

2 Ej.
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION
DE NITROGENO**



**MOVILIZACION DE DNA DE Neurospora crassa
A VEHICULOS DE CLONACION**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A**

JOSE MARIA DE LA PEÑA MICHEL

MEXICO, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MOVILIZACION DE DNA DEL HONGO NEUROSPORA CRASSA
A VEHICULOS DE CLONACION

	Pags.
1) INDICE	i
1) INTRODUCCIÓN	
1.1) Generalidades -----	1
1.2) Recombinación in vitro de ácidos nucleicos:	
Clonación Molecular -----	3
1.2.1) Generación de fragmentos de DNA para clonar -----	4
1.2.2) Endonucleasas de restricción y ligasa T-4 -----	5
1.2.3) Transformación con plásmidos -----	6
1.2.4) Encapsidación de genoma viral -----	7
1.2.5) Identificación y caracterización de fragmentos de DNA clonado -----	9
1.2.5.1) Métodos de detección física y de homología -----	10
1.2.5.2) Métodos dirigidos a la expresión del DNA clonado--	11
1.2.5.3) Métodos de detección inmunológica de producto génico específico -----	13
1.3) Vehículos de clonación -----	15
1.3.1) Plásmidos -----	16
1.3.1.1) Estrategia de clonación en plásmidos -----	18
1.3.2) Bacteriófagos λ Carantes -----	20
1.3.2.1) Tácticas para utilización del fago λ con seguridad biológica -----	21

	Pags.
1.4) Bancos de genes -----	25
1.4.1) Banco de DNA nativo -----	27
1.4.2) Banco de DNA complementario a RNA mensajero -----	28
1.5) Objetivo -----	29
2) MATERIAL Y METODO	
2.1) Cepas bacterianas -----	32
2.2) Medios de cultivo -----	32
2.3) Plásmidos -----	32
2.4) Preparación de DNA de plásmido -----	32
2.5) Purificación de DNA del Caronte 4 -----	33
2.6) Purificación de DNA de <u>Neurospora crassa</u> -----	33
2.7) Enzimas de restricción, ligasa y fostatasa alcalina ---	33
2.8) Ligamiento de DNA -----	34
2.9) Electroforesis de DNA en geles de agarosa y poliacri- lamida -----	35
2.10) Transformación de <u>E.coli</u> K12 -----	35
2.11) Síntesis de DNA complementario a RNA mensajero -----	35
2.12) Traducción in vitro de RNA mensajero -----	35
2.13) Sistema de encapsidación <u>in vitro</u> -----	36
2.14) Electroforesis de DNA de fagos recombinantes -----	36
2.15) Marcaje de DNA in vitro con ³² P -----	37
2.16) Hibridización en membrana de nitrocelulosa -----	37
3) RESULTADOS Y DISCUSION	
3.1) Clonación de DNA del genoma de <u>Neurospora</u> en el plásmido pBR325 -----	38

	Pags.
3.2) Banco de DNA complementario a RNA mensajero -----	40
3.3) Clonación de DNA del genoma de <u>Neurospora</u> en el bacte- riófago λ Caronte 4 -----	43
4) CONCLUSIONES -----	46
5) BIBLIOGRAFIA -----	49
6) FIGURAS -----	57
7) LISTA DE ABREVIATURAS -----	77
8) JURADO -----	78
9) AGRADECIMIENTOS -----	79

1) INTRODUCCION.

1.1) GENERALIDADES.

Las investigaciones del mecanismo molecular detallado de la regulación génica en procariotes ha requerido de un sistema de transcripción-traducción in vitro, en el cual es posible estudiar la forma de acción de las moléculas regulatorias (Dickson et al, 1978).

Se han efectuado estudios in vivo en varios sistemas procarióticos que han permitido el actual conocimiento del mecanismo regulatorio de la expresión génica (Woo et al, 1977). Uno de los principales requerimientos para estos sistemas es una alta concentración de los genes en estudio. Este requisito ha limitado tales trabajos, en gran parte, a aquellos casos en los cuales los genes bacterianos se han transferido a fagos trans - ductantes y a pequeños genomas virales.

Con pocas excepciones, no ha sido posible purificar, empleando los métodos bioquímicos convencionales, genes estructurales originalmente presentes en una sola copia a partir de genomas completos de eucariotes. La dificultad de lograr lo anterior surge de la gran complejidad de estos genomas; un gene de mamífero llega a constituir una diezmillonésima parte del DNA celular del organismo (Tilghman et al, 1977). Siendo que éste posee propiedades físicas y químicas idénticas al resto del DNA del genoma, no es posible aislarlo por métodos clásicos basados en estas propiedades (Woo et al, 1977).

La necesidad de sistemas in vitro para el estudio de la regulación de la expresión en eucariotes, ha llevado a establecer procedimientos de aislamiento de grandes cantidades de genes eucarióticos específicos. (Dickson et al, 1978). El

arreglo cromosomal de esos genes y las características de las secuencias asociadas, se pueden analizar empleando técnicas para la construcción in vitro de moléculas de DNA recombinantes (Boyer et al, 1977). Tales técnicas permiten el aislamiento y la amplificación de secuencias particulares de DNA, las cuales pueden constituir detectores de genes nativos por hibridización. Asimismo, es posible obtener por medio de esta tecnología suficiente material para la secuenciación de fragmentos específicos de DNA (genes). Las moléculas recombinantes pueden ser empleadas para el análisis del control de la expresión de genes eucariotes en sistemas procarióticos (Tilghman et al, 1977).

El descubrimiento de un conjunto de enzimas llamadas endonucleasas de restricción, el conocimiento de elementos genéticos extracromosomales (plásmidos y bacteriófagos) y el desarrollo de técnicas de hibridización de ácidos nucleicos han permitido el aislamiento y caracterización de secuencias de DNA de los más diversos orígenes. De esta forma, el análisis del genoma y el aislamiento y caracterización de fragmentos específicos de DNA, han surgido como un importante complemento de los estudios de genética clásica de mapeo por mutaciones y cruza genéticas. La perspectiva del uso del DNA recombinante para clonar un segmento dado del genoma eucariote, ofrece un medio para el conocimiento de la estructura génica y su función.

A continuación se describirán en una forma que no pretende ser exhaustiva, los diversos elementos constitutivos de la metodología de recombinación in vitro de ácidos nucleicos, para efecto de contextualizar el trabajo experimental que constituye la presente tesis profesional.

1.2) RECOMBINACION IN VITRO DE ACIDOS NUCLEICOS: CLONACION MOLECULAR.

El término de "CLONACION MOLECULAR" se ha usado por extensión de "CLONA CELULAR". Una clona es una población celular que desciende de una sola por divisiones asexuales sucesivas. Cuando se inocula en medio de cultivo sólido un número determinado de células con plásmido o células y fagos, se puede observar, después de algunas horas de incubación, el crecimiento de colonias discretas (en el caso de plásmido), o placas de lisis (en el caso del fago λ como vehículo de clonación). Cada una de ellas representa una clona o una molécula clonada. La recombinación in vitro de ácidos nucleicos es la metodología que permite la generación de fragmentos de DNA, así como la forma de unirlos in vitro siendo segmentos de distinto origen. Estas técnicas proveen el principal medio para el estudio de la estructura, organización y regulación del genoma. Dos o más fragmentos de DNA son unidos in vitro enzimáticamente; uno de los fragmentos llamado vehículo de clonación, es capaz de replicarse en una célula huésped, y el otro segmento o fragmento clonado es pasivamente replicado por el vehículo. Cualquier segmento de DNA no importando su origen, puede ser en principio, clonado (Bolívar, 1979).

Existen varios componentes técnicos de la metodología de la recombinación in vitro que finalmente permiten la inserción de fragmentos de DNA de cualquier origen a replicones (moléculas virales o plásmidos) y su recuperación como elementos replicativos en bacterias (Boyer et al, 1977).

Estos componentes son:

1.2.1) La disección de moléculas de DNA de interés con endonucleasas de restricción y rompimiento por métodos físicos; generación de fragmentos de DNA para clonar.

1.2.2) La unión de fragmentos de DNA a un vehículo de clonación apropiado, una plásmido o un fago con polinucleótido ligasa del fago T-4, ligasa de E. coli.

1.2.3) y 1.2.4) La transformación de células y la selección de bacterias conteniendo plásmidos, o bien la encapsulación in vitro del DNA viral recombinante y detección de placas de lisis.

1.2.5) La identificación y caracterización de fragmentos de DNA clonado.

A continuación, cada uno de estos puntos se examinará con cierto detalle:

1.2.1) GENERACION DE FRAGMENTOS DE DNA PARA CLONAR:

Existen cuatro alternativas para la generación de fragmentos de DNA:

a) Si se conoce la secuencia nucleotídica de la región, se puede sintetizar una molécula de DNA doble cadena de secuencia idéntica a partir de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosforados.

b) Teniendo puro o enriquecido el RNA mensajero que corresponde a la región de interés, es factible obtener una copia de doble hélice de DNA mediante el uso de la transcriptasa reversa. Se puede obtener la hélice sencilla complementaria y luego retirar el RNA por hidrólisis alcalina; es posible a continuación, sintetizar la doble hélice mediante el uso de la misma enzima o de la DNA polimerasa.

c) El rompimiento mecánico controlado de DNA produce una variedad de fragmentos que llevan partes de la región a clonarse, incluyendo fragmentos que llevan toda la región. Este método es particularmente útil para generar fragmentos 10 Kpb.

d) El uso de endonucleasas de restricción permite la obtención de fragmentos de DNA que son clonables. Si existiera un sitio de restricción para una determinada endonucleasa dentro del fragmento de DNA de interés a clonar, es posible obtenerlo no fragmentado mediante una digestión parcial. Si no existe el sitio, una digestión completa generaría el fragmento completo. Este método es el más usado para generar segmentos de DNA para clonar (Bolívar, 1979).

1.2.2) ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y LIGASA DE T-4.

Una de las limitantes que han existido para el estudio del genoma ha sido su enorme tamaño. A partir del descubrimiento de Smith y Wilcox (1970), de una enzima que hidrolizaba el DNA reconociendo una secuencia específica, la búsqueda de enzimas similares ha resultado en la identificación de una gran cantidad de endonucleasas de restricción que dan un fraccionamiento específico del DNA de cualquier organismo en forma reproducible.

Las endonucleasas de restricción del tipo 2 cortan el DNA en una secuencia específica bien definida que consiste en un palíndromo de cuatro a seis pb. Tales sitios se encuentran aleatoriamente en el DNA. La probabilidad de encontrar una secuencia reconocida por alguna de estas enzimas en una molécula de DNA dada, varía de acuerdo al número de nucleótidos reconocidos. Así, el tamaño promedio de los fragmentos generados por una endonucleasa es mayor para aquellas que reconocen 6 pares de bases ($4^6=4096$ pb) que para aquellas que reconocen 5 ($4^5=1024$ pb)

y para las que reconocen 4 ($4^4=256$ pb). Sin embargo, la distribución de estos sitios depende de la endonucleasa de restricción y de la composición de bases del DNA a digerir, de esta manera, se usan enzimas de restricción que reconocen 4 pb fundamentalmente para el mapeo físico fino, y las que reconocen 6 pb para el fraccionamiento de genomas y/o para generar sitios en donde se pueden insertar secuencias en los vehículos de clonación. Por ejemplo, la enzima EcoRI reconoce la secuencia GAATTC, produciendo los extremos de cadena sencilla AATT con un grupo fosfato en la posición 5'. Estos extremos reciben el nombre de cohesivos, son complementarios e idénticos en todos los fragmentos de DNA generados por una misma endonucleasa.

La enzima polinucleótido ligasa de DNA, codificada por el bacteriófago T-4, tiene la capacidad de formar la unión covalente entre un extremo fosfato 5' y un hidroxilo 3', con la consecuente hidrólisis de ATP como fuente de energía. Esta enzima es capaz de ligar o unir DNA de diferentes orígenes en forma covalente, formando moléculas híbridas o quimeras. Una característica importante de esta enzima es que puede unir tanto fragmentos con extremos cohesivos como fragmentos con extremos rasos, sin que en este último caso intervenga el apareamiento de bases (Bolívar, 1979).

1.2.3) TRANSFORMACION CON PLÁSMIDOS.

Los fragmentos de DNA unidos in vitro se aíslan y amplifican a partir de una mezcla heterogénea de recombinantes producidos en una reacción de ligasa. Para ello se construyen plásmidos o fagos recombinantes ya que ambos son capaces de replicarse y expresar un fenotipo en un organismo huésped. En el caso de plásmidos, la clonación se efectúa por la introducción y estabilización de las moléculas recombinantes en células

huésped, de tal forma que una célula particular recibe cuando más una sola molécula recombinante. Los plásmidos se replican dentro de cada célula y las diversas clonas se reconocen individualmente a través de su fenotipo (Ver sección 1.3.1 sobre plásmidos como vehículos de clonación). El método para transformar un organismo huésped utilizando DNA recombinante está determinado por la identidad del organismo. La bacteria Escherichia coli es capaz de ser transformada después de haber sido tratada con CaCl_2 aún cuando solamente una subpoblación de un cultivo dado pueda volverse competente. Generalmente se puede lograr un aumento en la eficiencia de transformación de E. coli por medio de ciertas mutaciones cromosomales que disminuyen la degradación de DNA (Bolívar, 1979).

1.2.4) ENCAPSIDACION DE GENOMA VIRAL.

Con la tecnología del DNA recombinante, se pueden insertar fragmentos de DNA heterólogo de modo eficiente en vectores adecuados del bacteriófago λ (Ver sección 1.3.2 sobre fagos λ como vehículos de clonación). Sin embargo, el proceso de lograr que este DNA se replique y se encapside en partículas fágicas ha sido muy poco efectivo. Tomando en cuenta que teóricamente el rendimiento podría ser cerca de 2×10^{10} unidades formadoras de placa (ufp) por microgramo de DNA de λ silvestre, los valores típicos del método normalmente usado de transfección con CaCl_2 son de 10^4 a 10^6 ufp por microgramo de DNA de λ . Mediante el desarrollo de una nueva metodología (Becker y Gold, 1975; Blattner et al, 1977; Enquist y Sternberg, 1979), se ha podido lograr un aumento sustancial en la eficiencia de maduración de DNA de λ , empleando precursores de λ parcialmente ensamblados para encapsidar in vitro el DNA recombinante en partículas fágicas formadoras de placa. Se obtienen comunmente, por este procedimiento de empacamiento $10^7 - 10^8$ ufp por microgramo de DNA de λ sin digerir.

Las funciones requeridas para el ensamble de partículas en el tubo de ensayo las proveen lisógenos de λ especialmente construidos, los cuales sintetizan componentes para encapsidación de DNA cuando son termoinducidos (Enquist y Sternberg, 1979). Se preparan dos tipos de extractos celulares de estos lisógenos: un extracto se prepara por lisis a través de congelar-descongelar y tratamiento con lisozima, y el otro extracto se sonica para romper las células concentradas. Se requiere además de la adición de proteína λ , parcialmente pura obtenida de un lisógeno inducido que posee un profago defectuoso λ_{gal} , como paso final en el procedimiento de encapsidación. Esta proteína funciona durante el empacamiento del DNA de λ en la procápside (Becker y Gold, 1975; 1978). Lo anterior se hace con el objeto de que proceso de encapsidación sea secuencial y controlado, teniendo finalmente una mezcla de extractos y proteínas que se complementan y junto con el DNA resultan en fagos viables. Los lisógenos empleados para la preparación de estos extractos contienen las siguientes mutaciones de huésped y profago, (Enquist y Sternberg, 1979):

1) Mutación sin sentido (ambar) en el gene de la proteína A de la cápside (cepa NS 428).

2) Mutación Sam7; en la ausencia de productos del gene fágico S, los lisógenos inducidos no pueden lisar espontáneamente, el DNA del fago continúa replicándose y los productos intracelulares del fago siguen acumulándose por 2 a 3 horas más allá del tiempo normal de lisis. Estas propiedades permiten la cosecha de células completamente inducidas todavía intactas y concentrarlas para la preparación de extractos activos en encapsidación.

3) La delección b2; esta delección incluye el λ_{att} del genoma del fago, y por tanto daña el sitio de recombinación

integrativa y evita la escisión del profago después de inducción. El profago λ_{b2} inducido se encuentra atrapado en el cromosoma de E.coli y aunque ocurran muchos ciclos de replicación del DNA del fago éste no se puede encapsidar en partículas infectivas y los extractos de ensamble no contienen fuente endógena de DNA encapsidable. Bajo estas condiciones, solamente el DNA exógeno se encuentra disponible para encapsidarse in vitro.

4) La mutación recA en el huésped y la rad3 en el fago; estas dos mutaciones inactivan eficientemente los principales sistemas de recombinación presentes en los extractos de encapsidación. Fué necesario evitar la recombinación, porque el hecho de añadir DNA exógeno a extractos rec+ rad+ resultaba en la producción de un nivel bajo de marcadores portados por el fago presentes tanto en el DNA endógeno como en el exógeno.

1.2.5) IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE FRAGMENTOS DE DNA CLONADOS.

Una vez que se ha incorporado un segmento de DNA a un plásmido o a una variante del fago λ y que este DNA se ha replicado, el siguiente paso es la aplicación de métodos de identificación y caracterización de fragmentos de DNA clonado. Estos métodos se dividen, primero: en métodos de detección física del fragmento de DNA clonado y de su caracterización por homología con otras moléculas de DNA o RNA; segundo: métodos dirigidos al estudio de la expresión de productos funcionales del DNA clonado y/o de genes de origen sintético constituidos por operones híbridos conteniendo DNA recombinante; y tercero: métodos basados en la determinación inmunológica de proteínas y polipéptidos de productos génicos específicos de traducción.

1.2.5.1) METODOS DE DETECCION ELECTROFORETICO Y DE HOMOLOGIA.

Cuando un DNA se somete a la acción de una endonucleasa de restricción, se fracciona mediante su diferencia en migración electroforética en geles de agarosa o poliacrilamida. De esta forma se puede observar un patrón definido debido al acomodo de los fragmentos de acuerdo a su peso molecular. Este resultado se conoce como patrón de restricción y es útil para comparar fragmentos, purificarlos y caracterizarlos mediante la localización relativa de los sitios de reconocimiento por enzimas distintas dentro del segmento. En el caso de tener un DNA clonado en un vehículo, se puede comparar el patrón de restricción de éste con el patrón de restricción que daría el DNA del vehículo solo. Esta es una forma de ver físicamente los cambios de patrones en DNA de clonas y saber cuales fragmentos son muy probablemente heterólogos.

La determinación del origen y caracterización por homología del DNA clonado se puede realizar por medio de ensayos de hibridización tipo Southern (Southern, 1975). Por este método se pueden transferir digestiones totales de DNA, obtenidas por enzimas de restricción que reconocen 6 pb, de un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa. Este DNA es sometido a hibridización con un detector radiactivo específico, que pueda contener un DNA clonado, el cual hibridizará dependiendo de la severidad de las condiciones de reacción de hibridización y de la homología entre las secuencias. En el caso de células portadoras de plásmidos híbridos, se fijan a membranas de nitrocelulosa y se someten a condiciones que lisan las células y desnaturalizan su DNA. El detector marcado radiactivamente se hace pasar por estas membranas y después de lavar la marca libre, se detecta por autorradiografía en qué sitio se asoció específicamente, localizando así la colonia que contiene una secuencia que hibridiza

con el detector (Grunstein y Hogness, 1975).

1.2.5.2) METODOS DIRIGIDOS A LA EXPRESION DEL DNA CLONADO.

¿Puede ser el DNA de eucariotes transcrito y subsecuentemente traducido en E.coli con la fidelidad suficientemente como para producir una proteína funcional de origen eucariote?

La expresión de genes eucarióticos en procariones es un campo en el cual es difícil generalizar. De hecho, en la mayor parte de los experimentos reportados, el DNA clonado de organismos eucariotes no ha sido capaz de expresarse en E.coli salvo notables excepciones como en los reportes de Struhl et al, 1976; 1977, en los que se describe el funcionamiento de algunos genes de levadura en la biosíntesis de histidina y leucina en E.coli. También evidencia positiva al respecto es la clonación de segmentos de DNA de levadura y el hallazgo de un fragmento que lleva el gene estructural de la enzima imidazol-glicerofosfato deshidratasa (his3), el cual es transcrito y traducido en E.coli con la fidelidad necesaria para generar una enzima funcional. Tal es el caso de un plásmido recombinante que contiene DNA de la levadura Kluyveromyces lactis que complementa a una cepa de E.coli, la cual contiene una deleción en el gene de la β -galactosidasa. Evidencia bioquímica e inmunológica indica que esta enzima fué sintetizada en células que poseen plásmidos recombinantes (Dickson et al, 1978). Vapnek et al, 1977, reportan las características de un plásmido pBR322 con DNA de Neurospora crassa que complementa una cepa mutante aroD⁻ de E. coli. Las cepas transformadas contienen ahora actividad de 5 deshidroquinato hidrolasa, enzima que ha sido demostrada bioquímica e inmunológicamente idéntica a la de Neurospora crassa. Miller et al, 1977,

han estudiado el grado al cual E.coli puede sintetizar RNA y proteína de tres fragmentos de DNA clonado de Drosophila melanogaster. Estos fragmentos insertados en plásmidos en E.coli sintetizan RNA de Drosophila. También se observaron ocasionalmente polipéptidos cuya síntesis pudo haber sido dirigida por las secuencias de DNA de Drosophila. También por medio de estas técnicas, ha sido clonada y aislada la secuencia de DNA que codifica para la subunidad grande de la enzima ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa de Chlamidomonas reinhardi (Gelvin et al, 1977).

Es posible que los elementos regulatorios de la transcripción y de la traducción tanto para la iniciación como la terminación defieran en procariotes y en eucariotes. Así pues, un gene eucariote pudiera no transcribirse en un procariote por la falta de un promotor adecuado; si se transcribiera podría no traducirse por la ausencia de un codón de iniciación o determinación o por la falta de procesamiento del mRNA, y si se tradujera, pudiera dar lugar a una proteína no funcional por la carencia de procesamiento o modificaciones en la proteína después de la traducción. Este parece ser el caso de por lo menos algunos genes eucarióticos en los cuales se sabe existen secuencias interventivas o intrones que interrumpen el gene estructural (Berget et al, 1977; Brack y Tonegawa, 1977; Breathmach et al, 1977). Toda la evidencia actual indica que algunos de estos intrones son transcritos y procesados por mecanismos enzimáticos específicos y en un orden determinado, antes de ser traducidos (Abelson, 1979). Es poco probable que los procariotes, en los cuales no se ha descrito la presencia de intrones, tengan mecanismos similares a los de eucariotes para retirar estas secuencias. Así pues, este tipo de genes con secuencias interventivas no podrían ser traducidos en procariotes. Sin embargo, no todos los genes eucariotes tienen intrones y es posible pensar en promotores de origen procariote que puedan ser fácilmente acoplados a genes de eucariotes, aún cuando la estructura de sitios

de unión a ribosomas eucarióticos podría ser mas compleja (Bolívar, 1979).

1.2.5.3.) METODOS DE DETECCION INMUNOLOGICA DEL PRODUCTO GENICO ESPECIFICO.

Un enfoque experimental para el aislamiento de recombinantes específicos de bancos de clonas es la determinación inmunológica de los productos de traducción de genes clonados producidos en E.coli (Anderson et al, 1979; Clarke et al, 1979; Erlich et al, 1979). La selección inmunológica representa un medio valioso cuando no es posible el uso de técnicas de detección que dependen de hibridización de ácidos nucleicos por no existir el detector adecuado; o bien que no existe una expresión funcional de la proteína del gene eucariótico clonado, o que esta proteína no puede complementar una mutante bacteriana. Por otro lado, el análisis inmunológico permite detectar las condiciones que permitirán la transcripción y traducción de una secuencia de DNA eucariótico.

No es lo esperado que genes eucarióticos sean precisamente expresados en bacterias, aunque muchas clonas eucarióticas pueden llevar insertos conteniendo la secuencia estructural del gene. En algunos casos la actividad biológica de un producto génico codificado por los fragmentos de DNA clonados se pueden usar para la selección fenotípica directa de clonas, en las cuales la secuencia específica de DNA es expresada como proteína funcional. Además, el número total de genes eucarióticos para los cuales podrían ser eventualmente desarrollados ensayos de complementación es relativamente pequeño.

El ensayo en general, está basado en el reconocimiento de determinantes antigénicos mediado por anticuerpos.

Este enfoque requiere que los determinantes se encuentren en los polipéptidos en vez de en las cadenas de carbohidratos adicionales que pudiera contener.

Tal inmunoensayo es capaz de detectar productos de traducción incompleta así como proteínas que no son fácilmente detectables por su función. Además proteínas incapaces de funcionar en un medio ambiente celular bacteriano podrían ser detectadas, ya que se esperaría que conservaran sus sitios inmunológicamente reactivos.

El primer procedimiento desarrollado para la selección inmunológica fué el inmunoensayo in situ (Skalka y Shapiro, 1976; Sansey et al, 1976). Tal método consiste en que fagos recombinantes o E.coli conteniendo plásmidos recombinantes, se crecen en cajas de agar que contienen antisuero producido contra la proteína de interés codificada por el gene clonado. El fago o la E.coli que expresa los determinantes antigénicos de la proteína son detectados por la aparición de reacciones de inmunoprecipitina o una amplificación de reacciones de inmunoprecipitina en el agar. Este método es bastante sensible; empleando la β -galactosidasa E.coli como modelo de antígeno se pueden detectar al nivel no inducido, de 10 a 20 moléculas por célula (Anderson et al, 1979). Recientemente se han desarrollado otros procedimientos que utilizan anticuerpo radioiodinado (Clarke et al, 1979), o proteína A radioiodinada de Staphylococcus aureus y tienen la capacidad teórica de detectar una molécula de antígeno por célula de E.coli. Este último método consiste en un radioinmunoensayo indirecto de fase sólida; esto permite la detección de antígenos en medios de cultivo líquidos o in situ en placas de lisis de fagos recombinantes y colonias bacterianas. Además, este procedimiento es capaz de identificar antígenos en geles de poliacrilamida, haciendo posible la caracterización electroforética de productos de traducción de fragmentos de DNA heterólogo clonado en

plásmidos o fagos. Este ensayo se ha usado para identificar y caracterizar electroforéticamente el antígeno de la dihidrofolato reductasa de ratón en células de E. coli conteniendo el plásmido quimérico que codifica para esta enzima. La presencia del antígeno de la histona H2B de erizo de mar, en bacterias con plásmidos quiméricos codificando para esta proteína, también ha sido detectada de esta forma (Erllich et al, 1979).

1.3.) VEHICULOS DE CLONACION.

La tecnología para la clonación molecular de fragmentos de DNA tiene su origen conceptual en el modelo del replicón de DNA de Jacob et al, 1963. Este modelo consiste en:

a) Una región en la molécula de DNA que constituye el origen de replicación del DNA, el cual puede ser reconocido por una o varias proteínas.

b) El gene o genes que codifican para una o varias de las proteínas que interactúan con el origen y participan en la replicación.

c) Una región en la misma molécula de DNA que contiene cualquier fragmento de DNA insertado o recombinado en tal molécula (DNA heterólogo o pasajero), que no perturbe ninguna función, puede replicarse como parte de y bajo el control de replicación inherente a esa molécula.

Por muchos años los geneticistas han empleado mecanismos de recombinación in vivo para transferir y manipular fragmentos de DNA de un replicón a otro, lo cual habitualmente sirve como purificación de varias regiones de un genoma mas complejo. En pocos años las técnicas de recombinación in vitro de fragmentos

de DNA han expandido este procedimiento para extenderlo más allá de las barreras biológicas ordinarias (Boyer et al, 1977).

1.3.1) PLASMIDOS.

La mayor parte de los experimentos de clonación utilizan a E. coli como huésped. Los vectores empleados en estos experimentos son plásmidos o derivados del bacteriófago λ especialmente contruidos en el laboratorio. Ambos vehículos se pueden emplear para obtener grandes cantidades de segmentos de DNA clonado.

Los plásmidos son moléculas de DNA circulares extracromosomales de replicación autónoma y han sido ampliamente usados como vectores de clonación. Dos clases de plásmidos son los que se han empleado. Estas clases se distinguen por su forma de replicación; la forma restringida (generalmente estos plásmidos están presentes en un número bajo de copias), como en el caso del plásmido pSC101; o la forma relajada (estos se encuentran presentes en muchas copias por célula), como el plásmido ColE1. Este último puede replicarse bajo ciertas condiciones de represión de replicación de DNA cromosomal, tal como la inhibición de la síntesis de proteínas por tratamiento con cloramfenicol o espectinomicina (Bolívar, 1979).

Los plásmidos pueden ser fácilmente purificados mediante el uso de gradientes de densidad de cloruro de cesio dada su configuración en círculo covalentemente cerrado y superenrollado. Algunas de las características de los plásmidos que hacen conveniente su uso son (Bolívar, 1978; Helinski et al, 1977):

- 1) Fáciles de trabajar para manipulación genética.

2) Fáciles de purificar.

3) Pueden ser unidos a DNA heterólogo, el cual se replica junto con el plásmido.

4) Los plásmidos híbridos generados in vitro son fáciles de introducir dentro de una bacteria.

5) Tienen un amplio rango de huéspedes dentro de las bacterias gram (-).

6) Tienen posibilidad de autotransferencia (conjugativos o no conjugativos).

7) Poseen elementos genéticos que sirven como marcadores ya que contienen información para resistencia a antibióticos, producción de colicina y de enterotoxinas.

8) Pueden ser relajados, (múltiples copias por célula), derivados del pColE1, los cuales permiten la obtención de gran cantidad de DNA recombinante; y restringidos (unas cuantas copias por célula), derivados del pSC101, los cuales son utilizados cuando los productos codificados por el plásmido son dañinos a la célula huésped en grandes cantidades.

9) Propiedades de incompatibilidad entre grupos de plásmidos (no todos los plásmidos pueden coexistir con otros en la misma célula), lo cual favorece la transformación de una célula por un solo plásmido híbrido.

10) Presentan secuencias regulatorias procarióticas que promueven un alto grado de expresión de DNA heterólogo clonado.

Los plásmidos empleados en clonación en el presente trabajo experimental fueron el pBR322 (Bolívar et al, 1977) y el pBR325 (Bolívar et al, 1978). Estos reúnen características que los hacen muy útiles como vehículos (Boyer et al, 1977; Helinski et al, 1977); como las siguientes:

1) Tamaño pequeño lo cual facilita la caracterización del DNA clonado y permite mayor tamaño del DNA pasajero. Los plásmidos contienen relativamente poco material prescindible para su replicación y la expresión de sus genes de resistencia.

2) No autotransferible y difícilmente movilizables por otros plásmidos.

3) Son amplificables en presencia de cloramfenicol o espectinomina, obteniéndose un número alrededor (ca. 2000 copias) de 100 veces mayor a la cantidad de plásmido normalmente presente por célula.

4) Sitios únicos para varias endonucleasas de restricción dentro de cada uno de los genes de resistencia a antibióticos.

1.3.1.1) ESTRATEGIA DE CLONACION EN PLASMIDOS.

1) El plásmido se le hace un corte con una endonucleasa de restricción en una región que no lleve un gene indispensable para su replicación y mantenimiento.

2) El DNA heterólogo se fracciona específicamente o al azar.

3) El plásmido y el DNA heterólogo son covalentemente

enlazados con la enzima polinucleótido ligasa de T-4 (ligasa).

4) La mezcla de DNA se agrega a células lavadas con CaCl_2 para transformarlas.

5) Si un DNA recombinado in vitro no ha sido covalentemente unido, los sistemas enzimáticos de la bacteria pueden repararlo y ligarlo. El mecanismo de replicación del plásmido asegura en este momento el mantenimiento de sí mismo y del DNA extraño integrado.

6) Se pueden aplicar presiones selectivas con el objeto de enriquecer la población bacteriana para aquellas células que lleven plásmidos (tratamiento con antibióticos), y se inicia la búsqueda o selección de una clona deseada en particular.

Los eventos de clonación producen dos efectos de suma importancia. El primero de ellos es la purificación del fragmento de DNA heterólogo clonado. Al ser introducido con el vector a una célula, todos sus descendientes llevan sólo un tipo de plásmido. Si se purifica el DNA del plásmido contenido en las células descendientes de una sola colonia después de un evento de transformación, se tendrá solo un tipo de molécula. Por otra parte, la secuencia clonada se puede purificar a partir del plásmido híbrido en cantidades de miligramos. Esto permite su caracterización hasta el nivel de secuencia nucleotídica y su uso para la detección de secuencias homólogas a ella.

Después de transformar células bacterianas con DNA que ha sido recombinado in vitro, se obtienen una serie de clonas o colonias que llevan, cada una, un plásmido proveniente de la mezcla de DNA con que se transformó. La relación de colonias que contienen plásmidos y la búsqueda de aquellas que

contienen plásmidos recombinantes suele ser sencilla si se cuenta con un vehículo apropiado. Por ejemplo, si el vector contiene dos genes que confieren resistencia a un antibiótico diferente cada uno, estos pueden usarse, respectivamente:

a) Para seleccionar células transformadas, colocando el cultivo que fué transformado en un medio sólido que contenga uno de los antibióticos (el gene que confiere resistencia a este antibiótico debe permanecer intacto durante la manipulación in vitro del DNA).

b) Para simplificar la búsqueda entre las células ya seleccionadas de aquellas que contienen plásmidos híbridos, se puede insertar el DNA heterólogo en un sitio que inactive el gene que confiere resistencia al otro antibiótico, de esta manera es posible diferenciar las células que llevan material híbrido o células recombinantes (resistentes a un antibiótico) y las que solo llevan el vector o células transformantes (resistentes a los dos antibióticos).

Las colonias que portan plásmidos híbridos son analizadas por las técnicas anteriormente explicadas para identificación y caracterización de fragmentos de DNA clonado.

1.3.2) BACTERIOFAGOS λ CARONTES.

Puede decirse que los bacteriófagos transductantes fueron los primeros vehículos moleculares, puesto que consisten de un replicón (fragmento de genoma viral) unido a un DNA heterólogo (fragmento de cromosoma bacteriano).

El genoma del bacteriófago λ está organizado de tal forma que su tercio central (la región reemplazable Fig.1)

contiene genes dispensables para el crecimiento lítico. Con el fin de ser empleados como vehículos de clonación (eliminando los sitios de restricción en regiones indispensables para la viabilidad del fago, entre otras ventajas, como se verá mas adelante), se han obtenido 30 derivados del fago λ silvestre por cruza, sustituciones, inserciones y deleciones.

Blattner y colaboradores (Blattner et al, 1977; Williams y Blattner, 1979), han construido una colección de estos derivados del fago λ llamados Carontes. Las estructuras de los Carontes han sido ampliamente estudiadas por pruebas genéticas, mapeo por heterodúplexes en el microscopio electrónico y el análisis por electroforesis en geles de los fragmentos generados empleando endonucleasas de restricción.

Los lugares de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI, permiten retirar una región que representa cerca del 40% (aproximadamente 20 Kpb) del genoma total del Caronte 4. Posteriormente se inserta, por medio de la enzima ligasa de T-4, un fragmento de DNA heterólogo de entre 8 y 23 Kpb. El DNA quimérico se encapsida in vitro y se utilizan los fagos resultantes para infectar E.coli, dando como resultado la obtención de placas de lisis provenientes de clonas virales conteniendo DNA recombinante. Utilizando DNA heterólogo fuera de este rango resulta en moléculas demasiado grandes o pequeñas para poder ser encapsidadas in vitro. El DNA pasajero debe de contener extremos cohesivos complementarios a los del DNA del fago vector.

El Caronte 4 se escogió para los experimentos de clonación descritos aquí.

1.3.2.1) TACTICAS PARA UTILIZACION DEL FAGO λ CON SEGURIDAD BIOLÓGICA.

El fago λ se puede replicar en forma lítica o como un residente permanente de una bacteria en forma de plásmido o lisógeno. Mediante la expresión de genes tardíos, puede lisar la célula después de generar un progenie de ca.100 fagos por bacteria infectada. El Caronte 4 actúa como vehículo de clonación al replicarse en una fase lítica. Si este crecimiento lítico se realiza en un medio ambiente natural, es probable que el fago λ o sus derivados tengan una capacidad de sobrevivencia muy limitada. Para crecimiento eficiente, el fago λ requiere de condiciones de laboratorio muy precisas. Se ha reportado que ninguna de mas de 1,800 cepas de E. coli, obtenidas de drenajes y aislados clínicos, fué capaz de producir placas de lisis con λ vir (virulento). Además, el fago solo puede infectar E. coli K12. De esta manera, el DNA recombinante puede perpetuarse unicamente en condiciones controladas de laboratorio.

Al construir derivados de λ utilizables como vehículos de clonación se ha buscado: desarrollar fagos en los cuales el mecanismo lítico se mantenga, mientras que las capacidades de formar plásmido o lisógeno queden bloqueadas, esto permite una replicación del DNA recombinante; introducir mutaciones ambar que limiten el huésped a E. coli K12Su⁺ y aumentar el crecimiento del vector en el huésped de laboratorio que normalmente se usa para propagación y así poder emplear volúmenes reducidos de cultivo.

Algunas características del fago Caronte 4 que le permite ser vector de clonación son:

a) Delección de la región de inmunidad; esto elimina una región que codifica para el represor del fago. Sin este gene, el estado lisogénico no se puede mantener y las células infectadas son lisadas eficientemente. Además el Caronte 4 ha perdido el gene int y el sitio att.

b) Genotipo N^+ ; las clonas formadas en el Caronte 4 son silvestres para el gene N del fago, lo cual permite una expresión mayor de los genes tardíos y por tanto la multiplicación del fago. El producto de N actúa antiterminando la transcripción en $tR1$ y $tR2$ permitiendo la expresión de genes que promueven la replicación activa del fago (O y P), de los genes que incrementan la expresión de las funciones líticas (S y R) y de los genes que forman la cápside e intervienen en la encapsidación del DNA.

c) Delección nin5; ésta incluye el sitio de terminación $tR2$. Esto permite la expresión de las funciones líticas S y R y los genes estructurales A-J aún en bajas concentraciones del producto de N. Consecuentemente, reduce la probabilidad de la formación de un plásmido estable por la consiguiente lisis celular.

d) Mutaciones ambar; debido a la presencia de mutaciones ambar, los fagos Caronte tienen un rango restringido de huésped ya que requieren de un tRNA supresor para la síntesis de dos proteínas competentes de la cápside (A y B). Los fagos que tienen mutaciones ambar en estos genes se les añade el sufijo "A" (por ambar) a su designación. Esto debe ser provisto por el gene del huésped bacteriano Su⁺ empleado para la propagación en el laboratorio. Las células supresoras son muy raras en la naturaleza.

e) Restricción-modificación; el Caronte 4 se puede propagar en una bacteria sin sistema de modificación, lo cual provee de una barrera adicional para el crecimiento lítico en cepas bacterianas conteniendo un sistema de restricción.

El caronte 4 ha sido probado para parámetros

de crecimiento, supervivencia y transferencia de genes en simulaciones del medio ambiente natural. De estos estudios se derivan sustancialmente 4 barreras a la propagación de los Carontes en el medio ambiente natural como el drenaje. Son los siguientes;

- 1) Los Carontes son sensibles a la inactivación por pH ácido, desecación y detergentes, los cuales se pueden encontrar durante su diseminación.
- 2) Al diluirlo es difícil para un fago encontrar a una bacteria.
- 3) Una vez encontrada, la bacteria podría posiblemente carecer de un sitio de adsorción apropiado.
- 4) Aunque la adsorción e inyección hayan tenido lugar, será posible que la bacteria degradara el DNA inyectado por restricción.
- 5) Y en el caso de los Carontes A (mutación ambar) si el DNA resistiera la restricción, la ausencia de un tRNA supresor prevendría la ruptura de la bacteria y ésta se moriría; en cualquier evento, la célula si sobreviviera, no sería probable que perpetuara el fragmento clonado como plásmido o lisógeno, aún si la bacteria fuera portadora de un profago con homología considerable con respecto al vehículo Caronte.

Finalmente, hay que apuntar que en los fagos Caronte la versatilidad en cuanto a los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción donde se puede clonar es menor a la de un plásmido, dada la multiplicidad de genes que requiere el fago subsistir con respecto al plásmido. Por otro lado, los fragmentos clonados pueden ser incompatibles con el metabolismo de la

célula huésped y resultar en propiedades letales para la misma. En estos casos, el uso de un plásmido (que requiere de la coexistencia estable con su célula huésped) está en desventaja con respecto al uso de un fago para clonar.

1.4) BANCOS DE GENES.

Con el objeto de aislar e identificar genes nativos es indispensable la construcción de un banco (también llamado biblioteca) de genes. Esto implica tener clonado en vehículos (plásmido, fago λ) todo el genoma de un organismo. El primer banco de genes fué de E. coli y reportado por Clarke y Carbon (1976). Estos investigadores determinaron el número de colonias en un banco de plásmidos recombinantes (aplicable también a las placas de un banco en fago λ), requerido para tener moléculas recombinantes representando de 90 a 99% del genoma de E. coli, levadura y *Drosophila*. El cálculo fué hecho como sigue: dada una preparación de DNA celular fragmentada a un tamaño tal que cada fragmento representa una fracción (f) del genoma total del organismo donador, la probabilidad (p) de que una secuencia única dada de DNA esté presente en una colección de N colonias recombinantes o placas de lisis, está expresada por la siguiente ecuación:

$$p = 1 - (1-f)^N \quad \circ$$

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

La probabilidad de que una secuencia particular no esté presente en ninguna de las clonas totales (N), está dada por $(1-f)^N$ que se aproxima a cero mientras el número de clonas (N) sea mayor.

Un cálculo de muestra para E. coli (tamaño de genoma, 2.7×10^9 daltones) para $p=0.99$ es:

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1 - 8.5 \times 10^6 / 2.7 \times 10^9)} = 1437$$

Entonces, si una preparación de DNA celular de E. coli es rota al azar a un tamaño promedio de 8.5×10^6 daltones para la construcción de DNA ligado, híbrido y circular, un banco de solamente 720 transformantes sería suficiente para una probabilidad de 90% de que cualquier gene de E. coli pudiera estar en un vehículo híbrido en una de las clonas (suponiendo que el gene deseado es pequeño en comparación con el tamaño de los fragmentos clonados). A una probabilidad de 99%, el tamaño del banco (N) es solo de 1437 colonias para E. coli. A medida que la complejidad genética del organismo vaya en aumento, N a altos niveles de probabilidad aumenta dramáticamente.

A $p=99\%$ el tamaño del banco para levadura es de 4,600 colonias, para Neurospora crassa es de 10,000 (tal como reportan Krumlauf y Marzluf (1980), el genoma de N. crassa consiste de 2.7×10^7 pb ó 1.6×10^{10} daltones), para Drosophila es de 46,000 y para un banco de conejo es de 8×10^5 colonias, (Carbon et al, 1977; Carbon et al, 1979; Maniatis et al, 1978).

Si el número de clonas es lo suficientemente grande para una representación completa de secuencias, en principio, cualquier gene se puede aislar por selección del banco con un detector específico de hibridización (Carbon et al, 1977; Maniatis et al, 1978). La construcción de bancos permite el estudio de la estructura de genes nativos completos, a través del mapeo físico del genoma y la consecuente detección de posibles

secuencias interventivas o intrones (Abelson, 1979).

1.4.1) BANCO DE DNA NATIVO.

Los bancos de DNA nativo o genómico se pueden construir de la manera siguiente:

El DNA del organismo se fragmenta mecánicamente a un tamaño promedio de 10 Kpb y se liga al plásmido empleando el método de la transferasa terminal, que consiste en:

- a) Linearización del plásmido enzimáticamente y ruptura mecánica del DNA a clonar;
- b) Tratamiento de ambos con λ 5' exonucleasa para generar extremos rasos;
- c) Incubación con transferasa terminal tanto del plásmido, en presencia de dTTP, como del DNA a clonar en presencia de dATP;
- d) Mezcla de ambas preparaciones para ligar y transformar.

Otra forma de construcción de bancos de genes mediante el uso de plásmidos como vehículos es:

- a) La digestión del vehículo con una endonucleasa determinada para la cual posee sitio único y tratar con fosfatasa alcalina para evitar reanillamiento del plásmido en el momento de ligar;

b) Digestión parcial del DNA a clonar con la misma enzima;

c) Mezclar ambas preparaciones para ligar y transformar.

En el caso del empleo del fago λ como vehículo;

a) Se digiere totalmente con una endonucleasa el DNA del fago y el DNA a clonar parcialmente con la misma enzima;

b) Se pueden o no separar los segmentos reemplazables de los brazos del fago para clonar;

c) Mezclar ambas preparaciones para ligar y encapsidar in vitro.

1.4.2) BANCO DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) a RNA MENSAJERO (RNAm).

Algunas de las innovaciones mas interesantes han surgido del diseño de experimentos dirigidos a la clonación de la información contenida en una molécula de RNAm. Es posible formar un primero de doble hélice con oligo-dT utilizando la fracción poliadenilada del mensajero. Este primero, o iniciador de doble hélice, es utilizado como sustrato de la enzima transcriptasa reversa para copiar el RNA y sintetizar una doble hélice híbrida RNA-cDNA, de la cual el RNA es retirado por tratamiento con álcali. La presencia de una estructura en forma de pasador en el extremo 5' del cDNA permite su empleo como molde para la síntesis de una hélice complementaria utilizando la transcriptasa reversa (o la polimerasa I de DNA).

La doble hélice de cDNA así obtenida se trata con nucleasa S1 para retirar la estructura de cadena sencilla y posteriormente el DNA resultante se puede clonar por el método de la transferasa terminal, o por el uso de enlazadores sintéticos (oligonucleótidos sintetizados químicamente) que lleven sitios de restricción para determinadas enzimas (Bolívar, 1979).

1.5) OBJETIVO:

El objetivo específico de la presente tesis profesional es el establecimiento y aplicación de metodologías para la construcción de bancos de genes del hongo Neurospora crassa. Esto representa un paso necesario para el aislamiento de genes nativos de enzimas involucradas en la asimilación y distribución de nitrógeno orgánico en Neurospora crassa, tales como la glutamato sintasa, la deshidrogenasa glutámica y la glutamino sintetasa. Esta última desempeña un papel fundamental en el metabolismo nitrogenado (Stadtman, 1973). Nuestro interés en el aislamiento de estos genes, en especial el de la glutamino sintetasa, radica en los hallazgos obtenidos por nuestro grupo de investigación. La regulación de la glutamino sintetasa de Neurospora crassa por las fuentes de nitrógeno y carbono presentes en el medio de cultivo ha sido reportada por Espín, et al, (1979); Limón-Lason et al, (1977); Mora et al, (1980) y Vichido et al, (1978).

Durante el crecimiento exponencial, la actividad de la enzima y su concentración son mas elevadas en glutamato que en amonio o glutamina como fuentes de nitrógeno (Vichido et al, 1978). Estas diferencias en la concentración de enzima se deben a diferentes velocidades de síntesis de la enzima (Quinto et al, 1977) lo cual asimismo resulta de distintos niveles del RNAm específico, (Sánchez et al, 1978). Bajo estas condiciones

la fuente de nitrógeno no tiene ningún efecto en la velocidad relativa de la degradación de la glutamino sintetasa (Quinto et al, 1977).

Los estudios realizados en cultivos alimentados en grupo, indican que la actividad de glutamino sintetasa es elevada durante limitación de amonio y baja durante limitación de carbono (Limón-Lason et al, 1977). Además, cuando el micelio de Neurospora crassa se depriva de fuente de nitrógeno la actividad de glutamino sintetasa aumenta, mientras que cuando se depriva de la fuente de carbono la actividad de la enzima y su concentración disminuyen (Mora et al, 1980).

La disminución en concentración de enzima durante la privación de carbono indica que la fuente de carbono participa en la regulación de la degradación de la glutamino sintetasa (Mora et al, 1980; Quinto et al, 1980).

Es de especial interés también el hallazgo de dos vías de asimilación de nitrógeno en Neurospora crassa. Estas dos vías de asimilación se ha visto que dependen de la concentración de amonio. En el caso del amonio bajo en el medio la asimilación de nitrógeno es vía glutamino sintetasa-glutamato sintasa (Hummelt y Mora, 1980). Alternativamente, cuando el amonio del medio es elevado la asimilación es por deshidrogenasa glutámica-glutamino sintetasa.

Tener un banco de genes de Neurospora crassa y la posibilidad de detectar secuencias específicas de estas enzimas, permitirá a los grupos de investigación involucradas en el programa general, conocer algunos aspectos como:

- a) Establecimiento de la colíneraridad gene-proteína.

b) Número y organización de los genes involucrados en la síntesis y regulación de estas enzimas.

c) Características y número de mensajeros participantes en su síntesis.

d) Análisis del procesamiento postranscripcional y pretraduccional de estos RNA mensajeros.

e) Manipulación de la información genética de estas enzimas y sus efectos sobre otras funciones.

f) Estudio del efecto de las señales regulatorias de estas enzimas sobre otros genes y sobre otras proteínas.

Esta tesis se enmarca dentro de un programa de investigación, que incluye la colaboración de varios laboratorios del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, y cuyos objetivos generales consisten en definir la organización y expresión de programas de información genética responsable de las vías de asimilación de nitrógeno en Neurospora crassa.

" Dios mío, cuánta maravilla
en una cosa tan pequeña "

Antonia van Leeuwenhoek (1670)

2) MATERIAL Y METODO

2.1) CEPAS BACTERIANAS:

Se utilizaron 3 cepas de *E. coli* K12. La RRI (pro leu thi lacY rpsL20 hsd20 hsm ara14 galK2 xyl5 ntl1 supE44) empleada como receptora en transformación; cepa K802 (met galK lacY suII hsr hsm) huésped de los fagos Caronte; y la cepa NS428 (λ Aam₁₁ b₂ red₃ cI857 Sam7) para la preparación de los extractos celulares del sistema in vitro de encapsidación.

2.2) MEDIOS DE CULTIVO:

La cepa RRI se creció en medio de Luria y en medio mínimo M9 con glucosa. Con las cepas K802 y NS428 se usó medio NZ amino A (Humko-Sheffield) con extracto de levadura (Bioxón) (NZY). Cuando se requirió el uso de ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina y estreptomyciná éstos fueron añadidos a 30 μ g/ml.

2.3) PLASMIDOS:

Los plásmidos con los que se trabajó para clonación fueron el pBR322 (Bolívar et al, 1977) para el banco de cDNA y el pBR325 para la clonación de DNA nativo (Bolívar et al, 1978).

2.4) PREPARACION DE DNA DE PLASMIDO:

La extracción y purificación del DNA de los plásmidos se realizó siguiendo la técnica de lisado claro previamente reportada por Betlach et al, (1976). El DNA del plásmido pBR322 se preparó por amplificación del número de copias en cultivo

creciendo en fase logarítmica, por adición de cloramfenicol (170 µg/ml) (Clewell, 1972). La espectinomomicina (300 µg/ml) se usó para la amplificación en células con plásmido pBR325, el cual confiere resistencia a cloramfenicol. Las preparaciones de DNA para geles de prueba o selección de posibles recombinantes en geles se trataron conforme el método de Meagher et al (1977).

2.5) PURIFICACION DE DNA DEL CARONTE 4:

La propagación del Caronte 4 (Blattner et al, 1977; Williams y Blattner, 1979). se efectuó conforme reportan Blattner et al, (1977) y como se indica en el protocolo detallado que acompaña a los fagos Carontes (colección EK1), seguido de diálisis, extracciones con fenol, diálisis y precipitación.

2.6) PURIFICACION DE DNA DE NEUROSPORA CRASSA.

El DNA de Neurospora crassa se obtuvo a partir de la Cepa Slime (mutante de pared) por la técnica descrita por Free et al, (1979).

2.7) ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, LIGASA DE DNA Y FOSFATASA ALCALINA:

Todas las endonucleasas de restricción y la ligasa de T-4 utilizadas en el trabajo fueron regalo del Dr. Francisco Bolívar, purificadas conforme al método de Greene et al, (1978). Las condiciones de reacción de estas enzimas son las reportadas por Bolívar et al, (1977).

2.8) LIGAMIENTO DE DNA;

Las reacciones de ligasa se realizaron en Tris HCl 66mM pH 7.6, MgCl₂ 66mM, ditiotreititol 10mM y ATP 0.5 mM a 12°C por 16 horas. Para la preparación del banco de DNA nativo de Neurospora crassa en el plásmido pBR325 se usaron 10 µl de ligasa de T-4 (1 µl forma concatémoros de alto peso molecular de 1 µg de pBR322 roto con EcoRI en 3 horas a 12° C), para unir 20 µg de DNA de Neurospora crassa digerido totalmente con EcoRI y 5 µg de pBR325 digerido con EcoRI y tratado con fosfatasa alcalina, en un volumen final de 120 µl.

Para ligar el DNA del C-4 con DNA de Neurospora crassa se hizo lo siguiente: a 32 µl de H₂O se adicionaron 10 µl de Tris HCl, MgCl₂, ditiotreititol, ATP, 3 µl de ligasa y 3.7 µg de DNA de C-4 digerido completamente con EcoRI y se añadió 1.1 µg de DNA de Neurospora crassa digerido parcialmente ca. 18 Kpb para una relación equimolar entre fragmentos de Neurospora y el genoma del fago, la mezcla de reacción se aforó a un volumen final de 50 µl. Las cantidades de DNA para relaciones molares fueron calculadas según describen Wang y Davidson (1966), como sigue:

$$Cv = 46 \frac{v}{L \frac{3}{2}}$$

$$Cn = \frac{tn \times Cv}{v}$$

En donde Cv es concentración del vector; v tamaño del vector en porcentaje del genoma del fago λ; L tamaño promedio de los fragmentos a clonar en Kpb; Cn concentración del DNA a clonar; y tn es el tamaño promedio de los fragmentos a clonar en porcentaje del genoma del fago λ.

2.9) ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA:

Las mezclas de reacción fueron sometidas a electroforesis en geles (14X11X0.15cm) de poliacrilamida al 7.5% (Bio-Rad) y de agarosa al 0.8% (Bio-Rad). Los geles se corren en solución amortiguadora Tris-EDTA-boratos a 150V (ca. 90 minutos) como reportan Bolívar et al (1977). Se tiñen con solución 0.5 µg/ml de Bromuro de etidio (Sigma) durante 5 minutos. El DNA se visualiza con luz ultravioleta de onda corta con un transiluminador (Ultraviolet Products). El gel se fotografía a través de un filtro amarillo de gelatina N°9 Kodak Wratten.

2.10) TRANSFORMACION DE E. COLI K-12

La cepa RRI de E. coli (Boyer and Roulland-Doussoix, 1969) se preparó para transformación por el método descrito por Cohen et al, (1972).

2.11) SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO A RNA MENSAJERO:

La reacción de cDNA se efectuó conforme reportan Ullrich et al, (1977) a partir de RNAm polisomal poliadenilado de Neurospora crassa (Palacios et al, 1977).

2.12) TRADUCCION IN VITRO DE RNA MENSAJERO:

El RNAm polisomal poliadenilado se tradujo en un sistema in vitro de reticulocito de conejo como indican Palacios et al (1977), después el producto proteico de la traducción se sometió a electroforesis de proteínas en geles de dos dimensiones o tipo O'Farrell (1975).

2.13) SISTEMA DE ENCAPSIDACION IN VITRO:

El empacamiento in vitro de genomas virales híbridos se llevó a cabo conforme al procedimiento de Blattner et al, (1978). Se obtuvieron los 2 extractos celulares complementarios de una cepa lisogénica de λ la NS428. La proteína A requerida para el ensamble fué un regalo de Tom Ingolia. El sistema se estableció para ser dependiente de DNA exógeno de λ solamente. La eficiencia alcanzada fué de 10^8 unidades formadores de placa por microgramo de DNA del fago λ silvestro (Bethesda Research Laboratories).

2.14) ELECTROFORESIS DE DNA DE FAGOS RECOMBINANTES:

Se toma con la punta de una pipeta Pasteur una placa de lisis de un fago con genoma híbrido, en forma de un cilindrito de agar que se resuspende en 0.5 ml de solución estéril de 0.01M Tris HCl pH 7.5, 0.1M NaCl, 0.01 MgCl₂ y 0.05% de gelatina. Se deja una noche a 4°C para que difunda el fago. 10 μ l de esta solución se mezclan con 10 μ l de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora K802 y 10 μ l de una solución 0.01M MgCl₂ y 0.01M CaCl₂. Los 30 μ l se incuban a 37°C durante 10 minutos. Se inoculan 5 ml de medio NZY y se incuban con agitación toda la noche. Se centrifuga a 6,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se filtra a través de papel Whatman, #1.doble. El filtrado se centrifuga a 20,000 rpm a 4°C durante dos horas en el rotor SW 50.1. La pastilla se resuspende en 0.4 ml de 0.1M Tris HCl pH 7.9 y 0.3M NaCl y se extrae con fenol 3 veces 1:1 (v/v) y una con cloroformo. La fase acuosa se precipita, se centrifuga durante 5 minutos en la microfuga Eppendorf 5412, se decanta el sobrenadante y se seca la pastilla al vacío. Resuspender en 100 μ l de 0.01M Tris HCl pH8 y 0.001 M EDTA, se toman 10 μ l y se digieren con la enzima EcoRI.

La muestra digerida es sometida a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% como se indica en el número 9 de esta sección.

2.15) MARCAJE DE DNA IN VITRO CON ^{32}P :

El marcaje interno con ^{32}P en las moléculas de plásmidos y genomas del fago λ recombinantes, se efectuó con el juego Nick Translation de New England Nuclear como describen Maniatis et al (1975).

2.16) HIBRIDIZACION EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA:

La transferencia de DNA en geles a membrana de nitrocelulosa se hizo como describe Southern (1975). El horneado, preincubación, hibridización, lavado y autorradiografía de los filtros se realizó de acuerdo a Craig et al, (1979).

"Creo que el afán de aventuras es sólo un aspecto del constante deseo de triunfar, propio del espíritu humano; simplemente una manifestación de compulsión, como la conocen los científicos y los artistas".

David Lewis (1960)

3) RESULTADOS Y DISCUSION

3.1) CLONACION DE DNA DEL GENOMA DE NEUROSPORA CRASSA EN EL PLASMIDO pBR325

Ha sido ya destacada la importancia de la construcción de bancos de genes para la identificación y aislamiento de secuencias específicas del genoma nativo. Con el fin de establecer un banco de genes de Neurospora crassa en forma de fragmentos de restricción, se siguió la estrategia esquematizada en la Fig. 2. La construcción de este banco se hizo en colaboración con Luis Covarrubias.

Se empleó el plásmido pBR325 como vehículo, entre cuyas características cabe mencionar su tamaño de 5.4 Kb (3.6 magadaltones) y su capacidad de conferir resistencia a ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina en la cepa de E. coli que lo contenga. Además, posee sitios de reconocimientos únicos para diversas endonucleasas de restricción dentro de estos genes, lo cual nos permite el uso de estas resistencias como marcadores en clonación.

El pBR325 se digirió con la enzima EcoRI, la cual reconoce un sitio único en el plásmido dentro de la secuencia que confiere resistencia a cloramfenicol. La clonación de un fragmento de DNA en este sitio, inactiva al gene permitiendo la selección de células que lleven plásmido recombinante. Posteriormente se trató con fosfatasa alcalina. Esta enzima de fosforila los extremos 5' fosfato evitando el recirculamiento sobre sí mismo de la molécula de DNA aumentando con ello el rendimiento de plásmidos recombinantes y disminuyendo así el número de colonias falsas positivas (resistentes a cloramfenicol) en transformación.

Por otro lado, el genoma de Neurospora crassa

se digirió totalmente con EcoRI generando una colección de fragmentos heterogénea en tamaño (4 Kb tamaño promedio). La mezcla de DNA de Neurospora crassa segmentado y el pBR325 se incubó en presencia de polinucleótido ligasa de T4, para obtener moléculas híbridas circulares cerradas covalentemente y se transformó la cepa RRI de E. coli con los plásmidos híbridos. En varios experimentos se llegó a obtener la cantidad de 2,200 clonas. Las cuales representan con una probabilidad de 0.99 aproximadamente el 10% del genoma de Neurospora y con una probabilidad de 0.90 el 20%.

En la Fig. 3 se muestra un gel de prueba con el DNA semipuro de 8 colonias derivadas de este banco digerido con EcoRI. A la derecha se indica con una barra vertical el vehículo pBR325 digerido con EcoRI como marcador. En este gel se puede apreciar el cambio en patrón de restricción esperado para plásmidos recombinantes.

Para demostrar la presencia de DNA de Neurospora crassa en clonas obtenidas en estos experimentos, se purificó el DNA de una de ellas para ser marcada in vitro con ^{32}P . Esta clona se empleó como detector hibridizando con DNA del genoma de Neurospora crassa digerido totalmente con EcoRI y transferido a membrana de nitrocelulosa (Southern). En la Fig. 4 se presenta el resultado. El carril 1 representa el DNA del plásmido híbrido pero digerido con EcoRI teñido con EtBr y visualizado con luz UV; el carril 2 muestra el patrón de restricción del genoma de Neurospora digerido con EcoRI totalmente, teñido con EtBr y luz UV; el 3 es la autorradiografía del DNA de Neurospora crassa (Carril 2) transferido a membrana de nitrocelulosa, usando como detector en hibridización el plásmido híbrido marcado con ^{32}P .

En el carril 3 se detectó material hibridizado, lo cual indica la existencia de homología entre el DNA de la única clona ensayada y el genoma de Neurospora.

3.2) BANCO DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) a RNA MENSAJERO (RNAm):

En la condición de crecimiento de la cepa silvestre 74A de Neurospora en presencia de glutamato 5 mM como única fuente de nitrógeno, se ha encontrado el nivel más elevado de actividad de una de las enzimas que nos interesa especialmente, la glutamino sintetasa (GS) (Vichido et al, 1978).

Por trabajos realizados por Sánchez et al (1978), se determinó que el nivel elevado de actividad específica de GS se correlaciona con un aumento en el RNAm específico de esta enzima, el cual se encuentra poliadenilado en su extremo 3' OH (Palacios et al, 1977).

Como un enfoque para el aislamiento de una secuencia específica de DNA conteniendo la información para la síntesis de GS, a partir de esta secuencia, se abordó la estrategia de la clonación de la información contenida en una población heterogénea de RNAm polisomal poliadenilado, en forma de cDNA. Los pasos metodológicos para este efecto se esquematizan en la Fig. 5. El vehículo de clonación es el plásmido pBR322 cuyo mapa de restricción se presenta en la Fig. 6.

Este plásmido tiene un tamaño de 4.3 Kb y posee los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap^r) y a tetraciclina (Tc^r). Estos marcadores en células transformadas con plásmidos híbridos con fenotipo $Ap^r Tc^s$, cumplen la doble función de indicar transformantes y posibles recombinantes,

respectivamente. Según las características de este vehículo al insertarse un fragmento de DNA en el sitio único de reconocimiento de HindIII, se inactiva el gene que confiere resistencia a tetraciclina al interrumpirse la continuidad de la región del promotor.

El plásmido fué digerido totalmente con HindIII y tratado con fosfatasa alcalina, previamente a la reacción de ligasa.

El RNAm de Neurospora se obtuvo en las condiciones ya señaladas. Una forma de asegurarse de la presencia del RNAm específico de GS y su cantidad relativa al número de proteínas de otros RNA mensajero de la mezcla (la cual se utilizó como sustrato de la transcriptasa reversa para la síntesis de cDNA). Se procedió a traducir en un sistema de traducción in vitro de reticulocito de conejo, esta mezcla de mensajeros.

En las Figs, 7a y 7b se muestran los geles de electroforesis de proteínas traducidas in vitro, entre las cuales se encuentra GS. El inmunoprecipitado específico de GS de la reacción de traducción se puede ver en la Fig. 7b. La síntesis del cDNA se efectuó como se ha señalado, por el Dr. Rafael Palacios en colaboración con el Dr. Francisco Bolívar.

Para la clonación del cDNA se utilizaron enlazadores sintéticos (oligonucleótidos de 12 pb) conteniendo el sitio de reconocimiento para HindIII, estos DNAs fueron previamente marcados in vitro con ^{32}P en los extremos 5' con la enzima cinasa y ATP- γ - ^{32}P como donador, con el fin de poder rastrear su unión a DNA de alto peso molecular. Estos enlazadores proveen las regiones complementarias para la formación de moléculas híbridas (Fig. 5); con ellas se transformó la cepa E.coli RRI. El volumen completo de medio de transformación se espatuló en cajas de medio completo de Luria con estreptomycin y ampicilina.

Después de incubar una noche a 37°C se obtuvieron 976 colonias con fenotipo $Sm^r Ap^r$ (Sm^r es resistencia cromosomal de la receptora RRI). Cada una de estas se probó tanto en medio conteniendo $Sm Ap Tc$. Las 246 colonias que resultaron fenotipo $Sm^r Ap^r Tc^s$, se consideraron como posibles recombinantes (clonas) constituyendo el 25.2% de las células transformadas. En la Fig. 8 se muestran los resultados de esta selección, nótese la ausencia de crecimiento de las clonas en la caja con tetraciclina.

Es un requisito indispensable determinar la presencia de DNA clonado en el plásmido de las que se tienen con fenotipo de recombinantes, por lo que se semipurificó el DNA de plásmido de 15 clonas elegidas al azar para determinar qué proporción de ellas presenta inserciones en la banda 1 producto de la digestión con HpaII. En la Fig. 6 se pueden ver el número de fragmentos del pBR322 que resultan de digerir con la endonucleasa HpaII. El sitio único de HindIII está incluido en la banda 1 de digestión con HpaII y se escogió digerir con esta enzima, ya que cualquier variación en el peso molecular en esta banda indica la presencia de DNA heterólogo de manera clara. La Fig. 9 muestra los resultados de los geles de prueba de poliacrilamida de plásmidos semipuros de clonas digeridas con HpaII teñidas con EtBr y visualizados con luz UV, comparados con el patrón normal del vehículo pBR322 digerido con esta enzima. La observación de estos patrones de restricción indica que las 15 clonas presentan cambios notorios en la migración de la banda 1 en el gel. Lo que sugiere fuertemente la clonación de cdNA de Neurospora.

Según el protocolo de clonación de cdNA, lo esperado es que al digerir los plásmidos de cualquiera de estas clonas con la endonucleasa que reconoce el sitio el cual se eligió para clonar (HindIII), es posible liberar el fragmento de DNA heterólogo si es que no se modificaron estos sitios de reconocimiento. Para probar lo anterior, se purificó el DNA de

plásmido de cinco clonas elegidas a partir de sus patrones de restricción con HpaII. Los cinco plásmidos híbridos se digirieron con HindIII y solamente la C49 y la D29 liberaron un fragmento de DNA de entre 550 a 600 pb y de 400 a 500 pb de tamaño, respectivamente (Fig. 10). Las otras tres clonas solamente se linealizaron (ruptura de un solo sitio en el plásmido) indicándose la pérdida de un sitio de reconocimiento para HindIII. Esto probablemente fué debido a que se transformó con plásmidos híbridos lineales con un solo sitio de HindIII, los cuales son ligados y reparados en el interior de la célula.

3.3) CLONACION DE DNA DEL GENOMA DE NEUROSPORA CRASSA EN EL BACTERIOFAGO λ CARONTE 4

La estrategia de clonación en el fago Caronte 4 (C-4) se presenta en la Fig. 11. En los experimentos realizados en este trabajo se utilizó DNA del C-4 puro digerido con EcoRI generando cuatro fragmentos correspondientes a los brazos izquierdo y derecho y a los segmentos internos de la región reemplazable. Por otro lado, se aisló DNA de la cepa Slime de Neurospora crassa, el cual se digirió parcialmente con la misma enzima para obtener una colección aleatoria de fragmentos de aproximadamente 18 Kpb de tamaño promedio, conteniendo extremos cohesivos de EcoRI para clonar (Fig. 12).

Ambos genomas restringidos fueron mezclados a distintas relaciones molares en presencia de ligasa T-4. En la Fig. 13 se puede observar un cultivo con crecimiento confluyente de la cepa E. coli K12 receptora del C-4. Asimismo, se ven las placas de lisis producidas por fagos recombinantes independientes después de una reacción de encapsidación in vitro dependiente de DNA viral exógeno, a partir del genoma del C-4 híbrido (unido a fragmentos de restricción de DNA de Neurospora crassa). Los

resultados muestran que el mayor número de fagos recombinantes se presentó en la relación 10 moles de fragmentos de genoma de Neurospora crassa mas 1 mol. de genoma de C-4 (Fig. 14), obteniéndose un título de 6×10^3 unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/ml) de reacción de encapsidación. En la relación 1 mol. de fragmentos de genoma de Neurospora mas 1 mol. de genoma de C-4 resultaron 2.4×10^3 ufp/ml. Finalmente, en el cociente molar 0/1 (Fig. 14), se sometió a encapsidación in vitro solamente DNA del C-4 digerido totalmente con EcoRI y ligado en condiciones idénticas a las anteriores en los que se usó DNA de Neurospora. Esto indica que el vehículo una vez digerido y ligado consigo mismo, no es capaz de dar partículas infectivas después de la encapsidación. Y que todos aquellos genomas de C-4 (un brazo izquierdo y un brazo derecho) a los cuales se les añadió DNA heterólogo de un tamaño adecuado (8.2 a 22.2 Kpb) para su encapsidación, lograron producir partículas infectivas en el sistema in vitro. Lo anterior se puede explicar en función de que es menos probable que los segmentos internos se ligan con ambos brazos, para regenerar un genoma completo de C-4 encapsidable, a que un fragmento de DNA de Neurospora de tamaño adecuado se ligue con un brazo izquierdo y uno derecho.

De estos experimentos fué posible propagar en medio sólido y aislar un total de 1,300 recombinantes independientes, las cuales representan aproximadamente el 10% del genoma de Neurospora con una probabilidad de 0.99.

Con el objeto de detectar cambios en los patrones de restricción de estas clonas, como indicador de la presencia de DNA heterólogo, el DNA de 7 de ellas escogidas al azar se semipurificó y se digirió con EcoRI. En la Fig. 15, se pueden observar dichos patrones de restricción. Nótese como existe un cambio de migración de los fragmentos del DNA de las clonas (a-g),

con respecto al DNA del vehículo C-4 (h) igualmente digerido con EcoRI. Además todos conservan las bandas que corresponden a los brazos, indispensables para la viabilidad del fago.

Fueron elegidas otras clonas inicialmente al azar y luego por sus patrones de restricción para demostrar por hibridización tipo Southern, la clonación de DNA de Neurospora crassa. En las Figs. 16a y 16b se presentan los resultados de cuatro de ellos. Nótese la comigración de las bandas en los carriles 1 y 2 en la parte superior del gel (DNA correspondiente al C-4) y 1 y 4 en la parte inferior (DNA del genoma de Neurospora crassa). No se detectó hibridización del DNA del C-4 con el genoma de Neurospora (Fig. 16c). Según los resultados obtenidos, se cumplen las predicciones para clonas de DNA de Neurospora crassa cuyo vehículo sea el Caronte 4.

" El placer de la investigación
radica en la investigación misma,
pues jamás se sabe lo que dará -
como cosecha".

Theobald Smith (1893).

4) CONCLUSIONES

Como ha sido ya constatado en la introducción es importante la construcción de bancos de genes y su utilización como paso necesario en el aislamiento de genes nativos específicos. La idea del desarrollo de esta metodología como un enfoque para la purificación de los genes de enzimas involucradas en las vías de asimilación y distribución de nitrógeno orgánico en Neurospora crassa, resulta de sumo interés. Ya que complementa en gran medida los estudios genéticos y bioquímicos realizados por los grupos de investigación involucrados. Abriría asimismo, nuevas perspectivas para el estudio molecular detallado de la organización y regulación de estos genes. Así pues para alcanzar este objetivo, es indispensable la aplicación de técnicas que permitan la obtención de bancos de genes como un instrumento para el fraccionamiento en unidades discretas e independientes, manipulación, enriquecimiento y amplificación de segmentos de genomas complejos. Este trabajo describe las estrategias seguidas para cumplir el primer objetivo para estudiar genes nativos, el cual consiste en el establecimiento de técnicas para la construcción de bancos de genoma de Neurospora crassa.

El banco de cDNA en pBR325 se caracterizó fenotípicamente y por patrones de restricción (Figs. 8, 9 y 10). Observando los resultados presentados en la Fig. 9. se puede afirmar que la totalidad de las quince clonas escogidas al azar, muestran cambios en la migración de la banda #1, producto de la digestión con HpaII. Este experimento exploratorio indica que la gran mayoría de las 246 clonas seleccionadas como Ap^r Tc^s poseen DNA heterólogo clonado.

Se obtuvieron dos bancos de genes nativos de Neurospora crassa. En el primero, se empleó como vehículo

de clonación el plásmido pBR325 el cual presenta insertos de un tamaño aproximado y ligeramente menor al del plásmido (Fig. 3) cuyo tamaño es de 5.4 Kb. Esto corresponde al tamaño de fragmentos de DNA que se clonaron digeridos totalmente con EcoRI (reconoce cada 4Kb promedio). El segundo banco, se hizo utilizando el bacteriófago λ Caronte 4 como vehículo a partir de DNA de Neurospora crassa parcialmente digerido con EcoRI.

Con respecto a los resultados obtenidos al someter el plásmido pBR325 o el fago Caronte 4 híbrido con un inserto heterólogo clonado del genoma de Neurospora crassa a hibridización contra la totalidad de este genoma fraccionado por restricción, era de esperarse el apareamiento por homología de la secuencia correspondiente al genoma clonado. Así pues se comprobó el origen de la secuencia clonada por hibridización con el DNA de Neurospora crassa. Lo anterior demuestra la clonación de DNA de Neurospora en dichos vehículos (Figs. 4, 6a, b, c).

Así mismo, es predecible la observación de que los fragmentos heterólogos restringidos completamente con EcoRI y separados en un gel del DNA del fago λ , comigran con los segmentos del genoma de Neurospora crassa digerido totalmente con EcoRI e hibridizan con el DNA del fago híbrido. Esto es claramente observable para las clonas de fagos analizados. (Figs. 16, b). En estas figuras también es de notarse que al digerir totalmente el DNA de estos fagos híbridos con la endonucleasa EcoRI, se observan varias bandas, lo cual apoya el hecho de que el DNA clonado proviene de digestiones parciales con EcoRI.

Además, tomando en cuenta la sumatoria de tamaños de los fragmentos correspondientes a DNA de Neurospora de las clonas A, B y C (15.3, 13.5 y 14.3 Kpb respectivamente), no exceden el límite que acepta el Caronte 4 para lograr una encapsidación in vitro exitosa (8.3 a 22.2 Kpb).

Actualmente en el laboratorio se está trabajando en la obtención de bancos de genes en los Carontes 4 y 28, de tal manera que lleguen a representar varias veces el genoma de Neurospora.

También se siguen diversos caminos para la detección de genes específicos como el sistema de hibridación-traducción de RNA mensajero, y la hibridación heteróloga con detectores radiactivos de otras especies.

"Ni el prestigio de tu objetivo
y el poder de tus instrumentos;
ni tu sabiduría y precisión sobre
tus proyectos, pueden substituir
a la originalidad de tu enfoque y
agudeza de tu observación".

Hans Selye (1925).

5) BIBLIOGRAFIA

Abelson, J. (1979); RNA processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.* 48:1035-1069.

Anderson, D., Shapiro, L. and Skalka, A.M. (1979); In situ immunoassays for translation/products; in *methods in Enzimology* Vol. 68, Recombinant DNA (Wu, R., ed) pp. 428-436, Academic Press, New York.

Becker, A. and Gold, M. (1975); Isolation of the bacteriophage λ A gene protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:581-585.

Becker, A. and Gold, M. (1978); Enzymatic breakage of the cohesive end and site of phage λ DNA terminase (Ter) reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4199-4203.

Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977); Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3171-3175.

Betlach, M.C., Hearschfield, V., Chow, L., Brow, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1976); A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction modification of DNA. *Fed. Proc.* 35:2037-2043.

Blattner, F.R. (1977); Charon phages: Safer derivatives of Bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 196:161-169.

Blattner, F.R., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Richards, J.E., Slightom, H.L., Tucker, P.W. and Smithies, O. (1978); Cloning human fetal γ globin and mouse α type globin DNA: Preparation and screening of shotgun collections. *Science* 202:1279-1284.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J. and Falkow, S. (1977); Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113.

Bolivar, F. (1978); Construction and characterization of new cloning vehicles III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. *Gene* 4:121-136.

Bolivar, F. (1979); Recombinación in vitro de ácidos nucleicos: Ingeniería genética molecular. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 21:37-55.

Boyer, H.W., Betlach, M., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Heynecker, H.L., Shine, J. and Goodman, H.M. (1977); The construction of molecular cloning vehicles; in *Recombinant molecules: Impact of science and society* (Beers, R.F. and Basset, E.G., eds) pp. 9-20, Raven Press, New York.

Boyer, H.W. and Roulland-Doussoix, O. (1969); A complementary analysis of the restriction and modification of DNA in E. coli; *J. Mol. Biol.* 41:459-472.

Brack, C. and Tonegawa, S. (1977); Variable and Constant parts of immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 non translated bases apart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5652-5656.

Breathnach, J., Mandel, L. and Chambon, P. (1977); Ovalbumin gene is split in chicken DNA, *Nature* 270:314-319.

Carbon, J., Clarke, L., Ilgan, C. and Ratzkin, B. (1977); The construction and use of hybrid plasmid gene banks in E. coli; in Recombinant molecules: Impact on science and society (Beers, R.F. and Basset, E.G., eds) pp. 355-378, Raven Press, New York.

Carbon, J. and Clarke, L. (1979); Selection of specific clones from colony banks by suppression or complementation tests; in methods in enzymology vol. 68, Recombinant DNA (Wu, R., ed) pp. 396-408, Academic Press, New York.

Clarke, L. and Carbon, J. (1976); A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9:91-99.

Clarke, L., Hitzeman, R. and Carbon, J. (1979); Selection of specific clones from colony banks by screening with radioactive antibody; in methods in enzymology Vol. 68, Recombinant DNA (Wu, R., ed) pp. 426-442, Academic Press, N.Y.

Clewell, D. (1972); Nature of ColE1 plasmid recombination in the presence of chloramphenicol. J. Bac. 110:667-676.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114.

Craig, E.A., Mc. Carthy, B.J. and Wadsworth, S.C. (1979); Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the mayor heat shock-induced protein of D. melanogaster. Cell 16:575-588.

Dickson, R.C. and Markin, J.S. (1978); Molecular cloning and expression in E. coli of yeast gene coding for β -galactosidase. Cedd 15:123-130.

Enquist, L. and Sternberg, N. (1979); In vitro packaging of λ Dam vectors and their use in cloning DNA fragments; in methods in enzymology Vol. 68, Recombinant DNA (Wu, R., ed) pp. 281-298, Academic Press, New York.

Erlich, H.A., Cohen, S.N. and Mc. Devitt, H.O. (1979); Immunological detection and characterization of products translated from cloned DNA fragments; in methods in enzymology Vol. 68, Recombinant DNA (Wu, R., ed) pp. 443-453, Academic Press, New York.

Espin, G., Palacios, R. and Mora, J. (1979); Glutamine metabolism in nitrogen-starved conidia of Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 115:59-68.

Free, S.J., Rice, P.W. and Metzenberg, R.L. (1979); Arrangement of the genes coding for ribosomal RNA in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 137:1219-1226.

Gelvin, S., Heizmann, P. and Howell, S.H. (1977); Identification and cloning of the chloroplast gene coding for the large subunit of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase from chlamidomonas reinhardi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3193-3197.

Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D.F., Tait, R.C. and Boyer, H.W. (1978); A general method for the purification of restriction enzymes. Nucleic Acid. Res. 5:2373-2380.

Grunstein, M. and Hogness, D.S. (1975); Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain s specific gene; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961-3965.

- Helinski, D.R., Hershfield, V., Figurski, D. and Meyer, R.J. (1977); Construction and properties of plasmid cloning vehicles; in Recombinant molecules; Impact in science and society (Beers, R.F. and Basset, E.G. eds) pp. 151-165, Raven Press, New York.
- Hummelt, G. and Mora, J. (1980); Submitted for publication in Biochem. Biophys. Res. Commun.
- Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F. (1963); On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:329-348.
- Krumlauf, R., and Marzluf, G.A. (1980); Genome organization of the repetitive and inverted repeat DNA sequences in Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 255:1138-1145.
- Limón-Lason, J., Lara, M., Resendiz, B. and Mora, J. (1977); Regulation of glutamine Synthetase in fedbatch cultures of Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78:1234-1240.
- Maniatis, T., Jeffreys, A. and Kleid, D.G. (1975); Nucleotide sequence of the right ward operator of phage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1184-1188.
- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Laver, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G.K. and Efstratiadis, A. (1978); The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15: 687-701.
- Miller, D.L., Gubbins, E.J., Pegg III, E.W. and Donelson, J. E. (1977); Transcription and translation of cloned Drosophila DNA fragments in E. coli Biochemistry 16:1031-1038.

Mora, Y., Chávez, O. and Mora, J. (1980); Regulation of Neurospora crassa, glutamine synthetase by the carbon and nitrogen source. J. Gen. Microbiol. in press.

O'Farrell, P.H. (1975); High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250:4007-4021.

Palacios, R., Campomanes, M. and Quinto, C. (1977); Neurospora glutamine synthetase: Translation of specific messenger ribonucleic acid in a cell free system derived from rabbit reticulocytes. J. Biol. Chem. 252:3028-3034.

Quinto, C., Mora, J. and Palacios, R. (1977); Neurospora crassa glutamine synthetase. Role of enzyme concentration during exponential growth. J. Biol. Chem. 252:8724-8727.

Quinto, C., Chávez, O. and Palacios, R. (1980); Degradation of Neurospora crassa glutamine synthetase during carbon starvation. In press.

Sánchez, F., Campomanes, M., Quinto, C., Hansberg, W., Mora, J., and Palacios, R. (1978); Nitrogen source regulates glutamine synthetase mRNA levels in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 136:880-885.

Sanzey, B., Mercerau, O., Fernynck, T. and Kourilsky, P. (1976); Methods for identification of recombinants of phage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3394.

Skalka, A. and Shapiro, L. (1976); In situ immunoassays for gene translation products in phage plaques and bacterial colonies. gene 1:65

- Smith, H. and Wilcox, K. (1970); A restriction enzyme from Haemophilus influenzae, I. Purification and general properties. J. Mol. Biol. 51:379.
- Southern, E.M. (1975); Detection of specific Sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Stadtman, E.R. (1973); in the enzymes of glutamine metabolism (Prusiner, S. and Stadtman, E.R., eds). pp. 1-6, Academic Press, New York,
- Struhl, K., Cameron, J.R. and Davis, R.W. (1976); Functional expression of eukaryotic DNA in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1471-1475.
- Struhl, K. and Davis, R.W. (1977); Production of a functional eucaryotic enzyme in E. coli: Cloning and expression of the yeast structural gene for midazole glycerol phosphate dehydratase (his 3). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5255-5259.
- Tilghman, S.M., Tiemer, D.C., Polsky, F., Edgell, M.H., Seidman, J.G., Leder, A., Enquist, L.W., Norman, B. and Leder, P. (1977); Cloning specific segments of the mammalian genome: Bacteriophage λ containing mouse globin and surrounding gene sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4406-4410.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirjwin, J., Pictet, R., Fisher, E., Rutter, W.J. and Goodman, H.M. (1977); Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. Science 196:1313-1319.

Vapnek, D., Hautala, J.A., Jacobson, J.W., Giles, N.H. and Kushner, S.R., (1977); Expression in E.coli K12 of the structural gene coding for catabolic dehydrokinase of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3508-3512.

Vichido, I., Mora, Y., Quinto, C., Palacios, R. and Mora, R. (1978); Nitrogen regulation of glutamine synthetase in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 106:251-259.

Wang, J.C., and Davison, N. (1966); On the probability of ring closure of λ DNA. J. Mol. Biol. 19:469.

Williams, B.G. and Blattner, F.R. (1979); Construction and characterization of hybrid bacteriophage λ vectors for DNA cloning. J. Virol. 29:555-575.

Woo, S.L.C., Monahan, J.J. and O'Malley, B.W. (1977); The ovalbumin gene: Purification of the anticodon strand. J. Biol. Chem. 252:5789-5797.

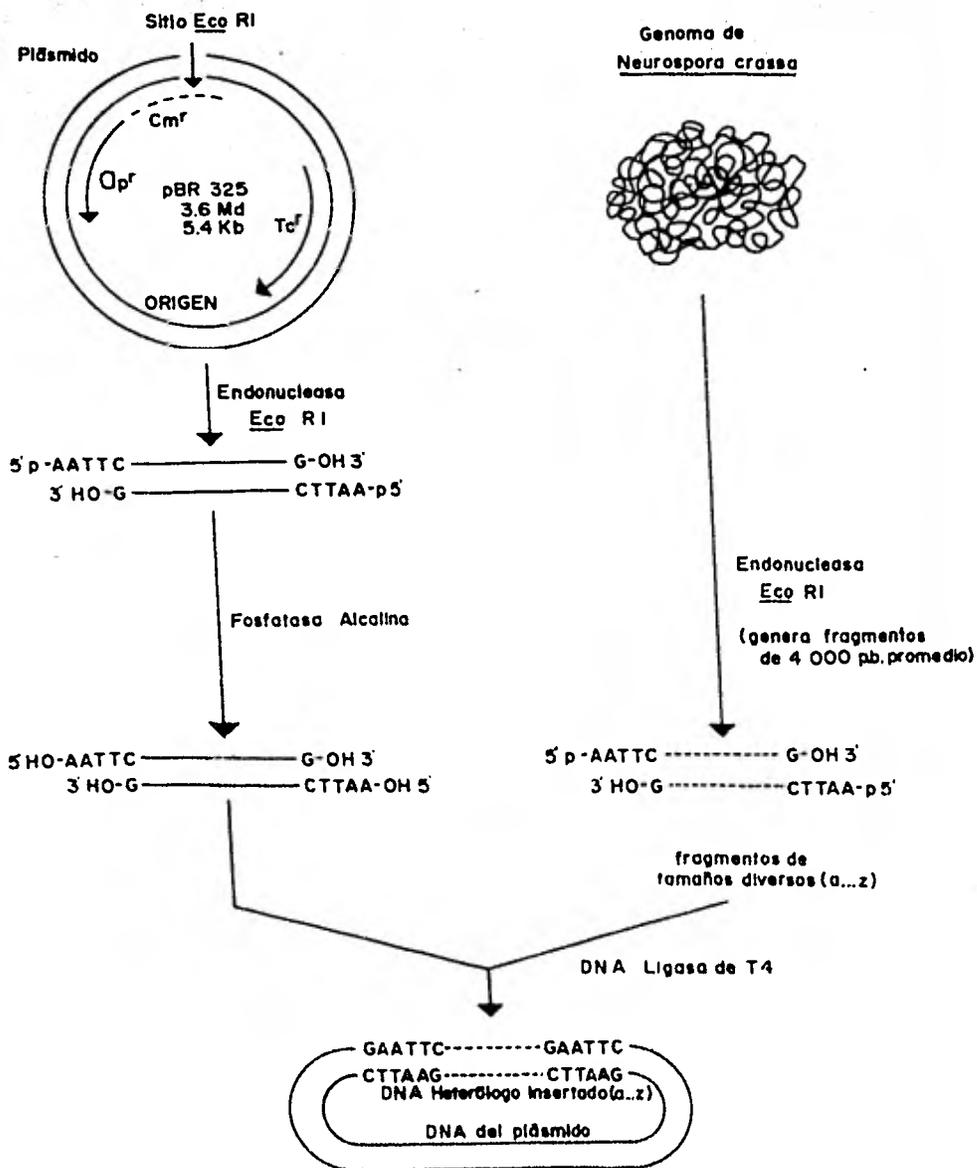


Fig. 2. Diagrama de la estrategia para la clonación de DNA nativo de *Neurospora crassa* en el plásmido pBR325.

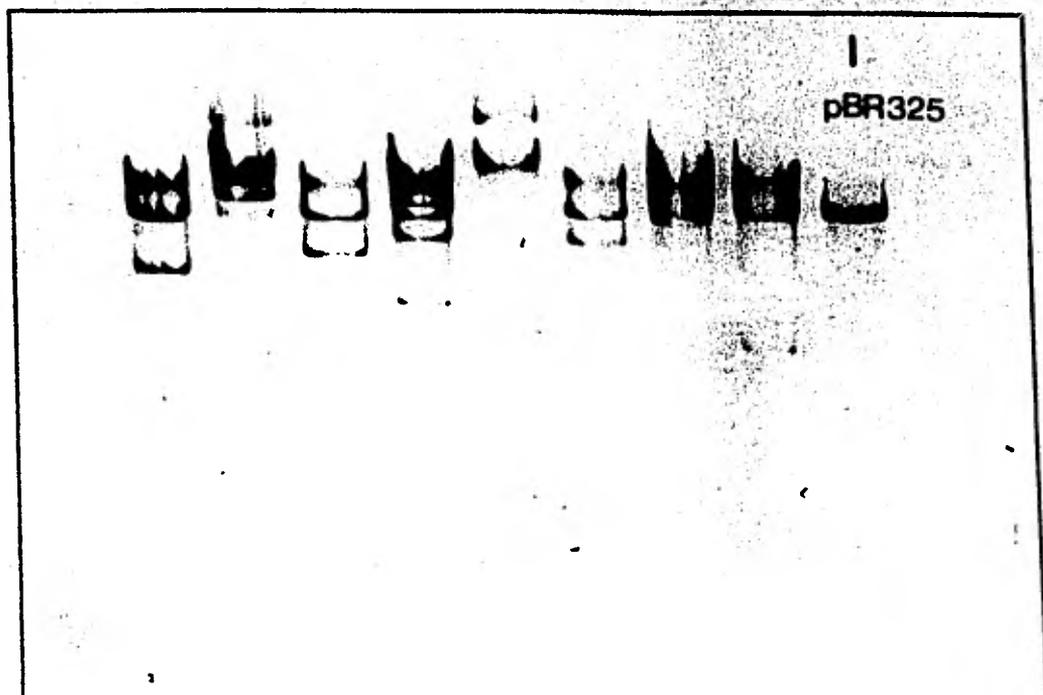


Fig. 3. Gel de prueba de acrilamida al 7.5% de 8 clones de DNA de Neurospora crassa en el pBR325 digeridas con EcoRI. Es de notar la presencia de DNA heterología al comparar estos patrones de digestión con el vehículo linealizado.

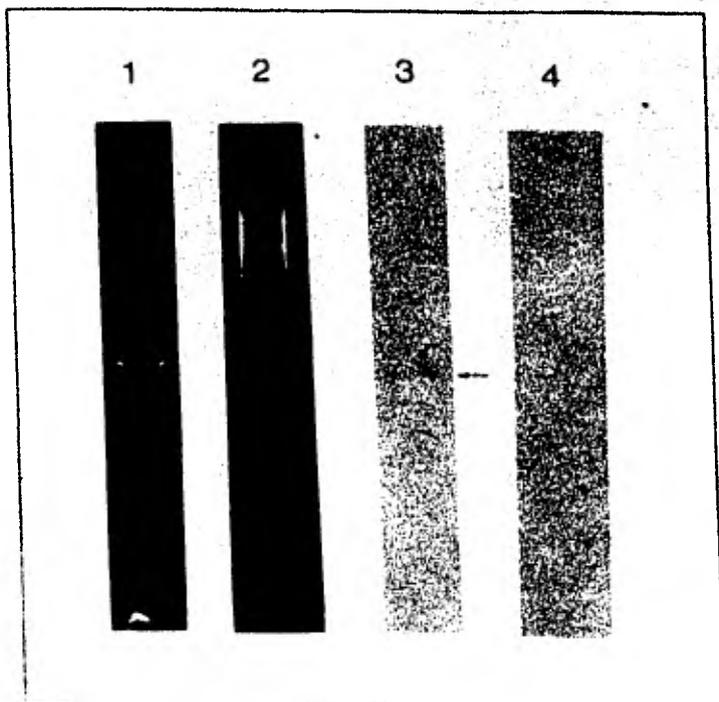


Fig. 4. Hibridización tipo Southern del inserto heterólogo clonado en el pBR325, con *HS* de genoma de Neurospora crassa. (Ver texto).

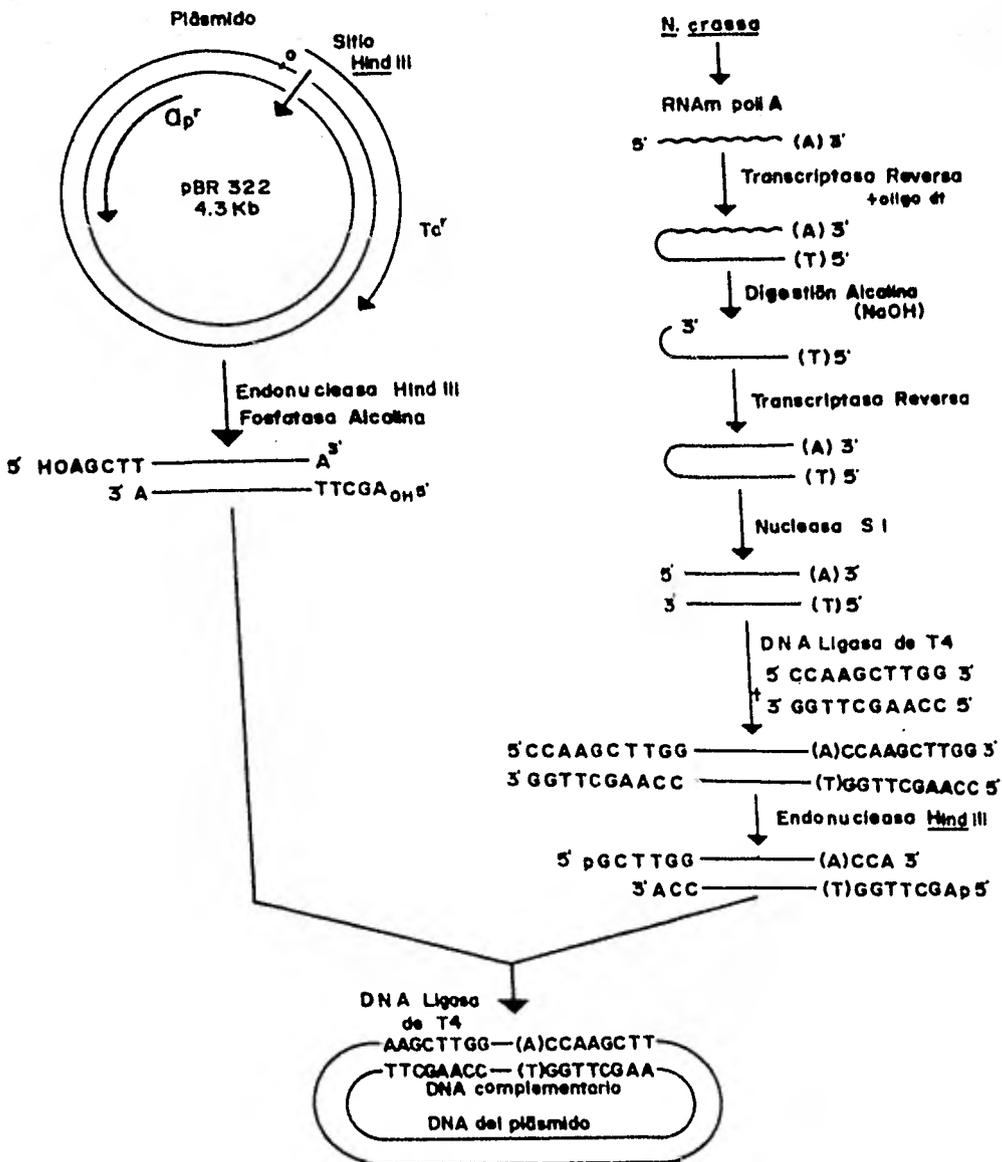


Fig. 5. Diagrama esquemático del procedimiento seguido para la inserción del cDNA al plásmido pBR322, empleando enlazadores sintetizados químicamente conteniendo el sitio de restricción de la enzima HindIII usada para linealizar el vehículo.

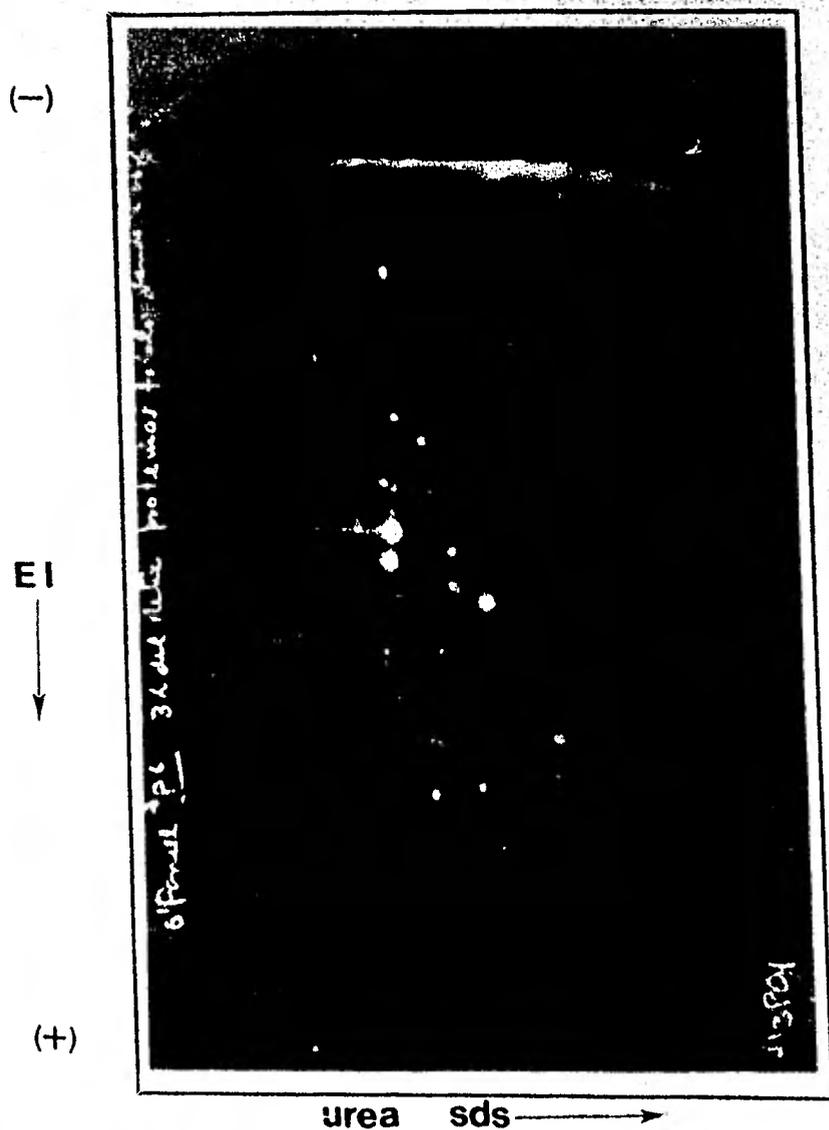


Fig. 7a. Electroforesis de proteínas en doble dimensión de los productos de traducción *in vitro*, del RNA poliadenilado utilizado como sustrato para la síntesis *de novo*. Cada mancha blanca corresponde a una proteína sintetizada *de novo* y cuya información está codificada en esta población de RNA mensajero.

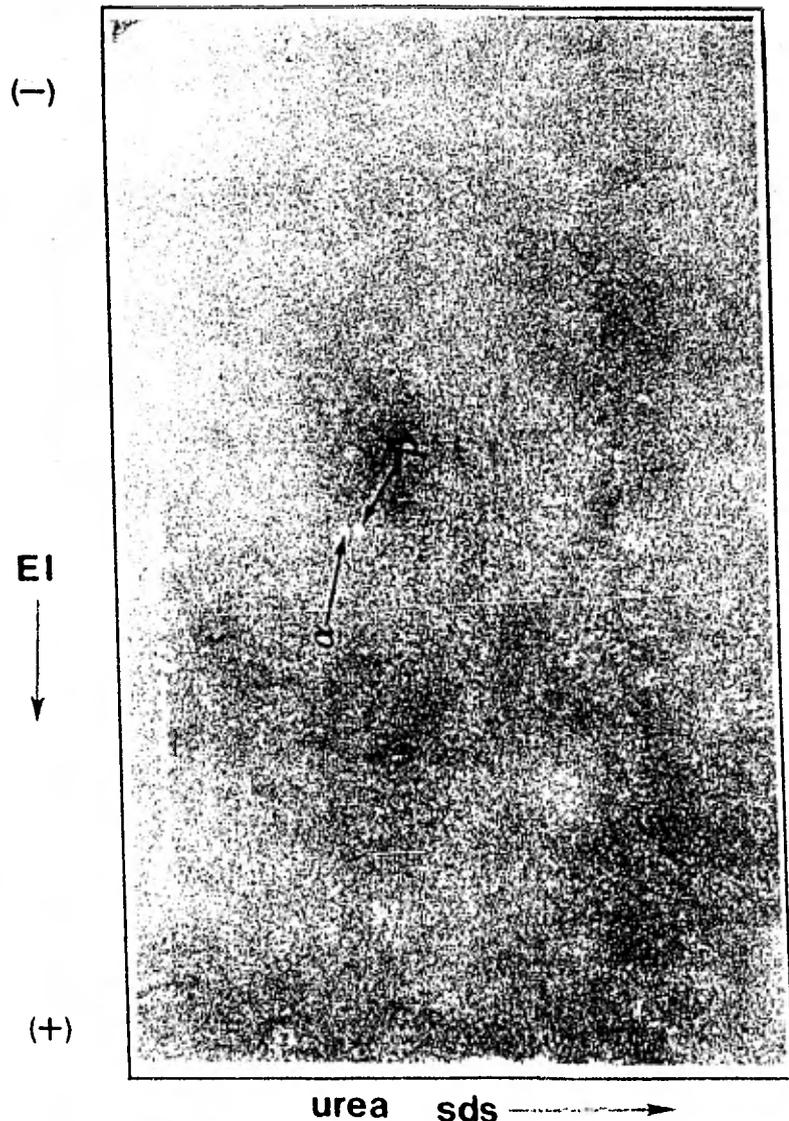


Fig. 7b. Electroforesis de proteínas en doble dimensión del producto de traducción in vitro o inmunoprecipitado in situ en el sistema de retículo endoplasmático, con anticuerpo específico anti-glutarilno sintetasa de *Aspergillus crassa*. En la figura se señalan la subunidad alfa y beta componentes estructurales de la glutarilno sintetasa (Sánchez et al., 1980, J. Biol. Chem. 255:2331).

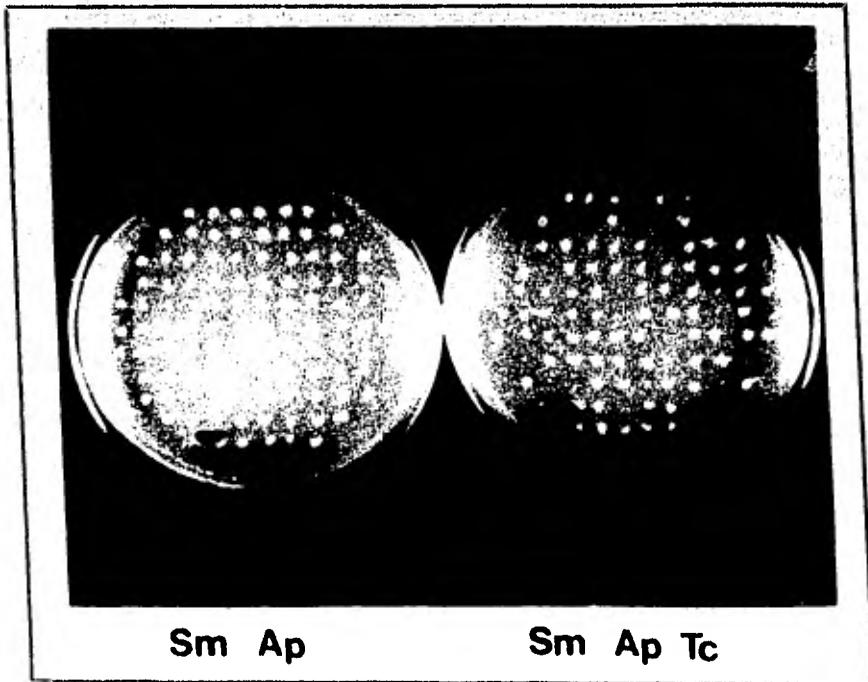


Fig. 8. Selección de posillos recombinantes (clonias), colonias con fenotipo $Sm^R Ap^R Tc^S$, véase texto.

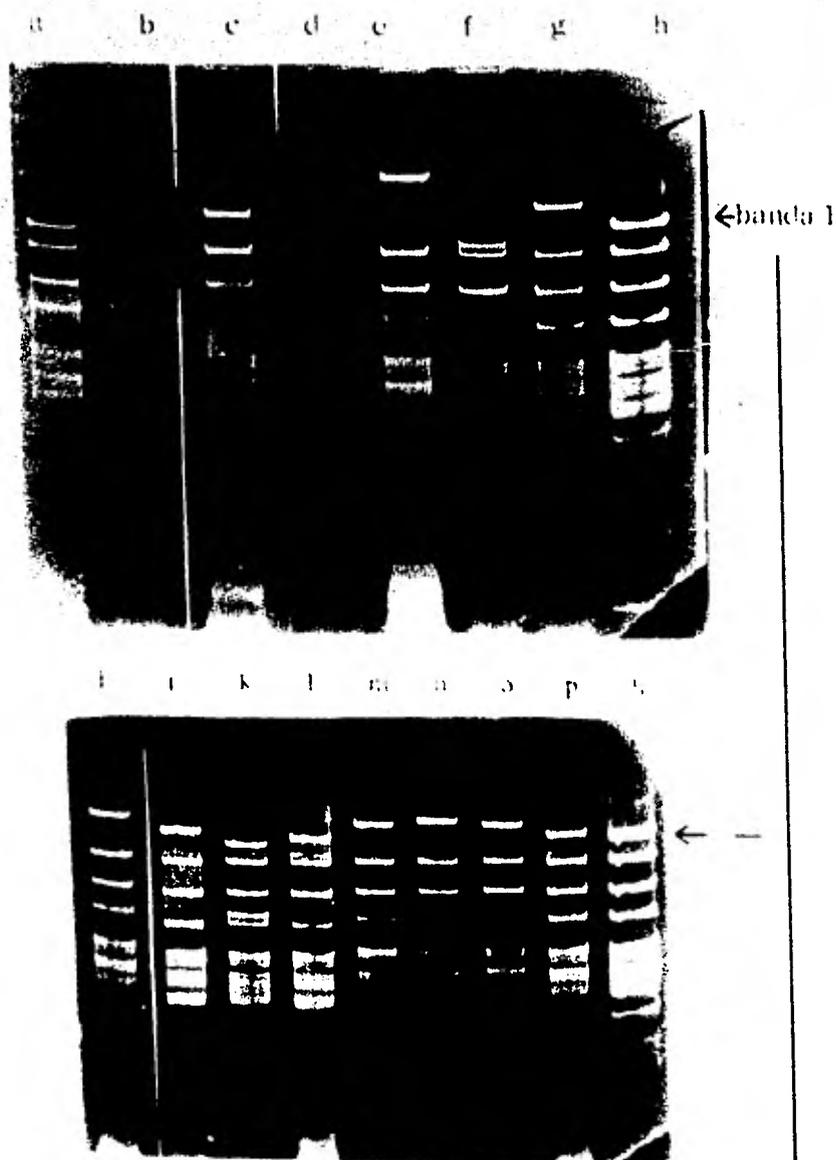


Fig. 9. Digestión con *Hpa*II de los plásmidos de 15 clones: a) D53; b) C82; c) C63; d) C49; e) B69; f) A77; g) pBR322; h) D98; i) J83; k) D74; l) D63; m) D46; n) D29; o) D26; p) D5. A la derecha se muestra la migración de la banda # 1 del pBR322.

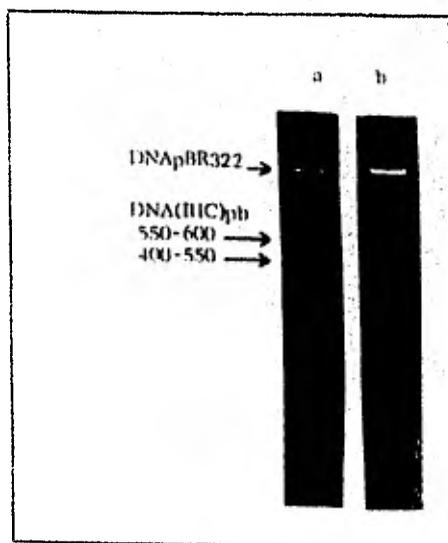


FIG. 10. Gel de agarosa al 7.5% con digestiones de *Hind*III de las clonas a)C4 y b)C9. Se muestra la banda de DNA del pBR322 en la parte superior. Los segmentos de mayor migración señalados como DNA IIC (inserto heterólogo clonado) se liberan del plásmido híbrido al ser cortados los dos sitios de *Hind*III que flanquean al cDNA. Los tamaños aproximados de tales fragmentos están señalados en pares de bases (pb).

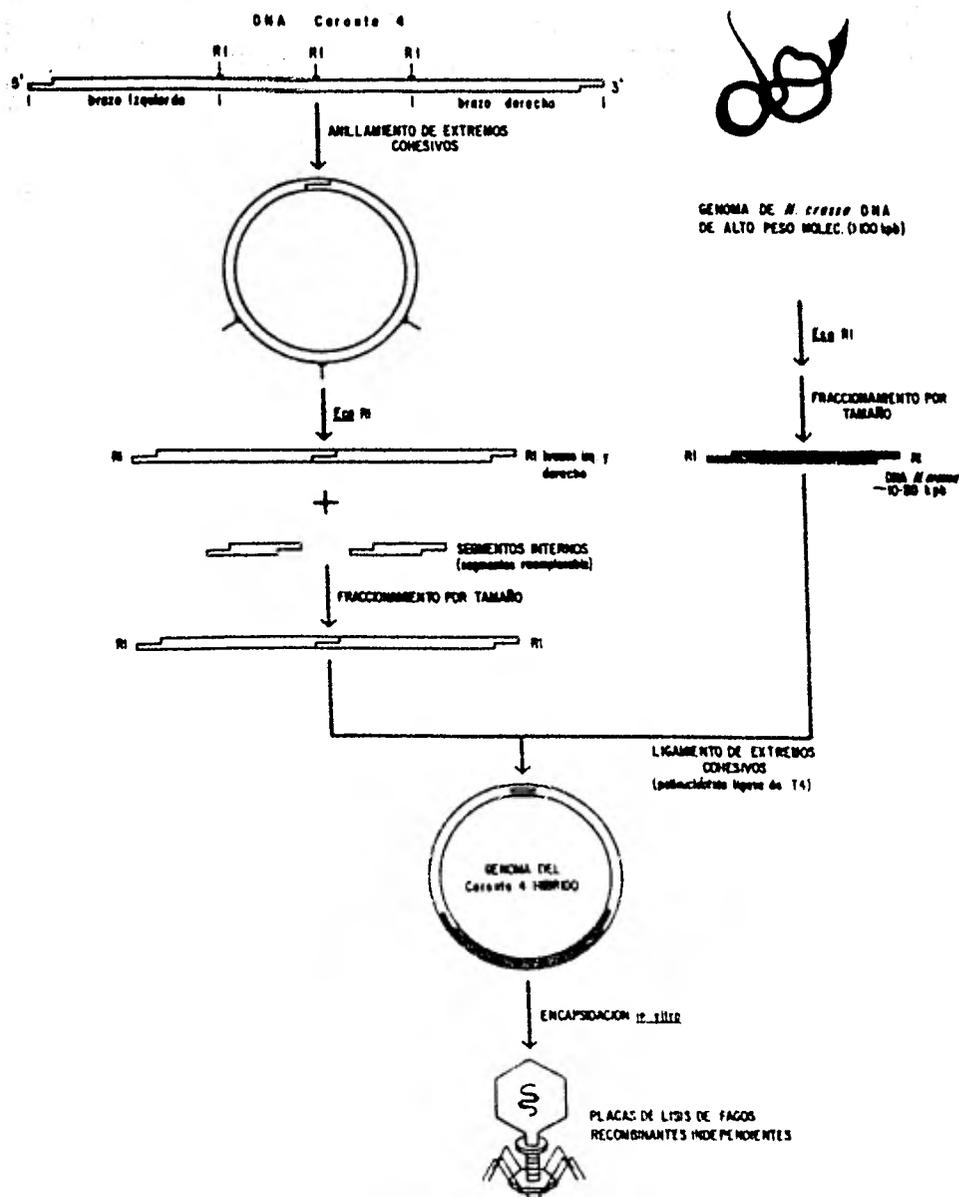


Fig. 11. Diagrama de la estrategia para la clonación de DNA genómico de *Neurospora crassa* en el Ceroteo 4.

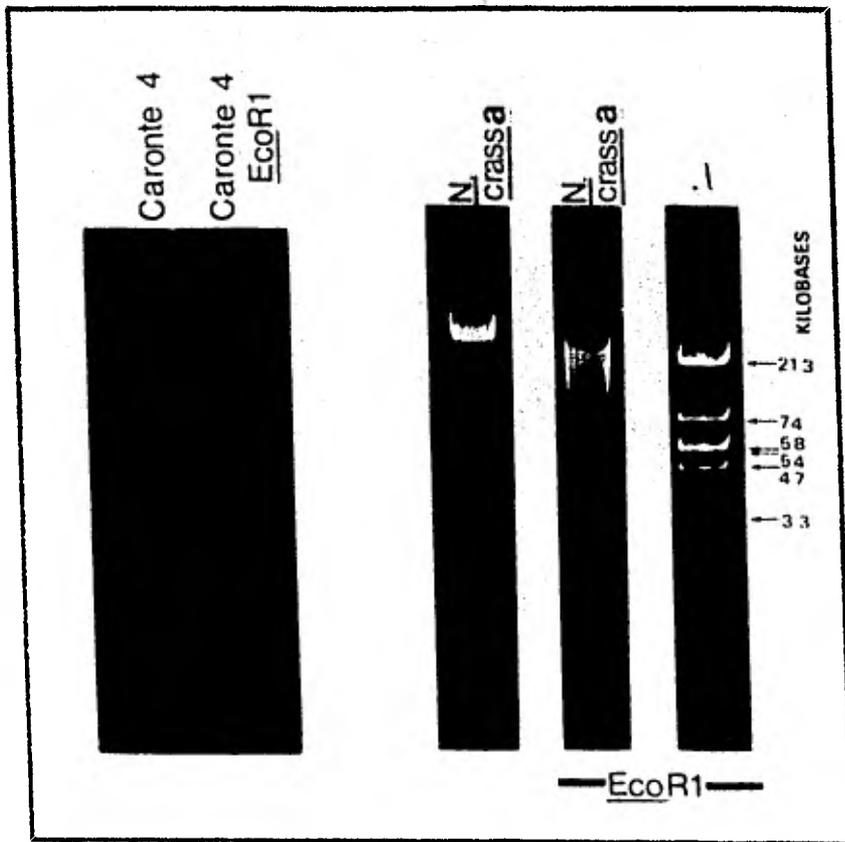


Fig. 12. A) Patrón de restricción con EcoRI de DNA del Caronte 4 en el que se observan el brazo izquierdo (banda superior 20 Kpb), brazo derecho (15 Kpb), y ambos segmentos internos (aprox. 7 Kpb). B) Digestión parcial con EcoRI del genoma de Neurospora crassa para clonar. A la derecha se presenta el DNA del fago silvestre digerido con EcoRI como marcador de peso molecular.



FIG. 13. Placa de lisis de fagos recombinantes después de una reacción de encapsulación in vitro.

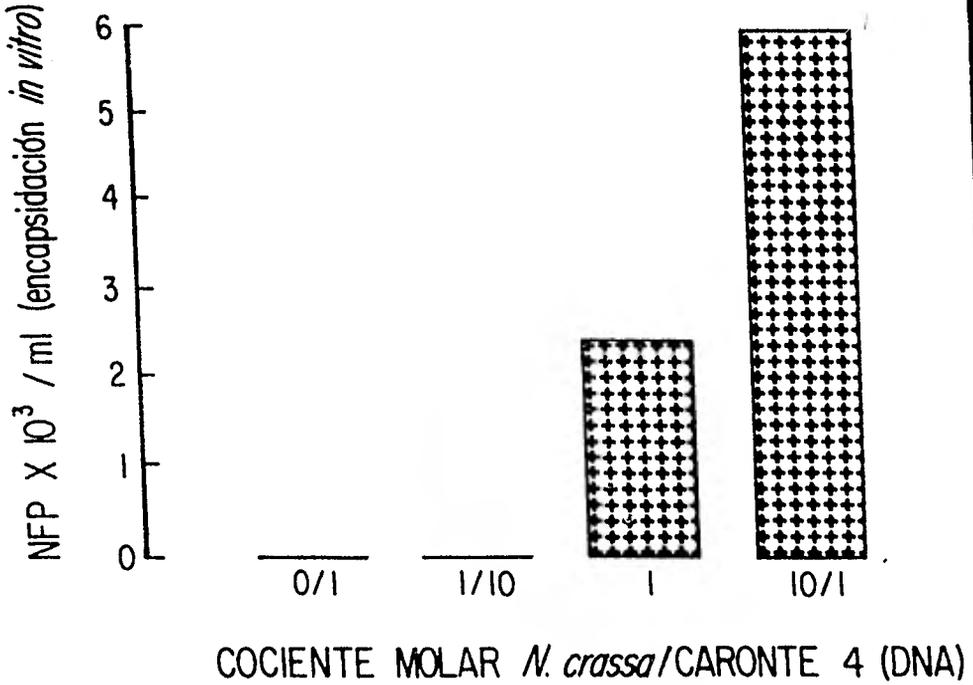


Fig. 14. Número de unidades formadoras de placa (NFP) resultantes de un ensayo de encapsidación *in vitro* al cual se sometió DNA híbrido ligado a distintos cocientes molares entre el DNA blanco y el DNA del vehículo.

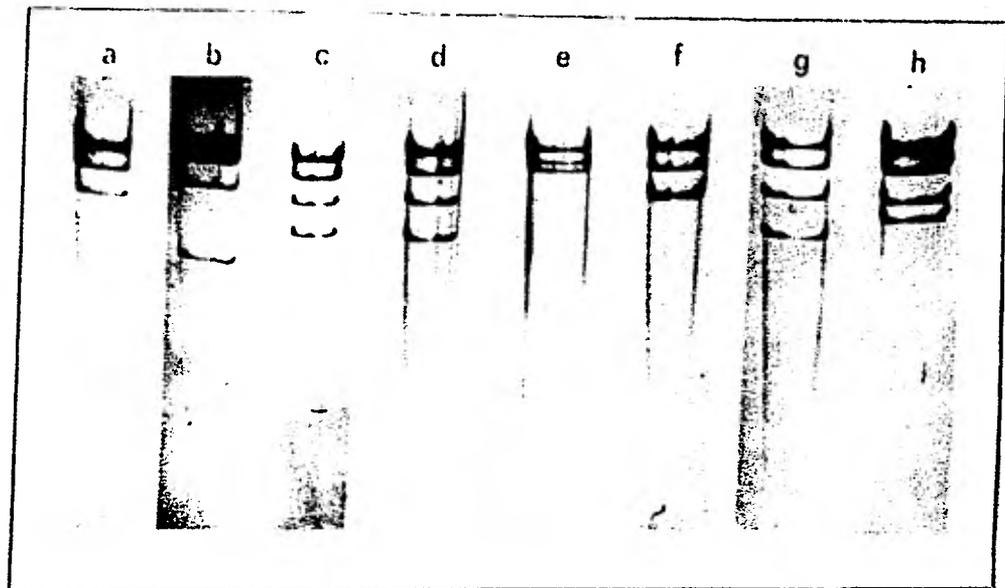


Fig. 15. Digestiones totales con endonucleasa EcoRI de DNA de fagos recombinantes independientes (1-g), en las que se nota un cambio en la migración electroforética con respecto al DNA del vehículo de clonación. Control 4, igualmente digerido con EcoRI (a).

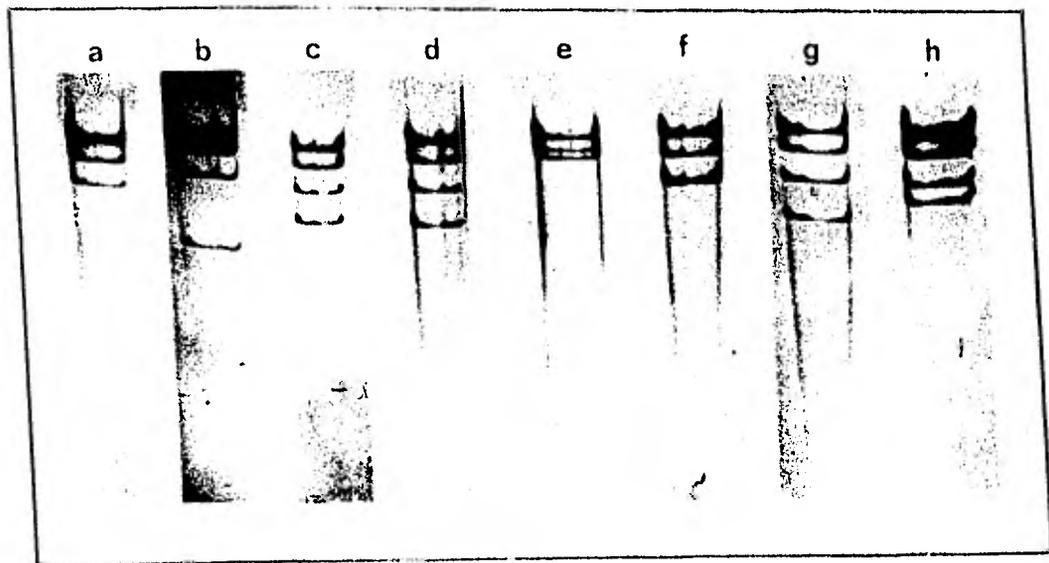
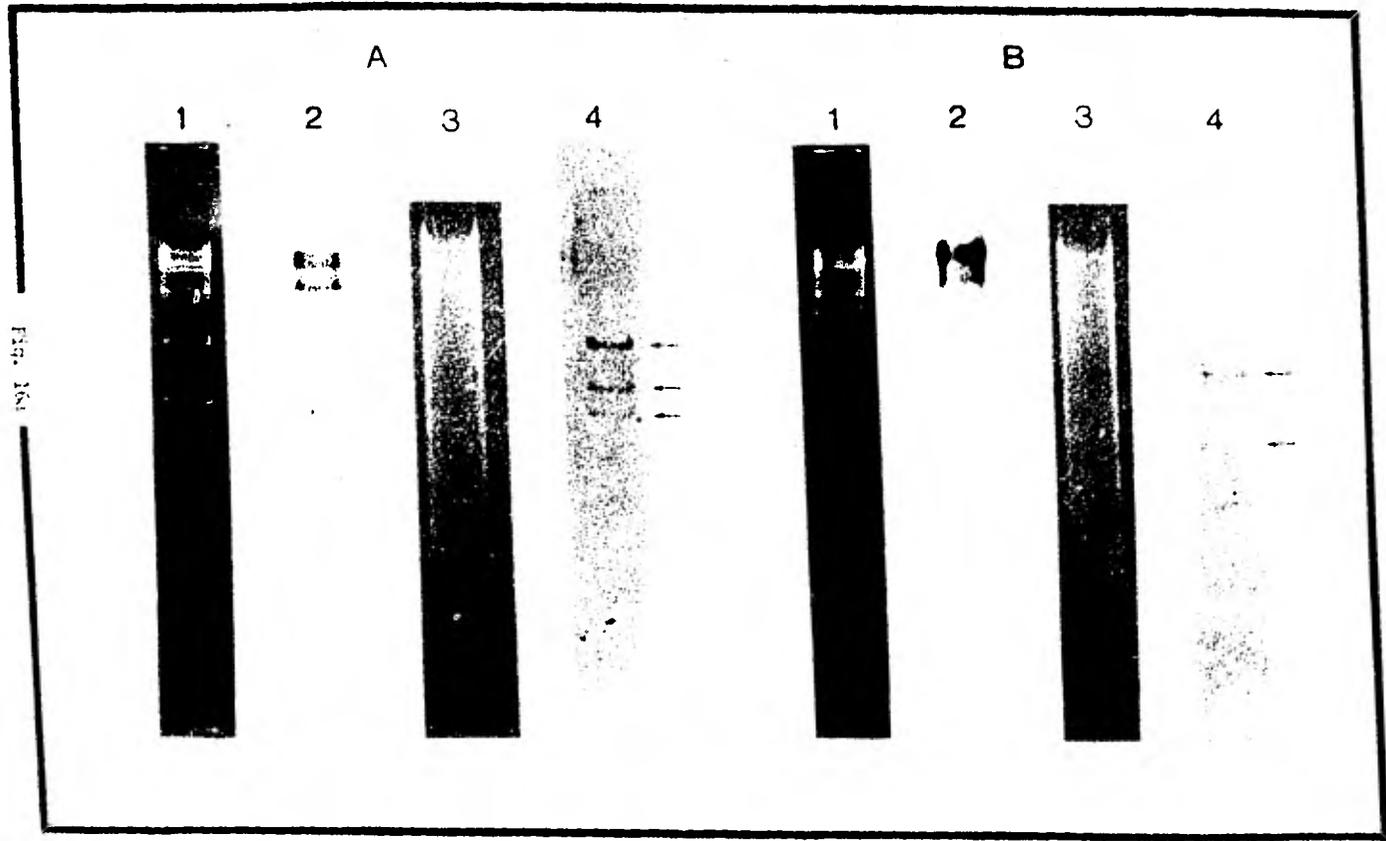
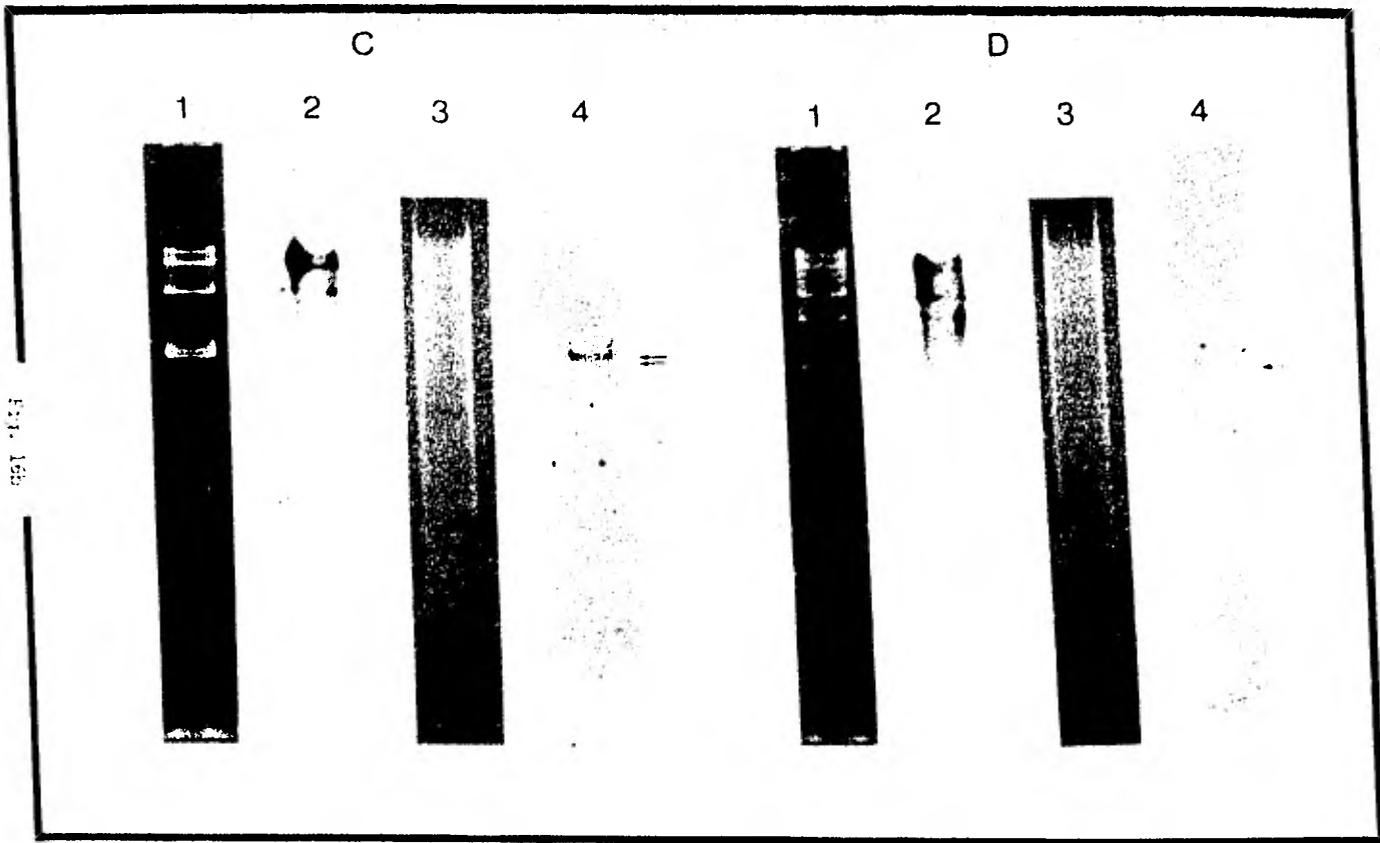


Fig. 15. Digestiones totales con endonucleasa *EcoRI* de DNA de fagos recombinantes independientes (1-9), en las que se nota un cambio en la migración electroforética con respecto al DNA del vehículo de clonación frente 4, igualmente digerido con *EcoRI* (h).

Figs. 16a, b, c. Hibridización tipo Southern de DNA de 4 clonas (A, B, C y D) de Caronte 4 como vehículo con DNA del genoma de Neurospora crassa.

Fig. 12





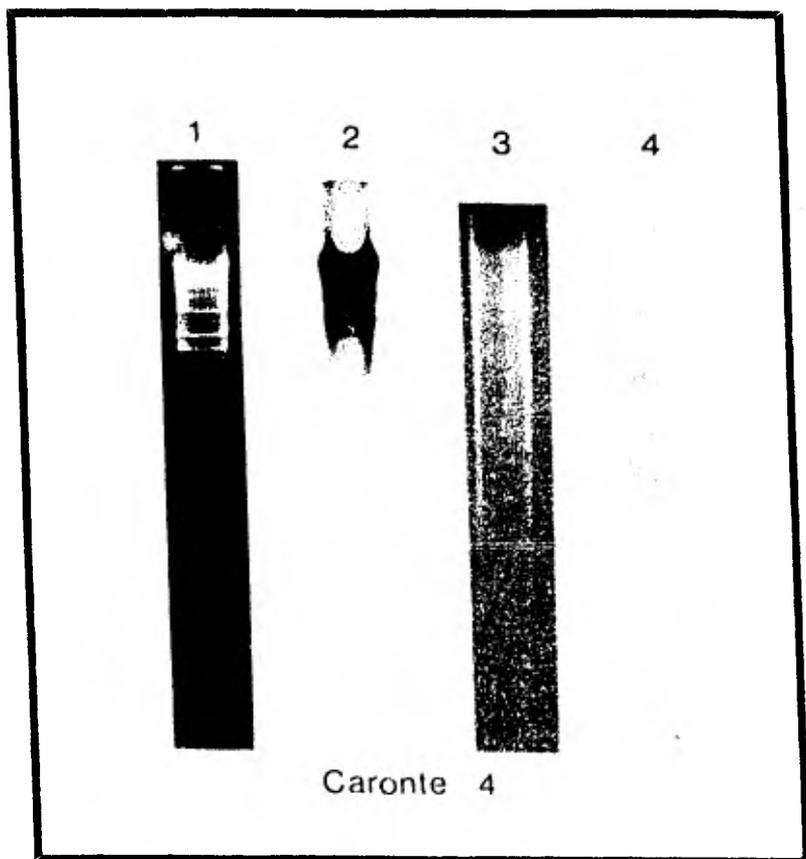


Fig. 1b2

7) LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
dATP	Deoxiadenosina Trifosfato
dTTP	Deoxitimidina Trifosfato
RNA	Acido Ribonucleico
RNA _m	RNA Mensajero
tRNA	RNA de Transferencia
DNA	Acido Desoxirribonucleico
cdNA	DNA Complementario a RNA _m
pb	Pares de Bases
Kpb o Kb	Kilo Pares de Bases o Kilobases
UV	Luz Ultravioleta
³² P	Isotopo Radiactivo de Fosforo
ufp	Unidades Formadoras de Placa
C-4	Bacteriófago Caronte 4
GS	Glutamino Sintetasa
Ap	Ampicilina
Sm	Streptomycin
Tc	Tetraciclina
Cm	Cloramfenicol
EI	Enfoque Isoeléctrico
sds	Dodecil Sulfato de Sodio