

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



\* 5 3 0 9 5 3 9 6 9 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

***ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE TRÁNSCRITOS Y GENES  
ESPECÍFICOS DE ENQUISTAMIENTO EN *Colpoda inflata****

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta  
Dña. **Laura Benítez Rico**

Vº Bº del Director

La Doctoranda

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Carlos Gutiérrez'.

Fdo: Dr. Juan Carlos Gutiérrez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Laura Benítez Rico'.

Fdo. Laura Benítez Rico

MADRID, 1995

## AGRADECIMIENTOS

Desco agradecer al Dr. Juan Carlos Gutiérrez, director de esta Tesis Doctoral, no sólo la oportunidad de realizar este trabajo, sino su enorme esfuerzo y dedicación personal a lo largo de todos estos años. Sus valiosos consejos, su ayuda y las innumerables charlas que hemos mantenido, han supuesto un gran estímulo para mí que agradeceré siempre.

A la Dra. Ana Martín, ante todo, por sus consejos y orientaciones, y por su disponibilidad permanente. Y, cómo no, por su valiosísima ayuda en la elaboración del material fotográfico de esta Tesis.

A Jose Ramón quiero agradecerle tantos años de dedicación a esta Tesis. A él le debo incontables horas frente al ordenador para la elaboración de los esquemas y gráficos así como todo el arduo trabajo de escritura. Y especialmente deseo agradecerle su infinita comprensión y paciencia, especialmente en los momentos más duros y difíciles. Gracias.

A Gemma Palacios, excelente compañera de trabajo, y ante todo amiga, con quien he compartido tanto, por su ánimo incansable, y por los buenos momentos que me ha hecho pasar.

Al Dr. Eduardo Orías (Universidad de California, EEUU) por permitir llevar a cabo en su laboratorio los experimentos de sustracción y sugerir algunas de las ideas que se han llevado a cabo en esta Tesis.

A la Dra. Cristina Miceli (Universidad de Camerino, Italia) por la estancia tan inolvidable en su laboratorio, y por su colaboración en algunos aspectos de este trabajo. No quiero olvidar a todos los compañeros de ese departamento que me acogieron tan cálidamente, prestándome desinteresadamente su ayuda durante ese tiempo.

Al Director del Departamento de Microbiología-III, Dr. José Martínez Peinado, por la oportunidad brindada para llevar a cabo este trabajo. Así mismo quisiera recordar a los demás profesores y compañeros del departamento que han tenido siempre una palabra o un gesto de ánimo, en especial a Jose Manuel y a Paco, por estar siempre además dispuestos a echar una mano, y a Domingo por su optimismo, tan poco frecuente. Igualmente, debo agradecer la ayuda prestada por todos los becarios de colaboración que han pasado por el laboratorio 12.

A mis nuevos compañeros del Servicio de Parasitología del CNMVIS, por sus palabras de aliento, especialmente a la Dra. Teresa Gárate a quien quiero y debo agradecer su comprensión de la situación, a Esperanza Rodríguez por su carácter entusiasta y por su ayuda personal en esta última etapa, así como al Dr. Ricardo Molina, por estar siempre dispuesto a escuchar.

A mis padres nunca les agradeceré suficientemente el haberme sabido comprender en todo momento, y ofrecer su ayuda, sin ni siquiera pedirlo.

A todos mis familiares y amigos, que de una forma u otra se han interesado por esta Tesis, quiero expresarles mi gratitud.

A la Comunidad de Madrid, por la concesión de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador para la realización de esta Tesis, así como la concesión de una beca para realizar una estancia en la Universidad de Camerino (Italia).

Por último, es obligado referir que esta Tesis ha sido financiada por dos Proyectos de Investigación: PB87-0006 y PB90-0244.

*A José Ramón y a mis padres*

## ***ÍNDICE***

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. CONCEPTO DE CRIPTOBIOSIS</b> .....	2
<b>2. CARACTERÍSTICAS DEL ENQUISTAMIENTO Y QUISTES DE RESISTENCIA EN CILIADOS</b> .....	3
2.1. Inductores de enquistamiento .....	3
2.2. Estructura y composición de la pared quística .....	4
2.3. Características morfológico-fisiológicas del proceso de enquistamiento en ciliados ..	5
<b>3. BASES MOLECULARES DE LA CRIPTOBIOSIS EN MICROORGANISMOS EUCARIOTAS</b> .....	6
3.1. Acumulación de ARNm en quistes y esporas .....	6
3.1.1. Naturaleza de los ARNm .....	6
3.1.2. Longevidad de los ARNm .....	9
3.1.3. Mecanismos de regulación traduccional del ARNm almacenado .....	10
3.2. Metilación de ácidos nucleicos en la criptobiosis .....	11
3.3. Biosíntesis de macromoléculas durante el enquistamiento .....	12
3.3.1. Biosíntesis de ADN .....	12
3.3.2. Biosíntesis de ARN .....	12
3.3.3. Biosíntesis proteica .....	16
3.3.4. Cambios en proteínas nucleares y nucleolares .....	18
3.3.5. Actividades enzimáticas .....	18
3.4. Genes y regulación génica .....	20
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>1. MATERIAL VIVO Y VECTORES DE CLONACIÓN</b> .....	24
1.1. <i>Colpoda inflata</i> .....	24
1.2. Estirpes bacterianas .....	24
1.3. Vectores de clonación .....	24
<b>2. MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES UTILIZADOS</b> .....	25
2.1. Medio C0,25E1 .....	25
2.2. Medios de cultivo bacterianos .....	25
2.3. Tampones utilizados .....	25
<b>3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y MENSAJERO</b> .....	26
3.1. Aislamiento de ARN total .....	26
3.2. Aislamiento de la fracción poli(A) <sup>1</sup> .....	28
3.3. Medida de la concentración y pureza .....	29

<b>4. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO</b> .....	29
4.1. ADN complementario a poblaciones de ARN total y mensajero .....	29
4.2. ADN complementario a ARN aislado de geles de agarosa .....	31
<b>5. TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN SUSTRACTIVA</b> .....	31
5.1. Preparación de muestras .....	31
5.2. Fotobiotinilación de ADNc .....	31
5.3. Hibridación sustractiva .....	32
<b>6. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	32
6.1. Electroforesis de ARN .....	32
6.2. Electroforesis de ADN .....	32
<b>7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BANDAS AISLADAS DE     GELES DE AGAROSA</b> .....	33
7.1. Aislamiento de bandas de ARN .....	33
7.2. Aislamiento de bandas de ADN .....	33
<b>8. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS Y HALOS DE LISIS     A FILTROS DE NYLON</b> .....	33
8.1. Transferencia de ARN ( <i>Northern blot</i> ) .....	33
8.2. <i>Dot blot</i> de ARN .....	34
8.3. Transferencia de ADN ( <i>Southern blot</i> ) .....	34
8.4. <i>Dot blot</i> de ADN .....	34
8.5. Transferencia de halos de lisis .....	34
<b>9. MARCAJE DE SONDAS DE ADN</b> .....	34
9.1. Marcaje radiactivo .....	34
9.2. Marcaje no radiactivo .....	35
9.2.1. Marcaje no radiactivo por extensión de hexanucleótidos al azar .....	35
9.2.2. Marcaje por PCR .....	36
<b>10. MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN SOBRE FILTROS DE NYLON<sup>+</sup></b> .....	36
10.1. Hibridaciones empleando sondas de ADN radiactivas .....	36
10.2. Hibridaciones empleando sondas de ADN no radiactivas .....	36
<b>11. CLONACIÓN EN pUC18</b> .....	37
11.1. Tratamiento del ADNc amplificado .....	37
11.2. Unión al vector pUC18 .....	38
11.3. Preparación y transformación de células competentes .....	38
11.4. Selección de clones positivos .....	38
11.5. Aislamiento y digestión de ADN plasmídico .....	38
<b>12. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADNc EN <math>\lambda</math>gt10</b> .....	39
12.1. Preparación de ADNc para su clonación .....	39
12.2. Unión al vector desfosforilado .....	39

12.3. Titulación y determinación de la eficiencia de clonación . . . . .	40
12.4. Selección de recombinantes . . . . .	41
12.5. Amplificaciones de los clones seleccionados . . . . .	42
12.6. Aislamiento y digestión de ADN viral . . . . .	42
<b>13. MÉTODOS BASADOS EN PCR . . . . .</b>	<b>42</b>
13.1. Reacciones de amplificación . . . . .	42
13.2. Cebadores y programas utilizados . . . . .	44
13.3. Amplificaciones de poblaciones de ADNc . . . . .	44
13.4. Estudio de los polimorfismos de las poblaciones de ADNc (RAPcD) . . . . .	45
13.5. Amplificación de insertos clonados en pUC18 y en $\lambda$ gt10 . . . . .	45
13.6. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) . . . . .	46
13.7. Amplificación de un fragmento del ADN ribosómico 18S . . . . .	46
13.8. Marcaje no radiactivo por PCR . . . . .	46
13.9. Purificación de las muestras amplificadas por PCR . . . . .	46
13.10. Secuenciación y análisis de la secuencia obtenida . . . . .	47
 <b>RESULTADOS . . . . .</b>	 <b>48</b>
 <b>1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ARN TOTAL Y Poli(A)<sup>+</sup> DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE <i>Colpoda inflata</i> . . . . .</b>	 <b>49</b>
1.1. Aislamiento de la fracción ARN poli(A) <sup>+</sup> . . . . .	53
<b>2. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADNc PREQUÍSTICOS . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>3. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE SONDAS ESPECÍFICAS DE ENQUISTAMIENTO . . . . .</b>	<b>57</b>
3.1. Sondas procedentes de bandas de ARN aisladas a partir de geles de agarosa . . . . .	57
3.2. Experimentos de sustracción . . . . .	68
3.3. Polimorfismos de ADNc . . . . .	72
<b>4. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE ADNc PREQUÍSTICOS CON LA SONDA B4/Q . . . . .</b>	<b>78</b>
<b>5. CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE UN FRAGMENTO (B4/QA) DE LA SONDA B4/Q . . . . .</b>	<b>84</b>
 <b>DISCUSIÓN . . . . .</b>	 <b>92</b>
 <b>1. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	 <b>93</b>
<b>2. ANÁLISIS DE ARN TOTAL Y POLIADENILADO DURANTE EL ENQUISTAMIENTO . . . . .</b>	<b>95</b>

<b>3. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN LA BÚSQUEDA DE SONDAS</b>	
<b>ESPECÍFICAS DE ENQUISTAMIENTO EN <i>C. inflata</i></b> .....	98
3.1. Sondas derivadas de bandas de ARN .....	100
3.2. Experimentos de sustracción .....	101
3.3. Polimorfismos de poblaciones de ADNc .....	103
<b>4. ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE ADNc 18 HORAS</b> .....	108
<b>5. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO B4/QA</b> .....	111
<b>6. PERSPECTIVAS Y ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES</b> .....	115
 <i>CONCLUSIONES</i> .....	 117
 <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	 119

## ABREVIATURAS

- A: adenina
- $A_{260}$ : absorbancia a 260 nm
- aa: aminoácidos
- ADNc: ADN complementario
- AMD: actinomicina D
- AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
- AMV: virus de la mieloblastosis aviar
- ARNt: ARN transferente
- BSA: albúmina de suero bovino
- C: citosina
- D/KD: Dalton /Kilodalton
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNasa: desoxirribonucleasa
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilén-diamino-tetracético
- G: guanina
- HEPES: N-2-hidroxietyl piperazina N'-2-etanosulfonato
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
- MOPS: ácido N-morfolino-propanosulfónico
- oligo(dT): oligodesoxitimidilato
- pb/b: pares de bases/bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PEG: polietilenglicol
- PPD: 4-metoxi-4-(3-fosfofenil) espiro(1,2-dioxietano-3,2'-adamantano), sal disódica.
- RNasa: ribonucleasa
- SAM: S-adenosilmetionina
- SDS: dodecil sulfato sódico
- T: timina
- TAE: tris-acetato-EDTA
- TE: Tris-EDTA
- Tris: tris-hidroximetil-aminometano
- Tween: polioxietileno sorbitan monolaurato
- U: uracilo
- UDPG: uridina difosfoglucosa pirofosforilasa
- ufp: unidades formadoras de placas o halos de lisis
- X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido

**CÓDIGO AMINOACÍDICO UTILIZADO**

- A: Ala
- C: Cys
- D: Asp
- E: Glu
- F: Phe
- G: Gly
- H: His
- I: Ile
- K: Lys
- L: Leu
- M: Met
- N: Asn
- P: Pro
- Q: Gln
- R: Arg
- S: Ser
- T: Thr
- V: Val
- W: Trp
- Y: Tyr

## ***INTRODUCCIÓN***

---

## **1. CONCEPTO DE CRIPTOBIOSIS**

El término criptobiosis fue introducido por KEILIN (1959) para designar aquellos estados en los que los sistemas vivos no muestran signos externos de vida activa, y su actividad metabólica resulta difícilmente medible.

Por lo tanto, el concepto de criptobiosis implicaría la ausencia de signos vitales visibles (reproducción, alimentación, etc.) y la falta de un metabolismo mensurable (transcripciones, traducciones, etc.), todo ello provocado por un proceso de diferenciación que conlleva drásticos cambios estructurales y fisiológicos, constituyendo una perfecta estrategia de supervivencia pasiva como respuesta a la presencia de condiciones desfavorables que impiden continuar en el ciclo crecimiento-división. Así, una característica intrínseca al estado criptobiótico es su longevidad en condiciones desfavorables para la vida activa.

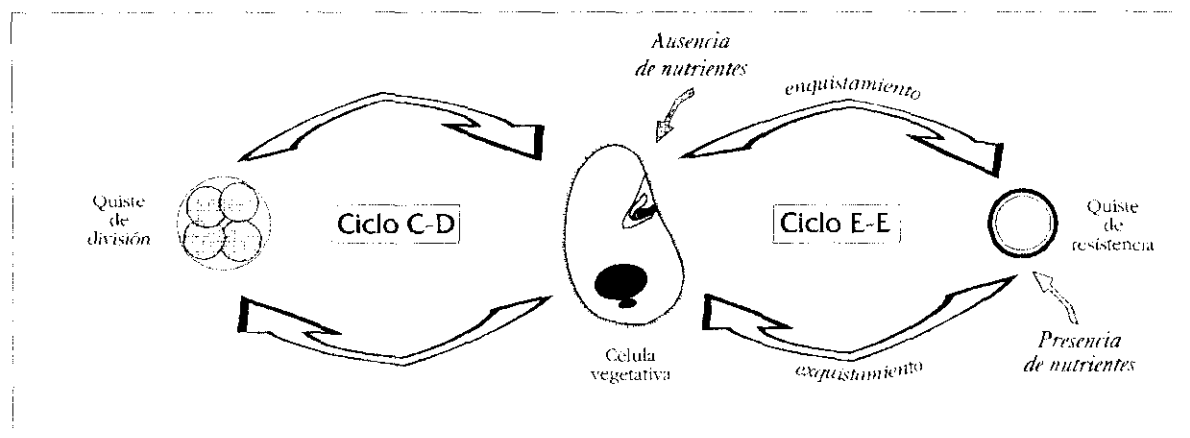
La existencia de formas criptobióticas en los ciclos de vida de diferentes organismos es un fenómeno ampliamente difundido, pudiéndose encontrar numerosos ejemplos tanto en microorganismos procariotas y eucariotas como en plantas y animales (HALVORSON, 1961). Podemos destacar como típicas formas criptobióticas en microorganismos: la espora bacteriana, los quistes de resistencia de numeros protozoos y las esporas de hongos. Todos estos procesos que implican la formación de estados de resistencia muestran numerosas analogías entre sí, a pesar de su distancia filogenética, por lo que proponemos el término criptobiosis como denominación generalizada para todos ellos.

Uno de los mejores ejemplos de criptobiosis microbiana nos la ofrece la esporulación bacteriana o proceso que conlleva a la formación de la espora, siendo ésta un perfecto estado criptobiótico procariota. Entre los microorganismos eucariotas, los quistes de resistencia de ciliados representan un buen ejemplo de estado criptobiótico ya que, una vez alcanzado dicho estado, la célula puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo.

En ciliados el proceso que conduce a la aparición de formas criptobióticas se denomina enquistamiento, mientras el proceso contrario o emergencia de la célula vegetativa a partir del quiste de resistencia se conoce como exquistamiento. Ambos procesos configuran el ciclo E-E (Enquistamiento-Exquistamiento), ciclo facultativo conectado al ciclo C-D (Crecimiento-División) del ciliado (Figura 1).

En el ciclo biológico de otros microorganismos eucariotas, como en el caso de hongos mucosos, podemos encontrar dos diferentes formas de resistencia, denominadas microquistes y esférulas o esporas. Los microquistes se originan a partir de los estados ameboides del hongo en un proceso denominado igualmente enquistamiento, mientras las esférulas o esporas se forman a partir del plasmodio, en un proceso particularmente conocido como esferulación.

Una característica adicional del estado criptobiótico es su posible función en la dispersión ecológica y posterior colonización de otros hábitats, ya que pueden ser fácilmente transportados por el viento o por animales (SCHLICHTING & SIDES, 1969).



**Figura 1:** Ciclo biológico de *Colpoda inflata*, conteniendo el ciclo C-D (Crecimiento-División), que implica la aparición de quistes de división, y el ciclo facultativo E-E (Enquistamiento-Exquistamiento) que se induce por falta de nutrientes en el medio, dando lugar al quiste de resistencia.

Una característica destacable de los quistes de resistencia de ciliados, al igual que otros sistemas criptobióticos, es, precisamente, su resistencia a condiciones extremas que son letales para los estados vegetativos de estos ciliados, pero no para sus formas criptobióticas, tales como temperaturas elevadas, condiciones de alto vacío, desecación o altas dosis de radiación visible y ultravioleta (BYCHENKOVA et al., 1969; GIESE, 1973; TAYLOR & STRICKLAND, 1936).

La longevidad quística es poco conocida, aunque existen datos de exquistamiento efectivo de muestras de quistes de hasta 49 años de antigüedad, como es el caso de quistes de *Colpoda cucullus* (GOODEY, 1913).

## **2. CARACTERÍSTICAS DEL ENQUISTAMIENTO Y QUISTES DE RESISTENCIA EN CILIADOS**

El proceso de enquistamiento conlleva el desarrollo de un complejo programa de diferenciación celular que es muy poco conocido. Las principales características del proceso de enquistamiento y de los quistes de resistencia en ciliados se describen a continuación.

### **2.1. Inductores de enquistamiento**

Aunque se han descrito numerosos factores que inducen enquistamiento en ciliados (cambios de temperatura, acumulación de sustancias de desecho, cambios osmóticos o de pH, desecación del medio, deficiencia de oxígeno o incremento de la densidad celular) (CORLISS & ESSER, 1974), la forma

más habitual y universal de inducción es la ausencia de nutrientes o hambre.

Muy poco se sabe a cerca del mecanismo transductor de la señal de inducción o de la posible existencia de receptores específicos que reconozcan posibles sustancias inductoras de enquistamiento. Hasta ahora sólo se conoce la existencia de un inductor específico de enquistamiento en *Euplotes encysticus* que se ha identificado como una proteína de bajo peso molecular (YONEZAWA & TAKASHASHI, 1989).

## 2.2. Estructura y composición de la pared quística

Una de las principales características de los estados criptobióticos es la presencia de una pared (parcialmente permeable) que rodea a la célula protegiéndola de las condiciones adversas. El estudio por microscopía electrónica de transmisión de los quistes en numerosos ciliados indica que el número de capas o envueltas de la pared quística varía entre un mínimo de una y un máximo de cuatro, denominadas, desde el exterior al interior del quiste: ectoquiste, mesoquiste, endoquiste y metaquiste (capa granulosa) (DELGADO et al., 1987; GUTIÉRREZ et al., 1983a; MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1994; MATSUSAKA, 1976; TIBBS, 1968; WALKER & HOFFMAN, 1985). La envuelta más externa (ectoquiste) puede presentar protuberancias o estructuras ornamentales, y en ocasiones poros u ostiolas (BUSSERS, 1976; GUTIÉRREZ et al., 1983a; RICCI et al., 1985).

Aún conocemos poco a cerca de la composición química de las paredes quísticas, debido a los problemas de solubilización que presentan las macromoléculas que las componen. Los principales componentes macromoleculares son proteínas, glucoproteínas y carbohidratos, localizados indistintamente en las diferentes capas quísticas (BENÍTEZ et al., 1991; BUSSERS & JENIAUX, 1974; CALVO et al., 1983; GUTIÉRREZ et al., 1984; MATSUSAKA & HONGO, 1984; RÍOS et al., 1989; TIBBS, 1966).

Estas capas quísticas, morfológica y bioquímicamente distintas, se forman a partir de diferentes precursores quísticos durante el enquistamiento. Se han identificado, microscópica y citoquímicamente, precursores para cada una de las capas (GRIMES, 1973; GUTIÉRREZ et al., 1983b; HOLT & CHAPMAN, 1971; MATSUSAKA, 1979; WALKER & MAUGEL, 1980). Dichos precursores pueden originarse tanto en el retículo endoplasmático rugoso como en el aparato de Golgi (CALVO et al., 1986).

Como se ha descrito en *Colpoda inflata* (BENÍTEZ et al., 1991; 1992), la glucosilación de proteínas desempeña una función importante en el desarrollo normal del proceso de enquistamiento. Muy probablemente, estas glucoproteínas están involucradas en la formación de la pared celular, puesto que inhibidores como la tunicamicina, a una concentración subinhibitoria del enquistamiento (10 µg/ml) ocasionan profundas alteraciones en la pared quística, dando origen a la aparición de quistes ovoides (BENÍTEZ et al., 1992).

Se han aislado anticuerpos contra componentes de paredes quísticas (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991b; RÍOS et al., 1992), que han resultado muy útiles para la localización de estas proteínas en las diferentes envueltas quísticas, así como para su identificación electroforética. Igualmente, se han empleado para una mejor identificación de las etapas prequísticas y un análisis más exacto de la cinética de enquistamiento (BENÍTEZ et al., 1994). Posiblemente, estos anticuerpos serán una

herramienta útil para la mejor identificación de precursores de pared quística y para el estudio de su formación y localización citoplasmática durante la formación de la pared.

### 2.3. Características morfológico-fisiológicas del proceso de enquistamiento en ciliados

Durante este proceso de diferenciación celular la célula experimenta una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que conducirán al estado diferenciado o quiste de resistencia.

Uno de los cambios más importantes y generalizados es una drástica disminución del volumen celular, con respecto a la célula vegetativa. En algunos ciliados esta pérdida de volumen puede representar hasta el 80% y es una consecuencia directa de la pérdida de agua intracelular a través de la vacuola contráctil (RICCI et al., 1985; TIBBS & MARSHALL, 1970; WALKER & MAUGEL, 1980; WALKER et al., 1980). Esta deshidratación citoplasmática desempeña un importante papel en la consecución del estado ametabólico característico de todo estado criptobiótico.

Durante las fases iniciales del proceso de diferenciación, el ciliado adquiere la forma esférica y se puede producir, o no, la reabsorción de parte o toda la infraciliación somática y oral (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1992; WALKER & MAUGEL, 1980).

Al mismo tiempo, la célula prequística experimenta importantes reorganizaciones en orgánulos intracelulares, probablemente como consecuencia de la pérdida de agua intracelular y el consiguiente incremento de la densidad celular. A continuación resumimos los cambios más llamativos y quizá mejor descritos:

- Es bastante frecuente un **empaquetamiento mitocondrial**, que implica el agrupamiento de numerosas mitocondrias en diferentes regiones del citoplasma quístico, sin que tenga lugar la fusión de membranas mitocondriales (GRIMES, 1973; MATSUSAKA, 1976; RIOS et al., 1985; TIBBS, 1968; VERNI et al., 1984; WALKER et al., 1980). En algunos casos, por el contrario, se ha descrito una degeneración de parte de la dotación mitocondrial sin que exista empaquetamiento, como ocurre en *Laurentiella acuminata* (GUTIÉRREZ & PÉREZ-SILVA, 1983) o en *Diophrys scutum* (WALKER & MAUGEL, 1980). Estos cambios mitocondriales podrían estar relacionados con la disminución, durante el enquistamiento, de la tasa respiratoria medida en algunos ciliados (GIESE, 1973; PIGON & EDSTROM, 1961).

- El **sistema nuclear** del ciliado (macronúcleo-micronúcleo) sufre importantes cambios a lo largo del enquistamiento, pudiendo afectar a cualquiera de los dos tipos de núcleos o bien a ambos. En ciliados que presentan, en estado vegetativo, varias masas macronucleares, éstas suelen fusionarse en una sola durante el enquistamiento (GRIMES, 1973; GUTIÉRREZ, 1985; GUTIÉRREZ & PÉREZ-SILVA, 1983; GUTIÉRREZ et al., 1981; MATSUSAKA & KIMURA, 1981; VERNI et al., 1984; WALKER et al., 1975; 1980), aunque existen algunos ciliados en los que no se ha observado este tipo de comportamiento (MATSUSAKA, 1976; WALKER & MAUGEL, 1980).

Una de las principales y más importantes consecuencias de esta fusión nuclear es la

condensación cromatínica (GUTIÉRREZ, 1985), que posiblemente contribuye a la inactivación del genoma macronuclear, característica propia del estado criptobiótico. Esta condensación cromatínica ha sido comprobada mediante estudios sobre cromatina macronuclear aislada en *Bursaria truncatella* (TIKHONENKO et al., 1984), y que ha mostrado la existencia de densos cuerpos cromatínicos en el macronúcleo quístico.

En otros ciliados, como *Colpoda inflata*, se ha descrito la formación durante el enquistamiento de cuerpos de extrusión a partir del macronúcleo (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991; MORAT et al., 1981). El significado de esta pérdida de ADN macronuclear es, probablemente, ajustar el volumen macronuclear al nuevo volumen del citoplasma quístico. Se desconoce el mecanismo de formación de los cuerpos de extrusión y la información que contienen.

Los nucleolos decrecen en tamaño y se hacen más esféricos durante el enquistamiento (GRIMES, 1973; MATSUSAKA & KIMURA, 1981; WALKER et al., 1980).

El micronúcleo o micronúcleos experimentan cambios menos drásticos que el macronúcleo. Es frecuente, en ciliados con varios micronúcleos, la degeneración de algunos de éstos durante el enquistamiento, aunque su dotación original suele restaurarse durante el exquistamiento por mitosis de los micronúcleos del quiste (GRIMES, 1973; GUTIÉRREZ et al., 1981; WALKER et al., 1980)

► Durante las primeras etapas del enquistamiento tiene lugar en la célula una elevada **actividad autofagosómica**, responsable de los procesos degradativos que ocurren en el citoplasma prequístico y que podría suponer un importante aporte energético endógeno para la célula en diferenciación y una fuente de precursores para las biosíntesis del enquistamiento (GRIMES, 1973; GUTIÉRREZ & PÉREZ-SILVA, 1983; HOLT & CHAPMAN, 1971; MATSUSAKA, 1976; WALKER et al., 1980).

### **3. BASES MOLECULARES DE LA CRIPTOBIOSIS EN MICROORGANISMOS EUCARIOTAS**

Como consecuencia del escaso conocimiento de índole molecular sobre el proceso de enquistamiento en ciliados, hemos creído que puede resultar de utilidad la exposición de los datos moleculares que actualmente se conocen en torno a procesos de criptobiosis en otros microorganismos eucariotas, con el fin de establecer posibles analogías con la criptobiosis en ciliados.

#### **3.1. Acumulación de ARNm en quistes y esporas**

##### **3.1.1. Naturaleza de los ARNm**

Las esporas de una gran variedad de hongos mucosos y levaduras, así como los quistes de algunas amebas y ciliados, contienen un *pool* de ARNm poliadenilado que es sintetizado durante el proceso de esporulación o enquistamiento (Tabla I)

**Tabla I:** Quistes o esporas de microorganismos que contienen un pool de ARNm poliadenilado

MICROORGANISMOS	REFERENCIA
<i>Allomyces arbuscula</i>	BURKE et al 1972
<i>Allomyces macrogynus</i>	SMITH & BURKE 1979
<i>Amebas</i> <sup>1</sup>	JEHAN & DUTTA, 1977
<i>Blastocladiella emersonii</i>	JOHNSON et al., 1977
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	KNIGHT & VAN ETTEN, 1976b
<i>Didymium nasutum</i>	BUTZEL & MAYER, 1976
<i>Dictyostelium discoideum</i>	CAMONIS et al., 1982
<i>Fuligo septica</i>	NELSON & ORLOWSKI, 1982
<i>Neurospora crassa</i>	MIRKES & MCCALLEY, 1976
<i>Mucor racemosus</i>	LINZ & ORLOWSKI, 1982
<i>Peronospora tabacina</i>	HOLLOMON, 1969
<i>Physarum polycephalum</i>	SAVARD et al., 1989
<i>Rhizopus stolonifer</i>	VAN ETTEN & FREER, 1978
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HARPER et al., 1980
<i>Uromyces phaseoli</i>	STAPLES et al., 1968

<sup>1</sup>*Schizopyrenus russelli*, *Hartmannella rhyodes*, *Acanthamoeba castellanii*, *Tetramitus rostratus* y *Didascalus thomtoni*

Algunas de estas especies de ARNm pueden ser activas mientras otras permanecen inactivas por mecanismos de procesamiento postranscripcional, hasta que se induce la germinación de las esporas (o exquistamiento), como se describirá más adelante.

La presencia de este ARNm o de polisomas ha sido demostrada directamente (hibridación con <sup>3</sup>H-poli U) o bien indirectamente con el empleo de inhibidores de síntesis de ARN como Actinomicina-D, Proflavina, 5-Fluorouracilo, Bromuro de Etidio, Fluoruro Sódico, Azida Sódica y Rifampicina durante las primeras etapas del proceso de germinación (BURKE et al., 1972; BUTZEL & MAYER, 1976; HOLLOMON, 1969; LINZ & ORLOWSKI, 1982; NELSON & ORLOWSKI, 1982). En varios géneros de amebas de vida libre (*Schizopyrenus russelli*, *Hartmannella rhyodes*, *Acanthamoeba castellanii*,

*Tetramitus rostratus* y *Didascalus thornstoni*) el exquistamiento no se ve afectado por AMD, lo que sugiere igualmente la posible presencia de ARNm preexistente en los quistes, involucrado probablemente, en la síntesis proteica *de novo* durante el exquistamiento (JEHAN & DUTTA, 1977; RUDICK, 1971).

La cantidad de ARNm poliadenilado acumulada en las diferentes clases de esporas de hongos es variable según los diferentes géneros, y representa una media del 1,8% al 5% del total de ARN contenido en dichas esporas. La mayor parte de este ARN (60-80%) se sitúa en una región perinuclear específica del estado diferenciado que rodea el núcleo (denominada *cap* nuclear), que es una zona rica en ARN, proteínas y ribosomas. El resto de ARNm se encuentra en fracciones extraperinucleares, en localizaciones aún no determinadas (JOHNSON et al., 1977; KNIGHT & VAN ETTEN, 1976a; LINZ & ORLOWSKI, 1982; ROHEIM et al., 1974; SMITH & BURKE, 1979).

Este ARNm acumulado en esporas suele ser muy heterogéneo en tamaño (10S a 23S), aunque las moléculas de pequeño tamaño son más abundantes (HARPER et al., 1980; ORLOWSKI, 1991). En general, la composición de bases es bastante similar a la encontrada en el estado vegetativo (CAMONIS et al., 1982; HARPER et al., 1980). Se ha descrito también que el ARN poli(A)<sup>-</sup> encontrado en algunas esporas (*Blastocladiella emersonii* y *Saccharomyces cerevisiae*) contiene estructuras resistentes a RNasas T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y A, y que además puede ser marcada con <sup>32</sup>P, lo que sugiere la presencia de una caperuza en el extremo 5' (JOHNSON et al., 1977; ORLOWSKI, 1991).

Muchos de los ribosomas contenidos en la región perinuclear de las esporas fúngicas están asociados a ARNm: 41% en *Blastocladiella emersonii* (JOHNSON et al., 1977) y 22-35% en *Mucor racemosus* (LINZ & ORLOWSKI, 1982). Se sabe, además, que en *Blastocladiella* existe una proporción relativamente alta de polisomas organizados en forma de complejos de iniciación 80S, algunos de los cuales se encuentran detenidos en fase de elongación (JAWORSKI & STUMHOFER, 1984), aunque según otros autores (JOHNSON et al., 1977) los ribosomas de la región perinuclear se encontrarían en forma de ribosomas 80S libres, y es 20 minutos después del comienzo de la germinación cuando el 50% de los ribosomas de las zoosporas se encuentran en forma de polirribosomas.

Aunque el total de ARN poliadenilado contenido en esporas maduras de *Dictyostelium discoideum* representa cerca de la décima parte del contenido total presente en células en crecimiento (aproximadamente 3.000 especies), la relación de secuencias poliadeniladas respecto del total de ARN permanece similar a la encontrada en varios estados de su ciclo de vida (CAMONIS et al., 1982).

Las especies de ARN detectadas en más de una copia por célula en las esporas de *Dictyostelium* pueden clasificarse en tres grupos según su abundancia: especies presentes en 1.000, 50 y 4 copias por célula. Una gran parte de este ARN es común al encontrado en otras etapas del ciclo celular de *Dictyostelium* (amebas y estados de agregación), aunque con diferente abundancia relativa. Según estos datos, sólo del 20% al 30% del total de ARN es específico del estado de espора (BLUMBERG & LODISH, 1980; CAMONIS et al., 1982). De hecho, entre los ARNm acumulados en la espора de *Dictyostelium* se han identificado también transcritos específicos de actina (MACLEOD et al., 1980).

Pero aún no se ha determinado si la información contenida en dichas moléculas corresponde a la información necesaria para el proceso de germinación o se mantiene también ARN específico de

esporulación, ya que han sido caracterizadas muy pocas moléculas. En *Blastocladiella emersonii* (JAWORSKI & THOMSON, 1980), el ARN poli(A)<sup>+</sup> presente en la espora ha sido sintetizado tanto durante la fase de crecimiento como durante las últimas etapas del proceso de esporulación, ya que el ARNm sintetizado en las primeras etapas de la esporulación es degradado.

El marcaje *in vivo* de proteínas (con <sup>35</sup>S-metionina) en presencia o ausencia de AMD en *B. emersonii* (SILVA et al., 1987) durante el proceso de germinación, muestra que la síntesis proteica durante los primeros 25 minutos se debe a la traducción de especies de ARNm ya existentes en la espora. Se han identificado en la germinación al menos seis polipéptidos codificados a partir de genes ya transcritos durante la formación de zoosporas, lo que evidencia la presencia de transcritos conteniendo al menos parte de la información necesaria para el desarrollo de la germinación. DOWDS & LOOMIS (1984) han identificado una de estas especies acumuladas en la espora como ARNm de la proteína SP96, uno de los principales componentes proteicos de la pared de las esporas de *Dictyostelium discoideum*, por lo que es posible también la acumulación en la espora de ARNm ya traducido durante la esporulación.

En *Mucor racemosus* el análisis por electroforesis bidimensional de los productos proteicos obtenidos de la traducción *in vitro* de los ARNm acumulados en las esporas, da origen a un conjunto de proteínas idénticas a las sintetizadas *in vivo* durante los primeros 30 minutos de germinación (LINZ & ORLOWSKI, 1987), lo que implica mecanismos de regulación postranscripcional que dirigen selectivamente la traducción de moléculas de ARNm tanto durante la esporulación como durante la germinación del hongo (ORLOWSKI, 1991).

JULIEN et al. (1984) han estudiado también la expresión de un gen específico del estado de espora de *D. discoideum* mostrando que su correspondiente ARNm está presente en estados vegetativos y también durante el proceso de diferenciación, aunque su cantidad se incrementa hasta 40 copias por célula en las esporas. Este ARNm codifica para un polipéptido de 55 KD, de función hasta ahora desconocida.

También la germinación de esporas bacterianas es insensible a inhibidores de ARN (y también a inhibidores de proteínas), lo que implica la existencia de ARN y proteínas en la espora madura (MOIR et al., 1994)

### 3.1.2. Longevidad de los ARNm

La acumulación específica de ARNm en las células en diferenciación podría deberse, en algunos casos, a alteraciones en la tasa de degradación más que en la de síntesis (KILLICK & WRIGHT, 1974) por lo que quizá deban existir mecanismos de estabilización de dichas moléculas frente a los activos procesos de lisis que tienen lugar en las células diferenciándose.

Muchos de los resultados obtenidos hasta ahora indican que este proceso de estabilización de ARN es el principal mecanismo de control de la expresión génica durante procesos de diferenciación celular en microorganismos eucariotas (MANGIAROTTI et al., 1985).

Durante las fases iniciales del desarrollo de *Dictyostelium* los ARNm sintetizados *de novo* son bastante inestables, con una vida media de menos de 30 minutos. En estados avanzados de su

desarrollo, la vida media de estas mismas moléculas se incrementa hasta más de cuatro horas, un valor comparable al de los ARNm constitutivos (BLUMBERG & LODISH, 1980). A pesar de ello, no se ha determinado aún si estos cambios pueden representar un mecanismo de control primario *per se*, o si se trata de un efecto secundario del control traduccional, que podría liberar moléculas de ARNm de polirribosomas, acelerando así su degradación.

La protección de estas moléculas de ARNm contra la acción de nucleasas podría deberse a su acoplamiento con proteínas (HOLLOMON, 1973), aunque otros autores sugieren que son los ribosomas asociados al ARNm los que protegerían a dicha molécula de la degradación por RNasas (LINZ & ORLOWSKI, 1982).

### 3.1.3. Mecanismos de regulación traduccional del ARNm almacenado

A pesar de que en la espora o quiste existan la mayoría (si no todos) los elementos necesarios para llevar a cabo la síntesis proteica: ARNm, aminoacil-ARNt y sintetetasas, factores de elongación y ribosomas (GONG & LOVETT, 1977; JAWORSKI & STUMHOFER, 1983; ROHEIM et al., 1974; YANIV & STAPLES, 1971), sin embargo, algunos de estos ARNm acumulados en la espora no son traducidos hasta la germinación.

Por lo tanto, las esporas o quistes son potencialmente capaces de biosintetizar proteínas a partir de los transcritos que acumulan. Pero, probablemente, estos ARNm son sintetizados durante la criptobiosis (esporulación/enquistamiento) para ser leídos durante la germinación o exquistamiento, lo que ahorra transcripciones a la célula que emerge del estado criptobiótico.

La presencia de este ARNm en las esporas de numerosos hongos sugiere la hipótesis de que el inicio de la germinación incluye mecanismos reguladores que afectan a la biosíntesis proteica. Para HOLLOMON (1973), durante las primeras etapas de la germinación de *Peronospora tabacina* se produciría la disociación de las subunidades ribosómicas permitiendo la unión del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y originando el complejo de iniciación. Dicho complejo reconocería entonces a la subunidad grande (unida a la membrana plasmática de la espora) comenzando el proceso de traducción. Para otros autores (LINZ & ORLOWSKI, 1982) los mecanismos de control parecen relacionarse con el nivel de fosforilación de la proteína S6 de la subunidad ribosómica 40S. Dicha proteína no se encuentra fosforilada en esporangiosporas de *Mucor racemosus*, pero se fosforila rápidamente durante el proceso de germinación (LARSEN & SYPHERD, 1980). El grado de fosforilación de dicha proteína se correlaciona tanto con altas tasas de síntesis proteicas como con elevados niveles intracelulares de ATP.

Otra de las hipótesis propuesta (JAWORSKI, 1976) es la posible existencia de cambios en la adenilación de los ARNm preexistentes, que podría constituir la base de una selección traduccional durante la germinación de *Blastocladiella*, ya que se ha detectado (en presencia de AMD) adenilación y desadenilación del ARNm acumulado en la espora, indicando así que ambos procesos no son dependientes de transcripción (SILVA et al., 1987).

La regulación de una traducción selectiva podría ejercerse también a nivel de la maquinaria traduccional, ya que existen evidencias de polisomas detenidos en fase de elongación en zoosporas de

*Blastocladiella* (JAWORSKI & STUMHOFER, 1984) donde aproximadamente el 41% de sus ribosomas están acomplejados con ARNm y menos del 10% de los ARNt unidos a ribosomas de la espora corresponden a metionil-ARNt, lo que indica que la mayoría de esos ribosomas no se han detenido en complejos de iniciación, sino que han experimentado algo de elongación. Se ha descrito también en este mismo hongo la presencia de un inhibidor de bajo peso molecular (probablemente un nucleótido) que bloquea la unión del aminoacil-ARNt a los ribosomas y que se localiza en el citoplasma de la espora, en la región extraperinuclear (ADELMAN & LOVETT, 1974). Según estos autores, el inhibidor podría modular la traducción proteica uniéndose a polisomas lo que evitaría la traducción de los ARNm almacenados en la espora. Igualmente, JAWORSKI & STUMHOFER (1983) proponen la existencia de "partículas inhibitoras" en esporas, que sedimentan como partículas subribosomales, que bloquean la aminoacilación del ARNt, pero no interfieren en etapas posteriores de la biosíntesis proteica. La misma interpretación se ha propuesto para la regulación del proceso de traducción de moléculas de ARN específicas durante la diferenciación de *Dictyostelium*, que podría explicarse en función de la disminución en la actividad de algún componente de la maquinaria de traducción, como por ejemplo algún factor de iniciación (ALTON & LODISH, 1977).

Contrariamente a lo expuesto hasta ahora, algunos autores sostienen que la expresión de un gen o genes durante un proceso de diferenciación no implica necesariamente la síntesis *de novo* de ARNm, ya que éste puede estar normalmente presente durante el crecimiento y puede ser traducido únicamente durante el proceso de diferenciación (KILLICK & WRIGHT, 1974). De hecho, RAMAGOPAL & ENNIS (1981) han encontrado, en amebas de *Dictyostelium*, ARNm de dos proteínas ribosomales presentes durante todo su ciclo de vida y, que sólo son traducidas durante el proceso de diferenciación.

### 3.2. Metilación de ácidos nucleicos en la criptobiosis

Existen evidencias de que durante los distintos procesos de diferenciación celular que conducen a la aparición de formas criptobióticas se producen cambios en los patrones de metilación del ARN o ADN.

El nivel de metilación de ARN se ha determinado únicamente en *Physarum flavicomum* (ASGARI & HENNEY, 1989). Se han comparado los niveles de metilación de ARN total en células enquistándose en condiciones normales con una población enquistándose en presencia de adenina. Existe una relación inversa entre la concentración de adenina exógena y la capacidad de las amebas de este género para formar microquistes. La inhibición del enquistamiento por adenina es consecuencia de la alteración de los niveles intracelulares de SAM (S-adenosilmetionina), como lo demuestra el hecho de que las células tratadas presentan concentraciones intracelulares de la enzima 3,5 veces superiores a la de células control (WHITE & HENNEY, 1985). El incremento en el nivel de SAM afecta a reacciones de transmetilación, aunque el mecanismo no se conoce con exactitud. En células tratadas con adenina se ha detectado un 11% de incremento en el nivel de ARN total, aunque con menor actividad específica debida a un menor nivel de metilación (ASGARI & HENNEY, 1989). Según estos autores, la disminución en los niveles de metilación de ARN podría reflejar la interrupción post-transcripcional ligada al proceso de formación del estado quiescente. En cualquier caso, la metilación

de ARN estaría involucrada en el proceso de diferenciación.

Conocemos algo más sobre los cambios en el patrón de metilación del ADN durante procesos de enquistamiento, tanto en *Physarum flavicomum* (ZHU & HENNEY, 1990) como en *Colpoda inflata* (PALACIOS et al., 1994). En ambos microorganismos eucariotas se ha detectado una desmetilación en residuos de citosina involucrada en el proceso de enquistamiento. Igualmente, en lo microquistes de *P. flavicomum* se ha encontrado metilación de adenina (6-metiladenina) no detectada en las formas vegetativas (ZHU & HENNEY, 1990), mientras que en *C. inflata* (PALACIOS et al., 1994) la 6-metiladenina no parece estar presente en el ADN macronuclear de este ciliado. Para ambos casos, se puede pensar que el proceso de desmetilación podría estar involucrado en la activación de genes de enquistamiento, idea que se ha corroborado en *C. inflata* empleando el potente agente desmetilante 5-azacitidina, que induce enquistamiento en medio de crecimiento. Probablemente, algunos promotores de genes involucrados en el enquistamiento se activen por desmetilación de citosinas, que en estado vegetativo se encontrarían metiladas, inactivando así la expresión del gen.

Así mismo, la metilación del ADN puede estar involucrada en la criptobiosis, bien silenciando genes o bien alterando la estructura del ADN en el estado diferenciado.

### **3.3. Biosíntesis de macromoléculas durante el enquistamiento**

#### **3.3.1. Biosíntesis de ADN**

En general, la biosíntesis de ADN no está involucrada en el enquistamiento de ciliados y amebas, ya que inhibidores de síntesis de ADN no bloquean el proceso de enquistamiento en ciliados (GUTIÉRREZ, et al., 1981; RUTHMANN & KUCK, 1985), como tampoco lo hacen en amebas (WEISMAN, 1976). Por el contrario, se produce una disminución del contenido total de ADN por célula durante el enquistamiento de *A. castellanii* que puede alcanzar hasta un 50% respecto a la cantidad de ADN en amebas creciendo exponencialmente (RUDICK, 1971).

En algunos ciliados también se ha descrito, durante el proceso criptobiótico, cierta pérdida de ADN como consecuencia de la formación de cuerpos de extrusión a partir del macronúcleo (MARTÍN-GONZÁLEZ, et al., 1991a; MORAT, et al., 1981). Esta pérdida de ADN macronuclear supone, posiblemente, una acomodación o ajuste del volumen macronuclear al nuevo volumen citoplasmático quístico. En cambio, durante el enquistamiento de *Polysphondylium pallidum* el contenido de ADN permanece constante (GITHENS & KARNOVSKY, 1973).

#### **3.3.2. Biosíntesis de ARN**

El enquistamiento en amebas, ciliados y hongos es un proceso dependiente de transcripción como lo demuestra el hecho de que inhibidores metabólicos de este proceso (Mitomicina C o Actinimicina D), bloquean este proceso de diferenciación en estos microorganismos eucariotas (ver Tabla II).

**Tabla II :** Inhibidores metabólicos de transcripción y traducción que bloquean procesos de enquistamiento en diferentes microorganismos eucariotas

MICROORGANISMOS	INHIBIDOR	REFERENCIA
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	AMD, CHX	POTTER & WEISMAN, 1972; RUDICK, 1971
<i>Achlya sp.</i>	AMD	LEJOHN, 1982
<i>Blepharisma</i>	CLF, PM	GIESE, 1973
<i>Colpoda inflata</i>	AMD, CHX	BENITEZ, 1990
<i>Colpoda steinii</i>	AMD, CHX	RUTHMANN & KUCK, 1985
<i>Dictyostelium discoideum</i>	AMD, CHX, DAU	KELICK & WRIGHT, 1974; LOOMIS, 1970
<i>Euplotes encysticus</i>	CHX, CLF	YONEZAWA, 1985b
<i>Hartmannella culbertsonii</i>	AMD, CHX, MITC	MURTI, 1971; RAIZADA & MURTI, 1971
<i>Hartmannella rhyodes</i>	CHX	BAND, 1963
<i>Histicoidus muscorum</i>	AMD, CHX	MATSUSAKA, 1979; MATSUSAKA & KIMURA, 1981
<i>Laurentiella acuminata</i>	AMD, CHX	GUTIÉRREZ et al., 1981
<i>Naegleria gruberi</i>	AMD, PM	CHIOVETTI & BOVLE, 1982
<i>Physarum polycephalum</i>	AMD, CHX, PM	HARA & OHTA, 1981; SAUER et al., 1969
<i>Polysphondylium pallidum</i>	CHX	O'DAY, 1973

AMD: Actinomicina-D; CHX: Cicloheximida; CLF: Cloranfenicol; DAU: Daunomicina; MITC: Mitomicina-C; PM: Puromicina

Los niveles celulares netos de ARN decrecen durante el proceso de enquistamiento, tanto en amebas (RAIZADA & MURTI, 1972; RUDICK & WEISMAN, 1973; STEVENS & PACHLER, 1973) como en ciliados (SENDO & MATSUSAKA, 1982; TIBBS & MARSHALL, 1970) y hongos mucosos (CAMONIS et al., 1982; GITHENS & KARNOVSKY, 1973), al tiempo que se produce la síntesis de ARNm específicos de dicho proceso. En *Dictyostelium* la composición de la población de ARNm durante el proceso de diferenciación y en las esporas ya maduras, muestra que cada estado se caracteriza por la presencia de distintas especies de ARNm (BLUMBERG & LODISH, 1980; CAMONIS et al., 1982; JACQUET et al., 1981).

La idea de un *turnover* de ARN durante procesos de diferenciación se ha sugerido tanto para el enquistamiento de *Acanthamoeba* (WEISMAN, 1976) como durante la esporulación de *Saccharomyces* (HOPPER, et al., 1974) y *Blastocladiella* (JAWORSKI & THOMSON, 1980). En este sentido es interesante hacer notar que, al igual que ocurre en otros procesos inducidos por hambre, la formación del quiste depende completamente de material endógeno, puesto que está ausente cualquier fuente de energía exógena (GUTIÉRREZ, et al., 1990).

La inhibición de la transcripción (mediante el empleo de AMD) durante el enquistamiento de *Histiculus muscorum* (MATSUSAKA & KIMURA, 1981) y *Acanthamoeba castellanii* (POTTER & WEISMAN, 1972) sólo se produce durante las etapas iniciales del proceso, sugiriendo que las células prequísticas son transcripcionalmente activas y esta actividad decrece en fases avanzadas del enquistamiento, hasta anularse completamente en el estado diferenciado. En amebas, la actividad específica de las ARN-polimerasas aisladas de células enquistándose se incrementa 1,5 a 2 veces durante las primeras horas de diferenciación y es reflejo del incremento en la actividad de la ARN polimerasa II (RUDICK & WEISMAN, 1973; WEISMAN, 1976), apoyando igualmente la hipótesis de una intensa actividad transcripcional temprana, que decrece gradualmente durante el enquistamiento y cesa en las últimas fases de éste. También, durante la diferenciación de *Dictyostelium*, la mayor parte de los genes se expresan en las primeras etapas del proceso, originando la aparición de un gran número de nuevas secuencias de ARN poliadenilado. Estos nuevos transcritos representan el 32% del total de ARN poliadenilado presente en la célula diferenciándose. El resto de ARN poli(A)<sup>+</sup> corresponde a especies de ARN presentes en la fase de crecimiento (BLUMBERG & LODISH, 1980).

En *A. castellanii* la síntesis de ARN específicos de enquistamiento se produce también en las fases iniciales del proceso, al tiempo que se pierden o degradan especies de ARN sintetizadas durante la fase estacionaria de crecimiento con un balance global de disminución neta del nivel de ARN total (STEVENS & PACHLER, 1973; WEISMAN, 1976). RUDICK (1971) señala, en cambio, que la síntesis de ARNr es necesaria para la diferenciación de *Acanthamoeba*, precisándose para la formación de ribosomas.

En *Aspergillus nidulans* (TIMBERLAKE, 1980) los experimentos de cinética de hibridación e hibridación diferencial sobre genotecas de ADNc, revelan cerca de 1.000 ARNm de secuencia única y algunos de abundancia moderada, específicos de esporulación (formación de conidiosporas), lo que representa aproximadamente el 20% del total de ARNm de las células en diferenciación.

En *Physarum polycephalum* el proceso de esferulación del microplasmidio lleva consigo importantes variaciones en la población de ARNm, y los principales cambios ocurren en las primeras 24 horas tras la inducción por hambre, que es cuando comienzan a acumularse numerosas proteínas específicas del proceso (BERNIER et al., 1986a). Después de 48 horas se detecta la síntesis de un grupo de proteínas tardías. Los autores clasifican los ARNm detectados durante el proceso en tres clases diferentes: (a) ARNm específicos de esporulación; (b) ARNm presentes siempre en un nivel constante y (c) ARNm cuyo nivel se reduce transitoriamente durante la formación de esférulas maduras (como los ARN que codifican para la actina o proteínas plasmodiales). Existe una cuarta clase de ARNm que se acumula en las fases finales de la esferulación y que da lugar a un pequeño grupo de proteínas tardías que aparecen después de 48 horas desde la inducción, una vez que se ha completado la

formación de las esférulas. Se piensa que dichas proteínas tardías podrían ser necesarias para la germinación de las esférulas, ya que el tiempo requerido para la germinación se acorta progresivamente para poblaciones que lleven 24, 36 ó 48 horas diferenciándose (BERNIER et al., 1986b).

En ciliados no existen, hasta ahora, datos moleculares que nos indiquen que los transcritos específicos de enquistamiento aparezcan preferentemente en las etapas iniciales del proceso. No obstante, se ha indicado esta posibilidad dentro de un modelo-hipótesis explicativo del proceso criptobiótico en ciliados (GUTIÉRREZ et al., 1990).

Existen algunos trabajos sobre clonación de ADNc originado a partir de ARNm aislados durante el proceso de esferulación en *Physarum* (BERNIER et al., 1986a) que aportan datos sobre estos ARNm. Los experimentos de hibridación diferencial con ARN poli(A)<sup>-</sup> sobre una genoteca de ADNc de esférulas de 24 horas, han detectado de 25 a 70 ARNm diferentes, moderadamente abundantes y específicos de estadio quístico o esférula. Se han encontrado también cuatro ARNm con alto número de copias y se supone que existen igualmente algunos ARNm de secuencia única difícilmente detectables con dicha técnica, con un rango de tamaños entre 4S y 16S. Las proteínas codificadas por estos ARNm son, en concordancia, proteínas de bajo peso molecular (14 KD a 35 KD). Estos ARNm son específicos de la esferulación y no se han detectado en ninguno de los demás procesos de diferenciación del ciclo biológico de *Physarum*, tales como la aparición de microquistes (enquistamiento de amebas) o de esporas (esporulación del plasmodio) (BERNIER et al., 1986b). Los mismos autores observan que diferentes inductores del proceso de esferulación (sales de hierro o hambre) conducen a la aparición de los mismos ARNm.

Se ha llevado a cabo el análisis de la secuencia de cuatro ADNc, procedentes de ARN poliadenilados tempranos de alto número de copias, que representan el 10% del total de ARNm presentes en esférulas de 24 horas. Dos de estos ADNc presentan un 81% de homología y son considerados, por tanto, miembros de la misma familia génica. Las proteínas codificadas por estos dos clones [denominadas esferulinas Ia (248 aa) y Ib (246 aa)] poseen una posible secuencia péptido señal y una secuencia de N-glucosilación, lo que les hace candidatas a ser glucoproteínas constituyentes de la pared de esférulas (compuesta de glucoproteínas y polisacáridos). Los otros dos clones codifican para las proteínas identificadas como esferulinas 2a y 3a (315 aa y 103 aa, respectivamente), se trata de proteínas no homólogas que carecen de péptido señal y se piensa podrían actuar como proteínas estructurales intracelulares en las esférulas (BERNIER et al., 1987).

Se ha secuenciado también un clon correspondiente a uno de los ARNm acumulados en los estadios avanzados de la esferulación (SAVARD et al., 1989). Este ARNm codifica para una proteína de 332 aa (denominada esferulina 4) que contiene también una secuencia péptido señal. Dicha proteína tiene muchas características comunes a proteínas de membrana plasmática. Se piensa que estas proteínas tardías de los quistes o esférulas no están involucradas, probablemente, en su formación y podrían, en cambio, estar relacionadas con su capacidad de germinación.

### 3.3.3. Biosíntesis proteica

El proceso de enquistamiento en amebas, ciliados y hongos, es también dependiente de traducción proteica ya que, igualmente, inhibidores de dicho proceso metabólico (Cicloheximida, Puromicina, Cloranfenicol o Daunomicina) impiden la formación del quiste de resistencia (Tabla II).

El contenido proteico global de las células enquistándose disminuye (a pesar de la existencia de biosíntesis de proteínas específicas en las diferentes etapas), probablemente como consecuencia del proceso degradativo que tiene lugar en el citoplasma de la célula prequística. En quistes maduros de *Histiculus muscorum* esta disminución puede llegar hasta el 60% del valor encontrado en células vegetativas (SENDO & MATSUSAKA, 1982), y en *Colpoda steinii* esta disminución se acerca al 30% (TIBBS & MARSHALL, 1970).

Además de la disminución generalizada del contenido proteico, el enquistamiento o la esporulación se caracteriza por la biosíntesis de proteínas específicas. Esta síntesis ocurre en ausencia de una fuente nutritiva exógena, por lo que se ha propuesto que debe existir un *turnover* proteico que provea a la célula de los aminoácidos necesarios para la síntesis de estas nuevas proteínas (GUTIÉRREZ & MARTÍN-GONZÁLEZ, 1990; KLAR & HALVORSON, 1975; WATTS, 1984).

En *Mucor racemosus* el análisis electroforético bidimensional de los productos proteicos sintetizados durante la formación de la espora, muestra que la población de estas proteínas acumuladas difiere significativamente de aquellas biosintetizadas durante la germinación (LINZ & ORLOWSKI, 1984). En este hongo, todas las traducciones ocurridas durante los primeros 30 minutos de la germinación emplean como ARNm el ya existente en la espora. Algunas de estas proteínas no se detectaron durante la esporulación, a pesar de la presencia de su mensajero específico. Además, cuando la germinación se lleva a cabo en aerobiosis (que conduce a la formación de hifas), la población de proteínas difiere considerablemente de las sintetizadas durante la germinación anaerobia (formación de levaduras), y ambos procesos se inician a partir de la traducción selectiva de ARNm acumulado en sus esporas (LINZ & ORLOWSKI, 1991). Estos resultados implican que debe existir, durante la germinación de este hongo, un mecanismo de regulación postranscripcional que dirija selectivamente la traducción.

En *Physarum flavicomum* (HENNEY, 1985) la síntesis proteica ocurre en los estadios iniciales del proceso de diferenciación que conduce a la formación de microquistes, coincidiendo con la iniciación de la formación de la pared quística.

En las etapas finales del proceso de desarrollo de *Dictyostelium discoideum* se han identificado, por técnicas de hibridación, entre 700 y 900 especies de ARNm localizadas en polisomas, que son específicas del estado de preculminación, estado previo a la diferenciación en cuerpo fructífero, que ocurre 18 horas después de la inducción por hambre (JACQUET et al., 1981). De hecho, la diferenciación celular en esporas y células del tallo comienza ya durante la fase de agregación (8 horas después de la inducción), acumulándose más tempranamente los ARNm específicos de células pre-tallo (RUTHERFORD et al., 1985).

Así, las proteínas más abundantes de la cubierta de la espora de *D. discoideum* (SP96, SP70 y SP60), caracterizadas por electroforesis bidimensional, aparecen a las 14-16 horas del desarrollo del hongo, en el estado de agregación aún no culminado, y están presentes únicamente en células pre-

espora así como en esporas y ausentes en las células del tallo (DEVINE et al., 1982). La proteína SP96 parece estar codificada por un único gen que produce un ARNm de 2,4 Kb. Se piensa que su expresión está controlada a nivel de acumulación del ARNm y no a nivel traduccional, ya que existe una buena correlación entre la cantidad de ARNm para SP96 y la cantidad de proteína sintetizada, medidas ambas por inmunoprecipitación con un antisuero policlonal específico contra SP96. Aunque dicho gen comienza a transcribirse en estados avanzados del desarrollo de *D. discoideum* (antes de la detección de la proteína SP96) su nivel de expresión se incrementa progresivamente hasta la fase de culminación a las 24 horas, que es cuando el producto proteico alcanza su máxima concentración. Entre esta fase y la formación de la espora, el nivel de ARNm SP96 disminuye aproximadamente 10 veces (DOWDS & LOOMIS, 1984).

Se han descrito también diferencias significativas (cuantitativas y cualitativas) en la composición de algunas proteínas ribosomales durante la diferenciación de *Dictyostelium* (RAMAGOPAL & ENNIS, 1981). Del total de proteínas, que constituyen los ribosomas, identificadas hasta ahora (12), dos fueron específicas de ribosomas de estados ameboides y tres de ellas específicas de ribosomas presentes en las esporas, siendo las otras comunes a ambos tipos celulares, aunque con ligeros cambios estequiométricos. Pero todos los ARNm funcionales estaban presentes en los dos estados diferenciados, por lo que deben estar implicados mecanismos de traducción que controlen la síntesis de varias de estas proteínas ribosomales durante la diferenciación de *Dictyostelium*.

En algunos ciliados se han podido identificar proteínas de pared quística, bien electroforéticamente a partir de paredes aisladas como en *Histiculus muscorum* (MATSUSAKA & HONGO, 1984), o bien utilizando anticuerpos específicos como en *Colpoda inflata* (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991b) y en *Paraurostyla* sp. (RÍOS et al., 1992). En *C. inflata* se identificaron tres polipéptidos de 61, 66 y 70 KD que reaccionaban con el antisuero policlonal contra paredes aisladas, que se localizaron, por inmunomarcaje al microscopio electrónico de transmisión y barrido, tanto en el ectoquiste como en el endoquiste (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991b).

En *Paraurostyla* sp. se han identificado al menos 15 polipéptidos de pared quística (RÍOS et al., 1989) y a partir de tres de ellos, de pesos moleculares 52, 66 y 110 KD, se obtuvieron anticuerpos que permitieron su localización en las diferentes capas quísticas mediante inmunocitoquímica al microscopio óptico. Los tres polipéptidos reaccionaron con el ectoquiste, pero sólo la banda de 110 KD reaccionó también con el endoquiste (RÍOS et al., 1992). No obstante, aún se desconoce qué tipo de transcritos codifican para estas proteínas y cuándo surgen durante el proceso de enquistamiento.

Por otra parte, estos anticuerpos contra elementos de pared quística han sido también muy útiles para el estudio de la cinética de enquistamiento y la identificación de etapas prequísticas en *Colpoda inflata* (BENÍTEZ et al., 1994).

En el hongo *Achlya* (LÉJOHN, 1983) se ha identificado también un grupo de polipéptidos de 40 KD que son específicos del proceso de diferenciación a esporas.

Por último, podríamos destacar que en el ciliado *Histiculus muscorum* se ha detectado la presencia de tubulina despolimerizada almacenada en el quiste de resistencia (NAKAMURA & MATSUSAKA, 1985). Este acúmulo de proteína podría ser utilizado por el ciliado en el exquistamiento, sin que se precise nueva biosíntesis de esta proteína (NAKAMURA & MATSUSAKA, 1992b). El

requerimiento de tubulina durante el exquistamiento es fundamental, ya que *H. muscorum*, al igual que otros ciliados hipotricos, pierde toda la ciliación e infraciliación durante el enquistamiento. Sin embargo, no existen actualmente evidencias experimentales que aporten algún dato sobre el empleo de la tubulina almacenada en el quiste. A pesar del conocimiento de que el exquistamiento es dependiente de síntesis de proteínas (ya que inhibidores de esta síntesis bloquean el exquistamiento), no se excluye la posible utilización de proteínas preexistentes en el quiste durante dicho proceso.

### 3.3.4. Cambios en proteínas nucleares y nucleolares

Se han observado cambios cuantitativos y cualitativos en los patrones electroforéticos de proteínas nucleolares solubles en fenol durante la fase exponencial de crecimiento y el comienzo del enquistamiento en *Acanthamoeba castellanii* (RUBIN et al., 1975) o en la esporulación de *Physarum polycephalum* (LESTOURGEON & RUSCH, 1973). Algunas de estas proteínas desaparecen completamente mientras otras incrementan o disminuyen su concentración considerablemente. Dichas proteínas podrían estar relacionadas con el control de la expresión génica nucleolar.

En el ciliado *Gaestostyla steinii* (GUTIÉRREZ, 1985) se ha observado que el macronúcleo quístico contiene 1,23 veces más histonas que el macronúcleo vegetativo y estas histonas quísticas son, aproximadamente, 1,59 veces más ricas en arginina que aquellas del macronúcleo vegetativo. Estos cambios en las proteínas nucleares nos confirman las drásticas modificaciones cromatínicas que se detectan durante la formación del estado criptobiótico y que podrían estar involucrados tanto en el silencio génico que acompaña a cualquier estado quiescente, como en la condensación cromatínica que se da igualmente en este proceso.

Con respecto a esta última característica, observaciones ultraestructurales en *Bursaria truncatella* (TIKHONENKO, et al., 1984) muestran que prácticamente toda la cromatina macronuclear quística se encuentra organizada en cuerpos densos de 100-300 nm. Estos cuerpos presentan una cromatina transcripcionalmente inactiva y parecen estar formados por subunidades que corresponden a nucleosomas. En *G. steinii* se ha calculado el grado de condensación cromatínica por el método del bandeo C, y posterior cuantificación espectrofotométrica. Los resultados indican que la condensación macronuclear quística es aproximadamente el doble de la existente en una masa macronuclear vegetativa (GUTIÉRREZ., 1985).

### 3.3.5. Actividades enzimáticas

Al igual que sucede con el contenido total de ARN y proteína por célula, durante el enquistamiento o la esporulación, suele producirse una disminución en la actividad de muchas enzimas, probablemente como consecuencia tanto de la actividad autofágica como de la disminución en el contenido de agua citoplasmática.

En *Acanthamoeba castellanii* decrecen los niveles celulares de glucógeno durante las primeras horas de enquistamiento hasta situarse en el 10-20% de los encontrados en fase vegetativa. Se incrementa, en cambio, la síntesis de celulosa, componente principal de la pared quística de amebas

(WEISMAN et al., 1970). Estos resultados indican que el glucógeno celular sirve como precursor de la celulosa de la pared quística. La degradación de glucógeno puede asociarse también a un incremento de dos o tres veces en el AMPc intracelular en poblaciones prequísticas, probablemente debido a un incremento en la conversión de ATP a AMPc por adenil ciclasas. Igualmente, RAZADA & MURTI (1971) han descrito que la capacidad de la ameba *Hartmanella culbertsonii* para consumir glucosa se incrementa cuatro veces en las primeras horas de enquistamiento. Al mismo tiempo, se detecta un incremento en las actividades específicas de celulosa sintetasa, hexosafosfato aminotransferasa y UDPG, y una disminución de la actividad enzimática de hidrogenasas, consecuencia probable de la falta de degradación de nutrientes.

En *Acanthamoeba*, SKRDLANT & WEISMAN (1976) encuentran que las actividades glucosil transferasas decaen durante el enquistamiento a la mitad o a la cuarta parte del valor medido presente en formas vegetativas, indicando una disminución en la síntesis de glucolípidos y, probablemente, glucoproteínas con respecto al ciclo crecimiento-división.

En varias especies de amebas (*A. castellanii*, *A. palestinensis* y *Naegleria gruberii*) se ha detectado actividad polifenol-oxidasa en células prequísticas (SYKES & BAND, 1985). Esta actividad enzimática se ha localizado en la pared quística, en el citoplasma y en el medio extracelular. Aunque no se conoce con exactitud la función de esta enzima, se piensa que podría tener relación con la resistencia del quiste frente a agentes químicos o físicos.

Algunas enzimas con probable localización lisosomal decrecen igualmente en su actividad durante el enquistamiento de ciliados y amebas. Estos datos enzimáticos podrían contradecir las numerosas observaciones sobre autofagosomas que surgen específicamente durante el enquistamiento (GRIMES, 1973; GUTIÉRREZ & PÉREZ-SILVA, 1983; MATSUSAKA, 1976; 1979; MCARDLE et al., 1980), lo cual implicaría un incremento de la actividad enzimática lisosomal. Sin embargo, la disminución de actividades enzimáticas como dipeptidásica y aminoácido-oxidasa en *Urostyla caudata* (PIGON, 1961) y fosfatasa y proteinasa ácidas en *Histiculus muscorum* (SENDO & MATSUSAKA, 1982), se basan en actividades totales que no reflejan con exactitud las actividades enzimáticas *in vivo*. Además, en *H. muscorum* (SENDO & MATSUSAKA, 1982), durante la fase de enquistamiento donde aparecen los autofagosomas (etapa I), la actividad de ambas hidrolasas ácidas no decrece. Todos estos datos sugieren que la actividad autofagosómica se concentra en las primeras fases del enquistamiento, inactivándose posteriormente la mayoría de las actividades enzimáticas lisosomales.

Igualmente durante el enquistamiento de *A. castellanii* la actividad de tres hidrolasas lisosomales (fosfatasa ácida, DNasa y RNasa) disminuye (MARTIN & BYERS, 1976), coincidiendo con los resultados de TIBBS y MARSHALL (1970), que han detectado una reducción en las actividades fosfatasa ácida y RNasa durante el enquistamiento de *Colpoda steinii*. Aunque el nivel de actividad total de fosfatasa ácida disminuye, MARTIN y BYERS (1976) han encontrado un incremento transitorio en la actividad específica de la enzima que contribuye a una degradación proteica más rápida durante las primeras horas de enquistamiento. De hecho, GRIFFITHS & BOWEN (1969) aunque no encontraron un incremento de los niveles de fosfatasa ácida en amebas enquistándose, detectaron un incremento significativo de la actividad de la enzima. Los autores concluyen que el proceso degradativo que tiene lugar durante el enquistamiento se debe a la activación de enzimas hidrolíticas encontradas en

compartimentos sedimentables, pero parece poco probable que sean consecuencia de la liberación al citoplasma de dichas enzimas.

LASMAN (1967) sugiere que el incremento en fosfatasa ácida durante la diferenciación de *Mayorella palestinensis* está asociado a un incremento en la actividad biosintética, necesaria para la formación de la pared quística y relacionada igualmente con la reabsorción de orgánulos o el almacenamiento de sustancias de reserva.

Como indican KILLICK y WRIGHT (1974) para la diferenciación de *Dictyostelium*, los cambios enzimáticos podrían estar provocados por mecanismos diferentes: cambios en los niveles de concentración enzimática, modificación de sus propiedades catalíticas o cambios en el nivel de actividad y fenómenos de descompartimentalización. Las únicas actividades enzimáticas susceptibles de sufrir cambios en el nivel de actividad en este eucariota (detectadas mediante técnicas inmunocitoquímicas) han sido: UDPG, glucógeno fosforilasa y N-acetilglucosaminidasa. Muchas otras enzimas muestran cambios en su concentración celular como resultado de procesos degradativos, o más raramente como respuesta a cambios en los niveles de síntesis (RUTHERFORD et al., 1985). Así por ejemplo, el empleo de inhibidores de traducción durante el enquistamiento de *H. muscorum* ha revelado que en este ciliado se produce síntesis *de novo* de proteinasa ácida (SENDO & MATSUSAKA, 1982).

Todos estos resultados que implican una disminución global en diferentes actividades enzimáticas son concordantes con la inactividad metabólica característica que se alcanza en el estado final diferenciado o quiste de resistencia.

### 3.4. Genes y regulación génica

Parece probable, como sugieren algunos autores, que los genes expresados diferencialmente durante cualquier programa de desarrollo o diferenciación celular se agrupen en tres categorías: genes que se activan durante la diferenciación, genes que se cierran o inactivan y genes que muestran actividad relativamente constante, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el proceso de diferenciación celular (GUTIÉRREZ et al., 1990; ROWEKAMP & FIRTEL, 1980).

No obstante, tanto en protozoos (amebas y ciliados) como en hongos se conoce muy poco acerca de los factores que intervienen en la apertura o cierre génico durante los procesos de diferenciación que conducen a la aparición de formas de resistencia.

Existen muy pocos datos sobre la localización y estructura de los genes específicos de enquistamiento, esferulación o esporulación en microorganismos eucariotas. Sólo hemos encontrado un trabajo en *Polysphondylium pallidum* (FRANCIS & RUPAR, 1983) sobre mutantes incapaces de diferenciarse a microquistes. Los cruces entre amebas mutantes apoyan la hipótesis de que el enquistamiento y la agregación/fructificación en hongos mucilaginosos están controlados por grupos diferentes de genes.

MEHDY et al. (1983) han estudiado algunos de los factores que activan o modulan la expresión génica durante la diferenciación celular del pseudoplasmodio de *Dictyostelium*. Existe una expresión diferencial de genes en células precursoras de esporas y tallo, inducidos por diferentes factores. En

células precursoras de esporas el AMPc se requiere para el mantenimiento de la expresión génica, y además estimula la expresión específica para este tipo celular en fases tempranas, por lo que se piensa que es uno de los factores necesarios para la inducción de dichos genes. Posteriormente, se han identificado otros genes (también específicos de pre-esporas) que no son inducibles por AMPc y cuyos productos de transcripción se inducen y acumulan en la célula por contacto celular en la fase de agregación (RUTHERFORD et al., 1985).

Es posible también, como sugieren ROWEKAMP & FIRTEL (1980) que la síntesis de una gran cantidad de proteínas específicas en un espacio muy corto de tiempo, requiera la transcripción simultánea de varios genes. Es importante igualmente destacar que, al menos en *Dictyostelium*, la mayoría de los genes regulados durante procesos de diferenciación son genes de copia única.

BLUMBERG & LODISH (1980) han detectado la expresión de un gran número de genes durante el desarrollo de *Dictyostelium*, la mayor parte de los cuales se expresan al comienzo del proceso. La expresión de 100 a 150 de estos genes es a nivel multicopia (80-100 copias por célula), mientras el resto (300 genes) expresan únicamente 5 copias por célula.

El estudio de mutantes deficientes en agregación durante la diferenciación de *Dictyostelium* ha permitido, tanto identificar algunos de los genes vegetativos que se desactivan al comienzo del programa de desarrollo, como establecer dos diferentes mecanismos posibles de control, uno dependiente y otro independiente de biosíntesis proteica (SINGLETON et al., 1988).

En todos los procesos de diferenciación que conlleva la formación de estados criptobióticos, tanto en microorganismos procariotas como eucariotas, se da una secuencia temporal de acontecimientos, lo cual ha servido para diferenciar etapas o fases del proceso. Muy probablemente esta secuencialidad implica una expresión génica igualmente secuencial, siendo cada etapa dependiente de los productos génicos de las anteriores.

Esta idea de secuencialidad ligada al proceso de diferenciación ha sido ampliamente utilizada a la hora de elaborar modelos que expliquen complejos procesos de diferenciación como la esporulación en *Bacillus subtilis* y el desarrollo de cuerpos fructíferos en mixobacterias o en *Dictyostelium*. En protozoos (tanto en amebas como en ciliados) esta potencial secuencialidad de la expresión génica es sólo evidente de una forma indirecta a partir de la aparición de los diferentes productos génicos o actividades enzimáticas que van surgiendo en las distintas fases. Este hecho se observa en ciliados hipotricos que presentan paredes quísticas complejas (hasta cuatro capas distintas) donde la aparición secuencial de los diferentes precursores de pared a lo largo del enquistamiento, nos indica indirectamente una posible expresión génica secuencial (GUTIÉRREZ et al., 1983b).

En cualquier caso, no conocemos aún absolutamente nada sobre la regulación génica (apertura y cierre de genes), la presencia de efectores internos que respondan a señales exógenas, o la potencial secuencialidad de la expresión de genes que se puedan presentar durante el enquistamiento de protozoos, y más concretamente de ciliados.

#### **4. OBJETIVOS**

Según acabamos de describir en esta introducción, existe poca información general en torno al enquistamiento en ciliados. Y esta escasa información es prácticamente inexistente a nivel molecular. No se ha identificado hasta ahora ningún gen relacionado con este proceso de diferenciación celular en ciliados, a diferencia de lo que ocurre, por ejemplo, en hongos, donde existen algunos genes caracterizados, incluso a nivel de su regulación, como ya hemos expuesto.

El objetivo principal, por tanto, era tratar de caracterizar los nuevos transcritos biosintetizados durante el enquistamiento de *C. inflata* que, probablemente, nos permitirían posteriormente caracterizar genes específicos o, al menos, involucrados en el proceso. De esta forma, aunque la etapa inicial consistía en el estudio del conjunto de moléculas de ARNm en etapas tempranas del proceso de diferenciación (fases prequísticas), el objetivo fundamental ha sido la búsqueda de alguna sonda derivada de algún gen, relacionado con el proceso de enquistamiento, con objeto de utilizarla para el cribado de genotecas de ADNc procedentes de transcritos presentes en el enquistamiento.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

## 1. MATERIAL VIVO Y VECTORES DE CLONACIÓN

### 1.1. *Colpoda inflata*

El ciliado *Colpoda inflata* (estirpe HSL-1; clon CI143), fue amablemente suministrado por la doctora E. Simon (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA). Se encuadra dentro del Filo *Ciliophora*, clase *Colpodea* (FOISSNER, 1993), del cual *Colpoda* representa el género tipo.

### 1.2. Estirpes bacterianas

- ▶ *Enterobacter aerogenes* (CECT 684) procede de la colección española de cultivos tipo (CECT). Se utilizó como componente del medio monoaxénico para el crecimiento de *Colpoda inflata*.
- ▶ *Escherichia coli*  $\alpha$ -DH5 (HANNAHAN, 1983): supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1. Estirpe bacteriana utilizada para el clonaje en pUC18.
- ▶ *Escherichia coli* JM101 (MESSING, 1979): supE44, thi-1(lac-proAB), F'[traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup> lacZAM15. Estirpe bacteriana utilizada para el clonaje en pUC18.
- ▶ *Escherichia coli* C600 (YOUNG & DAVIES, 1983): supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21. Estirpe empleada para la titulación y propagación del vector  $\lambda$ gt10. Esta estirpe permite diferenciar halos de lisis parentales (halos claros) de los halos recombinantes (halos turbios).
- ▶ *Escherichia coli* C600hfl (YOUNG & DAVIES, 1983): La mutación hfl150 (mutación de alta frecuencia de lisogenia) permite seleccionar únicamente fagos recombinantes de  $\lambda$ gt10 y se emplea, por tanto, para la amplificación de la librería de ADNc.

### 1.3. Vectores de clonación

- ▶ pUC18 (YANISCH-PERRON et al., 1985): Se ha utilizado un vector desfosforilado digerido con Sma I (concentración 50 ng/ml, Pharmacia). Dicho plásmido carece del gen *rop*, localizado junto al origen de replicación y que está relacionado con el control del número de copias. Como resultado de ello dichos plásmidos presentan un alto número de copias por células (500-700 copias). El tamaño del vector pUC18 es 2.686 pb.
- ▶  $\lambda$ gt10 (HUYNH et al., 1985): Se empleó un vector desfosforilado (imn<sup>434</sup> b527, Promega) digerido con EcoRI (concentración 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l). Es un vector utilizado para la construcción de librerías de ADNc y librerías genómicas. El ADN parental de  $\lambda$ gt10 es de aproximadamente

43 kb y presenta una capacidad de clonación de hasta 7,6 Kb.

## **2. MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES UTILIZADOS**

### **2.1. Medio C0,25E1**

Medio para el crecimiento de *Colpoda inflata*. El medio C0,25E1 se prepara con una solución acuosa al 0,25% (p/v) de Cerophyll (*Sigma*), sometiéndose a ebullición (5 minutos) y filtrado, tras lo cual se tampona a pH 7,9 con  $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ . Se esteriliza en autoclave (121 °C) durante 20 minutos.

Se adiciona una suspensión bacteriana de *Enterobacter aerogenes* al 1% (v/v) de un cultivo previamente crecido a 28 °C en Cerophyll y mantenido a 4 °C, constituyendo así un medio monoaxénico.

### **2.2. Medios de cultivo bacterianos**

Todos los medios descritos se han preparado según se indica en SAMBROOK et al. (1989).

#### ► Medio LB (Luria Bertani)

Medio para el crecimiento de las estirpes bacterianas *Escherichia coli* C600 y C600 Hfl. Justo antes de su utilización el medio se suplementa con maltosa al 0,2% y  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

Cuando se cultiva la cepa C600 Hfl se añade tetraciclina (*Boehringer*) a una concentración final de 15 µg/ml. Las placas así preparadas se almacenan en oscuridad a 4 °C.

#### ► Medio SOB

Medio utilizado para el crecimiento de la cepa bacteriana *E. coli* α-DH5. Tanto el medio líquido como el medio sólido se suplementan con  $\text{MgSO}_4$  20 mM y ampicilina (*Sigma*) a una concentración final de 50 µg/ml.

#### ► Medio TB (agar de cobertura)

Medio para el desarrollo de los halos de lisis del fago lambda, constituido por triptona (1%), NaCl (0,5%) y agar (0,8%). Se esteriliza en autoclave y se suplementa antes de su utilización con  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

### **2.3. Tampones utilizados**

#### ► Tampón de enquistamiento

El tampón utilizado para la inducción de enquistamiento de *Colpoda inflata* fue Tris/HCl 10 mM (pH 6,8).

► Tampones TM y SM

Ambos tampones se emplean para la resuspensión y almacenamiento del fago lambda y están descritos en SAMBROOK et al., 1989.

► Tampones de Proteinasa-K

Se han empleado dos tampones para Proteinasa-K (Boehringer, Promega), ambos con idénticos resultados:

- 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 20 mM EDTA
- 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; (pH 8,0)

► Tampones para otras enzimas

Todas las enzimas con las que se ha trabajado (incluyendo enzimas de restricción) han sido suministradas por varias casas comerciales (Amersham, Boehringer, Promega, Sigma), y los tampones para cada una de ellas fueron suministrados también por la misma casa o bien preparados de acuerdo a lo descrito en manuales generales (SAMBROOK et al., 1989).

### 3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y MENSAJERO

#### **3.1. Aislamiento de ARN total**

Para el aislamiento de ARN total de estados vegetativos, prequísticos y quistes de resistencia de *Colpoda inflata* se partió de cultivos crecidos en medio C0,24E1 a 28°C durante 24 horas. Los volúmenes de cultivo para cada una de las extracciones se muestran en la Tabla III.

**Tabla III.** Volúmenes de cultivo utilizados para las extracciones de ARN

AISLAMIENTO	VOLUMEN DE CULTIVO (ml)	NÚMERO DE CÉLULAS
Vegetativos	400	$1,2 \times 10^8$
Prequísticos	800	$2,4 \times 10^8$
Quistes de resistencia	800-1600	$2,4 - 4,8 \times 10^8$

► Para las extracciones de ARN totales de células en fase **vegetativa** los cultivos se centrifugaron a 500g (centrífuga Selecta, Centronic) durante tres minutos, lavándose varias veces en tampón de enquistamiento y las células fueron resuspendidas en un volumen adecuado de tampón de

ruptura de composición variable según el método utilizado (Tabla IV), manteniéndose durante una o dos horas en hielo y procediendo después con el protocolo de extracción.

► Para las extracciones de ARN total de células en fases **prequísticas** se procedió de igual manera, pero las células se resuspendieron en un total de 60 ml de tampón de enquistamiento y se distribuyeron en 12 tubos estériles, manteniéndose a 28°C durante el proceso de enquistamiento. A partir de esos tubos se obtuvieron muestras a diferentes tiempos desde 12 horas hasta un máximo de 72 horas.

Las suspensiones celulares obtenidas de estas muestras se centrifugaron de nuevo y el precipitado se resuspendió en el tampón de ruptura (Tabla IV). Para la lisis de las células prequísticas se utilizó un método de ruptura mecánico (homogenizador manual), en frío, y controlando siempre el grado de ruptura al microscopio óptico, alcanzándose máximos de aproximadamente un 60-70%.

**Tabla IV:** Métodos utilizados para el aislamiento de ARN total

MÉTODO	TAMPÓN DE RUPTURA	REFERENCIA
Tiocianato de guanidina Fenol/Cloroformo	Tiocianato de guanidina 4 M Citrato sódico 2.5 mM (pH 7,0) Sarcosil 0.5% 2-β-mercaptoetanol 0.1 M	CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987
LiCl	Tiocianato de guanidina 5 M EDTA 10 mM Sarcosil 1% Tris/HCl 50 mM (pH 7,5) 2-β-mercaptoetanol 8% (v/v)	CATHALA et al., 1983

En el caso de **quistes maduros** de *C. inflata* se combinó un tratamiento enzimático y otro mecánico, controlándose de igual manera el grado de ruptura. La suspensión quística (mantenida en tampón de enquistamiento a 28°C durante al menos un mes) se resuspendió en 2-3 volúmenes de una solución 10 mg/ml de Proteinasa-K y se mantuvo 24 horas a 50-60°C, tras lo cual se añadió un volumen igual de tampón de ruptura, homogeneizándose en frío.

Se han utilizado dos métodos de aislamiento de ARN total que se indican en la Tabla IV donde

se indica también la composición del tampón de ruptura celular para cada método. En ambos casos se emplea tiocianato de guanidina como agente desnaturante e inhibidor de RNasas (CHIRGWIN et al., 1979).

► Método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo

Se ha empleado el método de CHOMCZYNSKI y SACCHI (1987) con un *kit* de la casa comercial Clontech, adaptándolo a volúmenes máximos de 2 ml.

► Método del LiCl

Se ha seguido el método descrito por CATHALA et al. (1983), reduciendo los tiempos de precipitación en LiCl a un máximo de tres horas y adaptando el protocolo a tubos con un volumen máximo de 5 ml. Antes de la precipitación en etanol se añadió un paso de extracción con cloroformo, dos con fenol-cloroformo y un último paso, de nuevo, en cloroformo.

### 3.2. Aislamiento de la fracción poli(A)<sup>+</sup>

Para llevar a cabo el aislamiento y purificación de la fracción poli(A)<sup>+</sup> (ARNm) de estados prequísticos y quistes de resistencia de *Colpoda inflata* se partió de muestras de ARN total de cada una de las fases descritas, excepto en el caso de extracción de ARN poli(A)<sup>+</sup> de forma directa, en el que se utilizaron cultivos celulares preparados según se describe en el apartado 3.1. Los procedimientos empleados y las casas comerciales que suministraron los *kits* utilizados se describen en la Tabla V.

► Cromatografía en columnas de oligo(dT)-celulosa

Se han utilizado dos *kits* comerciales basados en este sistema. Las columnas oligo(dT) preempaquetadas suministradas por Clontech permiten la purificación de la fracción poly(A)<sup>+</sup> de ARN, utilizando como fuente ARN total aislado por cualquier otro procedimiento.

El *kit* comercial de Pharmacia está diseñado para la purificación directa de ARN poliadenilado obviando el paso intermedio de purificación de ARN total. Inicialmente, las muestras de células vegetativas, prequísticas o quistes de resistencia preparadas según se ha descrito (apdo. 3.1.), se homogeneizaron en solución tamponada con alta concentración de isotiocianato de guanidina. El extracto se diluyó tres veces para reducir la concentración de dicho compuesto de modo que permita una eficiente formación de puentes de hidrógeno entre las fracciones poli(A) de las moléculas de ARNm y las columnas oligo(dT) celulosa.

► Sistema biotina-estreptavidina

Este sistema emplea un cebador oligo(dT) biotinilado que hibrida con alta eficiencia, en solución, con la región poliadenilada de los nuevos transcritos biosintetizados. Dichos híbridos son capturados empleando partículas paramagnéticas acopladas a estreptavidina. El ARNm se eluye de la fase sólida por simple adición de agua libre de ribonucleasas.

**Tabla V:** Métodos utilizados para el aislamiento de ARN poli(A)<sup>+</sup>

MÉTODO	CASA COMERCIAL (kit)	REFERENCIA
Directo: Tiocianato de guanidina Fenol-Cloroformo Columnas Oligo-dT	PHARMACIA	AVIV & LEDER, 1972
Columnas Oligo-dT	CLONTECH	AVIV & LEDER, 1972
Biotina/estreptavidina	PROMEGA	—

### 3.3. Medida de la concentración y pureza

La concentración de ARN fue medida por absorbancia a 260 nm, empleando la fórmula:

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/ml}$$

$D = \text{factor de dilución}$

El grado de pureza se calcula según la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm y debe aproximarse a 1,8 ó 2,0. Valores inferiores a los señalados pueden indicar contaminación con proteínas.

Todas las muestras (ARN total y ARN poli(A)<sup>+</sup>) fueron almacenadas a -70°C en etanol absoluto con adicción de 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) o acetato potásico 2 M (pH 5). A esta temperatura las muestras son estables durante varios años.

## 4. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

### 4.1. ADN complementario a poblaciones de ARN total y mensajero

Para la síntesis de ADNc se ha utilizado ARN total y mensajero empleando un *kit* comercial de la casa *Promega*. Se ha seguido el método descrito por OKAYAMA y BERG (1982) y modificado posteriormente por GÜBLER y HOFFMAN (1983).

Los métodos de obtención y características de cada una de las muestras de ARN utilizadas para la síntesis de las poblaciones de ADNc se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI: Métodos de obtención de ADNc de diferentes poblaciones

MUESTRA CELULAR	MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ARN TOTAL	MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ARNm	CANTIDAD DE ARN UTILIZADO <sup>1</sup> (µg)	CANTIDAD DE ADN SINTETIZADO <sup>1</sup> (µg)
Vegetativos	Tiocianato de guanidina Fenol:Cloroformo	No aislado	10	5
Prequisticos 12 h	Tiocianato de guanidina Fenol:Cloroformo	Columnas oligo(dT)	10	4
Prequisticos 18 h	Tiocianato de guanidina Fenol:Cloroformo	Columnas oligo(dT)	3	7
Prequisticos 24 h	Tiocianato de guanidina Fenol:Cloroformo Columnas oligo(dT)		10	7
Quistes de resistencia	Tiocianato de guanidina Fenol:Cloroformo	Biotina:estreptavidina	3	4

<sup>1</sup> Medida espectrofotométrica

Para la síntesis de la primera cadena se ha utilizado un cebador oligo(dT) de 15 b que se une específicamente a la región poly(A) del extremo 3' de las moléculas de ARNm eucariotas. La proporción cebador/ARN se mantuvo en una relación constante para todas las poblaciones (0,5 µg/µg ARN). La síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa (AMV) (15 U/µg ARN) se realiza en presencia de pirofosfato sódico (4 mM) que reduce la formación de horquillas en el extremo 3' de la nueva cadena de ADN sintetizada (KIMMEL & BERGER, 1987). Se utiliza RNasina como inhibidor de ribonucleasas tipo A (1 U/µl). Este paso evita la digestión de la horquilla monocatenaria con nucleasa S1, necesario cuando se utiliza el protocolo tradicional de síntesis (*self-primed*). Esta digestión es difícil de controlar y puede causar una importante pérdida de información del extremo 5' del ARN mensajero.

La síntesis de la segunda cadena de ADN se lleva a cabo directamente sobre los productos de la primera reacción sin necesidad de extracción ni precipitación. Se utiliza RNasa H ( $8 \times 10^{-3}$  U/µl) para crear mellas en la cadena de ARN del híbrido formado, que proporciona cebadores ARN con extremos 3'OH para la síntesis de la segunda cadena con la ADN polimerasa I de *E. coli* (0,23 U/µl). Tras una breve incubación con la ADN polimerasa del fago T4 para eliminar cualquier extremo 3' protuberante, las muestras de las diferentes poblaciones fueron extraídas mediante fenol/cloroformo, precipitadas en etanol y resuspendidas en TE, manteniéndose sin alteración durante largos periodos a -20°C.

La concentración del ADNc obtenido fue medida por absorbancia a 260 nm (1 unidad de  $A_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$ ). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla VI.

No obstante, la utilización de este protocolo puede producir también la pérdida de algunos nucleótidos del extremo 5' del ARNm (SAMBROOK et al., 1989) durante la síntesis de la segunda cadena ya que, en ocasiones, algunas de las mellas creadas pueden estar muy próximas al extremo 5' de la cadena, generando un cebador de ARN demasiado pequeño para permanecer unido a la cadena de ADN formada.

#### **4.2. ADN complementario a ARN aislado de geles de agarosa**

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN aislado de geles de agarosa, las muestras de ARN extraídas de las bandas (apdo. 7.2) se secaron al vacío y se resuspendieron en un pequeño volumen de agua bidestilada estéril. El cebador utilizado fue también un cebador oligo(dT) de 12-18 b (Amersham).

Una vez producida la unión del cebador a la molécula de ARN (10 minutos a 65°C), se añadieron 20 U/ $\mu\text{l}$  de transcriptasa inversa (AMV) (GIBCO, Inc.), utilizando igualmente RNasina (2 U/ $\mu\text{l}$ ) como inhibidor de ribonucleasas. La reacción se incubó a 37°C durante una hora. No se llevó a cabo la síntesis de la segunda cadena de ADNc ni se hidrolizaron las moléculas de ARN. Las muestras, conteniendo los híbridos ADNc : ARN se secaron al vacío y se resuspendieron en TE para ser posteriormente amplificadas por PCR (apdo. 13.7).

### **5. TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN SUSTRATIVA**

#### **5.1. Preparación de muestras**

Las muestras de ADNc de poblaciones prequísticas de 12 y 18 horas unidas a adaptadores Eco RI, fueron amplificadas por PCR empleando los cebadores EO3 (Programa #04), y EO4/EO5 (9:1) (Programa #02) respectivamente, en las condiciones que se describen en el apartado 13.2. Las muestras amplificadas en ambos casos fueron purificadas y concentradas por extracciones fenol/cloroformo y precipitación en isopropanol (SAMBROOK et al., 1989). El ADNc fue resuspendido en TE y cuantificado espectrofotométricamente (concentraciones de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para 12 y 18 horas respectivamente, con un grado de pureza cercano a dos en ambos casos).

#### **5.2. Fotobiotinilación de ADNc**

El protocolo utilizado para la fotobiotinilación es una modificación del descrito por SIVE y JOHN (1986), 10  $\mu\text{g}$  de cada una de las poblaciones de ADNc se mezclaron con 60  $\mu\text{g}$  de acetato de fotobiotina (Invitrogen) y se irradiaron con una lámpara solar (275 W) durante 20 minutos en hielo. La fotobiotina que no se incorporó se eliminó por adición de Tris 0,1 M (pH 9) y extracciones sucesivas (4 veces) con una solución acuosa saturada de 2-butanol. El ADNc fotobiotinilizado (ADNc-

Fb) se precipitó en etanol y el precipitado (de color marrón) se resuspendió en 15 µl de agua estéril.

### 5.3. Hibridación sustractiva

Las mezclas de hibridación se prepararon en un volumen total de 40 µl en proporción 15:5 (ADNc-Fb : ADNc) que representa, aproximadamente, 10 µg de ADNc marcado frente a 500 ng de ADNc no marcado. De este modo se prepararon dos mezclas de reacción: 12<sup>B</sup> (ADNc-Fb 12 h : ADNc 18 h) y 18<sup>B</sup> (ADNc-Fb 18 h : ADNc 12 h). Ambas mezclas fueron coprecipitadas separadamente con etanol/acetato sódico y, posteriormente, resuspendidas en 4 µl de agua estéril más 4 µl de tampón de hibridación (NaCl 0,9 M; HEPES 25 mM (pH 7,5); EDTA 5 mM; SDS 0,1%). Se desnaturalizaron a 100°C (1 minuto) y la hibridación se realizó a 65°C (40 horas).

La unión de estreptavidina (10 µg, *Invitrogen*) se produjo en presencia de NaCl 0,38 M, HEPES/EDTA 5 mM (incubación 10 minutos a temperatura ambiente). Las extracciones con fenol/cloroformo (F/C) y HEPES/EDTA 10 mM; NaCl 0,5 mM (HENa) permitieron recoger la fase acuosa que contiene el ADNc no hibridado. La adición de estreptavidina y las extracciones F/C y HENa se repitieron una vez más. Finalmente el volumen total obtenido de las fases acuosas se precipitó en etanol/acetato sódico en presencia de 100 µg de ARNt. Las poblaciones de ADNc no hibridado se resuspendieron en 25 µl de TE y posteriormente fueron amplificadas por PCR y analizadas en geles de agarosa.

## 6. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 6.1. Electroforesis de ARN

Las electroforesis de ARN totales o mensajeros se realizaron en geles de agarosa (*BioRad*) y agarosa de bajo punto de fusión (*Pronadisa*) al 1-1,5% empleando formaldehído 0,66 M (*Merek*) como agente desnaturalizante (*SAMBROOK et al., 1989*). Se aplicaron voltajes de 5-10 V/cm durante 3-4 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (EtBr, 1 µg/ml).

Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron ARN ribosómico (16S y 26S de *Escherichia coli* (*Boehringer*) y marcadores de ARN (*Promega*) de rango 9,4 a 0,3 Kb.

Los geles fueron observados utilizando luz ultravioleta de 302 nm (transiluminador LKB 2011, *Pharmacia*) y se fotografiaron empleando un sistema Polaroid CU-5 (película Polaroid 667).

### 6.2. Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa (1 a 2%) en tampón TAE como se describe en *SAMBROOK et al. (1989)*. Los geles se corrieron a 4 V/cm durante aproximadamente tres horas. Los geles se tiñeron igualmente con EtBr (1 µg/ml).

Los marcadores de tamaño molecular empleados fueron: M-II y M-VI (*Boehringer*) con rangos de tamaño molecular de 23 - 0,125 Kb y 2,1 - 0,154 Kb respectivamente, también se utilizó otro

marcador con rango de 12 - 0,154 Kb (BRL, Inc.). Los geles se fotografiaron según se indica en el apartado anterior.

## **7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BANDAS AISLADAS DE GELES DE AGAROSA**

### **7.1. Aislamiento de bandas de ARN**

Las bandas con el ARN que nos interesaba recuperar fueron aisladas de geles de agarosa de bajo punto de fusión en condiciones desnaturalizantes, empleándose en este caso sólo la mitad de la concentración de formaldehído con respecto a las electroforesis de ARN que se han descrito (apdo. 6.1), ya que se ha encontrado que este agente desnaturalizante puede omitirse en esta clase de geles sin afectar a la separación electroforética de las moléculas de ARN (YIN-CHANG & YII-CHENG, 1990), manteniendo la cantidad indicada previamente para el tampón de corrido. El ARN de las bandas se recuperó usando el mismo protocolo que para la extracción de ADN (SAMBROOK et al. (1989).

### **7.2. Aislamiento de bandas de ADN**

Para la recuperación del ADN de bandas obtenidas de geles de agarosa de bajo punto de fusión se ha seguido el método descrito por SAMBROOK et al., (1989). En ocasiones se han empleado tubos Eppendorf comerciales conteniendo un gel separador de fases (*Phase Lock Gel Light, Prime, SB*), que optimiza la recuperación de ácidos nucleicos de la fase acuosa, ya que la fase orgánica y la interfase son atrapadas en dicho gel. En este caso se emplean dos pasos más con respecto al método estándar: extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y extracción cloroformo-isoamílico (24:1).

## **8. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS Y HALOS DE LISIS A FILTROS DE NYLON**

### **8.1. Transferencia de ARN (*Northern blot*)**

Las muestras de ARN total fraccionadas por electroforesis y teñidas con EtBr fueron transferidas por capilaridad a membranas de nylon no cargadas (Hybond-N, Amersham) y membranas de nylon<sup>+</sup> (Boehringer) (SAMBROOK et al., 1989). La transferencia en ambos casos se realizó durante un máximo de 24 horas y el ARN fue fijado al filtro mediante un doble sistema: secado del filtro a 80°C (hasta un máximo de dos horas) y exposición a luz ultravioleta (254 nm) durante 3 minutos (Spectrolinker XL-100; Spectronics Corporation). Los filtros fueron almacenados en sequedad a 4°C hasta su posterior utilización.

## 8.2. *Dot blot* de ARN

Todas las preparaciones de dot blot de ARN se han realizado sobre filtros de nylon<sup>+</sup> según el protocolo descrito por DYSON (1991) empleando ARN total (0,5 a 20 µg por muestra) en alícuotas de 2 µl depositadas de forma manual. Los filtros así preparados fueron secados al aire y fijados por irradiación con luz ultravioleta en las condiciones descritas (apdo. 8.1).

## 8.3. Transferencia de ADN (*Southern blot*)

Cada una de las poblaciones de ADNc unidas a adaptadores Eco RI fue amplificada empleando el cebador EO3 (apartado 13.3) y una alícuota de cada una de las muestras purificadas (27-35,5 µg) fue fraccionada por electroforesis en geles de agarosa (1,5%) en TAE. Los geles fueron visualizados por tinción con EtBr, fotografiados y posteriormente sometidos a desnaturalización y neutralización (SAMBROOK et al., 1989). La transferencia a filtros de nylon<sup>+</sup> se realizó por capilaridad según describen los mismos autores durante 18-20 horas. Los filtros fueron entonces secados a 60-80°C durante 15-20 minutos y el ADN se fijó por luz ultravioleta durante 3 minutos. Los filtros se guardaron en sequedad a 4°C.

## 8.4. *Dot blot* de ADN

Las muestras purificadas de ADN se colocaron sobre filtros de nylon<sup>+</sup> siguiendo el método descrito por DYSON (1991), aplicando manualmente desde 1,6 a 5 µg de ADN por muestra. Una vez depositadas las muestras, los filtros fueron directamente secados al aire y fijados por irradiación ultravioleta, sin pasos previos de desnaturalización. Se almacenaron a 4°C.

## 8.5. Transferencia de halos de lisis

Los fagos, aislados y mantenidos en SM/cloroformo a 4°C o en SM/DMSO a -20°C se aplicaron directamente sobre los filtros de nylon<sup>+</sup> (previamente bañados en agua bidestilada estéril) en alícuotas de 2 µl hasta un volumen máximo de 15 µl por muestra, que representa, como media, 4-5 x 10<sup>6</sup> ufp. Posteriormente, los filtros son desnaturalizados, secados y fijados según se describe en el apartado 8.3.

## 9. MARCAJE DE SONDAS DE ADN

### 9.1. Marcaje radiactivo

El marcaje radiactivo se ha llevado a cabo por extensión de cebadores (hexanucleótidos) al

azar, *random primed*, (FEINBERG & VOLGELSTEIN, 1984), empleando 2,8  $\mu\text{Ci}$  dATP  $\alpha^{32}\text{P}$  (800  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (Amersham) y 0,1 U/ $\mu\text{l}$  de ADN polimerasa I (fragmento Klenow) (Amersham), incubando durante 5 horas a temperatura ambiente. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados por cromatografía en columna Sephadex G50 (SAMBROOK et al., 1989).

## 9.2. Marcaje no radiactivo

Se ha utilizado un método de marcaje no radiactivo por incorporación de desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con un hapteno de origen vegetal denominado digoxigenina (DIG-11-dUTP). Tras el marcaje por digoxigenina las sondas son detectadas empleando anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. Para el proceso de revelado se empleó un método quimioluminiscente (Boehringer).

### 9.2.1. Marcaje no radiactivo por extensión de hexanucleótidos al azar

Para el marcaje no radiactivo de las sondas de ADN se ha seguido el protocolo descrito por FEINBERG y VOLGELSTEIN (1984), utilizando 0,5-3,5  $\mu\text{g}$  de ADN purificado. En la Tabla VII se describen los componentes de las mezclas de reacción adaptadas al empleo de DIG-11-dUTP.

Las reacciones se realizaron a 37°C durante 20 horas, empleando 0,1 U/ $\mu\text{l}$  de polimerasa Klenow. La cantidad de ADN marcado depende de la cantidad de ADN molde y de la duración del tiempo de incubación, ya que tiempos de incubación largos (hasta una máximo de 20 horas) incrementan la producción de ADN marcado. En la reacción estándar se incorpora una molécula de digoxigenina cada 20-25 nucleótidos. Posteriormente el ADN es precipitado en etanol, resuspendido en TE y almacenado a -20°C, temperatura a la que la sonda marcada con digoxigenina es estable, al menos, durante un año.

**Tabla VII:** Descripción de los componentes de las mezclas de reacción para el marcaje no radiactivo de sondas de ADN

<b>Mezcla de hexanucleótidos (10x)</b>	62,5 A <sub>260</sub> U/ml hexanucleótidos de secuencia al azar Tris/HCl 500 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 1 mM BSA 2mg/ml
<b>Mezcla de marcaje dNTP (10x)</b>	dATP, dCTP, dGTP 1mM dTTP 0.65 mM DIG-11-dUTP 0.35 mM

La eficiencia del marcaje se comprobó mediante detección directa, antes de llevar a cabo la hibridación. Así, 5 µl de cada una de las muestras marcadas se depositaron directamente sobre las membranas de nylon<sup>+</sup> y se procedió con el protocolo de detección descrito posteriormente (apdo. 10.2).

### 9.2.2. Marcaje por PCR

El marcaje no radiactivo de sondas por PCR se especifica en la sección Métodos basados en PCR (apdo. 13.8).

## 10. MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN SOBRE FILTROS DE NYLON<sup>+</sup>

### 10.1. Hibridaciones empleando sondas de ADN radiactivas

Las prehibridaciones e hibridaciones de los filtros de nylon de muestras de ARN total (Northern) se realizó según describe BERENT et al. (1985). Los filtros fueron prehibridados a 65°C (en ausencia de formamida) durante 3 horas y las hibridaciones se prolongaron durante 18-20 horas a la misma temperatura.

Las membranas fueron lavadas secuencialmente a 65°C con 2 x SSC (dos lavados de 15 minutos) y 0,1 x SSC (15 minutos).

Los filtros fueron autorradiografiados a -70°C empleando película *Agfa-Gevaert*, exponiéndose durante periodos variables hasta un máximo de 5 días.

### 10.2. Hibridaciones empleando sondas de ADN no radiactivas

Las prehibridaciones de los filtros de nylon<sup>+</sup> se realizaron a una temperatura de 42°C (*Southern dot blot* de ADN y halos de lisis) ó 50°C (*Northern y dot blot* de ARN) en tampón de hibridación (formamida desionizada 50% (*Clontech*), 5 x SSC, 0,02% SDS (p/v), N-laurilsarcosina 0,1% (p/v) y 2% (p/v) de agente bloqueante (*Boehringer*) en lugar de ADN de esperma de salmón.

Las hibridaciones se realizaron a las mismas temperaturas durante toda la noche empleando el tampón anteriormente descrito más 200 ng/ml de sonda marcada con digoxigenina. Las diluciones de la sonda marcada se hicieron en tampón TE con ADN de esperma de salmón (50 µg/ml, *Boehringer*).

En todos los casos los filtros se lavaron dos veces con 2 x SSC, 0,1%SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente y dos veces más (15 minutos cada una) en solución 0,1 x SSC, 0,1%SDS a 68°C.

Las soluciones de hibridación conteniendo las sondas fueron reutilizadas varias veces y almacenadas a -20°C. Para su reutilización dichas soluciones fueron desnaturalizadas por calor a 100°C durante 10 minutos y enfriadas rápidamente en hielo.

Una vez finalizados los lavados, se procedió a la detección siguiendo un proceso quimioluminiscente en tres pasos:

- ▶ Tratamiento de las membranas con agente bloqueante para evitar uniones no específicas de los anticuerpos a la membrana.
- ▶ Incubación de las membranas con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina.
- ▶ Reacción de las membranas con Lumigen PPD y mantenimiento a 37°C (aproximadamente 3 horas) para activar el intermediario inestable que se produce en la reacción.

Finalmente los filtros son expuestos a una película de rayos X (Kodak, X-Omat 100) entre 3 y 15 horas.

Una descripción más detallada del método se puede encontrar en el protocolo suministrado en el *kit* de la casa comercial *Boehringer* (BOEHRINGER-MANNHEIM, 1993).

## 11. CLONACIÓN EN pUC18

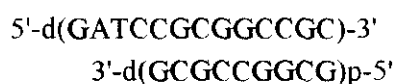
### 11.1. Tratamiento del ADNc amplificado

Para llevar a cabo la clonación de los productos amplificados por PCR (apdo. 13.4 y 13.6) se procedió de la siguiente forma:

La mitad de la muestra amplificada fue digerida con Proteinasa K (4 µg/µl) a 37°C durante 30 minutos (CROWE et al., 1991) y el ADN se extrajo con un paso de purificación fenol-cloroformo y un segundo paso en cloroformo, tras lo cual la muestra se precipitó en PEG 8.000 (20%) durante 15 minutos a 37°C. La adición de PEG induce a las moléculas de ADN a condensarse en agregados, lo que acelera la tasa de unión al vector de 1 a 3 órdenes de magnitud (SAMBROOK et al., 1989). El precipitado se lavó de nuevo en etanol y se trató con la enzima polinucleótido quinasa (0,3 U/µl) incubando la reacción a 37°C durante 30 minutos.

Para la reparación de los extremos romos de ADNc se empleó ADN polimerasa del fago T4 (0,1 a 0,2 U/µl) y una mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 2,5 mM cada uno, Pharmacia) en tampón universal de restricción 10x (Tris-acetato 33 mM, acetato potásico 66 mM, acetato magnésico 10 mM, DTT 0,5 mM). Se mantuvo 30 minutos a 37°C y la reacción se detuvo por calentamiento a 65°C durante 10 minutos.

Para la clonación de ADN de extremos protuberantes se le unieron adaptadores Bam HI/Not I (Pharmacia), constituido por dos oligonucleótidos complementarios (13 y 9 b) que se unen para producir un extremo protuberante Bam HI, permitiendo también un sitio interno de reconocimiento Not I, como se muestra a continuación:



La unión de adaptadores permite eliminar los pasos de metilación y digestión con la enzima de restricción correspondiente, necesarios cuando se utilizan *linkers* en lugar de adaptadores.

No obstante, las moléculas de ADNc que contienen adaptadores fosforilados pueden formar moléculas circulares covalentemente cerradas que no pueden ser clonadas o moléculas quiméricas no deseables durante la reacción de unión al vector desfosforilado. Para evitar este problema, se ha seguido el protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989), empleando adaptadores en los que sólo se encuentra fosforilado el extremo 5' más corto de la doble cadena que compone el adaptador.

Se emplearon 0,02 U/ $\mu$ g de ADN y 13 U de ligasa. A continuación se fosforilaron los extremos 5' de las nuevas moléculas con polinucleótido quinasa del fago T4 (0,16 U/ $\mu$ l). El exceso de adaptadores se elimina con una columna Sephacryl S-400 (Promega).

### 11.2. Unión al vector pUC18

Para el clonaje con ADN de extremos romos, la mitad del volumen anteriormente preparado se unió al vector pUC18 (digerido con Sma I y desfosforilado) (Amersham) y el ADN unido a adaptadores Bam HI/Not I se ligó al vector pUC18 (digerido con Bam HI y desfosforilado) (Pharmacia) utilizando una alta concentración de ligasa (0,06 U/ng de vector). Las reacciones se mantuvieron a 12-16°C durante toda la noche.

### 11.3. Preparación y transformación de células competentes

La preparación de células en estado competente (cepas  $\alpha$ -DH5 y JM101 de *E. coli*) se realizó siguiendo el procedimiento del CaCl<sub>2</sub> (SAMBROOK et al., 1989).

Una alícuota del vector ligado (aproximadamente 2-10  $\mu$ l) se empleó para transformar células competentes (volumen 100  $\mu$ l), manteniéndose 30 minutos en hielo y sometándose, a continuación, a un choque térmico (42°C) durante 90 segundos. Se añadió entonces medio SOB suplementado con glucosa 0,01 M y la mezcla se vertió en placas de medio SOB que contenían ampicilina (50  $\mu$ g/ml), IPTG (6  $\mu$ M) y X-Gal (0,012%) preparados previamente según se describe en SAMBROOK et al. (1989).

### 11.4. Selección de clones positivos

Se seleccionaron colonias blancas y colonias que presentaban débiles zonas azules centrales, que son típicamente recombinantes. También se eligieron algunas colonias completamente azules, ante la evidencia de que algunos recombinantes siguen produciendo  $\beta$ -galactosidasa activa y aparecen como colonias azules sobre X-Gal (BROWN, 1991).

Las colonias elegidas se crecieron en medio SOB líquido en presencia de ampicilina (50  $\mu$ g/ml) durante 12 horas a 37°C en agitación, procediendo después al aislamiento de ADN plasmídico para su análisis.

### 11.5. Aislamiento y digestión de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se obtuvo por el método de la hidrólisis alcalina descrito por SAMBROOK

et al. (1989). El ADN plasmídico para secuenciación automatizada fue extraído por el mismo protocolo utilizando un *kit* comercial (Quiagen). El ADN obtenido se resuspendió en un volumen de 20  $\mu$ l de agua estéril conteniendo RNasa (50  $\mu$ g/ml) y se mantuvo 10 minutos a 37°C. La concentración de ADN fue medida por absorbancia a 260 nm.

Posteriormente, la mitad del ADN obtenido fue digerido con Eco RI (0,25 U/ $\mu$ l) y Hínd III (0,3 U/ $\mu$ l) a 37°C durante 3-4 horas. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,7%.

## **12. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADNc EN $\lambda$ gt10**

### **12.1. Preparación de ADNc para su clonación**

Se procedió, en primer lugar, a la unión de adaptadores EcoRI (Promega) al ADNc de extremos romos, para clonar en el vector  $\lambda$ gt10 digerido con la misma enzima de restricción, como se muestra a continuación:



La unión de adaptadores y fosforilación de las nuevas moléculas se realizó según las condiciones descritas en el apartado 11.1. El ADN eluido se concentró por precipitación y se resuspendió en TE para su posterior clonación.

### **12.2. Unión al vector desfosforilado**

Para determinar las condiciones óptimas de unión entre el ADN inserto y el ADN del vector  $\lambda$ gt10 se procedió a ajustar la cantidad de ADN a clonar, manteniendo constante la concentración molar de ADN del fago. Paralelamente se preparó un tubo control adicional (tubo A) para comprobar los niveles de reasociación del vector. En las Tablas VIII y IX se muestran las relaciones molares empleadas para cada una de las dos genotecas preparadas (ADNc de 12 y 18 horas respectivamente).

El ADNc ligado al vector es empaquetado *in vitro* empleando extractos virales (Promega) conservados a -70°C. La reacción de empaquetamiento se llevó a cabo a 22°C durante aproximadamente 2 horas. Los fagos se pueden mantener empaquetados a 4°C hasta tres semanas [en presencia de cloroformo 20% (v/v)], aunque la titulación va disminuyendo progresivamente.

En nuestro caso, no obstante, los fagos empaquetados se mantuvieron viables en estas condiciones durante, al menos, un año.

**Tabla VIII:** Volúmenes y relaciones molares utilizadas para la construcción de la genoteca de ADNc-12 horas

	<b>TUBO A</b>	<b>TUBO B</b>	<b>TUBO C</b>	<b>TUBO D</b>
ADN vector (0,5 µg/µl) 1 µg = 0.035 pmoles	2 µl (1 µg)	2 µl (1 µg)	2 µl (1 µg)	2 µl (1 µg)
ADNc 12 h (0,24 µg/µl) 1 µg = 1.04 pmoles	—	3 µl (0.72 µg)	2 µl (0.48 µg)	1 µl (0.24 µg)

**Tabla IX:** Volúmenes y relaciones molares empleadas para la construcción de la genoteca de ADNc-18 horas

	<b>TUBO B</b>	<b>TUBO C</b>
ADN vector (0.5 µg/µl) 1 µg = 0.035 pmoles	2 µl (1 µg)	2 µl (1 µg)
ADNc 18 h (0.48 µg/µl) 1 µg = 1.04 pmoles	3 µl (1.44 µg)	2 µl (0.96 µg)

### 12.3. Titulación y determinación de la eficiencia de clonación

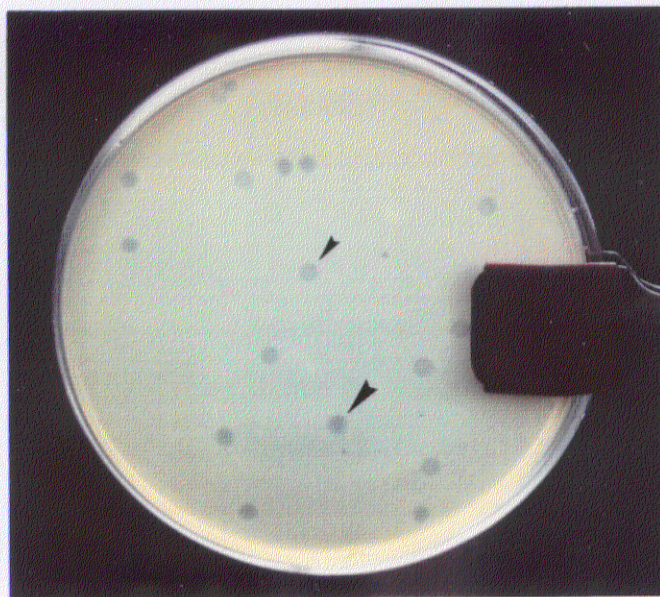
La titulación del bacteriófago lambda (SAMBROOK et al., 1989) se realizó en medio LB (en presencia o ausencia de tetraciclina, según se trate de la cepa C600 Hfl ó C600) empleando diluciones seriadas de los extractos de empaquetamiento en tampón de fagos TM (diluciones 1/500 a 1/5000 según el tiempo transcurrido desde el empaquetamiento). La eficiencia de clonación para cada una de las genotecas aparece en la Tabla X.

**Tabla X:** Eficiencia de clonación para las genotecas de ADNc-12h y ADNc-18h empleando diferentes relaciones molares

ADNc 12 h	TUBO A	TUBO B	TUBO C	TUBO D
PARENTALES	100%	50%	63,4%	29,5%
RECOMBINANTES	-	50%	36,6%	70,5%
ADNc 18 h	TUBO B	TUBO C		
PARENTALES	80%	88,5%		
RECOMBINANTES	20%	11,5%		

#### 12.4. Selección de recombinantes

Los halos de aspecto claro constituidos por fagos recombinantes (Figura 2) fueron separados del agar y aislados en tubos Eppendorf estériles en SM/cloroformo (1 : 0,25) y guardados a 4°C o bien conservados en pocillos de microplacas estériles en SM/DMSO (1 : 0,07) y mantenidos a -20°C.



**Figura 2:** En la fotografía se observan los halos de lisis claros (▶), constituidos por fagos recombinantes y los halos de lisis turbios (▶), no recombinantes, sobre un césped de *E. Coli* C 600.

La titulación media de halos claros mostraba un rango de  $5 \times 10^7$  -  $6 \times 10^{10}$  ufp/ml.

### 12.5. Amplificaciones de los clones seleccionados

Los clones elegidos tras la hibridación directa de los halos de lisis con la sonda específica, fueron amplificados por el método del lisado en placa (SAMBROOK et al., 1989) reduciendo al máximo el volumen de tampón SM que se añade a las placas y manteniendo éstas a 4°C durante 6 ó 7 horas. La titulación de los amplificados fue  $10^9$  -  $10^{10}$  ufp/ml.

### 12.6. Aislamiento y digestión de ADN viral

El método utilizado para la extracción de ADN de las partículas víricas se basa en el descrito por SAMBROOK et al. (1989), empleando un volumen aproximado de 1 ml de los clones amplificados y resuspendidos en SM.

En las digestiones iniciales con DNasa I y RNasa pancreática se incrementaron las concentraciones a 8 y 2 µg/ml respectivamente, prolongándose la digestión durante toda la noche a 37°C.

Una alícuota del ADN extraído se digirió con Eco RI (0,66 U/µl) en presencia de RNasa (20 µg/ml) y se mantuvo toda la noche a 37°C. Este procedimiento, descrito por los mismos autores, se emplea cuando el ADN del vector no puede ser digerido por enzimas de restricción. Tanto el ADN no digerido como los fragmentos de restricción se analizaron en geles de agarosa (1-1,5%).

Para la extracción de ADN de los clones de lambda también se han utilizado tubos Eppendorf conteniendo un gel separador de fases (*Phase Lock Gel*) que incrementa la recuperación de ácidos nucleicos (apdo. 7.2.). El método utilizado es básicamente igual al descrito, excepto que la lisis de las partículas víricas se produce en presencia de SDS (0,5%) y Proteinasa-K (100 µg/ml).

## 13. MÉTODOS BASADOS EN PCR

### 13.1. Reacciones de amplificación

Las reacciones de PCR se desarrollaron en tubos Eppendorf siliconizados de 0,5 ml con un volumen total de reacción de 50 µl conteniendo MgCl<sub>2</sub> (0,7 mM), desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0,2 mM cada uno, Perkin-Elmer Cetus), cebadores en concentración molar 10, 200 ó 400 pM, según el cebador utilizado (Tabla IX) y 1,25 unidades de Taq polimerasa (Amersham, BioProbe, Boehringer, Perkin-Elmer Cetus). El tampón estándar para las reacciones de PCR fue suministrado por cada una de las casas comerciales citadas. La evaporación en el interior de los tubos se redujo añadiendo 40 µl de aceite mineral estéril (Perkin-Elmer Cetus, Sigma). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *Precision Scientific GTC-2*.

Para todas las amplificaciones se utilizaron 5 µl de diferentes diluciones del ADN a amplificar en TE (diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), a excepción de las amplificaciones directas de halos de lisis de λgt10 (apdo. 13.5).

**Tabla XI:** Relación de cebadores y programas de PCR utilizados

CEBADOR	CASA COMERCIAL	TAMAÑO (b)	CONCENTRACIÓN MOLAR (pM)	SECUENCIA (5'-3')	PROGRAMA <sup>1</sup>
EO3	OPERON TECHNOLOGIES	12	400	CCGTTGCTGTGCG	#04
pUC/M13 <sub>forward</sub>	PROMEGA	17	10	CTTTCCAGTCACGAC	#01
pUC/M13 <sub>reverse</sub>		17		CAGGAAACAGCTATGAC	
SA1	Servicio de Síntesis de oligonucleótidos. Dpto. de Microbiología-II Fac. de Farmacia (UCM)	10	200	GTTTCCGCCC	#04
SA2		10		AACGCGCAAC	
EO4	OPERON TECHNOLOGIES	21	400	GCATGCGCGGCCGCGGAGG	#04
EO5 (EO4 + EO3)	OPERON TECHNOLOGIES	33	400	GCATGCGCGGCCGCGGAGGCCGTTGCTGTGCG	#02
λgt10 <sub>forward</sub>	PROMEGA	27	10	CTTTGAGCAAGTTCAGCCTGGTTAAG	#01
λgt10 <sub>reverse</sub>		31		GAGGTGGCTTATGAGTATTTCTCCAGGGTA	
NS1	GENOSYS BIOTECHNOLOGIES	19	200	GTAGTCATATGCTTGICTC	#01
NS2		21		GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	
OLIGO(dT) <sub>12-18</sub>	AMERSHAM	12-18	0,25	(D) <sub>12-18</sub>	#03

<sup>1</sup> Las características de cada programa se muestran en el apartado 13.2

### 13.2. Cebadores y programas utilizados

En la Tabla XI se muestra una relación de todos los cebadores y los programas utilizados en cada caso. Las condiciones de amplificación para cada programa se describen en la Tabla XII.

Las temperaturas óptimas de reasociación para cada tipo de cebador fueron deducidas a partir de la secuencia nucleotídica de cada uno de ellos, utilizando el programa de ordenador REANNEAL (cedido amablemente por su autor, Dr. E. Orias).

**Tabla XII:** Condiciones de amplificación de los programas utilizados

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	PROGRAMA #01		PROGRAMA #02		PROGRAMA #03		PROGRAMA #04	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<u>Primer ciclo</u>								
Desnaturalización	94	5	94	5	94	7	94	5
Reasociación	54	1	52	1	37	1	40	1
Polimerización	72	2	72	2	72	1	72	2
<u>Resto de ciclos</u>								
Desnaturalización	94	1	94	1	94	0,5	94	1
Reasociación	54	1	52	1	37	1	40	1
Polimerización	72	2	72	2	72	1	72	2
Extensión final	72	5	72	5	72	5	72	5
Nº TOTAL DE CICLOS	25		45		30		45	

### 13.3. Amplificaciones de poblaciones de ADNc

Las poblaciones de ADNc obtenidas (fase vegetativa, fases prequísticas (12, 18 y 24 horas) y quistes de resistencia de *Colpoda inflata*), unidas a los adaptadores EcoRI fueron diluidas en TE [0,6-1,2 µg de ADNc (dilución 1:1) y 120-240 ng de ADNc (dilución 10<sup>-1</sup>)]. Como cebador se utilizó EO3 (secuencia complementaria al adaptador EcoRI) a una concentración final 400 pM. Alícuotas de las muestras de reacción amplificadas se analizaron en electroforesis de agarosa (1,5%). Posteriormente las muestras fueron purificadas (apdo. 13.9) y cuantificadas espectrofotométricamente. Como media se obtuvieron, dependiendo de la población, de 4 a 11 µg de ADN por amplificación. Para siguientes amplificaciones se utilizaron diluciones de las poblaciones ya amplificadas y purificadas.

### 13.4. Estudio de los polimorfismos de las poblaciones de ADNc (RAPcD)

Para el estudio de los polimorfismos se emplearon cebadores de secuencia al azar (EO3, EO4, SA1, SA2 y el par SA1/SA2) con los programas indicados en el apartado 13.2., empleándose diluciones  $10^{-1}$  (120 a 240 ng) de poblaciones nativas de ADNc, sin adaptadores Eco RI, de estados vegetativos, prequísticos (12, 18 y 24 horas) y quistes de resistencia. Alicuotas de las muestras de reacción se analizaron en electroforesis de agarosa estándar o agarosa de bajo punto de fusión (1,5%).

Algunas bandas fueron cortadas, aisladas y purificadas (apdo. 7.2.) y posteriormente fueron marcadas con digoxigenina por PCR (apdo. 13.8) utilizando el mismo o los mismos cebadores con las que fueron obtenidas.

### 13.5. Amplificación de insertos clonados en pUC18 y en $\lambda$ gt10

En ocasiones, el ADN plasmídico puede ser resistente a la digestión con enzimas de restricción a la hora de recuperar el inserto del vector plasmídico (SAMBROOK et al., 1989), por lo que los insertos de ADNc clonados en pUC18 se obtuvieron por PCR empleando para ello cebadores específicos del vector (pUC/M13 *forward* y *reverse*), situados 81 pb a la izquierda (*upstream*) y 10 pb hacia la derecha (*downstream*) del lugar de restricción Eco RI respectivamente (Tabla XI).

Para determinar el tamaño de los insertos, se amplificaron diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  de ADN plasmídico aislado y digerido con RNasa (apdo. 11.5), analizándose posteriormente en geles de agarosa (1,5 y 2%). Una segunda amplificación (utilizando una dilución  $10^{-1}$  del primer amplificado) permitió la obtención directa del inserto, incrementando notablemente la proporción del mismo. Dichos fragmentos amplificados fueron entonces purificados (apdo. 13.9), cuantificados espectrofotométricamente y, en su caso, marcados con digoxigenina por PCR empleando los cebadores específicos ya descritos. Igualmente, el vector  $\lambda$ gt10 puede presentar problemas de digestión con Eco RI para la liberación del inserto (GOUELI & AHMED, 1991), por lo que los insertos clonados en dicho vector fueron obtenidos por PCR a partir de dos fuentes distintas:

► Amplificación directa de clones recombinantes de  $\lambda$ gt10

Los halos de lisis conteniendo fagos recombinantes mantenidos en SM en presencia de cloroformo o DMSO (apdo. 12.4) fueron amplificados por PCR utilizando cebadores específicos del vector ( $\lambda$ gt10 *forward* y *reverse*), que son complementarios a regiones situadas 35 pb a la izquierda y 41 pb a la derecha del sitio de restricción Eco RI, respectivamente (Tabla XI).

Para la amplificación se utilizaron 5  $\mu$ l de la suspensión de fagos en SM o diluciones en TE, amplificándose directamente o bien en presencia de detergentes como Nonidet P40 al 0,3% (v/v) (HENKEL et al., 1993) o DMSO al 6% (v/v).

► Amplificación de ADN aislado de clones recombinantes de  $\lambda$ gt10

El ADN aislado de los clones de  $\lambda$ gt10 (apartado 11.5) se diluyó en TE (diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) y se amplificó empleando los cebadores específicos descritos (Tabla XI).

### 13.6. Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)

Para la amplificación de ADNc de los híbridos ADNc:ARN, obtenidos como se describe en el apartado 4.2, se añadió una cola de homopolímeros (residuos dA) en el extremo 3' de la cadena sintetizada de ADN, utilizando transferasa terminal (0,6 U/ $\mu$ l) y dATP (1 mM) en tampón 5x (cacodilato sódico 1 M; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; 2- $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM). La mezcla de reacción se incubó 15 minutos a 37°C. Aproximadamente 1/4 del volumen total (5  $\mu$ l) se utilizó para la amplificación por PCR, empleando oligo(dT) de 12 a 18 b como cebador (Tabla XI).

### 13.7. Amplificación de un fragmento del ADN ribosómico 18S

Se empleó ADN genómico de *C.inflata* (estado vegetativo) extraído por el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (SAMBROOK et al., 1989). Se amplificó por PCR un fragmento del gen ADN ribosómico 17S/18S utilizando cebadores universales (NS1/NS2, Tabla XI) que amplifican una región de 515 pb. Se obtuvo así un fragmento amplificado de 555 pb (región amplificada más cebadores) que se utilizó como sonda tras su marcaje por PCR con digoxigenina.

### 13.8. Marcaje no radiactivo por PCR

Para el marcaje no radiactivo (marcaje con digoxigenina) de fragmentos de ADN (procedentes de previas amplificaciones ya purificadas o directamente de bandas aisladas en geles de agarosa de bajo punto de fusión), las muestras fueron diluidas en TE (10<sup>-1</sup>) y amplificadas utilizando una mezcla de nucleótidos (dATP : dGTP : dCTP : dTTP : DIG-dUTP; 1 : 1 : 1 : 0,66 : 3,3) incrementando aproximadamente 10 veces la proporción de DIG-dUTP respecto a la mezcla empleada para el marcaje por extensión de hexanuclótidos al azar (apdo. 9.2.1). La molaridad final de los nucleótidos dATP, dGTP, dCTP se aproxima a la utilizada en las reacciones estándar de PCR (0,19 mM), pero se modifica la molaridad final de dTTP (0,13 mM) y la de dUTP-DIG (66  $\mu$ M) (LION & HAAS, 1990).

El resto de los componentes de la mezcla de reacción son iguales a los descritos en el apartado 13.1. En cada amplificación se realiza una segunda reacción de PCR (sin digoxigenina), que sirve de control del proceso de marcaje. La eficiencia del marcaje se determina por comparación de la movilidad del fragmento marcado con el control, en una electroforesis de agarosa, ya que la incorporación de digoxigenina en la molécula de ADN retarda su movilidad electroforética.

### 13.9. Purificación de las muestras amplificadas por PCR

Las muestras amplificadas (marcadas y no marcadas) han sido purificadas utilizando un kit comercial (Perkin-Elmer Cetus) que permite separar el ADN amplificado de todos los nucleótidos y cebadores no incorporados, pudiendo ser utilizado para un amplio rango de fragmentos de ADN (200 pb a 25 Kb).

La purificación de la muestra se lleva a cabo según el método de VOGELSTEIN y GILLESPIE (1979) empleando una matriz particulada que, en presencia de NaI, retiene el ADN mientras las proteínas

permanecen en solución. La elución de ADN se consigue con adición de agua destilada. Las muestras purificadas se cuantificaron espectrofotométricamente (en todos los casos se obtuvo una pureza inferior a 1,3), procediendo luego a preparar las diluciones adecuadas bien para el marcaje de dichos fragmentos o bien para su posterior utilización como sondas, en el caso de fragmentos de ADN ya marcados con digoxigenina.

### **13.10. Secuenciación y análisis de la secuencia obtenida**

La secuenciación del fragmento B4/QA se llevó a cabo por el método dideoxi y se realizó en el Servicio de Secuenciación Automatizada de ADN (Departamento de Microbiología-II, Facultad de Farmacia, UCM).

El análisis de la secuencia se realizó en el Servicio de Modelado de Proteínas perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). La base informática utilizada para el estudio de la secuencia fue el programa GCG.

## ***RESULTADOS***

---

## **1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ARN TOTAL Y Poli(A)<sup>+</sup> DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE *Colpoda inflata***

Como ya se ha indicado en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, para llevar a cabo los aislamientos de ARN total, o bien de las fracciones poli(A)<sup>+</sup> directamente, durante el proceso de enquistamiento de *Colpoda inflata*, se ha partido de volúmenes diferentes de cultivo. El volumen de cultivo de células en etapas prequísticas fue el doble del utilizado para los aislamientos de estados vegetativos, mientras que para los aislamientos de quistes maduros se empleó hasta 4 veces el volumen utilizado para extracciones de células de etapas vegetativas.

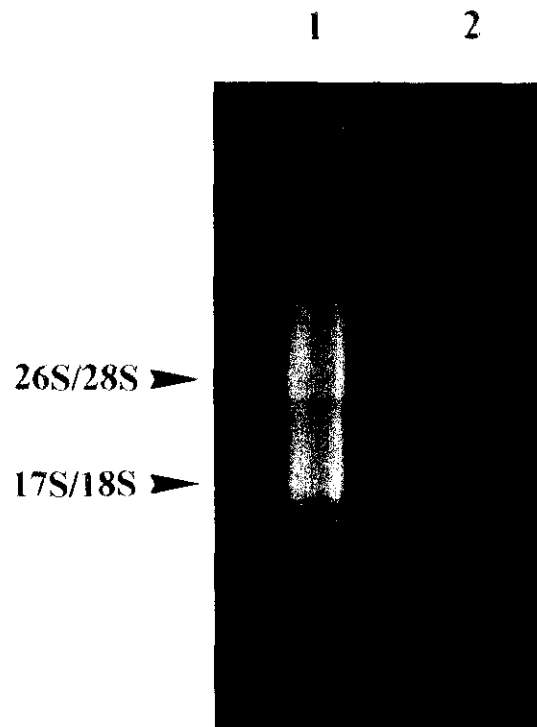
Estas diferencias en los volúmenes de cultivo, y por tanto, en el número de células, se debe a la dificultad de extracción de ARN tanto de estados prequísticos como de quistes de resistencia maduros. En ambos casos se debe proceder a una ruptura celular mecánica, realizada por homogenización en frío en el tampón de lisis indicado para cada tipo de extracción (Tabla IV).

Las muestras de quistes maduros (con una edad superior a un mes), son particularmente resistentes a la ruptura mecánica, lo que exige un previo tratamiento enzimático con Proteinasa-K (10 mg/ml) durante 24 horas (50-60°C) antes de la homogenización. Tanto para muestras prequísticas como para muestras de quistes maduros, el porcentaje de ruptura quística es bastante variable (50 a 80%) utilizando homogenización manual. Ésta es la razón de trabajar con muestras que contengan un mayor número de células prequísticas y quísticas, con respecto a muestras de células en estado vegetativo, que no requieren ruptura mecánica ya que se lisan por los componentes del tampón de ruptura.

A pesar de que sabemos que la sonicación es un buen método de ruptura mecánica para los quistes de resistencia de ciliados (GUTIÉRREZ et al., 1984; MATSUSAKA & HONGO, 1984), en nuestro caso, nos hemos visto obligados a utilizar la homogenización manual, ya que los detergentes que contienen los tampones de lisis (Tabla IV) provocan la aparición de espuma durante la sonicación, disminuyendo el nivel de ruptura sobre los quistes. Por otro lado, la potencial eliminación de los componentes responsables de la aparición de espuma del tampón de lisis, afectaría la integridad de las macromoléculas que se desean aislar.

El aislamiento de ARN total se ha llevado a cabo empleando dos métodos diferentes de extracción: tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987) y precipitación con cloruro de litio (CATHALA et al., 1983). El rendimiento y pureza de ARN obtenido con cada uno de los métodos se muestran en la Tabla XIII.

La figura 3 muestra el análisis electroforético de las muestras de ARN total de células vegetativas extraídas con cada uno de los dos métodos anteriormente indicados, en donde destacan las bandas de ARNr (subunidad mayor y menor). Aunque la cantidad de ARN de cada una de las muestras depositadas en el gel fue la misma (80 µg), en la muestra obtenida por el método tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (Figura 3, carril 1) se aprecia un mayor arrastre durante la electroforesis, probablemente debido a una mayor contaminación proteica. Estas observaciones coinciden con los valores medios de pureza obtenidos en ambos métodos de aislamiento (Tabla XIII).



**Figura 3:** Muestras de ARN total de células vegetativas (agarosa 1%) **Carril 1:** Extracción con el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo. **Carril 2:** Extracción con el método del LiCl. Las flechas indican las bandas de ARNr

**Tabla XIII:** Resultados comparativos obtenidos con los métodos de aislamiento de ARN total

MÉTODO	REFERENCIA	RENDIMIENTO <sup>1</sup> (µg)	PUREZA (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
Tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo	CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987	100-600	1.3
LiCl	CATHALA et al., 1983	30-250	1.6

(1) Cantidades obtenidas de cultivos de 400 a 1.600 ml.

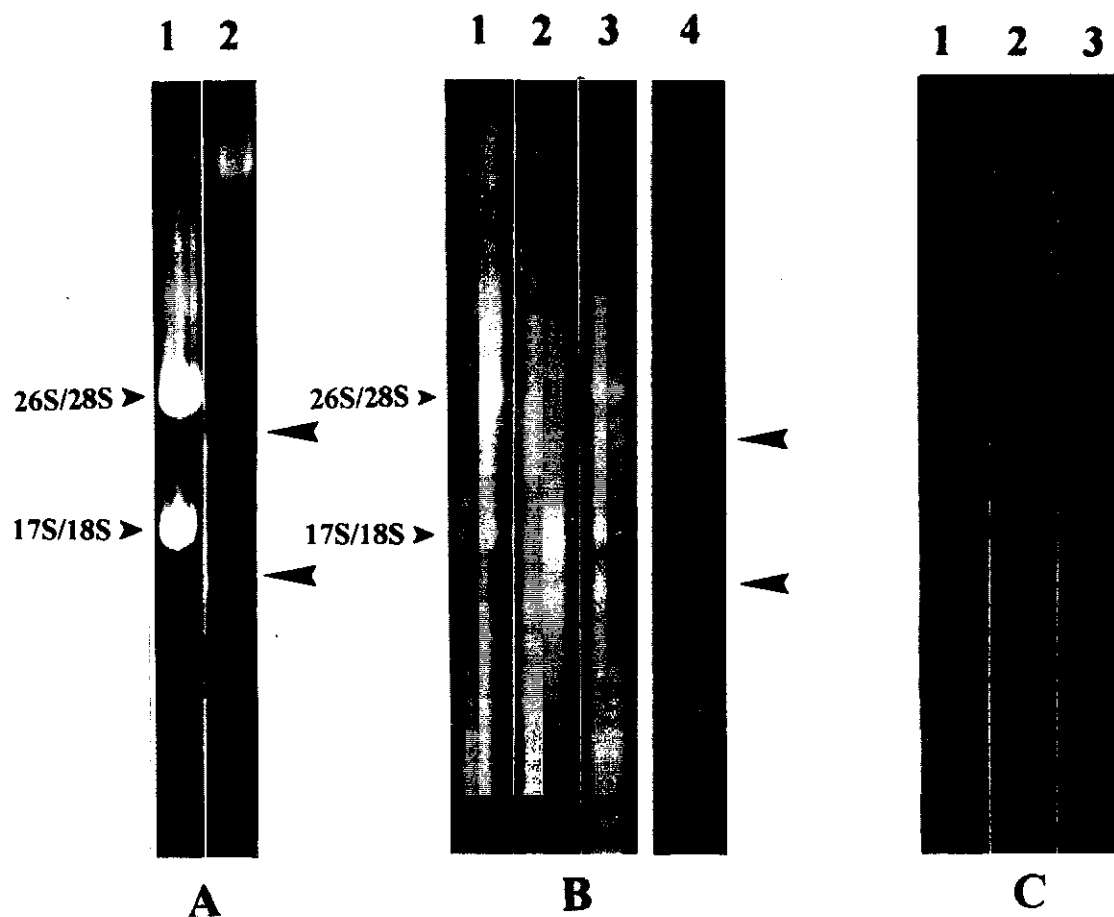
Probablemente, la menor pureza (y por tanto mayor contaminación con proteínas) que se obtiene en las extracciones de ARN con el método de CHOMCZYNSKI y SACCHI (1987) (valor medio 1,3), puede deberse a la existencia de un único paso de purificación fenol/cloroformo, que además se lleva a cabo en la primera parte del protocolo. En cambio, en el método de extracción basado en el LiCl, existen cuatro pasos de purificación (dos en fenol/cloroformo y dos en cloroformo) en la penúltima etapa del proceso, lo que permite obtener una relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> más próxima a 2, aunque por el contrario existe también una mayor pérdida de muestra o menor rendimiento (Tabla XIII).

El aislamiento de ARN total por el método del LiCl permite la recuperación de ARNm intactos, e incluso de precursores de hasta 10 Kb de longitud, aunque en ocasiones pueden perderse ARN de pequeño tamaño (CATHALA et al., 1983). En nuestro caso estas pérdidas no resultaron significativas ya que el interés se centraba en transcritos de mayor tamaño, por lo que el análisis de los patrones de ARN total durante el enquistamiento de *C. inflata* se realizó utilizando ambos tipos de extracción.

Durante el enquistamiento del ciliado se aisló ARN total a diferentes tiempos del proceso de diferenciación, y los resultados obtenidos con cada uno de los dos métodos de extracción se muestran en la figura 4. Las bandas de ARNr 17S/18S y 26S/28S aparecen claramente tanto en células vegetativas como en prequísticos y quistes de resistencia.

Ya desde las primeras etapas del enquistamiento en las que se obtuvieron muestras (ARN de 15 horas) e incluso en quistes maduros, se aprecia la presencia de dos bandas, inusualmente abundantes, situadas debajo de los ARNr correspondientes a las subunidades grande y pequeña respectivamente, apreciándose en muestras obtenidas con ambos métodos de aislamiento (Figura 4A y 4B). Estas bandas no aparecen en muestras aisladas de células vegetativas (Figura 3 y Figura 4, carriles 1A y 1B).

Para tratar de averiguar algo más acerca de la naturaleza de estas bandas se hibridó con una sonda ribosómica homóloga, obtenida por PCR (apdos. 13.7 y 13.8 de Materiales y Métodos), sobre un filtro conteniendo muestras de ARN total de vegetativos y de diferentes etapas prequísticas (Figura 4C).



**Figura 4:** Muestras de ARN total aisladas a partir de células procedentes de diferentes tiempos durante el proceso de enquistamiento. **A:** Muestras aisladas por el método del LiCl (agarosa 1%); **Carril 1:** Células vegetativas; **Carril 2:** Prequísticos 15h. **B:** Muestras aisladas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (agarosa 1%); **Carril 1:** Células vegetativas; **Carril 2:** Prequísticos 16h; **Carril 3:** Prequísticos 33h; **Carril 4:** Quistes de resistencia maduros. Las flechas indican las bandas situadas debajo de los dos ARNr en las figuras A y B. **C:** Quimioluminograma del gel de la figura B con una sonda ribosómica (18S) de *C. inflata* de 555 pb, marcada con digoxigenina. **Carril 1:** Células vegetativas; **Carril 2:** Prequísticos 16h; **Carril 3:** Prequísticos 33h.

Para tratar de averiguar algo más acerca de la naturaleza de estas bandas se hibridó con una sonda ribosómica homóloga, obtenida por PCR (apdos. 13.7 y 13.8 de Materiales y Métodos), sobre un filtro conteniendo muestras de ARN total de vegetativos y de diferentes etapas prequísticas (Figura 4C). La sonda ribosómica, formada por un fragmento de 555 pb del extremo 5' de la subunidad ribosómica menor de *Colpoda inflata*, fue marcada con digoxigenina por PCR e hibridada sobre el filtro de ARN en condiciones restrictivas (ver apdo. 10.2 de Materiales y Métodos). El quimioluminograma obtenido se muestra en la figura 4C.

Los resultados fueron similares cuando se utilizó una sonda ribosómica (heteróloga) procedente del ciliado *Euplotes crassus*, formada por el extremo 3' del ARNr 18S y la secuencia completa del ARNr 28S. En este caso, la hibridación de dicha sonda sobre un filtro conteniendo una muestra de ARN total de un prequístico de 15 horas (extraído por el método de LiCl), se localiza en las bandas correspondientes a ambos ARNr (subunidad grande y pequeña). De nuevo, las dos bandas que aparecen en la electroforesis (de tamaño inferior a cada uno de los dos ribosómicos) no hibridaron con la sonda (Figura 5).

### 1.1. Aislamiento de la fracción ARN poli(A)<sup>+</sup>

Para llevar a cabo el aislamiento de la fracción de ARN poliadenilada de diferentes muestras a lo largo del enquistamiento de *C. inflata* se emplearon tres métodos diferentes, aunque basados todos ellos en la captura de la cola poliA de los transcritos de nueva síntesis. En dos de los métodos empleados (*kits* comerciales de Clontech y Promega), el aislamiento de la fracción poli(A)<sup>+</sup> se lleva a cabo a partir de ARN total aislado previamente. El protocolo de la tercera casa comercial (Pharmacia) permite el aislamiento de la fracción poli(A)<sup>+</sup> directamente a partir del cultivo celular.

La purificación de la fracción de ARN poliadenilada se basa en el empleo de cromatografías en columnas oligo(dT) celulosa (AVIV & LEDER, 1972), sistema utilizado por Clontech y Pharmacia. Se ha empleado también un sistema magnético de captura de ARN poli(A) basado en el sistema biotina-estreptavidina (apdo. 3.2. de Materiales y Métodos).

La tabla XIV reúne el rango de valores obtenidos en diferentes aislamientos de ARN poli(A)<sup>+</sup> (tanto de vegetativos como de prequísticos o quistes de resistencia), con cada uno de los protocolos antes mencionados.

Las cantidades de ARN recuperadas con los métodos basados en cromatografías en columnas oligo(dT) son semejantes. En cambio, la relación de absorbancia  $A_{260/280}$  es ligeramente más alta en el aislamiento directo de la fracción poli(A)<sup>+</sup> (Pharmacia), donde se alcanzan valores próximos a 2. Esta mayor pureza puede deberse a la dilución del extracto celular que se realiza en este protocolo, antes de la adición de la muestra a la columna. El extracto celular se diluye a la tercera parte con tampón Tris/EDTA, lo que provoca la precipitación de numerosas proteínas e impide que éstas interfieran en la retención de ARN por la columna.

FIGURA 5

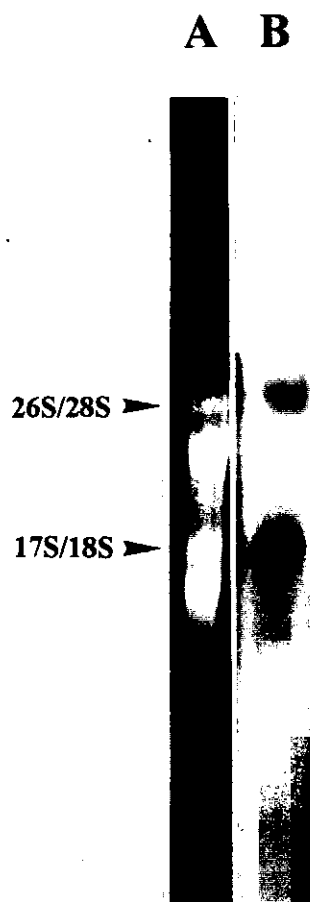
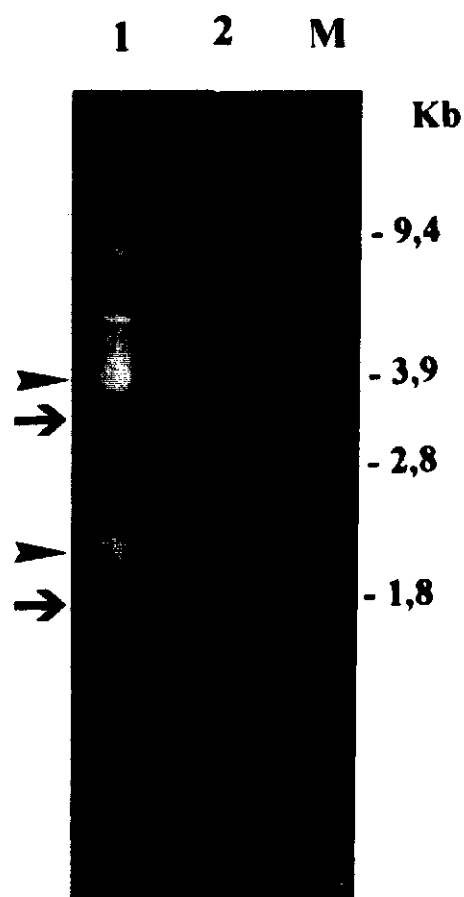


FIGURA 6



**Figura 5. A:** Muestra de ARN total de prequísticos de 15 horas obtenida por el método del LiCl (agarosa al 1%). Las flechas indican las bandas de ARNr sobre las que ha tenido lugar la hibridación. **B:** Autorradiografía de la hibridación del gel anterior con una sonda ribosómica de *Euplotes crassus* marcada con <sup>32</sup>P.

**Figura 6:** Muestras de ARN poli(A)<sup>+</sup> de células en fase vegetativa (agarosa al 1%). **M:** Marcadores de tamaño molecular de ARN. **Carril 1:** ARN poli(A)<sup>+</sup> obtenido directamente por el paso de un cultivo celular a través de columnas oligo(dT). **Carril 2:** ARN poli(A)<sup>+</sup> purificado por el paso de ARN total a través de columnas oligo(dT). Se observan en ambos carriles trazas de ARNr (indicadas por >) y dos posibles bandas de ARN poli(A)<sup>+</sup> (indicadas por →).

Las cantidades de ARN recuperadas con los métodos basados en cromatografías en columnas oligo(dT) son semejantes. En cambio, la relación de absorbancia  $A_{260/280}$  es ligeramente más alta en el aislamiento directo de la fracción poli(A)<sup>+</sup> (Pharmacia), donde se alcanzan valores próximos a 2. Esta mayor pureza puede deberse a la dilución del extracto celular que se realiza en este protocolo, antes de la adición de la muestra a la columna. El extracto celular se diluye a la tercera parte con tampón Tris/EDTA, lo que provoca la precipitación de numerosas proteínas e impide que éstas interfieran en la retención de ARN por la columna.

En cambio, la cantidad de ARN poli(A)<sup>-</sup> obtenida con el sistema biotina/estreptavidina fue bastante inferior a la de los otros dos (5-10 µg), con una relación de absorbancia  $A_{260/280}$  relativamente baja (1,3) e igual a la obtenida en aislamientos cromatográficos en oligo(dT) celulosa de la casa comercial Clontech.

El análisis electroforético de algunas de estas muestras de ARN poliadenilado muestra casi siempre contaminación con ARN ribosómico (ambas subunidades), contaminación que resulta relativamente mayor cuando el aislamiento de la fracción poli(A)<sup>-</sup> se lleva a cabo directamente a partir del cultivo celular, sin una previa extracción de ARN total.

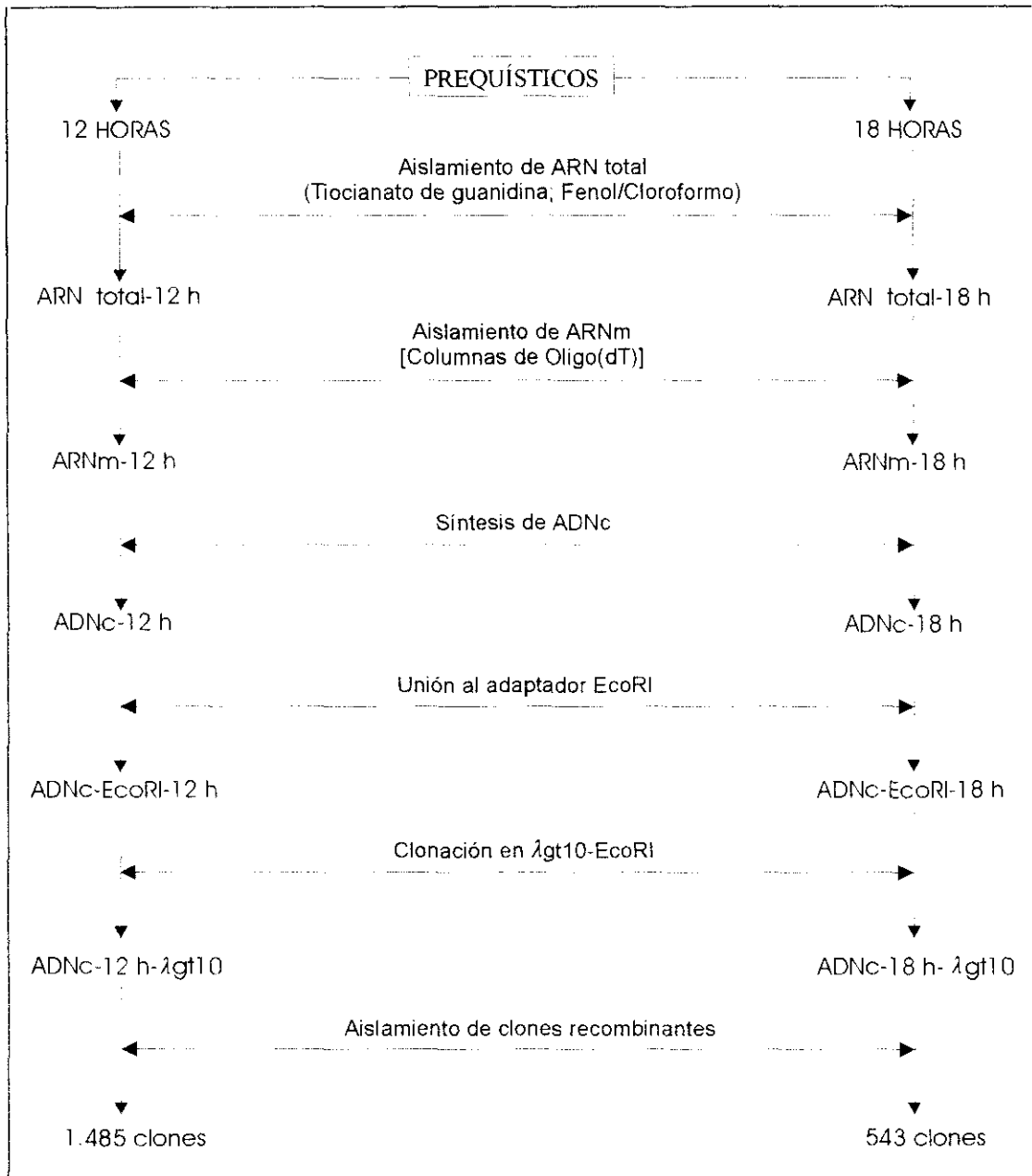
En la figura 6 se observan dos muestras de ARN poliadeniladas obtenidas en ambos casos a partir de cultivos de células vegetativas, una purificada con un método indirecto (columnas oligo(dT) de Clontech), y otra obtenida directamente a partir de un extracto celular (Pharmacia). Aunque en ambas purificaciones es posible observar ARNr, éstos resultan bastante más abundantes en la muestra purificada directamente.

Pero además, resulta particularmente importante señalar la aparición de dos bandas de ARN (Figura 6, carriles 1 y 2), semejantes a las descritas en el apartado anterior, que aparecen justo por debajo de los dos ARNr. El hecho de su aislamiento a través de una columna oligo(dT) no implica que las moléculas se encuentren poliadeniladas ya que, como hemos indicado, existe una fracción de ARN ribosómico, y por tanto carentes de una cola poli(A)<sup>-</sup>, que es también retenido.

## **2. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADNc PREQUÍSTICOS**

Las genotecas de ADNc de estados o fases prequísticas se construyeron a partir de ARNm procedentes de muestras prequísticas tempranas (12 y 18 horas desde la inducción del enquistamiento), ya que pensamos, basándonos en ciertas evidencias indirectas (BENÍTEZ et al., 1994; GUTIÉRREZ & MARTÍN-GONZÁLEZ, 1990; GUTIÉRREZ et al., 1990) que, al menos, algunos transcritos específicos de enquistamiento podrían surgir en etapas tempranas.

El ADNc de doble cadena de ambas muestras (12 y 18 horas) se preparó a partir de ARN poliadenilado obtenido de ARN total, por paso a través de columnas de oligo(dT), como se esquematiza en la figura 7. Posteriormente, se añadieron adaptadores EcoRI, preparando de este modo dichas poblaciones para su clonación en el vector  $\lambda$ gt10, digerido también con EcoRI. Una vez determinada la eficiencia de clonación para cada uno de las dos poblaciones de ADNc clonadas (apdo. 12.3 de Materiales y Métodos), se aislaron todos los halos claros (constituidos por partículas víricas recombinantes), obteniéndose un total de 1.485 clones de ADNc-12h y 543 clones de ADNc-18h.

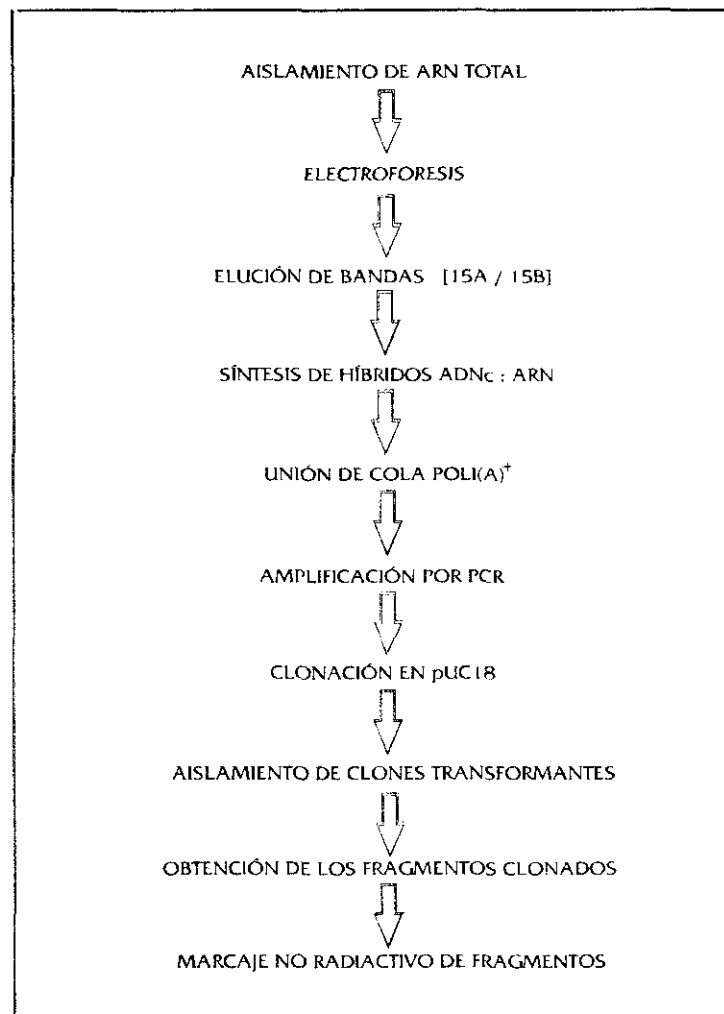


**Figura 7:** Diagrama de flujo que muestra las etapas seguidas para la construcción de las genotecas de ADNc de prequísticos de 12 y 18 horas en  $\lambda$ gt10.

### 3. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE SONDAS ESPECÍFICAS DE ENQUISTAMIENTO

#### 3.1. Sondas procedentes de bandas de ARN aisladas a partir de geles de agarosa

La estrategia seguida para la obtención de sondas procedentes de las bandas de ARN aisladas 15A y 15B se describe en la figura 8.



**Figura 8:** Estrategia seguida para la obtención de sondas procedentes de las bandas de ARN 15A y 15B, mostradas en la electroforesis de agarosa de la figura 9.

Se partió de muestras de ARN total aislado de células en estado vegetativo y prequísticas de 15 y 65 horas. En la figura 9 se observa una electroforesis de agarosa con una muestra de prequísticas de 15 horas en la que se indican las bandas aisladas. Estas bandas (de tamaño aproximado 3,1 y 1,8

Kb) fueron eluidas del gel y purificadas.

Posteriormente, a partir de este ARN se procedió a sintetizar la primera cadena de ADNc, obteniéndose los híbridos ADNc:ARN para cada una de las dos bandas indicadas. La adición posterior de una cola poli(A)' en el extremo 3' de la cadena de ADN sintetizada permitió la amplificación por PCR de los extremos 3' de ambas poblaciones de ADNc, empleando un cebador oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Tabla XI y XII de Materiales y Métodos).

En la electroforesis de las muestras de ADNc (ADNc-15A y ADNc-15B) amplificadas por PCR (Figura 10), se puede observar que ambas muestras están formadas por un conjunto heterogéneo de fragmentos de ADN con un amplio rango de tamaño molecular muy similar para ambas poblaciones.

La clonación de ambas poblaciones amplificadas de ADNc se realizó en el vector pUC18 empleando ADNc con extremos romos. Este sistema tiene dos inconvenientes principales: produce un alto número de clones no transformantes y, en ocasiones, se pueden perder las secuencias de restricción en las uniones entre el ADN heterólogo y el plásmido vector (SAMBROOK et al., 1989). En nuestro caso se produjeron ambos efectos. En primer lugar, la eficiencia de clonación fue baja en los dos casos. Para la población de ADNc-15A se analizaron 52 colonias, obteniéndose tan sólo 3 colonias con inserto (pCIA18, pCIA35 y pCIA38) que representa casi un 6% de las analizadas (Tabla XV). Los insertos de los clones pCIA18 y pCIA35 presentaban un tamaño de aproximadamente 300 pb y 1.230 pb respectivamente (Figura 12). El clon pCIA38 se descartó por presentar un tamaño muy pequeño (< 154 pb), y el clon pCIA35 también, ya que existían evidencias de que se trataba de un "clon ribosómico". En la otra población de ADNc clonada (ADNc-15B) se analizaron 84 colonias y sólo se encontró una que contuviera inserto (pCIB9), lo que representa el 1,2% del total de transformantes analizados (Tabla XV). El tamaño del inserto clonado en este caso fue de 360-370 pb. (Figura 11).

**Tabla XV:** Plásmidos e insertos seleccionados en las genotecas ADNc-15A y ADNc-15B. El plásmido pCIA24 carece de inserto.

ADNc	Plásmido/clon	inserto/sonda
ADNc-15A	pCIA18	A18
	pCIA35	A35
	pCIA38	A38
	pCIA24	-
ADNc-15B	pCIB9	B9

FIGURA 9

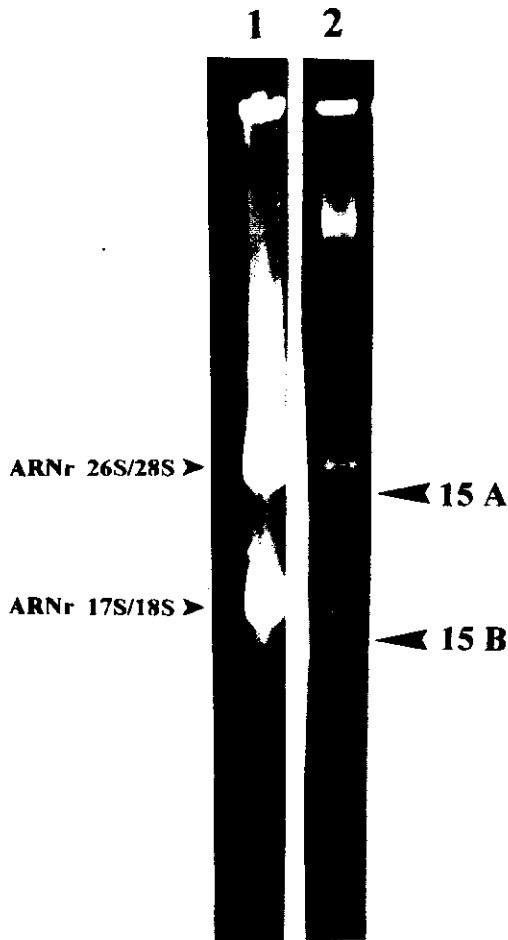
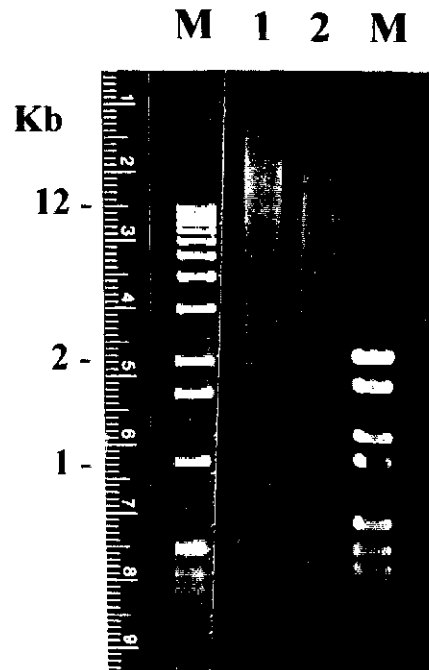
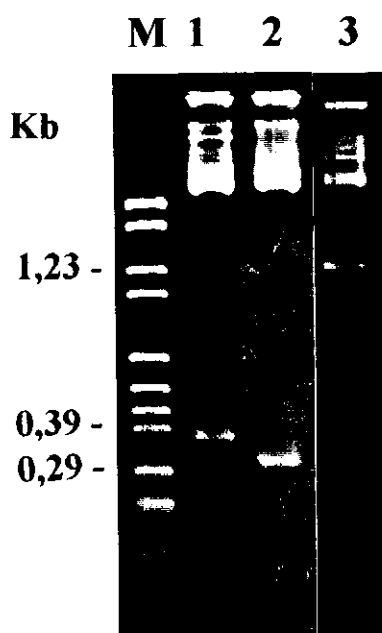


FIGURA 10



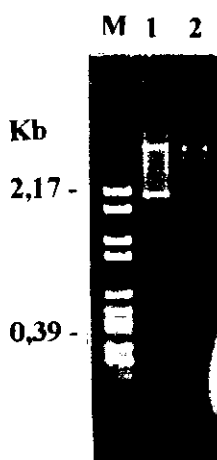
**Figura 9:** Muestras de ARN total obtenidas por el método del LiCl (agarosa de bajo punto de fusión al 1%). **Carril 1:** Células vegetativas. **Carril 2:** Prequísticos 15h. Las flechas indican las bandas aisladas, denominadas 15A (3,1 Kb) y 15B (1,8 Kb). Se indican también las bandas de ARNr.

**Figura 10:** Poblaciones de ADNc obtenidas de la amplificación por PCR de los híbridos ADNc:ARN (15A y 15B), con un cebador oligo(dT) (agarosa al 1%). **M:** Marcadores de tamaño molecular. **Carril 1:** Población de ADNc obtenida de la amplificación de la banda 15A. **Carril 2:** Población de ADNc obtenida de la amplificación de la banda 15B.



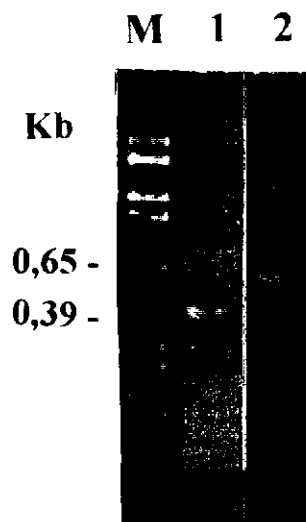
**Figura 11:** Insertos de los clones positivos de las genotecas ADNc-15A (pCIA18 y pCIA35) y ADNc-15B (pCIB9) obtenidos por digestión enzimática (EcoRI + Hind III) (agarosa de bajo punto de fusión al 1.7%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** Clon pCIB9; **Carril 2:** Clon pCIA18; **Carril 3:** Clon pCIA35.

**FIGURA 12**



**Figura 12:** Recuperación de los insertos de los clones pCIB9 (Carril 1) y pCIA18 (Carril 2) por amplificación con cebadores específicos de pUC18 (agarosa al 1.5%). **M:** Marcadores de tamaño.

**FIGURA 13**



**Figura 13:** Marcaje por PCR con digoxigenina del inserto B9 (agarosa al 2%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** Inserto B9 no marcado. **Carril 2:** Inserto B9 marcado.

Y en segundo lugar, la baja eficiencia en la detección de clones positivos (con inserto) en ambos casos pudo estar relacionada con la resistencia a la digestión por las enzimas de restricción EcoRI+HindIII de muchos de estos clones, lo que, posiblemente, no permitió la liberación de los fragmentos clonados. De hecho, en algunos clones positivos (reconocidos por restricción), el inserto clonado no se pudo recuperar posteriormente, posiblemente por pérdida de la secuencia de restricción para EcoRI y/o HindIII.

Por este motivo, los fragmentos clonados se recuperaron por amplificación del inserto con cebadores específicos de pUC18 (apdo. 13.5. de Materiales y Métodos), en lugar de la digestión enzimática con EcoRI+HindIII. De este modo se obtuvieron los fragmentos de los clones positivos (pCIA18 y pCIB9) con un mayor tamaño molecular, como resultado de la presencia de 122 pb más, que es la distancia de los cebadores al sitio SmaI de inserción. Por lo tanto, el tamaño final del inserto para el clon pCIB9 fue de 450-460 pb y 400 pb para el inserto del clon pCIA18 (Figura 12).

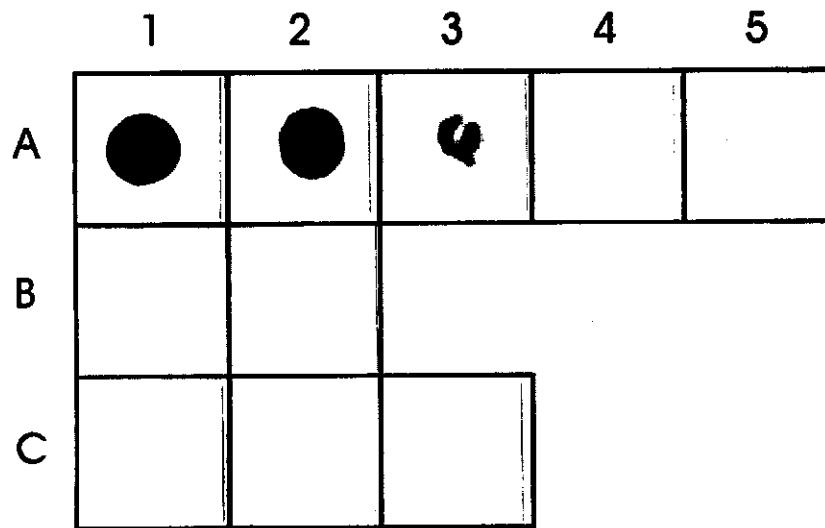
Posteriormente se marcaron ambos insertos (A18 y B9) por PCR con digoxigenina. La eficiencia del marcaje para el inserto B9 se observa en la figura 13, ya que los fragmentos marcados migran en el gel a una velocidad menor tras la incorporación del nucleótido con digoxigenina (LION & HAAS, 1990), que se incorpora cada 20-25 residuos (KESSLER, 1992). Las muestras amplificadas y marcadas fueron purificadas, utilizándose directamente como sondas sobre filtros de ARN (*dot blot*).

Las hibridaciones del inserto B9, obtenido por PCR (y conteniendo, por tanto, 122 pb homólogos del vector pUC18), sobre las poblaciones de ARN, se muestran en el quimioluminograma de la figura 14. La sonda B9 hibridó con igual intensidad tanto sobre ADN plasmídico del clon pCIB9 (Figura 14, A1) como sobre ADN plasmídico del clon pCIA18 (Figura 14, A2). La hibridación homóloga con el inserto aislado B9 (Figura 14, A3) es más intensa que la hibridación cruzada sobre el inserto A18 (Figura 14, A4). No existió hibridación cruzada con el inserto A35 (Figura 14, A5).

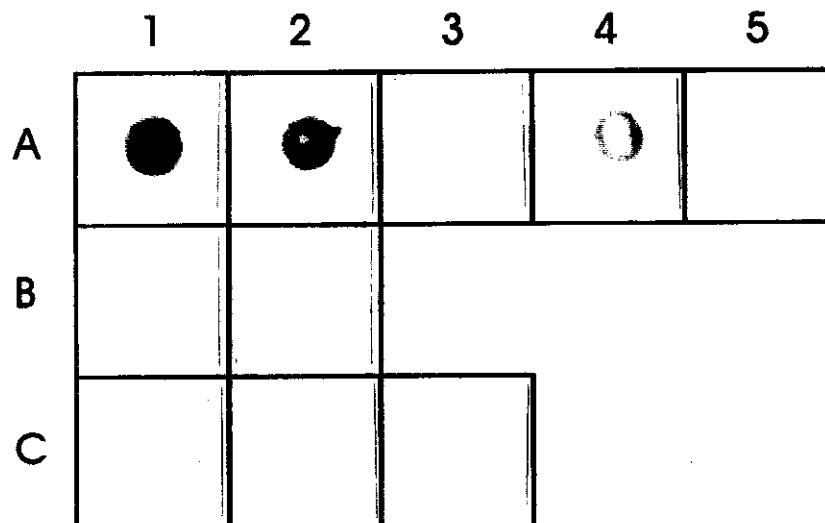
Tampoco se obtuvo hibridación cuando se utilizaron, como sustratos, ARN totales vegetativos y prequísticos obtenidos por el método del LiCl (Figura 14, B1 y B2), ni con el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (Figura 14, C1, C2 y C3).

Las hibridaciones sobre un filtro de las mismas características, utilizando el inserto A18 marcado con digoxigenina, se muestran en el quimioluminograma de la figura 15. En este caso, la hibridación fue igualmente positiva sobre muestras de ADN plasmídico de los clones pCIB9 (Figura 15, A1) y pCIA18 (Figura 15, A2). En cambio, no se obtuvo hibridación cruzada con ninguno de los otros dos insertos utilizados: B9 (Figura 15, A3) y A35 (Figura 15, A5). La hibridación fue positiva sólo en la muestra A18 (Figura 15, A4). De igual forma que la sonda B9, la sonda A18 no reconoció ninguna de las muestras de ARN total vegetativas y/o prequísticas (15 ó 33 horas) obtenidas por el método del LiCl (Figura 15, B1 y B2) ni por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (Figura 15, C1, C2 y C3).

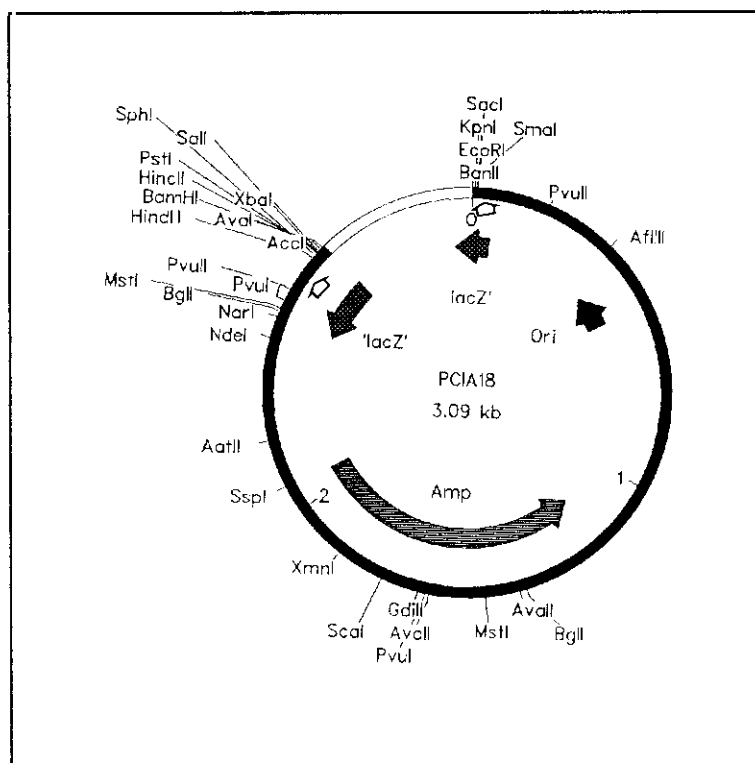
Según estos resultados, es posible que la intensa señal obtenida en ambas muestras de ADN plasmídico cuando se utilizaron ambas sondas se deba a la presencia de secuencias comunes (122 pb) entre dichas sondas y el vector pUC18 (Figura 16), puesto que la hibridación cruzada entre ambos insertos (B9 y A18) sólo se obtuvo en uno de los filtros (Figura 14, A4), con una señal muy débil.



**Figura 14:** Quimioluminograma (*dot blot*) de muestras de ARN total hibridadas con la sonda B9 marcada con digoxigenina. Cada mancha o muestra representa 5  $\mu$ g. A1: Plásmido pCIB9; A2: Plásmido pCIA18; A3: Inserto B9; A4: Inserto A18; A5: Inserto A35. B: Muestras de ARN total obtenidas por precipitación con LiCl; B1: Células vegetativas; B2: Prequísticos 15h. C: Muestras de ARN total obtenidas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo; C1: Células vegetativas; C2: Prequísticos 15h; C3: Prequísticos 33h.



**Figura 15:** Quimioluminograma (*dot blot*) de muestras de ARN total hibridadas con la sonda A18 marcada con digoxigenina. Cada mancha o muestra representa 5  $\mu$ g. A1: Plásmido pCIB9; A2: Plásmido pCIA18; A3: Inserto B9; A4: Inserto A18; A5: Inserto A35. B: Muestras de ARN total obtenidas por precipitación con LiCl; B1: Células vegetativas; B2: Prequísticos 15h. C: Muestras de ARN total obtenidas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo; C1: Células vegetativas; C2: Prequísticos 15h; C3: Prequísticos 33h.

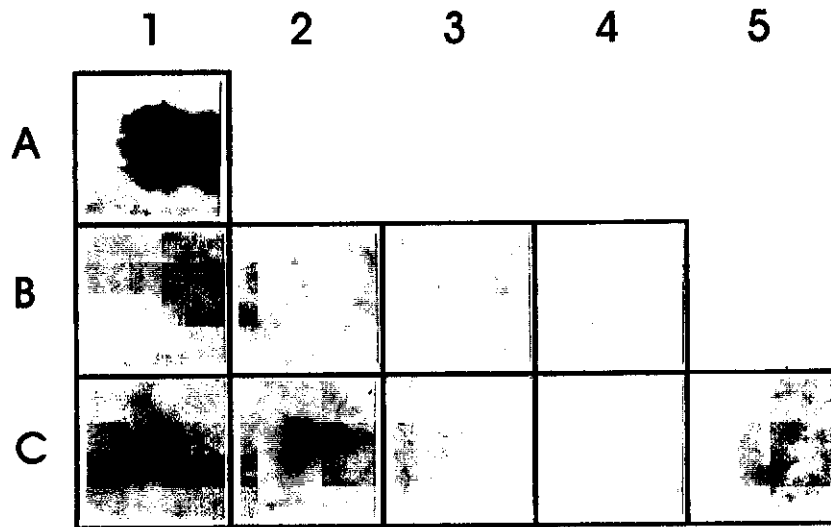


**Figura 16:** Esquema del plásmido pCIA18. El segmento no sombreado representa el fragmento clonado A18. Las flechas (D) indican la posición de los cebadores específicos de pUC18 (pUC18/M13<sub>forward</sub> y pUC18/M13<sub>reverse</sub>) utilizados para la recuperación de los insertos.

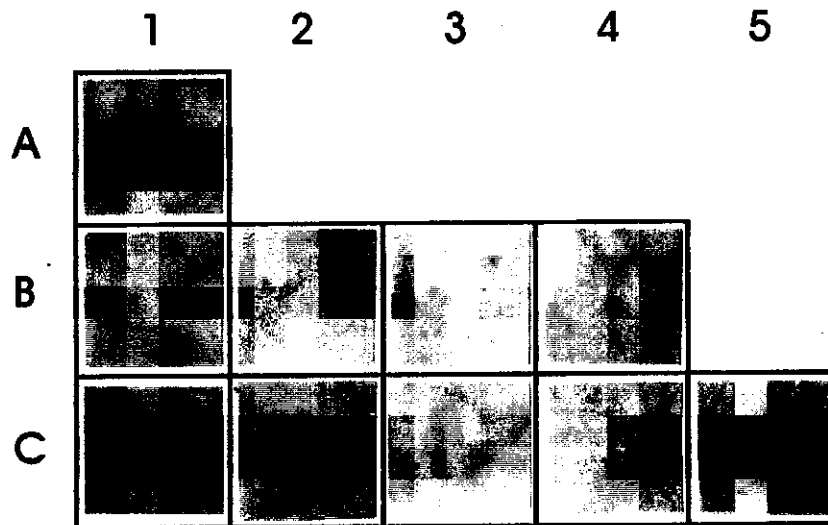
Por tanto, ninguno de los dos fragmentos (A18 y B9) utilizados como sondas dio hibridación positiva con muestras de ARN totales obtenidas tanto de vegetativos como de diferentes momentos del proceso de enquistamiento de *C. inflata*.

Para comprobar si estos resultados negativos pudieran deberse a la cantidad de sustrato para hibridar, se incrementó la cantidad de ARN total, vegetativo o prequístico (15 y 33 horas) que servía como sustrato. Se utilizaron diferentes cantidades de ARN, aislado tanto por el método del LiCl, como por el de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo, hasta un máximo de 20 µg/muestra (Figuras 17 y 18). Como controles positivos se utilizaron muestras de los plásmidos pCIB9 (Figura 17, A1) y pCIA18 (Figura 18, A1).

El filtro de la figura 17 fue hibridado con el inserto B9. Las muestras de ARN total de prequísticos de 15 horas, muestra a partir de la que fue obtenida la sonda, purificadas con el método del LiCl, no fueron reconocidos por dicha sonda [Figura 17, A3 (20 µg), A4 (10 µg) y A5 (0,5 µg)]. Dicha sonda, en cambio, hibridó, con una débil señal, en algunas de las muestras de ARN obtenidas por el método de isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo: ARN vegetativo (20 µg) (Figura 17, B1) y prequísticos de 15 horas (20 µg y 10 µg) (Figura 17, B2 y B3 respectivamente).



**Figura 17:** Quimioluminograma (*dot blot*) de muestras de ARN total hibridadas con la sonda B9 marcada con digoxigenina. **A1:** Plásmido pCIB9; **B:** Muestras de ARN total obtenidas por precipitación con LiCl; **B1:** Células vegetativas (20 µg); **B2:** Prequísticos 15 h (20 µg); **B3:** Prequísticos 15 h (10 µg); **B4:** Prequísticos 15 h (0,5 µg); **C:** Muestras de ARN total obtenidas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo; **C1:** Células vegetativas (20 µg); **C2:** Prequísticos 15 h (20 µg); **C3:** Prequísticos 15 h (10 µg); **C4:** Prequísticos 15 h (0,5 µg), **C5:** Prequísticos 33 h (20 µg).



**Figura 18:** Quimioluminograma (*dot blot*) de muestras de ARN total hibridadas con la sonda A18 marcada con digoxigenina. **A1:** Plásmido pCIA18; **B:** Muestras de ARN total obtenidas por precipitación con LiCl; **B1:** Células vegetativas (20 µg); **B2:** Prequísticos 15 h (20 µg); **B3:** Prequísticos 15 h (10 µg); **B4:** Prequísticos 15 h (0,5 µg); **C:** Muestras de ARN total obtenidas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo; **C1:** Células vegetativas (20 µg); **C2:** Prequísticos 15 h (20 µg); **C3:** Prequísticos 15 h (10 µg); **C4:** Prequísticos 15 h (0,5 µg), **C5:** Prequísticos 33 h (20 µg).

Resultados muy semejantes se obtuvieron cuando se utilizó la sonda A18 sobre un filtro de las mismas características (Figura 18).

No se obtuvo hibridación cuando se utilizaron como sustratos muestras de ARN total aisladas por el método del LiCl (Figura 18, A2, A3, A4 y A5). Las señales positivas de hibridación se obtuvieron con muestras de ARN total aisladas por el método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo, tanto de vegetativos [Figura 18, B1 (20 µg)], como de prequísticos de 15 horas [Figura 18, B3 (20 µg) y B4 (10 µg)].

En resumen, ambas sondas (B9 y A18) hibridaron con muestras de ARN procedentes de vegetativos y prequísticos de 15 horas obtenidas con el método tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo. No hubo, en cambio, hibridación positiva sobre muestras de ARN aisladas por el método del LiCl, aún cuando las cantidades de ARN usadas como sustrato fueron las mismas.

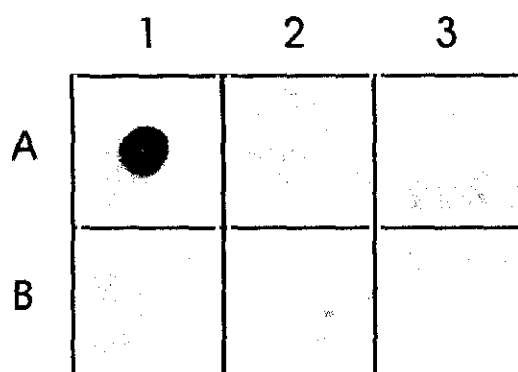
Ante estos resultados, pensamos que el fragmento A18 podría ser utilizado como sonda más específica de enquistamiento, ya que era el que manifestaba una menor intensidad de hibridación sobre ARN de estados vegetativos. Pero antes de comenzar a analizar las genotecas ya construidas, se preparó un *dot blot* de los diferentes ADNc obtenidos hasta el momento para comprobar si los transcritos a partir de los que se obtuvo dicha sonda (A18) estaban presentes en las diferentes poblaciones de ADNc, al igual que para comprobar su posible especificidad como sonda de enquistamiento (Figuras, 19 y 20).

La única señal de hibridación detectable fue la del control positivo (la sonda A18 consigo misma) y no se observó señal positiva sobre ninguna de las poblaciones de ADNc previamente amplificadas (vegetativos, prequísticos y quistes de resistencia) (Figura 19). Tampoco se obtuvo señal cuando la cantidad de ADN por muestra se incrementó desde 1,6 a 5 µg (Figura 20).

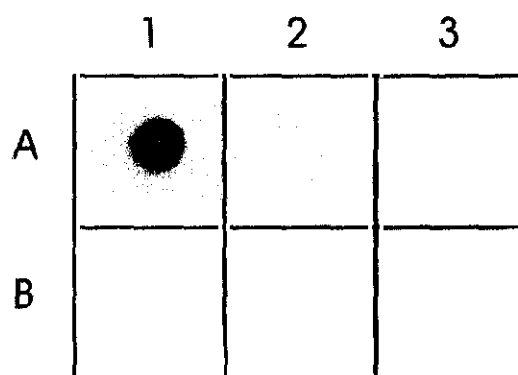
Una posible interpretación de estos resultados podría ser el que se hubiera clonado en pUC18 fragmentos ribosómicos, contaminantes de la muestra durante el proceso de escisión y extracción de las bandas de ARN (15A y 15B) y que hubieran podido transcribirse posteriormente a ADNc por homología interna con secuencias ricas en adenina. Para dilucidar esta posibilidad se preparó un *dot blot* de los insertos B9 y A18 y el plásmido pCIA24, considerado como negativo por la ausencia de fragmento (Figura 21). El filtro, constituido por dichas muestras, fue hibridado con la sonda ribosómica homóloga de *C. inflata*, constituida por un fragmento de 555 pb del ARNr 17S/18S marcado con digoxigenina.

El resultado fue negativo en todos los casos (Figura 21), y únicamente se detectó hibridación en el control positivo, la sonda ribosómica no marcada (Figura 21, A). Esta última hibridación indicó que no existía contaminación ribosómica (al menos de la parte del ARNr que forma la sonda) en ninguno de los clones seleccionados, aunque no nos permitió saber si existía contaminación con alguna de las otras subunidades o con el resto del ARNr 17S/18S no presente en la sonda.

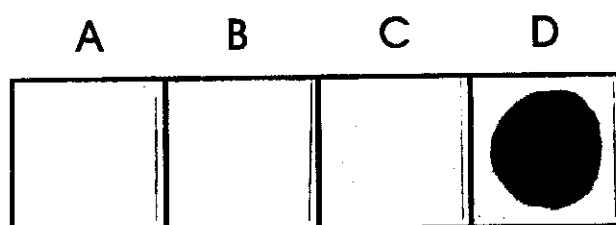
Todos estos resultados nos llevaron a descartar inicialmente el fragmento clonado (A18) como sonda específica de enquistamiento para utilizarla en la posterior búsqueda del gen en las genotecas de ADNc de prequísticos (12 y 18 horas) ya preparadas.



**Figura 19:** Quimioluminograma (*dot blot*) obtenido de la hibridación de diferentes poblaciones de ADNc con la sonda A18. Cada muestra representa 1.6  $\mu$ g de ADN, excepto el plásmido control. **A1:** Plásmido pCIA18 (4  $\mu$ g); **A2:** ADNc-vegetativos; **A3:** ADNc-prequisticos 12h; **B1:** ADNc-prequisticos 18h; **B2:** ADNc-prequisticos 24h; **B3:** ADNc-quistes



**Figura 20:** Quimioluminograma (*dot blot*) obtenido de la hibridación de diferentes poblaciones de ADNc con la sonda A18. Cada muestra representa 5  $\mu$ g de ADN. **A1:** Plásmido pCIA18; **A2:** ADNc-vegetativos; **A3:** ADNc-prequisticos 12h; **B1:** ADNc-prequisticos 18h; **B2:** ADNc-prequisticos 24h; **B3:** ADNc-quistes



**Figura 21:** Quimioluminograma (*dot blot*) obtenido de la hibridación de los insertos B9 (**A**), A18 (**B**) y el plásmido control pCIA24 (**C**) con una sonda ribosómica (18S) de *C. inflata*. **D**: Sonda ribosómica no marcada utilizada como control positivo. Cada muestra representa 4  $\mu$ g de ADN.

### 3.2. Experimentos de sustracción

Para llevar a cabo los experimentos de sustracción se eligieron los ADNc obtenidos de dos etapas tempranas (12 y 18 horas) del proceso de enquistamiento de *C. inflata*.

Estas poblaciones de ADNc contenían el adaptador de la endonucleasa EcoRI (ver apartado 12.1 de Materiales y Métodos) para ser clonados en  $\lambda$ gt10, vector que se utilizó para la elaboración de la genotecas. Aprovechando esta circunstancia, se sintetizó un cebador (EO3) cuya secuencia (12 pb) es parte del adaptador para EcoRI, presente en ambos extremos de todas las moléculas de ADNc.

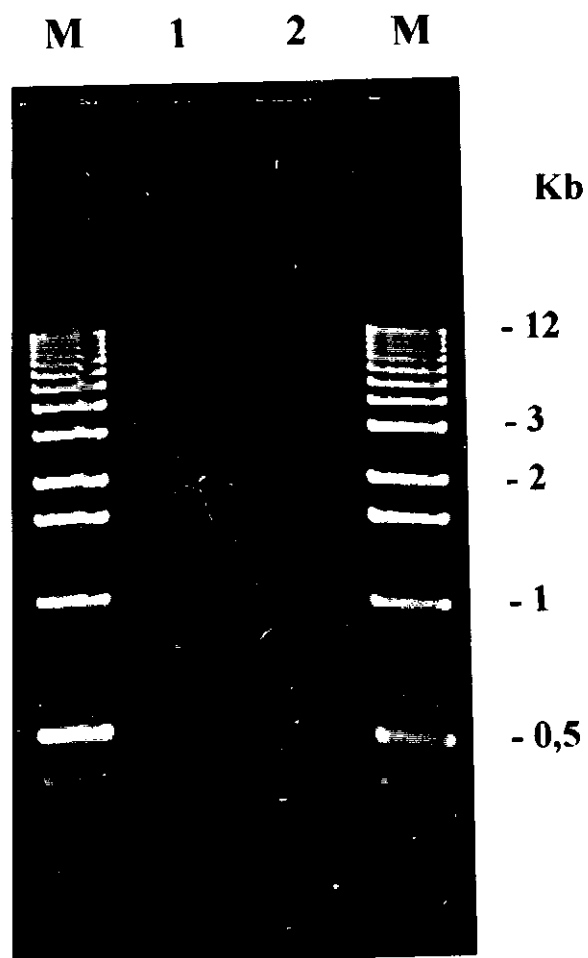
Para los experimentos de sustracción es necesario tener suficiente cantidad de ADN para hibridar, por lo que ambas poblaciones de ADNc (12 y 18 horas) fueron amplificadas por PCR usando el cebador EO3 (apdo. 13.3 de Materiales y Métodos). Se amplificaron cinco alícuotas de cada una de las dos poblaciones de ADNc, las cuales se sumaron posteriormente, las cinco de 12 horas y las cinco de 18 horas. Estas poblaciones mostraron, tras una electroforesis en agarosa (Figura 22), estar constituidas por una población continua de moléculas con un rango de tamaños bastante similar para ambas (desde un mínimo de aproximadamente 400 pb, hasta un máximo inusualmente alto para las dos muestras).

Posteriormente, y como se muestra en el esquema de la figura 23, ambas muestras (ADNc 12h y 18h) fueron nuevamente amplificadas por PCR, pero una de ellas (ADNc 18h) se amplificó utilizando una mezcla 9:1 de los cebadores EO4:EO5. La finalidad de esta operación era incrementar la heterogeneidad de una de las poblaciones de ADNc.

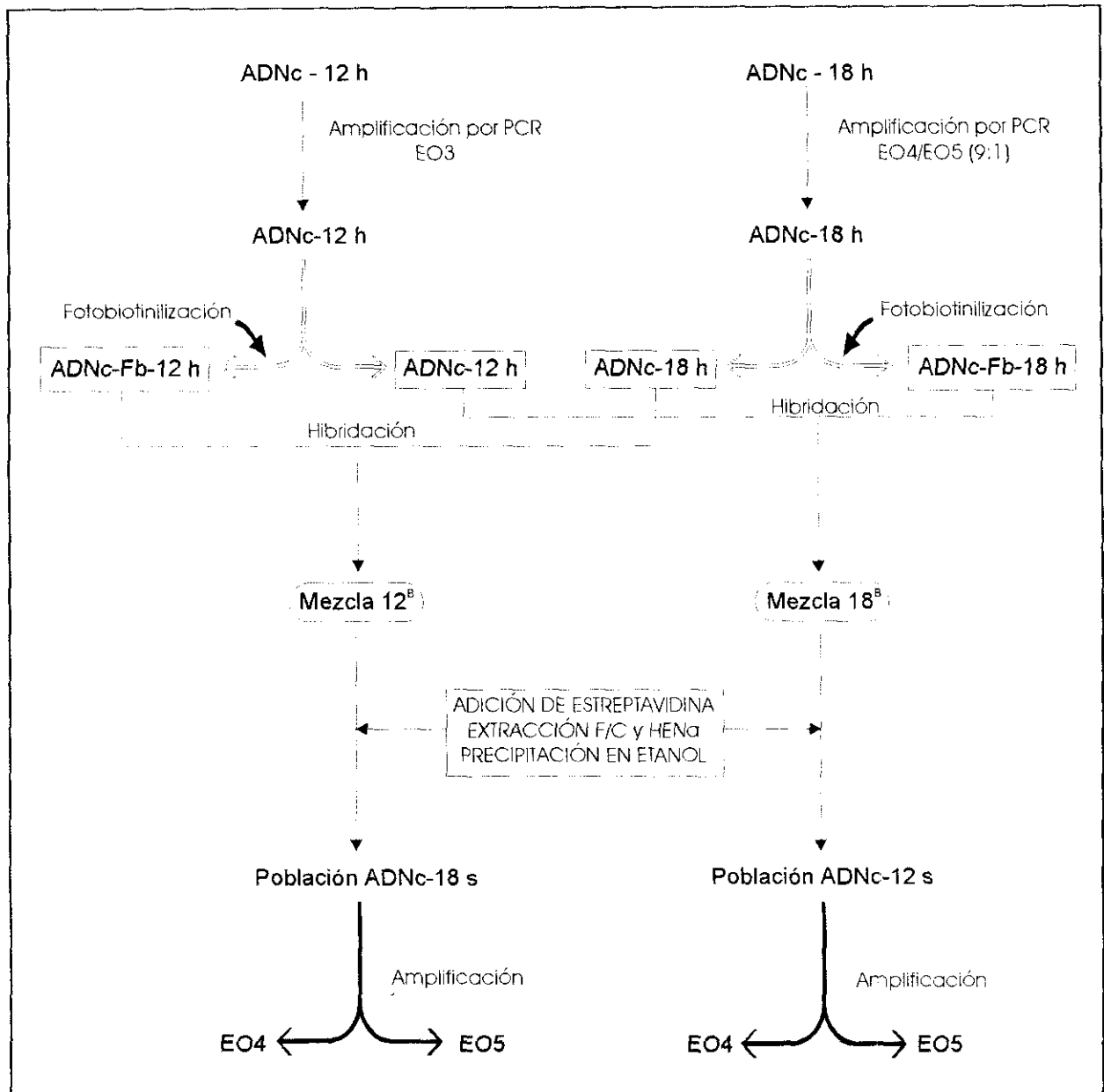
La amplificación del ADNc 18h con la mezcla EO4:EO5 permitiría, por una parte, la amplificación de todas las moléculas de ADNc 18h con el adaptador EcoRI puesto que el cebador EO5 lleva en su extremo 3' la secuencia del EO3 y el resto es la misma secuencia del EO4, es decir EO5 = EO4+EO3 (Tabla XI). El cebador EO4, mayoritario en la mezcla de cebadores, presenta una secuencia construida al azar, y amplificará secuencias internas en algunas pocas moléculas de la población ADNc 18h en donde se encuentren regiones complementarias a dicha secuencia. Esto da origen a una mayor heterogeneidad interna de la población amplificada ADNc 18h.

Después de estas amplificaciones, ambas muestras fueron purificadas y se procedió a la fotobiotinilización de ambas poblaciones. Cada una de las muestras fotobiotinilizadas (ADNc-Fb 12 y 18 horas) se hibridó con una alícuota de muestras de ADNc no fotobiotinilizadas, realizando mezclas cruzadas (Figura 23) en una proporción 15:5 (ADNc-Fb : ADNc). Estas mezclas de hibridación fueron denominadas 12<sup>B</sup> (ADNcFb-12h : ADNc-18h) y 18<sup>B</sup> (ADNcFb-18h : ADNc-12h).

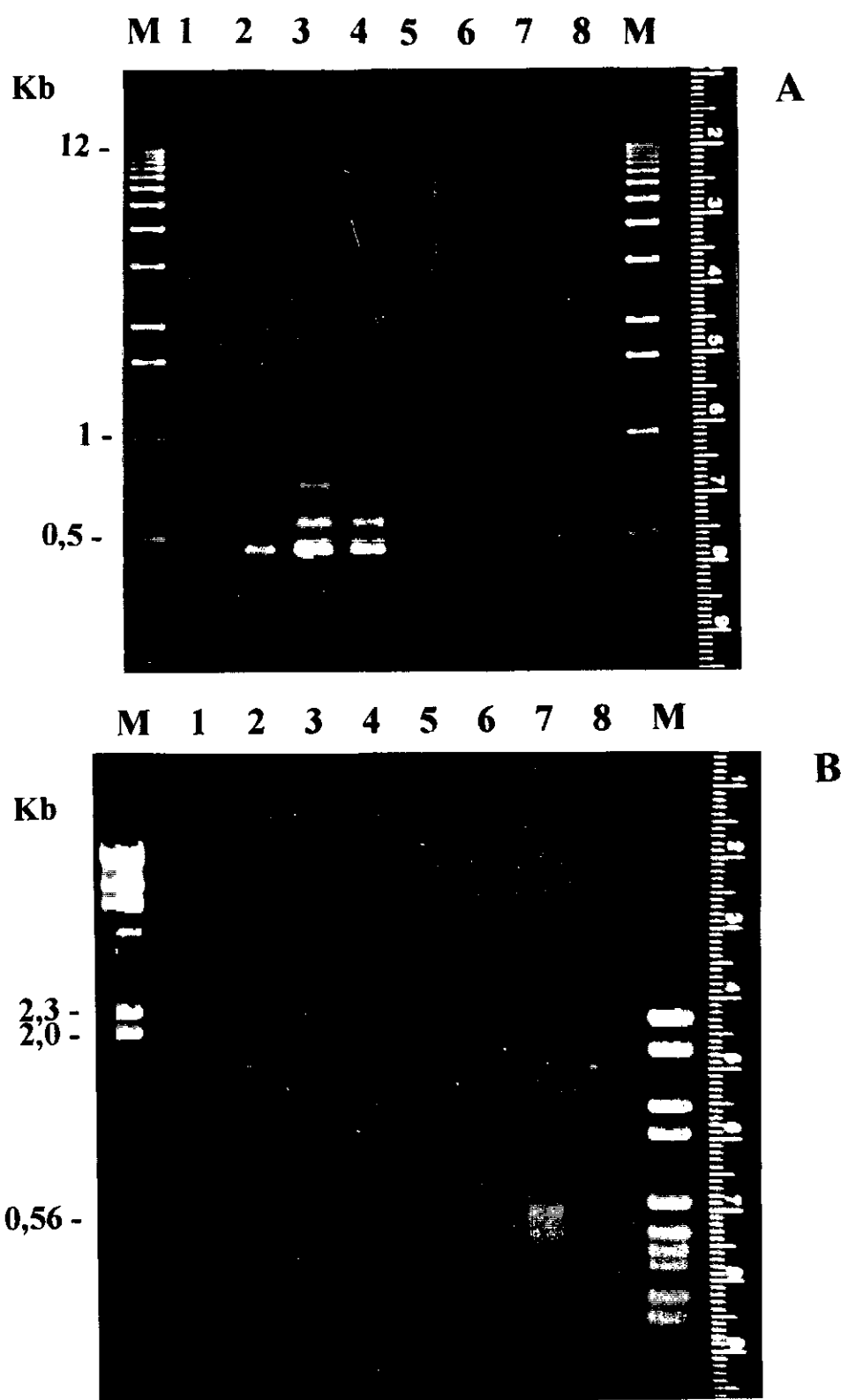
Finalmente, tras la adición de estreptavidina, los complejos estreptavidina-biotina-ADNc se eliminaron por sucesivas extracciones con fenol/cloroformo y HEPES/EDTA/NaCl, recogiendo la fase acuosa de cada una de las dos mezclas de hibridación que contenían los ADN sustraídos (secuencias presentes solamente en una de las poblaciones de ADNc, 12 ó 18 horas). Diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) de ambas muestras sustraídas (ADNc-18 s y ADNc-12 s) fueron amplificadas por PCR con los cebadores EO4 y EO5 separadamente. Los resultados se muestran en la figura 24.



**Figura 22:** Patrón de bandas obtenido de las poblaciones de ADNc amplificadas por PCR con el cebador EO3 (agarosa 1,5%). Cada muestra representa la suma de cinco alicuotas amplificadas separadamente. **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** ADNc de prequísticos de 12h. **Carril 2:** ADNc de prequísticos de 18h.



**Figura 23:** Esquema del proceso de sustracción llevado a cabo entre poblaciones de ADNc de etapas prequísticas (12 y 24 horas). **ADNc-Fb:** población fotobiotinizada; **Mezcla 12<sup>B</sup>:** mezcla de hibridación de la población ADNc de 12 horas fotobiotinizada (ADNc-Fb-12h) con la población de ADNc de 18 horas no fotobiotinizada; **Mezcla 18<sup>B</sup>:** mezcla de hibridación de la población de ADNc de 18 horas fotobiotinizada (ADNc-Fb-18h) con la población de ADNc de 12 horas no fotobiotinizada; **F/C:** fenol/cloroformo; **HENA:** HEPES/EDTA/NaCl; **ADNc-18s:** población de ADNc de prequísticos de 18 horas sustraída; **ADNc-12s:** población de ADNc de prequísticos de 12 horas sustraída.



**Figura 24:** Patrones de bandas obtenidos de la amplificación por PCR de las poblaciones sustraídas. **A:** Carriles 1, 2, 3, 4: Diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> de la muestra sustraída ADNc-18 s con el cebador EO4. Carriles 5, 6, 7, 8: Diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> de la muestra sustraída ADNc-12 s con el cebador EO5. **B:** Carriles 1, 2, 3, 4: Diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> de la muestra sustraída ADNc-18 s con el cebador EO5. Carriles 5, 6, 7, 8: Diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> de la muestra sustraída ADNc-12 s con el cebador EO4. **M:** Marcadores

El análisis electroforético de la población amplificada ADNc-12 s mostró dos resultados diferentes dependiendo del cebador utilizado. En el caso del cebador EO5 todas las diluciones utilizadas presentaron un patrón continuo de bandas (Figura 24A, carriles 5, 6, 7 y 8).

Cuando la población ADNc-12 s se amplificó con el cebador EO4 se observó un patrón continuo en las tres primeras diluciones (Figura 24B, carriles 5, 6 y 7), pero, en cambio, se detectaron bandas discretas en la dilución más alta ( $10^{-4}$ ), con una banda mayoritaria de aproximadamente 1.600 pb (Figura 24B, carril 8).

En cuanto a la población ADNc-18 s, los resultados de la amplificación con el cebador EO5 se muestran en la figura 24B (carriles 1, 2, 3 y 4). Se aprecia, de nuevo, un patrón continuo en todas las diluciones, con un rango de tamaños desde 2,5 Kb a 150 pb aproximadamente.

Los resultados de la amplificación de dicha población sustraída (ADNc-18 s) con el cebador EO4 aparecen en la figura 24A (carriles 1, 2, 3 y 4). En las diluciones más bajas se observa un patrón continuo desde el inicio del gel hasta aproximadamente 500 pb, pero al aumentar la dilución aparecen algunas bandas discretas (una banda mayoritaria de 420 pb y tres bandas más de 330, 420 y 610 pb).

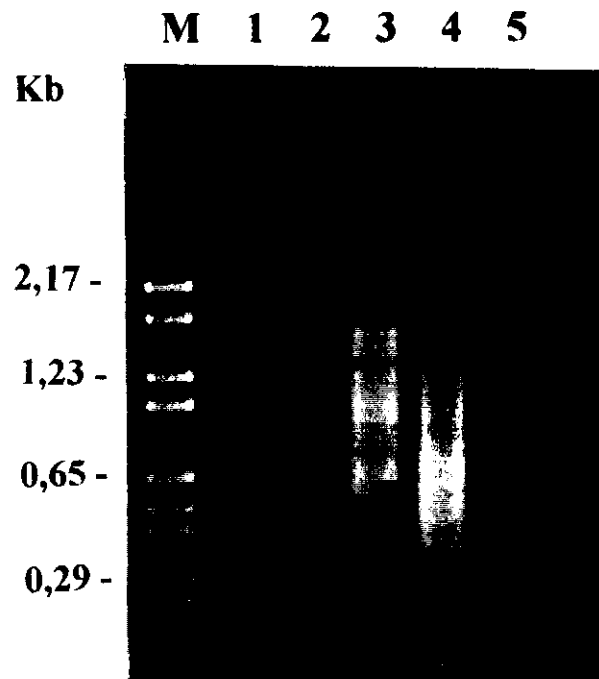
### 3.3. Polimorfismos de ADNc

Otra estrategia para tratar de encontrar heterogeneidad entre poblaciones de ADNc es la detección de polimorfismos en ellas. Para el estudio de polimorfismos en las diferentes poblaciones de ADNc se empleó el método de amplificación por PCR empleando cebadores de secuencias al azar (método denominado RAPcD). Los cebadores utilizados fueron (EO3, EO4, SA1, SA2 y el par SA1/SA2) cuyas secuencias y condiciones de amplificación se describen en el apartado 13 de Materiales y Métodos. Los ADNc utilizados para detectar polimorfismos fueron los derivados de muestras de poblaciones de vegetativos, varios prequísticos y quistes de resistencia maduros de *Colpoda inflata*. Como muestras a ser amplificadas se emplearon dos diluciones de estos ADNc ( $10^{-1}$  y  $10^{-3}$ ). Estos ADNc no presentaban el adaptador para EcoRI o modificación alguna para una posterior clonación, sino que se trataba de los obtenidos de las transcripciones inversas de las poblaciones de ARNm de los diferentes estados antes indicados.

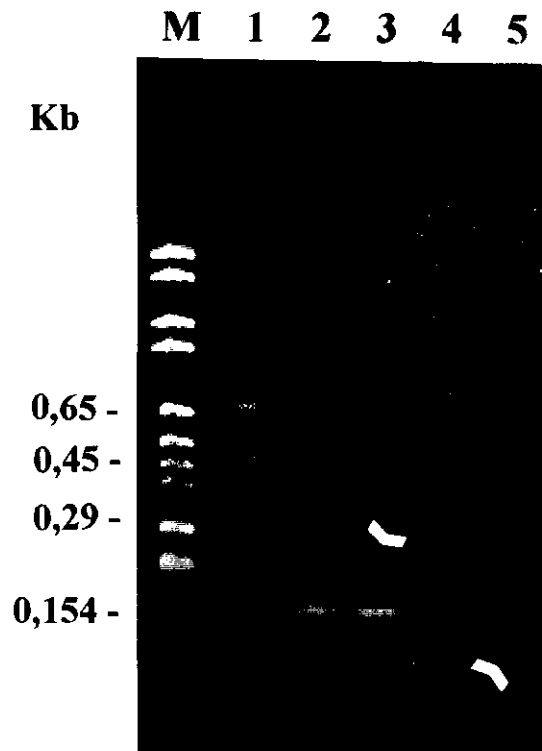
El estudio de los polimorfismos de las diferentes poblaciones de ADNc nos permitiría conocer el grado de homología entre las diferentes poblaciones, ya que el empleo de la técnica RAPcD no requiere un conocimiento previo del genoma o de la secuencia que va a ser analizada, y podría constituir una tercera estrategia para la obtención de una sonda específica a partir de alguna de las poblaciones de ADNc.

En todos los casos los cebadores utilizados mostraron una buena eficiencia en la obtención de patrones con múltiples bandas. El patrón obtenido con el cebador EO4 presentó un gran número de bandas, como se observa en la figura 25. El ADNc de etapas prequísticas (18 y 24 horas) aparece con un patrón casi continuo de bandas que se extiende desde 1,5 Kb hasta unos 400 pb (Figura 25, carriles 3 y 4).

El patrón obtenido cuando las poblaciones de ADNc se amplificaron con el par de cebadores SA1/SA2 (1:1) se muestra en la figura 26. Algunas de estas bandas son coincidentes en la mayoría de



**Figura 25:** Polimorfismos obtenidos de la amplificación por PCR de las diferentes poblaciones de ADNc (diluciones  $10^{-2}$ ) con el cebador EO4 (agarosa de bajo punto de fusión al 2,5%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** ADNc-vegetativos; **Carril 2:** ADNc-12h; **Carril 3:** ADNc-18h; **Carril 4:** ADNc-24h; **Carril 5:** ADNc-quistes.



**Figura 26:** Polimorfismos obtenidos de la amplificación por PCR de las diferentes poblaciones de ADNc (diluciones  $10^{-1}$ ) con el par de cebadores SA1/SA2 (agarosa de bajo punto de fusión al 2,5%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** ADNc-vegetativos; **Carril 2:** ADNc-12h; **Carril 3:** ADNc-18h; **Carril 4:** ADNc-24h; **Carril 5:** ADNc-quistes. Las flechas indican las bandas que fueron cortadas y eluidas del gel (bandas B1/18= 250 pb y B2/Q < 200 pb).

las poblaciones, pero además se puede apreciar que los patrones procedentes de células vegetativas y prequísticos de 12 horas presentan mayor homología entre sí (tres bandas de un total de cuatro), igual que sucede con las otras dos poblaciones de prequísticos (18 y 24 horas) con respecto a la población de quistes (Figura 26). Cabe destacar también la presencia de algunas bandas, indicadas con flechas (Figura 26), que sólo se observan en las poblaciones señaladas. Estas bandas fueron aisladas posteriormente para ser utilizadas como potenciales sondas.

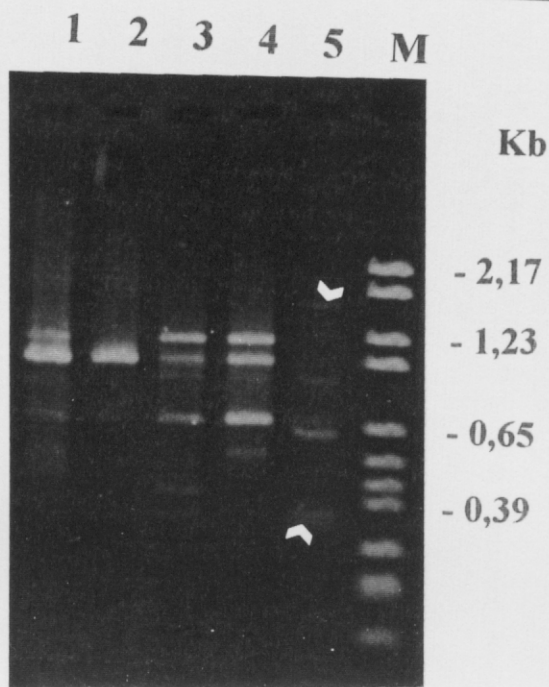
También se utilizó el cebador EO3, secuencia complementaria al adaptador Eco RI, pero que, en este caso, actúa como cebador con secuencia al azar, al no estar las poblaciones de ADNc unidas a dicho adaptador, como anteriormente se indicó. Igualmente, se observan muchas bandas coincidentes en casi todas las muestras (Figura 27). Se observaron algunas bandas en la población de ADNc procedente de quistes maduros (señaladas con flechas en la figura 27), que no aparecieron en el resto de las poblaciones, y que fueron aisladas posteriormente para su posible utilización como sondas. Hay que hacer notar también que el patrón obtenido cuando la población se amplificó con el cebador EO3 presenta un mayor tamaño molecular con respecto al observado con la mezcla de cebadores SA1/SA2.

En el primero de los casos (amplificación con el cebador EO3, figura 27) la población de bandas amplificadas se extiende desde aproximadamente 2 Kb hasta 350 pb, mientras que con el par SA1/SA2 (Figura 26) la banda de mayor tamaño amplificada y detectable con bromuro de etidio es sólo de 800 pb, apareciendo incluso bandas menores de 200 pb.

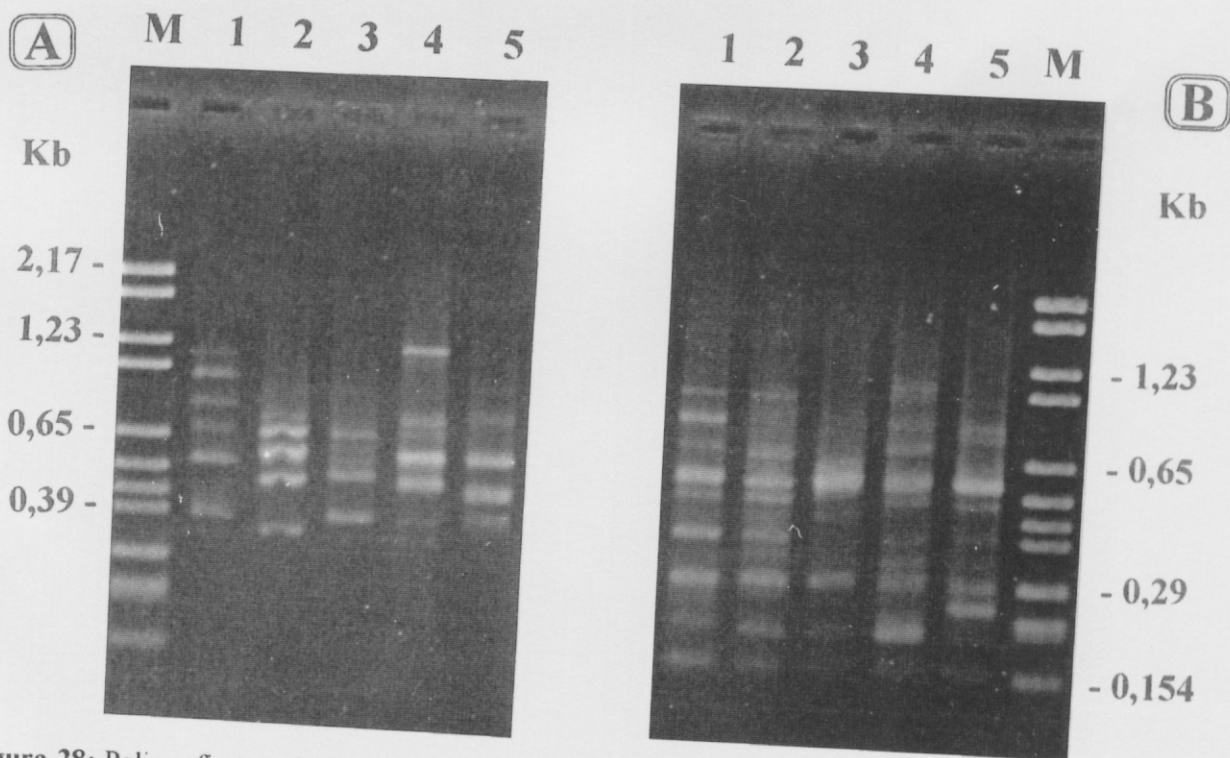
Se emplearon, así mismo, los cebadores SA1 y SA2 por separado (Figura 28). En ambos casos se observa que la amplificación, empleando los mismos cebadores por separado, genera un patrón diferente al obtenido con la mezcla SA1/SA2, rindiendo un mayor número de bandas por muestra de ADNc.

Una vez analizados los patrones de los polimorfismos de ADNc, se procedió a aislar aquellas bandas que aparecían en una determinada etapa prequística, que no aparecían en el resto de las poblaciones analizadas, y que estaban lo suficientemente separadas unas de otras como para permitir una fácil escisión del gel, minimizando así la posible contaminación con fragmentos de ADN procedentes de bandas muy próximas.

Se eligieron dos bandas a partir del patrón obtenido de la amplificación con el par de cebadores SA1/SA2: una banda de aproximadamente 250 pb (Figura 26, carril 3), aislada de la población de prequísticos de 18 horas, que denominaremos B1/18, y una banda de tamaño molecular inferior (< 200 pb), obtenida de la amplificación de ADNc quístico que denominaremos B2/Q (Figura 26, carril 5). Se aislaron otras dos bandas a partir de los polimorfismos con el cebador EO3, denominadas bandas B3/Q y B4/Q de 320 y 1.600 pb respectivamente, aisladas en ambos casos a partir de la población de ADNc de quistes (Figura 27, carril 5). Estos ADNs fueron recuperados de los geles de agarosa según se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos, y los ADNs purificados fueron amplificados de nuevo utilizando los mismos cebadores. De las bandas aisladas B1/18 y B2/Q (Figura 27, carriles 3 y 5 respectivamente) no se pudo obtener una nueva amplificación, quizá por ruptura o degradación de la molécula de ADN original durante el proceso de extracción o por la presencia de algún contaminante que inhibió la amplificación.



**Figura 27:** Polimorfismos obtenidos de la amplificación por PCR de las diferentes poblaciones de ADNc (diluciones  $10^{-1}$ ) con el cebador EO3 (agarosa de bajo punto de fusión al 2,5%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** ADNc-vegetativos; **Carril 2:** ADNc-12h; **Carril 3:** ADNc-18h; **Carril 4:** ADNc-24h; **Carril 5:** ADNc-quistes. Las flechas indican las bandas que fueron cortadas y eluidas del gel (bandas B3/Q= 320 pb y B4/Q= 1.600 pb).

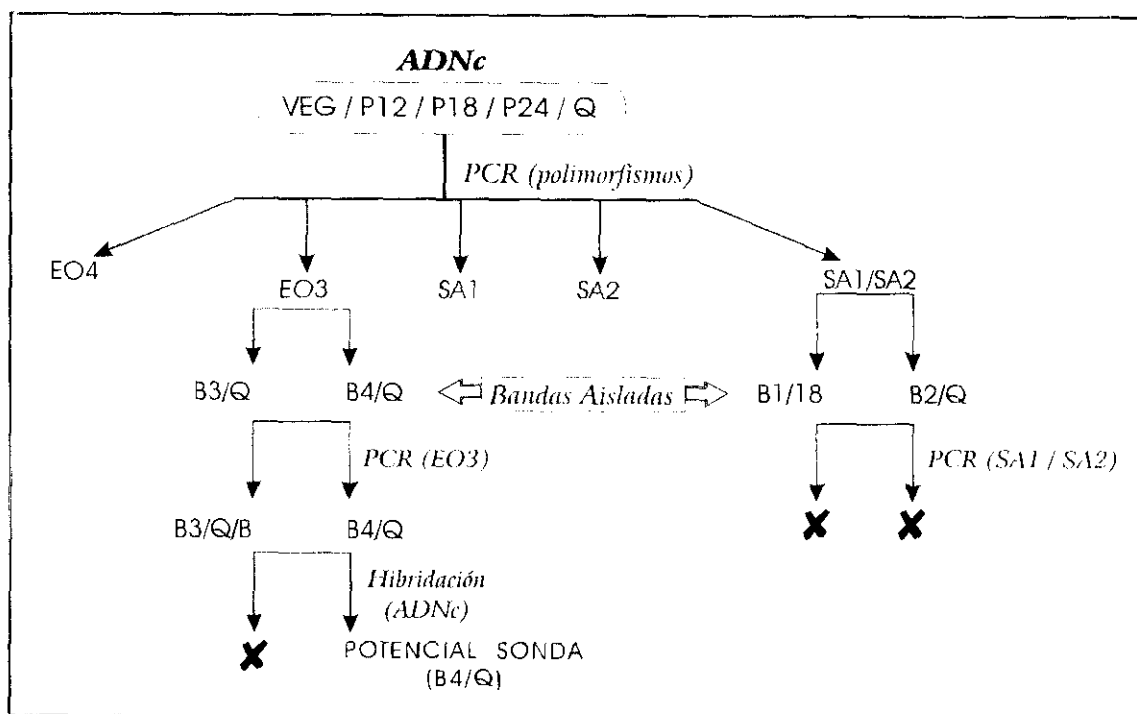


**Figura 28:** Polimorfismos obtenidos de la amplificación por PCR de las diferentes poblaciones de ADNc (diluciones  $10^{-1}$ ) con los cebadores SA1 (**Figura A**) y SA2 (**Figura B**) (agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** ADNc-vegetativos; **Carril 2:** ADNc-12h; **Carril 3:** ADNc-18h; **Carril 4:** ADNc-24h; **Carril 5:** ADNc-quistes.

La amplificación por PCR de la banda B4/Q, empleando el cebador EO3, rindió ocho bandas de tamaño inferior al de la banda original extraída del gel, con una banda mayoritaria de unos 500 pb (Figura 29). La amplificación de la banda B3/Q, empleando el mismo cebador EO3, también produjo una serie de productos que, en este caso, fueron de tamaño superior al de la banda original extraída, por lo que se procedió a aislar la banda de menor tamaño molecular (220 pb), denominándose banda B3/Q/B (Figura 30).

La aparición de bandas de menor tamaño, respecto de la banda original extraída, después de una amplificación por PCR empleando los mismos cebadores, se podría deber a la ruptura de la molécula original durante la extracción del gel de agarosa y su posterior purificación. Por el contrario, las bandas de tamaño superior al de la banda original extraída, sólo se pueden atribuir a contaminación de la muestra, ya con ADN procedente del mismo gel o contaminación exógena durante la reacción de amplificación propiamente dicha.

En el esquema de la figura 31 se resumen las diferentes bandas aisladas a partir del estudio de los polimorfismos de las poblaciones de ADNc.



**Figura 31:** En el esquema se resumen las bandas que se han aislado a partir del estudio de polimorfismos de las poblaciones de ADNc y las posteriores amplificaciones de dichas bandas (VEG: Vegetativos; P12, P18 y P24: Prequisticos de 12, 18 y 24 horas respectivamente; Q: Quiste de resistencia). El símbolo X indica aquellas bandas que no pudieron ser amplificadas (B1/18 y B2/Q), o bien que no fueron específicas de una determinada población (B3/Q/B).

FIGURA 29

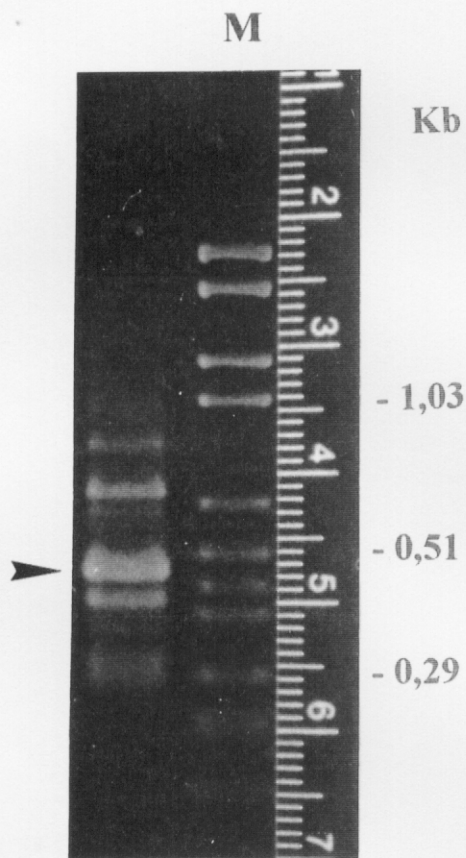
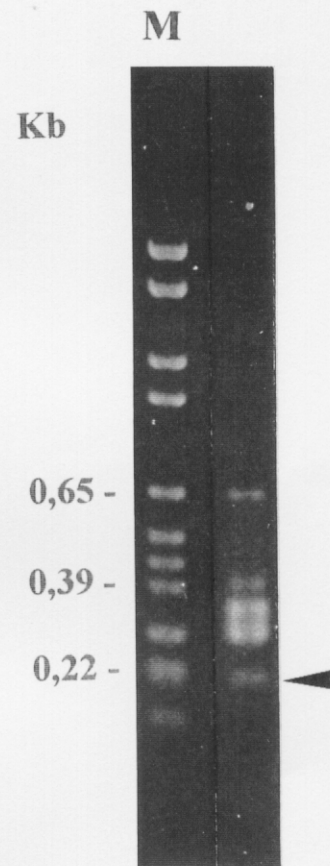


FIGURA 30



**Figura 29:** Amplificación por PCR de la banda B4/Q aislada (dilución  $10^{-1}$ ), empleando el cebador EO3 (agarosa al 2,5%). La flecha indica la banda mayoritaria de 500 pb. M: Marcadores de tamaño.

**Figura 30:** Patrón de bandas obtenido de la amplificación por PCR de la banda B3/Q (dilución  $10^{-1}$ ), empleando el cebador EO3 (agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%). La banda B3/Q/B (220 pb) que fue aislada del gel, se marca con una flecha. M: Marcadores de tamaño.

Las bandas B4/Q y B3/Q/B fueron marcadas con digoxigenina por PCR con la finalidad de comprobar su especificidad como sondas del estado quístico. Para ello se preparó un *dot blot* con las distintas poblaciones de ADNc (Figuras 32 y 33). En la figura 32 se muestra el quimiolumigrama obtenido de un *dot* de las poblaciones de ADNc (vegetativos, prequísticos y quistes maduros), hibridados con la sonda B4/Q. Dicha sonda hibridó de forma más intensa con la muestra de ADNc de quistes (como cabría esperar), pero además se aprecia hibridación sobre todas las muestras de ADNc. En la figura 33 se observa el quimiolumigrama obtenido de un *dot* con las mismas poblaciones de ADNc, hibridadas con la sonda B3/Q/B que, por el contrario, mostró una señal semejante en todas las muestras, excepto en la muestra de 18 horas, donde la señal fue más débil.

Se preparó una hibridación *Southern* con las poblaciones de ADNc (vegetativos, prequísticos y quistes de resistencia), empleando desde 27 a 35  $\mu$ g de ADN por muestra (Figura 34A) y utilizando el fragmento B4/Q como sonda.

En el quimiolumigrama de la figura 34B se aprecia que el fragmento B4/Q hibrida con una banda de tamaño molecular aproximado de 550 pb en vegetativos (Figura 34B, carril 1) y prequísticos de 12 horas (Figura 34B, carril 2), aunque en esta última muestra no se aprecia con mucha claridad, mientras en las muestras de ADNc de prequísticos de 18h y 24h (Figura 34B, carriles 3 y 4 respectivamente), la hibridación se localiza en una banda de menor tamaño (400 pb). Pero la mayor señal de hibridación se obtiene, como cabría esperar, con la población quística, donde aparecen dos bandas mayoritarias de 300 y 400 pb (Figura 34B, carril 5). La banda superior (400 pb) coincide con la de prequísticos de 18 y 24 horas.

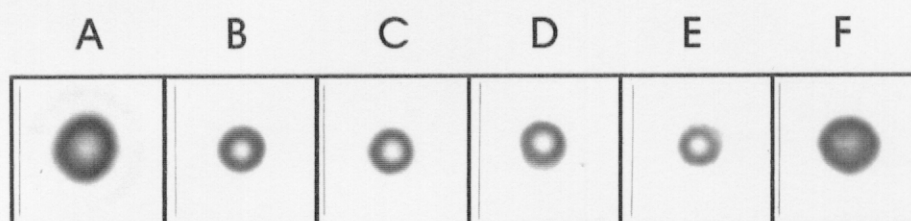
Este fragmento B4/Q, al hibridar mayoritariamente en ADNc de quistes de resistencia y también en prequísticos, se consideró inicialmente útil como sonda de enquistamiento para, posteriormente, detectar el gen completo sobre las genotecas prequísticas de ADNc previamente construidas.

#### **4. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE ADNc PREQUÍSTICOS CON LA SONDA B4/Q**

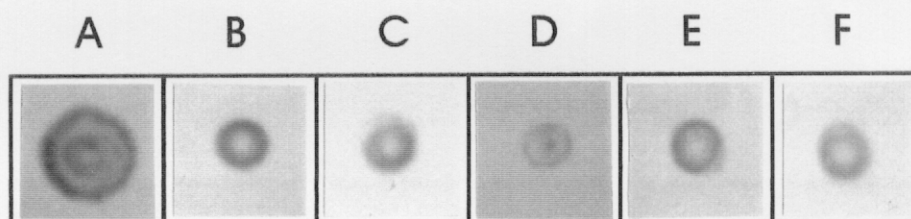
Una vez realizada la hibridación de la sonda B4/Q sobre diferentes muestras de ADNc (Figura 34), se apreció que la señal de hibridación positiva en prequísticos fue más intensa sobre la muestra de ADNc de 18 horas que sobre la de 12 horas. Ésta fue la razón de que se eligiera la genoteca de ADNc de 18 horas para utilizar el fragmento B4/Q como sonda, con la finalidad de buscar el gen completo o un fragmento mayor del mismo. El análisis de la genoteca ADNc-18h se realizó a partir de los clones aislados (halos claros) de las placas de agar (un total de 543 clones). La estrategia seguida en el análisis de la genoteca ADNc-18h se esquematiza en la figura 35.

La mayor parte de los clones recombinantes se analizaron por hibridación directa sobre filtros de nylon conteniendo alícuotas de 15  $\mu$ l de los clones aislados. Este volumen representa, por mancha o muestra de ADN sobre el filtro, una cantidad que podría oscilar entre  $10^5$  y  $10^7$  ufp.

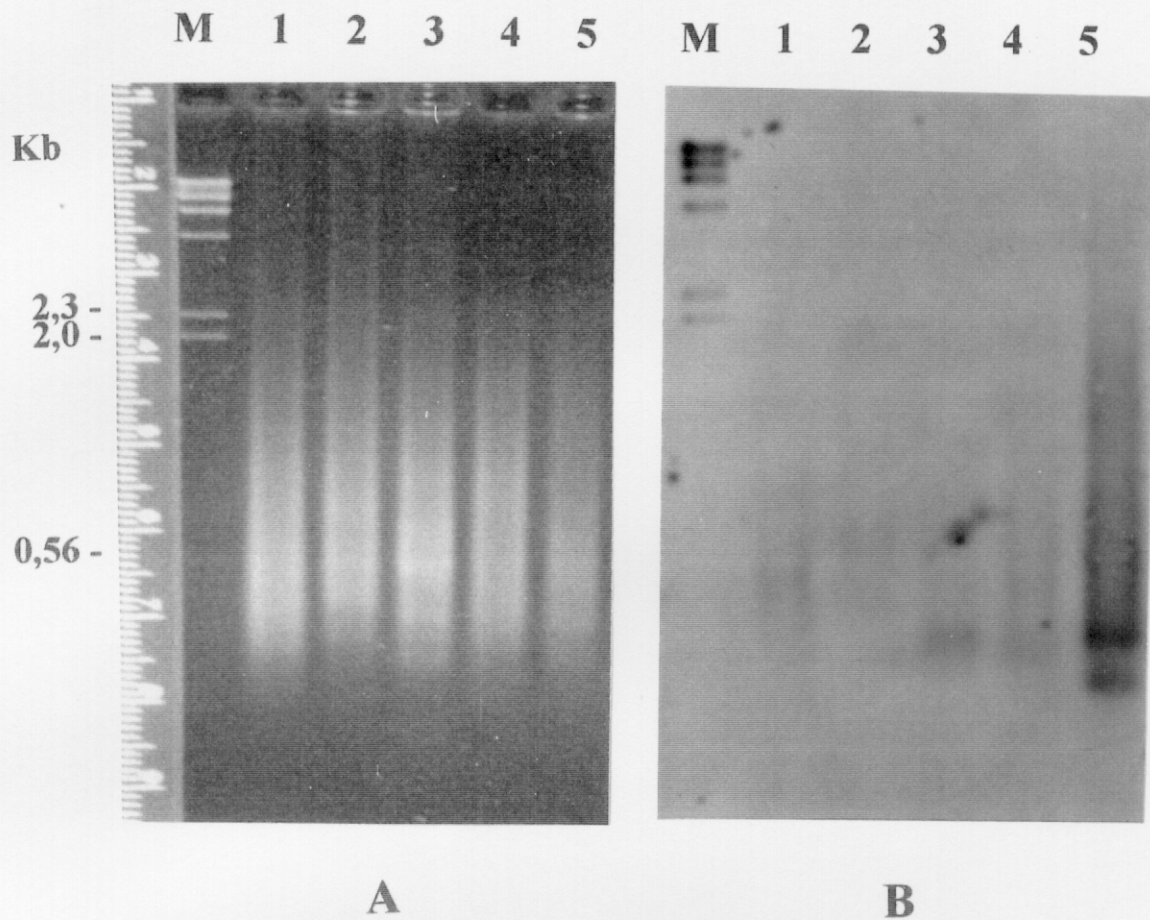
De este modo se analizaron 447 clones, de los que 84 se consideraron con respuesta positiva (fuerte señal de hibridación) frente a la sonda B4/Q, lo que representa el 19% del total de población analizada (Figura 35-I).



**Figura 32:** Quimioluminograma (*dot blot*) obtenido de la hibridación de diferentes poblaciones de ADNc con la sonda B4/Q. Cada muestra representa 5 $\mu$ g de ADN. **A:** Sonda B4/Q no marcada o control positivo; **B:** ADNc-vegetativos; **C:** ADNc-prequisticos 12h; **D:** ADNc-prequisticos 18h; **E:** ADNc-prequisticos 24h; **F:** ADNc-quistes.



**Figura 33:** Quimioluminograma (*dot blot*) obtenido de la hibridación de diferentes poblaciones de ADNc con la sonda B3/Q/B. Cada muestra representa 5 $\mu$ g de ADN. **A:** Sonda B3/Q/B no marcada o control positivo; **B:** ADNc-vegetativos; **C:** ADNc-prequisticos 12h; **D:** ADNc-prequisticos 18h; **E:** ADNc-prequisticos 24h; **F:** ADNc-quistes.



**Figura 34. A:** Patrones obtenidos de la amplificación de las poblaciones de ADNc unidas al adaptador EcoRI y amplificadas con el cebador EO3. **M:** Marcadores de tamaño molecular con digoxigenina. **Carril 1:** ADNc-vegetativos (27  $\mu\text{g}$ ); **Carril 2:** ADNc-12h (33  $\mu\text{g}$ ); **Carril 3:** ADNc-18h (35,5  $\mu\text{g}$ ); **Carril 4:** ADNc-24h (33,4  $\mu\text{g}$ ); **Carril 5:** ADNc-quistes (32  $\mu\text{g}$ ). **B:** Quimioluminograma de la hibridación del gel de la Figura A con la sonda B4/Q marcada con digoxigenina.

Aunque la hibridación de la sonda B4/Q con la población de ADNc-18h (Figura 34) indica que el fragmento de ADNc que hibrida con la sonda es bastante abundante en dicha población, el porcentaje inicial de clones positivos resultó anormalmente alto. Ante la posibilidad de que se tratara de falsos positivos [se ha estimado que en EMBL3 la proporción de falsos positivos varía entre el 10 y el 50% (PORTEUS, 1986)] se procedió a aislar el ADN vírico, con la finalidad de hibridar directamente el inserto con la sonda B4/Q, una vez liberado del vector.

El aislamiento del ADN de las partículas víricas se realizó por dos métodos diferentes (apdo. 12.6 de Materiales y Métodos) con objeto de minimizar los frecuentes problemas de digestión con enzimas de restricción (GOUELI & AHMED, 1991), pero en ambos casos el ADN aislado de los clones positivos fue resistente a la digestión con la enzima de restricción EcoRI, por lo que el fragmento de ADN heterólogo no se pudo recuperar aislado (Figura 35-III).

El fragmento clonado se intentó aislar entonces por PCR empleando cebadores universales para  $\lambda$ gt10 (apdo. 13.5. de Materiales y Métodos). La amplificación se realizó directamente a partir de los halos de lisis aislados (halos claros) y mantenidos en tampón SM (Figura 35-VI) o de clones considerados como positivos después de la hibridación con B4/Q (Figura 35-V).

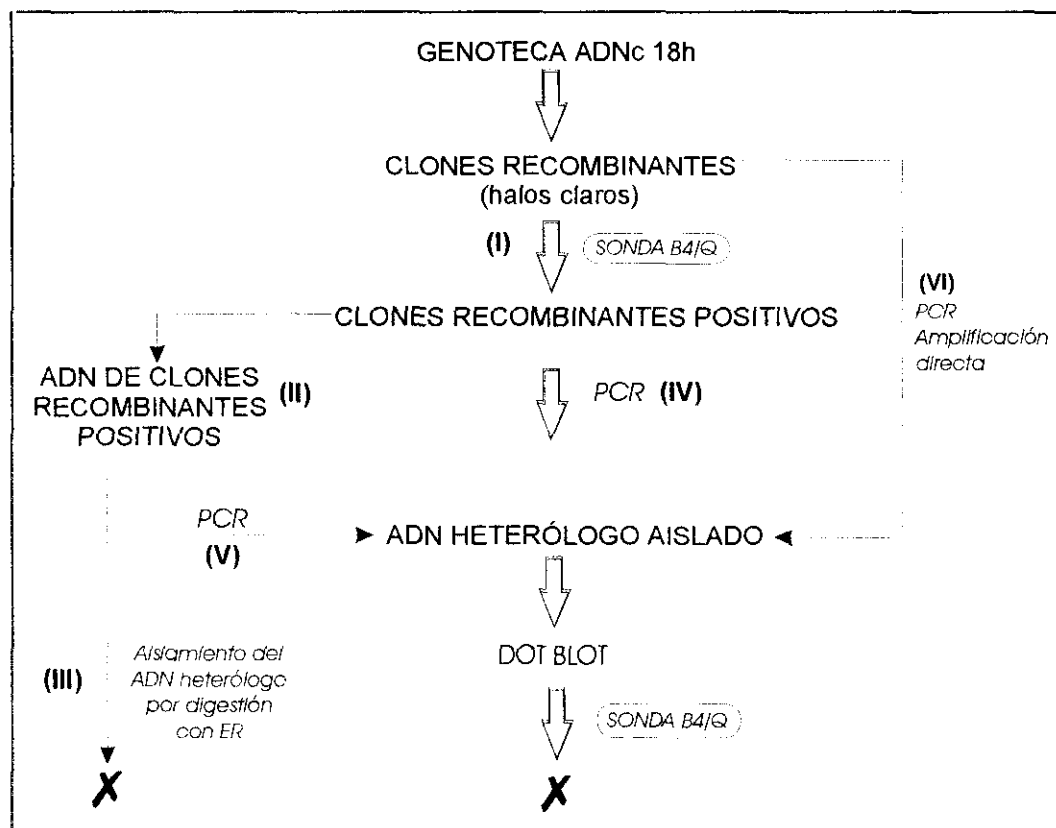
Los resultados de la amplificación fueron similares (Figura 36) tanto cuando ésta se realizó directamente con virus intactos como cuando se emplearon algunos agentes desnaturalizantes (DMSO o Nonidet P40), para facilitar la ruptura de la cápsidas, como sugieren algunos autores (HENKEL et al., 1993). En la figura 36 se muestra la banda amplificada (700 pb) (en presencia y ausencia de dichos agentes desnaturalizantes) correspondiente al fragmento de ADN heterólogo del clon recombinante 12D10.

En ocasiones, la recuperación del inserto por PCR directo a partir de partículas víricas completas no rendían ningún producto. Ante la sospecha de que existiese algún elemento presente en la suspensión de fagos que pudiera interferir en la amplificación, ésta se realizó entonces a partir del ADN aislado de los clones positivos de lambda (Figura 35-V). Pero los resultados fueron siempre idénticos a los que se obtenían a partir de las amplificaciones usando las partículas víricas completas; cuando la amplificación directa no rendía ningún fragmento en un clon determinado, tampoco se obtenía nada si se realizaba a partir de ADN aislado de ese mismo clon.

Se intentó comprobar la ausencia o presencia del inserto mediante digestiones enzimáticas con EcoRI de los clones en los que no ocurría amplificación, pero como hemos indicado anteriormente, el ADN aislado por cualquiera de los dos métodos utilizados fue siempre resistente a la digestión.

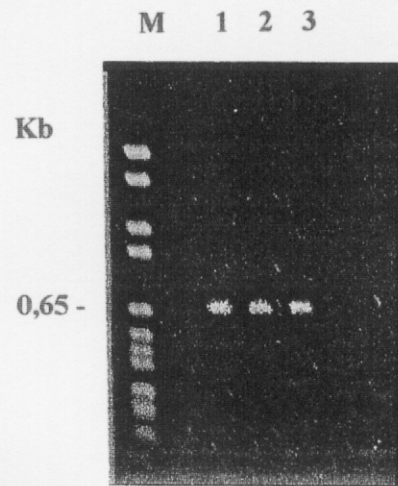
La recuperación de los fragmentos clonados, por amplificación directa, sólo se consiguió en 9 de los 84 clones seleccionados previamente como positivos, lo que representa el 10,7%. En el resto de los clones aislados (89,3%) la amplificación (directa o a partir de ADN viral aislado) no dio origen a ningún fragmento.

El análisis de los 96 clones restantes (una vez analizados 447 por hibridación directa sobre los filtros de nylon, de un total de 543 clones) se realizó únicamente por PCR directo a partir de los halos de lisis. En este caso sólo se obtuvieron 4 clones con inserto, que representa un porcentaje aún más bajo (4%).

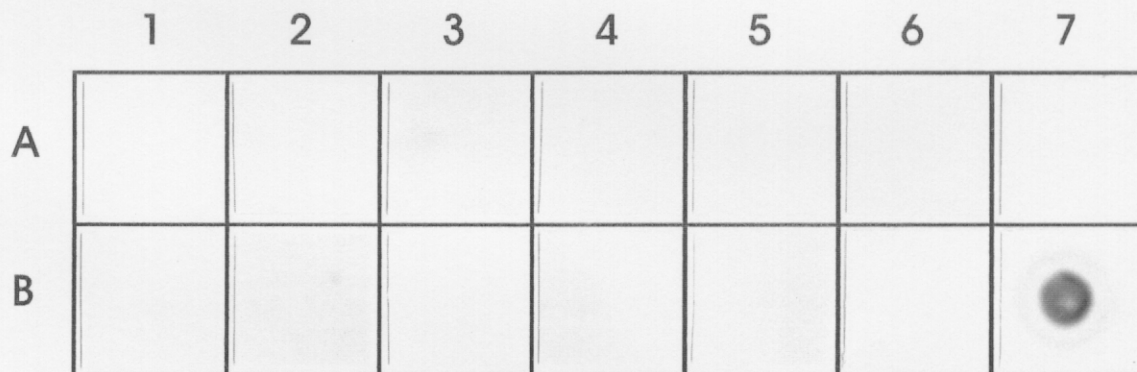


**Figura 35:** Estrategia empleada en el análisis de la genoteca de ADNc-18 h en  $\lambda$ gt10 con la sonda B4/Q.

- (I):** Cribado por hibridación con la sonda B4/Q de los halos de lisis aislados.
- (II):** Aislamiento del ADN de los clones recombinantes positivos obtenidos con la sonda B4/Q.
- (III):** Recuperación por digestión enzimática de los insertos de clones recombinantes positivos, obtenidos en el cribado con la sonda B4/Q.
- (IV):** Obtención por PCR de los insertos de los clones recombinantes positivos obtenidos del cribado con la sonda B4/Q.
- (V):** Obtención por PCR de los insertos a partir de ADN aislado de los clones recombinantes positivos obtenidos del cribado con la sonda B4/Q.
- (VI):** Obtención por PCR de los insertos, a partir de los clones recombinantes.



**Figura 36:** Productos de amplificación del clon 12D10, procedente de la genoteca  $\lambda$ -ADNc-18h, que mostró hibridación positiva en el cribado con la sonda B4/Q (agarosa al 1%). **M:** Marcadores de tamaño. **Carril 1:** Amplificación directa por PCR. **Carril 2:** Amplificación en presencia de DMSO al 6% (v/v). **Carril 3:** Amplificación en presencia de Nonidet P40 al 0,3% (v/v).



**Figura 37:** Quimioluminograma obtenido de la hibridación de los 13 insertos aislados de la genoteca  $\lambda$ -ADNc-18h con la sonda B4/Q. Cada muestra representa 5  $\mu$ g de ADN. **A1:** Clon 12C1; **A2:** Clon 12D1; **A3:** Clon 12D10; **A4:** Clon 12D11; **A5:** Clon 12F10; **A6:** Clon 12G11; **A7:** Clon 13C5; **B1:** Clon 13F6; **B1:** Clon 13F6; **B2:** Clon 15A2; **B3:** Clon 15D7; **B4:** Clon 15F7; **B5:** Clon 15G5; **B6:** Clon 16H2; **B7:** Sonda B4/Q no marcada, utilizada como control positivo.

De este modo fueron 13 los clones con fragmento de ADN heterólogo recuperable: 9 clones que previamente mostraron hibridación positiva (12C1, 12D1, 12D10, 12D11, 12F10, 12G11, 13C5, 13F6 y 16H2), y 4 clones (15A2, 15D7, 15F7 y 15G5) que fueron elegidos, únicamente, por la presencia de inserto, puesta de manifiesto con la amplificación, aunque no habían sido hibridados previamente con la sonda B4/Q.

La hibridación de estos 13 fragmentos aislados con la sonda B4/Q no mostró ningún tipo de señal positiva (Figura 37). Por tanto, al menos en el caso de los clones previamente hibridados (19% considerados positivos), se trataba de falsos positivos, fenómeno frecuente en el análisis de genotecas de lambda.

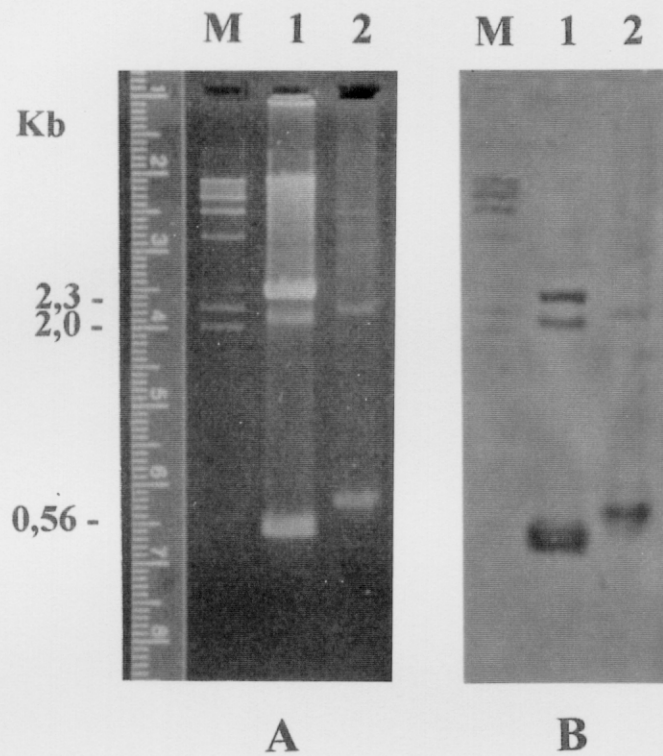
## **5. CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE UN FRAGMENTO (B4/QA) DE LA SONDA B4/Q**

Ante los resultados negativos obtenidos tras el análisis de parte de la genoteca de ADNc-18h con la sonda B4/Q y ya que dicha sonda, compuesta por varios fragmentos, constituía parte del gen que nos interesaba estudiar, decidimos analizar su secuencia. La población de fragmentos se preparó para su clonación en el vector pUC18, según se describe en el apartado 11 de Materiales y Métodos. La clonación en este caso se realizó con adaptadores BamHI/NotI, que mejoran la eficiencia de clonación respecto a la clonación de ADN con extremos romos.

El análisis de las colonias blancas se realizó tanto por digestión enzimática con BamHI como por PCR, empleando cebadores universales de pUC/M13 (apdo. 13.5 de Materiales y Métodos). Se seleccionó uno de los clones que contenía un fragmento de aproximadamente 550 pb, coincidiendo con el tamaño del fragmento mayoritario de la sonda B4/Q. El inserto (que denominaremos B4/QA) fue recuperado tanto por digestión enzimática con BamHI (Figura 38A, carril 1) como por amplificación, aunque en este caso el inserto presentaba un tamaño ligeramente superior (650 pb) (Figura 38A, carril 2) al incluir parte del vector, como consecuencia de los cebadores utilizados para su amplificación. En la parte superior del gel se observa tanto vector no digerido como productos de digestiones parciales. En el quimioluminograma de la figura 38B se muestran los resultados de la hibridación (*Southern*) del gel de la figura 38A con la sonda B4/Q, demostrándose que el inserto clonado en pUC18 es reconocido por la sonda.

El ADN plasmídico del clon seleccionado fue extraído utilizando el *kit* comercial Quiagen, obteniéndose de 2 a 4 µg de ADN por mililitro de cultivo, con una pureza de 1,5. El fragmento clonado fue secuenciado por el método de los dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTP), empleando cebadores universales de secuenciación en pUC18 (SAMBROOK et al., 1989).

La secuenciación se realizó en ambas cadenas del inserto, obteniéndose 430 b y 220 b en la cadena complementaria. Ambas secuencias fueron alineadas, encontrándose numerosos huecos o *gaps* en uno de los extremos del inserto, lo que hizo bastante dudosa la secuencia resultante de esta parte extrema del fragmento, obteniéndose finalmente una secuencia fiable de sólo 381 pb (Figura 39).



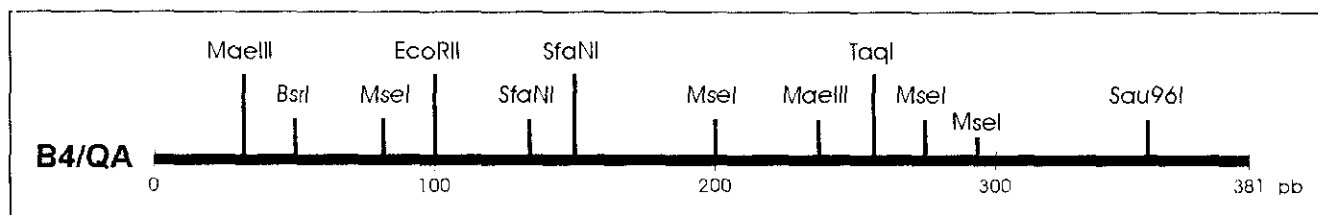
**Figura 38:** Clonación de la sonda B4/Q en pUC18. **M:** Marcadores de tamaño molecular con digoxigenina. **A:** Electroforesis (agarosa 1,5%) del inserto B4/QA liberado del vector pUC18. **Carril 1:** Inserto B4/QA obtenido por digestión enzimática con BamHI. **Carril 2:** Inserto B4/QA obtenido por PCR con cebadores específicos de pUC18. **B:** Quimioluminograma de la hibridación del gel de la figura A con la sonda B4/Q.

```

5'- CCGTTGCTGT CGGACGACAA GAATATGAAG GTTACCAACC ATGATGATGT
AAACCAGTTT GTAAAGAGAG AGCACCTGA AGGTTTTAAA TTGCAACCCC
TGGCGTAAAA CAATTTAGAG TTTTGGAAA CAAGCATCTG TTTTACATAG
CATCATCGTT GCTACGCTCA GTTCAGGTTT TAGTTCAATT TTGGGGCCTT
TAACCTGTTG CTAAAAGGGA AGTAGCGATG TAACAAAATA GGTATATAAT
CAATCGAGGT CGTTAGATAA GAATTTATTT AAACAACATC AATTTTAAAA
TCTACATACA TGACCGTACA GAAGCTGTAC AAAGCATTGC CTTGTTATTA
GGGGGACCAT CGTTGGTAGT TCTGCATTCAT -3'
    
```

**Figura 39:** Secuencia del fragmento B4/QA de 381 pb. procedente de la sonda B4/Q

El mapa de restricción teórico del fragmento B4/QA, deducido a partir de la secuencia nucleotídica se muestra en la figura 40. Dicho fragmento es reconocido por un total de 37 endonucleasas de restricción, de las que sólo se representan en dicha figura aquellas que cortan más frecuentemente el fragmento B4/QA: SfaNI (dos veces), MaeIII (dos veces) y MseI (cuatro veces), mientras el resto (TaqI, EcoRII y Sau96I) cortan una sola vez.



**Figura 40:** Mapa de restricción del fragmento B4/QA. deducido a partir de la secuencia nucleotídica

Dado que el análisis de la secuencia mostró un porcentaje de A+T del 62,2%, el hecho de que la enzima MseI corte cuatro veces el fragmento secuenciado, ratifica igualmente la abundancia de pares AT puesto que dicha enzima reconoce la secuencia 5'-TTAA-3'.

El análisis de la secuencia, igualmente, nos proporcionó los posibles marcos de lectura que se pueden establecer en la misma: tres posibles en el sentido 5'-3' de una de las cadenas y otros tres en el sentido 5'-3' de la cadena complementaria, ya que el fragmento clonado podría estar inserto en el

vector en cualquiera de los dos sentidos. De estos seis posibles marcos de lectura de la secuencia nucleotídica, se eligieron dos como los más plausibles, en función de la aparición de tripletes de final de lectura, encontrándose ambos en la misma cadena de ADNc (Figura 41). El primer marco de lectura a considerar comienza en el segundo nucleótido, siendo el primer codón de la secuencia el triplete CGT (Figura 41A), mientras que el segundo marco de lectura viable comienza en el primer nucleótido, siendo el primer codón de la secuencia el triplete CCG (Figura 41B).

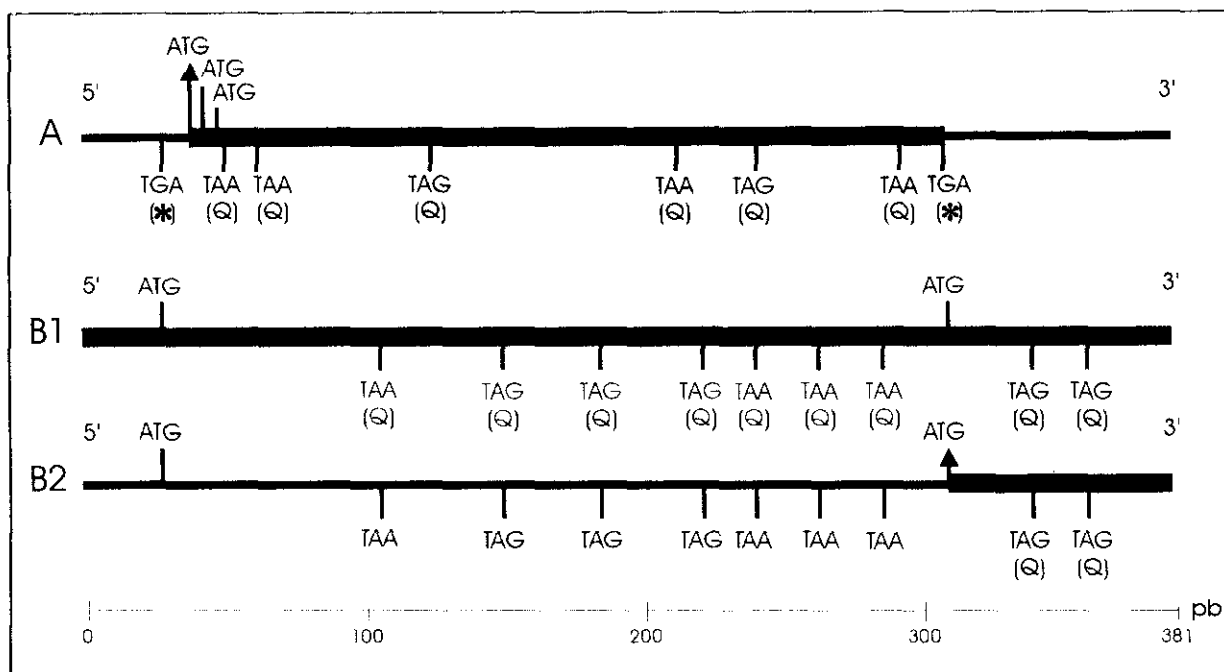
Con respecto al primer marco de lectura posible (Figura 41A), encontramos dos tripletes TGA de final de lectura, ya que los seis tripletes restantes (dos TAG y cuatro TAA), que podrían igualmente ser final de lectura, los consideramos codificantes para glutamina, como sucede en la mayoría de los ciliados estudiados (PRESCOTT, 1994). La secuencia codificante de 273 pb, con un porcentaje A+T de 66,3%, se extendería desde el nucleótido 41 hasta el 310, donde aparece el segundo triplete TGA de final de lectura (Figura 42). En la secuencia existe un primer triplete TGA dentro del mismo marco de lectura, localizado 15 bases antes del primer codón de inicio (ATG de la secuencia codificante). Igualmente, destacamos la secuencia 5'-CCAACCATGA-3', al ser bastante similar a la secuencia consenso propuesta para el inicio de traducción en eucariotas (KOZAK, 1986). El polipéptido resultante de la secuencia codificante (Figura 42) presenta tres dominios o motivos destacables: una región de posible fosforilación por quinasa-C, localizada a partir del residuo aminoacídico 12 y constituida por tres aminoácidos (TLK), un motivo de N-miristilación a partir del residuo 52 (GLLTCC) y un dominio de posible N-glucosilación, constituido por cuatro aminoácidos (NQSR) localizado a partir del residuo 70 de la secuencia aminoacídica. Por último, hay que destacar igualmente, que según este marco abierto de lectura el polipéptido podría comenzar por tres, dos o un residuo de metionina.

Respecto al segundo marco de lectura (Figura 41B), en el que no se ha encontrado ningún triplete TGA de final de lectura, se pueden considerar dos posibilidades:

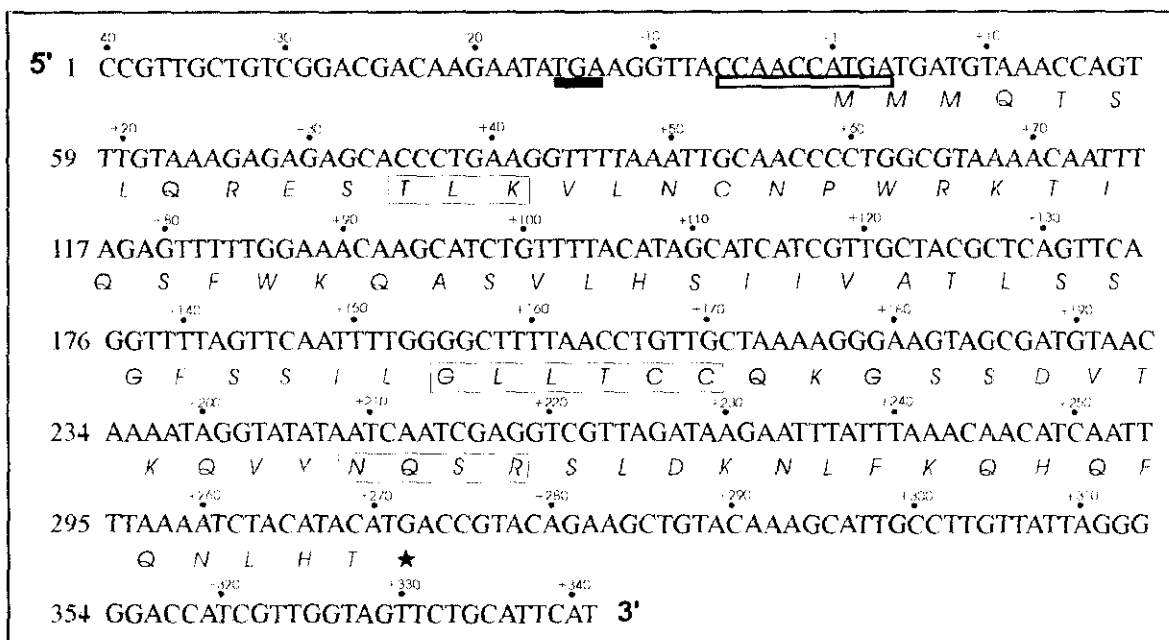
- a) Que todo el marco de lectura sea codificante, y que las dos secuencias ATG detectadas codifiquen para metioninas internas de la secuencia polipeptídica (Figura 41-B1).
- b) Que la secuencia codificante comience en el codón ATG de la posición 310 de la secuencia, y por lo tanto la secuencia codificante sea de 72 pb (Figura 41-B2).

La primera posibilidad rendiría un polipéptido de 127 aminoácidos, cuya secuencia se muestra en la figura 43. Lo único destacable en esta secuencia aminoacídica es la existencia de una región de posible fosforilación por la caseína-quinasa II, constituida por cuatro aminoácidos (TNHD).

La segunda posibilidad (Figura 44) presentaría una región no codificante (a partir del extremo 5') de 309 pb, con un porcentaje A+T de 64%. La región codificante de este fragmento presentaría un marco abierto de lectura de 72 pb, que codificaría para un polipéptido de 24 aminoácidos, con un porcentaje A+T de 54,2%. En la región considerada como no codificante se observan tres repeticiones invertidas localizadas en las posiciones -230 a -192 (con una repetición de 6 b), -187 a -160 (con una repetición de 5 b) y -117 a -89 (con una repetición de 6 b). Un esquema de estas horquillas se muestra en la figura 45. La mayor parte de la secuencia que se autoaparea en las horquillas está constituida por pares AT.



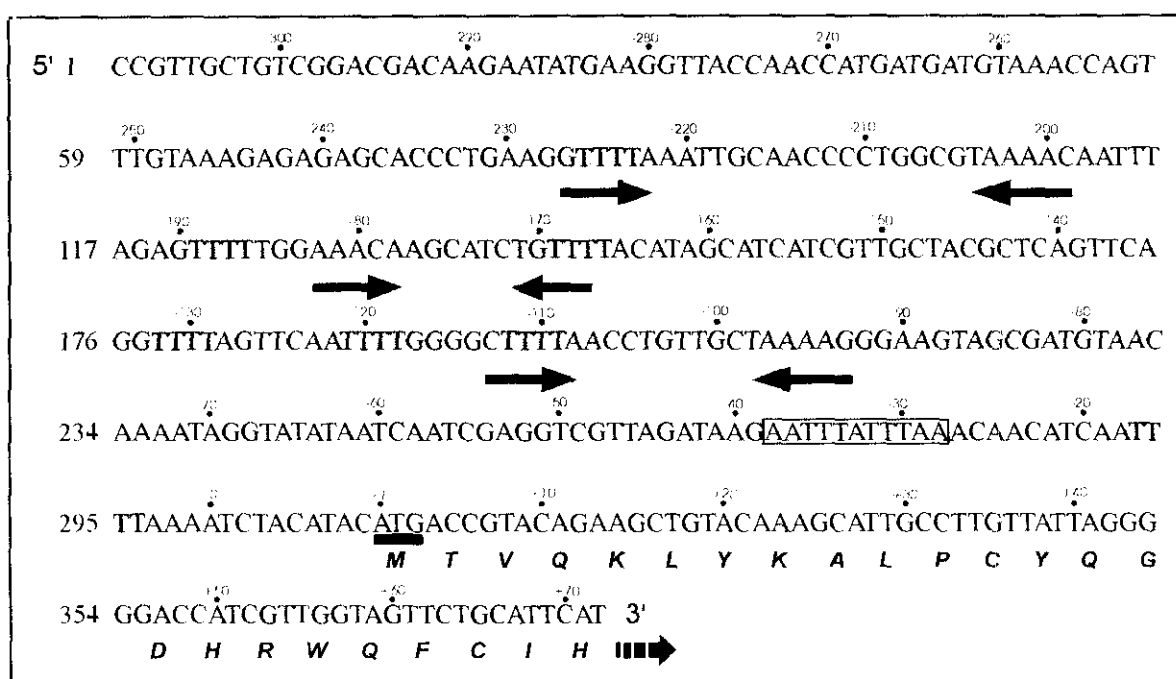
**Figura 41:** Esquema que representa los dos marcos de lectura considerados (A y B) junto con las dos posibles interpretaciones de uno de ellos (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>). La figura A muestra una región codificante de 273 pb que comienza en el primer ATG, conteniendo cuatro codones TAA y dos TAG que los consideramos codificantes para glutamina (Q). La figura B constituye un segundo marco de lectura con dos posibles interpretaciones: **B1**= toda la secuencia constituye una región codificante (381 pb) sin ningún codón de fin de lectura (TGA). **B2**= la secuencia constaría de una zona 5' no codificante de 309 pb, y una secuencia codificante de 72 pb que comienza en el segundo ATG y que contiene dos codones TAG.



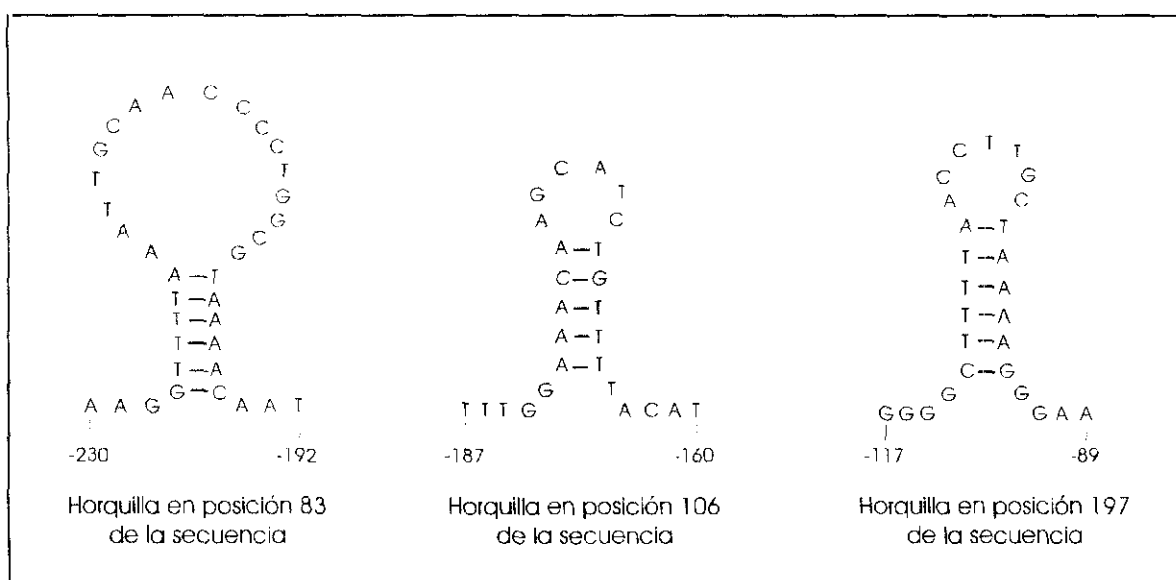
**Figura 42:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica del primer marco de lectura considerado, que contiene una secuencia codificante de 273 pb y 90 aminoácidos. En la región 5' no codificante existe un triplete TGA en el mismo marco de lectura (subrayado con una banda negra) y una secuencia semejante a la secuencia consenso descrita por Kozak (1986), como inicio de traducción en eucariotas (subrayada con una banda blanca). El símbolo (★) localiza el codón de final de lectura (TGA). Los aminoácidos enmarcados representan posibles dominos o motivos: TLK, motivo de fosforilación por quinasa-C; GLLTCC, motivo de N-miristilación, y NQSR, motivo de N-glucosilación.

5' 1	CCGTTGCTGTCGGACGACAAGAATATGAAGGTTACCAACCATGATGATGTAAACCAGT
	P L L S D D K N M K V <u>T N H D</u> D V N Q
59	TTGTAAAGAGAGAGACACCCTGAAGGTTTTAAATTGCAACCCCTGGCGTAAAACAATTT
	F V K R E H P E G F K L Q P L A Q N N L
117	AGAGTTTTTGGAAACAAGCATCTGTTTTACATAGCATCATCGTTGCTACGCTCAGTTCA
	E F L E T S I C F T Q H H R C Y A Q F
176	GGTTTTAGTTCAATTTTGGGGCTTTTAACCTGTTGCTAAAAGGGAAGTAGCGATGTAAC
	R F Q F N F G A F N L L L K G K Q R C N
234	AAAATAGGTATATAATCAATCGAGGTCGTTAGATAAGAATTTATTTAAACAACATCAATT
	K I G I Q S I E V V R Q E F I Q T T S I
295	TTAAAATCTACATACATGACCGTACAGAAGCTGTACAAAGCATTGCCTTGTTATTAGGG
	L K S T Y M T V Q K L Y K A L P C Y Q G
354	GGACCATCGTTGGTAGTTCTGCATTCAT 3'
	D H R W Q F C I H

**Figura 43:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica del segundo marco de lectura (B1), que considera que toda la secuencia es codificante. Los aminoácidos enmarcados (TNHD) representan un posible motivo de fosforilación por caseín-quinasa-II.



**Figura 44:** Secuencia nucleotídica y aminoacídica del segundo marco de lectura (interpretación B2) que consideran una región codificante de 72 pb y 24 aminoácidos. En la región 5' no codificante (309 pb) se distinguen siete secuencias TTTT (ver texto), sombreadas en gris, una secuencia palindrónica (enmarcada) y seis repeticiones invertidas (indicadas con flechas), que podrían dar lugar a la aparición de tres horquillas. El triplete ATG de inicio se encuentra subrayado con una banda negra.



**Figura 45:** Detalle de las horquillas encontradas en la región 5' no codificante del fragmento B4/QA

## ***DISCUSIÓN***

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo representa diferentes aproximaciones moleculares para la búsqueda de una sonda específica del proceso de enquistamiento en el ciliado *Colpoda inflata*.

Como ya se ha expresado en la introducción de esta Tesis, en ciliados no se ha identificado hasta ahora ningún gen relacionado con este proceso de diferenciación celular denominado enquistamiento. Sí se han identificado, en cambio, algunos genes relacionados con procesos similares de diferenciación celular, tanto en microorganismos eucariotas como procariotas, tales como el proceso de esferulación en *Physarum* (BERNIER et al., 1987), genes específicos de esporulación en *Dictyostelium discoideum* (DOWDS & LOOMIS, 1984; JULIEN et al., 1982; 1984; SINGLETON et al., 1988), así como muchos genes estructurales y/o reguladores de la expresión génica en la esporulación de *Bacillus subtilis* (ERRINGTON, 1993).

En ciliados el gran desconocimiento sobre este tema es reflejo, probablemente, del escaso número de trabajos que existen sobre identificación y caracterización de proteínas relacionadas con el proceso de enquistamiento. Por ello, nos parece útil comentar, a continuación, el contenido de los más relevantes.

MATSUSAKA y HONGO (1984) han identificado, por análisis electroforético, dos bandas polipeptídicas de alto peso molecular [140 y 190 KD, esta última PAS (Periodic Acid Schiff) positiva] específicas de pared quística de *Histiculus muscorum*, aunque se han descrito además otras seis bandas de bajo peso molecular que podrían también formar parte de la pared de estos quistes.

En otro ciliado hipotrico, *Paraurostyla* sp. (RÍOS et al., 1989), se han identificado al menos 15 proteínas diferentes (algunas glucosiladas) específicas de pared quística, aunque sólo cuatro de estos polipéptidos de bajo peso molecular representan el 70% de las proteínas de la pared quística. Posteriormente, el empleo de un antisuero policlonal contra algunas de estas bandas polipeptídicas ha permitido su localización en el ectoquiste y endoquiste por inmunocitoquímica a microscopía óptica (RÍOS et al., 1992).

En *Colpoda inflata* (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991b) el empleo de un antisuero policlonal contra paredes quísticas completas aisladas permitió identificar tres principales bandas polipeptídicas de 61, 66 y 70 KD. El análisis inmunocitoquímico a microscopía electrónica de transmisión, empleando dicho antisuero, indicó la presencia de proteínas que reaccionan con este antisuero en las dos envueltas (ectoquiste y endoquiste) de la pared quística de este ciliado.

Por el contrario, no existen aún datos moleculares sobre la aparición de nuevos transcritos durante el proceso de enquistamiento en ciliados o sobre la expresión génica involucrada en el mismo, y los escasos datos de que disponemos sobre actividades transcripcionales en el enquistamiento se basan en estudios fisiológicos. En ciliados, en general, se sabe que el proceso de enquistamiento es dependiente de síntesis de ARN y proteínas (Tabla II), ya que el empleo de inhibidores de ambos procesos, aplicados durante las primeras horas del proceso de enquistamiento, conduce a la muerte de las células, al impedir la formación del estado diferenciado o quiste de resistencia.

Una de las posibles razones que podría explicar la falta de datos moleculares en protozoos, puede ser la ausencia de un método generalizado de inducción sincrónica del enquistamiento. A

diferencia de la esporulación en microorganismos eucariotas como *Aspergillus* (TIMBELAKE, 1980), *Physarum* (SAUER et al., 1969), *Blastocladiella* (JAWORSKI, 1976) o *Dictyostelium* (RAMAGOPAL & ENNIS, 1981) donde este proceso es bastante rápido y sincrónico, en amebas, y sobre todo en ciliados, el enquistamiento es generalmente bastante asincrónico. A pesar de ello se ha logrado inducir enquistamiento sincrónico en algunos ciliados hipotricos (DALLAI, 1987; MATSUSAKA, 1977; RÍOS et al., 1989; YONEZAWA, 1985a) y en algunas amebas (CHAGLA & GRIFFITHS, 1978; LASMAN & SHAFRAN, 1978) sin que ello haya supuesto un avance en la resolución de los aspectos moleculares del enquistamiento.

Otro problema que dificulta, la realización de una posible genética inversa, especialmente en Colpódidos, es la difícil solubilización de los componentes moleculares de las paredes quísticas (TIBBS, 1982). Esta cuestión se comentará posteriormente, en relación con la obtención de una sonda específica de enquistamiento.

Por tanto, según lo expuesto hasta ahora, podemos decir que la ausencia de datos moleculares sobre el enquistamiento, junto con los problemas antes citados, dificulta la obtención de una sonda adecuada y específica de enquistamiento en Colpódidos. Por ello, el trabajo que se presenta aquí ha constituido una búsqueda de posibles estrategias para la obtención de sondas génicas específicas, involucradas en el enquistamiento. El esquema de la figura 46 se simplifican las diferentes aproximaciones moleculares que hemos empleado en la búsqueda de dichas sondas o genes involucrados en el enquistamiento de *Colpoda inflata*.

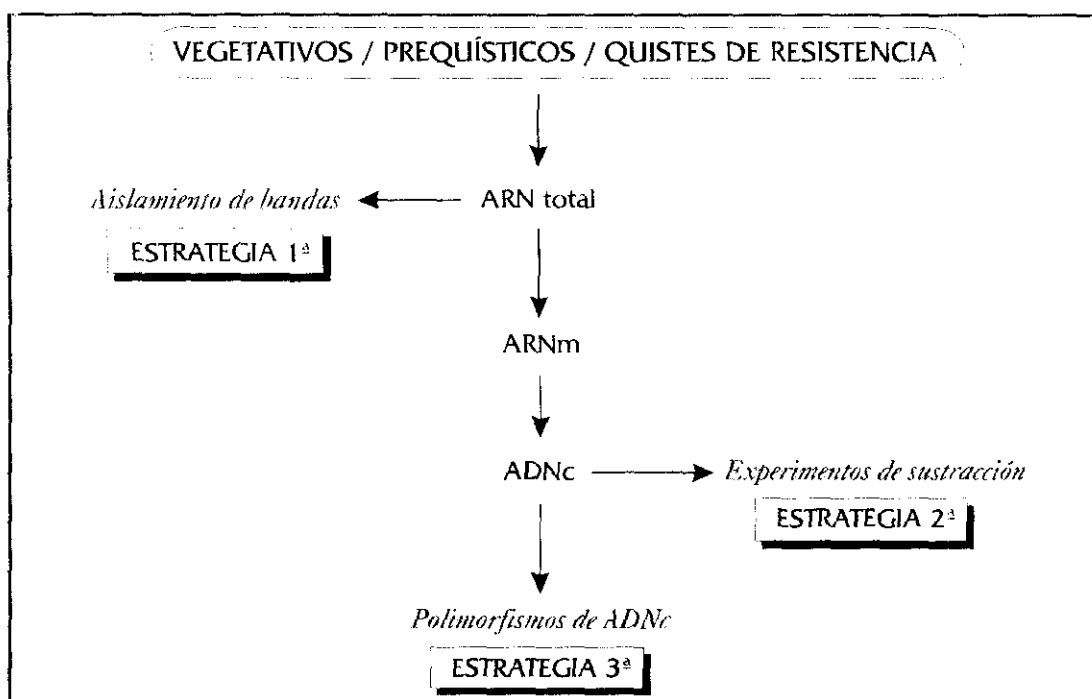


Figura 47: Esquema simplificado de las estrategias moleculares utilizadas en la búsqueda de sondas específicas de enquistamiento

## 2. ANÁLISIS DE ARN TOTAL Y POLIADENILADO DURANTE EL ENQUISTAMIENTO

Las etapas elegidas para los aislamientos, tanto de las muestras de ARN total como de ARN poliadenilado, fueron dos estados diferenciados del ciclo (células vegetativas y quistes de resistencia), y cuatro etapas prequísticas diferentes (prequísticos de 12h, 18h, 24h y 72h). Estos tiempos fueron elegidos en función de la cinética de enquistamiento de *C. inflata*, estudiada por técnicas de inmunofluorescencia (BENÍTEZ et al., 1994). La estimación de la duración total del proceso de enquistamiento es de aproximadamente 200 horas, por lo que para asegurarnos de la obtención de muestras de ARN de quistes maduros, hemos utilizado cultivos de aproximadamente un mes desde la inducción de enquistamiento.

Como ya se ha descrito, se emplearon dos métodos diferentes para el aislamiento de ARN total: método de tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987) y el de precipitación con cloruro de litio (CATHALA et al., 1983). Las muestras obtenidas en las extracciones de ARN con el método de CHOMCZYNSKI y SACCHI presentaron menor pureza (valor medio 1,3, Tabla XIII), lo que indica una mayor contaminación con proteínas que podría deberse a la existencia de un único paso de purificación fenol/cloroformo, que además se lleva a cabo únicamente en la primera parte del protocolo, y que no se repite posteriormente. En cambio, en el método de extracción basado en el LiCl, existen cuatro pasos de purificación (dos en fenol/cloroformo y dos en cloroformo) en la penúltima etapa del proceso, lo que permite obtener una relación  $A_{260}/A_{280}$  más próxima a 2, aunque, por el contrario, representa también una mayor pérdida de muestra y por consiguiente un menor rendimiento.

El aislamiento de ARN total por el método del LiCl permite la recuperación de ARNm intactos, e incluso de precursores de hasta 10 Kb de longitud, aunque en ocasiones pueden perderse ARN de pequeño tamaño (CATHALA et al., 1983). En nuestro caso estas posibles pérdidas no resultaban importantes, ya que nuestro interés se centraba en transcritos de mayor tamaño, por lo que el análisis de los patrones de ARN total durante el enquistamiento de *C. inflata* se realizó utilizando ambos tipos de extracciones.

El patrón electroforético de las diferentes muestras de ARN total mostró la presencia de dos bandas de ARN muy intensas, situadas debajo de las bandas de ARNr que aparecen en todas las muestras prequísticas así como en los quistes de resistencia (Figura 4). Pero el patrón observado en la muestras de ARN poli(A)<sup>+</sup> procedente de etapas vegetativas (Figura 6) indica que ambas bandas están presentes también en células que se encuentran en el ciclo crecimiento-división, aunque su abundancia es mucho menor, ya que sólo son visibles, con bromuro de etidio, en muestras purificadas y enriquecidas en ARNm. Podemos considerar dos posibles interpretaciones acerca de la naturaleza de estas bandas de ARN tan abundantes:

- a) podría tratarse de ARN ribosómico, procesado, degradado o alterado durante el proceso de enquistamiento.
- b) podrían ser moléculas de ARNm involucradas en el proceso de enquistamiento.

En relación con la primera de las hipótesis, se puede interpretar como una degradación selectiva de ARNr durante el proceso de enquistamiento, que podría relacionarse con la disminución de los niveles celulares netos de ARN que ha sido detectada en algunos ciliados como *Histiculus muscorum* (SENDO & MATSUSAKA, 1982) y *Colpoda steinii* (TIBBS & MARSHALL, 1970), así como en *Acanthamoeba* (STEVENS & PACHLER, 1973).

A pesar de que durante el enquistamiento de *Colpoda inflata* puede existir un mecanismo de degradación selectiva para el ARNr 26S/28S, los resultados obtenidos cuando se utilizó la sonda ribosómica heteróloga procedente de *Euplotes crassus* (sonda que contiene el extremo 3' del ARNr 17S/18S y la secuencia completa del ARNr 26S/28S) parecen descartar esta posibilidad. La sonda utilizada, aunque heteróloga, hibrida con las dos bandas de ARNr (Figura 5B), pero no se detecta hibridación en ninguna de las dos bandas indicadas (15A y 15B), por lo que resulta difícil pensar que dichas bandas representen productos de degradación del ARNr 26S/28S. La hibridación con la sonda homóloga de ARNr (fragmento de 555 pb del extremo 5' del ARNr 17S/18S) tampoco hibrida con las bandas de ARN antes citadas (Figura 4C), confirmando igualmente que, al menos, la banda 15B (situada debajo de la subunidad ribosómica menor) no es tampoco un producto de degradación.

En esta segunda hibridación (Figura 4C), se puede apreciar que el marcaje aparece sobre todo en la subunidad menor del ARN ribosómico, aunque se aprecia también hibridación con la banda ARNr 26S/28S. Puesto que la sonda ribosómica utilizada contiene sólo un fragmento del extremo 3' del ARNr 17S/18S, resulta sorprendente la hibridación con la subunidad grande del ARN ribosómico. Estos resultados podrían interpretarse como la consecuencia del arrastre de ARNr 17S/18S durante la electroforesis, ya que la hibridación aparece más como un patrón continuo que como una señal específica a la altura del 26S/28S. Esta hipótesis resulta más plausible que la posible existencia de zonas de homología interna entre la sonda ribosómica utilizada y la subunidad grande, o incluso que la existencia de algún precursor que aparezca durante el procesamiento del ARN ribosómico y que se sitúe a nivel de ARNr 26S/28S.

Se ha detectado también (Figura 4C, carril 1) una banda situada encima del ARNr de la subunidad mayor, presente sólo en muestras de ARN total procedentes de células vegetativas. Esta banda no se ha detectado en el resto de las muestras de ARN prequístico (Figura 4C carriles 2 y 3) y pensamos que podría tratarse de un precursor de ARN ribosómico, quizá ARNr 35S que podría contener los tres ARNr de mayor tamaño, como sucede en *Tetrahymena* (CECH, 1986), aunque la carencia de estudios semejantes en *Colpoda* no nos permite aún caracterizar esta molécula.

En resumen, la ausencia de hibridación de ambas bandas (15A y 15B) con cualquiera de las dos sondas ribosómicas utilizadas (sonda homóloga procedente de *C. inflata* y sonda heteróloga procedente de *E. crassus*) parece descartar la primera de las hipótesis, ya que parece más probable que se trate de ARN no ribosómico.

Según la segunda hipótesis propuesta, es posible que se trate de transcritos poliadenilados, aunque el hecho de su aislamiento a través de una columna oligo(dT) no garantiza que las moléculas se encuentren poliadeniladas, ya que existe una fracción de ARN ribosómico, y por tanto carente de una cola poli(A)<sup>+</sup>, que es también retenido (Figura 6, carril 1). De hecho existen referencias en ciliados (MARTINDALE & BRUNS, 1983; SCHMIDT et al., 1991) que muestran uniones inespecíficas de moléculas

de ARN a la matriz de las columnas de oligo(dT) causada por la presencia de zonas ricas en pares A-T, en lugar de su unión a la cola poliadenilada de los ARNm, lo que confirma el alto contenido A+T en el ADN micro y macronuclear de ciliados (PRESCOTT, 1994).

La aparición de nuevos transcritos durante el enquistamiento estaría en consonancia con los estudios realizados con inhibidores de transcripción, que han puesto de manifiesto que el enquistamiento es dependiente de nueva síntesis de ARN tanto en *Colpoda* (BENÍTEZ, 1990), como en el resto de ciliados estudiados (GIESE, 1973; GUTIÉRREZ, 1981; MATSUSAKA, 1979; MATSUSAKA & KIMURA, 1981; RUHTMAN & KUCK, 1985; YONEZAWA, 1985b).

La presencia de las bandas 15A y 15B en extracciones purificadas y enriquecidas en ARNm procedentes de células vegetativas (Figura 6) podría indicar que dichas moléculas de ARN representan transcritos que, aunque están mayoritariamente presentes durante el proceso de enquistamiento, se sintetizan también durante el ciclo crecimiento-división del ciliado. Se puede especular, por tanto, sobre la existencia de un mecanismo de regulación de la actividad transcripcional, o bien mecanismos de regulación postranscripcionales que favorezcan la acumulación de estos transcritos, como por ejemplo, alteraciones en su tasa de degradación, o mecanismos de estabilización de ARNm.

Así, por ejemplo, durante la diferenciación de *Dictyostelium* (ROWEKAMP & FIRTEL, 1980) se ha descrito un mecanismo de regulación de la actividad transcripcional. En este microorganismo se han localizado transcritos presentes en una copia por célula durante el crecimiento vegetativo, detectándose, en cambio, varios cientos de copias de dichas moléculas durante la fase de preagregación. Pero, como han sugerido KILICK & WRIGHT (1974), aún no se conoce si estos cambios son consecuencia del incremento de la actividad transcripcional o de la disminución de la tasa de degradación debida a mecanismos de estabilización de ARNm.

Estas bandas de ARN (15A y 15B) encontradas en *C. inflata* (probablemente ARNm como ya se ha indicado) aparecen también en el quiste de resistencia maduro (Figura 4B, carril 4). Según se ha expuesto en la introducción (Tabla I) existen numerosas especies de hongos, amebas y algunos ciliados cuyas formas de resistencia (esporas o quistes) contienen algunos ARNm necesarios para la germinación o exquistamiento, que han sido biosintetizados por la célula durante la formación de la espora o quiste. En procariontes ocurre algo similar durante la esporulación, ya que la espora bacteriana de *Bacillus* (MOIR et al., 1994) contiene también ARNm que utilizará durante su germinación.

Los escasos datos de que disponemos hasta ahora (ya que en *Colpoda inflata* no se ha realizado aún ningún estudio con inhibidores metabólicos durante el exquistamiento) no nos permiten afirmar si estas moléculas de ARN (posibles transcritos) contienen información necesaria para el enquistamiento o para el proceso opuesto (exquistamiento), y si estos ARNm detectados durante el enquistamiento son los mismos que se acumulan también en el quiste de resistencia.

El estudio de la cinética del enquistamiento por inmunofluorescencia (BENÍTEZ et al., 1994), empleando un antisuero contra elementos de pared de los quistes de *C. inflata* (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1991b), indican que al comienzo del proceso de enquistamiento (entre 6 y 10 horas después de la inducción del proceso) la célula adquiere la forma esférica, pero aún no ha comenzado a secretar los precursores de pared. Por otra parte, el estudio ultraestructural del enquistamiento en este ciliado (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1994) ha puesto de manifiesto que los precursores de la capa más externa

o ectoquiste (en forma de paquetes fibrilares) surgen en células prequísticas de 8 horas. Posteriormente, estos precursores son secretados para formar el ectoquiste (proceso rápido y uniforme en toda la superficie celular prequística), y la formación de esta capa externa culmina entre 20 y 30 horas después de la inducción del enquistamiento. La secreción de precursores de la capa interna o endoquiste es más tardía, observándose entre 20 y 30 horas después de la inducción (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1994).

De acuerdo con todos estos resultados, es posible que la aparición de nuevos transcritos en la célula prequística (al menos los que codifican para elementos de pared) sea muy temprana, probablemente antes de las 8 primeras horas desde la inducción, aunque no se descarta la aparición posterior de otros ARNm necesarios durante el proceso de diferenciación. De hecho, se ha sugerido (GUTIÉRREZ et al., 1990) que la aparición sucesiva de precursores en el citoplasma prequístico podría estar determinada por una expresión génica igualmente secuencial.

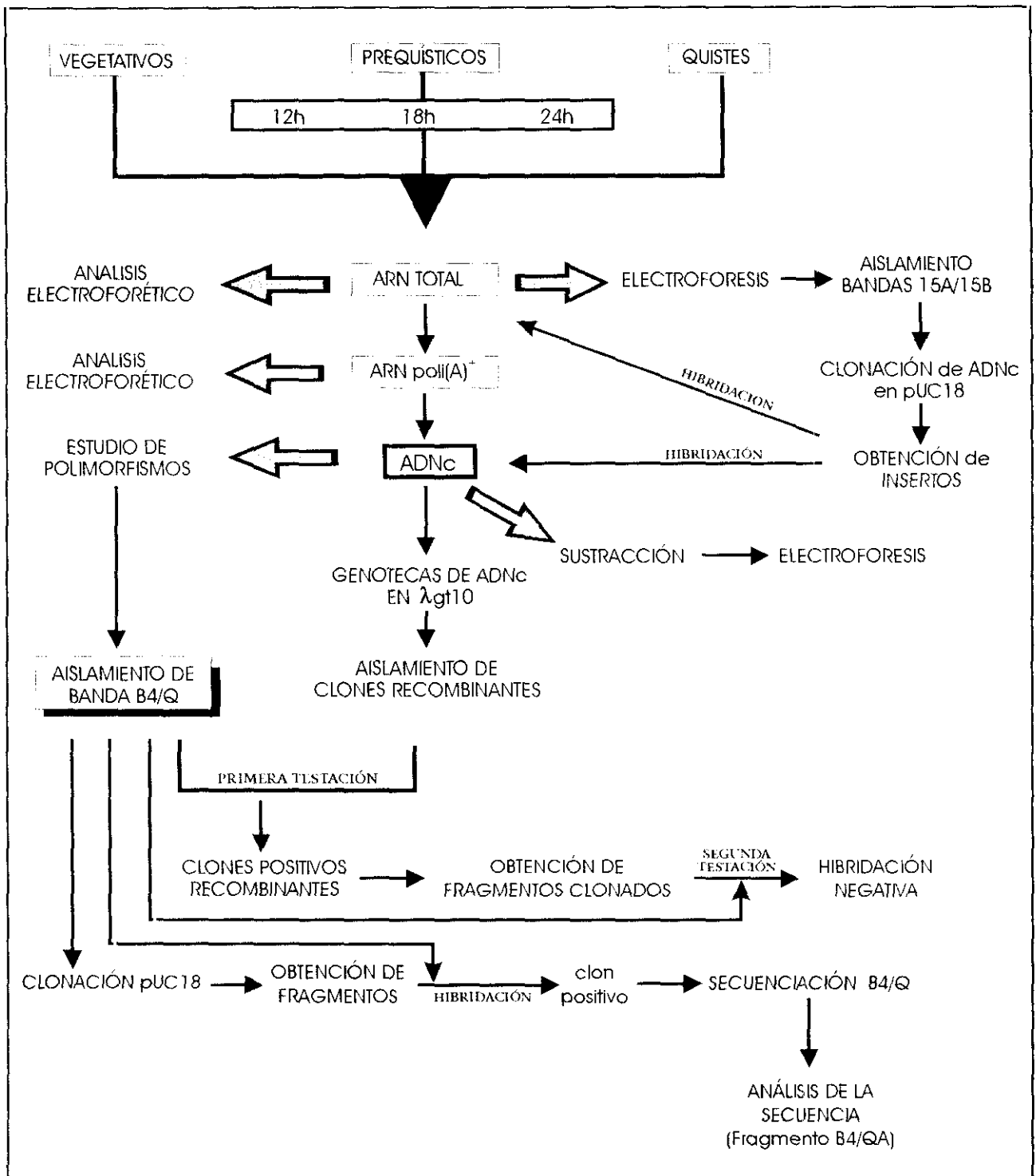
Según todo lo expuesto anteriormente, parece probable que las bandas 15A y 15B, presentes principalmente en muestras procedentes de etapas prequísticas, representen moléculas de ARN poliadeniladas, especialmente abundantes durante etapas tempranas del proceso de diferenciación. Es posible que estos primeros transcritos sean inestables, como sucede durante la diferenciación de *Dictyostelium* (BLUMBERG & LODISH, 1980; MANGIAROTTI et al., 1985; NEVINS, 1983).

De nuestro trabajo no se han desprendido datos suficientes para conocer si estos ARN procedentes de las bandas 15A y 15B son los mismos que se acumulan en los quistes de resistencia, gracias a algún mecanismo de estabilización postranscripcional. Tampoco conocemos hasta cuándo la célula prequística es transcripcionalmente activa, aunque parece lógico pensar que dicho proceso disminuya paulatinamente a lo largo del enquistamiento debido a la progresiva deshidratación que sufre la célula y que probablemente inactiva el metabolismo celular (GUTIÉRREZ et al., 1990).

### **3. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN LA BÚSQUEDA DE SONDAS ESPECÍFICAS DE ENQUISTAMIENTO EN *C. inflata***

Como ya se ha señalado, el principal problema para la búsqueda de genes específicos de enquistamiento es la ausencia de una sonda adecuada, lo que es consecuencia a su vez de una serie de dificultades que comentaremos a continuación.

En primer lugar, los problemas para la solubilización de componentes macromoleculares de pared quística de ciliados han sido ya descritos en la bibliografía (GUTIÉRREZ et al., 1984; RÍOS et al., 1989; TIBBS, 1966; 1982). Por ello la posibilidad de elaboración de sondas oligonucleotídicas a partir de la secuencia aminoacídica de algunas de las proteínas constitutivas de pared, resulta bastante compleja, a diferencia de lo que sucede con proteínas solubles que se liberan al medio, como por ejemplo, las feromonas (MICELI et al., 1989). Igualmente, se podría utilizar una proteína soluble de carácter enzimático involucrada específicamente en el enquistamiento, pero el escasísimo conocimiento actual del metabolismo ligado al enquistamiento hace, de momento, inviable esta aproximación. No obstante, no descartamos aún la posibilidad futura de utilizar una proteína de pared quística como herramienta para llevar a cabo una genética inversa, cuando se logre una adecuada solubilización y liberación de alguna proteína de pared quística en *Colpoda inflata*.



**Figura 47:** Esquema donde se integran las estrategias seguidas y los resultados obtenidos en la búsqueda de posibles genes (sondas) involucradas en el proceso de enquistamiento de *Colpoda inflata*.

La dificultad de utilizar marcaje radiactivo (por falta de permisos e instalaciones adecuadas) nos impidió también realizar experimentos de marcaje *in vivo* que nos permitieran, posteriormente, utilizar sondas de ARN aisladas durante diferentes fases del enquistamiento, estrategia empleada frecuentemente en algunos de los genes caracterizados en procesos de diferenciación en hongos (BERNIER et al., 1986a; DOWDS & LOOMIS, 1984; JACQUET et al., 1981; MANGIAROTTI et al., 1985; PALLOTA et al., 1986; ROWEKAMP & FIRTEL, 1980; WILLIAMS & LLOYD, 1979). Teniendo en cuenta esta serie de limitaciones y problemas, nos propusimos la búsqueda de alguna sonda específica de enquistamiento utilizando tres diferentes estrategias, esquematizadas en la figura 46 y cuyos resultados, que se presentan agrupados en la figura 47, se discutirán a continuación.

### 3.1. Sondas derivadas de bandas de ARN

Esta estrategia fue desarrollada basándonos en la inusual intensidad de las dos bandas de ARN anteriormente citadas (15A y 15B), visibles en electroforesis de agarosa a partir de muestras de ARN total obtenidas de etapas prequísticas (Figura 9).

Una vez aisladas ambas bandas de ARN (15A y 15B), se sintetizaron los híbridos ADNc:ARN para cada una de las muestras. El paso siguiente fue su amplificación por PCR y su clonación en el vector pUC18. Esta clonación se realizó sin adaptadores, es decir, clonación de ADNc con extremos romos. Por esta razón, probablemente, el porcentaje de transformantes fue en ambos casos muy bajo (1,2% y 6% respectivamente).

Después de seleccionar los clones que contenían inserto de ADNc (clones pCIB9 y pCIA18), se marcaron por PCR con digoxigenina para realizar hibridaciones sobre muestras de ARN total aisladas a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento.

Estas hibridaciones (empleando como sondas los insertos B9 y A18 marcados) sobre las muestras de ARN total, extraídas con tiocianato de guanidina/fenol/cloroformo, mostraron señales de hibridación muy débiles en ambos casos (Figuras 14 a 18). Los resultados de las hibridaciones utilizando muestras de ARN total obtenidas por LiCl fueron negativas, aún cuando las cantidades de ARN depositadas sobre los filtros fueron las mismas en ambos métodos.

La extracción de bandas de ARN, presumiblemente específicas de estados diferenciándose, y su posterior clonación, no es un método utilizado frecuentemente ya que, generalmente, resulta difícil la visualización clara de bandas de ARNm tras tinción con EtBr, por lo que la identificación de transcritos específicos suele realizarse empleando un marcaje radiactivo *in vivo* con posterior detección en un autorradiograma a partir de muestras purificadas y enriquecidas en ARNm. Además, otro problema asociado a esta metodología es el escaso rendimiento que se obtiene del aislamiento directo de ARNm a partir de geles de agarosa, así como la obtención de ARNm frecuentemente degradado (WALLACE et al., 1987).

Una posible explicación para la falta de reconocimiento de los fragmentos clonados, utilizados como sondas (B9 y A18), sobre muestras de ARN total podría ser la contaminación con algunas de las bandas de ARNr próximas a las aisladas 15A y 15B, que posteriormente podrían haber sido clonadas en el vector, al presentar homología entre secuencias internas ricas en adenina y el cebador oligo(dT)

utilizado para la síntesis de ADNc. De hecho, se ha descrito la existencia de algunos clones de ADNc "ribosomal" resultantes de la transcripción inversa de ARN ribosomal empleando cebadores oligo(dT), a partir de poblaciones de ARN total utilizadas para la clonación (WILLIAMS & LLOYD, 1979). Sin embargo, la hibridación negativa de estos fragmentos clonados (B9, A18 y A35) (Figura 21) con parte del fragmento del ADNr 17S/18S utilizado como sonda, parece descartar la posible contaminación ribosómica, al menos con parte de la subunidad 17S/18S del ARNr, que hubiera sido más probable para el clon B9, ya que deriva de la banda de ARN más cercana a dicha subunidad de ARNr (banda 15B). No obstante, aún cabe la posibilidad de contaminación con la subunidad mayor de ARNr, cercana a la banda superior de ARN que se ha clonado (15A), aunque no tenemos datos suficientes para comprobar esta hipótesis.

La dificultad de interpretar estos resultados junto con la falta de hibridación sobre filtros conteniendo las poblaciones de ADNc clonadas (Figuras 19 y 20), nos llevó a descartar estos insertos (B9 y A18) como potenciales sondas de enquistamiento.

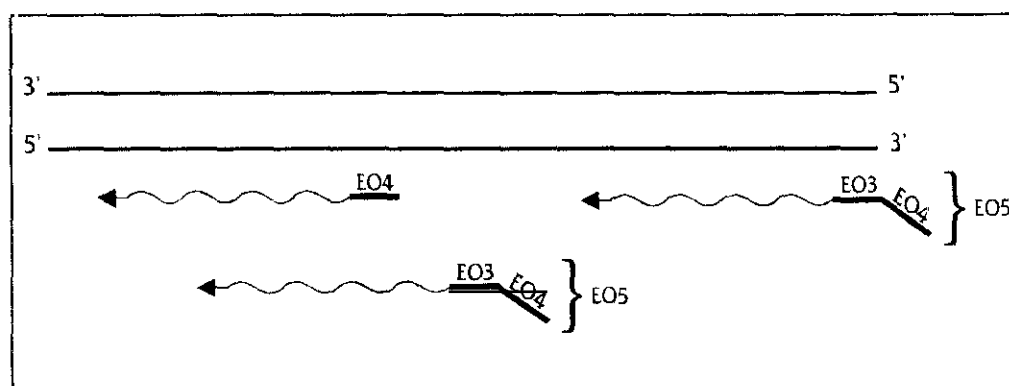
### 3.2. Experimentos de sustracción

La segunda estrategia se basó en experimentos de hibridación sustractiva entre los ADNc sintetizados a partir de poblaciones de ARN poli(A)<sup>+</sup> de células prequísticas de 12 y 18 horas. El objetivo de estos experimentos era la comparación de la homología de ambas poblaciones de ADNc, obtenidas en etapas relativamente tempranas del proceso, donde pensamos que podían encontrarse mayores diferencias entre las poblaciones de ARNm. De este modo podríamos seleccionar moléculas de ADNc específicas de algunas de estas poblaciones prequísticas, eliminando el resto de moléculas homólogas de ambas poblaciones.

Para realizar estos experimentos se partió de poblaciones de ADNc unidas a adaptadores EcoRI, que permite su amplificación por PCR con un cebador específico (EO3) que hibrida con dicho adaptador. Con objeto de obtener suficiente cantidad de ADNc para realizar la sustracción se amplificaron, utilizando el cebador antes citado, cinco alícuotas de cada una de las poblaciones, que después se unieron.

La electroforesis de estas muestras de ADNc amplificadas (Figura 22) presentaba un conjunto de moléculas con un tamaño máximo inusualmente alto en ambas muestras (12 y 18). Una posible interpretación para este hecho podría ser la formación de concatémeros entre las moléculas de ADNc amplificadas (debido a la presencia de extremos protuberantes Eco RI).

Con la finalidad de incrementar la potencial heterogeneidad de una de las poblaciones de ADNc (18 h), se realizó un PCR asimétrico (Figura 23) empleando una mezcla desigual de cebadores (EO4 : EO5 = 9 : 1). El cebador EO5 (5'-EO4+EO3-3') permitiría la amplificación de todas las moléculas de ADNc de dicha población (18 horas), mientras el cebador EO4 (de secuencia arbitraria para estas poblaciones) permitiría la amplificación de algunos fragmentos de dichas moléculas por homología interna (Figura 48).



**Figura 48:** Esquema de amplificación con los cebadores EO4 y EO5

También se podría contemplar la posibilidad de que el fragmento EO3 del EO5, que hibrida con el adaptador *EcoRI*, pudiera encontrar alguna región homóloga interna, como se muestra en el esquema anterior (Figura 48), lo que incrementaría igualmente la heterogeneidad de la población. Esta posibilidad se pudo dilucidar posteriormente al utilizar estos mismos cebadores en el estudio de polimorfismos de las poblaciones de ADNc (sin adaptadores *EcoRI*). Los resultados, que serán discutidos en el siguiente apartado, indican que ambas poblaciones de ADNc (12h y 18h) presentan zonas de homología interna para ambos cebadores (EO4 y EO3), siendo especialmente abundantes las secuencias complementarias al cebador EO4 (Figura 25) dada la aparición de un gran número de bandas.

Es importante indicar que el patrón de polimorfismos con este cebador no genera fragmentos mayores de 2,2 kb o, al menos, no lo hace con el suficiente rendimiento como para ser detectados con EtBr, ya que como algunos autores señalan (BJOURSON et al., 1992), el empleo de grandes fragmentos de ADN (generalmente de tamaño superior a 2 kb) puede incrementar el riesgo de perder regiones no homólogas durante la sustracción. En nuestro caso, la amplificación de las moléculas completas de ADNc se generaría, teóricamente, sólo con los cebadores EO3 y EO5, mientras el empleo del cebador EO4 (y también del cebador EO3), podrían originar fragmentos de tamaño inferior a la longitud completa de las moléculas de ADNc en ambas poblaciones (12h y 18h). No se descarta tampoco la presencia de secuencias internas complementarias al cebador EO5 (EO3+EO4), pero dada la longitud de dicho cebador (33 pb), resulta más improbable.

La posterior amplificación por PCR de cada una de las poblaciones sustraídas (ADNc-18s y ADNc-12s) empleando el cebador EO5 dio origen a un patrón continuo de bandas (Figuras 24A y 24B). Como ya hemos indicado, el cebador EO5 permitiría la amplificación completa de todas las moléculas de ADNc que presentaran extremos *EcoRI*. Por tanto, estos resultados podrían indicar, en principio, una máxima heterogeneidad entre ambas poblaciones.

El empleo de diluciones en las amplificaciones nos permitió amplificar selectivamente las moléculas más abundantes presentes en la población. En cualquiera de las diluciones empleadas, el cebador EO5 siempre mostró un patrón continuo de bandas, mientras que el EO4 originó bandas

discretas en ambas poblaciones sustraídas (en el caso de ADNc-18s a partir de la segunda dilución utilizada y para ADNc-12s en las dos últimas diluciones).

Ambas poblaciones sustraídas resultaron tener un gran número de moléculas de muy diferente tamaño, todas ellas amplificadas por el EO5. Estos resultados admiten dos posibles interpretaciones: la sustracción no se ha realizado con suficiente efectividad, o ambas poblaciones (12h y 18h) son muy diferentes, existiendo muy poca o ninguna homología entre ellas.

Las amplificaciones con el cebador EO4, de secuencia arbitraria para ambas poblaciones, originó bandas discretas, más evidentes en las diluciones más altas. Estos resultados indicarían, por una parte, la existencia de una amplificación selectiva dada la abundancia de estas moléculas en las poblaciones y, por otra, cierta heterogeneidad entre ambas poblaciones sustraídas, ya que los patrones de bandas amplificadas son bastante diferentes (Figuras 24A y 24B).

Aunque existen casos en los que la hibridación sustractiva se ha aplicado con éxito (BJOURSON et al., 1992; LEE et al., 1991; YANCOPOULUS et al., 1990), también es cierto que la sustracción no siempre es efectiva, o el rendimiento no es demasiado alto. Nos inclinamos a pensar que el punto crítico de la metodología es la fotobiotinilización del ADN, más que la unión con la estreptavidina, la cual presenta una especificidad muy alta por la biotina, si bien la etapa de hibridación puede resultar igualmente crítica.

Creemos que, probablemente, la sustracción se ha realizado parcialmente o con un bajo rendimiento, ya que resulta poco fiable que ambas poblaciones, tan cercanas en el tiempo según la cinética de enquistamiento de *C. inflata* (BENÍTEZ et al., 1994), presenten una heterogeneidad tan elevada. Por otro lado, también los resultados del estudio de los polimorfismos de las poblaciones de ADNc, nos indican, como ya discutiremos en el siguiente apartado, la existencia de una elevada homología entre estas dos poblaciones.

Sin embargo, la amplificación con el cebador EO4 nos ha mostrado cierta heterogeneidad entre las poblaciones, presentando patrones de bandas diferentes. No descartamos la posibilidad de utilizar esta probable heterogeneidad en un futuro próximo, tras aislar las bandas diferenciales, marcarlas y dilucidar por hibridación cruzada su presencia/ausencia en las muestras 12h y 18h. Dichas bandas podrían ser utilizadas como sondas específicas de etapas prequisticas, siempre y cuando no estuvieran presentes en ambas poblaciones.

### 3.3. Polimorfismos de poblaciones de ADNc

Como consecuencia de la deficiente sustracción obtenida entre las poblaciones de ADNc (12h y 18h), intentamos una segunda estrategia para buscar una mayor heterogeneidad entre dichas poblaciones. Esta estrategia se basó en el estudio de los patrones polimórficos obtenidos por PCR, empleando cebadores de secuencia arbitraria para los ADNc de estados prequisticos (12h, 18h y 24h) y los procedentes de estados definitivos (vegetativos y quistes maduros). De esta forma, a partir de estos perfiles polimórficos, se podrían obtener bandas únicas o específicas de algún estado prequistico o diferenciado en una población concreta de ADNc.

Todos los cebadores utilizados (EO3, EO4, SA1 y SA2) se comportaban como cebadores

arbitrarios o marcadores polimórficos para todas las poblaciones de ADNc, ya que dichas poblaciones carecían del adaptador EcoRI. Como se observa en las figuras 25 a 28, todas las amplificaciones mostraron patrones con un alto número de bandas (especialmente con el cebador EO4), encontrándose en algunos casos bandas de alto tamaño molecular (hasta 2 Kb).

A partir de los patrones de polimorfismos de las diferentes etapas prequísticas, podemos deducir la existencia de un elevado nivel de homología entre todas las poblaciones, destacando especialmente las poblaciones de ADNc de prequísticos de 12 y 18 h. En general, no apreciamos grandes diferencias entre estas etapas prequísticas y los dos estados diferenciados del ciclo (vegetativos y quistes). En todos los casos, se detectan numerosas bandas comunes a todas las poblaciones (ver especialmente los polimorfismos con cebadores SA1/SA2, SA1 y SA2 de las figuras 26 y 28 respectivamente). No obstante, también se observan bandas únicas, presentes sólo en algún estado del proceso de enquistamiento, o bien en los estados diferenciados, con cualquiera de los cebadores utilizados. El aislamiento de todas estas bandas resultaba a veces problemático, debido a su cercanía con otras bandas comunes, por lo que sólo fueron escindidas del gel aquellas bandas que, además de ser intensas, estuvieran suficientemente separadas de otras, para minimizar al máximo las contaminaciones con bandas cercanas.

A pesar de que la banda con la que finalmente trabajamos (B4/Q) no fue visible por tinción con EtBr en la electroforesis de las distintas muestras de ADNc (a excepción de la muestras de ADNc de quistes de la que fue aislada), se confirmó su presencia en las muestras del resto de las poblaciones de ADNc, con similar intensidad de hibridación para todas ellas (*dot* de la figura 32). Una posterior hibridación (*Southern*) de estas mismas muestras de ADNc con el fragmento-sonda B4/Q (Figura 34) mostró resultados más interesantes.

En primer lugar, y como se confirmó con las hibridaciones en *dot*, todas las muestras presentaron alguna señal de hibridación positiva, pero la intensidad de la señal no fue la misma para todas ellas. Es posible que la presencia desigual de esta molécula específica de ADNc en los diferentes estados estudiados, se tradujera en una amplificación por PCR también desigual, obteniéndose la máxima presencia en los quistes de resistencia de *C. inflata*. En segundo lugar, también apreciamos que la hibridación positiva con la sonda B4/Q se localiza en fragmentos de la población de ADNc situados en diferentes niveles. Las poblaciones de vegetativos y prequísticos tempranos (12 h) presentan una banda de hibridación a la misma altura, mientras en el resto de prequísticos (18 y 24 h) la señal se localiza en bandas de menor tamaño molecular. En las muestras de ADNc de quistes aparecen dos bandas de hibridación, una de las cuales coincide con la de los prequísticos de 18 y 24 h, mientras que la otra banda se localiza justo debajo de la anterior.

Una primera interpretación posible del patrón de hibridación obtenido de los diferentes ADNc de distintas fases del enquistamiento de *C. inflata*, podría ser la consecuencia de la incompleta transcripción realizada *in vitro* por la transcriptasa inversa. En el paso de ARN poli(A)<sup>+</sup> a ADNc se pueden originar diferentes longitudes o extensiones de moléculas de ADNc para cada especie de ARNm, de tal forma que en una determinada población de ADNc podemos encontrar una mezcla de moléculas de ADNc de diferentes longitudes derivadas del mismo transcrito. Y no sólo pueden existir diferencias cualitativas sino también cuantitativas para cada copia de ADNc, por lo que existe

heterogeneidad cualitativa y cuantitativa en la población de moléculas de ADNc derivadas de un mismo ARNm. Así por ejemplo, en los quistes maduros hay dos fragmentos mayoritarios, derivados del mismo transcrito que son reconocidos por la sonda B4/Q. En las muestras de prequísticos de 18h y 24h, el fragmento mayoritario coincide con el de menor tamaño reconocido por la sonda en quistes. Y en vegetativos y prequísticos de 12h la sonda B4/Q reconoce un fragmento (de los posibles derivados del mismo ARNm) de igual tamaño que el mayor obtenido en la muestra de quistes de resistencia.

Una segunda interpretación del patrón de bandeo observado en la figura 34, podría ser un posible procesamiento de transcrito primario o precursor, dando origen a formas más pequeñas que surgirían en la mayor parte del proceso de enquistamiento, acumulándose ambas formas en los quistes maduros. De este modo, podrían existir diferencias cuantitativas entre ambas formas (procesadas y no procesadas) en las diferentes poblaciones, lo cual explicaría la detección de sólo una de ellas en algunas muestras. Esta segunda hipótesis nos parece improbable, sobre todo teniendo en cuenta que la sonda B4/Q es un subproducto de PCR derivado de un fragmento aislado de ADNc de aproximadamente 1.600 pb, longitud que parece más próxima a la media que presentan los ARNm eucariotas.

Según todos los datos expuestos, nos inclinamos hacia la primera posibilidad, es decir, que la sonda B4/Q ha hibridado preferentemente con fragmentos menores o incompletos del mismo transcrito original, más abundantes en las muestras de ADNc.

Existe otro punto importante que merece discusión ya que, como acabamos de decir, la sonda B4/Q procede de una molécula de mayor tamaño obtenida en uno de los polimorfismos, pero, en cambio, la hibridación de dicha sonda con la población de ADNc de quistes se observa en dos bandas (Figura 34), la mayor de las cuales presenta un tamaño de 400 pb.

Probablemente, la explicación más inmediata a esta observación sea la pérdida de esta molécula de ADNc de gran tamaño (y probablemente de otras) durante la transferencia, pero podemos pensar quizá en otra explicación adicional, derivada de la metodología utilizada. No hay que olvidar que esta hibridación se ha realizado sobre poblaciones de ADNc unidas al adaptador EcoRI y amplificadas con el cebador EO3, que al ser complementario a la secuencia de dicho adaptador, permite aplicar toda la población, obteniendo así cantidad suficiente de ADNc para realizar las hibridaciones. Evidentemente, la realización de amplificaciones consecutivas sobre una población de moléculas puede conllevar un efecto no deseado, como es la selección de las moléculas más abundantes en dicha población. De este modo, podría ser posible que la molécula original de 1.600 pb estuviera ínfimamente representada en la población amplificada, ya que la amplificación por PCR incrementaría la población de moléculas más abundantes que, como se observa en la figura 34, se sitúan en un rango inferior de tamaños, perdiendo paulatinamente las moléculas menos abundantes.

Por último, otra cuestión a discutir es la intensidad de hibridación, es decir, la cantidad de copias presentes en cada muestra. El incremento paulatino en la intensidad de la hibridación (débil en vegetativos y prequísticos tempranos y más intenso a medida que avanza el enquistamiento, hasta alcanzar el máximo en la muestra de quistes de resistencia), podría interpretarse bien como consecuencia del aumento en los niveles de transcripción de dicho gen, o bien debido a una sucesiva

acumulación en el citoplasma prequístico sin que dichos transcritos sean degradados, con el consiguiente aumento de longevidad. Además, ambas posibilidades no son excluyentes, por lo que se podrían dar simultáneamente durante el enquistamiento.

Por consiguiente, tendríamos un fragmento-sonda (B4/Q) que correspondería a un transcrito que aparece preferentemente durante el enquistamiento (aunque también se detecta en vegetativos), y que se acumula en los quistes de resistencia definitivos. Estos resultados, tomados en conjunto, coinciden con algunos datos descritos en otros sistemas vivos eucariotas y procariotas que experimentan procesos de diferenciación, en algunos casos semejantes a la criptobiosis de ciliados. Así por ejemplo, RUTHERFORD y colaboradores (1985) distinguen dos clases de ARNm presentes durante el proceso de diferenciación (formación del cuerpo fructífero y esporas) en *Dictyostelium*: ARNm constitutivos (presentes tanto durante el crecimiento de las formas vegetativas como durante el proceso de diferenciación, aunque en número variable de copias) y ARNm específicos de cada etapa del proceso de diferenciación (agregación, post-agregación y formación de esporas y tallo en el cuerpo fructífero).

Según esta posible clasificación de transcritos presentes durante procesos de diferenciación microbiana, se podría pensar que el transcrito que reconoce la sonda B4/Q se comporta constitutivamente, ya que aparece tanto en vegetativos como en estadios de diferenciación. Por otra parte, el incremento de su presencia en etapas prequísticas avanzadas y quistes maduros, nos podría hacer pensar que dicho ARNm es importante o necesario para el enquistamiento de *C. inflata*. Sin embargo, caben otras interpretaciones, como por ejemplo que este ARNm, aunque biosintetizado durante el enquistamiento no se traduzca hasta el exquistamiento, siendo mantenido o guardado en el estado quiste hasta su utilización en los primeros momentos del exquistamiento. Estos transcritos se pueden mantener sin degradación, bien debido a la deshidratación que ha sufrido el citoplasma quístico durante el proceso de enquistamiento, o bien debido a mecanismos de estabilización postranscripcional para moléculas de ARNm. En este sentido se podría pensar en ciertas estructuras secundarias que regulen su estabilidad o en la asociación con proteínas específicas formando complejos de ribonucleoproteína, que mantienen estable, y potencialmente traducible, al transcrito durante prolongados periodos de tiempo, como sucede para ciertos ARNm en oocitos de *Xenopus laevis* (STANDART & JACKSON, 1994). El almacenamiento de moléculas de ARNm específicas de diferenciación es un hecho comprobado tanto en eucariotas [diferenciación de *Dictyostelium* (DOWDS & LOOMIS, 1984)] como en procariotas [situaciones de estrés inducido por hambre en el género *Vibrio* (ALBERTSON, 1990)].

Igualmente, existen casos descritos en la bibliografía microbiana en los que determinados transcritos biosintetizados durante ciertas fases de un proceso de diferenciación se utilizan en otras etapas posteriores; así por ejemplo en la esporulación de hongos como *Mucor* (ORLOWSKI, 1991) y *Blastocladiella* (SILVA et al., 1987), al igual que en la esporulación bacteriana (MOIR et al., 1994). En ciliados [*Tetrahymena pyriformis* (SOARES et al., 1984)] se ha descrito la utilización de ARN poli(A)<sup>1</sup> preexistente, no asociado a ribosomas, en células que sufren una situación de estrés inducido por hambre.

En *Dictyostelium discoideum* se ha obtenido ADNc a partir de uno de los ARN poliadenilados

acumulados en las esporas de este hongo (CAMONIS et al., 1982), utilizándose como sonda sobre una genoteca de ADN genómico, lo que condujo al aislamiento del gen codificante para el ARNm almacenado en el estado espora (JULIEN et al., 1982). La hibridación de dicho fragmento génico con ARN poliadenilado procedente de células vegetativas, células en diferentes fases del proceso de diferenciación y esporas, resultó similar a la que hemos encontrado en *C. inflata* con la sonda B4/Q, es decir, bajos niveles de hibridación en vegetativos y células diferenciándose, mientras la señal de hibridación se incrementó unas quince veces en la muestra de ARN procedente de esporas. Estos autores sugieren que la acumulación de este ARNm (específico de espora) estaría sometido a cierto control durante el proceso de diferenciación, sin que exista una apertura génica específica ligada a dicho proceso.

Haciendo un resumen en este punto de la discusión, tendríamos, por tanto, un transcrito presente en baja cantidad en el estado vegetativo de *C. inflata*, que paulatinamente incrementa su presencia a medida que avanza el enquistamiento, hasta alcanzar el máximo nivel en el quiste maduro. En este punto caben dos posibles interpretaciones:

- Que sea un ARN específico de enquistamiento, y por tanto, necesario para dicho proceso, que se acumula en el quiste, manteniéndose funcional o no, como consecuencia tanto de la deshidratación como de la inactivación metabólica que conlleva dicha deshidratación.
- Que sea un ARNm que ha de ser traducido durante el exquistamiento, aunque se biosintetice en el enquistamiento, para lo cual se almacena en el quiste de resistencia.

Con respecto a la primera de las hipótesis, la detección de hibridación en células vegetativas no tiene por qué ser un hecho que descarte esta posibilidad, ya que en varios ciliados (GUTIÉRREZ et al., 1983b; MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 1994; WALKER et al., 1980) se han detectado precursores de pared (ectoquiste) en estados muy tempranos, incluyendo células vegetativas. Por tanto, la expresión de ciertos genes específicos de enquistamiento podría darse, igualmente, en estados vegetativos, existiendo un mayor nivel de transcripción durante el enquistamiento, o bien algún mecanismo de regulación postranscripcional para los transcritos ya existentes. En cualquier caso, se han detectado transcripciones muy tempranas respecto del inicio de procesos de diferenciación tanto en procariotas [esporulación bacteriana (ERRINGTON, 1993)] como en eucariotas [diferenciación en *Dictyostelium* (LOOMIS, 1990)].

Sabemos que durante el proceso de enquistamiento en ciliados existe una autofagia relativamente elevada en el citoplasma prequístico (GUTIÉRREZ et al., 1990), lo que conlleva degradación macromolecular. Por ello, los transcritos específicos de enquistamiento (ya sean transcritos temprana o tardíamente sintetizados) deberían presentar características estructurales que les hicieran estables frente a esta degradación. Así mismo, existe una disminución global del contenido de ARN citoplasmático durante el enquistamiento (PIGON & EDSTRÖM, 1961) por lo que, es posible que un gran número de transcritos sean degradados. Esto nos hace pensar que los ARNm que prevalecen durante el enquistamiento y se acumulan en el estado quístico, deben presentar características estructurales que les hagan longevos y estables. Los mecanismos de estabilización de transcritos constituyen un modo

de regulación génica postranscripcional realmente importante en sistemas eucariotas (ATWATER et al., 1990; CLEVELAND, 1989).

En definitiva, carecemos de datos experimentales suficientes para inclinarnos por alguna de las hipótesis que se han expuesto y que resumimos a continuación:

- a) Que sea un transcrito constitutivo, utilizable por la célula tanto en estado vegetativo como prequístico, aunque el número de copias varíe de un estado a otro y que, por lo tanto, no sea específico de enquistamiento.
- b) Que sea un transcrito específico del proceso de enquistamiento, aunque de aparición muy temprana, y cuyo número de copias se incremente durante dicho proceso acumulándose finalmente en el quiste maduro por efecto, principalmente, de la deshidratación citoplasmática.
- c) Que sea un transcrito de síntesis temprana que se acumule o almacene en el quiste de resistencia, pero que no sea traducido hasta el exquistamiento, por lo que se trataría de un transcrito específico de exquistamiento.

#### **4. ANÁLISIS DE LA GENOTECA DE ADNc 18 HORAS**

Una vez elegida la sonda B4/Q como específica del enquistamiento de *Colpoda inflata*, ya que presentaba un patrón de hibridación cuantitativamente diferente en las poblaciones de ADNc sobre las que se realizó la hibridación, se trató de buscar la secuencia completa del gen en alguna de las dos genotecas que se habían construido previamente: ADNc de prequísticos de 12 horas y ADNc de prequísticos de 18 horas.

La sonda elegida (B4/Q) constituye sólo un fragmento de un ADNc de mayor longitud. Este subfragmento es producto de una amplificación por PCR de un fragmento de ADNc de 1.600 pb generado del polimorfismo con el cebador EO3 a partir de la población de ADNc de quistes (Figura 27, carril 5).

A pesar de que el fragmento B4/Q utilizado como sonda presentaba una mayor abundancia en la muestra de ADNc de quistes (Figura 34), también se detectó hibridación positiva en la muestra de ADNc de 18 horas. Por esta razón, y dado que dicha genoteca se encontraba ya preparada, se optó por comenzar la búsqueda de un fragmento de mayor longitud que constituyera parte del gen implicado o que incluyera el gen completo.

La estrategia general para detectar un gen determinado a partir de una genoteca, no requiere el aislamiento previo de clones recombinantes, ya que el clon o clones que llevan dicho gen se detectan directamente sobre placas Petri conteniendo todo tipo de halos, tras una hibridación con la sonda del gen que se busca sobre un filtro-copia de la placa Petri (DYSON, 1991; SAMBROOK et al., 1989). Esta técnica facilita el escrutinio de un gran número de clones en un corto espacio de tiempo. A pesar de esta clara ventaja, el aislamiento directo y previo de los halos recombinantes puede obviar el inconveniente de posibles contaminaciones debidas a la difusión entre halos vecinos (PORTEUS, 1986).

Como ya hemos indicado, la genoteca de ADNc de prequísticos de 18h en  $\lambda$ gt10 se obtuvo antes de contar con alguna sonda específica de enquistamiento, motivo por el que se utilizaron los clones recombinantes ya aislados y por lo que la muestra a analizar fue bastante reducida (543 clones). Estas limitaciones no constituyen, inicialmente, un problema, ya que existen diversos estudios de diferenciación en los que se han analizado un número reducido de clones en genotecas de ADNc (BERNIER et al., 1986a; DOWDS & LOOMIS, 1984; MARTINDALE & BRUNS, 1983).

Por tanto, para realizar las hibridaciones se utilizaron alícuotas del tampón SM (conteniendo DMSO como crioprotector) en que se encontraban resuspendidas las partículas víricas que habían difundido de los bloques de agar. El tratamiento posterior de los filtros fue el mismo que se utiliza para los filtros-copia obtenidos directamente de las placas Petri.

El volumen de las alícuotas de los diferentes clones que se depositaban en los filtros fue el mismo (15  $\mu$ l), que representa una cantidad de  $10^5$  a  $10^7$  ufp. Sin embargo, la cantidad de fagos que contenía cada alícuota dependía, tanto del tamaño del halo aislado de la placa de agar como de la cantidad de partículas víricas que se desprenden en el tampón SM, lo que indica que las alícuotas empleadas en la hibridación no contenían el mismo número de partículas víricas, aunque una cantidad mínima de  $10^5$  ufp es suficiente para obtener una señal positiva de hibridación, como pudimos comprobar en experimentos previos utilizando una sonda de  $\lambda$ gt10 marcada con digoxigenina.

Existía además otro problema adicional, ya que como hemos indicado la genoteca de ADNc-18h se preparó antes de disponer de una sonda adecuada para llevar a cabo su análisis, por lo que los halos aislados se mantuvieron durante aproximadamente un año a  $-20^\circ\text{C}$  en SM con adición de 7% (v/v) de DMSO. A pesar de que existe alguna referencia bibliográfica en la que el mantenimiento de genotecas se realiza a  $-70^\circ\text{C}$  tras congelación rápida en nitrógeno líquido (BAINBRIDGE, 1991), en nuestro caso la congelación a  $-20^\circ\text{C}$  no afectó a la viabilidad de los fagos almacenados, como se pudo comprobar al realizar la amplificación posterior de algunos de dichos clones.

Los resultados que obtuvimos en cuanto al número de clones que presentaban inserto (el 10,7% de los clones considerados como positivos en una hibridación previa y el 4,2% de los analizados únicamente por PCR) podrían indicar la pérdida de los fragmentos clonados, puesto que todos los clones que se analizaron eran halos claros y, por tanto, constituidos por partículas víricas recombinantes. No hemos encontrado referencias en la bibliografía sobre la obtención de un porcentaje tan alto de clones inestables, y ciertamente resulta difícil conocer si estos clones han perdido sus insertos de ADN durante el largo tiempo de almacenamiento o si, en su origen, se trataba de halos o placas constituidos por partículas víricas que carecían de ADN heterólogo. Esta segunda hipótesis parece menos probable, puesto que los aislamientos se realizaron utilizando como hospedador la cepa de *E. coli* C600 hfl que permite seleccionar únicamente fagos recombinantes, no llegando a observarse en ningún momento placas o halos turbios.

Si nos inclinamos a pensar que estos clones habían perdido sus insertos de ADN, cabe pensar si la pérdida era del ADN heterólogo clonado o quizá sólo de ciertas zonas de ADN de lambda, necesarias para la unión de los cebadores en la reacción de amplificación por PCR para recuperar el inserto. Para abordar el problema se llevaron a cabo dos tipos de experimentos:

a) Realizar una amplificación por PCR a partir de ADN aislado de los clones, evitando así dos posibles problemas: la diferente cantidad de partículas víricas que existen cuando la amplificación por PCR se lleva a cabo directamente y evitar la presencia de algún tipo de elemento que pudiera interferir en la reacción de amplificación.

b) Intentar liberar los posibles insertos por digestión enzimática a partir de ADN viral aislado de cada clon. Las digestiones se realizaron con la enzima EcoRI que reconoce las secuencias que flanquean directamente al ADN heterólogo.

Contrariamente a lo esperado, ninguno de los dos procedimientos ofreció más información.

En el primero de ellos, los resultados de la amplificación por PCR fueron los mismos, tanto a partir de ADN aislado de un determinado clon como directamente a partir de la suspensión de fagos de ese mismo clon. Por tanto, en este caso se demuestra que la efectividad de la amplificación no depende de la pureza del ADN a ser amplificado. Parece probable, por tanto, que estos clones hayan perdido el inserto o bien, las zonas de reconocimiento para los cebadores.

En el segundo tipo de experimentación, todos los clones analizados fueron resistentes a la digestión con EcoRI, tanto aquellos que presentaban un inserto como los que carecían de él. Probablemente, los problemas asociados con la digestión enzimática de los clones podrían ser consecuencia de su crecimiento en placas de agar (en lugar de agarosa) que puede constituir un posible inhibidor de la actividad endonucleásica (BAINBRIDGE, 1991; SAMBROOK et al., 1989).

En resumen, sólo el 7,2% de los 180 clones analizados por PCR, para comprobar la presencia de ADN heterólogo clonado, presentaban inserto. Es un porcentaje realmente bajo, sobre todo teniendo en cuenta que todos los clones seleccionados procedían, como ya hemos señalado, de halos claros.

Los datos que acabamos de exponer parecen indicar que en un gran número de clones de la genoteca se había producido la pérdida de los fragmentos clonados, o bien de algunas de las secuencias de ADN vírico necesarias para la recuperación de los insertos, quizá como consecuencia del almacenamiento prolongado de los clones que componían la genoteca.

Por último, es destacable el alto porcentaje de falsos positivos que se obtuvo al realizar el primer análisis de la genoteca con la sonda B4/Q: 84 clones dieron respuesta positiva de un total de 447 clones analizados por esta técnica. Esta primera criba de la genoteca se llevó a cabo sin preparar filtros por duplicado, que es la forma habitual para discriminar los posibles clones positivos (SAMBROOK et al., 1989). En nuestro caso, las réplicas de los filtros suponían doble trabajo y exigían mucho tiempo, ya que dichos filtros se preparaban a mano, depositando las alícuotas directamente con una micropipeta. En su lugar, se decidió realizar una segunda criba utilizando los fragmentos clonados que pudieron ser recuperados por PCR (sólo 9 clones). Ninguno de los insertos fue reconocido por la sonda B4/Q indicando igualmente que se trataba de falsos positivos.

La aparición de un gran número de falsos positivos es un fenómeno frecuente en el análisis de genotecas de lambda para hibridaciones realizadas con marcaje radiactivo (CLANCY et al., 1983; PORTEUS, 1986; TAGU, 1993). El marcaje no radiactivo que hemos utilizado en nuestro caso podría estar relacionado también con la aparición de los numerosos falsos positivos, ya que incorpora una

etapa que no se utiliza en el marcaje con radiactividad, basada en el empleo de anticuerpos anti-digoxigenina. En esta etapa podría producirse un reconocimiento inespecífico con el vector lambda que condujera a la aparición de señales falsamente positivas, dificultando la detección de los auténticos clones positivos.

Entendemos asimismo que el número de clones analizados ha sido realmente bajo, sobre todo teniendo en cuenta el gran número de falsos positivos que suelen aparecer en genotecas de lambda.

Ante la imposibilidad, de momento, de aislar un fragmento mayor (o el gen completo) a partir de la genoteca, decidimos, fundamentalmente por motivos de tiempo, conocer algo más sobre las características del fragmento B4/Q que se utilizó como sonda, por lo que procedimos a su secuenciación.

### **5. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO B4/QA**

Ante los resultados negativos en los intentos de obtener el gen clonado en la genoteca de ADNc (18h), decidimos secuenciar alguno de los fragmentos que constituyen la sonda B4/Q.

La clonación se realizó en el vector pUC18, etapa necesaria para llevar a cabo la secuenciación automatizada. Tras la clonación del conjunto de fragmentos contenidos en la sonda B4/Q, se obtuvo un clon positivo que contenía un inserto de 550 pb, que denominamos fragmento B4/QA (Figura 38). Al ser uno de los clones con mayor inserto, se decidió secuenciarlo, aunque tras la secuenciación sólo obtuvo una secuencia fiable de 381 pb, después de obtener las secuencias de ambas cadenas y repetir por duplicado la secuenciación de una de ellas.

El reducido tamaño de la secuencia obtenida (sólo 381 pb), nos delimita extraordinariamente cualquier consideración relativamente fiable sobre el gen al que pertenece. Sin embargo, nos parece de interés, sobre todo teniendo en cuenta el futuro de este trabajo, discutir algunas de sus características, así como posibles marcos de lectura que podríamos establecer en la misma. Previamente, debemos tener en cuenta algunas consideraciones:

a) El fragmento clonado deriva de una población de ADNc, es decir, transcritos poliadenilados convertidos en ADNc *in vitro*, por lo que el gen en sí es básicamente codificante y se encuentra procesado (en el caso de la existencia de intrones). Por tanto, se trataría de un gen de clase II.

En el género *Colpoda* no se conoce aún secuencia alguna sobre genes de clase II, ya que la única secuencia publicada hasta ahora se refiere al ARNr de la subunidad pequeña (GREENWOOD et al., 1991), es decir, un gen de clase I.

Ante esta ausencia de información sobre genes de *Colpoda*, hemos aplicado los conocimientos ya existentes sobre el código genético que utilizan la mayoría de los ciliados estudiados hasta el momento (PRESCOTT, 1994). *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Paraurostyla*, *Oxytricha* y *Stylonychia* utilizan el triplete TGA como único codón de fin de lectura, mientras que los otros dos posibles tripletes (TAA y TAG) codifican para glutamina, a excepción de *Euplotes*, que utiliza los tripletes TAA y TAG como fin de lectura, mientras el codón TGA codifica para cisteína (PRESCOTT, 1994). Los ciliados del género *Colpoda* se encuentran más cercanos a *Tetrahymena* y *Paramecium* que a *Euplotes*,

por lo que hemos utilizado el triplete TGA como único codón de fin de lectura.

Por otra parte, y considerando cualquiera de los posibles marcos de lectura de la secuencia obtenida, no tendría sentido considerar los codones TAA y TAG como fin de lectura en ninguna de ellas, ya que se encuentran en numerosas ocasiones a lo largo de las mismas (Figura 41), lo que carecería de sentido en un ADNc.

**b)** La secuencia obtenida presenta un contenido moderadamente elevado en A+T (62,2%), que no se aleja demasiado del valor promedio (74%) que presenta el ADN macro y micronuclear de un ciliado estándar como *Tetrahymena* (PRESCOTT, 1994). Sin embargo, resulta importante diferenciar regiones codificantes de las que no lo son. Así, en *Tetrahymena* las regiones codificantes presentan un 54% de A+T, mientras en las no codificantes, el porcentaje es superior al 76%. En ciliados hipotricos el promedio de A+T en secuencias codificantes es de 50-60% y en secuencias no codificantes de un 69-75% (PRESCOTT, 1994).

En nuestro caso, la secuencia del fragmento B4/QA está incompleta, por lo que constituye una pequeña parte de lo que puede ser el gen completo, de modo que no representa el valor completo y correcto de A+T de la secuencia codificante. A pesar de todo ello, el porcentaje de A+T obtenido se aproxima más a los valores promedio presentados en general en ciliados.

En la secuencia obtenida, podemos establecer dos posibles marcos de lectura diferentes que se muestran en la figura 41, dependiendo de los codones de fin de lectura que hemos considerado como reales. A continuación discutiremos cada uno de ellos.

El primer marco de lectura (Figura 41A) muestra una posible secuencia codificante de 273 pb (Figura 42). Sin embargo, y teniendo siempre presente que la secuencia es incompleta, existen una serie de razones que parecen descartar esta primera alternativa:

► En primer lugar, debemos recordar que se trata de una molécula de ADNc derivada de un transcrito poliadenilado y, por consiguiente, procesado. Se podría pensar en un transcrito policistrónico, pero resulta un hecho extraño en eucariotas. No obstante, carece de sentido encontrar una secuencia codificante tan corta con respecto al resto que aún queda por secuenciar, que es mucho mayor, dado que la secuencia B4/QA (381 pb) es una parte del fragmento B4/Q de 550 pb, derivado a su vez de una banda de un patrón polimórfico de la población de ADNc quístico de 1.600 pb. Por tanto, la región secuenciada representa sólo un 23% del total de la secuencia y nuestra potencial región codificante (273 pb) representaría únicamente un 17% del total de la molécula de ADNc de la cual deriva. Todos estos datos son correctos siempre que se considere que la banda de 1.600 pb representa el ADNc completo, lo que no sabemos si es cierto. Según esta primera interpretación, el resto de la molécula (83%) podría ser una secuencia no codificante, o bien una secuencia codificante interrumpida por zonas no codificantes, es decir, por intrones, lo que resulta muy improbable al tratarse de un transcrito procesado. Al mismo tiempo, el porcentaje en A+T de las zonas no codificantes (108 pb), posibles secuencias intrónicas en este marco de lectura, es muy inferior al descrito en ciliados (>85%).

► En segundo lugar, la secuencia codificante presenta un contenido en A+T relativamente elevado (66,3%) a diferencia de la media observada en ciliados para regiones codificantes (PRESCOTT, 1994).

► Igualmente, se observa que aparecen tres metioninas como inicio de la secuencia codificante, lo que resulta realmente inusual.

► Existe una secuencia de 10 bases que se asemeja (aunque no es idéntica) a la secuencia consenso de inicio de traducción en eucariotas (KOZAK, 1986). La secuencia consenso propuesta por este autor está constituida por 9 bases (CCA/GCCATGG) y funciona como una secuencia iniciadora de la traducción en eucariotas. La secuencia 5'-CCAACCATGA-3' encontrada en nuestro fragmento (Figura 42) presenta una base adicional (A) que no existe en la secuencia consenso, así como una A en posición +4. A pesar de ello, mantiene una purina (A) en posición -3, característica común a muchos otros ARNm de ciliados (HELFTENBEIN, 1985; KLOBUTCHER et al., 1984; 1991; MICELI et al., 1989).

► Con respecto a la secuencia aminoacídica resultante de la secuencia codificante, podemos destacar el uso de cuatro tripletes TTT que codifican para fenilalanina (F), codón que no es frecuentemente utilizado en ciliados (BANNON et al., 1984; HELFTENBEIN, 1985; HELFTENBEIN & MÜLLER, 1988; HOROWITZ & GOROVSKY, 1985; MICELI et al., 1989). A pesar de ello, genes de *Paramecium* (PREER et al., 1987) y *Euplotes* (KLOBUTCHER et al., 1991; LIANG et al., 1994; MEYER et al., 1991) utilizan codones TTT para fenilalanina, aunque en una proporción inferior respecto al codón TTC, que codifica también para este aminoácido. Igualmente, en la secuencia que presentamos, existen algunos codones que son muy poco frecuentes en los genes de ciliados descritos hasta ahora: CGT (arginina), AGG (arginina), ACG (treonina), GGG (glicina) y TCG (serina) (MARTINDALE, 1989; PRESCOTT, 1994).

El segundo marco de lectura que consideramos en el sentido 5'-3' de la secuencia (Figura 41B), presenta dos interpretaciones posibles. En primer lugar, se puede estimar que todo el marco de lectura sea codificante (Figura 41-B1) y que los codones ATG codifiquen para metioninas internas del polipéptido (Figura 43) con lo que éste sería rico en residuos de fenilalanina (F) y glutamina (Q) (11 y 13 residuos, respectivamente). De nuevo, la mayor parte de los residuos de fenilalanina vienen codificados por codones TTT (8 residuos) y el resto (sólo 3 residuos) por el codón TTC, lo que resulta algo inusual en ciliados como acabamos de discutir.

La abundancia en residuos de glutamina (Q) se debe a que hemos considerado los codones TAA y TAG codificantes de este aminoácido, además de los propios de la glutamina (CAA y CAG). Otros aminoácidos igualmente abundantes en esta secuencia son la leucina (L) con 12 residuos, y la lisina (K) con 10 residuos. Todo ello no es más que el resultado de la abundancia de pares A+T (62,2%), que es relativamente alta para una secuencia codificante, lo que hace que predominen los aminoácidos que utilizan los codones más ricos en A y/o T.

Todos los puntos discutidos hasta ahora hacen poco probable esta primera posibilidad

considerada dentro del segundo marco de lectura.

Una segunda posibilidad de interpretación, dentro del mismo marco de lectura (Figura 41-B2), sería que la secuencia codificante comenzase en el codón ATG de la posición 310, con lo que la secuencia codificante presente en este fragmento tendría sólo 72 pb, siendo mayor la región no codificante con 309 pb (Figura 44). En este caso, los porcentajes de A+T de ambas regiones (54,2% para la codificante y 64% para la no codificante) se aproximan más a los datos generales obtenidos en ciliados (PRESCOTT, 1994). Así mismo, la región 5' no codificante (309 pb) presentaría una serie de características estructurales interesantes:

a) Se observan tres repeticiones invertidas que pueden originar tres horquillas localizadas entre los nucleótidos -227 a -199, -182 a -167 y -113 a -93 de la región 5' no codificante (Figura 45). Las secuencias autoapareantes de dichas horquillas están formadas por 5-6 bases y son ricas en pares A+T. En ciliados hipotricos (MICELI et al., 1989) estas horquillas, localizadas cerca del origen de traducción, pueden representar orígenes de replicación. Igualmente podrían actuar como punto de unión o reconocimiento de proteínas implicadas en la transcripción o en su regulación, como sucede en levaduras (STRUHL, 1988). Así mismo, la regulación traduccional de determinadas especies de ARNm está mediatizada por secuencias localizadas en la región 5' no codificante de dichos transcritos. El ejemplo más claro nos lo ofrece el ARNm que codifica para la ferritina (CASEY et al., 1988), cuya traducción se ve incrementada en presencia de hierro, al eliminarse la horquilla presente en la región 5' no codificante. En la secuencia del gen que nos ocupa, estas horquillas podrían tener una función similar en la regulación de la traducción de su ARNm.

b) Existen siete secuencias TTTT, tres de las cuales forman parte de las horquillas comentadas anteriormente. Estos tetranucleótidos de timina se han encontrado en la región 5' no codificante de algunos genes, tanto en hipotricos (HELFTENBEIN, 1985; HELFTENBEIN & MÜLLER, 1988; KAINE & SPEAR, 1982; LIANG et al., 1994; MICELI et al., 1989) como en *Paramecium* (PRIER et al., 1987) y *Tetrahymena* (BANNON et al., 1984). En algunos eucariotas (KORN & BROWN, 1978; LIANG et al., 1994) estas secuencias se han relacionado como señales de terminación de la transcripción.

En nuestro caso, y si consideramos correcta esta interpretación del marco de lectura, no sabemos que significado podría tener la aparición de horquillas en la región 5' no codificante, al igual que sucede en otros ciliados.

c) A pesar de que la región situada antes del codón de inicio, en esta interpretación de la secuencia, no se asemeja a las secuencias consenso propuestas para inicio de traducción en eucariotas (CCA/GCCATGG) (KOZAK, 1986) o en *Saccharomyces* (A/TAA/TAA/CA) (HAMILTON et al., 1987), es una característica común a muchos otros genes de ciliados, a diferencia, por ejemplo, de lo que ocurre en los escasos genes identificados que se han relacionado con procesos de diferenciación en hongos (BERNIER et al., 1987; PODGORSKY et al., 1986; SAVARD et al., 1989), que presentan secuencias semejantes a la secuencia consenso de *Saccharomyces*.

d) Se observa una secuencia palindrómica AATTTATTTAA en posición -38 a -28, próxima al codón de inicio de traducción (ATG). En hipotricos, las secuencias palindrómicas ricas en pares A+T en regiones no codificantes, se han relacionado con su posible función como orígenes de replicación (HELFENBEIN, 1985). Al igual que para las otras secuencias, desconocemos qué función podría tener en este caso.

A pesar de que la región codificante de esta segunda interpretación del marco de lectura es probablemente incompleta (sólo 24 aminoácidos), podemos destacar algunas características. En primer lugar, el único residuo de fenilalanina encontrado viene codificado por el triplete TTC, algo que resulta más acorde con la utilización de codones en ciliados. En segundo lugar, el aminoácido más abundante presente en este oligopéptido es la glutamina (Q) (12,5% de la secuencia obtenida). En *Colpoda steinii* (TIBBS, 1966; 1982), la proteína que forma parte de la pared quística es rica en residuos de glutamina (20%). Sin embargo, resultaría osado considerar una posible analogía, ya que la secuencia es incompleta y el marco de lectura puede no ser el correcto.

A la espera de tener la secuencia completa y según todos los datos expuestos, esta segunda interpretación del marco de lectura del fragmento B4/QA (Figura 44), parece la más factible de todas las consideradas, en función del porcentaje en A+T, de sus características estructurales (horquillas) y de la utilización de codones.

En definitiva, el fragmento B4/QA constituye una fracción muy pequeña de un gen de clase II, probablemente involucrado en el enquistamiento de *C. inflata*, que incluiría una buena parte de la región 5' no codificante del gen y una mínima parte de la región codificante. Evidentemente, la posible confirmación o refutación de esta hipótesis está pendiente de la completa secuenciación del gen.

## **6. PERSPECTIVAS Y ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES**

Somos conscientes de que el trabajo que aquí se presenta es un trabajo inacabado, ya que únicamente se muestra la secuencia de un fragmento de 381 pb (B4/QA) de la sonda B4/Q. El conocimiento de la secuencia completa, no sólo de la sonda B4/Q sino de la molécula de ADNc de la cual procede (1.600 pb), nos ofrecería mucha más información para tratar de comprender la función de este transcrito en el proceso de enquistamiento.

Nuestro objetivo más inmediato se centraría, por tanto, en la secuenciación completa de esta molécula de ADNc. El conocimiento de la secuencia nos permitirá conocer de qué proteína se trata, sus características estructurales y su posible función en el enquistamiento de *Colpoda inflata*.

Otras cuestiones interesantes que han quedado sin resolver en este trabajo y que deberían constituir, igualmente, parte de estas perspectivas son las siguientes:

► Basándonos en la posibilidad de encontrar alguna heterogeneidad en las poblaciones de 12h y 18h en los experimentos de sustracción, cabría la posibilidad de aislar bandas diferenciales y utilizarlas como sondas específicas de algunas de estas etapas, siempre y cuando no estuvieran presentes en ambas muestras ni en células vegetativas.

► El patrón de hibridación con la sonda B4/Q sobre poblaciones de ADNc nos ha permitido establecer una serie de hipótesis sobre posibles mecanismos de expresión génica involucrados en el enquistamiento. Estas hipótesis deberían ser dilucidadas en un futuro próximo.

Además de resolver estas cuestiones pendientes, es necesaria la búsqueda de más genes involucrados directa o indirectamente en el enquistamiento y, en este sentido, este trabajo de tesis nos ha resultado de gran utilidad para descartar posibles estrategias y enfocar otras nuevas.

Debemos, igualmente, considerar y valorar el hecho del carácter pionero del trabajo que aquí se presenta (véase la bibliografía relativa a enquistamiento en ciliados que se ha publicado hasta ahora), con todas las dificultades características de la ausencia de precedentes dentro del ámbito de los protozoos ciliados que ayuden a contrastar resultados y a solventar problemas técnicos o metodológicos.

Sin embargo, y al igual que ocurre con otros aspectos del proceso criptobiótico en ciliados, hemos encontrado curiosas similitudes respecto de otros procesos criptobióticos semejantes, tanto en procariotas como en eucariotas, lo que nos indicaría que posiblemente estamos comenzando a comprender mejor el desarrollo de este complejo proceso de diferenciación celular.

## ***CONCLUSIONES***

---

## CONCLUSIONES

1. Los quistes de resistencia maduros del ciliado *Colpoda inflata* contienen ARN poliadenilados, al igual que sucede en los quistes de amebas y en otras formas de resistencia o criptobióticas, como las esporas de hongos filamentosos y levaduras.
2. El estudio de los polimorfismos de las poblaciones de ADNc obtenidos de células vegetativas, prequísticas y quistes de resistencia, revelan una elevada similitud entre ellos. Estos resultados podrían indicar que se originan pocos transcritos específicos de enquistamiento, como parece ser que también ocurre en el enquistamiento de amebas.
3. Los resultados obtenidos sobre el transcrito del que forma parte el fragmento secuenciado B4/QA, nos indican que puede variar la concentración intracelular de algunos ARNm durante el proceso de enquistamiento de *C. inflata*. Y, como sucede para este transcrito, podrían acumularse un mayor número de copias en el estado diferenciado o quiste de resistencia.
4. El hecho de que determinados transcritos incrementen su presencia en el estado criptobiótico, parece ser un fenómeno habitual entre los sistemas vivos microbianos que presentan procesos similares al enquistamiento de ciliados. Su correcto significado, así como las características fisiológicas y estructurales que lo hacen posible, son cuestiones aún por resolver en la mayoría de los casos.
5. El presente trabajo constituye, teniendo en cuenta lo publicado hasta el momento, el primer intento conocido sobre estudios moleculares del proceso de enquistamiento en protozoos ciliados. El carácter pionero del mismo ha implicado la optimización y adaptación de diversas técnicas, su adecuación a las características del material vivo y del proceso a estudiar, así como el diseño de diferentes estrategias. Todo ello ha constituido un conocimiento previo necesario que, a nuestro entender, será la base del futuro trabajo molecular sobre el enquistamiento del ciliado *Colpoda inflata*.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

- ADELMAN, T.G. & LOVETT, J.S. (1974). Evidence for a ribosome-associated translation inhibitor during differentiation of *Blastocladia emersonii*. *Biochem. Biophys. Acta*, **335**: 236-245.
- ALBERTSON, N.H., NYSTRÖM, T. & KJELLEBERG, S. (1990). Functional mRNA half-lives in the marine *Vibrio* sp. S14 during starvation and recovery. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 2195-2199.
- ALTON, T.M. & LODISH, H.F. (1977). Translational control of protein synthesis during the early stages of differentiation of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cell*, **12**: 301-310.
- ASGARI, M. & HENNEY, H.R.Jr. (1989). Some properties of RNA from *Physarum* amoebae undergoing encystment: electrophoretic similarity to *Acanthamoeba* RNA. *Cytobios*, **57**: 131-139.
- ATWATER, J.A., WISDOM, R. & VERMA, I.M. (1990). Regulated mRNA stability. *Ann. Rev. Genet.*, **24**: 519-541.
- AVIV, H. & LEDER, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 1408-1412.
- BAINBRIDGE, B.W. (1991). Microbiological techniques for molecular biology: bacteria and phages. En: *Essential molecular biology: a practical approach* (ed. D. RICKWOOD & D. HAMES). Vol I, pp. 13-45. IRL Press, Oxford.
- BAND, R.N. (1963). Extrinsic requirements for encystation by the soil amoeba *Hartmannella rhysodes*. *J. Protozool.*, **10**: 101-107.
- BANNON, G.A., BOWEN, J.K., YAO, M.-C. & GOROVSKY, M.A. (1984). *Tetrahymena* H4 genes: structure, evolution and organization in macro- and micronuclear. *Nucl. Acids Res.*, **12**: 1961-1975.
- BENÍTEZ, I. (1990). Análisis del proceso criptobiótico en *Colpoda inflata*: Estudio de la cinética, cambios morfológicos y algunos aspectos metabólicos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología (UCM).
- BENITEZ, I., MARTÍN-GONZÁLEZ, A. & GUTIÉRREZ, J.C. (1991). Protein glycosylation has an important role in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell. Biol. Inter. Reports* **15**: 221-228.
- BENITEZ, I., MARTIN-GONZÁLEZ, A. & GUTIÉRREZ, J.C. (1994). Identification of precystic stages and encystment kinetics analysis of *Colpoda inflata* by using an immunofluorescent method. *J. Euk. Microbiol.*, **41**: 375-379.
- BENÍTEZ, I., PALACIOS, G., MARTÍN-GONZÁLEZ, A. & GUTIÉRREZ, J.C. (1992). Protein glycosylation in ciliate cryptobiosis. En: *Recent advances in cellular and molecular biology*. WEGMANN, R.J. & WEGMANN, M.A. (eds.). Vol. 4, pp. 357-364. París.
- BERENT, S.L., MAHMOUDI, M., TORCZYNSKI, R.M., BRAGG, P.W. & BOLLON, A.P. (1985). Comparison of oligonucleotides and long DNA fragments as probes in DNA and RNA dot, Southern, Northern, colony and plaque hybridizations. *BioTechniques*, may-june: 208-220.
- BERNIER, I., PALLOTA, D. & LEMIEUX, G. (1986a). Molecular cloning of mRNAs expressed specifically during spherulation of *Physarum polycephalum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **867**: 234-243.
- BERNIER, I., SELIGY, V.L., PALLOTA, D. & LEMIEUX, G. (1986b). Changes in gene expression during spherulation in *Physarum polycephalum*. *Biochem. Cell. Biol.*, **64**: 337-343.
- BERNIER, F., LEMIEUX, G. & PALLOTA, D. (1987). Gene families encode the major encystment-specific proteins of *Physarum polycephalum* plasmodia. *Gene*, **59**: 265-277.

- BJOURSON, A.J., STONE, C.E., & COOPER, J.E. (1992). Combined subtraction hybridization and polymerase chain reaction amplification procedure for isolation of strain-specific *Rhizobium* DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2296-2301.
- BLUMBERG, D.D. & LODISH, H.F. (1980). Changes in the messenger RNA population during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **78**: 285-300.
- BOEHRINGER-MANNHEIM (1993). The DIG-system user's guide for filter hybridization. pp: 49-53. Boehringer-Mannheim GmbH, Biochemica, Germany.
- BROWN, T.A. (1991). Generation and identification of recombinant clones. En *Essential molecular biology: a practical approach* (ed. D. RICKWOOD & D. HAMES). Vol I, pp. 161-177. IRL Press, Oxford.
- BURKE, D.J., SEALE, T.W. & MCCARTHY, B. (1972). Protein and ribonucleic acid synthesis during the diploid life cycle of *Allomyces arbuscula*. *J. Bacteriol.*, **110**: 1065-1072.
- BUSSEERS, J.C. (1976). Structure et composition du kyste de résistance de 4 protozoaires ciliés. *Protistologica (Europ. J. Protistol.)*, **12**: 87-100.
- BUSSEERS, J.C. & JEUNIAUX, CH. (1974). Recherche de la chitine dans les productions metaplasmatiques de quelques ciliés. *Protistologica (Europ. J. Protistol.)*, **10**: 43-46.
- BUTZEL, H.M. & MAYER, L. (1976). Effects of actinomycin-D and puromycin upon excystment of *Didinium nasutum*. *Genet. Res.*, **27**: 291-296.
- BYCHENKOVA, V.N., LOZINA-LOZINSKY, L.K. & MANALOV, T. (1969). Microscopic observations of the processes of freezing and thawing in *Colpoda maupasi*. *Zool. Zh.*, **48**: 1772-1779.
- CALVO, P., TORRES, A. & PÉREZ-SILVA, J. (1986). Ultrastructural and cytochemical study of the encystment in the hypotrichous ciliate *Histriculus similis*. *Arch. Protistenk.*, **132**: 201-211.
- CALVO, P., TORRES, A., NAVAS, P. & PÉREZ-SILVA, J. (1983). Complex carbohydrates in the cyst wall of *Histriculus similis*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 829-832.
- CAMONIS, J., JULIEN, J., AYALA, J. & JACQUET, M. (1982). Polyadenylated RNA population present in dormant spores of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Diff.*, **11**: 55-61.
- CASEY, J.L., HAUTZE, M.W., KOELLER, D.W., CAUGHMAN, S.W., RONALD, T.A., KLAUSNER, R.D. & HARFORD, J.B. (1988). Iron-responsive regulatory sequences that control mRNA levels and translation. *Science*, **240**: 924-928.
- CATHALA, G., SAVOURET, J.F., MENDEZ, B., WEST, B.L., KARIN, M., MARTIAL, J.A., & BAXTER, J.D. (1983). A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid. *DNA*, **2**: 329-335.
- CECH, T.R. (1986). Ribosomal RNA gene expression in *Tetrahymena*: transcription and RNA splicing. En: *The molecular biology of ciliated protozoa*. GALL, J.G. (ed.), pp. 203-225. Academic Press, New York.
- CHAGLA, A.M. & GRIFFITHS, A.J. (1978). Synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii* and their use in the study on encystation. *J. Gen. Microbiol.*, **108**: 39-43.
- CHIOVETTI, R. JR. & BOVEE, E.C. (1982). Effects of dinitrophenol, actinomycin-D and puromycin on encystment of the amoebflagellate, *Naegleria gruberi*. *Acta Protozool.*, **21**: 213-220.

- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MACDONALD, R.J. & RUTTER, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294-5299.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- CLANCY, M.J., BUTEN-MAGEE, B., STRAIGHT, D.J., KENNEDY, A.L., PARTRIDGE, R.M. & MAGEE, P.T. (1983). Isolation of genes expressed preferentially during sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3000-3004.
- CLEVELAND, D.W. (1989). Gene regulation through messenger RNA stability. *Curr. Op. Cell Biol.*, **1**: 1148-1153.
- CORLISS, J.O. & ESSER, S.C. (1974). Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of the free-living protozoa. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **93**: 578-593.
- CROWE, J.S., COOPER, H.J., SMITH, M.A., SIMS, M.J., PARKER, D. & GEWERT, D. (1991). Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nuc. Acids Res.*, **19**: 184.
- DALLAI, R., MICELI, C. & LUPORINI, P. (1987). *Euplotes rariseta* CURDS et al. (Ciliophora, Hypotrichida) from the somalian coast: description and preliminary observations on cyst induction and ultrastructure. *Monit. Zool. Ital.*, **22**: 263-280.
- DELGADO, P., CALVO, P. & TORRES, A. (1987). Encystment in the hypotrichous ciliate *Paraurostyla weisseri*: Ultrastructure and cytochemistry. *J. Protozool.*, **34**: 104-110.
- DEVINE, K.M., MORRISSEY, J.H. & LOOMIS, W.F. (1982). Differential synthesis of spore coat proteins in prespore and prestalk cells of *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7361-7365.
- DOWDS, B.C.A & LOOMIS, W.F. (1984). Cloning and expression of a DNA that comprises part of the gene coding for a spore coat protein of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 2273-2278.
- DYSON, N.J. (1991). Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis. In *Essential molecular biology: a practical approach* (ed. D. RICKWOOD & D. HAMES). Vol II, pp. 111-156. IRL Press, Oxford.
- ERRINGTON, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**: 1-33.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, C. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **137**: 266-267.
- FOISSNER, W. (1993). *Colpodea (Ciliophora)*. Protozoenfauna, Vol. 4/1. (ed. D. MATTCHEs). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Jena. New York.
- FRANCIS, D. & RUPAR, M. (1983). Genetics of microcystless mutants of *Polysphondylium pallidum*. *Dev. Genetics*, **4**: 69-76.
- GIESE, A.C. (1973). *Blepharisma*: The biology of a light-sensitive protozoan. Stanford Univ. Press., pp. 247-265.
- GITHENS, M.S. & KARNOVSKY, M.L. (1973). Biochemical changes during growth and encystment of the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *J. Cell. Biol.*, **58**: 522-535.
- GONG, C.-S. & LOVETT, J.S. (1977). Regulation of protein synthesis in *Blastocladia* zoospores: factors for synthesis in nonsynthetic spores. *Exp. Mycol.*, **1**: 138-151.

- GOODEY, T. (1913). The excystation of *Colpoda cucullus* from its resting cysts and the nature and properties of the cysts membranes. Proc. Roy. Soc. Lond., **86**: 427-439.
- GOUELI, S.A. & AHMED, K. (1991). A procedure for rapid isolation of cloned cDNA inserts using the polymerase chain reaction technique. BioTechniques, **10**: 306-309.
- GREENWOOD, S.J., SCHLEGEL, M., SOGIN, M.L. & LYNN, D.H. (1991). Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum ciliophora inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. J. Protozool., **38**: 1-6.
- GRIFFITHS, A.J. & BOWEN, S.M. (1969). Lysosomal activity and its control in encysting *Hartmannella castellanii*. J. Gen. Microbiol., **59**: 239-245.
- GRIMES, G.W. (1973). Differentiation during encystment and excystment in *Oxytricha fallax*. J. Protozool., **20**: 92-104.
- GUBLER, U. & HOFFMAN, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene, **25**: 263-269.
- GUTIÉRREZ, J.C. (1985). Quantitative cytochemical study of chromatin and histones on isolated macronuclear masses from the resting cyst of *Gastrostyla steinii*. Microbios, **43**: 43-51.
- GUTIÉRREZ, J.C. & PÉREZ-SILVA, J. (1983). Ultrastructural aspects of the precystic and cystic cytoplasm of the hypotrichous ciliate, *Laurentiella acuminata*. Acta Protozool., **22**: 203-210.
- GUTIÉRREZ, J.C. & MARTÍN-GONZÁLEZ, A. (1990). Evidence for a protein degradation and synthesis during encystment of the ciliate *Colpoda inflata*. Microbios letters, **43**: 57-63.
- GUTIÉRREZ, J.C., TORRES, A. & PÉREZ-SILVA, J. (1981). Excystment cortical morphogenesis and nuclear process during encystment and excystment in *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). Acta Protozool., **20**: 145-152.
- GUTIÉRREZ, J.C., TORRES, A. & PÉREZ-SILVA, J. (1983a). Fine structure of the cyst wall of *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida: Oxytrichidae). Trans. Am. Microsc. Soc., **102**: 55-59.
- GUTIÉRREZ, J.C., TORRES, A. & PÉREZ-SILVA, J. (1983b). Structure of the cyst wall precursors and kinetics of the appearance during the encystment of *Laurentiella acuminata* (Hypotrichida, Oxytrichidae). J. Protozool., **30**: 226-233.
- GUTIÉRREZ, J.C., TORRES, A. & PÉREZ-SILVA, J. (1984). Composition of the cyst wall of the hypotrichous ciliate *Laurentiella acuminata* I. Cytochemical, cytophotometrical, enzymatic analysis. Protistologica (Europ. J. Protistol.), **20**: 313-326.
- GUTIÉRREZ, J.C., MARTÍN-GONZÁLEZ, A. & MATSUSAKA, T. (1990). Towards a generalized model of encystment (cryptobiosis) in ciliates: a review and hypothesis. Biosystems, **24**: 17-24.
- HALVORSON, H.O. (1961). Cryptobiotic stages in Biology. En Cryptobiotic stages in biological systems. N. Grossowicz et al., eds. Elsevier Publishing Company (New York), pp. 51-64.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., **166**: 557-580.
- HARA, S. & OHYA, J. (1981). Studies on cyst formation in *Physarum polycephalum* myxamoebae. Bot. Mag. Tokyo, **94**: 83-89.

- HARPER, J.F., CLANCY, M.J. & MAGEE, P.T. (1980). Properties of polyadenilate-associated ribonucleic acid from *Saccharomyces cerevisiae* ascospores. *J. Bacteriol.*, **143**: 958-965.
- HELFTENBEIN, E. (1985). Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for  $\alpha$ -tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. *Nucleic. Acids Res.*, **13**: 415-433.
- HELFTENBEIN, E. & MÜLLER, E. (1988). Both  $\alpha$ -tubulin genes are transcriptionally active in *Stylonychia lemnae*. *Curr. Genet.*, **13**: 425-432.
- HENKEL, T., SCHMITZ, I. & BAEUERLE, P. (1993). Rapid characterization of cDNA clones after amplification and radioactive labeling with the PCR technique. *BioTechniques*, **14**: 906-908.
- HENNEY, H.R. (1985). Identification of developmentally regulated proteins of the microcyst wall of *Physarum flavicomum*. *Cytobios*, **42**: 235-242.
- HOLLOMON, D.W. (1969). Biochemistry of germination in *Peronospora tabacina* (Adam) conidia: evidence for the existence of stable messenger RNA. *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 267-274.
- HOLLOMON, D.W. (1973). Protein synthesis during germination of *Peronospora tabacina* conidia: an examination of the events involved in the initiation of germination. *J. Gen. Microbiol.*, **78**: 1-13.
- HOLT, P.A. & CHAPMAN, G.B. (1971). The fine structure of the cyst wall of the ciliated protozoan *Didinium nasutum*. *J. Protozool.*, **18**: 604-614.
- HOPPER, A.K., MAGEE, P.T., WELCH, S.K., FRIEDMAN, M. & HALL, B.D. (1974). Macromolecule synthesis and breakdown in relation to sporulation and meiosis in yeast. *J. Bacteriol.*, **119**: 619-628.
- HOROWITZ, S. & GOROVSKY, M.A. (1985). An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2452-2455.
- HUYNH, T.V., YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1985). Construction and screening cDNA libraries in lambda gt11. *En DNA cloning: a practical approach* (ed. D.M. GLOVER), Vol. 1, p. 49. IRL Press, Oxford.
- JACQUET, M., PART, D. & FELENBOK, B. (1981). Changes in the polyadenilated messenger RNA population during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **81**: 155-166.
- JAWORSKI, A.J. (1976). Synthesis of polyadenylic acid RNA during zoospore differentiation and germination in *Blastocladiella emersonii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**: 201-209.
- JAWORSKI, A.J. & STUMHOFER, P. (1983). Inhibition *in vitro* protein synthesis by subribosomal particles isolated from *Blastocladiella emersonii* zoospores. *Exp. Mycol.*, **7**: 47-56.
- JAWORSKI, A.J. & STUMHOFER, P. (1984). Dormant ribosomes in *Blastocladiella emersonii* zoospores are arrested at elongation. *Exp. Mycol.*, **8**: 13-24.
- JAWORSKI, A.J. & THOMSON, K. (1980). A temporal analysis of the synthesis of the mRNA sequestered in zoospores of *Blastocladiella emersonii*. *Dev. Biol.*, **75**: 343-357.
- JEHAN, M. & DUTTA, G.P. (1977). Effect of metabolic inhibitors on excystment process in amoebae. *Protistologica*, **13**: 181-186.
- JOHNSON, S.A., LOVETT, J.S. & WILT, F.M. (1977). The polyadenylated RNA zoospores and growth phase cells of the

- aquatic fungus *Blastocladiella*. *Develop. Biol.*, **56**: 329-342.
- JULIEN, J., CAMONIS, J. & JACQUET, M. (1982). Cloning and analysis of a genomic fragment of *Dictyostelium discoideum* hybridizing to an RNA specifically accumulated in spore cells. *EMBO J.*, **1**: 1089-1093.
- JULIEN, J., BOGDANOVSKY-SEQUEVAL, D., FELENBOK, B. & JACQUET, M. (1984). Expression of a spore-specific gene in *Dictyostelium discoideum*. *Cell. Diff.*, **15**: 37-42.
- KAENE, B.P. & SPEAR, B.B. (1982). Nucleotide sequence of a macronuclear gene for actin in *Oxytricha fallax*. *Nature*, **295**: 430-432.
- KEILIN, F.R.S. (1959). The problem of anaerobiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Roy. Soc. London*, **150**: 149-191.
- KESSLER, C. (1992). Standard nonradioactive labeling and detection systems. En "Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. (C. Kessler ed.), pp 27-40. Springer-Verlag. New York.
- KILLICK, K.A. & WRIGHT, B.E. (1974). Regulation of enzyme activity during differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**: 139-166.
- KIMMEL, A.R. & BERGER, S.L. (1987). Preparation of cDNA and generating of cDNA libraries: overview. *Meth. Enzymol.*, **152**: 307-316.
- KLAR, A.J.S. & HALVORSON, H.D. (1975). Proteinase activities of *Saccharomyces cerevisiae* during sporulation. *J. Bacteriol.*, **124**: 608-685.
- KLOBUTCHER, L.A., JAHN, C.I. & PRESCOTT, D.M. (1984). Internal sequences are eliminated from genes during macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha nova*. *Cell*, **36**: 1045-1055.
- KLOBUTCHER, L.A., TURNER, L.R. & PERALTA, E. (1991). Sequence of a *Euplotes crassus* macronuclear DNA molecule encoding a protein with homology to a rat form-I phosphoinositide-specific phospholipase-C. *J. Protozool.*, **38**: 425-427.
- KNIGHT, R.H. & VAN ETTEN, J.L. (1976a). Characteristics of ribonucleic acids isolated from *Botryodiplodia theobromae* pycnidiospores. *Arch. Microbiol.*, **109**: 45-50.
- KNIGHT, R.H. & VAN ETTEN, J.L. (1976b). Synthesis of ribonucleic acids during the germination of *Botryodiplodia theobromae* pycnidiospores. *J. Gen. Microbiol.*, **95**: 257-267.
- KOZAK, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**: 283-292.
- LARSEN, A. & SYPHERD, P. (1980). Physiological control of phosphorylation of ribosomal protein S6 in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, **141**: 20-25.
- LASMAN, M. (1967). Observations on acid phosphatase in *Mayorella palestinensis*. *J. Cell. Physiol.*, **69**: 151-154.
- LASMAN, M. & SHAFRAN, A. (1978). Induction of encystment in *Acanthamoeba palestinensis*. Factors influencing cyst formation. *J. Protozool.*, **25**: 489-491.
- LEE, S.W., TOMASETTO, C. & SAGER, R. (1991). Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 2825-2829.

- LÉJOHN, H.B. (1983). Changes in gene expression patterns for specific proteins when vegetatively growing cells of the fungus *Achlya* are induced to differentiate by starvation. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **61**: 1172-1184.
- LESTOURGEON, W.M. & RUSH, H.P. (1973). Localization of nucleolar and chromatin residual acidic protein changes during differentiation in *Physarum polycephalum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**: 144-158.
- LIANG, A., SCHMIDT, H.J. & HECKMANN, K. (1994). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin genes of *Euplotes octocarinatus*. *J. Euk. Microbiol.*, **41**: 163-169.
- LINZ, J.E. & ORLOWSKI, M. (1982). Stored mRNA in sporangiospores of the fungus *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, **150**: 1138-1144.
- LINZ, J.E. & ORLOWSKI, M. (1984). Differential gene expression during aerobic germination of *Mucor racemosus* sporangiospores. *J. Bacteriol.*, **159**: 965-972.
- LINZ, J.E. & ORLOWSKI, M. (1987). Regulation of gene expression during aerobic germination of *Mucor racemosus* sporangiospores. *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 141-147.
- LINZ, J.E. & ORLOWSKI, M. (1991). Differential gene expression and evidence of selective translocation during anaerobic germination of *Mucor racemosus* sporangiospores. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 827-835.
- LION, T. & HAAS, O.A. (1990). Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **188**: 335-337.
- LOOMIS, W.F., Jr. (1970). Developmental regulation of  $\alpha$ -mannosidase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.*, **103**: 375-381.
- LOOMIS, W.F., Jr. (1990). Essential genes for development of *Dictyostelium*. En "Progress in Molecular and Subcellular Biology. W.E.G. Müller (ed). pp. 159-183. Springer-Verlag. New York.
- MCARDLE, E.W., BERQUIST, B.L. & EHVET, C.F. (1980). Structural changes in *Tetrahymena rostrata* during induced encystment. *J. Protozool.*, **27**: 388-397.
- MACLEOD, C., FIRTEL, R.A. & PAPKOFF, J. (1980). Regulation of actin gene expression during spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, **76**: 263-274.
- MANGIAROTTI, G., GIORDA, R., CECCARELLI, A. & PERLO, C. (1985). mRNA stabilization controls the expression of a class of developmentally regulated genes in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5786-5790.
- MARTIN, S.M. BYERS, T.J. (1976). Acid hydrolase activity during growth and encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.*, **23**: 608-613.
- MARTINDALE, D.W. (1989). Codon usage in *Tetrahymena* and other ciliates. *J. Protozool.*, **36**: 29-34.
- MARTINDALE, D.W. & BRUNS, P.J. (1983). Cloning of abundant mRNA species present during conjugation of *Tetrahymena thermophila*: Identification of mRNA species present exclusively during meiosis. *Mol. Cell Biol.*, **3**: 1857-1865.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A., BENÍTEZ, L. & GUTIÉRREZ, J.C. (1991a). Cortical and nuclear events during cell division and resting cyst formation in *Colpoda inflata*. *J. Protozool.*, **38**: 338-344.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A., PALACIOS, G. & GUTIÉRREZ, J.C. (1994). Cyst wall precursors of *Colpoda inflata*: a

- comparative ultrastructural study and a review of ciliate cyst wall precursors. *Cytobios*, **77**: 215-223.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A., BENÍTEZ, L., CORTADELLAS, N. & GUTIÉRREZ, J.C. (1991b). Detection of antigenic cyst wall elements in *Colpoda inflata*: An immunoelectron microscopic study and immunoblotting identification of cyst wall polypeptides. *Cell. Mol. Biol.*, **37**: 21-27.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A., BENÍTEZ, L., PALACIOS, G. & GUTIÉRREZ, J.C. (1992). Ultrastructural analysis of resting cyst and encystment in *Colpoda inflata*. I. Normal and abnormal resting cysts. *Cytobios*, **72**: 7-18.
- MATSUSAKA, T. (1976). An ultrastructural study of encystment in the hypotrichous ciliate, *Pleurotricha* sp. *Kumamoto J. Sci. Biol.*, **13**: 13-26.
- MATSUSAKA, T. (1977). Induction of synchronous encystment in hypotrichous ciliate, *Histiculus* sp. *Exp. Cell. Res.*, **110**: 459-462.
- MATSUSAKA, T. (1979). Effects of cycloheximide on the encystment and ultrastructure of the ciliate, *Histiculus*. *J. Protozool.*, **26**: 619-625.
- MATSUSAKA, T. & HONGO, F. (1984). Cytochemical and electrophoretic studies on the cyst wall of a ciliate, *Histiculus muscorum* Kahl. *J. Protozool.*, **31**: 471-475.
- MATSUSAKA, T. & KIMURA, S. (1981). Changes in macronuclear ultrastructure during encystment in a ciliate, *Histiculus muscorum*. *Kumamoto J. Sci. Biol.*, **15**: 49-58.
- MEHDY, M.C., RATNER, D. FIRTEL, R.A. (1983). Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell*, **32**: 763-771.
- MESSING, J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.*, **2**: 43.
- MEYER, F., SCHMIDT, H.J. & HECKMANN, K. (1992). Pheromone 4 gene of *Euplotes octocarinatus*. *Dev. Genet.*, **13**: 16-25.
- MEYER, F., SCHMIDT, H.J., PLÜMPER, E., HASILIK, A., MERSMANN, G., MEYER, H.E., ENGSTRÖM, A. & HECKMANN, K. (1991). UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 3758-3761.
- MICELI, C., LA TERZA, A. & MELLI, M. (1989). Isolation and structural characterization of cDNA clones encoding the mating pheromone Er-1 secreted by the ciliate *Euplotes raikovi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 3016-3020.
- MICHELI, M.R., BOVA, R., CALISSANO, P. & D'AMBROSIO, E. (1993). Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. *BioTechniques*, **15**: 388-390.
- MIRKES, P.E. & MCCALLEY, B. (1976). Synthesis of polyadenylic acid-containing ribonucleic acid during the germination of *Neurospora crassa* conidia. *J. Bacteriol.*, **125**: 174-180.
- MOIR, A., KEMP, E.H., ROBINSON, C. & CORFE, B.M. (1994). The genetic analysis of bacterial spore germination. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 9S-16S.
- MORAT, G., CHessa, M.G. & CRIPPA-FRANCHESCHI, T. (1981). Étude de la régulation des teneurs en ADN nucléaire chez le cilié *Colpoda cucullus*. *Protistologica*, **17**: 313-329.
- MURTI, C.R.K. (1971). Encystment of amoebae. *Curr. Sci.*, **22**: 589-593.

- NAKAMURA, T. & MATSUSAKA, T. (1985). Presence of a tubulin pool in the resting cyst of the hypotrich ciliate, *Histiculus muscorum*. *Cell Biol. Int. Reports*, **9**: 965-969.
- NAKAMURA, T. & MATSUSAKA, T. (1992a). Reversibility of encystment in the ciliate, *Histiculus cavicola* (KAHL, 1935) (Ciliophora: Stichotrichia). *Europ. J. Protistol.*, **28**: 51-55.
- NAKAMURA, T. & MATSUSAKA, T. (1992b). Temporal suspension of excystment by salt solution in the ciliate, *Histiculus cavicola* (KAHL, 1935) (Ciliophora: Stichotrichia). *Europ. J. Protistol.*, **28**: 299-304.
- NELSON, R.K. & ORLOWSKI, M. (1982). Biochemical and physiological changes during spore germination and swarm cell morphogenesis in the acellular slime mold *Fuligo septica*. *Can. J. Microbiol.*, **28**: 951-958.
- NEVINS, J.R. (1983). The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 441-466.
- O'DAY, D.H. (1973).  $\alpha$ -mannosidase and microcyst differentiation in the cellular slime mold *Polysphondilium pallidum*. *J. Bacteriol.*, **113**: 192-197.
- OKAYAMA, H. & BERG, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell Biol.*, **2**: 161-170.
- ORLOWSKI, M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.*, **55**: 234-258.
- PALACIOS, G., MARTÍN-GONZÁLEZ, A. & GUTIÉRREZ, J.C. (1994). Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell Biol. Int.*, **18**: 223-228.
- PALLOTA, D., LAROCHE, A. & TESSIER, A. (1986). Molecular cloning of stage specific mRNAs from amoebae and plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Biochem. Cell Biol.*, **64**: 1294-1302.
- PIGON, A. (1961). Change of enzyme activity during starvation of a ciliate (*Urostyla*). *Acta Biológica Cracov.*, **4**: 123-142.
- PIGON, A. & EDSTRÖM, J.F. (1961). Excystment ability, respiratory metabolism, and ribonucleic acid content in two types of resting cysts of *Colpoda cucullus* O.F. Müller. *J. Protozool.*, **8**: 257-260.
- PODGORSKI, G.J., FRANKE, J. & KESSIN, R.H. (1986). Isolation of a cDNA encoding a portion of the cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 1043-1050.
- PORTEUS, D.J. (1986). Rapid isolation and characterization of hybridization selected recombinants from lambda genomic libraries. *Anal. Biochem.*, **159**: 17-23.
- POTTER, J.L. & WEISMAN, R.A. (1972). Correlation of cellulose synthesis *in vitro* during the encystment of *Acanthamoeba*. *Dev. Biol.*, **28**: 472-479.
- PREER, J.R. JR., PREER, L.B., RUDMAN, B. & BARNETT, A. (1987). Molecular biology of the genes for immobilization antigens in *Paramecium*. *J. Protozool.*, **34**: 418-423.
- PRESCOTT, D.M. (1994). The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.*, **58**: 233-267.
- RAIZADA, M.K. & MURTI, C.R.K. (1971). Changes in the activity of certain enzymes of *Hartmannella* (Culbertson strain A-1) during encystment. *J. Protozool.*, **18**: 115-119.
- RAIZADA, M.K. & MURTI, C.R.K. (1972). Synthesis of RNA, protein, cellulose and mucopolysaccharide, and changes in the chemical composition of *Hartmannella culbertsoni* during encystment under axenic conditions. *J. Protozool.*, **19**: 691-695.

- RAMAGOPAL, S. & ENNIS, H.L. (1981). Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**: 3083-3087.
- RICCI, N., VERNI, F. & ROSATI, G. (1985). The cyst of *Oxytricha bifaria* (Ciliata: Hypotrichida). I. Morphology and significance. Trans. Am. Microsc. Soc., **104**: 70-78.
- RÍOS, R.M., MARTÍN, J., TORRES, A. & FEDRIANI, C. (1992). Production and characterization of three polyclonal antibodies raised against cyst wall proteins of a hypotrichous ciliate. J. Protozool., **39**: 584-588.
- RÍOS, R.M., SARMIENTO, R., TORRES, A. & FEDRIANI, C. (1989). Solubilization and electrophoretic studies of cyst wall protein of a hypotrichous ciliate. Biol. Cell, **67**: 271-279.
- RÍOS, R.M., TORRES, A., CALVO, D. & FEDRIANI, C. (1985). The cyst of *Urostyla grandis* (Hypotrichida: Urostylidae): ultrastructure and evolutionary implications. Protistologica, **21**: 481-485.
- ROHEIM, J.R., KNIGHT, R.H. & VAN ETTEN, J.L. (1974). Synthesis of ribonucleic acids during germination of *Rhizopus stolonifer* sporangiospores. Develop. Biol., **41**: 137-145.
- ROWEKAMP, W. & FIRTEL, R.A. (1980). Isolation of developmentally regulated genes from *Dictyostelium*. Dev. Biol., **79**: 409-418.
- RUBIN, R.W., MILL, M.C., HEPWORTH, P. & BOEHMER, J. (1975). Isolation and electrophoretic analysis of nucleoli, phenol-soluble nuclear proteins, and other cyst walls from *Acanthamoeba castellanii* during encystation initiation. J. Cell. Biol., **68**: 740-751.
- RUDICK, V.L. (1971). Relationships between nucleic and synthetic patterns and encystment in aging unagitated cultures of *Acanthamoeba castellanii*. J. Cell Biol., **49**: 498-506.
- RUDICK, V.L. & WEISMAN, R.A. (1973). DNA-dependent RNA polymerase from trophozoites and cyst of *Acanthamoeba castellanii*. Biochim. Biophys. Acta, **299**: 91-102.
- RUTHERFORD, C.L., VAUGHAN, R.A., CLOUTIER, M.J., NARANAN, V., BRICKEY, D.A. & FERRIS, D.K. (1985). Compartmentation in *Dictyostelium*. Ann. Rev. Microbiol., **39**: 271-298.
- RUTHMANN, A. & KUCK, A. (1985). Formation of the cyst wall of the ciliate *Colpoda steinii*. J. Protozool., **32**: 677-682.
- SAMBROOK, J., FRIISCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor, NY: Cold spring Harbor Laboratory.
- SAUER, H.W., BABCOCK, K.L. & RUSCH, H.P. (1969). Changes in RNA synthesis associated with differentiation (sporulation) in *Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys. Acta, **195**: 410-421.
- SAVARD, L., LAROCHE, A., LEMIEUX, G. & PALLOTA, D. (1989). Developmentally regulated late mRNAs in the encystment of *Physarum polycephalum* plasmodia. Biochim. Biophys. Acta, **1007**: 264-269.
- SCHLICHTING, H.E. & SIDES, S.I. (1969). The passive transport of aquatic microorganisms by selected hemiptera. J. Ecol. **57**: 759-764.
- SCHMIDT, H.J., BOTTKER, N., TECKENTRUP, W. & HECKMANN, K. (1991). A comparative study of RNAs from four ciliate groups and a mollusc and data on their poly(A)<sup>+</sup> RNA in vitro translation. Europ. J. Protistol., **27**: 343-351.
- SENDO, Y. & MATSUSAKA, T. (1982). Changes in two acid hydrolase levels during cyst differentiation of a ciliate, *Histiculus muscorum*. J. Protozool., **29**: 125-129.

- SILVA, A.M., MACA, J.C.C. & JULIANI, M.H. (1987). Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.*, **169**: 2069-2078.
- SINGLETON, C.K., MANNING, S.S. & FENG, Y. (1988). Effect of protein synthesis inhibition on gene expression during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 10-16.
- SIVE, H.L. & JOHN, T.S. (1988). A simple subtractive hybridization technique employing photoactivable biotin and phenol extraction. *Nucleic Acid Res.*, **16**: 10937.
- SKRDLANT, I.B. & WEISMAN, R.A. (1976). Glucolipid synthesis in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.*, **23**: 613-618.
- SMITH, B.A. & BURKE, D.D. (1979). Evidence for the presence of messenger ribonucleic acid in *Allomyces macrogynus* mitospores. *J. Bacteriol.*, **138**: 535-541.
- SOARES, M.C.M., FARO DE CASTRO, J., RONDINELLI, E., DE CARVALHO, E., SAMEL, C. & DE CASTRO, F.T. (1984). Poly (A)<sup>+</sup> RNA metabolism during change of physiological state of *Tetrahymena pyriformis* cells. *Exp. Cell Res.*, **154**: 591-599.
- STANDART, N. & JACKSON, R. (1994). Y the message is masked?. *Curr. Biol.*, **4**: 939-941.
- STAPLES R.C., BEDIGIAN, D. & WILLIAMS, P.H. (1968). Evidence for polysomes in extracts of bean rust uredospores. *Phytopathology*, **58**: 151-154.
- STEVENS, A.R. & PACHLER, P.F. (1973). RNA synthesis and turnover during density-inhibited growth and encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Biol.*, **57**: 525-537.
- SYKES, D.E. & BAND, R.N. (1985). Polyphenol oxidase produced during encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.*, **32**: 512-517.
- TAGU, D. (1993). Identifying false positives during the first round of cDNA library screening. *BioTechniques*, **15**: 822.
- TAYLOR, C.V. & STRICKLAND, A.G.R. (1936). Reactions of *Colpoda duodenaria* to environmental factors. II. Factors influencing the formation of resting cysts. *Physiol. Zool.*, **12**: 219-230.
- TIBBS, J. (1966). The cyst wall of *Colpoda steinii*. A substance rich in glutamic acid residues. *Biochem. J.*, **98**: 645-651.
- TIBBS, J. (1968). Fine structure of *Colpoda steinii* during encystment and excystment. *J. Protozool.*, **15**: 725-732.
- TIBBS, J. (1982). Covalent bonding of protein to polyamine in the cyst coat of the protozoan *Colpoda steinii*. *Eur. J. Biochem.*, **122**: 535-539.
- TIBBS, J. & MARSHALL, B.J. (1970). Cyst wall protein synthesis and some enzyme changes on starvation and encystment in *Colpoda steinii*. *J. Protozool.*, **17**: 125-128.
- TIKHONENKO, A.S., BESPALOVA, I.A., MARTINKINA, L.P. & POPENKO, V.I. (1984). Structural organization of macromolecular chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella* in resting cysts and at excysting. *Eur. J. Cell. Biol.*, **33**: 37-42.
- TIMBERLAKE, W.E. (1980). Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.*, **78**: 497-510.
- VAN ETTEN, J.L. & FREER, S.N. (1978). Polyadenylate-containing RNA in dormant and germinating sporangiospores

- of *Rhizopus stolonifer*. *Exp. Mycol.*, **2**: 301-312.
- VERNI, F., ROSATI, G. & RICCI, N. (1984). The cyst of *Oxytricha bifaria* (Ciliata Hypotrichida). II. The ultrastructure. *Protistologica* (Europ. J. Protistol.), **20**: 87-95.
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 615-619.
- WALKER, G.K. & HOFFMAN, J.T. (1985). An ultrastructural examination of cyst structure in the hypotrich ciliate *Gonostomum* sp. *Cytobios*, **44**: 153-161.
- WALKER, G.K. & MAUGEL, T.K. (1980). Encystment and excystment in hypotrich ciliates. II. *Diophrys scutum* and remarks on comparative features. *Protistologica* (Europ. J. Protistol.), **16**: 525-531.
- WALKER, G.K., MAUGEL, T.K. & GOODE, D. (1975). Some ultrastructural observations on encystment in *Stylonychia mytilus* (Ciliophora: Hypotrichida). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **94**: 147-154.
- WALKER, G.K., MAUGEL, T.K. & GOODE, D. (1980). Encystment and excystment in hypotrich ciliates. I. *Gastrostyla steinii*. *Protistologica* (Europ. J. Protistol.), **16**: 511-524.
- WATTS, D.J. (1984). Protein synthesis during development and differentiation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.*, **220**: 1-14.
- WEISMAN, R.A. (1976). Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**: 189-219.
- WEISMAN, R.A., SPIEGEL, R.S. & MCCAULER, J.G. (1970). Differentiation in *Acanthamoeba* glycogen levels and glycogen synthetase activity during encystment. *Biochim. Biophys. Acta*, **201**: 45-53.
- WHITE, H.U. & HENNEY, M.R. JR. (1985). Adenine inhibits microcyst formation in *Physarum flavicomum* and affects the cellular level of S-adenosylmethionine. *Protoplasma*, **125**: 36-42.
- WILLIAMS, J.G. & LLOYD, M.M. (1979). Changes in the abundance of polyadenylated RNA during slime mould development measured using cloned molecular hybridization probes. *J. Mol. Biol.*, **129**: 19-35.
- YANCOPOULUS et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5759-5763.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-119.
- YANIV, Z. & STAPLES, R.C. (1971). The purification and properties of the aminoacyl-tRNA binding enzyme from bean rust uredospores. *Biochim. Biophys. Acta*, **232**: 717-725.
- YIN-CHANG, L. & YIH-CHENG, C. (1990). Formaldehyde in formaldehyde/agarose gel may be eliminated without affecting the electrophoretic separation of RNA molecules. *BioTechniques*, **9**: 558-560.
- YONEZAWA, F. (1985a). The relationship between encystment and the phases of cell cycle in *Euplotes encysticus* (Ciliophora). *J. Sci. Hiroshima Univ.*, **32**: 47-55.
- YONEZAWA, F. (1985b). Effects of Actinomycin-D, RNase and protein synthesis inhibitors on encystment in *Euplotes encysticus* (Ciliophora). *J. Sci. Hiroshima Univ.*, **32**: 73-82.
- YONEZAWA, F. & TAKAHASHI, T. (1989). Encystment inducing substance of the ciliate *Euplotes encysticus*. VIII International Congress of Protozoology. Tsukuba, Japan.

- YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 1194.
- ZHU, C. & HENNEY, H.R.JR. (1990). DNA methylation pattern during the encystment of *Physarum flavicomum*. *Biochem. Cell Biol.*, **68**: 944-948.