripción *in vitro*, usando como molde el fragmento XhoI a diferentes temperaturas. Se obtiene un producto de transcripción de un tamaño idéntico al que produce la enzima termofílica (400 b). La temperatura óptima para la RNA polimerasa de *E. coli* fue de 37°C, aunque se pudo detectar la aparición del transcrito en un rango de temperatura de 30°C hasta 45°C.

Un análisis de la capacidad de interacción de la RNA polimerasa de *E. coli* con el promotor del gen de tRNA^{SER} a diferentes temperaturas demuestra que se forman complejos retenibles en filtros de nitrocelulosa en un rango de temperatura desde 0°C hasta 45°C (Figura 20), disminuyendo drásticamente su formación, si se incrementa la temperatura de incubación sobre 45°C.

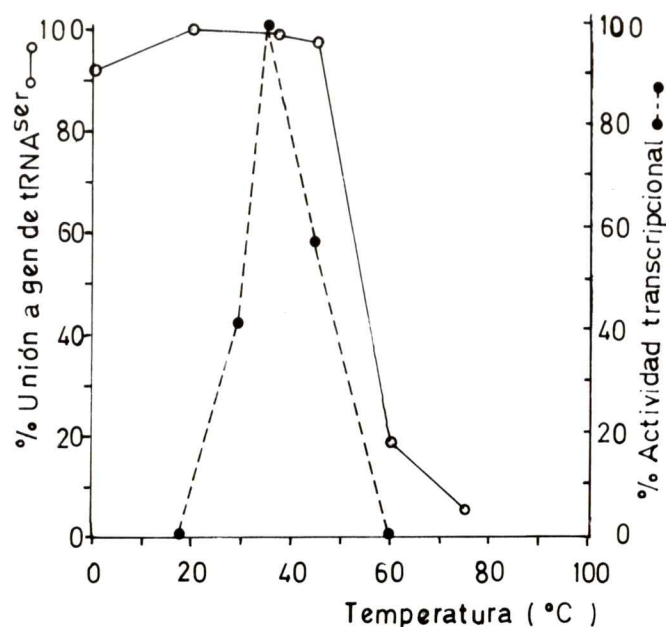


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la formación del complejo enzima-promotor entre la RNA polimerasa de *E. coli* y el gen de tRNA^{SER}. (○) unión al fragmento XhoI marcado con tritio. La unión y la detección de los complejos retenidos en filtro de nitrocelulosa se realizó de acuerdo a Métodos 21. Un 100% de retención del complejo corresponde a 72.000 cpm y representa el 90% del total del fragmento XhoI marcado disponible en el ensayo. (●) transcripción *in vitro* del gen de tRNA^{SER} cuantificada por densitometría de la autorradiografía de la Figura 18A. Se asignó un 100% de actividad transcripcional al máximo obtenido a 37°C.

18. EFECTO DE LA HEPARINA SOBRE LA UNIÓN DE LA RNA POLIMERASA AL PROMOTOR

Uno de los parámetros importantes de analizar en la formación del complejo RNA polimerasa-promotor es la estabilidad de éste. Estos estudios se han realizado con la RNA polimerasa de *E. coli* recurriendo a la adición de heparina en el ensayo para capturar la enzima libre y evitar la reunión al promotor (Hinkle y Chamberlin, 1972). El agente sustractor debe actuar en forma tal que al ser agregado al medio, después de formarse el complejo enzima-DNA no afecte grandemente su equilibrio. De este modo los estudios de disociación o estabilidad del complejo no estarán mal interpretados por una reasociación de la enzima al DNA. El compuesto más usado para este fin ha sido la heparina, que por su característica de polianión es capaz de unirse a la RNA polimerasa de *E. coli*, inhibiéndola. Con ésto, además, anula las interacciones débiles e inespecíficas de la enzima con regiones distintas al promotor.

Con el objeto de conocer la cantidad de heparina necesaria para inhibir la RNA polimerasa de *T. thermophilus*, se incubó la enzima con distintas concentraciones de heparina y luego se agregó el fragmento XhoI marcado para medir la capacidad de unión de la RNA polimerasa al promotor del gen. En la Figura 21 se muestran estos resultados. No se observa una inhibición apreciable de la RNA polimerasa en el rango de concentraciones usado para heparina, conservándose la capacidad de formación del complejos en alrededor de 70%, aún a una concentración de heparina de 40 ug/ml. El grado de inhibición de la enzima es similar tanto a 60°C como a 37°C y es marcadamente diferente a la sensibilidad de la RNA polimerasa de *E. coli*, que es inhibida totalmente a una concentración de heparina de 1 ug/ml.

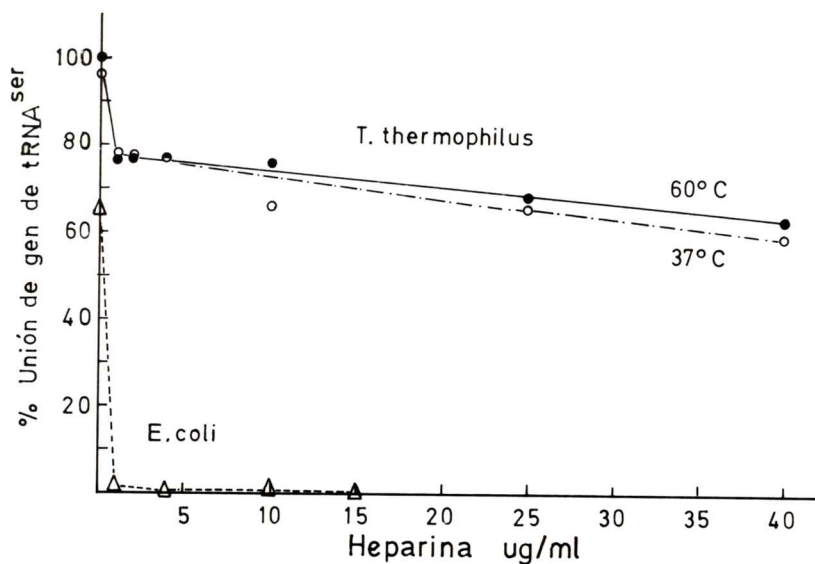


Figura 21. Efecto de la heparina sobre las RNA polimerasas de *T. thermophilus* y de *E. coli* previo a la formación del complejo con el promotor del gen tRNA^{ser}. Se incubó la enzima con distintas concentraciones de heparina durante 2 min y luego se agregó 20 ng del fragmento XhoI marcado con tritio (80000 cpm) incubando por 2 min adicionales a la misma temperatura. La proporción de complejos enzima-DNA formados se midió de acuerdo a Métodos 21. El ensayo de unión con la RNA polimerasa se hizo a 37°C.

DISCUSION

EL PROBLEMA ABORDADO

En el proyecto de Tesis se propuso estudiar el aparato transcripcional de un termófilo extremo con el fin de saber cómo ocurre la regulación génica a altas temperaturas. Esta meta se logró a través de varias etapas. En primer lugar se hizo una genoteca del DNA cromosomal de *Thermus thermophilus* en *Escherichia coli*, usando como vector pBR322. Por varios criterios se eligió un clon, el 111, el cual resultó que codificaba para un tRNA que incorporaba serina. Se analizó la estructura de este tRNA, así como también sus elementos regulatorios. Por otro lado, se purificó la RNA polimerasa del mismo organismo y se estudió la interacción RNA polimerasa-promotor del gen de tRNA, a nivel de transcripción *in vitro*, microscopía electrónica, retención del complejo en filtros de nitrocelulosa y protección del promotor frente a digestiones con enzimas de restricción.

1. ANALISIS DE LA GENOTECA FORMADA A PARTIR DEL DNA CROMOSOMAL DE *T. THERMOPHILUS*

El DNA cromosomal de *T. thermophilus* fue cortado con la enzima de restricción BamHI. Esta enzima reconoce la secuencia 5'GGATCC3'. La probabilidad que esta secuencia exista en el genoma bacteriano sería de $(1/4)^6 = 2,5 \times 10^{-4}$, y la enzima cortará teóricamente el DNA una vez cada 4096 bases. Sin embargo, en la secuencia reconocida por la enzima 4 de las 6 bases son G o C y además el genoma del termófilo es rico en GC (70%) (Oshima e Imahori, 1974, Vásquez, 1983), lo que eleva la probabilidad de existencia de estos sitios a

$(0,35)^4 \times (0,15)^2 = 3,4 \times 10^{-4}$, lo que equivale a un corte cada 2940 bases. No se conoce el tamaño del genoma de *Thermus thermophilus*, pero si es comparable al de *E. coli* (4×10^3 Kpb) el genoma del termófilo estaría representado por 1360 fragmentos de igual tamaño. Para clonar este genoma en *E. coli* se requieren al menos 1360 clones diferentes.

La problemática que surge entonces es: en cuántos de estos recombinantes estaría presente un gen que codificara para un tRNA. El desarrollo teórico para este tipo de análisis fue planteado inicialmente por Clarke y Carbon (1976). Se considera la probabilidad de tener clonado un determinado gen con un margen de seguridad de un 99%, según el tamaño promedio de los fragmentos producidos por la enzima de restricción en base a la siguiente ecuación:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

donde N es el número de recombinantes que son necesarios obtener un clon que posea el gen buscado con una probabilidad $P=0,99$. La razón f es el cociente de tamaños entre aquel del fragmento de restricción y el del genoma termofilico, y es igual en este caso a $7,35 \times 10^{-4}$. Sería necesario obtener 6263 recombinantes para tener la seguridad de encontrar un clon con un gen de tRNA. Se debe considerar que los genes de tRNA corresponden a una familia génica, ya que existen al menos tantos como aminoácidos son necesarios para la biosíntesis de proteínas. Además, cada tRNA que carga el mismo aminoácido puede tener isoaceptores, y cada uno de ellos puede estar incluso repetido. En *E. coli*, existen 60 genes de tRNA por genoma (Lewin, 1978), lo que hace que el número de recombinantes a obtener, si la distribución de estos genes es homogénea, sea sólo de 104 ($6263/60$), de los cuales uno de ellos correspondería a un gen de tRNA del termófilo, con una seguridad de un 99%.

Los resultados presentados en la Figura 1 nos muestran que la frecuencia de clones que contienen genes de tRNA es más

de la esperada. Los clones que se analizaron por hibridación fueron 120 de los cuales 8 se muestran en el gel y 4 de éstos dieron hibridación positiva con tRNA total. El número de genes detectados puede sugerir una distribución homogénea de ellos, es decir, no agrupados en "clusters", como se ha observado en *E. coli* (Ikemura y Ozeli, 1977), ya que si la distribución fuera de este modo, la probabilidad sería más baja. Sin embargo es difícil plantear una cierta distribución con tan bajo número de clones analizados.

Contrasta con este resultado algunas consideraciones tentativas del tamaño del genoma del termófilo. Es probable que este organismo tenga un cromosoma de menor tamaño que el de *E. coli* si se considera valedera una correlación entre longitud del DNA y número de operones ribosomales: en *E. coli* existen 7 operones (que incluyen en promedio 3 genes de tRNA cada uno) (Boros, Kiss y Venetianer, 1979) y para el termófilo se han descrito solo 2 operones (Ulbrich, Kumagai y Erdmann (1984). Es posible entonces que el número de genes de tRNA en *T. thermophilus* sea menor que en *E. coli*.

Con el número de clones analizados que representan solo una genoteca parcial se logró el objetivo propuesto: aislar un gen de tRNA.

En el proceso de detección de los genes de tRNA se descartó el uso del método de hibridación en colonia (Grunstein y Hogness, 1975) y se prefirió separar el DNA plasmidial del cromosomal antes de realizar la hibridación Southern. Esto se decidió al considerar una probable alta homología entre los genes de tRNA del termófilo y aquellos presentes en el cromosoma de *E. coli*. A modo de ejemplo hay una base diferente al comparar los tRNA^{MET} de ambas especies (Watanabe y col. 1979). En experimentos posteriores, destinados a crear otra genoteca de *T. thermophilus*, esta vez digiriendo el DNA con la enzima de restricción HindIII, se encontró que sí era posible detectar selectivamente genes de tRNA en presencia del DNA cromosómico de *E. coli*. Esto se realizó cambiando las

condiciones de lavado del filtro de nitrocelulosa luego de la hibridación en colonia, de tal modo que sólo las secuencias que presentaron gran homología entre sí permanecieron hibridadas. Además, la detección de las colonias recombinantes se facilita por el hecho que el plasmidio está presente en varias copias y esto puede aún aumentarse mediante amplificación con cloramfenicol (Scheilf y Wensick, 1981).

De los clones que se muestran en la Figura 1 se eligió el 111 por las razones ya mencionadas, pero también se hicieron estudios preliminares en otro clon de los allí mostrados, el 112. En este clon el inserto BamHI original contenía varios sitios adicionales BamHI, lo que indicó que al realizar la genoteca, la digestión de esta enzima sobre el DNA cromosomal fué incompleta. Se procedió a subclonar un trozo BamHI de 1800 pb que presentaba hibridación positiva con tRNA total de *T. thermophilus*. Actualmente se ha acotado a 150 pb la zona que hibrida y se está secuenciando este trozo por el método de Sanger. Con estos antecedentes es probable que este clon contenga también un sólo gen de tRNA, al igual que el clon 111. El análisis de otro promotor será de utilidad para saber si el tracto que separa los elementos de un promotor termofílico es normalmente rico en GC.

2. ESTRUCTURA DEL SEGMENTO DE DNA SECUENCIADO

La composición de GC del trozo de 506 bases secuenciado es de 67%, lo que está cercano al promedio general del DNA cromosómico y del gen de tRNA. En un análisis de distribución de GC a lo largo del fragmento secuenciado no se observan diferencias significativas en zonas ricas en GC. La mantención de la proporción mesofílica de GC es al parecer posible sólo en el caso de genes de pequeño tamaño, ya que en el gen que codifica para la isopropilmalato deshidrogenasa de *T. thermophilus* (Kagawa y col., 1984) el

porcentaje de GC de la región codificadora es de un 70%, valor dentro del promedio general del DNA cromosomal. Esto se logra mediante un uso de codones muy diferente del usado normalmente en *E. coli* (Ikemura, T., 1981).

En *E. coli* se conoce el gen del tRNA^{ser} y sus regiones adyacentes (Tamura, Nishimura y Ohki, 1984). El tRNA también está aislado, y 200 bases después del CCA se inicia una proteína de 23500 daltons. Nosotros comparamos la dos secuencias (la del fragmento XhoI y la reportada) no encontrándose homología significativa. Tampoco se encontró una secuencia de Shine Dalgarno (Shine y Dalgarno, 1974) en la cercanía de un codon de iniciación.

3. EL tRNA^{ser} TERMOFILICO

La estructura del tRNA^{ser} de *Thermus thermophilus*, deducida de la secuencia del gen fue analizada con respecto a su relación con otros tRNA publicados, como se muestra en Resultados. La conclusión es que el tRNA descrito en este trabajo se homologa muy bien con la estructura típica del tRNA procariótico descrita por Lewin (1981).

La composición de bases GC del tRNA descrito (63%) es la normal de un tRNA, similar a la del tRNA^{ser} de *E. coli*, y levemente diferente de la composición general del DNA cromosomal de *Thermus thermophilus*, que es de un 70% (Vásquez, 1983). Watanabe y col., (1980) encuentran que en el caso del tRNA^{met} el número de bases G y C es mayor (50 b en *T. thermophilus*) que en el tRNA homólogo de *E. coli* (39 b). Pero esto no es una regla general en los tRNA termofilicos, ya que en el caso de los otros tRNA analizados en el mismo trabajo, no existe una diferencia importante entre la composición de bases de los tRNA mesofilicos y termofilicos. Luego se deduce que la estabilidad térmica de los tRNA termofilicos de este microorganismo, no se logra por un enriquecimiento substancial en la composición en GC de la molécula, sino probablemente por modificaciones

post-transcripcionales de algunas de sus bases.

Se ha hecho mucho hincapié en la literatura acerca del alto porcentaje de GC como requerimiento estructural del DNA termofílico. Sin embargo existen casos de organismos no termofílicos con un porcentaje de GC más alto, como ser *Streptomyces lividans*, con un 73% (Jaurin y Cohen, 1984). Por otro lado, se ha descrito un termófilo con sólo un 25% de GC en su DNA cromosomal (Darlan y col., 1970).

El tRNA predicho por la secuencia de DNA tiene como anticodon GGA, es decir el codon reconocido es UCC. Este corresponde precisamente al codon de serina que es preferido en *T. thermophilus*, a juzgar por el uso de codones que se observa en el gen de la isopropilmalato deshidrogenasa (Kagawa y col., 1984). Esto implicaría que el tRNA transcrito a partir del gen que se ha clonado, sería uno de los más abundantes de tRNAs del termófilo, similar a lo encontrado en *E. coli*.

Además de la estructura del tRNA^{SER}, presentada en esta Tesis, el otro tRNA de *T. thermophilus* cuya secuencia se conoce es el tRNA^{MET} (Watanabe y col. 1979). Este tRNA existe en dos isoformas en el termófilo: tRNA₁^{MET} y tRNA₂^{MET}, en cantidades equivalentes. Se diferencian en una inversión, en el par C₅₁:G₆₃. La secuencia del tRNA₁^{MET} difiere del tRNA^{MET} de *E. coli* en cuatro bases: un reemplazo (C₅₁ en *T. thermophilus*U₅₀ por C₅₀ en *E. coli*) y tres modificaciones (G_{m19} por G₁₉, m¹A₅₈ por A₅₈ y s²T₅₄ por T₅₄). (La nomenclatura s²T₅₄ significa que la uridina 54, que ha sido metilada en la posición 5 del anillo, convirtiéndose en la ribotimidina, sufre la sustitución del grupo carbonilo de la posición 2 por un grupo tiocarbonilo). Si no se consideran las modificaciones, la homología con *E. coli* es de un 99%, que es mayor que la existente entre el tRNA^{MET} de *E. coli* y otros tRNAs iniciadores procarióticos. Esto sugiere una gran cercanía filogenética entre ambos organismos.

En *Thermus thermophilus* se ha visto que el punto de fusión

(T_M) de los tRNAs varía de acuerdo a la temperatura a la cual se ha crecido la bacteria (Watanabe y col. 1976, Watanabe y col. 1983). Por ejemplo, si se ha crecido a 50°C, el T_M es de 83,3°C, pero si se crecido a 80°C, el T_M es de 86,4°C. Aún más interesante es que este incremento en T_M es proporcional al contenido en s^2T . Cuando las bacterias crecen a 50°C, la s^2T representa el 27,8% de la población de uridinas en posición 54 de la molécula de tRNA. Al crecer las bacterias a 80°C, el contenido relativo de s^2T aumenta al 57,4%. Estos resultados sugieren que la estabilidad térmica de los tRNAs de *T. thermophilus* depende de la presencia de s^2T , y que la variación del contenido en s^2T , es el mecanismo de adaptación del tRNA al calor.

La presencia de la s^2T_{54} es una propiedad específica de las bacterias termofilicas extremas, no siendo encontrada en los tRNA de mesófilos, o aún de termófilos moderados (Oshima y col. 1977).

Algunas proposiciones del rol que tendría esta modificación son: fijación de una conformación de la ribosa (Yokoyama y col., 1979), una unión más favorable a iones magnesio (Watanabe y col. 1980) o un incremento en la energía de estabilización de la interacción (stacking) entre bases (Watanabe y col., 1979).

Según Yokoyama y col. (1979), la estabilidad de la estructura del tRNA termofililico estaría dada por la rigidez de la ribosa. Esto ocurriría porque el doble enlace C=S es más largo (1,66 Å) que el del grupo carbonilo (1,22 Å). Además, el radio de van der Waals del azufre es más largo (1,85 Å) que el del oxígeno (1,40 Å). Esto le permite al grupo tiocarbonilo interaccionar con, ya sea el hidrógeno (1') o con el hidroxilo (2') de la ribosa. El resultado de esto es que el nucleótido queda en una conformación definida. La existencia de esta base modificada en el termófilo produciendo un congelamiento de cierta conformación de la ribosa está sustentada por la

identificación de igual configuración para la T₅₄ determinada en la estructura tridimensional del tRNA^{PHE} de levadura. Un análisis por NMR de la base aislada en solución, demuestra un equilibrio de dos formas estructurales. La base modificada presenta sólo una de ellas (Yokoyama y col. (1979). Por lo tanto, la base modificada presente en la estructura del tRNA termofílico sólo permitiría en solución la conformación idéntica a la encontrada en la estructura del tRNA^{PHE}.

La segunda proposición sugiere que un factor con un rol importante en la termoestabilidad sería el magnesio (Watanabe y col. 1980). Esto se basa en la existencia de al menos dos sitios de unión del metal en el tRNA^{PHE} de levadura que están en la región en la cual el lazo T₄CG y el lazo de la dihidrouridina se asocian. El magnesio estabilizaría esta interacción. Estos sitios de unión de magnesio tendrían una posición topográfica equivalente en base a la similitud de estructuras terciarias de tRNA^{MET} de *E. coli* (Woo, Roe y Rich, 1980) y tRNA^{PHE} de levadura (Rich y RajBhandary, 1976). En los tRNAs de *Thermus thermophilus* los tres residuos modificados están ubicados en esta región, de modo que podrían fortalecer la interacción.

En relación a la tercera proposición, que parece ser la más probable, ella indica que las bases modificadas tendrían una energía de interacción superior a que si no lo estuvieran. Por ejemplo, se ha estudiado la estructura del ácido poli-2-tiouridílico (Mazumdar, Saenger y Scheit, 1974), encontrándose que el azufre interacciona con enlaces glicosídicos de la misma cadena, originando una gran estabilidad de la estructura general, probablemente dando cuenta del alto T_M del ácido poli-2-tiouridílico (68,5°), en comparación con el ácido poliuridílico (8°), medido bajo idénticas condiciones. Otro apoyo teórico a esta proposición es la comparación de las energías de interacción entre las bases G₅₃:T₅₄:T₅₅, cuando la T₅₄ esta reemplazada por s²T₅₄ (Aida y col. 1982). El resultado

teórico muestra que este reemplazo incrementa la energía de interacción en 1,16 Kcal/mol. Esto aumentaría el T_M en 7°C, lo cual puede explicar la estabilidad del tRNA termofílico. Sin embargo, los autores no excluyen las otras explicaciones acerca del rol de la sT_{54} .

Cualquiera que sea el mecanismo por el cual la base s^2T_{54} estabiliza el tRNA termofílico, es notable que un simple cambio de un oxígeno por un azufre tenga tanta importancia en la termoestabilidad.

4. EL PROMOTOR

A continuación se compara la secuencia del promotor procariótico de consenso con la del promotor del gen de tRNA^{SER} de *Thermus thermophilus*. En minúsculas están las bases que se presentan con una frecuencia menor que 60%.

<u>secuencia de consenso:</u>	TTGACat	TATAaT
<u>secuencia del gen tRNA^{SER}:</u>	TTGAC <u>CG</u>	TAC <u>ACT</u>

Es notable el grado de similitud entre la secuencia de consenso y la del gen descrito en este trabajo. Las diferencias (subrayadas) están sólo en aquellas bases menos conservadas. Los cambios ocurren en el sentido de producir un mayor número de enlaces de hidrógeno, cambiando un par AT (que está unido por dos enlaces) por un par GC (tres enlaces). Esta desviación se verá más marcada cuando se analice la zona que separa las dos regiones conservadas.

En el caso del promotor que se describe en este trabajo, el largo de la región espaciadora es de 17 pb, de modo que tiene el largo óptimo de espaciamiento (Dahl, 1983). La secuencia espaciadora reveló una característica interesante, cual es el alto contenido en bases G y C (82%) en el segmento separador de las cajas. Esta es una composición que se aleja del promedio, como se observa en la Figura 23, en la que se presenta una distribución de frecuencia de aparición en promotores en función del porcentaje de G y C, datos que hemos procesado a partir de una compilación de 105 promotores (Hawley y McClure 1983).

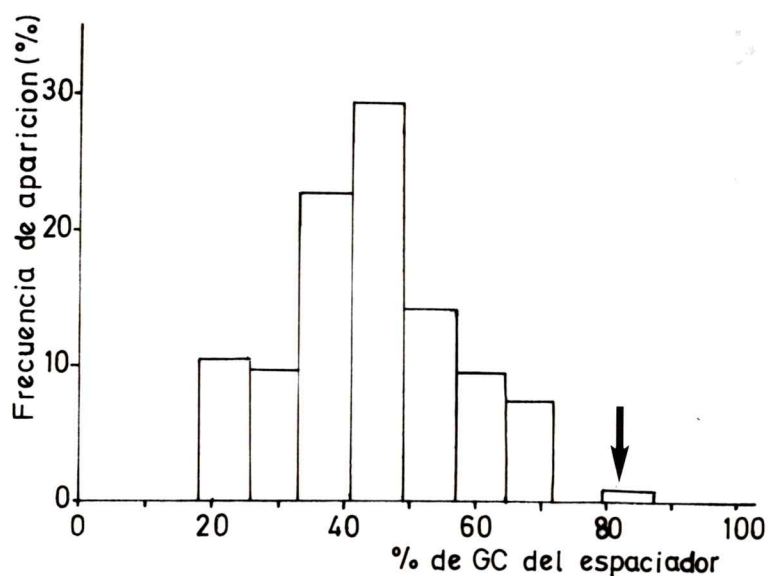


Figura 23. Distribución de frecuencias de bases G y C en el trecho que separa las regiones -35 y -10. Se observa que sólo existe además del nuestro (cuya posición se señala con una flecha) un caso con una composición de G y C de un 82%. Este corresponde al promotor TN5 Neo (Rothstein y Reznikoff, 1981).

Se conocen muchas mutaciones que afectan las regiones -35 y -10, pero hasta el momento sólo se ha publicado una en la secuencia espaciadora, que no altera su largo sino que cambia una G por una A (Busby y Truelle, 1984). Esta modificación produce un 40% de aumento en la expresión del gen mutado, lo que es mucho menor que las variaciones que se producen al insertar o retirar un par de bases del trozo espaciador (Hawley y McClure, 1983). La función de este trozo es separar las dos regiones conservadas, de tal modo que tengan la orientación adecuada para unirse a la RNA

polimerasa. El resultado anterior dice que al cambiar una base por otra también hay un cambio en la capacidad promocional. La explicación parece estar en que diferentes secuencias producen diferentes periodicidades en el DNA. En un homopolímero de $(dA)_n-(dT)_n$, existen 10 pares de bases por vuelta; en cambio, en un homopolímero $(dG)_n-(dC)_n$, hay 10,7 pares de bases por vuelta (Peck y Wang, 1981). De acuerdo a este cálculo, el cambio de una G por una A provocaría una alteración de $6,6^\circ$ en el giro de las hebras de DNA en el trozo separador del promotor, lo que bastaría para explicar un aumento en la expresión.

Actualmente no tenemos suficiente información como para definir la fuerza de un promotor analizando únicamente la secuencia. Un enfoque experimental al problema es transcribir los DNAs, que contienen los promotores que se desea analizar, en un ensayo en el que la RNA polimerasa pueda elegir entre ellos. Se puede comparar la cantidad de transcritos que son producidos después que el DNA es copiado una sola vez por la RNA polimerasa. Esto se logra agregando al medio heparina una vez que se ha producido la unión, pero no la iniciación de la transcripción. Este polianión se ha usado en la mayoría de los estudios de transcripción, ya que inhibe en forma efectiva y rápida a la enzima libre impidiendo su unión al promotor (Walter y col., 1967; Zillig y col., 1970). En estas condiciones, Kajitani e Ishihama (1983), estudiaron la capacidad transcripcional de los promotores del *rrnE*, *rpsA*, *recA*, *lac UV5*, *trp* y *rp1J*, todos de *Escherichia coli*. Concluyeron que el promotor *lac UV5* es el más fuerte de los estudiados, seguido por el promotor *trp*. En contraste, recientemente se ha encontrado que la RNA polimerasa de *E. coli* es capaz de unirse al promotor de consenso sintetizado químicamente y realizar varios ciclos de transcripción del gen aún en presencia de heparina (Rossi y col., 1983). Este resultado evidencia, en forma indirecta, una gran afinidad de este promotor por la enzima,

definiéndolo como el más fuerte de todos. En nuestro caso, la capacidad de unión al gen de tRNA^{SER} de la polimerasa de *E. coli* es inhibida cuando se incubaba previamente con bajas concentraciones de heparina, no pudiéndose unir al promotor del gen de tRNA^{SER} (Figura 21). No obstante, la RNA polimerasa termofílica no se ve afectada notablemente en estas condiciones, aun con una incubación previa de 40 ug/ml de heparina. Esto se puede deber a que la afinidad de la unión es mayor o a que la heparina no interacciona con la subunidad de 180 Kd homóloga a beta prima, como se ha descrito para *E. coli* (Zillig y col., 1970), de modo que no interfiere con los sitios que están participando en la unión al promotor.

Para determinar la fuerza relativa del promotor termofílico será necesario hacer experimentos de transcripción comparativos con la RNA polimerasa de *E. coli*. Esto puede lograrse entregando a la enzima cantidades estequiométricas de dos fragmentos de DNA que contengan promotores diferentes (y que originen transcritos distintos), para que se formen los respectivos complejos enzima-DNA, usando heparina y con ello permitiendo sólo un ciclo de transcripción, como lo han descrito Kajitani y Isihihama (1983).

Se han realizado experimentos preliminares con la RNA polimerasa de *E. coli* para comparar la eficiencia de transcripción de este promotor con el promotor lac UV 5 obtenido desde el plasmidio pUC 9 (Vieira y Messing, 1982). Se obtuvo una mayor cantidad de transcrito a partir del promotor termofílico (resultado no mostrado). Para estudios de interacción con la RNA polimerasa termofílica, una evidencia indirecta de la fuerza de este promotor puede sugerirse al comparar el número de moléculas unidas específicamente a promotores con respecto a un número determinado de fragmentos de DNA. Al analizar la unión a pBR322 (Gonzalez, Davagnino y Vicuña, 1985) se observó que de 344 moléculas de DNA analizadas, sólo 23 tenían la RNA

polimerasa unidas al promotor P₄, que es el más fuerte de los presentes en pBR322. En condiciones idénticas (el mismo experimento) de 344 moléculas de inserto de 3200 pb del clon 111 que se contaron, 74 tenían unidas moléculas de enzima en el promotor termofilico. La razón 74/23 es elocuente.

Para el sistema termofilico se han ensayado inhibidores de la transcripción, como ser heparina y Rojo Congo que normalmente se han usado en *E. coli* para estudiar la fuerza de la interacción polimerasa promotor (Kajitani e Ishihama, 1983, Woody, Reisbig y Woody, 1981). En el sistema termofilico los resultados así obtenidos son de difícil interpretación por el efecto refractario de la RNA polimerasa frente a estos inhibidores.

5. INTERACCION PROMOTOR-RNA POLIMERASA

El reconocimiento e interacción de la RNA polimerasa con el promotor es una etapa fundamental en el proceso de transcripción. Además, constituye un medio de regulación en la expresión génica, ya que la polimerasa se puede unir con distintos grados de afinidad a los diversos promotores, dependiendo de las características propias de éstos.

Se han realizado numerosos estudios en los que se ha caracterizado la interacción que ocurre entre la RNA polimerasa de *E. coli* y promotores que son reconocidos por esta enzima (Siebenlist, Simpson y Gilbert, 1980), pero hay escasa información acerca de cómo ocurre este proceso en organismos que normalmente viven a altas temperaturas.

Las interacciones inespecíficas de la RNA polimerasa con el DNA se han clasificado de acuerdo a la fuerza de la unión de la RNA polimerasa a estos sitios definidos funcionalmente como "no promotores". Así, se describen las uniones débiles, que son de carácter electrostático (Melacon, Burgess y Record, 1982; von Hippel y col., 1984), las uniones fuertes (menos frecuentes) que tienen características similares a la unión específica de la enzima y las uniones a los extremos

del DNA si éste es lineal (Melacon, Burgess y Record, 1982). Las uniones débiles y fuertes pueden ser eliminadas aumentando la fuerza iónica y las uniones débiles pueden reducirse con heparina. El uso de DNA circular evita el efecto de interacción con los extremos del DNA.

Se ha comentado que la afinidad de la RNA polimerasa por los extremos del DNA es una de las interacciones inespecíficas más fuertes (ver revisión de von Hippel y col, 1984). Este último tipo de interacción puede ser una fuente importante de error para el método de retención de complejos de nitrocelulosa en que no se visualiza directamente el lugar de interacción. En los estudios descritos aquí fue necesario agregar una razón molar enzima DNA de al menos 18/1 (Figura 13). Nótese que esta es una proporción proteína/DNA, por lo que la proporción real puede ser menor. Con esta relación se logró llegar al máximo de unión del gen de tRNA^{SER}. La diferencia entre el número de moléculas de enzima y el número de moléculas de DNA (o número de promotores, considerando un promotor por molécula de DNA), es grande, si se piensa que la unión es estequiométrica. Bajo estas condiciones es muy probable que ocurran algunas uniones inespecíficas de la enzima a sitios del DNA que no son promotores. Se ha comunicado para *E. coli* que una razón de 5:1 es óptima para obtener el máximo de unión a un determinado promotor si se usa una enzima saturada en subunidad sigma (Strauss y col., 1981). Los datos de unión en base a los estudios de microscopía electrónica, indican un 35% de unión al sitio promotor. Este valor puede estar afectado por la eficiencia del proceso de fijación con glutaraldehído, por la reversibilidad de la interacción y por el grado de sobre enrollamiento del DNA. La ubicación del promotor concuerda muy bien con datos anteriores sobre la localización del promotor deducida a partir de la secuenciación del DNA y por ubicación del inicio de la transcripción. Estos resultados también han revelado que en las condiciones de ensayo descritas no se

detecta unión inespecífica a los extremos del DNA. En los experimentos de microscopía electrónica, la RNA polimerasa se incubó a 60°C con el clon 111. Posteriormente la mezcla de DNA y enzima se sometió a digestión con BamHI, a 37°C, Para separar el inserto del vector. La RNA polimerasa presente podría haberse unido a las puntas de los fragmentos de restricción. Esto no se detectó en los histogramas mostrados en la Figura 16. El reconocimiento específico del promotor ha sido también corroborado por los experimentos de protección con la RNA polimerasa frente a la enzima de restricción RsaI, la cual corta dentro de la caja de Pribnow del promotor del gen de tRNA^{SER}. La protección es de 100%, indicando que en las condiciones de ensayo, todas las secuencias promotoras en las moléculas de DNA, tienen la RNA polimerasa unida.

Al medir la formación del complejo en filtros de nitrocelulosa, agregando heparina en concentraciones mayores que 100 ug/ml, luego de formado el complejo (resultados no mostrados) la unión se reduce sólo en un 30%, lo que correspondería a interacciones débiles.

En resumen, la especificidad medida por microscopía electrónica y por protección frente a enzimas de restricción marcan los límites del porcentaje de unión específica, cuyo valor absoluto es difícil de precisar.

Existen dos factores importantes que considerar en cuanto a la actividad transcripcional específica.

- 1) La proporción de enzima que mantiene, al final del proceso de purificación (DNA-celulosa), sus subunidades en proporción estequiométrica, en especial la subunidad sigma, que es la que está unida más débilmente al resto de las subunidades, y que durante el ciclo transcripcional se desprende del resto de la enzima. En teoría sería posible que el grado de interacciones inespecíficas detectadas en el ensayo reflejase la proporción de enzimas carentes de subunidad sigma. La presencia de interacciones específicas debido a la falta de esta subunidad no puede descartarse

absolutamente ya que como se muestra en la Figura 8B la composición de subunidades de la enzima revela una estequiometría alrededor de 0,7 para la subunidad sigma.

2) El segundo factor es la población de holoenzimas activas que llegan como tales al último paso de purificación. Este es en sí un problema muy difícil en cualquier sistema enzimático, más aún en este caso por cuanto el producto de la catálisis es un polímero y uno de los componentes (DNA) no puede ser definido como sustrato, y existen múltiples pasos en el proceso catalítico global.

Se ha intentado abordar este problema diseñando un método para medir la cantidad de RNA polimerasa activa de *E. coli* (Chamberlin, 1981). Este se basa en tener un promotor fuerte y un inactivador de la enzima libre, como es la heparina. Cuando este método se aplicó a varias preparaciones diferentes de la enzima de *E. coli* pura, los valores encontrados variaron en un rango de 10 a 90% de enzima activa. El método fue aplicado para varias polimerasas, purificadas de otros microorganismos, pero no es aplicable en el caso de la polimerasa de *T. thermophilus*, ya que no se conoce actualmente un agente capaz de inhibir la enzima que se libera del DNA, sin afectar el complejo mismo.

6. EFECTO DE LA TEMPERATURA

La transcripción del gen de *tRNA^{SER}* *in vitro* con la polimerasa termofílica tiene una temperatura óptima de 60°C (Figuras 18B y 19), muy cercana a la cual vive *T. thermophilus* y hay una disminución total de la transcripción bajo los 30°C (Figura 19), temperatura a la cual se observa un 42% de transcripción del mismo gen con la polimerasa mesofílica (Figura 18A y 20). Sin embargo, la unión al promotor en ambos casos, no se ve afectada en un amplio rango de temperatura (Figuras 19 y 20). Esto significa que el paso limitante para la transcripción, que es dependiente de temperatura, corresponde a una etapa posterior al

reconocimiento del promotor.

El hecho de que la RNA polimerasa de *E. coli* pueda formar complejos con el fragmento XhoI retenibles aún a 0°C, condiciones en que no se detecta actividad transcripcional, no es sorprendente ya que se ha observado lo mismo con otros promotores mesofílicos (Hinkle y Chamberlin, 1972).

La RNA polimerasa de *E. coli*, al unirse a un promotor forma un complejo inicial, llamado "complejo cerrado", que no es capaz de iniciar el proceso catalítico de polimerización (Hinkle y Chamberlin, 1972; Chamberlin, 1974; Rosenberg, Kadesch y Chamberlin, 1982). Es necesaria la conversión a un "complejo abierto" de naturaleza más estable para que ocurran las etapas siguientes. Este es un proceso dependiente de la temperatura (Hinkle y Chamberlin, 1972). Este cambio implica una separación de las hebras de DNA que involucra una región de 11 bases del promotor, desde la posición -9 hasta la +3 (Siebenlist, 1979). (Hinkle y Chamberlin, 1972). La transición de menor a mayor estabilidad del complejo es muy marcada para la RNA polimerasa de *E. coli* y ocurre a los 20°C con los promotores del fago T7, con un cambio de entalpía que favorece la formación del complejo abierto (Mangel y Chamberlin, 1974; Chamberlin, 1974). Para la RNA polimerasa de *T. thermophilus*, en un sistema heterólogo, usando un promotor del fago fd, se ha podido determinar que a 50°C se produce la conversión de complejo cerrado a complejo abierto, a juzgar por variaciones que se producen en los espectros de dicroísmo circular al formar los complejos a distintas temperaturas (Tsuji y col., 1980).

Experimentos no mostrados, conducentes a explorar una transición entre complejo abierto y complejo cerrado en el sistema descrito, basados en un cambio de estabilidad, dieron resultados negativos.

7. HOMOLOGIA ENTRE LAS RNA POLIMERASAS

Existe suficiente evidencia experimental apoyando la idea que hay rasgos comunes entre las polimerasas termofilicas y mesofilicas. Se sabe que la RNA polimerasa de *T. thermophilus* se une a un promotor del fago fd, iniciando la transcripción en el mismo punto desde donde parte la RNA polimerasa de *E. coli* (Tsuji y col., 1980) y que es capaz de unirse a pBR322 en los mismos sitios donde se une la RNA polimerasa de *E. coli* (Gonzalez, Davagnino y Vicuña, 1985). Por otra parte la RNA polimerasa de *E. coli* puede transcribir *in vivo* el gen de la enzima isopropil malato deshidrogenasa de *T. thermophilus* clonado en pBR322 (Nagahari y col., 1980; Tanaka y col., 1981), además de los experimentos de transcripción *in vitro* del gen de tRNA^{ser} ya comentados.

El análisis comparativo de las dos RNA polimerasas en cuanto a los sitios que participan en la unión a DNA y al mecanismo por el cual ocurre la interacción específica enzima-promotor, se ve obstaculizado por la restricción para aplicar ciertas técnicas con la polimerasa termofílica (carencia de un secuestrador apropiado de la enzima libre) y la limitación que implican algunos ensayos a altas temperaturas. Un ejemplo: determinar las bases del promotor que están participando en la unión con la RNA polimerasa, mediante estudios de protección, frente a metilación o etilación. Se han realizado experimentos preliminares de protección a metilación por dimetilsulfato. Sin embargo, los resultados no son claros ya que la reacción de metilación no es controlable a la temperatura que se realiza la unión. En otros casos, mediante el uso de esta técnica, se ha encontrado que las RNA polimerasas de *E. coli* y de *Pseudomonas putida* (Gragerov y col., 1984), ambos mesófilos gram negativos, utilizan los mismos puntos de contacto en cuatro promotores. Más aún, *Streptomyces lividans*, un gram negativo, también mantiene las mismas interacciones,

conclusión basada en estudios de mutantes en el promotor (Jaurin y Cohen, 1984).

B. TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION

Se han descrito numerosos sitios dentro de los DNA de bacterias y de fagos que indican el término de la transcripción (Holmes, Platt y Rosenberg, 1983). Además de especificar el término de una unidad de transcripción, estas señales juegan un rol importante en la regulación de la expresión génica en un fenómeno denominado atenuación (Yanofsky, 1981).

Las secuencias de terminación exhiben rasgos estructurales comunes. Generalmente constan de una secuencia repetida invertida, rica en GC, seguida por un trozo de varias Ts. Estas secuencias de DNA pueden plegarse formando un tallo y un lazo, lo que probablemente ocurre en el RNA, induciendo una detención momentánea de la enzima, la que luego alcanza una zona rica en AT, en que se libera del DNA. Estas señales interrumpen la transcripción sin requerir de otros factores, y por eso se las denomina "terminadores independientes", en oposición a las señales que necesitan factores proteicos para detener la transcripción. Estos últimos no presentan la conservación a nivel de secuencia que muestran los terminadores independientes (Rosenberg y Court 1979).

Una estructura con los requerimientos de un terminador independiente aparece al final de la región codogénica del gen $tRNA^{SER}$. Ella consta de un tallo de 8 GC continuadas, que puede ser extendido a 9 si se considera un apareamiento GT al inicio del tallo. Cuatro nucleótidos después del término del tallo aparece una secuencia de cuatro Ts consecutivas.

En los experimentos de transcripción mostrados se obtuvieron RNAs de un tamaño mayor que lo esperado. Si este sistema de terminación hubiese funcionado *in vitro* sólo se hubiese esperado un precursor de 132 bases (Figura 10).

Cuando la enzima de *E. coli* es usada, se encuentra el mismo resultado (Figura 10). El mecanismo de terminación parece ser un proceso general ya que hay evidencias que ocurre tanto para procariotes como para RNA polimerasa II (Henikoff, Kelly y Cohen, 1983) y RNA polimerasa III (Bogenhagen y Brown, 1981). En alguno de estos casos se ha detectado la presencia de cierto número de Ts consecutivas y algunos mutantes de terminación carecen del número de Ts suficientes (Bertran y col., 1977). La ausencia de terminación en nuestro ensayo de transcripción *in vitro* podría deberse a la presencia de sólo cuatro Ts consecutivas. Ellas no serían suficientes para la terminación de la transcripción *in vitro*, como se ha descrito para un mutante en la estructura del atenuador del gen *trp E* de *E. coli*, en el que sólo 4 de las 8 Ts permanecen (Bertran y col., 1977). Este mutante sí funciona con mediana eficiencia *in vivo* por lo que se supone que algún factor proteico facilitaría además la terminación.

9. CONCLUSIONES FINALES

La evidencia experimental presentada en esta Tesis, muestra que en general el aparato transcripcional aislado del termófilo extremo *Thermus thermophilus* HB8 se comporta en forma similar al de las bacterias mesofílicas pero funcionando óptimamente a temperaturas más altas.

El análisis del promotor del gen que codifica para el tRNA^{SER}, que es el primer promotor termofílico de secuencia conocida, estaría de acuerdo con la teoría macromolecular, para explicar las bases de la termoestabilidad, ya que presenta un rasgo único en su estructura, como es el espaciador rico en GC. Para corroborarlo debería demostrarse que tiene un rol en la termoestabilidad funcional del gen. Se concluye que las diferencias entre mesófilos y termófilos a nivel molecular deben ser menores, ya que pequeñas diferencias bastarían para conferir la adaptación

evolutiva a altas temperaturas.

En síntesis, hay analogías suficientes para ratificar la universalidad de los mecanismos moleculares que la naturaleza ha escogido para expresar vida en ambientes tan diferentes.

Las siguientes etapas de estudio, a realizar en el futuro, estarán enfocadas a:

- 1) Secuenciar el gen que codifica para un tRNA en el clon 112, con el fin de saber si la estructura rica en GC es un rasgo general en los promotores termofílicos.
- 2) Estudiar la expresión del clon 111 en *E. coli*.
- 3) Determinar el grado de eficiencia con que la RNA polimerasa de *E. coli*, y eventualmente la enzima termofílica pueden unirse al promotor del gen de tRNA^{SER}.
- 4) Con respecto a la terminación de la transcripción, se proponen enfoques como: a) analizar el efecto del factor rho con la RNA polimerasa de *E. coli*; b) modificar la estructura terminadora incluyendo un mayor número de Ts en la zona conflictiva y ver su funcionalidad.
- 5) Estudiar la distribución de los genes de tRNA en el termófilo para establecer si la mayoría de ellos existen como unidades transcripcionales independientes, como las de los clones 11 y 112, o están organizados en clusters"

REFERENCIAS

- Ackerson, J. y Gralla, J. (1982) *in vivo* expression of *lac* promoter variants with altered -10, -35 and spacer sequences. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 473-476.
- Aida, M., Nagata, C. Ohmine, I. y Morokuma, K. (1982). *Ab Initio* Molecular Orbital Study on the Thermostability of the Extreme Thermophile tRNA: Role of the Base Stacking. J. theor. Biol. 99:599-608.
- Allen, M. M. (1953). The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. Bacteriol. Rev. 17: 125-173.
- Ameluxem, R. y Murdock, A. (1978) Mechanisms of thermophily. C.R.C. Crit. Rev. Microbiol. 6: 343-393.
- Aoyama, T., Takanami, M., Ohtsuka, E. Taniyama, Y., Marumoto, R., Hiroko, H. y Ikehara, M. (1983). Essential structure of *E. coli* promoter: effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function. Nucleic Acids Res. 11:5855-5864.
- Barker, D.G. (1982). Cloning and amplified expression of the tyrosyl-tRNA synthetase genes of *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 25: 357-360.
- Baross, J.A. y Deming, J.W. Growth of "black smoker" bacteria at temperatures of at 250°C. (1983). Nature 303: 423-426.

- Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70: 241-250.
- Bertran, K., Korn, L.J., Lee, F. y Yanofsky, C. (1977) The attenuator of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Heterogeneous 3'-OH termini *in vivo* and deletion mapping of functions. *J. Mol. Biol.* 117: 227-247.
- Bogenhagen, D. F. y Brown, D. D. (1981) Nucleotide sequence in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell* 24: 261-270.
- Boros, I., Kiss, A., y Venetianer, P. (1979) Physical map of seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *NAR* 6: 1817-1830.
- Boyer, H. y Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Brock, T.D. (1967) Life at high temperatures. *Science* 158: 1012-1019.
- Brock, T. D. (1978) En: "Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin pp 41-46.
- Bull, P., Zaldivar, J., Venegas, A., Martial, J. y Valenzuela, P. (1975) Inactivation of *E. coli* RNA polymerase by pyridoxal 5'-phosphate: identification of a low pKa lysine as the modified residue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64: 1152-1159.

- Burgess, R. (1969) A new method for the large-scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 244: 6160-6167
- Burgess, R. R., Travers, A.A., Dunn, J.J. y Bautz, E.K.F. (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 211: 43-
- Burgess, R. (1976) Purification and physical properties of *E. coli* RNA polymerase. En: RNA polymerase. (Losick y Chamberlin editores) Cold Spring Harbor Lab. pp 69-100.
- Burgess, R. y Jendrisak, J. (1975) A procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography. *Biochemistry.* 14: 4634-4639.
- Burton, Z., Burgess, R., Lin, J., Moore, D., Holder, S. y Gross, C. (1981) The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 9: 2889-2903.
- Busby, S., Truelle, N., Spassky, A., Dreyfus, M. y Buc, H. (1984). The selection and characterisation of two novel mutations in the overlapping promoters of the *Escherichia coli* galactose operon. *Gene* 28:201-209).
- Chamberlin, M. (1974) The selectivity of transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 721-775.
- Chothia, C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 537-572.

- Clarke, L. y Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91.
- Date, T., Suzuki, K. y Imahori, K. (1975) Purification and some properties of DNA-dependent RNA polymerase from an extreme thermophile. *J. Biochem. Tokio.* 78: 845-858.
- Davison, B., Egly, J-M., Mulvihill, E. y Chambon, P. (1983) Formation of stable preinitiation complexes between eukariotic class B transcription factors and promoter sequence. *Nature* 301: 680-686.
- Dahl, H-H. (1983) Constructing the optimal promotor. *TIBS* 8: 230.
- Davanloo, P., Sprinzl, M., Watanabe, K., Albani, M., y Kersten, H. (1979) Role of ribothymidine in the thermal stability of transfer RNA as monitored by proton magnetic resonance. *Nucleic Acids Res.* 6:1571-1581.
- Deutscher, M. P., Lin, J. J. C. y Evans, J. (1977) Transfer RNA Metabolism in *Escherichia coli* cells deficient in tRNA nucleotidyltransferase. *J. Mol. Biol.* 117: 1081-1094.
- Doi, R. (1977) Role of ribonucleic acid polymerase in gene selection in prokariotes. *Bacteriol. Reviews* 41: 568-594.
- Dynan, W. y Tjian, R. (1983a) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32: 669-680.
- Dynan, W. y Tjian, R. (1983b) The promoter-specific transcription Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87.

- Eberhard, M., Vásquez, C., Valenzuela, P., Vicuña, R. y Yudelevich, A. (1981) Physical characterization of a plasmid (pTT1) isolated from *Thermus thermophilus*. Plasmid 6: 1-6.
- Fukuda, R., Ishihama, A., Saitoh, T. y Taketo, M. (1977) Comparative studies of RNA polymerase subunits from various bacteria. Molec. Gen Genet. 154: 135-144.
- Gauss, H.D. and Sprinzl, M. (1983) Compilation of tRNA sequences. Nucleic Acids Res. 11: r1-r53.
- Gerard, G., Johnson, J y Boezi, J. (1972) Release of the sigma subunit of *Pseudomonas putida* deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase. Biochem. 11: 989-997.
- Gilbert, W. (1976).: Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. 193-205. En: Losick, R., Chamberlin, M. J., eds. 1976. *RNA polimerase*. New York: Cold Spring Harbor Lab.
- González, B., Davagnino, J. y Vicuña, R. (1984) Electron microscopic mapping of *Thermus thermophilus* RNA polymerase binding sites on plasmid pBR322. Comp. Biochem. Physiol. In press.
- González, B., Vasquez, C., Bull, P. y Vicuña, R. (1984) Electron microscopy mapping of *Escherichia coli* RNA polymerase-binding sites on plasmids from thermophilic bacteria. DNA 3: 251-257.
- Gragerov, A. y Mirkin, S. (1980) Influence of DNA superhelicity on major genetic processes in prokariotes. J. Molec. Biol. USRR. 14: 8-34.

- Gragerov, A., Chenchik, A.; Aivasashvilli, V., Beabealashvilli, R. y Nikiforov, V. (1984). *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* RNA polymerases display identical contacts with promoters. *Mol. Gen. Genet.* 195: 511-515.
- Grunstein, M. y Hogness, D. (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene *PNAS* 72: 3961-396.
- Haldenwang, W. G., Lang, N. y Losisk, R. (1981) A sporulation-induced sigma-like regulatory factor from *B. subtilis*. *Cell* 23: 615-624.
- Haming, J., Gruber, M. y Geert, AB. (1979) Interaction between RNA polymerase and a ribosomal RNA promoter of *E. coli*. *Nucl. Acid. Res.* 7: 1019-1033.
- Haming, J., Geert A. B. y Gruber, M. (1980) *E. coli* RNA polymerase-rRNA promoter interaction and the effect of ppGpp. *Nucleic Acids Res.* 8: 3947-3963.
- Hawley, D. y McClure, W. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acid. Res.* 11: 2237-2255.
- Henikoff, S., Kelly, J. D. y Cohen, E. H. (1983) Transcription terminates in yeast distal to a control sequence *Cell* 33: 607-614.
- Hinkle, D. y Chamberlin, M. (1972) Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. *J. Mol. Biol.* 70: 157-185.
- Holmes, W. M., Platt, T. y Rosenberg, M. (1983) Termination of transcription in *E. coli*. *Cell* 32: 1029-1032.

- Hsu, L.M., Klee, H.J., Zagorrski, J. y Fournier, M.J. (1984) Structure of an *Escherichia coli* tRNA operon containing linked genes for arginine, leucine and proline tRNAs. *J. Bacteriol.* 158: 934-942.
- Hudson, L., Rossi J., y Landy, A., (1981) Dual function transcripts specifying tRNA and mRNA. *Nature* 294: 422-427.
- Ikemura, T. y Ozeki, H. (1977) Gross map location of *Escherichia coli* transfer RNA genes. *J. Mol. Biol.* 117: 419- 446.
- Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J. Mol. Biol.* 151: 389-409.
- Ilgen, C. Kirk,L. y Carbon,J. (1976) Isolation and characterization of large transfer ribonucleic acid precursors from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 251: 922-929.
- Jaskunas, S., Burgess, R. y Nimura, M. (1975) Identification of a gene for the alfa-subunit of RNA polymerase at the str-spc region of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 5036-5040.
- Jaurin, B. y Cohen, S. N. (1984) *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals. *Gene* 28: 83-91.
- Jones, O. y Berg, P. (1966) Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides. *J. Mol. Biol.* 22: 199-209.

- Kadesch, T., Rosenberg, S. y Chamberlin, M. (1982) Binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to bacteriophage T7 DNA. *J. Mol. Biol.* 155: 1-29.
- Kagawa, Y., Nojima, H., Nukiwa, N., Ishizuka, M., Nakajima, T., Yasuhara, T., Tanaka, T., y Oshima, T. (1984). High guanine plus cytosine content in the third letter of codons of an extreme thermophile. *J. Biol. Chem.* 259: 2956-2960.
- Kajitani, M. y Isihihama, A. (1983). Determination of the promoter strength in the mixed transcription system, II. Promoters of ribosomal RNA, ribosomal protein S1 and *recA* protein operons from *Escherichia coli*. *NAR* 11:3873-3889.
- Kassavetis, G. A., Elliot, T., Rabussay, D. P. & Geiduschek, E. P. (1983). Initiation of transcription at phage T4 late promoters with purified RNA polimerase. *Cell* 33: 887-897.
- Koffler, H., Mallet, G.E. y Adye, J. (1957) Molecular basis of biological stability to high temperatures. *PNAS* 43 464-477.
- Komiya, H., Kawakami, M., Takemura, S., Kumagai, I. y Erdmann, V. A. (1983) Terminal heterogeneity and corrections of the nucleotide sequence of 5S rRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Res.* 11: 913-916.
- Laemmli, V. (1970). *Nature* 227: 680-685.
- Langridge, J. (1968) Genetic and enzymatic experiments relating to the tertiary structure of Beta-galactosidase *J. Bacteriol.* 96: 1711.
- Le Grice, S. y Sonenshein, A. (1982) Interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with a chromosomal promoter. *J. Mol. Biol.* 162:551-564.

- Lewin, B. (1978) En: Gene expression. Vol. 1. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Lewin, B. (1983) En: Genes. John Wiley & Sons, Inc, New York. pp 174-194.
- Linn, T. y Scaife, J. (1978) Identification of a single promoter in *E. coli* for *rplJ*, *rplL* and *rpoBC*. *Nature* 276: 33-37.
- Losick, R. y Chamberlin, M. (eds.) (1976) RNA polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Losick, R. y Pero, J. (1976) Regulatory subunits of RNA polymerase. En: Losick, R. y Chamberlin, M. (eds) RNA polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p227.
- Mangel, W. y Chamberlin (1974) Studies of ribonucleic acid chain initiation by *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase bound to T7 Deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 249: 3007-3013.
- Maniatis, T, Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, A. y Roeder, R (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polimerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992-11996.
- Matthews, B. W. y Remington, S.J. (1974). The three dimensional structure of the lysozyme from Bacteriophage T4. *PNAS* 71: 4178-4182.

- Matthews, B. W. (1975). Round table and general discussion on structure and function of thermophilic enzymes and proteins. En: Enzymes and proteins from thermophilic microorganism. Ed.: Zuber, H. Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart. pp.418.
- Mazumdar, S. K., Saenger, W. & Scheit, K. H. (1974). Molecular structure of poly-2-thiouridilic acid, a double helix with non-equivalent polynucleotide chains. J. Mol. Biol. 85:213-229.
- Meagher, R., Tait, R., Betlach, M. y Boyer, H. (1977) Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. Cell 11: 521-536.
- Melacon, P., Burgess, R y Record, T. (1982) Nitrocellulose filter binding studies of the interactions of *Escherichia coli* holoenzyme with deoxyribonucleic acid restriction fragments: Evidence for multiple classes of nonpromoter interactions, some of wich display promoter-like properties. Biochemistry 21: 4318-4331.
- Melacon, P., Burgess, R. y Record, T. (1983) Direct evidence for the preferential binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to the ends of deoxyribonucleic acid restriction fragments. Biochemistry 22: 5169-5176.
- Merkler, D.J., Farrington, G.K. y Wedler, F.C. (1981) Int.J. Peptide Proteins Res. 18: 430-442.
- Minkey, E.G. & Pribnow, D. (1973). Transcription of the early region of bacteriophage T7. Selective initiation with dinucleotiddes. J. Mol. Biol. 77:255-277.

- Nagahari, K., Koshikawa, T., Sakaguchi, K. (1980) Cloning and expression of the leucine gene from *Thermus thermophilus* in *Escherichia coli*. *Gene* 10: 137-145
- Nakano, E. y Sakaguchi, K. (1971) The binding sites for *Escherichia coli* RNA polymerase on lambda phage DNA: characteristics of binding sites on sonicated lambda DNA. *FEBS Letters* 14: 139-142.
- Nishimura, S., Harada, F., Narushima, U. y Seno, T. (1967) Purification of methionine-, valine-, phenylalanine- and tyrosine-specific tRNA from *Escherichia coli* *Biochim. Biophys. Acta* 142: 133-148.
- Ohno-Iwashita, Y., Oshima, T. and Imahori, K. (1975). *Z. Allg. Mikrobiol.* 15:131-134.: Similitud taxonómica entre *E. coli* y *T. thermophilus*.
- Oshima, T. (1978) en "Biochemistry of Thermophily" Eds. S. Marvin Friedman, Acad. Press N. Y. pp. 31-44.
- Oshima, T. (1979) A new polyamine, thermospermine, 1,12-Diamino-4,8-diazadodecane, from an extreme thermophile. *J. Biol. Chem.* 254: 8720-8722).
- Oshima, T. y Baba, M. (1981) Occurrence of sym-homospermidine in extremely thermophilic bacteria. *BBRC* 103: 156-160.
- Oshima, T. y Imahori, K. (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a non sporulating thermophilic bacterium from a Japanese Thermal Spa. *Int. J. System. Bacteriol.* 24: 102-112.

- Oshima, T., Kato, M. y Watanabe, K. (1977). Nucleic Acids Res. Special Publ. 3: s185-s188.
- Oshima, M., Sasaki, Y. y Oshima, T. (1978) ω -cyclohexyl fatty acids in acido-thermophilic bacterial membranes and phage capsids. En "Biochemistry of Thermophily" Eds. S. Marvin Friedman, Acad. Press N. Y. pp. 31-44.
- Ovchinnikov, Yu.A., Lipkin, V.M., Modyanov, N.N., Chertov, O. Yu. y Smirnov, Yu. V. (1977) Primary structure of α -subunit of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. 76: 108-111.
- Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Gubanov, V.V., Guryev, S.O., Chertov, O. Yu., Modyanov, N.N. Grinkevich, U.A., Makarova, I.A., Marchenko, T.V., Polovnikova, I.N. Lipkin, V.M., y Sverdlov (1981) The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpo* gene and amino acid sequence of the β subunit. Eur. J. Biochem. 116: 621-629.
- Ovchinnikov y co (Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Gubanov, V.V., Guryev, S.O., Salomatina, I.S., Shuvaeva, T.M., Lipkin, V.M. y Sverdlov (1981) The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpoC* gene and amino acid sequence of the β' subunit. Nucleic Acids Res. 10: 4035-4044.
- Ozeki, H. en: RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes; Their Genetics and Evolution (eds. Ozaka, S., Ozeki, H., Uchida, H. & Yura, T.) pp. 173-183 (tokyo University Press, 1980).
- Pace, B. y Campbell, L.L. (1967). Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 1110-1116.

- Park, C., Hillel, Z. y Wu C. (1980) DNA strand specificity in promoter recognition by RNA polymerase 8: 5895-5911.
- Peck, L.J. y Wang, J.C. (1981). Sequence dependence of the helical repeat of DNA in solution. *Nature* 292:375-378)
- Platt, T. (1978) Regulation of gene expression in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. En: The operon, (Miller, J. y Reznikoff, W. editores) Cold Spring Harbor Lab., pp 263-302.
- Portmann, R. y Koller, T. (1976) The divalent cation method for protein-free spreading of nucleic acid molecules. En: Sixth European Congress Electron Microscopy, Vol. 2, Y. Ben Shaul, Ed. (Tal International Publishing Company, Jerusalem) pp. 546-548.
- Pribnow, D. (1975) Nucleotide sequence site at an early T7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 784-788.
- Rich y RajBhandary (1976) Transfer RNA: Molecular structure, sequence and properties *Ann. Rev. Biochem.* 45: 805-860.
- Reznikoff, W. y Abelson, J. (1978) The *lac* promoter. En: The operon. (Miller, J. y Reznikoff, W. editores) Cold Spring Harbor Lab., pp 221-243
- Rosenberg, M. y Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in promotion and termination of RNA polymerase transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319-353.
- Rossi, J., Soberon, X., Marumoto, Y., McMahon, J. y Ittakura, K. (1983) Biological expression of an *Escherichia coli* consensus sequence promoter and some mutant derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3203-3207.

- Rothstein, S. y Reznikoff, W. (1981) The functional differences in the inverted repeats of Tn5 are caused by a single base pair nonhomology. *Cell* 123: 191-199.
- Russell, D. y Bennet, G. (1981) Characterization of the β -lactamase promoter of pBR322. *Nucl. Acid. Res.* 9: 2517-2533.
- Staden, R. (1980) A computer program to search for tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 8: 817-825.
- Schaller, H., Gray, C. y Hermann, R. (1975) Nucleotide Sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 737-741.
- Scheilf, R. F. y Wensick, P. C. (1981) Practical methods in molecular biology. Spring-Verlag New York Heidelberg Berlin. pp 101.
- Schmitz, A. y Galas, D. (1979) The interaction of RNA polymerase and *Iac* repressor with the *Iac* control region. *Nucleic Acid. Res.* 6: 111-137.
- Schwartz, I., Klotsky, R-A., Elseviers, D., Gallagher, P.J. Krauskopf, M. Siddiqui, M.A., Wong, J.F.H. y Roe, B.A. (1983) Molecular cloning and sequencing of *pheU*, a gene for *Escherichia coli* tRNA^{PHE}. *Nucleic Acids Res.* 11: 4379-4389.
- Shine, J. y Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 71: 1342-1346.
- Siebenlist, U. (1979) RNA polymerase unwinds an 11-base pair segment of a phage T7 promoter. *Nature* 279: 651-652.

- Siebenlist, U., Simpson, R. B. & Gilbert, W. (1980). *E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell* 20: 269-281.
- Siebenlist, U. y Gilbert, W. (1980) Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and an early promoter of phage T7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 122-126.
- Sippel, A. y Hartmann, G. (1970) Rifampicine resistance of RNA polymerase in the binary complex with DNA. *Eur. J. Biochem.* 16: 152.
- Shorenstein, R.G. y Losick, R. (1973) Purification and properties of the sigma subunit of RNA polymerase from vegetative subtilis. *J. Biol. Chem.* 248: 6163-
- Sogo, J., Inciarte, M., Corral, J., Viñuela, E. y Salas, M. (1979) RNA polymerase binding sites and transcription map of the DNA of *Bacillus subtilis* phage 029. *J. Mol. Biol.* 127: 411-436.
- Spiegelman, G. y Whiteley, H. (1978) Bacteriophage SP82 induced modifications of *Bacillus subtilis* RNA polymerase result in the recognition of additional RNA synthesis initiation sites on phage DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 81: 1058-1065.
- Sprinzi, M., Gruter, F. & Gauss, D.H. (1978) Collection of published tRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 5: r15-r27.
- Steege, D.A. (1983). A nucleotide change in the anticodon of an *Escherichia coli* serine transfer RNA results in *supD*-amber suppression. *Nucleic Acids Res.* 11: 3823-3832.
- Stefano, J. y Gralla, D (1982) Spacer mutations in the *lac* p^o promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1069-1079.

- Stenesh, J., Roe, B. A. y Snyder, T. L. (1968) Studies of the deoxyribonucleic acid from mesophilic and thermophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 161: 442-454.
- Strauss, H., Boston, R., Record, T. y Burgess, R. (1981) Variables affecting the selectivity and efficiency of retention of DNA fragments by *E. coli* RNA polymerase in the nitrocellulose filter-binding assay. *Gene* 13: 75-87.
- Strniste, G. y Smith, D. (1974) Induction of stable linkage between the ribonucleic acid polymerase and $d(A-T)_n.d(A-T)_n$ by ultraviolet light. *Biochem.* 13: 485-493.
- Tamura, F., Nishimura, S. y Ohki, M. (1984). The *E. coli* *divE* mutation, which differentially inhibits synthesis of certain proteins, is in $tRNA^{SER}$. *EMBO J.* 3: 1103-1107.
- Tsuji, S., Takanami, M. y Imahori, K. (1980) A study of the interaction between promoter DNA and *T. thermophilus* DNA-dependent RNA polymerase. *J. Biochem.* 88: 715-724.
- Ulbrich, N., Kumagai, I. y Erdmann, V. A. (1984) The number of ribosomal RNA genes in *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Res.* 12: 2055-2060.
- Valenzuela, P. y Méndez, B. (1982) Techniques in Molecular Genetics. (Valenzuela y Méndez editores) pp 40-42.
- Vásquez, C. (1983) Estudios sobre plasmidios y sistemas de modificación-restricción de bacterias del género *Thermus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular. Universidad Católica de Chile.

- Vásquez, C., Venegas, A. y Vicuña, R. (1981) Characterization and cloning of a plasmid isolated from the extreme thermophile *Thermus flavus* AT-62. *Biochemistry International* 3: 291-299.
- Venegas, A., Martial, J. y Valenzuela, P. (1973) Active site-directed inhibition of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55:1053-1059.
- Venkstern, V. (1981) Processing of tRNA. *Mol. Biol. (URSS)* 15: 5-25.
- Vieira, . y Messing, . (1982) The pUC plasmids, an M 13mp7-derived system for insertion, mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- von Hippel, P., Bear, D., Morgan, W. y Mc Swiggen, A. (1984) Protein-nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 389-446.
- Walter, G., Zillig, W., Palm, P. y Fuchs, E. (1967) Initiation of DNA dependent RNA synthesis and the effect of heparin on RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* 3: 194-201.
- Watanabe, K., Shinna, M., Oshima, T. y Nishimura, S. (1976). Heat-induced stability of tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:1137-1144.
- Watanabe, K., Kuchino, Y., Yamaizumi, Z., Kato, M., Oshima, T. & Nishimura, S. (1979). Nucleotide sequence of formylmethionine tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.* 86:893-905.

- Watanabe, K., Oshima, T., Iijima, K., Yamaizumi, Z. & Nishimura, S. (1980). purification and thermal stability of several amino acid-specific tRNAs from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.* 87: 1-13.
- Watanabe, K., Oshima, T., Hansske, F. y Ohta, T. (1983) Separation and comparison of 2-thioribothymidine-containing transfer ribonucleic acid and the ribothymidine-containing counterpart from cells of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochemistry* 22: 98-102.
- Warner, C. y Schaller, H. (1977) RNA polymerase-promotor complex stability on supercoiled and relaxed DNA. *FEBS Letters* 74: 215-219.
- West, R. y Rodriguez, R. (1980) Construction and characterization of *E. coli* promoter-probe plasmid vectors. *Gene* 9: 175-193.
- Wong, S-L. y Doi, R. (1982) Peptide mapping of *Bacillus subtilis* RNA polymerase sigma factors and core-associated polypeptides. *J. Biol. Chem.* 257: 11932-11936.
- Woo, N.H., Roe, B.A. y Rich, A. (1980) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* initiator tRNA^{PHE}. *Nature* 286: 346-351.
- Woody, A-Y., Reisbig, R y Woody, R. (1981) Spectroscopic studies of congo red binding to RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 655: 82-88.

- Yamamoto, M. y Nomura, M. (1978) Cotranscription of genes for RNA polymerase subunits beta and beta' with genes for ribosomal proteins in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 75: 3891-3895.
- Yanofsky, C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature 289: 751-758.
- Yokoyama, S., Yamaizumi, Z. Nishimura, S. & Miyazawa, T. (1979). ¹H NMR studies on the conformational characteristics of 2-thiopyrimidine nucleotides found in transfer RNAs. Nucleic Acids Res. 6: 2611-2626.
- Yura, T. y Ishihama, A. (1979) Genetics of bacterial RNA polymerases. Ann. Rev. Genet. 13: 59-97.
- Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V., Palm, P., Heil, A. y Seifert (1971). On the role of different subunits of DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli* in the transcription process. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35: 47.
- Zubay, G. (1962) The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid. J. Mol. Biol. 4: 347-356.