



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos
Profesionales y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades

Centro de Investigación sobre Fijación de
Nitrógeno

“CONSTRUCCION Y ANALISIS DE BANCOS
DE GENES DEL HONGO *Neurospora crassa*”

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P r e s e n t a

MA. DE LOURDES GIRARD CUESY

1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fué realizada
en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno,
bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado, a quién
agradezco sus enseñanzas, críticas, interés, apoyo y amistad
constantes.

Agradezco a los doctores Guillermo Dávila, Federico Sánchez, Rafael Palacios y Jaime Mora quienes participaron muy de cerca en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, críticas y apoyo.

A Cheli por su valiosa colaboración y amistad.

A David por su constante crítica y estímulo.

A Estela por su excelente ayuda en la transcripción de esta tesis.

A Agustín por su amor, paciencia y total apoyo y comprensión.

A Mariano, mi pequeño "gorila" , por el nuevo significado que le ha dado a mi vida y lo estimulante que ha resultado.

A mis papás por su amor y apoyo, y porque siempre me enseñaron y dieron lo mejor.

A mis hermanos por su cariño y estímulo.

A la familia de Leonardo por su apoyo y cariño.

A Edmundo, mi maestro.

Y a todos mis amigos y compañeros del CIFN.

INDICE

I) INTRODUCCION	
- Aspectos biológicos de la asimilación de amonio en el hongo <i>Neurospora crassa</i>	1
- Organización del genoma de <i>Neurospora crassa</i>	7
- Genes de <i>Neurospora crassa</i> clonados molecularmente	9
- DNA recombinante	14
- Lambda como vector de clonación	17
- El fago λ 1059: un vector de clonación con selección positiva para recombinantes	21
II) OBJETIVO	24
III) MATERIALES Y METODOS	
- Construcción de bancos de genes de <i>Neurospora crassa</i>	25
- Síntesis de cDNA de cadena sencilla marcado radiactivamente con ^{32}P	25
- Hibridización de ácidos nucleicos	26
- Análisis de proteínas en minicélulas de <i>E. coli</i>	28
IV) RESULTADOS	29
V) DISCUSION	36
VI) APENDICE	44
VII) BIBLIOGRAFIA	46
VIII) FIGURAS	55
ARTICULO	

I). INTRODUCCION

ASPECTOS BIOLOGICOS DE LA ASIMILACION DE AMONIO EN EL HONGO *Neurospora crassa*

El nitrógeno es un elemento esencial para todos los organismos ya que es encontrado en muchos compuestos simples y macromoléculas complejas tales como las proteínas y los ácidos nucleicos, que son especialmente ricas en nitrógeno. Por ello no es de sorprender que exista una maquinaria metabólica que comprende -- vías catabólicas y anabólicas de compuestos nitrogenados para suplir de éste elemento a la célula. Numerosos estudios sobre metabolismo nitrogenado y su control se han llevado a cabo en *Neurospora* así como en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Aspergillus nidulans*. En especial, el hongo *Neurospora crassa* ha sido un organismo muy útil en experimentación para el estudio de estos sistemas regulatorios en eucariotes.

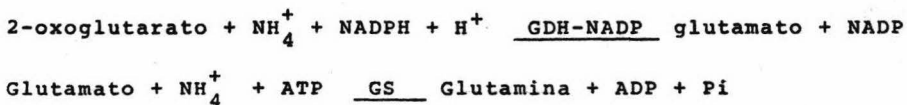
Amonio, glutamina y glutamato son las mejores fuentes de nitrógeno, aunque estos organismos son capaces de utilizar diversas fuentes secundarias de nitrógeno, que incluyen nitrito, nitrato, purinas, proteínas, aminoácidos, acetamida y aún acrilamida. El uso de estas fuentes secundarias requiere de la síntesis de enzimas catabólicas específicas o de la activación de enzimas preexistentes (1).

La regulación de vías catabólicas comunmente involucra tanto inducción específica, por el sustrato de la vía o un derivado de éste, como represión ejercida directa o indirectamente por un

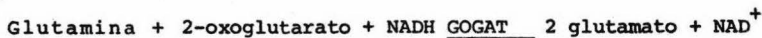
producto del catabolismo. Generalmente este es un metabolito tal como amonio, glucosa (ó un producto de glicolisis) ó fosfato. Un objetivo primordial de estos estudios es tratar de entender las señales genéticas y metabólicas que son responsables de la regulación (2).

La mayoría de los genes regulatorios de los hongos no están ligados a sus genes estructurales. Numerosos genes no ligados que codifican para enzimas del metabolismo nitrogenado están como grupo reguladas negativamente por la denominada represión - catabólica nitrogenada y son controlados positivamente por nit-2 un gene regulatorio general para nitrógeno. El metabolismo del fósforo, del azufre y la síntesis de cadenas de aminoácidos ramificados están sujetos a sistemas de control similares (3).

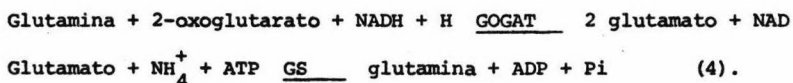
Posiblemente, el mejor ejemplo de regulación general corresponde a aquellas enzimas y sistemas de transporte cuya función es dar amonio a la célula. La incorporación de amonio a compuestos orgánicos para la biosíntesis de compuestos nitrogenados celulares es llevada a cabo primariamente vía la acción secuencial de la glutamato deshidrogenasa (GDH) dependiente de NADP y la glutamino sintetasa (GS); de la siguiente forma:



Otra enzima involucrada, la glutamato sintasa (GOGAT) puede catalizar la formación de glutamato a partir de glutamina y oxoglutarato por medio de la reacción:



La GOGAT acoplada con la GS funciona en la asimilación de amonio bajo condiciones de limitación ó en ausencia ó deficiencia de la GDH-NADP:



Hasta ahora los numerosos estudios de asimilación de nitrógeno en *N. crassa* han indicado la existencia de dos vías diferentes que operan bajo concentraciones de alto o bajo amonio. En exceso de amonio, la GDH-NADP y la GS octamérica, formada -- por monómeros β , participan en la asimilación de amonio. Cuando el nitrógeno es limitante, la GS tetramérica, formada por monómeros α y una GOGAT dependiente de NADH son responsables de la asimilación de amonio (8,9,10,12,19,20).

La glutamino sintetasa (GS) juega un papel central en el metabolismo nitrogenado. La glutamina puede ser considerada un producto final del catabolismo de compuestos nitrogenados y -- como iniciador en la biosíntesis de muchos metabolitos que participan en la formación de importantes macromoléculas en la célula, tales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

La GS de *N. crassa* ha sido ampliamente estudiada por los grupos de investigación del Dr. Rafael Palacios y del Dr. Jaime Mora. Pasos claves en estos estudios fueron su purificación por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa-antranflico (5), la obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra la enzima purificada y la traducción de su mRNA en un sistema libre de células derivado de reticulocitos de conejo (6). La

GS purificada por este método es una enzima octamérica compuesta de monómeros idénticos con peso molecular de 48,000 daltones (5).

La fuente de nitrógeno regula la concentración y la síntesis *de novo* de la GS en *Neurospora* ajustando los niveles de mRNA específicos de la enzima. En glutamato como fuente de nitrógeno, la actividad de la glutamino sintetasa es diez veces mayor que la encontrada cuando el hongo esta creciendo en glutamina, y los niveles de mRNA específico presentan diferencias similares (7).

En *Neurospora crassa* los dos polipéptidos que participan en la actividad de la glutamino sintetasa, pueden ser separados por electroforesis en geles de acrilamida en SDS-urea, donde α corre mas lentamente que β (8). El estado oligomérico menor de la GS también se encuentra en cepas mutantes de *Neurospora* con auxotrofia parcial para glutamina, gln1-a y gln1-b (11).

Al igual que la fuente de nitrógeno, aunque a diferentes niveles, la fuente de carbono regula a la GS de *Neurospora*. El micelio del hongo degrada GS cuando es privado de la fuente de carbono, ya que en cultivos limitados de carbono la actividad de la enzima es baja (12). Al igual que la privación de nitrógeno, el ayuno de carbono dispara un cambio de la GS octamérica a la enzima tetramérica. Al privar el micelio de nitrógeno y carbono, la proteína es degradada, y el amonio formado es excretado al medio; esta degradación específica de GS parece ser un mecanismo regulatorio para prevenir la síntesis de glutamina y liberar esqueletos de carbono para dar energía (13).

La restauración de la fuente de carbono, después de una privación, no ocasiona que el micelio regrese a su condición me-

tabólica original. El hecho de que al incubar el micelio con glu tamina ocurra una disminución en la poza de glutamina, un aumento en 2-oxoglutarato a concentraciones similares a las anteriores a la deprivación, y un aumento en glutamato a concentraciones similares a las encontradas cuando glutamato es la fuente de nitrógeno, sugiere que la fuente de carbono es necesaria para la conversión de glutamina a glutamato (13).

La existencia de auxótrofos parciales de glutamina que tienen β deficientes o que han perdido este polipéptido; el hecho de que no exista una relación precursor-producto entre los polipéptidos α y β en un sistema de traducción *in vitro* (8); y que -- puede haber algo de separación de los mRNA específicos (10); indica que, al menos, dos mRNA son responsables de la síntesis de la glutamino sintetasa en *Neurospora crassa* y sugieren la existencia de dos genes estructurales.

El aislamiento de cepas mutantes deficientes en el polipéptido α de GS y la clonación molecular de las secuencias responsables para la síntesis de la glutamino sintetasa, darían una evidencia inequívoca de la existencia de dos genes para dos glutamino sintetasa en *Neurospora crassa*.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) ocupa una posición estratégica en el metabolismo nitrogenado. Diferentes especies de levaduras y hongos filamentosos tales como *Neurospora crassa* poseen dos glutamato deshidrogenasas: una dependiente de NADP, con un papel biosintético, y otra que depende de NAD y que cataboliza glutamato. La GDH biosintética cataliza la aminación reducti-

va de α -cetoglutarato para dar glutamato y la catabólica la deaminación oxidativa de glutamato para dar α -cetoglutarato y amonio (1).

Para entender la asimilación de amonio es necesario establecer los niveles en los que los controles regulatorios operan en las vías de dicha asimilación.

Se ha reportado que la regulación de GDH-NADP por la fuente de nitrógeno es ejercida a nivel de síntesis específica de la enzima (14). Al crecer la cepa silvestre de *N. crassa* (74-A) en medio mínimo con sacarosa, en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno, los tiempos de duplicación son 4, 3, 3.25 y 2 horas al usar nitrato, amonio, glutamato y glutamina respectivamente. La actividad enzimática específica alcanza sus niveles más altos cuando el hongo crece en una fuente de nitrógeno inorgánica, especialmente después de doce horas de crecimiento. Cuando el amonio es la fuente de nitrógeno, tanto la actividad enzimática específica como la incorporación de aminoácidos radiactivos en la GDH-NADP son tres veces más elevados que cuando el glutamato es la fuente de nitrógeno, indicando que la regulación de la enzima por la fuente de nitrógeno es ejercida a nivel de síntesis enzimática específica (14).

También se han llevado a cabo estudios genéticos y estructurales que han establecido la estructura oligomérica y la secuencia de aminoácidos de la enzima. El gene estructural para la GDH-NADP ha sido identificado en *Neurospora*, así como en *Aspergillus* y levaduras. En *Neurospora crassa* el gene am, localiz-

zado en el grupo de ligamiento V (15), codifica para un hexámero compuesto de seis subunidades idénticas de 452 residuos de aminoácidos de longitud, con un peso molecular de 48,000 (1,16,17,18)

La otra enzima que participa en la asimilación de amonio en *N. crassa* es la glutamato sintasa (GOGAT). La presencia de esta enzima en *Neurospora* fué demostrada en cultivos limitados de amonio de una cepa que carece de GDH biosintética (19). La existencia de GOGAT le da a la célula otra alternativa para la síntesis de glutamato a partir de glutamina y oxoglutarato (4). Entonces, la GOGAT junto con la glutamino sintetasa juegan un papel en la asimilación de amonio en limitación.

Bajo condiciones de limitación se encuentra una elevada actividad de GOGAT en la cepa silvestre de *Neurospora*; y una actividad cuatro veces menor en exceso de amonio. Una mutante deficiente en GDH-NADP, crecida en exceso de amonio, crece pobremente con una elevada actividad de GOGAT, lo cual sugiere que la síntesis de glutamato por estas enzimas está coordinadamente regulada (20).

La enzima purificada está compuesta de un solo tipo de monómero con peso molecular de cerca de 200,000 (20).

La actividad de GOGAT desaparece en la cepa en(am)-2 por lo cual se propone que en(am)-2 sea el locus para el gene estructural de la GOGAT (4).

ORGANIZACION DEL GENOMA DE *Neurospora crassa*.

El genoma de los organismos eucariotes está compuesto de -

dos clases generales de secuencias de DNA, las secuencias repetidas y las secuencias únicas. La cantidad de cada tipo varía en un rango extremadamente amplio pero responden a un patrón altamente ordenado de organización. Típicamente se encuentran secuencias cortas repetidas de 200 a 400 nucleótidos, dispersas entre secuencias únicas a intervalos de 1000 a 2000 nucleótidos (21).

Los hongos, como grupo, generalmente tienen genomas pequeños y pequeñas cantidades de DNA repetido. El genoma de *Neurospora* es simple y consiste de secuencias "foldback" (2%), repetidas (8%) y únicas (90%). El tamaño del genoma es aproximadamente 6.3 veces mayor que el genoma de *E. coli* es decir 2.7×10^7 pares de bases. La cinética de complejidad de los componentes únicos corresponde a una capacidad codificadora para 18,000 genes estructurales de tamaño promedio. Estudios del contenido de mRNA en células vegetativas indican que cerca del 10% de las secuencias únicas del DNA de *Neurospora* son transcritas, representando la expresión de 2000 secuencias únicas (22).

Las secuencias repetidas tienen una complejidad de solo 15,300 pares de bases y están reiteradas cerca de 140 veces, lo cual sugiere que corresponden a las secuencias rDNA. La unidad repetitiva mayor que contiene las secuencias codificadoras para los RNA ribosomales (rRNA) 17S, 5.8S y 25S, está presente 185 veces en el genoma y representa aproximadamente el 7% del DNA nuclear total y el 90% del DNA repetido. Las secuencias repetidas también codifican para RNA de transferencia (tRNA) y rRNA 5S. Entonces todo el DNA repetido en *Neurospora* son secuencias codifi-

cadoras para rRNA y tRNA. Las secuencias repetidas están organizadas en unidades de al menos 10,000 nucleótidos de longitud. Solo el 0.6% de las secuencias únicas están contiguas al DNA repetido.

Las secuencias "foldback" están dispersas en el genoma a intervalos regulares. Representan el 2% del genoma, 700 aproximadamente son inversas repetidas y 350 "foldback" únicos por genoma (23).

Se ha sugerido que las secuencias repetidas adyacentes al DNA de una sola copia podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica, posiblemente como sitios de reconocimiento para el control de la transcripción (24). También se ha propuesto que estas secuencias podrían controlar la expresión génica post-transcripcionalmente (25) al formar duplex intermoleculares RNA-RNA entre secuencias repetidas transcritas y secuencias complementarias presentes en genes estructurales transcritos. Sin embargo, el DNA repetido de *Neurospora* pudiera no tener una función regulatoria, ya que no se encuentra intercalado con secuencias únicas y no está constituido por fragmentos de 200 a 400 pares de bases sino que está organizado en fragmentos mucho mayores y las secuencias repetidas y únicas no están ligadas.

GENES DE *Neurospora crassa* CLONADOS MOLECULARMENTE.

De todas las secuencias codificadoras contenidas en el gen de *Neurospora* muy pocas han sido clonadas molecularmente. Entre ellas tenemos los genes ga (26-31), am (17,32,33), trp-1 - -

(34,35), pyr-4 (36), los genes ribosomales (37) y los genes de las histonas H3 y H4 (38).

Dentro de las estrategias utilizadas para su clonación tenemos transformación a prototrofia de cepas auxótrofas tanto de *E. coli* como de *Neurospora*, e hibridización homóloga y heteróloga con detectores naturales o sintéticos. La mayoría de estos experimentos fueron hechos con clonas recombinantes de bancos de genes construidos en plásmidos o en fagos vectores.

El catabolismo del ácido quínico en *N. crassa* requiere de la síntesis *de novo* de tres enzimas inducibles, la 5-dehidroquinato hidrolasa (gene ga-2); la quinato dehidrogenasa (gene ga-3) y la dehidroshikimato desidratasa (gene ga-4). Estos genes están controlados por una proteína regulatoria codificada por un cuarto gene (gene ga-1) (39).

El estudio del gene ga-2 por medio de un método de transformación para *Neurospora crassa*, desarrollado por el grupo de los Drs. M. Case y N. Giles (28,29), representa un paso significativo para facilitar los estudios de genética molecular con *Neurospora*. Hasta ahora, ga-2 era el único sistema disponible para estudiar detalladamente la transformación en este hongo.

Los primeros experimentos para el aislamiento de este gene fueron hechos con un plásmido recombinante que complementa una cepa de *E. coli* aro-D6 (5-dehidroquinato hidrolasa deficiente) (26,27). Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de transformación con un plásmido de *E. coli*, derivado del pBR322, que lleva el gene ga-2. Este plásmido transforma una mutante ga-2 $\frac{+}{-}$

$qa-2^+$ de *Neurospora*. La integración del plásmido híbrido dentro del genoma de *Neurospora* es en mas de un sitio y puede ocurrir en sitios ligados o no al locus qa-2. Ninguno de los otros dos genes, qa-3 y qa-4, son expresados en *E. coli* ni ha sido detectado ningún producto del gene qa-1 (28).

El grupo de genes completo fué clonado al usar clonas de un banco de genes de *Neurospora* construido en un cósmido (29-31) Los genes qa-3, qa-4 y qa-1 son expresados por retransformación en *Neurospora*. Todos estos experimentos han permitido examinar la organización génica y la regulación a nivel molecular en un eucariote simple.

En *Neurospora crassa* am codifica para la enzima GDH-NADP. Características de esta enzima han sido mencionadas anteriormente. La utilización de un detector sintético de 17 nucleótidos, a partir del codón de iniciación, permitió la clonación del gene am (17). La secuencia codificadora para am se encuentra dentro de un fragmento de 2.7 kb flanqueado por sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción BamHI (17,32). Al llevar a cabo experimentos de transformación en cepas auxótrofas, con clonas que llevan esta secuencia (33), se demostró que las secuencias necesarias para la transformación de auxótrofos am a protótrofos, y para la expresión de GDH están contenidas en este fragmento de BamHI. Las transformantes obtenidas tienen niveles de GDH similares a los de la cepa silvestre cuando el gene am se ha incorporado en su sitio normal (ligado a in1), mientras que aquellas transformantes con el gene am en un sitio

diferente (no ligado a in1) solo producen de un 5% a un 20% de los niveles normales de la cepa silvestre (33).

Cuatro genes estructurales no ligados, trp-1 a trp-4, codifican para los polipéptidos de la biosíntesis de triptofano. El polipéptido producto de dos genes de *Neurospora*, trp-1 y trp-2, forma un complejo enzimático responsable de la catálisis de cuatro de las siete reacciones. trp-2 codifica la antranilato sintasa; trp-1 codifica un polipéptido trifuncional que lleva las actividades de glutamina amidotransferasa (GAT o trp-G); indolglicerolfosfato sintasa (IGPS o trp-C); y fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI o trp-F). El complejo ha sido purificado y consiste de un tetrámero que lleva dos polipéptidos idénticos de 84,000 daltones (producto de trp-1) y dos de 76,000 daltones (producto de trp-2) (40).

Para la clonación del gene trp-1 se llevaron a cabo experimentos de transformación de cepas de *E. coli* y *N. crassa*, auxótrofas para triptofano, con plásmidos recombinantes derivados del pBR322 que llevan DNA de *Neurospora* (34,35). El análisis de las transformantes de *E. coli* a prototrofia indica que solo el dominio del carboxilo terminal es expresado en *E. coli* (actividad de PRAI) (35). La secuencia clonada contiene una fase de lectura abierta capaz de codificar una proteína de 85,000 daltones altamente homóloga con trp-c, sugiriendo que el fragmento de DNA contiene el gene trp-1 de *Neurospora* (35).

La ornitina 5-fosfato carboxilasa (OMP decasa) es una de las cinco enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de uridi-

na 5' monofosfato en *Neurospora crassa*.

Se utilizaron plásmidos recombinantes con DNA de *Neurospora*. Se seleccionaron aquellos plásmidos que complementaran cepas de *E. coli* y *Neurospora* que carecían de actividad de OMP decasa (36). Estas clonas también complementan cepas de *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* (41) que carecen de OMP decasa, lo cual sugiere que la secuencia de *Neurospora* contenida en la clona que complementa lleva el gene estructural para la enzima y no un gene capaz de suprimir la mutación en estas especies. Al tratar de comprobar que la enzima presente en la cepa de *E. coli* transformada tiene las propiedades físicas de la enzima de *Neurospora* se encontró que los niveles de la enzima presentes en la cepa transformada no son suficientes para el estudio (36).

Los genes codificadores para las histonas H3 y H4 de *N. crassa* fueron clonados utilizando como detectores de hibridación secuencias de DNA heterólogas contenidas en plásmidos recombinantes (38). Para estos experimentos se utilizaron clonas que contienen el gene de la histona H4 del erizo de mar, la clona que contiene el gene de la histona H3 y la de H4 de *Xenopus*, aprovechando el hecho de que las histonas son altamente conservadas a lo largo de la escala filogenética (42).

En *N. crassa* los genes de las histonas H3 y H4 son únicos, adyacentes en el genoma y son transcritos en direcciones opuestas. Además, en *Neurospora* éstas secuencias están interrumpidas por intrones, H3 tiene un intrón de 67 nucleótidos, mientras que dentro del gene H4 hay un intrón de 69 pares de bases y otro de-

68 (38). Estas características son sorprendentes, ya que, en general, los genes de histonas en los eucariotes estudiados parecen estar reiterados y no interrumpidos por intrones, aún en levaduras donde existen dos copias por grupo central de histonas (43 - 49).

Neurospora crassa contiene 190 copias de rDNA por genoma haploide (23). El rDNA en el hongo consiste de secuencias repetidas de 6 megadaltones, acomodados en bloque linealmente, el cual no contiene a la secuencia codificadora para el rRNA 5S. Esta secuencia no está linealmente acomodada en el genoma y sus secuencias flanqueadoras son heterogéneas (37).

La clonación de estas secuencias se llevó a cabo por medio de experimentos de hibridización homóloga, donde las clonas de un banco de genes de *Neurospora*, en el plásmido vector pBR322, fueron hibridizadas a los rRNA 26S, 17S, 5.8S y 5S del hongo marcados *in vivo* con 32p (37).

DNA RECOMBINANTE.

En los últimos años se ha generado un excitante avance en diversas áreas de la biología molecular, gracias al desarrollo de las técnicas de DNA recombinante. El estudio a nivel molecular, de la expresión y regulación, de los mecanismos involucrados en la asimilación de amonio en *Neurospora crassa* requiere de la aplicación de estas metodologías que permiten el aislamiento, manipulación *in vitro*, inserción dentro de vehículos de clonación y propagación de fragmentos de DNA de un genoma complejo.

De esta manera genes individuales y operones pueden ser analizados fácilmente (50,51).

El principio básico de la clonación molecular de fragmentos de DNA tiene su origen conceptual en el modelo del replicón de Jacob (52), donde los elementos importantes son una región de DNA que constituye el origen de replicación y que puede ser reconocido por una o varias proteínas; y las secuencias codificadas localizadas en la misma molécula. Cualquier fragmento de DNA insertado o recombinado en tal molécula, que no perturbe ninguna función, puede ser replicado como parte de tal molécula (53).

Una ventaja de esta metodología es que la purificación de genes es llevada a cabo en el proceso de clonación, ya que la inserción de fragmentos de DNA al vehículo de clonación es al azar. La utilidad de este método depende de la habilidad de construir una colección de secuencias de DNA clonadas representativa del genoma de interés en su totalidad, y en la capacidad para identificar y aislar una sola de estas secuencias (54).

En un recombinante, la molécula de DNA que es capaz de autoreplicarse en un huésped es llamada vehículo de clonación, y la molécula que es ligada a él y que ahora es replicada junto con el vehículo es llamada pasajero (51).

En la tecnología de DNA recombinante existen diversos componentes técnicos importantes tales como:

1. La disección sistemática de las moléculas de DNA de interés con enzimas de restricción,
2. la reunión de los fragmentos de DNA a un vehículo de clonación apropiado,

3. la selección de moléculas recombinantes, y
4. la identificación y caracterización de los fragmentos - de DNA clonados.

Algunas de las enzimas claves para el conocimiento actual de la biología son la fosfatasa alcalina de *E. coli*, la nucleasa S1, la exonucleasa de lambda, las endonucleasas de restricción, la DNA ligasa, la DNA polimerasa I, la nucleotidiltransferasa -- terminal, y la transcriptasa reversa (55, 56). Las endonucleasas de restricción (57,58) y la DNA ligasa (59,60) son esenciales - en el proceso de generación de moléculas recombinantes.

Los dos vehículos procariotes mas comúnmente usados en experimentos de DNA recombinante, son los plásmidos de *E. coli* y - los derivados del colifago lambda. Ambos sistemas tienen inherentes ventajas y desventajas para un experimento dado, pero en general, ambos pueden ser usados indistintamente para experimentos de clonación.

Clark y Carbon, en 1976 (61), fueron los primeros en utilizar los métodos de clonación para producir una colección de fragmentos del genoma de *E. coli* en el plásmido pSC101. Este genoma bacteriano contiene 5×10^6 pares de bases y puede estar representando en pocos cientos de clonas de 10 kilopares de bases. Un genoma de mamífero contiene cerce de 2×10^9 pares de bases porequivalente haploide, y se requieren cerca de 10^6 a 10^7 fragmentos de DNA de 20 kilopares de bases para tener completamente representado este genoma, lo que significa que al utilizar un plásmido como vector de clonación se requerirán muchos gramos de DNA

pasajeros y varios litros de bacterias para transformar. El uso de derivados del bacteriofago lambda y el desarrollo de las técnicas de encapsulación *in vitro* incrementaron la eficiencia de clonación, permitiendo la construcción de bibliotecas de genes usando pequeñas cantidades de DNA (microgramos) y de cultivos bacterianos (50,54,62). Esto permitió la construcción del primer banco de genes de DNA genómico de mamífero a Blattner (63) y a Maniatis (64).

LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACION.

El colifago λ maduro contiene una molécula de DNA de doble cadena de 48,000 pares de bases que puede ser dividida en tres regiones (Figura 1). La región del extremo izquierdo incluye a todos aquellos genes (A — J) cuyos productos son necesarios para encapsular el DNA del fago y producir un virión infectivo. Aproximadamente 20 genes están involucrados en morfogénesis (65, 68). La región central entre los genes J y N contiene genes cuyos productos no son necesarios para el crecimiento productivo del fago. La porción restante del genoma, a la derecha del gen N, incluye los principales elementos de control, los genes necesarios para la replicación del fago (O y P) y los genes S y R que codifican para las protefínas requeridas para la lisis de la membrana y pared celular de la célula huésped, respectivamente (66,68).

En cada extremo del genoma de λ hay proyecciones de una sola cadena de secuencias complementarias a través de las cuales -

la molécula se circulariza al ser inyectada por el fago a su célula huésped, la fusión de estos extremos cohesivos permiten la formación del sitio cos (m.m) (Figura 1) (65,66). De las aproximadamente 50 proteínas que codifica λ , seis son regulatorias (cI - cII, cIII, cro, N y Q) y su expresión da lugar a un circuito de expresión génica con el fin de dar una respuesta lítica o lisogénica (66,67).

El uso del colifago lambda como vector de clonación de DNA genómico es un método atractivo, ya que un gran número de placas de lisis de fagos recombinantes pueden ser rápidamente generadas utilizando pequeñas cantidades de DNA pasajero (69). Su uso como vector de clonación se basa en el hecho de que más del 40% (20 -- kpb) de su genoma, el cual forma un bloque continuo en la región central, contiene genes que son totalmente dispensables para el crecimiento lítico (63,68,70). Los derivados del lambda adaptados específicamente para la clonación de DNA están contruidos de tal manera que las endonucleasas de restricción sólo tengan sitios de reconocimiento en la región dispensable, de modo que permitan la adición o reemplazamiento de un segmento heterólogo de DNA. Mutaciones puntuales, deleciones y sustituciones son introducidas al tipo silvestre para alterar la distribución de los sitios de restricción o eliminarlos de la región esencial del genoma del fago (63,68,70).

Todo esto ha permitido el desarrollo de un gran número de vectores que pueden aceptar y propagar DNA heterólogo insertado en una variedad de sitios de restricción (71). Aquellos deriva--

dos que tienen un solo sitio blanco, en el que el DNA heterólogo es insertado, se conocen como vectores de inserción; y aquellos que tienen sitios pares, que permiten remover un segmento y reemplazarlo con DNA heterólogo, son conocidos como vectores de reemplazamiento en los que para su uso es crítico el corte eficiente en los sitios blanco de las enzimas de restricción en el DNA vector.

La delección de la región dispensable del genoma produce fagos no infectivos. La infectividad se pierde ya que la encapsulación del virión requiere de un tamaño mínimo y de uno máximo (68-72). Al reemplazar la región deletada con una secuencia de DNA heteróloga, de tamaño apropiado, la infectividad es mantenida. La encapsulación no sólo requiere de moléculas de tamaño apropiado, sino también de la secuencia cos que incluye los extremos -- cohesivos (73).

El empacamiento de moléculas de tamaño apropiado es fundamental en el diseño de vectores de clonación derivados de λ y el uso de la técnica como medio eficiente de recuperación de recombinantes. En cuanto al requerimiento del tamaño del DNA que puede ser encapsulado, las moléculas en un rango de entre el 80 - - 100% (y aun 105%) del tamaño normal de lambda son preferentemente encapsuladas. En general, los fagos con más del 25% de su genoma deletado no son infectivos. Aquellos con el 22-25% de genoma deletado crecen pobremente y son fácilmente sobrecrecidos por aquellos fagos con un contenido de DNA mayor, y fagos con mas -- DNA que el normal también son desplazados (68). En términos gene

rales, podemos decir que la longitud del DNA en los fagos no debe ser mayor al 105% ni menor que el 78% del genoma silvestre -- (72). Por lo tanto, el tamaño del DNA pasajero está restringido a que el tamaño de las moléculas recombinantes esten dentro de los límites mencionados.

Stenberg (74) descubrió un sistema donde el DNA recombinante es adicionado a extractos celulares, hechos de lisógenos de lambda, que proporcionan precabezas, colas y otros componentes necesarios para el ensamblaje de fagos *in vitro*. El DNA es incorporado (o empacado) dentro de cabezas y después se ensambla la cola para producir partículas infecciosas. Esta técnica es diez veces mas eficiente que la transfección. También se ha visto que tiene una marcada preferencia para empacar moléculas de DNA de tamaño máximo.

La clonación con fagos vectores involucra, en términos generales, diferentes pasos (72).

1. El DNA del vector es digerido totalmente con la enzima de restricción apropiada, y en el caso de vectores de reemplazamiento sin selección positiva para recombinantes, que los brazos del fago sean físicamente separados de la región central dispensable.

2. Los brazos son ligados a fragmentos de DNA heterólogo con los mismos extremos cohesivos.

3. Las moléculas de DNA recombinante resultantes, son encapsuladas *in vitro* para producir partículas fágicas viables que formen placas de lisis en huéspedes apropiados.

4. Identificación de secuencias de DNA pasajero, comunmente por procedimientos que involucran hibridización de ácidos nucleicos.

Para la selección del bacteriofago lambda vector que se va a utilizar hay que considerar la enzima o enzimas de restricción que se van a utilizar y el tamaño de los fragmentos de DNA a clonar. En la actualidad se han desarrollado una gran variedad de fagos λ adaptados para clonación. Algunos tienen selección positiva para recombinantes; otros con secuencias insertadas que permiten el reconocimiento del fenotipo del fago; y otros conocidos como fagos vectores de expresión (63,75 - 78).

EL FAGO λ 1059: UN VECTOR DE CLONACION CON SELECCION POSITIVA PARA RECOMBINANTES.

La mayoría de los fagos vectores son vehículos de clonación por sustitución que requieren que la región dispensable sea físicamente separada de los brazos del fago antes de que sea reemplazada por DNA heterólogo (62,64), pero la eficiencia del método no es tan buena como la deseada y puede haber contaminación con uno o mas de estos fragmentos.

En 1980 se reportó la construcción del fago vector λ 1059 que tiene un sistema de selección positiva para los fagos recombinantes (76). Ello permite la construcción de recombinantes sin la separación física de los brazos del fago. El fago λ 1059 está formado de tres fragmentos generados por corte con BamHI: uno de 19.6 kpb, que corresponde al brazo izquierdo, lleva todos los genes para las proteínas de la cabeza y la cola; un

fragmento central de 17 kpb, que corresponde a la región dispensable para el crecimiento lítico del fago; y uno de 9.4 kpb, el brazo derecho, que lleva los genes de replicación y lisis. Las secuencias contenidas en los dos brazos representan el 58.2% de la longitud total del fago silvestre. La producción de fagos viables es llevada a cabo al reemplazar el fragmento central con secuencias de DNA de 6.3 a 24.4 kpb (secuencias que representan el 12.8% al 49.8% de la longitud total del fago silvestre). La estructura del genoma del λ 1059 se encuentra esquematizada en la parte superior de la figura 2.

En la construcción de este fago vector se deletaron dos sitios de reconocimiento para la enzima BanHI en la región correspondiente al brazo izquierdo, uno en la región central y en el brazo derecho se removió el DNA entre dos sitios de BamHI. La región central del fago lleva secuencias de un plásmido ColE1, el pACL29, que introduce el gene de la β lactamasa (Amp^R) y el gene de inmunidad a colicina ($colicina^R$), además en esta región están presentes los genes red (exo y β) y el gene gamma dándole al fago el fenotipo spi⁺. Este fago además de ser un vector por sustitución puede serlo por recombinación ya que lleva duplicados los sitios att de λ y múltiples orígenes de replicación ColE1. Entonces puede crecer líticamente como fago o no líticamente como plásmido en presencia del represor de λ , por tanto, λ 1059 pertenece a la familia de los fagos vectores "fásmidos".

El esquema de selección para recombinantes está basado en

el fenotipo spi de lambda (sensibilidad a inhibición por P2 (67) Los derivados spi⁻ de lambda son fagos que forman placas sobre cepas de *E. coli* lisogénicas para el fago temperado P2. Zissler (79), fué el primero en describir este fenómeno, al demostrar -- que el loci red y gamma eran requeridos para una expresión total del fenotipo. Al tener los genes red y gamma en la proci6n central del vector, bajo en control de pL, los recombinantes que -- han sustituido este fragmento serán spi⁻ y se distinguirán de los fagos λ 1059 silvestres al crecer sobre un césped de células de *E. coli* que contiene P2. Los recombinantes son incapaces de crecer sobre cepas recA (76,77). En la figura 3 se muestra la estrategia de construcción de recombinantes usando el vector λ 1059.

El hecho de que el fago λ 1059 lleve en la región central-secuencias de un plásmido ColE1, representa cierta desventaja experimental en los casos donde se utilizan plásmidos ColE1, tales como el pBR322 (111), como detectores en experimentos de hibridación. Estas secuencias podrían ser detectadas en el proceso de selección y seleccionar aquellos fagos padres que han escapado a la selección spi. Esto puede deberse a que se ha perdido el fenotipo por algún rearrreglo ó deleción en la zona red, sin que haya habido un reemplazamiento de DNA en la región central (80). Algunos derivados del λ 1059 han sido construidos (76) de tal manera que el fragmento del DNA del plásmido ha sido sustituido. Los mapas de restricci6n de estos fagos derivados del λ 1059 se muestran en la figura 4.

II OBJETIVO

El aislamiento y purificación de los genes que codifican para las enzimas relacionadas con el metabolismo nitrogenado en el hongo *Neurospora crassa*, ayudaría a comprender su organización y regulación, lo que nos daría la oportunidad de estudiar los mecanismos moleculares de su expresión.

Considerando el interés que existe en este centro de investigación por estudiar, tanto a nivel fisiológico como molecular las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, el objetivo del presente trabajo fué el de establecer en nuestro medio la metodología de DNA recombinante, como herramienta para la clonación molecular de esta información. Se utilizó como modelo experimental el hongo *Neurospora crassa*, aunque también se contribuyó al estudio de los genes de fijación de nitrógeno en la bacteria simbiótica *Rhizobium phaseoli*.

Se construyeron bancos de genes del genoma *Neurospora* en fagos vectores y se montaron las metodologías necesarias para el análisis, localización y purificación de clonas específicas de interés.

Como estrategia posible de clonación del gene de la glutamino sintetasa se aprovechó la expresión diferencial presentada por el polipeptido β de la enzima, entre las cepas silvestre (74-A) y un auxótrofo parcial de glutamina (gln1-a), crecidas en glutámico y glutamina respectivamente.

III MATERIAL Y METODOS

CONSTRUCCION DE BANCOS DE GENES DE *Neurospora crassa*. Se creció la cepa "slime" de *Neurospora* en Vogel, medio mínimo suplementando con 1.5% sacarosa, a 25°C por 12 horas (81). Se purificó DNA de alto peso molecular (28). Alicuotas de DNA fueron digeridas parcialmente con BamHI o con Sau3A (75); el buffer de reacción utilizado en las reacciones de digestión con BamHI fue - - 20mM TrisHCl pH 8.5, 100mM NaCl y 10mM MgCl (82). Por electroforesis en agarosa se seleccionaron aquellas digestiones que generaran una mayor cantidad de fragmentos de 10 a 20 kpb, y se limpiaron precipitando dos veces con dos volúmenes de etanol y lavando con 70% etanol (a - 20°C), esto para bajar la concentración de sales provenientes de la digestión con endonucleasas de restricción y llevar a cabo las reacciones de ligamiento al DNA vector con mayor eficiencia.

Se creció el fago vector λ 1059 y se purificó DNA (75). El DNA del fago se circularizó por sus extremos cohesivos y fue digerido totalmente con BamHI, el DNA restringido con BamHI se limpió de igual manera que la descrita para el DNA de *Neurospora*, y fue ligado a fragmentos de DNA de 10 a 20kpb de *N. crassa* en una proporción molar 1:1 (64,83). Los fagos recombinantes se generaron por encapsulación *in vitro* del DNA ligado (84), utilizando las cepas lisogénicas NS433 y NS428 (74).

SINTESIS DE cDNA DE CADENA SENCILLA MARCADO RADIATIVAMENTE CON ³²P. Se purificó mRNA poliA+ (7) de las cepas 74-A, crecida en-

10mM glutámico a 25°C por 12 horas (11). El RNA fué limpiado -- precipitando dos veces con 2 volúmenes de etanol y se lavó después de cada precipitación con 70% etanol. La reacción de síntesis de DNA complementario (85) fué llevada a cabo a 42°C por 60 minutos en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 5 microgramos de mRNA poliA+, en presencia de hidróxido de metil -- mercurio (86). 5 microlitros de mRNA poliA+ fueron incubados en presencia de CH₃ Hg OH a una concentración final de 2mM durante diez minutos a temperatura ambiente, se adicionó β-mercaptoetanol a 28mM final y 0.8 U/microlitro de RNAsin (Promega-Biotec) se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Esta mezcla fué llevada a 50 microlitros con 0.1M Tris HCl pH8.3 (a 42°C), -- 0.1mM de cada uno de los deoxinucleotidos; 100µ Ci de 400Ci/mmole de dCTP ³²P, 140mM KCl, 10mM MgCl, 200 g/ml oligo dT y 28 unidades de transcriptasa reversa. El cDNA, sintetizado es separado de la marca no incorporada por filtración en columna de sefadex poro G-75. Este cDNA tiene una actividad específica de -- 10⁸ cpm/µg.

HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS. Los fagos recombinantes fueron plaqueados sobre la cepa Q359 (75) en cajas conteniendo -- 10g/l de tripticasa (BBL); 5g/l NaCl y 10g/l de agar. Para el -- agar de superficie se utilizaron 7g/l de agarosa. El DNA de las placas de lisis es adsorbido y fijado a filtros de nitrocelulosa (87) e hibridicados con 10⁷ cpm de cDNA ³²P (88).

La hibridización de fragmentos de DNA separados por electroforesis y transferidos a filtros de nitrocelulosa se hizo de acuerdo a la técnica de Southern (89,90).

Los experimentos tipo "Northern" se hicieron en geles de agarosa conteniendo $\text{CH}_3 \text{Hg OH}$ transfiriendo a papel diazobenxiloximetil (DBM) (91,93).

El marcaje radiactivo de los DNAs, con ^{32}P , que se usaron como detectores de hibridización se hizo de acuerdo a la técnica de "Nick Translation" (94).

Los experimentos de hibridización-traducción positiva de mRNAs (95,96) se hicieron hibridizando 5 μg de RNA polia+ de la cepa 74-A, en 100 μl de 50% formamida, 20mM PIPES pH6.4, 0.2% SDS, 0.4M NaCl y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA de *E. coli*, a 10 μg de DNA de fagos recombinantes inmovilizados en filtros de nitrocelulosa, por 12-14 horas a 37°C. Los filtros fueron lavados siete veces con 10mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15M NaCl, 1mM EDTA y 0.5% SDS a 37°C, y dos veces con el mismo buffer a 37°C sin SDS. El RNA unido a los filtros fué eluído colocando los filtros en un baño con agua hirviendo por un minuto y congelando las muestras inmediatamente después en un baño de hielo seco-etanol. El RNA es extraído con fenol-cloroformo y precipitado con etanol. Se traduce en un sistema de traducción *in vitro* (Promega-Biotec) y los productos de traducción son inmunoprecipitados con anticuerpos anti GS de *Neurospora crassa* (7) y separados en geles de acrilamida SDS-urea.

ANALISIS DE PROTEINAS EN MINICELULAS DE *E. coli*. Se hicieron mi
nicélulas (97) de la cepa productora P678-54, transformándola -
con plásmidos recombinantes de *Neurospora*, derivados del pUC8 -
(102).

IV RESULTADOS

El manejo de las técnicas de DNA recombinante nos ha permitido llevar a cabo la clonación molecular del genoma del hongo *Neurospora crassa*, en el fago vector λ 1059, un vehículo de clonación con un sistema de selección para recombinantes (75).

Se construyeron dos genotecas de *Neurospora* de acuerdo a la estrategia de clonación esquematizada en la figura 3. El genoma del hongo fué digerido parcialmente con la enzima de restricción BamHI, para uno de los bancos, y con Sau3A para el otro. Los fragmentos de 10 a 20kpb se seleccionaron de acuerdo al grado de digestión del DNA por las enzimas utilizadas. Alícuotas de éste DNA fueron separadas en geles de agarosa para escoger aquella condición de ensayo que generara una mayor población de estos fragmentos. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 5; -- donde se pueden apreciar las digestiones de DNA de *Neurospora* -- con la enzima BamHI. El grado de digestión es diferente en cada una de las muestras de acuerdo a las unidades de enzima por microgramo de DNA presentes en la reacción llevada a cabo a 37°C -- por 60 minutos. El DNA del fago λ 1059 fué circularizado por sus extremos cohesivos y digerido totalmente con BamHI, lo cual genera dos fragmentos de DNA, uno de aproximadamente 27kpb correspondiente a los dos brazos del fago, y otro de 17kpb que corresponde al segmento interno (figura 2, parte inferior).

Los fagos recombinantes se formaron al encapsular *in vitro* (84) las moléculas de DNA recombinante generadas al ligar los --

brazos del λ 1059 con el DNA de *Neurospora*, ambos DNAs contienen extremos cohesivos de BamHI. Los fagos recombinantes se seleccionaron en la cepa Q359 (r_k^- , m_k^- , 80^r , P2), con una eficiencia de clonación de 4×10^4 unidades formadoras de placa (ufp) por microgramo (μ g) de fragmentos de DNA de *Neurospora* de 10 a 20kpb. La eficiencia de clonación obtenida al generar fagos λ 1059, después de digerir con BamHI y religar su DNA, es de 4×10^6 ufp/ μ g de DNA de fago al plaquear en una cepa no restrictiva (Q358, r_k^- , m_k^+ , 80^r). En la cepa Q359 menos de 2×10^2 ufp son detectadas. De estos experimentos se generaron cerca de 18,000 fagos recombinantes que representan clones independientes de DNA de *Neurospora crassa* entre 10 y 20kpb.

Un análisis inicial de los bancos de genes construidos consistió en observar, por electroforesis en geles de agarosa, el patrón de restricción generado por BamHI en clones independientes. Para ello, aislamos al azar placas de lisis, producto de nuestros fagos recombinantes, eluímos los fagos, los crecimos en líquido, y purificamos DNA (98,99). Este DNA fué digerido totalmente con BamHI y separamos los fragmentos generados por electroforesis en agarosa.

Como puede apreciarse en la figura 6, el patrón de restricción de las clonas analizadas es diferente, pudiéndose observar que los fragmentos correspondientes a los brazos del fago vector se conservan igual en todas las clonas recombinantes generadas con parciales de BamHI de DNA de *Neurospora* (figura 6A). Para el caso de los fagos recombinantes generados con parciales de Sau3A

(figura 6B) el tamaño de los brazos del fago varía un poco, ya que el sitio blanco original de BamHI se pierde en el momento de la clonación y la enzima cortará en el primer sitio blanco existente en el DNA pasajero, que será diferente en cada recombinante.

Por otra parte, comprobamos la presencia de una región -- única del genoma de *Neurospora* en experimentos tipo Southern -- (89). Para ello amplificamos la biblioteca generada con parciales de BamHI y purificamos DNA (99). Este DNA fué digerido con la enzima de restricción PstI. Separamos los fragmentos generados en la reacccción de digestión por electroforesis y transferimos a filtros de nitrocelulosa. Como detector de hibridización-- utilizamos el plásmido pVK88 (27), que contiene un inserto de DNA de *Neurospora* de 7.2kpb, flanqueado por sitios de PstI, que contiene el gene ga-2 (Ver parte inferior de la figura 7). Como podemos observar en la parte superior de la figura 7, esta secuencia única de *Neurospora* está contenida en nuestra biblioteca analizada en las cantidades esperadas. Para hacer cuantitativo este experimento calculamos la fracción de DNA de una secuencia de 7.2kpb contenida en el genoma total del hongo multiplicada por el número total de microgramos corridos en el gel y su equivalente en el Banco de genes. Asumimos que un tercio del -- DNA de los fagos recombinantes corresponde a DNA pasajero insertado.

Cuando no se cuenta con un detector específico proveniente de otro organismo o con un detector sintético para la locali

zación de genes, se puede aprovechar la expresión diferencial -- que muestran algunos genes de acuerdo a las condiciones de crecimiento utilizadas en el laboratorio. También se observa expresión diferencial de genes entre diferentes cepas de un organismo (88,100).

Para tratar de seleccionar aquel o aquellos fagos recombinantes que lleven insertada la secuencia codificadora para la -- glutamino sintetasa de *N. crassa*, se aprovechó la expresión diferencial presentada por el polipéptido β de la enzima, al crecer la cepa silvestre, 74-A, de *Neurospora* en 10mM glutámico a 25°C por 12 horas (7) y la cepa gln1-a, un auxótrofo parcial de glutamina (11), crecida en 10mM glutamina a 25°C por 12 horas. En estas condiciones de crecimiento, el polipéptido β de la enzima se encuentra presente en niveles de entre 5 y 10 veces más en la cepa silvestre que en la mutante, estos niveles corresponden a niveles similares en mRNA específico (8).

Para realizar estos experimentos de hibridización diferencial sintetizamos cDNA de cadena sencilla marcado radiactivamente con ^{32}P , a partir de cada una de las preparaciones de mRNA -- poliA+ purificados de las cepas y condiciones de crecimiento mencionadas. Estos cDNAs fueron utilizados como detectores de hibridización de las impresiones en filtros de nitrocelulosa del DNA de las placas de lisis de aproximadamente 4×10^4 fagos recombinantes (87) en experimentos independientes. La figura 8 muestra los resultados obtenidos en un experimento donde cerca de 10^4 fagos fueron probados. Se utilizaron condiciones de hibridización--

y de lavado severas (a 42°C en 50% formamida, lavando hasta con 0.1X SSC a 50°C) y los cDNAs sintetizados a alta actividad específica. Como podemos ver, la autoradiografía muestra que aproximadamente el 10% de las ufp hibridizan con los cDNAs, lo cual -- concuerda con el hecho de que solo un 10% de las secuencias contenidas en el genoma del hongo son transcritas (2), de estas se seleccionaron aquellos fagos cuya señal de hibridización es más intensa al usar como detector al cDNA de la cepa 74-A, tomando como referencia las señales que dan los fagos cercanos. Algunos ejemplos se muestran con flechas.

De estos experimentos se seleccionaron aproximadamente 50-fagos independientes. Algunos de ellos fueron purificados hibridizando mas de una vez y seleccionando aquellas clonas que repiten la diferencial. Dentro de 13 fagos se localizaron regiones específicas de DNA que presentan hibridización diferencial en -- experimentos tipo Southern (89). Para ello se hicieron preparaciones crudas de DNA (98), se digirieron totalmente con BamHI y los fragmentos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos a filtros de nitrocelulosa. Siete regiones dentro del genoma del hongo, contenidas en 13 clonas independientes, son expresadas diferencialmente.

Dos regiones que son transcritas diferentemente fueron seleccionadas, una está contenida en un fragmento de BamHI de -- 3.8kpb y la otra en uno de 5.4kpb también flanqueada por sitios de BamHI. Los fagos recombinantes que contienen estas regiones -- son llamados λ Nc 5.4 y λ Nc 3.8; fueron purificados de la geno-

teca de *N. crassa* construida con parciales de Sau3A y BamHI respectivamente. La figura 9 muestra el patrón de restricción generado por la enzima BamHI de cada una de estas clonas y la expresión diferencial que presentan específicamente estas regiones.

Ambos fragmentos fueron subclonados en pUC8 (102), el - - cual permite la expresión en *E. coli* del DNA insertado, a partir del promotor de lac. Los plásmidos generados, pGC5.4 y - - pGC3.8, fueron mapeados (figura 10) y su expresión fue analizada en minicélulas de *E. coli*. El fragmento de 5.4 dirige la síntesis, predominantemente en una orientación, de tres polipéptidos de 44, 40, y 30×10^3 daltones (figura 11). Este experimento nos permitió establecer la dirección 5' y 3' de este gene. Estos productos sintetizados en minicélulas de *E. coli* no inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-GS de *Neurospora crassa*.

Para determinar el tamaño de los transcritos codificados por estas regiones de DNA realizamos experimentos tipo "northern" (103), donde preparaciones de mRNA poliA+ de las cepas - 74-A y gln1-a fueron corridas en geles de agarosa conteniendo - hidróxido de metil mercurio (91,92), transferidas a papel DBM - (92,93) e hibridicadas a los plásmidos pGC5.4 pGC3.8 marcados - radiactivamente con ^{32}P . La clona pGC3.8 hibridiza con un mRNA de 1.3kb de la cepa 74-A; ni este transcrito ni ningún otro, se encuentra en la preparación de mRNA de la cepa gln1-a (figura - 12). Con la clona pGC5.4 no detectamos hibridización, posiblemente porque su RNA correspondiente migra en la zona de los --- rRNA y su eficiencia de unión al papel es muy baja (88).

Para descartar la posibilidad de que las regiones que mostraron expresión diferencial representan únicamente sobreposiciones de una misma región del genoma del hongo dentro de los fagos recombinantes, llevamos a cabo un experimento de hibridación tipo Southern, donde los DNAs de las 13 clonas diferenciales, digeridos con BamHI y transferidos a nitrocelulosa, fueron hibridizados al fragmento de 5.4kpb, semipurificado por electroelución. De las siete regiones diferenciales solo la región de 3.8kpb mostró cierta homología con este fragmento (figura 13). De las 13 clonas independientes que mostraron hibridación diferencial en regiones específicas dos son λ Nc5.4. Esto se determinó al hibridizar DNA de las clonas con el DNA del fago λ Nc5.4 marcado radiactivamente con ^{32}P .

V DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo muestran claramente las posibilidades que nos dan las técnicas de DNA recombinante. La construcción de bibliotecas de genes del hongo *Neurospora crassa* nos permitió, en este caso, montar una serie de metodologías indispensables para la localización de secuencias de interés, así como llevar a cabo una estrategia posible de clonación del gene de la glutamino sintetasa.

Analizando nuestros datos, al llevar a cabo la clonación del genoma de *Neurospora* vemos que nuestra eficiencia de clonación 4×10^4 fagos por microgramo de fragmentos de DNA de 10 a 20kpb, es de aproximadamente seis veces menor a la reportada por Karn et al (75). Ellos obtienen 2.4×10^5 fagos por microgramo de DNA de Nematodo, seleccionados en una cepa restrictiva (Q359), al utilizar el fago λ 1059 como vehículo de clonación. Nuestra eficiencia es similar a la reportada por Maniatis (64), 3.8×10^4 recombinantes por microgramo de DNA eucariote, utilizando como vectores de clonación los carontes 4 y 4A (63). Nuestra eficiencia de generar fagos λ 1059, en una cepa no restrictiva (Q358), después de digerir y religar su DNA, es similar a la reportada (75).

Una vez montada la metodología de construcción de fagos recombinantes, en nuestro grupo construimos otros bancos de genes, dos del genoma de la cepa silvestre del hongo y uno de la cepa CFN 42 de *Rhizobium phaseoli*, en este caso, nuestra efi-

ciencia aumenta y es similar a la reportada por Karn. Posiblemente esto se debe a que el método de selección de insertos de 10 - a 20kpb es mas eficiente cuando los fragmentos generados por las enzimas de restricción son separados por tamaño, ya sea por ultracentrifugación (104) o por electroforesis preparativa en geles de agaroso, que cuando únicamente son seleccionadas las condiciones de digestión que generen una mayor cantidad de fragmentos del tamaño deseado, ya que en este caso, los fragmentos de DNA mas pequeños compiten por los brazos del fago. De estos experimentos se generaron aproximadamente 30×10^4 fagos recombinantes que representan clonas independientes de DNA de *Neurospora crassa* entre 10 y 20kpb, con una probabilidad del 95 al 99% (112) de tener representadas, al menos una vez, todas las secuencias contenidas en el genoma del hongo, considerando que su tamaño es de 27×10^3 kpb.

Estos datos muestran que hemos montado la metodología necesaria para la construcción de bancos de genes en fagos vectores y de que estamos en condiciones de clonar cualquier genoma.

En la búsqueda del gene de la glutamino sintetasa de *Neurospora* llevamos a cabo diferentes estrategias. En enterobacterias se ha identificado el gene estructural de GS, glnA, así como otros genes ligados y no ligados a glnA, glnL, glnG y glnF, cuyos productos participan en la regulación de la síntesis ó de la actividad de GS (106, 108). El plásmido pACR5 (110) fué construido clonando un fragmento de DNA de *E. coli*, dentro del pBR322 (111), contiene intacto el gene glnA clonado originalmen-

te en el pACR1 (97,109). Al utilizar el pACR5 como detector de hibridización contra DNA del hongo o contra DNA de nuestros fagos recombinantes vemos que no hay hibridización, ni relajando las condiciones de hibridización (datos no mostrados). Ello nos indica que posiblemente no exista homología entre los genes estructurales de GS en estos dos organismos. Al tratar de complementar cepas de *E. coli* con auxotrofia por glutamina, (MX727, - 112) con nuestros fagos recombinantes no hay complementación, - esto nos indica o que nuestras clonas no llevan el gene de GS o que el gene estructural de GS de *Neurospora* no se expresa en *E. coli* (113) (E. Calva, comunicación personal). Datos similares - se obtuvieron al tratar de complementar esta cepa de *E. coli* -- con el gene estructural de GS de la levadura (G. Dávila, comunicación personal).

El uso de detectores sintéticos ha permitido la clonación de diversos genes (114,115), un ejemplo de ello es la clonación del gene de la GDH de *Neurospora* (16,18). La síntesis de oligonucleótidos requiere que se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína (116). Al tratar de secuenciar los polipéptidos α y β de la GS de *Neurospora* se encontró bloqueado el extremo - aminoterminal en ambos polipéptidos. (E. Calva, comunicación -- personal). Esto podría ser una indicación de que, por lo menos - en este sitio, ambos polipéptidos son muy parecidos. Digestiones de las α y β con proteasa V8, enzima que corta después de aspártico y glutámico (117), produce un patrón similar entre am - bos polipéptidos (E. Calva, comunicación personal).

Recientemente se ha purificado un plásmido, pGDC1, que -- contiene una secuencia de *Saccharomyces cerevisiae* que completa una auxotrofia por glutamina (118). Hemos llevado a cabo experimentos preliminares, utilizando como detector heterólogo de hibridización este plásmido, contra DNA total de *Neurospora*. Cuando el DNA de *Neurospora* es digerido con BamHI, una banda de -- 17kpb y otra de 9kpb aproximadamente, hibridizan con este detector. Si el DNA del hongo es digerido con EcoRI, nuevamente obtenemos hibridización, en este caso en una banda de mas de 23kpb- y en otra de aproximadamente 0.8kpb. Las condiciones de hibridización utilizadas en estos experimentos fueron las usadas para detectores homólogos. Al probar con este detector las 13 clonas aisladas en este trabajo, que presentan regiones específicas -- con expresión diferencial, no obtuvimos señales de hibridización.

La estrategia de clonación del gene de GS de *Neurospora* - presentada en este trabajo representa una posibilidad más de -- clonación. Numerosos genes han sido aislados utilizando la expresión diferencial que presentan, tanto en eucariotes sencillos como en eucariotes mas avanzados (100,101,119,121). Al realizar este proyecto se trató de aprovechar la expresión diferencial presentada por el polipéptido β de la GS de *Neurospora* entre las cepas 74-A y gln1-a, como ha sido mencionado. En los resultados se ha presentado el aislamiento de dos regiones de DNA de *Neurospora* que son expresadas diferencialmente. Estas regiones no contienen el gene estructural para la GS de *Neurospora* -

Al probar estas clonas para transformación de cepas auxótrofas de *N. crassa* a protótrofas de glutamina, los resultados fueron negativos. Se llevaron a cabo experimentos de hibridación-selección positiva con el DNA de estas clonas inmovilizando en -- filtros de nitrocelulosa. El mRNA poliA+ usado fué el de la cepa 74-A crecida en glutámico. No obtuvimos enriquecimiento para el mRNA de GS.

El polipéptido α de la cepa mutante gln1-a es indistinguible del de la cepa silvestre, pero esta mutante no sintetiza, - *in vivo* o *in vitro*, el monómero β de la GS. Sin embargo, esta cepa sintetiza un polipéptido (γ) con un peso molecular menor - y que cruza con los anticuerpos contra α y β (122), esto podría ser explicado como una mutación en el gene para el polipéptido- β . Entonces, la clona que lleve el gene estructural para el polipéptido β de la GS podría hibridizar, en un experimento tipo "northern", con los mRNAs de las cepas 74-A y gln1-a, crecidas en glutámico y glutamina respectivamente, pero el tamaño y nivel de los transcritos deberán ser diferentes. Al realizar este experimento con nuestras clonas, en un caso obtenemos hibridación solo con el mRNA de la cepa silvestre. Si ambas cepas son crecidas en glutámico los niveles de los transcritos serán similares.

Las limitaciones encontradas en la estrategia de clonación elegida para aislar el gene ó genes de la GS de *Neurospora* están dadas, principalmente, por la carencia de mutantes totales de la enzima en el hongo. Esto es debido probablemente a --

que el posible parecido existente entre los polipéptidos α y β de la GS, a nivel de proteína, podría impedir una respuesta de hibridización diferencial clara, ya que posiblemente este parecido sea reflejo de similitud entre secuencias codificadoras. Por otra parte el tamaño de los fragmentos de DNA de *N. crassa* contenidos en los fagos recombinantes podría causar que la señal diferencial no sea apreciada, ya que en 10 a 20kpb deben existir más de una secuencia codificadora. Si éstas no estuvieran relacionadas con metabolismo nitrogenado su regulación será diferente, por lo que sus niveles de transcripción se mantendrían invariables en las cepas y condiciones de crecimiento utilizadas en este proyecto, y esta hibridización de fondo obscurecería la diferencial.

Creemos que la estrategia llevada a cabo representa un intento más realizado para la clonación de dicho gene y que a pesar de que los resultados no fueron los deseados la estrategia de hibridización diferencial es una buena posibilidad para aquellos casos en los que existan mutantes totales y la inducción o represión de la síntesis sea total. Para el caso de GS de *Neurospora* surgen preguntas tales ¿Existe realmente un gene para cada polipéptido? Si es así, ¿estos genes están sobrepuestos o separados? ¿Cómo es que solo existen mutantes para el polipéptido β ?

A lo largo del desarrollo del proyecto han surgido nuevas posibilidades de clonación de las secuencias codificadoras de GS. El aislamiento del pGDC1 y el hecho de que existan secuen--

cias dentro del genoma de *Neurospora* con homología con las secuencias de *S. cerevisiae* contenidas en este plásmido, nos brinda una alternativa con posibilidades de éxito. La estrategia a seguir sería utilizar este plásmido como detector de hibridización contra el DNA de grupos de 300 fagos recombinantes, transferido a filtros de nitrocelulosa, para probar todas las clonas de los bancos de genes que hemos construido. Del grupo de fagos que dé señal de hibridización se purificaría el fago o fagos -- que contengan dicha información y se localizaría la región específica. Posteriormente se podrán transformar cepas de *Neurospora* auxótrofas de glutamina y se realizarían experimentos de hibridización-selección positiva para comprobar que se trata del gene o genes estructurales de la GS.

La clonación de genomas o de secuencias de DNA complementario dentro de vehículos de expresión de *E. coli*, plásmidos o fagos (123,127), podría facilitar la identificación de genes de interés. El colifago vector de expresión λ gt11 (77), es un vector que contiene un sitio único de EcoR1, dentro de una copia del gene de β -lactamasa (lacZ) a donde se insertan fragmentos de DNA pasajero de tamaño pequeño (0-8kpb). El DNA recombinante es encapsulado *in vitro*, y los fagos se propagan infectando una cepa lisogénica para lambda e induciendo la lisis a 42°C. La cepa lisogénica contiene un represor termosensible (cI857). Cuando las secuencias del DNA pasajero codifican para una proteína y estas secuencias están en la fase y en la orientación adecuadas con respecto al gene lacZ se produce una proteína híbrida.

Si se cuenta con un anticuerpo contra el producto del gene de interés, el antígeno es detectado directamente sobre filtros de nitrocelulosa (125,126). Bancos construídos en este vehículo -- ayudarían en la clonación de los genes codificadores para GS y GOGAT del hongo.

Finalmente, es importante mencionar que dentro de nuestros bancos de genes han sido localizadas las clonas que lleven el gene codificador de la glutamato deshidrogenasa (GDH). Estos fagos recombinantes fueron identificados por L. Blanco, en el laboratorio del Dr. J. Mora, usando como detector específico un oligonucleótido sintético de 20 bases.

VI APENDICE

FIJACION DE NITROGENO EN *Rhizobium phaseoli*. Las bacterias del género *Rhizobium* fijan nitrógeno en simbiosis con las raíces de las leguminosas (128,129). *R. phaseoli* nodula *Phaseolus vulgaris*. La nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa forman un complejo enzimático que está presente en los organismos procaríotes capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

Los genes codificadores para los polipéptidos de la nitrogenasa en *Klebsiella pneumoniae* son nifH, D y K y están organizados en una unidad transcripcional (130). Estos genes están altamente conservados a lo largo de la evolución y utilizándolos como detectores de hibridización éstos cruzan con secuencias -- equivalentes en una amplia variedad de organismos fijadores de nitrógeno (131).

Utilizando como detector de hibridización el plásmido -- pSA30, el cual contiene los genes estructurales para la nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa de *K. pneumoniae* (132), en el laboratorio del Dr. R. Palacios, se aislaron clonas recombinantes que contienen las secuencias nif de la cepa CFN-42 de *R. phaseoli* (133). En esta cepa las regiones nif están localizadas en un plásmido de 250kpb, que también codifica para funciones de nodulación (133), y están comprendidas en fragmentos de EcoR1 -- de 4.7kpb (pCQ15 o región nif a), 4.5kpb (pCQ23 ó región nif c) y 4.1kpb (pCQ12 ó región nif b). Con el fin de conocer la organización de estos genes nif, se procedió a construir y aislar fagos recombinantes que contuvieran segmentos más extensos del-

genoma de *Rhizobium phaseoli*.

Las regiones nif de *R. phaseoli* también fueron aisladas de un banco de genes en fagos de la cepa CFN-42 (131), construido en el fago vector λ 1059 (80), con parciales de BamHI. Estas clonas fueron utilizadas para análisis de heteroduplex entre diferentes fagos. Las regiones nif a y nif b son homólogas al menos en 4.7kpb y la región nif c es homóloga 1.3kpb tanto con nif a como con nif b (134).

Experimentos de secuenciación indican que las tres diferentes regiones nif contienen completa la secuencia codificada para la nitrogenasa reductasa (134).

VII B I B L I O G R A F I A

1. Marzluf, G.A. (1981). *Microb. Rev.*, 437-461.
2. Fincham, J.R.S., Day P.R. and Radford A. (1979). En: *Fungal Genetics 4*. University of California Press. 380.
3. Krumlauf, R., and Marzluf, G.A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 1138-1145.
4. Dunn-Coleman, N.S., Robey, E.A., Tomsett, B., and Garret, R.H. (1981). *Mol. Cel. Biol.* 1, 158-164.
5. Palacios, R. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 487-491.
6. Palacios, R., Campomanes, M., and Quinto, C. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 3028-3034.
7. Sánchez, F., Campomanes, M., Quinto, C., Hansberg, W., Mora, J., and Palacios, R. (1978). *J. Bact.* 136, 880-885.
8. Sánchez, F., Calva, E., Campomanes, M., Blanco, L., Guzmán, J., Saborío, J.L., and Palacios, R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 2231-2234.
9. Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J., and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92, 134-140.
10. Lara, M., Campomanes, M., Calva, E., Palacios, R., and Mora, J. (1982). *J. Bact.* 150, 105-112.
11. Dávila, G., Sánchez, F., Palacios, R., Mora, J. (1978). *J. Bact.* 134, 693-698.
12. Limón, J., Lara, M., Resendiz, B., and Mora, J. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 1234-1240.
13. Mora, Y., Chávez, O., and Mora, J. (1980). *J. Gen. Microbiol.* 118, 455-463.
14. Hernández, G., Sánchez-Pescador, R., Palacios, R., and Mora, J. (1983). *J. Bact.* 154, 524-528.
15. Perkins, D.D., Radford, A., Newmeyer, D., and Bjorkman, M. (1982). *Microbiol. Rev.* 46, 426-570.

16. Wootton, J.C., Chambers, G.K., Holder, A., Baron, A.J., Taylor, J.G., Fincham, J.R.S., Blumenthal, K.M., Moon, K., and Smith, E.L. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 4361-4365.
17. Fincham, J.R.S., Day, P.R., and Radford, A. (1979). *En: Fungal Genetics* 4. University of California Press. 320-327.
18. Kinnaird, J.H., Keighren, M.A., Kinsey, J.A., Eaton, M., and Fincham, J.R.S. (1982). *Gene* 20, 387-396.
19. Hummelt, G., and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92, 127-133.
20. Hummelt, G., and Mora, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96, 1688-1694.
21. Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S. and Britten, R.J. (1973). *J. Mol. Biol.* 77, 1-23.
22. Krumlauf, R., and Marzluf, G.A. (1979). *Biochemistry* 18, 3705-3713.
23. Krumlauf, R., and Marzluf, G.A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 1138-1145.
24. Britten, R.J., and Davidson, E.H. (1969). *Science* 165, 349-357.
25. Davidson, E.H., and Britten, R.J. (1979). *Science* 204, 1052-1059.
26. Vapnek, D., Hautala, J.A., Jacobson, J.W., Giles, N., and Kushner, S.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 3508-3512.
27. Alton, K.N., Hautala, J.A., Giles, N., Kushner, S.R., and Vapnek, D. (1978). *Gene* 4, 241-259.
28. Case, M.E., Schweizer, M., Kushner, S.R., and Giles, N. (1979). *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5259, 5263.
29. Schweizer, M., Case, M.E., Dykstra, C.C., Giles, N., and Kushner, S.R. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 5086-5090.
30. Schweizer, M., Case, M.E., Dykstra, C.C., Gilis, N., and Kushner, S.R. (1981). *Gene* 14, 23-32.
31. Patel, V.B., Schweizer, M., Dykstra, C.C., Kushner, S.R., and Giles, N. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 5783-5787.

32. Kinnaird, J.H., and Fincham, J.R.S. (1983). *Gene* 20, 253-260.
33. Kinsey, J.A., and Rambosek, J.A. (1984). *Mol. Cel. Biol.* 4, 117-122.
34. Keeseey, J.K., and Demoss, J.A. (1982). *J. Bact.* 152, 954-958.
35. Schechtman, M.G., and Yanofsky, Ch. (1983). *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 83-99.
36. Buxton, F.P. and Radford, A. (1983). *Mol. Gen. Genet.* 190, 403-405.
37. Free, S.J., Rice, P.W., and Metzenberg, R.L. (1979). *J. Bact.* 137, 1219-1226.
38. Woudt, L.P., Pastink, A., Kempers-Veenstra, A.E., Jansen, A.E.M., Mager, W.H., and Plauta, R.J. (1983). *Nuc. Acids. Res.* 11, 5347-5360.
39. Reinert, W.R., and Giles, N. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 4256-4260.
40. Hulett, F.M., De Moss, J.A. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 6648-6652.
41. Ballance, D.J. Buxton, F.P. and Turner, G. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112, 284-289.
42. Henschel, C.C., and Birnstiel, M.L. (1981) *Cell* 25, 301-314.
43. Crawford, R.J., Kreig, P.A., Harvey, R.P., Hewish, D.A., and Wells, J.R.E. (1979). *Nature* 279, 132-136.
44. Engel J.D., and Dogson, J.B. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 2856-2860.
45. Hereford, L., Fahrner, K., Wooldford, J., Rosbash, M., and Kaback, D.B. (1979). *Cell.* 18, 1261-1271.
46. Van Donge, W., de Laaf, L., Zall, R., Moorman, A., and Destreé, O.H.J. (1981). *Nucl. Acids. Res.* 9, 2297-2311.
47. Ruberti, I., Fragapare, P., Perandrei-Amaldi, P., Beccari, E., and Amaldi, F. (1982). *Nucl. Acids. Res.* 10, 7543-7559.
48. Heintz, N., Zernik, M., and Roeder, R.G. (1981) *Cell* 24, 661-668.
49. Sierra, F., Lichtler, A., Marashi, F., Rickles, R., VanDijke, F., Clark, S., Wells, J., Stein, G., and Stein, J. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 1795-1799.

50. Enquist, I., and Szybalski, W. (1978). En: Viruses and Environment. (Ed. Jurstak, E., and Maramorosch, K.). Academic Press, New York. Cap. 31. pp. 625-652.
51. Abelson, J. (1977). Science 196, 159-160.
52. Jacob, F., Brenner, S., and Cuzin, F. (1963). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.
53. Boyer, H.W., Betlach, M., Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Heyneker, H. L., Shine, J., and Goodman, H.M. (1977). En: Recombinant Molecules: Impact on Science and Society. (Ed. Beers, R.F., and Bassett, E.G.). Raven Press, New York. pp 9-20.
54. Zehnbauer, B.A., and Blattner, F. (1982). En: Genetic Engineering. Principles and Methods. (Ed. Setlow, J.K., and Hollaender, A) Plenum Press, New York. Vol.4, 249-279.
55. Singer, M.F. (1979). En: Genetic Engineering. Principles and Methods. (Ed. Setlow, J.K., and Hollaender, A.). Plenum Press, New York. Vol. 1, 1-13.
56. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 98-148.
57. Brooks, J.E., and Roberts, R.J. (1982). Nuc. Acids. Res. 10, 913
58. Roberts, R.J. (1977). En: Recombinant Molecules: Impact on Science and Society. (Ed. Beers, R.F., and Bassett, E.G.). Raven Press, New York. pp 21-32.
59. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 146.
60. Bolivar, F. (1979). Rev. Lat-amer. Microbiol. 21, 37-55.
61. Clark, L. and Carbon, J. (1976). Cell 9, 91-99.
62. Blattner, F., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Richards, J.E., Slightom, J.L., Tucker, P.W., and Smithies, O. (1977). Science 202, 1279-1284.
63. Blattner, F., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L., and Smithies, O. (1977). Science 196, 161-169.

64. Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Conner, C., Quon D., Sim, G.K., and Efstratiadis, A. (1978). *Cell* 15, 687-701.
65. Szybalski, E., and Szybalsky, W. (1979]. *Gene* 7, 217-270.
66. Herskowitz, I., and Hagen, D. (1980). *Ann. Rev. Genet.* 14, 399-445.
67. Friedman, D., and Gottesman, M. (1983). En: *Lambda II*. (Ed. Hendrix R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W., and Weisberg, R.A.). Cold Spring Harbor Lab. pp. 21-51.
68. Murray, N. (1983). En: *Lambda II*. (Ed. Hendrix, R.W., Roberts, J. W., Stahl, F.W., and Weisberg, R.A.). Cold Spring Harbor Lab. pp 395-432.
69. Woo, S.L.C. (1979). En: *Methods in Enzymology*. (Ed. Wu, R.). Academic Press, New York. Vol. 68 pp. 389-395.
70. Williams, B.G., and Blattner, F. (1979). *J. Vir.* 29, 555-575.
71. Williams, B.G., and Blattner, F. (1980). En: *Genetic Engineering. Principles and Methods*. (Ed. Setlow, J.K., Hollaender, A.). Plenum Press, New York, Vol. 2, 201-229.
72. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. pp. 17-42.
73. Feiss, M., Fisher, R.A., Crayton, M.A., and Egner, C. (1977). *Virology* 77, 281.
74. Sternberg, N., Tiemeier, D., and Enquist, L. (1977). *Gene* 1, 255-280.
75. Karn, J., Brenner, S., Barnett, L., and Cesareni, G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5172-5176.
76. Karn, J., Brenner, S., and Barnett, L. (1983). En: *Methods and Enzymology*, Academic Press, Inc. Vol. 101, 3-19.
77. Young, R.A., and Davis, R. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1194-1198.
78. Young, R.A., and Davis, R. (1983). *Science* 222, 778-782.
79. Zissler, J., Signer, E.R., and Schaefer, F. (1971). En: *The Bacteriophage Lambda*. (Ed. Hershey, A.D.). Cold Spring Harbor Lab. pp. 455-468.
80. Schoenberg, D.R. (1984). *Gene Anal. Techn.* 1, 3-8.

81. Vogel, H.J. (1964). American Nat. 98, 435-446.
82. Blakesley, R.W. (1983). En: Gene Amplification and Analysis. (Ed. Chirikjian, J.G., and Papas, T.S.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam. Vol. 12, 85-113.
83. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) En: Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 286-289.
84. Hohn, B. (1979). En: Methods in Enzymology. Vol. 68, 299-309.
85. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 213-214.
86. Payvar, F., and Schimke, R.T. (1979). J.Bact.Chem. 254, 7636-7642.
87. Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977). Science 196, 180
88. St John, T.P., and Davis, R.W. (1979). Cell 16, 443-452.
89. Southern, E.M. (1975). J.Mol.Biol. 98, 503-517.
90. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 383-386.
91. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. pp. 335-343.
92. Alwine, J.C., Kemp, D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R. and Wahl, G.M. (1979). En: Methods in Enzymology. Vol. 68, 220-242.
93. Alwine, J.C., Kemp, D.J., and Stark, G.R. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5350-5354.
94. Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Hodes, C., and Berg, P. (1977). J. Mol. Biol. 113, 237-251.
95. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 330-333.
96. Miller, J.S., Roberts, B.E., and Paterson, B.M. (1982). En: Genetic Engineering, Plenum Press, New York. Vol. 4, 103-117.

97. Covarrubias, A.A., Rocha, M., Boliyar, F., and Bastarrachea, F. (1980). *Gene* 11, 239-251.
98. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. pp. 371-373.
99. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. pp. 76-85.
100. Kramer, R.A., and Andersen, N. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6541-6545.
101. Bostian, K.A., Lemire, J.M., Cannon, E., and Halvorson, H.O. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 4504-4508.
102. Vieira, J., and Messing, J. (1982). *Gene* 19, 259-268.
103. Thomas, P.S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5201-5205.
104. Fredman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikjema, W.S., and Ausubel, F.M. (1982). *Gene* 18, 289-296.
105. Seed, B., Parker, R.C., and Davidson. (1982). *Gene* 19, 201-209.
106. Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4576-4580.
107. Pathel, G., and Tyler, B. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4544-4548.
108. McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Justu, S. (1981). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78, 2135-2139.
109. Covarrubias, A.A., Sánchez_Pescador, R., Osorio, A., Boliyar, F., and Bastarrachea, F. (198). *Plasmid* 3, 150-164.
110. Covarrubias, A.A., and Bastarrachea, F. (1983). *Mol. Gen. Genet.* 190, 171-175.
111. Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C., and Boyer, H.W. (1977) *Gene* 2, 75-93.
112. Bastarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A.A., Osorio, A., and Bolívar, F. (1980). *En: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation.* (Ed. Mora, J. and Palacios, R.). Academic Press, New York. pp. 107-121.

113. Sthrul, K., Stinchcomb, D.T., and Davis, R.W. (1980). *J.Mol.Biol.* 136, 291-307.
114. Wallace, R.B., Johnson, M.J., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H. and Itakura, K. (1981). *Nucl.Acids.Res.* 9, 879-894.
115. Noyes, B.E., Mevarech, M., Stein, R., and Agarwae, K.L. (1979). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 76, 1770-1774.
116. Matteucci, M.D., and Caruthers, M.H. (1981). *J. Ann.Chem.Soc.* 103, 3185-3191.
117. Drapeauau, G.R., Boily, Y., and Houmard, J. (1972). *J.Biol.Chem.* 247, 6720-6726.
118. González, A., Dávila, G., y Calva, E. (1985). *Gene*. En prensa.
119. Scherrer, G., Wolfgang, S., Strange, C.M., Rowekamp, W., and Schutz, G. (1982). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79, 7205-7208.
120. Foster, D.N., Schmidt, L.J., Hodgson, C.P., Moses, H.L., and Getz, M.J. (1982). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79, 7317-7321.
121. Ogata, R.T., Shreffler, D.C., Sepich, D.S., and Lilly, S.P. (1983). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80, 5061-5065.
122. Dávila, G., Brom, S., Mora, Y., Palacios, R., and Mora, J. (1983). *J. Bact.* 156, 993-1000.
123. Rosenberg, M., Ho, Y., Shatzman, A. (1983). En: *Methods in Enzymology*. Vol. 101, 123-138.
124. Gribskov, M., and Burgess, R.R. (1983). *Gene* 26, 109-118.
125. Young, R.A., and Davis, R.W. (1983). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80, 1194-1198.
126. Young, R.A. and Davis, R.W. (1983). *Science* 222, 778-782.
127. Goto, T., and Wang, J.C. (1984). *Cell* 36, 1073-1080.
128. Ruvkun, G.B., Sundaresan, V., and Ausubel, F.M. (1982). *Cell* 29, 551-559.
129. Adams, T.H., and Chelm, B.K. (1984). *J.Mol.Appl.Genet.* 2, 392-405.
130. MacNeil, T., MacNeil, D. Roberts, G.P., Supiano, M.A., and Brill, W.J. (1978). *J.Bact.* 136, 253-266.
131. Ruvkun, G.B., and Ausubel, F.M. (1980). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 77, 191-195.

132. Cannon, F.C., Riedel, G.E., and Ausubel, F.M. (1979). *Mol. Gen. Genet.* 174, 59-66.
133. Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., and Palacios, R. (1982). *Nature* 299, 724-726.
134. Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.L., Calva, E., and Palacios, R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1170-1174.

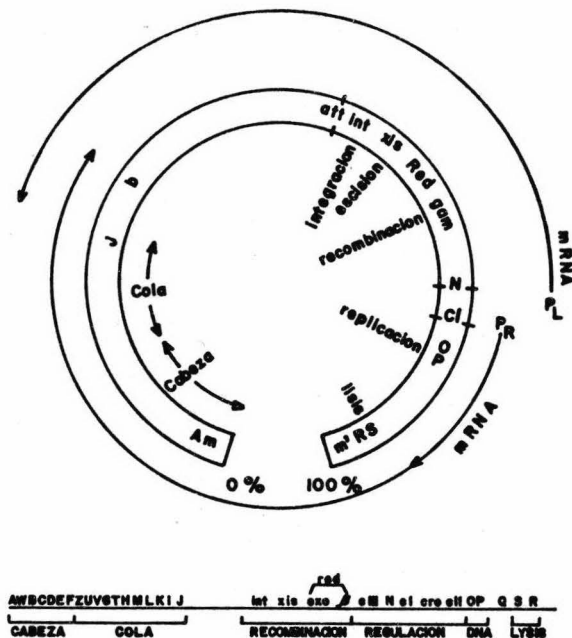


FIGURA 1. MAPA GENETICO Y FUNCIONAL DEL DNA DE LAMBDA. Los genes A-- 7 son esenciales para el crecimiento lítico normal. Los genes no esenciales para el crecimiento lítico son *CI*, *CII*, *CIII*, y *cro*, los cuales participan en la regulación negativa; los genes *int* y *xis* están involucrados con la recombinación sitio específica y los genes *red* y *lys* para la formación del modo tardío de replicación.

λ 1059: h λ s Bam^Ib189 <int 29 nin L44 c1857 pac129> Δ [int-clIII]
KH 54 sR14⁺ nin 5 chi 3

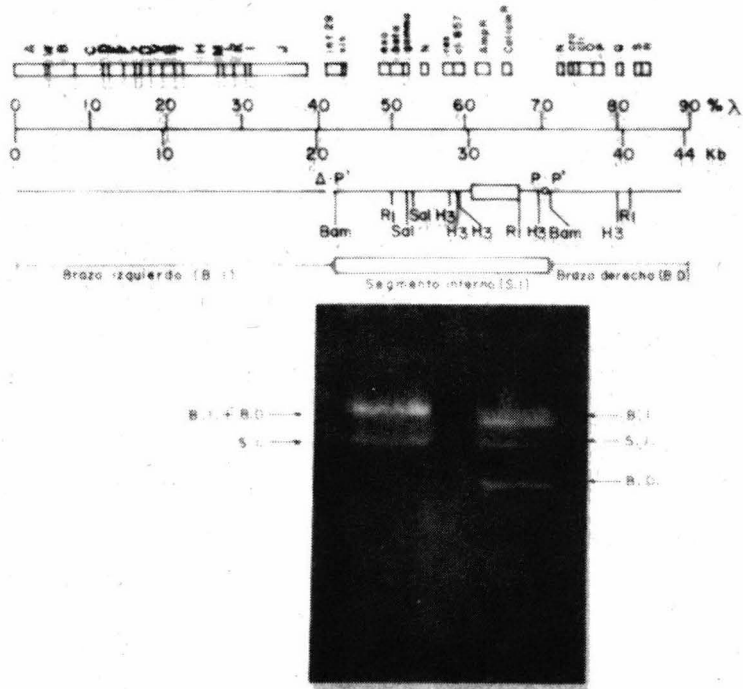


FIGURA 2. MAPA GENETICO DEL FAGO VECTOR LAMBDA 1059.

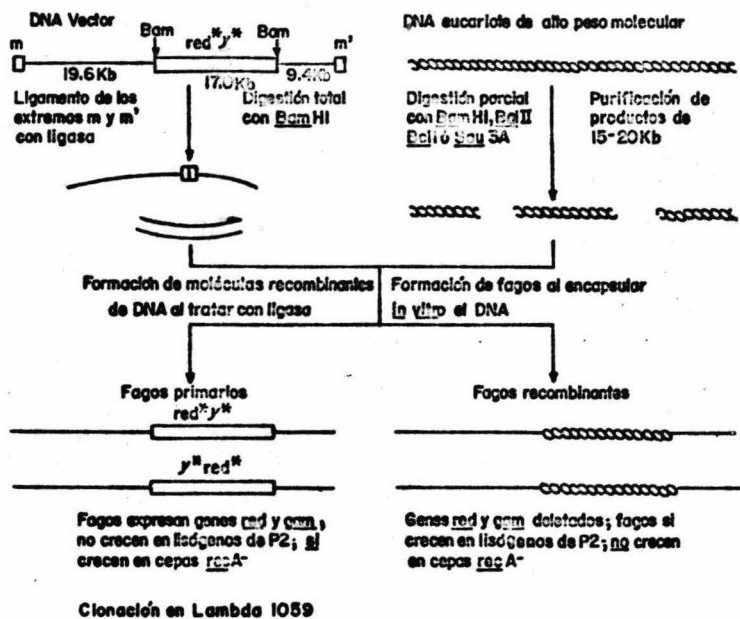


FIGURA 3. CLONACION EN LAMBDA 1059.

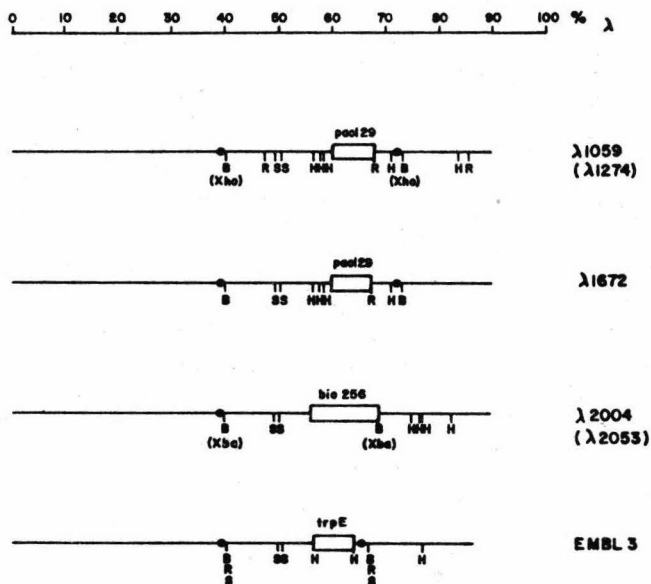


FIGURA 4. MAPAS DE RESTRICION DE FAGOS VECTORES DERIVADOS DE LAMBDA CON SELECCION POSITIVA PARA RECOMBINANTES.

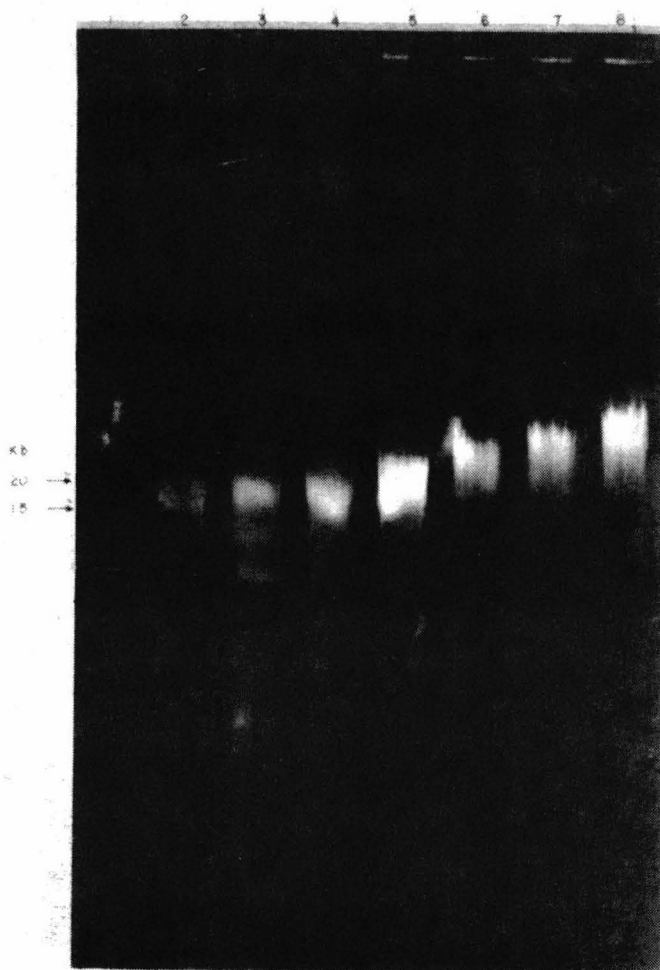


FIGURA 5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA DE DIGESTIONES LIMITADAS DE DNA DE *Neurospora crassa* con *Bam*HI. DNA de alto peso molecular del hongo fué digerido con diferentes cantidades de *Bam*HI y separado en geles de agarosa. (1)DNA de *Neurospora* sin digerir; (2-8)Alícuotas de DNA con diferentes grados de digestión. El tamaño de los fragmentos de 15 a 20kpb son indicados.

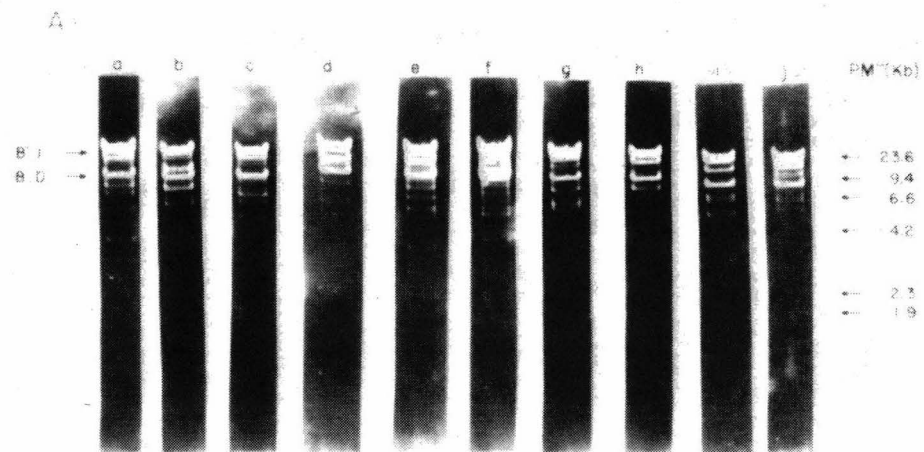
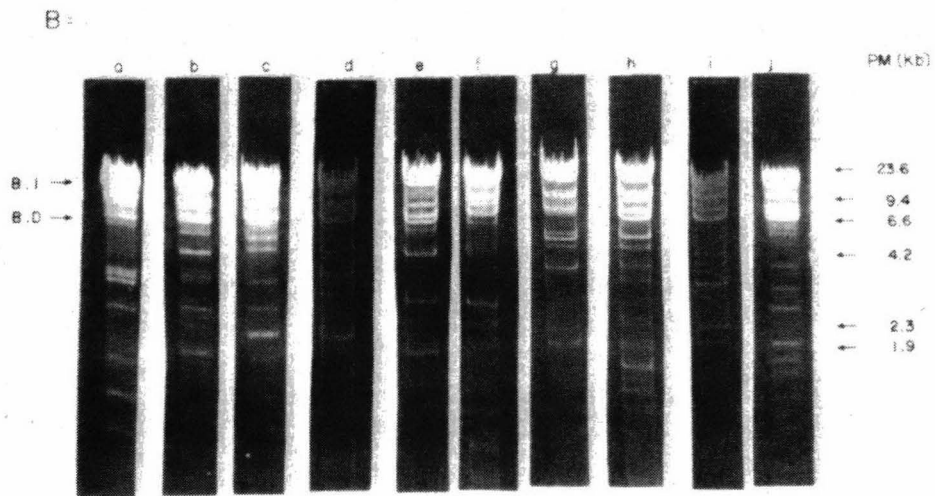


FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA DEL DNA DE FAGOS RECOMBINANTES DIGERIDO TOTALMENTE CON *Bam*HI.

A) Clonas independientes aisladas del banco de genes de *Neurospora crassa* construido con fragmentos de DNA generados por la enzima *Bam*HI.



B) Clonas independientes aisladas del banco de genes de *Neurospora crassa* construido con fragmentos de DNA generados por la enzima *Sau3A*

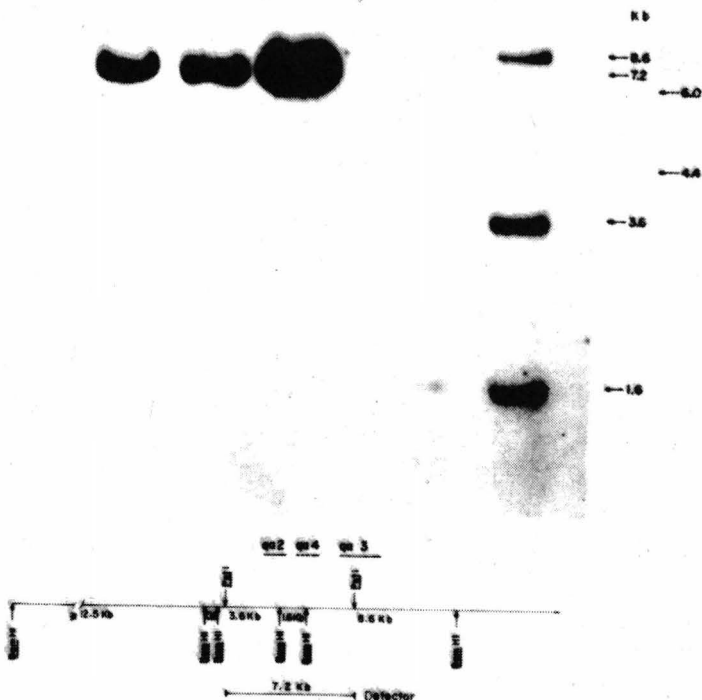


FIGURA 7. DETECCIÓN DEL GENE *qa-2* DENTRO DEL BANCO DE GENES DE *Neurospora crassa* CONSTRUIDO CON PARCIALES GENERADAS POR LA ENZIMA *Bam*HI. Hibridización tipo Southern de digestiones con A) *Pst*I (1) DNA total del banco, 10 µg; (2) DNA de *N. crassa*, 3 µg; (3) pVK88, 0.002-µg. B) *Bam*HI de (4) DNA de *N. crassa*, 3 µg. Contra el pVK88 marcado radiactivamente con 32 P, en presencia de 50 µg/ml de pBR322. En la parte inferior se muestra el mapa de restricción de la región del genoma de *N. crassa* que contiene *qa-2*, y la contenida en el detector.

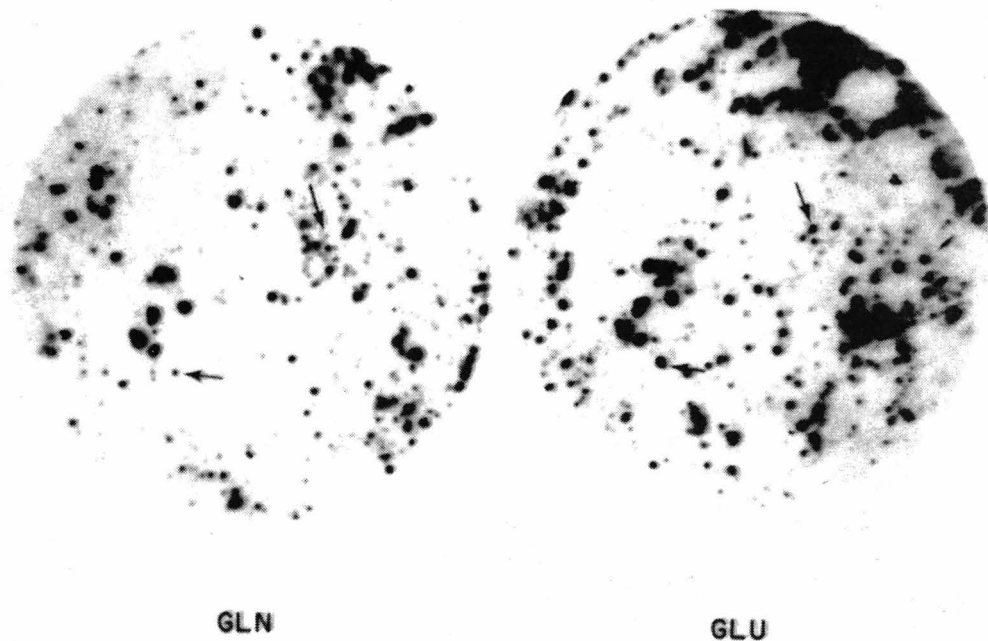


FIGURA 8. HIBRIDIZACION DIFERENCIAL. Hibridización en placa del DNA de aproximadamente 10^4 ufp transferido a filtros de nitrocelulosa contra 10^7 cpm de ^{32}P -cDNA sintetizado a partir de mRNA polia⁺ de las cepas *gln1-a* y 74-A, crecidas en glutamina y glutámico respectivamente.

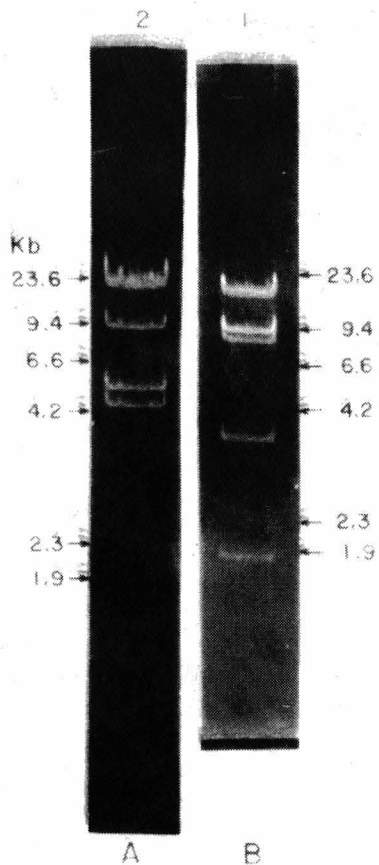
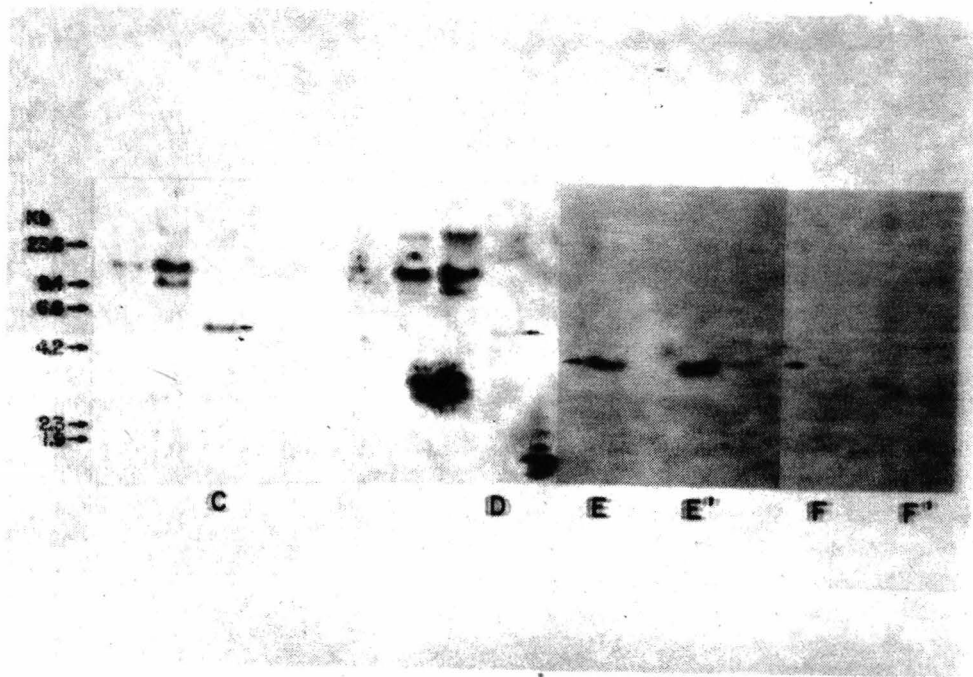


FIGURA 9. FAGOS QUE CONTIENEN FRAGMENTOS DE DNA QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE.

I) Electroforesis en geles de agarosa de digestiones totales con *Bam*HI del DNA de los fagos (A) λ Nc5.4; y (B) λ Nc3.8.



II) Hibridización tipo Southern de los fagos (C,D) λ Nc3.8; y (D,E) λ Nc5.4. Los DNAs digeridos con *Bam*HI fueron hibridizados a 10^6 cpm/carril de 32 P-cDNA sintetizado a partir de mRNA poliA⁺ de la cepa 74-A, crecida en glutámico (C,E); y de la cepa *gln1-a*, crecida en glutamina (E,F).

Genes de *Neurospora crassa* transcritos diferentemente
 en las cepas 74A y *gln 1-a*.

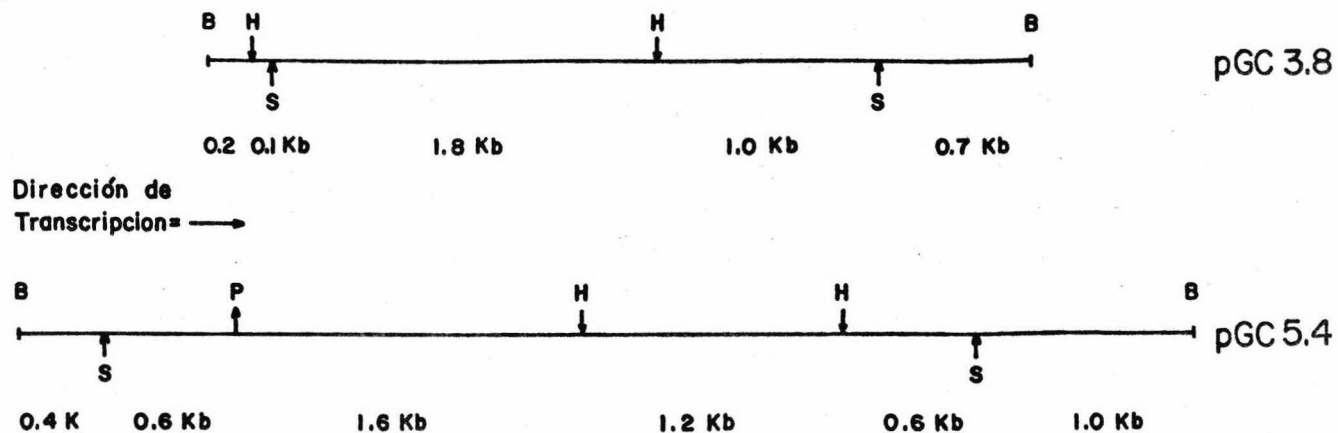


FIGURA 10. MAPAS DE RESTRICCIÓN DE LAS REGIONES DE DNA DE *Neurospora crassa* 5.4 y 3.8kpb, FLANQUEADAS POR SITIOS DE *BamHI* .(B:*BamHI* ;H:*HindIII*;s:*SalI* ;p:*PstI*).

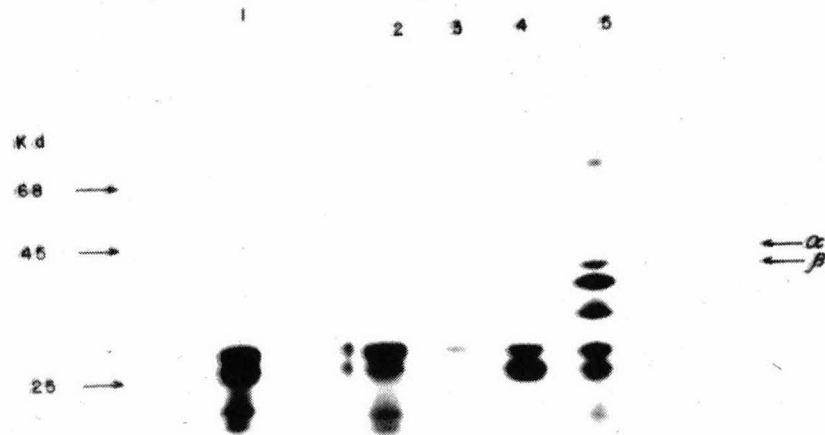


FIGURA 11. PROTEINA ^{32}S -METIONINA PRODUCIDAS EN MINICELULAS DE *E. coli*. La cepa P678-54 fué transformada con los plásmidos pGC3.8 y pGC5.4. (1) Control, sin transformar; (2) Transformada con el pGC3.8, en una de las dos orientaciones posibles; (3) Transformada con el pGC3.8 en la otra orientación posible; (4) Transformada con el pGC5.4, en la orientación "U"; y (5) Transformada con el pGC5.4, en la orientación "N".

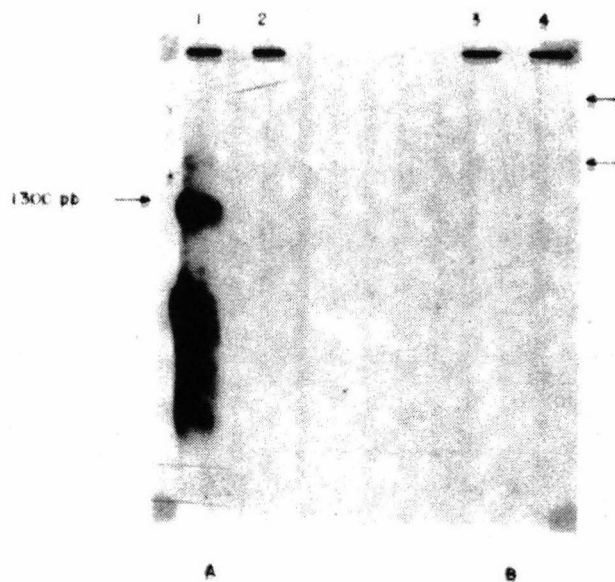


FIGURA 12. HIBRIDIZACION TIPO "NORTHERN". Las preparaciones de mRNA poliA⁺ de las cepas 74-A y *gln1-a*, separadas en geles de agarosa conteniendo hidróxido de metil mercurio y transferidas a papel DBM, fueron hibridizadas a 10⁶ cpm/carril de A) pGC3.8; B) pGC5.4. Carriles (1,3) RNA poliA⁺ de la cepa 74-A crecida en glutámico; (2,4) RNA poliA⁺ de la cepa *gln1-a* crecida en glutamina.

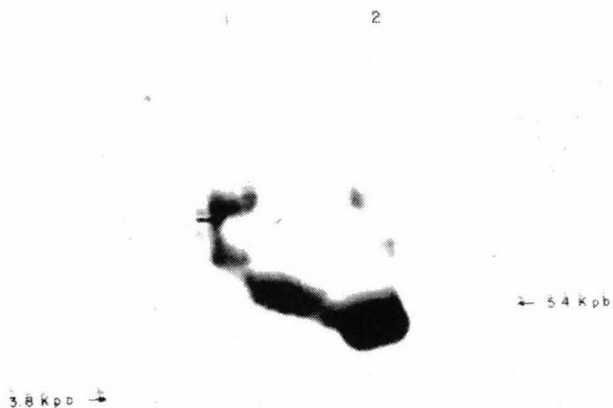


FIGURA 13. HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DE DIGESTIONES CON *Bam*HI DEL DNA DE LOS FAGOS (1)λNc3.8; y (2) λNc5.4, contra el fragmento de *Bam*HI 5.4 semipurificado por electroelución y - marcado radiactivamente con 32 P.

Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*

(DNA reiterations/identical genes/symbiotic nitrogen fixation/nucleotide sequence/*in vitro* mutagenesis)

CARMEN QUINTO, HUMBERTO DE LA VEGA, MARGARITA FLORES, JAN LÉEMANS, MIGUÉL ANGEL CEVALLOS, MARCO AURELIO PARDO, RICARDO AZPIROZ, MARIA DE LOURDES GIRARD, EDMUNDO CALVA, AND RAFAEL PALACIOS

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Communicated by Harold J. Evans, October 1, 1984

ABSTRACT The complete coding sequence of the nitrogenase reductase gene (*nifH*) is present in three different regions of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. Homology between two of the regions containing *nifH* coding sequences extends over 5 kilobases. These in turn share 1.3 kilobases of homology with the third region. The nucleotide sequences of the three nitrogenase reductase genes were found to be identical. Site-directed insertion mutagenesis indicated that none of the three genes is indispensable for nitrogen fixation during symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. This implies that at least two of the reiterated genes can be functionally expressed.

Some prokaryotic organisms are able to fix atmospheric nitrogen due to the presence of the nitrogenase enzyme complex. This complex is composed of two enzymes: nitrogenase (component I) and nitrogenase reductase (component II). Component I is composed of two α subunits and two β subunits encoded by the *nifD* and *nifK* genes, respectively. Component II is composed of two identical subunits encoded by the *nifH* gene. The genes coding for the nitrogenase polypeptides were originally characterized in *Klebsiella pneumoniae* (1-3). In this organism *nif* genes *H*, *D*, and *K* are organized in one transcriptional unit. Nitrogenase structural genes are highly conserved in evolution. Gene probes isolated from *K. pneumoniae* cross-hybridize with equivalent sequences from a wide variety of nitrogen-fixing organisms (4). This has facilitated the analysis of these genes in other organisms, including bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, which fix nitrogen in symbiosis with the roots of legumes (5-10).

For *Rhizobium phaseoli*, the symbiont of *Phaseolus vulgaris*, we reported the reiteration of nitrogen-fixation gene sequences (11). In this paper we present a structural and functional analysis of reiterated nitrogenase reductase DNA sequences. We conclude that nitrogenase reductase is a functional multigene family in *R. phaseoli*.

METHODS

***R. phaseoli* Phage Library.** Total DNA from CFN-42 strain (11) was partially digested with *Bam*HI and the 15- to 25-kilobase (kb) fraction was cloned in λ 1059 (12, 13).

Bacteroid DNA Isolation. Nodules were ground with dry ice, suspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.5 M mannitol/20 mM sodium succinate/0.1% 2-mercaptoethanol (buffer A) and homogenized. The homogenate was filtered through cheesecloth, rinsed with buffer A, and centrifuged

at 1500 rpm in Sorvall HB4 rotor at 4°C. The supernatant was centrifuged at 9000 rpm in the same rotor at 4°C, and the pellet was resuspended in protoplast medium (15 mM Tris-HCl, pH 8/0.45 M sucrose/8 mM EDTA) and incubated at 0°C for 5 min. This bacteroid suspension was centrifuged at 10,000 rpm in a Sorvall HB4 rotor, the pelleted cells were lysed, and the DNA was extracted as previously reported (11).

Hybridization and Heteroduplex and DNA Sequence Analysis. Probes were labeled with 32 P by nick-translation (14). DNA was transferred from agarose gels to nitrocellulose filters as described by Southern (15), and hybridization to probes was performed under stringent conditions as reported previously (11). Hybridization to phage plaques was done according to Benton and Davis (16). Formation of heteroduplex molecules and electron microscopic analysis were as described previously (17). DNA sequencing was carried out according to Sanger *et al.* (18). Phages M13mp8 and M13mp9 were used as sequencing vectors (19).

Site-Directed Mutagenesis. Intermediate vectors (20) were constructed as shown in Fig. 3A. *Escherichia coli* strains carrying intermediate vectors were mated with HB101 (pRK2013) and with *R. phaseoli* strain CE-3 [streptomycin-resistant (Str^R) CFN-42] by mixing stationary cultures of donors and recipients. Cells were plated on PY medium (0.5% peptone/0.3% yeast extract/10 mM CaCl₂) and incubated overnight at 28°C. Cells were resuspended in 10 mM MgSO₄ and dilutions were plated on selective media. *E. coli* was counterselected on PY plates containing nalidixic acid at 10 μ g/ml because CFN-42 is naturally resistant to this drug. Antibiotic concentrations for *R. phaseoli* were 50 μ g/ml for kanamycin and 2 μ g/ml for tetracycline.

Assay for Nodulation and Nitrogen Fixation. Sterile *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa seedlings were grown in nitrogen-free plant nutrient agar (21). Three to four days after germination in the dark, plants were inoculated with 0.5 ml of liquid bacterial culture. Nodulation and nitrogenase activity (acetylene reduction) were measured 17 days after inoculation.

RESULTS

Extent of Homology Among *nif* Regions. We reported previously (11) the isolation of clones containing *nif* gene sequences from a total genome library of *R. phaseoli* strain CFN-42 constructed in the *Eco*RI site of pBR328. Three recombinant plasmids were isolated: pCQ15, pCQ23, and pCQ12, which contain *Eco*RI inserts of 4.7, 4.5, and 4.1 kb, respectively. Hybridization of such plasmids with total

Abbreviations: Str^R, streptomycin resistant (resistance); Km^R, kanamycin resistant (resistance); kb, kilobases).

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

genome blots from different *R. phaseoli* strains showed the reiteration of *nif*-related DNA sequences (11). The different reiterated *nif* regions were localized in a 250-kb plasmid of strain CFN-42 (11). This strain harbors six large plasmids, and the one containing *nif* gene sequences (p42-d) also encodes nodulation functions (see Discussion).

The *nif* regions contained in p42-d were isolated as recombinant λ phages from a CFN-42 DNA library of *Bam*HI partial digests. λ GC1, λ GC2, and λ GC3 contain the *Eco*RI fragments present in pCQ15 (*nif* region a), pCQ12 (*nif* region b), and pCQ23 (*nif* region c), respectively. Electron microscopic analysis of heteroduplex molecules formed between different pairs of the recombinant phages (Fig. 1A) revealed that *nif* regions a and b are homologous over a stretch of at least 4.7 kb. Hybridization experiments with overlapping phages (not shown) indicate that homology between regions a and b ends near the *Bam*HI site at the left of λ GC2. The *nif* region c is homologous over 1.3 kb with both *nif* regions a and b.

The inserts of the recombinant plasmids pCQ15, pCQ12, and pCQ23 were mapped with restriction endonucleases. The *Eco*RI sites that limit these inserts were localized on the *Bam*HI maps of the recombinant phages. Restriction sites were conserved in the regions identified as homologous by

heteroduplex analysis, whereas differences in enzyme sites were evident outside these zones (Fig. 1B). The position of the coding region of the *nifH* gene, whose presence in each region was demonstrated by DNA sequence analysis (see below and Fig. 2), was aligned on the three restriction maps (Fig. 1B).

Nucleotide Sequence of Reiterated *nifH* Genes. Fragments showing hybridization with the *nifH* gene of the three *nif* regions were sequenced. The sequence strategy is shown in Fig. 1B. About 1100 nucleotides were sequenced in each region (Fig. 2) and aligned on the restriction maps (Fig. 1B). An initiation and a termination codon determine an open reading frame of 296 codons. This nucleotide sequence is identical in the three regions and has a large degree of homology with the nitrogenase reductase sequences that have been found in other nitrogen-fixing organisms (22-29). The highest degree of homology was found with other rhizobia (22-24). There are two additional ATG codons at positions 22 and 64 upstream from the one assigned here as the nitrogenase reductase initiation codon. These would determine open reading frames of 305 and 319 codons. Such alternative polypeptides would not have homology in the amino-terminal region with other known nitrogenase reductase proteins.

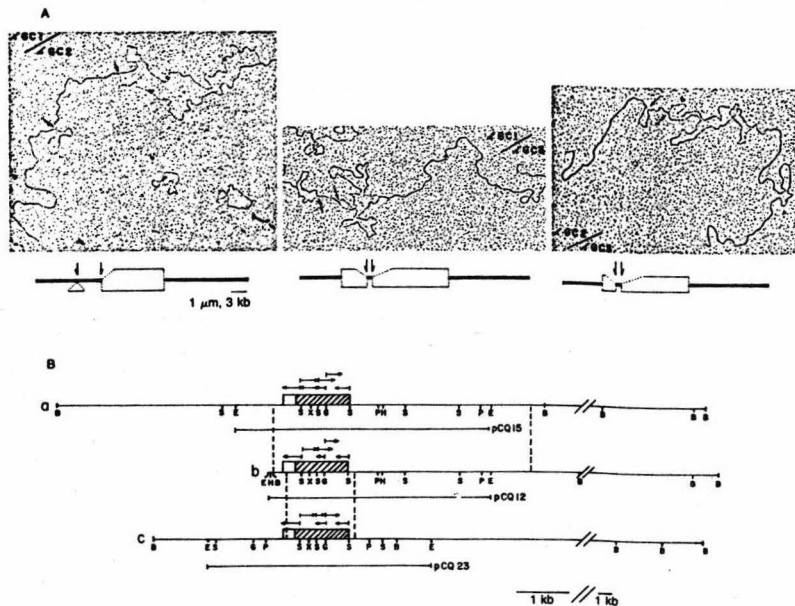


FIG. 1. Extent of homology among *nif* regions of strain CFN-42. (A) Electron micrographs and schematic representation of heteroduplexes between recombinant phages λ GC1, λ GC2, and λ GC3. Arrows indicate the positions of the regions in which there is homology between the inserts. The schemes represent the mean values of 10 molecules measured; thin and dotted lines represent single-stranded DNAs. (B) Restriction endonuclease map of *nif* regions. *Bam*HI sites were mapped in the recombinant phages by partial digestions with overlapping phages. Other enzyme sites were mapped by single and multiple digestions in the *Eco*RI inserts of pCQ15, pCQ12, and pCQ23. Endonuclease sites are B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bgl* II; P, *Pst* I; S, *Sal* I; X, *Xho* I; and H, *Hind* III. Bars above the maps show the regions that have been sequenced. Hatched portion indicates *nifH* coding sequence. The sequencing strategy is indicated by arrows above the bars.

Moreover, the position of some presumptive regulatory features discussed below would not fit with initiation at these alternative positions.

The sequence data indicate that a complete coding sequence for nitrogenase reductase is present in the three dif-



FIG. 2. Nucleotide sequence of reiterated *nifH* regions. Nucleotides in regions b and c identical to region a are indicated by dots. Nucleotide 1 corresponds to the first base of the presumptive initiation codon. The coding region for *nifH* is shown as triplets with corresponding amino acid residues above. Amino acids identical with the *R. meliloti* sequence are indicated by asterisks on top of them. DNA sequences referred to in the text are underlined. The *Sal* I sites are indicated by arrows.

ferent *nif* regions. The sequence upstream of the initiation codon was determined for about 200 base pairs in each region. The sequence is identical in the three regions up to nucleotide 96 upstream from the presumptive initiation codon. At that point region c diverges, while regions a and b remain identical. A purine-rich region is located 7 nucleotides upstream from the suggested initiation codon. This position is analogous to that designated as the ribosome binding site in enteric bacteria (30). As shown in Fig. 2, the 17-base-pair sequence A-T-G-G-C-A-C-G-G-G-T-T-T-G-A-A is located 74 nucleotides upstream from the initiation codon. This sequence shares 13 nucleotides with the sequence in the promoter region of *R. meliloti nifH* (31). It has the characteristic structure for *K. pneumoniae nif* promoters as proposed by Beynon et al. (32) and the heptameric consensus sequence that has been proposed by Ow et al. (33) to be characteristic for promoters regulated by the *glnG* and *nifA* gene products.

Site-Directed Mutagenesis of the *nifH* Genes. Intermediate vectors that are mobilized but not maintained in the recipient cell (20) were used to mutagenize each of the three *nifH* genes in CFN-42. The construction of the intermediate vectors pJL115 and pJL123 is described in Fig. 3A. In pJL115, gene *nifH* from region a was interrupted in the *Bgl* II site located at codon 147 by an insert encoding kanamycin resistance (Km^R). In pJL123, a *Bgl* II fragment from *nif* region c was replaced by the Km^R insertion, thus a deletion was created extending from about 0.5 kb upstream of the *nifH* initiation codon down to codon 147. The intermediate vectors were mobilized from *E. coli* into *R. phaseoli* CE-3, a Str^R derivative of CFN-42, in a triparental mating using HB101 (PRK2013) for mobilization (34). Double recombinants were isolated as Km^R tetracycline-sensitive *R. phaseoli* transconjugants. Direct evidence of the recombination events in isolated colonies was obtained from Southern blot hybridization experiments using *nifH* and *Tn5* sequences as probes. Transconjugants derived from pJL115 were of two types, depending whether *nif* region a or b was involved in the recombination, while those derived from pJL123 were the result of recombination in *nif* region c. CFN-2201 and CFN-2202 carried the insertion of the Km^R determinant in *nif* region a or b, respectively, as evidenced by a 2.1-kb increase in the corresponding *Bam*HI fragments. In CFN-2203 the *Bam*HI fragment increased only by 0.75 kb because it contains the deletion substitution of pJL123 that removes the 5' end and part of the coding region of the *nifH* gene in region c. Hybridization with *Sal* I-digested genomes showed the precise site of mutation involving *nifH* gene in each strain (see below, Fig. 3B).

The mutated strains were used to nodulate the roots of young bean plants. None of the three mutants showed an inability to fix nitrogen (Fig. 3C). In fact, nodulation and nitrogen fixation by the three mutant strains were comparable to those in the parental strain, CE-3. Similar nodule fresh weight and nitrogenase activity (acetylene reduction) per plant were detected.

To ascertain that the mutants were stable in the symbiotic state and that no wild-type bacteria were present in the nodules, bacteroid DNA was isolated from a pool of nodules induced by each strain and analyzed by hybridization with *nifH* and *Tn5* sequences. The hybridization pattern of DNA from the nodules was identical to that obtained with strains CFN-2201, CFN-2202, and CFN-2203 used as inoculants. Fig. 3B shows the hybridization pattern of nodule DNA. Furthermore, bacteria were isolated without kanamycin selection from nodules induced by each mutant, and all of those that were screened (80 from each mutant) proved to be Km^R .

From the symbiotic phenotype of the mutant strains we infer that none of the three *nifH* genes is indispensable for

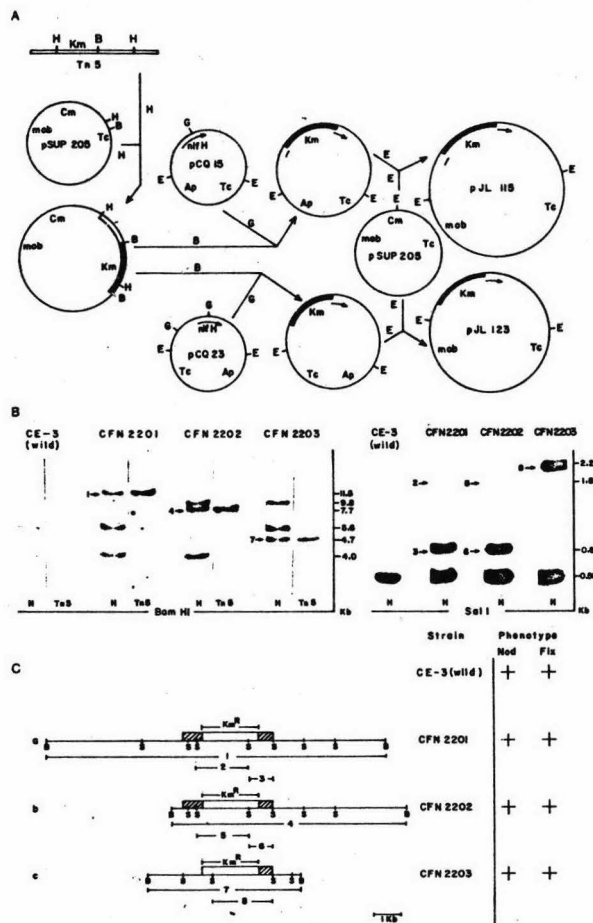


Fig. 3. Site-directed mutagenesis of reiterated *nifH* genes. (A) Construction of intermediate vectors. Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline; Ap, ampicillin; mob, mobilization. The 3-kb internal *Hind*III (H) fragment of Tn5 was inserted into the *Hind*III site of pSUP205. The resulting Km^R Cm^R plasmid provided the Km^R determinant of Tn5 of the 2.1-kb *Bam*HI (B) fragment. This fragment was ligated into the unique *Bgl* II (G) site of pCQ15, thereby interrupting the *nifH* coding sequence (see Fig. 1); pCQ23 was mutated by substituting the 1.3-kb *Bgl* II fragment for the *Bam*HI fragment carrying Km^R. Both plasmids were isolated as Ap^R Km^R Tc^R recombinants. The mutated *Eco*RI fragments were subcloned in the mobilizable vector pSUP205 to produce pJL115 and pJL123 (Km^R Tc^R). (B) Southern blot hybridization of bacteroid DNA from a pool of nodules induced by each mutant strain. DNA was digested with *Bam*HI or with *Sal*I and was hybridized with ³²P-labeled insert from pCQ153 (H) or with pBR322 carrying Tn5. The insert from pCQ153 is the *Sal*I fragment that extends from codon 119 down to 9 base pairs after the termination codon of *nifH*. Band numbers correlate with the maps in C. (C) Schematic representation and phenotype of the mutant strains. Restriction enzyme symbols are as in Fig. 1B; open bars, Km^R insertion; hatched bars, *nifH* coding sequence. Numbers correlate with hybridization bands in B.

expression of nitrogenase. This implies that at least two of the reiterated genes can be functionally expressed.

DISCUSSION

The present work shows the existence of the complete coding sequence of the nitrogenase reductase gene in three different regions of p42-d, a 250-kb plasmid of *R. phaseoli* strain CFN-42. This plasmid can be considered a symbiotic plasmid because it restores nodulation and nitrogen fixation properties in cured strains and promotes nodulation upon transfer into *Agrobacterium tumefaciens* (unpublished data).

The pattern of organization of nitrogenase genes in fast-growing rhizobia (5-8) is similar to that of *K. pneumoniae*, in which *nif* genes *H*, *D* and *K* are clustered as a single transcriptional unit. In slow-growing rhizobia (9, 10) a different organization has been found, in which *nifH* is separated from *nifD* and *K*. The data presented here show that, in *R. phaseoli*, the *nifH* gene in regions a and b is part of a reiterated DNA stretch of approximately 5 kb. Hybridization with heterologous specific probes suggests the existence of nitrogenase structural genes *nifD* and *nifK* downstream from *nifH* in these regions (unpublished data). In contrast, *nif* region c is homologous only over 1.3 kb with regions a and b, and *nifH* is the only complete nitrogenase structural gene present here.

The high degree of homology that a portion of the nucleotide sequence upstream of *nifH* has with described *nif* promoter regions (10, 31-33) suggests that such sequences might be involved in promoter functions. It is interesting that these potential regulatory signals are located in a position where the nucleotide sequences of the three *nif* regions are identical. This might imply that, unless *cis*-acting regulatory signals are located outside the zones of identity, the three genes are regulated in the same way.

Recently, reiteration of nitrogen-fixation gene sequences has been reported in other organisms. Sequences homologous to all three structural genes for nitrogenase are present in several copies in the genome of *Rhodospseudomonas capsulata*, where there is one functional *nifH* gene and extra copies can be activated (35). More than one copy of *nifH* gene has also been reported for the cyanobacteria *Anabaena* (36) and *Calothrix* (37). Besides the *nif*-related DNA reiterations shown in this work, we have evidence that other DNA sequences are also reiterated in *R. phaseoli* (unpublished data).

The concept of multigene families has been well documented in eukaryotic systems. In contrast, few examples of stable gene duplications have been reported in prokaryotic organisms (35-39). From our data we conclude that nitrogenase reductase is a functional multigene family in *R. phaseoli*. A remarkable feature of these reiterated genes is their nucleotide sequence identity. Since our results suggest that none of the three genes is essential, several questions arise for further investigation. What kind of selective pressure maintains these genes? When did these reiterations emerge and why has their nucleotide sequence not diverged? What mechanism gives stability to these sequences?

We thank Ria Maenhout and Gilbert Engler for performing the heteroduplex experiment; Yolanda Peralta, Consuelo Enriquez, and Marcos Fernández for technical assistance; and Lorenzo Segovia for critical reading of the manuscript. This research was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, and by Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada.

- MacNeil, T., MacNeil, D., Roberts, G. P., Supiano, M. A. & Brill, W. J. (1978) *J. Bacteriol.* **136**, 253-266.
- Merrick, M., Filser, M., Kennedy, C. & Dixon, R. A. (1978) *Mol. Gen. Genet.* **165**, 103-111.
- Elmerich, C., Hourmard, J., Sibold, L., Manheimer, I. & Charpin, N. (1978) *Mol. Gen. Genet.* **165**, 181-189.
- Ruvkun, G. & Ausubel, F. M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 191-195.
- Ruvkun, G. B., Sundaresan, V. & Ausubel, F. M. (1982) *Cell* **29**, 551-559.
- Corbin, D., Ditta, G. & Helinski, D. (1982) *J. Bacteriol.* **149**, 221-228.
- Ma, Q., Johnson, A. W. B., Hombreck, G. & Downie, J. A. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **187**, 166-171.
- Scott, K. F., Hughes, J. E., Gresshoff, P. M., Beringer, J. E., Rolfe, B. G. & Shine, J. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 315-326.
- Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensburger, B. & Hennecke, H. (1982) *J. Bacteriol.* **155**, 915-918.
- Adams, T. H. & Chelm, B. K. (1984) *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 392-405.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Balado, T., Soberón, G. & Palacios, R. (1982) *Nature (London)* **299**, 724-726.
- Hohn, B. (1979) *Methods Enzymol.* **68**, 299-309.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. & Cesareni, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5172-5176.
- Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
- Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Benton, W. D. & Davis, R. W. (1977) *Science* **196**, 180-182.
- Engler, G., Depicker, A., Maenhout, R., Villarroel-Mandiola, R., Van Montagu, M. & Schell, J. (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 183-208.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Messing, J. & Vieira, J. (1982) *Gene* **19**, 269-276.
- Simon, R., Priefer, V. & Puhler, A. (1983) *Bio/technology* **1**, 784-791.
- Wacek, T. & Brill, W. J. (1976) *Crop Sci.* **16**, 519-522.
- Torok, I. & Kondorosi, A. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 5711-5723.
- Scott, K. F., Rolfe, B. G. & Shine, J. (1983) *DNA* **2**, 149-155.
- Scott, K. F., Rolfe, B. G. & Shine, J. (1983) *DNA* **2**, 141-148.
- Sundaresan, V. & Ausubel, F. M. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2808-2812.
- Scott, K. F., Rolfe, B. G. & Shine, J. (1981) *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 71-81.
- Mevarech, M., Rice, D. & Haselkorn, R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6476-6480.
- Hausinger, R. P. & Howard, J. B. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2483-2487.
- Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K. T. & Mortenson, L. E. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7093-7100.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1975) *Nature (London)* **254**, 34-38.
- Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow, D. W. & Ausubel, F. M. (1983) *Nature (London)* **301**, 728-732.
- Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, V. & Cannon, F. (1983) *Cell* **34**, 673-682.
- Ow, D. W., Sundaresan, V., Rothstein, D. M., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2524-2528.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1648-1652.
- Scolnik, P. A. & Haselkorn, R. (1984) *Nature (London)* **307**, 289-292.
- Rice, D., Mazur, B. J. & Haselkorn, R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13157-13163.
- Kallas, T., Rebriere, M. C., Ripka, R. & Tandeau de Marsac, N. (1983) *J. Bacteriol.* **155**, 427-431.
- Riley, M. & Aniloms, A. A. (1978) *Rev. Microbiol.* **32**, 519-560.
- Inouye, S., Ike, Y. & Inouye, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 38-40.