

Def  
2

*Universidad Nacional Autónoma de México*

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN  
DE NITRÓGENO**



**IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE  
ADN MEDIANTE UN METODO DE HIBRIDACION-  
TRADUCCION.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A**

**MARIA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO**

**MEXICO, D. F.**

**1981**



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.

## I N D I C E

	Pág.
Introducción	1
Objetivo	9
Métodos y Técnicas	12
Resultados	17
Discusión	21
Apéndice 1	26
Esquemas y Figuras	30
Bibliografía	40

## INTRODUCCION

Recientemente el lenguaje del genoma se ha vuelto asequible al conocimiento humano. En 1944 Avery reconoció que la información genética reside en la molécula de ADN. En 1953 Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura del ADN y un mecanismo mediante el cual la información genética puede ser replicada. En 1965 los datos combinados obtenidos por los grupos de Nirenberg, Khorana y Ochoa permitieron establecer el Código Genético y la universalidad de éste en los seres vivos.

En cuanto al código regulatorio, Pribnow, 10 años más tarde, reporta la semejanza que existe en la secuencia de los promotores de algunos fagos y procariotes, a partir de entonces se describieron las cajas de Goldberg-Hogness (promotores de eucariotes) y la secuencia de Shine-Dalgarno (para el reconocimiento ribosomal).

Con la posibilidad de aislar genes específicos se abrió el camino para escudriñar el genoma, así se descubrió un hecho sorprendente e inesperado: en la región estructural de algunos genes de eucariotes y de algunos genes de virus de animales se encuentran secuencias interruptoras (intrones) cuya información no se expresa ni en la proteína ni en el mensajero procesado. La primera indicación de la existencia de una estructura génica en mosaico se obtuvo de los genes 28S ribosomal de Drosophila melanogaster (Glover y Hogness, 1977; Wellauer y Dawid, 1977).

Se han reportado intrones en los genes de adenovirus

(Berget et al, 1977 y Chow et al, 1977), de las inmunoglobulinas de ratón (Brack y Tonegawa, 1977; Tonegawa et al, 1978), de las globinas (Jeffreys y Flavell, 1977; Tilghman, 1978), de la ovalbumina (Breathnach, 1977; Doel et al, 1977), de los ARN de transferencia de levadura (Goodman, 1977; Valenzuela et al, 1978) y en otros más.

Hasta el momento el significado funcional de las secuencias interruptoras parece ser diferente para cada caso, el ejemplo más sobresaliente es el de las inmunoglobulinas en el cual la existencia de un genoma separado en piezas V, J y C permite proponer un fascinante mecanismo para la generación de la variabilidad en estas moléculas (Brack et al, 1978).

La exploración del genoma y la posibilidad de manipularlo han atraído el interés de un número considerable de grupos de investigación, no sólo desde el punto de vista básico sino también aplicado (Bolívar, 1979).

La metodología para abordar el estudio directo del genoma consiste de una serie de procedimientos generales que podemos clasificar en las siguiente forma:

- 1) Clonación
- 2) Selección
- 3) Caracterización

#### Clonación

La obtención de una secuencia de ADN en cantidad adecuada para caracterizarla y secuenciarla se logra mediante la recombinación in vitro de la molécula en cuestión con

algún vehículo molecular que convenga, el cual después se introduce en una célula huésped para que se replique y amplifique el gene clonado hasta llegar a obtener en algunos casos hasta 2 000 copias de él por célula.

La generación de toda esta metodología tuvo como base el descubrimiento de una enzima (enzima de restricción) que hidroliza el ADN en una secuencia específica (Smith y Wilcox, 1970) y la utilización de enzimas que permiten unir covalentemente fragmentos de ADN de diferente origen (Cohen, 1973; Sgaramella, 1970, 1977).

Actualmente se cuenta con una enorme cantidad de enzimas de restricción que reconocen diferentes secuencias entre 4 y 6 pares de bases.

A partir de los vehículos naturales se han ido construyendo vehículos más adecuados para la clonación, los más utilizados son:

- Los plásmidos ColE1, pMB9, pBR322, etc.
- Los derivados del bacteriofago  $\lambda$ : carontes y los  $\lambda$ gt.

Los cósmidos (plásmidos que llevan los sitios cohesivos de  $\lambda$ ).

Los diferentes vehículos poseen diferentes características con respecto a:

- a) tamaño
- b) cantidad de material extraño que puede ser clonado.

c) los sitios de restricción que pueden ser utilizados para introducir los segmentos de ADN pasajero.

d) los marcadores que permiten la selección de células que hayan adquirido el vehículo.

e) el número de copias de vehículo que se obtienen por célula infectada.

Por otro lado, se utilizan células huésped que permitan la replicación adecuada de los vehículos, v. g., E. coli recombinación menos, restricción menos.

Dado el gran tamaño del genoma, el primer paso para la clonación es la generación de fragmentos de tamaño adecuado que se obtienen mediante rompimiento mecánico o por digestiones con enzimas de restricción, los cuales se unen después al vehículo con la enzima ligasa o con la transferasa terminal.

La introducción y estabilización del vehículo dentro de las células así como la selección de las células con ADN recombinante depende del sistema que se haya elegido:

a) Los plásmidos se introducen a las bacterias receptoras de E. coli en presencia de  $CaCl_2$  (Cohen, 1972) y así se transforman las bacterias en resistentes de acuerdo a la resistencia conferida por el plásmido.

b) el ADN de los fagos o de los cósmidos se ensambla in vitro en un proceso en el que se añaden "colas" y "cabezas" de la cápside del fago en presencia de una proteína, la proteína A que funciona durante el empacamiento del ADN de  $\lambda$  en la procápside (Becker y Gold, 1975, 1978), de esta forma se obtienen partículas que infectan eficientemen

te a la bacteria (sólo los fagos recombinantes son infecciosos). Las células que contienen a los cósmidos son seleccionadas por la resistencia codificada por la parte plasmídica del vector.

Para tener representado todo el genoma se requiere un número variable de clonas dependiendo del tamaño tanto del genoma como de los fragmentos clonados. Por ejemplo, si se tienen fragmentos de 14.1 kilopares de bases se necesitan 1437 colonias recombinantes para clonar el genoma de E. coli (Clarke y Carbon, 1976) y 10 000 para el de Neurospora (Krumlauf y Marzluf, 1980) con una probabilidad de 0.99 de encontrar cualquier gene.

#### Selección

Desde un principio es preferible construir bancos selectivos, esto ha sido posible con aquellos genes cuyo producto es muy abundante (los ribosomales, el de ovalbumina, inmunoglobulinas, globinas, insulina, etc.). A partir de ARN muy enriquecido en el mensajero del gene buscado se sintetiza el ADN complementario con la transcriptasa reversa. Los segmentos de ADN así obtenidos se utilizan para la construcción de bancos como se describió anteriormente. También estas moléculas se pueden utilizar como detectores para la selección de clonas a partir de bancos de genes nativos.

Algunas de las estrategias que se han seguido para la identificación de las secuencias clonadas son:

- a) complementación
- b) inmunodetección
- c) hibridación heteróloga

#### d) hibridación-traducción

##### Complementación

Si el ADN clonado en un vehículo puede expresarse y producir un producto activo dentro de la célula receptora entonces se puede identificar la clona del gene buscado usando células receptoras con las auxotrofías apropiadas y seleccionando aquellas células que hayan recuperado la función. Esta estrategia es muy recurrida en la selección de clonas recombinantes de procariotes (Carbon y --- Clarke, 1979).

No se puede predecir si un gene eucariote clonado se expresará en E. coli ya que no se puede tener ninguna indicación sobre el funcionamiento de su promotor o de sus señales regulatorias. Además, posiblemente no exista el procesamiento de mensajeros en E. coli que requerirían muchos mensajeros de eucariotes para ser traducidos. A pesar de los malos augurios se ha tenido éxito en la expresión de algunos genes clonados en E. coli: genes de levadura que participan en la biosíntesis de triptofano, de arginina, de leucina, de histidina (Clarke y Carbon, 1978; Struhl et al, 1976, 1977), el gene de la 5-deshidroquinato hidrolasa de N. crassa (Vapnek, 1977). Un método más promisorio para obtener la expresión de estas secuencias clonadas es transformar células de eucariotes, esto se ha logrado complementando auxotrofías de levadura (Hinnen et al, 1978; Hsiao y Carbon, 1979) y de Neurospora (Case et al, 1979).

## Inmunodetección

En esta estrategia no se pide que la proteína del ge ne clonado sea funcional o que esté completa, el reconoci miento es a nivel estructural. El ensayo puede ser tan -- sensible que permite detectar hasta una molécula de anti- geno por célula utilizando anticuerpos yodados (Broome y Gilbert, 1978 y Clarke et al, 1979).

## Hibridación con detectores heterólogos

Cuando el gene buscado ya se ha aislado de otra es- pecie se le puede utilizar como detector en la selección de clonas. Esto será exitoso siempre y cuando exista su- ficiente homología entre los genes de ambas especies. Así, con el gene de las actinas de Dictyostolium se aisló me- diante hibridación el gene de Drosophila (Tobin et al, 1980). Se espera que este método funcione cuando se tra- te de genes conservados o de especies cercanas.

## Hibridación-traducción

Este método es el más seguro pues no requiere la ex- presión del gene clonado ni la funcionalidad de su produc- to. Existen dos modalidades: la hibridación-traducción ne- gativa y la positiva.

La modalidad negativa consiste en hacer híbridos en- tre la secuencia problema y el mensajero y así impedir que este se traduzca ocasionando la desaparición de una banda de los productos totales de la traducción (Paterson et al, 1977; Hastie y Hold, 1978).

En la positiva se selecciona con el plásmido el men

sajero complementario y se traduce. Se identifica así una clona con su producto. Para lograr esto existen dos posibilidades:

- En determinadas condiciones de temperatura y concentraciones de formamida se puede propiciar la formación de "R-loops" (estructuras en las que el ARN se encuentra unido al ADN de doble cadena desplazando una porción de hebra de ADN idéntica al mensajero) los cuales se pueden separar de los mensajeros no complementarios por comatografía en columnas de agarosa A-150 m (100-200 mesh) o en columnas de urea-hidroxiapatita. Después el ARN se desnaturaliza del R-loop y se traduce (Weinand et al, 1979; Woolford et al, 1979; Thomas et al, 1976; Woolford y Rosbash, 1979 y Lewis et al, 1975).

- Otra forma es unir el ADN problema a diazobenziloximetil celulosa (covalentemente) o a nitrocelulosa, el mensajero complementario se unirá al ADN del filtro lo que permitirá separarlo de los demás. El mensajero específico se eluye y posteriormente se traduce (Noyes y Stark, 1975; Goldberg et al, 1979; Ricciardi et al, 1979; Harpold et al, 1978; Fyrberg et al, 1980 y Tobin et al, 1980).

#### Caracterización

La caracterización de la secuencia de interés incluye la delimitación del gen estructural, la secuenciación de las regiones críticas del gen, la microscopía electrónica de los híbridos mensajero (o ADN complementario) - gene nativo, la hibridación in situ para su localización

en el cromosoma (en los casos en los que se tienen cromosomas politénicos) y la evaluación de la funcionalidad del segmento (en este punto se puede introducir la mutación in vitro como un instrumento), sobre la funcionalidad de las secuencias clonadas un ejemplo muy particular es el del plásmido PLC544 que se comporta como un minicromosoma por llevar clonado un centrómero de levadura (Clarke y Carbon, 1980).

#### OBJETIVO

Los estudios que se han realizado en los grupos del Dr. J. Mora, del Dr. R. Palacios y del Dr. W. Hansberg sobre el metabolismo nitrogenado de un eucariote sencillo Neurospora crassa se han enfocado desde varios puntos de vista: fisiológico, genético y bioquímico.

Algunas de las contribuciones que se han realizado son:

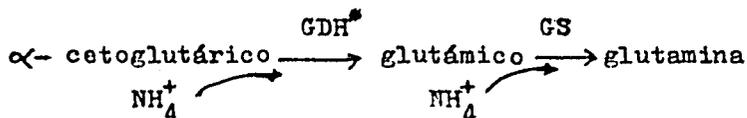
- Definir la regulación de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio dependiendo de la fuente nitrogenada y de la fuente de carbono y establecer el nivel al que se ajustan las diferentes actividades de las enzimas (concentración de proteína, síntesis, degradación o concentración de mensajero (Mora et al, 1980; Palacios et al, 1980).

- Aislar y caracterizar diferentes mutantes en las vías de asimilación (Mora et al, 1980; Palacios et al, 1980).

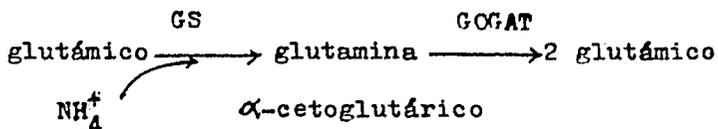
- Describir la existencia de la enzima Glutamato sintetasa (GGAT) en N. crassa (Hummel et y Mora 1980) y el fun

cionamiento de dos vías enzimáticas dependientes de la concentración de amonio así como establecer la participación de las diferentes formas oligoméricas de la Glutamino sintetasa (GS) en las distintas vías.

La vía en altas concentraciones de amonio es:



La vía en concentración limitante de amonio es:



\*GDH = glutamato deshidrogenasa

- Determinar que la enzima glutamino sintetasa está constituida por dos polipéptidos diferentes  $\alpha$  y  $\beta$  ambos con actividad enzimática (Sánchez et al, 1980).

- Establecer que los tetrámeros y octámeros de GS están constituidos principalmente por polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente (Dávila et al, 1980).

- Determinar las constantes de afinidad del tetrámero y del octámero de GS y establecer que la afinidad del tetrámero por sus sustratos (glutámico y amonio) es mayor (Guzmán y Mora, comunicación personal).

En este contexto surgen algunas preguntas:

- ¿existen secuencias regulatorias comunes para aqu

llos genes que se expresan concertadamente en una vía?

- ¿cuántos genes codifican para la GS, cuál es la relación entre ellos (comparten alguna secuencia los posibles distintos genes)?

- ¿cuáles son las características de estos genes, - existen secuencias interruptoras, hay arreglos génicos durante la diferenciación del hongo?

El camino para contestar estas preguntas señalaba hacia el genoma por lo que se diseñó un plan general (ver esquema 1) y se unieron los esfuerzos de un grupo de personas para abordar las diferentes partes del problema. Se estableció como base el aislar los genes de la glutamino sintetasa y de la deshidrogenasa glutámica.

El presente trabajo se sitúa en el plan general esbozado y su objetivo es establecer las condiciones para la selección de clonas mediante hibridación y traducción que consiste en identificar una secuencia específica por el producto que sintetice el mensajero que le sea complementario, de acuerdo al esquema No. 2.

Para establecer las condiciones se trabajó en un sistema modelo de ovalbumina utilizando: el plásmido pOV230 (pMB9 con un inserto de 1950 pares de bases conteniendo el ADNc de ovalbumina, McReynolds, 1977); el mensajero polia denilado de oviducto de gallina, ovalbumina y los anticuerpos antiovalbumina (generosamente proporcionados por M. A. Campomanes).

## MÉTODOS Y TÉCNICAS

### Obtención de los plásmidos

Se utilizaron los siguientes plásmidos: pOV230 y pBR322.

Se emplearon las cepas de E. coli: GM31/pBR322 (leu, his, Bl/Tc<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>) y RRL/pOV230 (pro, leu, thi, lacY, -- ara14, galD2, xyl5/Tc<sup>R</sup>, Amp<sup>S</sup>)<sup>\*\*</sup>.

Las bacterias se crecieron en medio de Luria y durante la fase logarítmica se amplificaron los plásmidos utilizando cloramfenicol. Las células se trataron con lisozima, con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), con ribonucleasa y con tritón. El sobrenadante "lisado claro" (Betlach, 1976) se extrajo con fenol-cloroformo, una o dos veces y posteriormente se cromatografió en agarosa (Bio-gel) 100-200 mesh, para separar el plásmido del ADN cromosomal.

El plásmido se purificó a través de un gradiente de cloruro de cesio con yoduro de propidio. Para eliminar el yoduro de propidio el ADN se cromatografió en Dowex AG-50W X8. La solución con el plásmido se dializó, se precipitó, se resuspendió en Tris-EDTA y se guardó a -20°C.

---

\* X<sup>R</sup> = resistente a X

X<sup>S</sup> = sensible a X

Tc = tetraciclina

Amp = ampicilina

\*\* Se recuperó la cepa conteniendo el pOV230 mediante transformación (Cohen, 1972).

### Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN en urea, con xylen cyanol y azul de bromofenol como marcadores, se corrieron en geles de agarosa (Bio-Rad) al 0.8% en Tris (hidroximetil) aminometano, EDTA y ácido bórico pH 8.2, a 150 V. Los geles se tñieron con bromuro de etidio durante unos minutos y el ADN se observó con luz ultravioleta.

### Aislamiento del Mensajero Poliadenilado

La cepa silvestre de Neurospora crassa 74A se creció en medio líquido Vogel (Medio Mínimo = MM) o en Vogel sin nitrógeno con glutámico-5mM (glut-SN) durante 12 horas. El micelio se colectó por filtración y se lavó con H<sub>2</sub>O estéril.

Para aislar polisomas se siguió con algunas modificaciones la técnica reportada por Sánchez et al (1980) la cual fue descrita originalmente para aislar polisomas de hojas de planta (Gray y Cashmore, 1976). El micelio se homogeneizó y al sobrenadante se le añadió una mezcla de detergentes (Nonidet P-4 y desoxicolato). Los polisomas se precipitaron ultracentrifugando a 27 000 rpm en el rotor SW27 durante 90 minutos. La preparación polisomal se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se precipitó con NaCl-etanol y el precipitado se lavó con cloruro de litio.

El ARN se cromatografió en una columna de oligodesoxitimidilato (oligo dT), el ARN poliadenilado se eluyó con una solución de baja fuerza iónica, se precipitó, se

resuspendió en agua y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Preparación del ADN

Todos los plásmidos se linearizaron incubando entre una y tres horas con la enzima Hind III (BRL) a  $37^{\circ}\text{C}$  (Boivar et al, 1977). Después se trataron con proteinasa K (Merck) a 1 mg/ml en Tris 0.5 M pH 7.5, SDS 1% y EDTA 10 mM; se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron y se resuspendieron en Tris-EDTA.

El ADN de los plásmidos se desnaturalizó hirviendo en aceite a  $100^{\circ}\text{C}$  o añadiéndole NaOH 1N en SSC 6X (NaCl 0.9 M y citrato de sodio 0.09 M).

#### Preparación de los filtros

Distintas concentraciones de ADN desnaturalizado se pipetearon sobre filtros Schleicher y Schuell BA-85-R597 de 0.55 de diámetro (Kafatos et al, 1979). Cuando se utilizaron soluciones con NaOH, los filtros se neutralizaron lavándolos con SSC 6X. Los filtros se hornearon al vacío a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. Posteriormente, se lavaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. en una solución igual a la que se utilizará después para eluir el ARN, posteriormente se enjuagaron en una solución de composición idéntica a la empleada en la hibridación pero sin ARN.

En la Fig. 1 la flecha señala un filtro conteniendo 6.6  $\mu\text{g}$  de pOV230 y teñido con bromuro de etidio.

#### Hibridación

Se utilizó formamida (Eastman) conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  -

después de desionizarla durante una hora agitando con la resina AG-501-X9 (20-50 mesh) de Bio-Rad. Los filtros se incubaron con la mezcla de hibridación en tubos Eppendorf de 1.5 ml durante diferentes tiempos y distintas temperaturas.

100  $\mu$ l de mezcla se prepararon con: 10  $\mu$ l de Pipes 1 M pH 7.2, 10  $\mu$ l de NaCl 5M, 4  $\mu$ l de EDTA 0.25 M, 30-50  $\mu$ l de formamida, 5-15  $\mu$ g de ARN poliadenilado de diferentes orígenes y H<sub>2</sub>O (todo estéril y filtrado en Millex GS.22  $\mu$ ). Para eliminar la estructura secundaria del ARN, éste se calentó a 80°C durante 45 seg antes de la hibridación.

Después de la hibridación los filtros se pasaron a otros tubos y se lavaron diez veces con la mezcla de hibridación sin ARN agitando cada vez. Después de esto, los filtros se cambiaron a tubos conteniendo 200  $\mu$ l de formamida, 2  $\mu$ l de Tris 1 M pH 7.8 y 10  $\mu$ g de tRNA de levadura y se calentaron a 65°C durante 5 min para disociar los híbridos ARN-ADN. El filtro se retiró del tubo, el eluido se centrifugó 3 minutos en la microfuga y se precipitó añadiendo 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M pH 5.5 y 2.5 volúmenes de etanol. Después de 12 hrs a -20°C ó 2 hrs a -20°C y 15 min a -70°C, se centrifugaron 7 min a 4°C en la microfuga y se lavaron los precipitados 3 a 5 veces con etanol al 70%. El ARN se secó al vacío, se re-suspendió en 1.66  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se tradujo.

#### Traducción

Se utilizó un lisado de reticulocitos para la tradue-

ción in vitro del ARN (Quinto et al, 1977), haciéndolo de pendiente de mensajero exógeno mediante el tratamiento con nucleasa de micrococo en presencia de calcio (Pelham y Jackson, 1976).

Los mensajeros se calentaron a 80°C durante 45 seg y posteriormente se tradujeron en presencia de etilenglicol-bis (2-aminoetil-éster) N-N ácido tetracético (EGTA) utilizando metionina S<sup>35</sup> de New England Nuclear (400 Ci/mmol) o de Amersham (780 Ci/mmol) a una concentración final de 1.25 m Ci/ml. El volumen del ensayo de traducción se redujo tres veces con el fin de tener una más alta concentración de los mensajeros eluidos de los filtros.

#### Cuantificación de la incorporación

Alícuotas del lisado de traducción se incubaron con NaOH 0.3 N. La proteína se precipitó con TCA al 10% y se recuperó filtrando a través de fibra de vidrio. Los filtros secos se contaron en líquido de centelleo en el canal de carbono. Los datos de estas cuantificaciones no se muestran en el trabajo.

#### Inmunoprecipitación directa

A una alícuota obtenida de la traducción se le añadió metionina, desoxicolato, tritón y H<sub>2</sub>O, se centrifugó y el sobrenadante se incubó con anticuerpos antiovalbumina obtenidos en cabra o con anticuerpos antiglutamino sintetasa - obtenidos en conejo (Palacios, 1976) en presencia del acarreador frío respectivo, ovalbumina o glutamino sintetasa.

Se separaron los inmunoprecipitados centrifugando a través

de un gradiente discontinuo de sacarosa (Palacios et al, — 1977).

### Electroforesis

El inmunoprecipitado o el lisado de la traducción -- (2.5-7  $\mu$ l) en dodecilsulfato de sodio (SDS) - urea-mercapto etanol se corrieron en geles discontinuos de acrilamida -- (5-10%) utilizando el sistema de Laemmli (1970) en presencia de SDS y urea 7M.

Los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250 en metanol y ácido acético y se trataron para fluorografía con dimetilsulfoxido (DMSO) y DMSO-PPO (Bonner y Laskey, 1974). Se utilizaron placas para rayos X Kodak X-O MAT con tiempos de exposición variables.

Se hicieron barridos de las placas de fluorografía midiendo la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro — Gilford 250.

## RESULTADOS

### Evaluación de la sensibilidad de la traducción

Se tradujeron mezclas conteniendo diferentes concentraciones de mensajero poliadenilado de oviducto y 500 ng de mensajero de Neurospora. Los productos totales de la traducción y los inmunoprecipitados obtenidos con anticuerpos antiovalbumina se muestran en la fluorografía de la Fig. 2. En el carril 8 se observa la ovalbumina sintetizada a partir de una mezcla en la que su mensajero se encontraba al 1%. En el carril 9, se observa el inmunoprecipitado obtenido con —

anticuerpos anti-glutamino sintetasa de una traducción con 500 ng de mensajero de Neurospora, comparando esta banda - con las de los inmunoprecipitados de ovalbumina se podría pensar que el mensajero de glutamino sintetasa se encuentra en una proporción alrededor del 1%, si se asume una igual - eficiencia de traducción de los mensajeros y también igual eficiencia en las inmunoprecipitaciones.

La placa de la Fig. 2 se obtuvo después de 18 hrs de exposición de la fluorografía, lo que hace más favorables estos resultados, pues se esperaría que con una concentración aún menor de mensajero se obtuviera una banda visible, si se aumentara el tiempo de exposición.

#### Sistema Modelo de Ovalbumina

Se utilizó el plásmido pOV230, Fig. 3, que contiene el gene estructural de ovalbumina. Después de algunos intentos se tuvo éxito en seleccionar mediante hibridación con este plásmido, el mensajero de ovalbumina a partir de una mezcla de mensajeros de N. crassa y de ovalbumina. Estos resultados se muestran en la Fig. 4, en el carril 7 se señala con una flecha el producto obtenido al traducir el mensajero - seleccionado con el pOV230, este producto coincide con la ovalbumina que se sintetizó con el mensajero de oviducto - (carriles 2 y 3). En el carril 6 se observan los productos de los mensajeros eluidos de un filtro que no fue lavado - (ver Materiales y Métodos) y se aprecia una banda adicional que corresponde al pegado inespecífico del mensajero más concentrado de Neurospora (ver carril 4). En el primer carril se observan los polipéptidos sintetizados por los -

mensajeros de la mezcla en la que se incubaron los filtros y de la cual se seleccionó el mensajero de ovalbumina que estaba al 5.72%. En el quinto carril se observa la banda que se obtiene al añadir sólo  $H_2O$  al ensayo de traducción.

Según la absorbancia a 560 nm de las bandas de la fluorografía que corresponden a la ovalbumina sintetizada, se tiene como máximo una recuperación del 7% del mensajero de ovalbumina. Para aumentar la recuperación se probaron diferentes condiciones de hibridación, variando la temperatura, la concentración de formamida, los tiempos de incubación, las concentraciones de ADN y de ARN y hasta la forma de preparar los filtros.

En la Fig. 5 se muestran los resultados de un experimento en el que se cambiaron algunas de las variables. En la Fig. 6 se analizan los resultados obtenidos de la cuantificación de las bandas que corresponden a ovalbumina en la fluorografía, en la parte A se comparan los diferentes tiempos de hibridación a  $50^{\circ}C$  y 50% de formamida; en la parte B se observan los resultados obtenidos variando la concentración de formamida a  $50^{\circ}C$  y con 2 horas de hibridación; en la parte C se muestran los efectos de diferentes concentraciones de ADN en los filtros en hibridaciones a  $50^{\circ}C$  con 50% de formamida durante 2 horas; en la parte D se compara I) la hibridación a  $37^{\circ}C$  durante 18 horas con II) la hibridación a  $50^{\circ}C$  durante 2 horas, ambas a 50% de formamida. En este experimento se utilizó como control negativo un filtro con  $10 \mu g$  de pBR322. Se decidió combinar aquellas condiciones con las que se obtuvo un aumento con

respecto a la condición original, así se determinó hibridar a 37°C con 30% de formamida durante 18 horas.

Se diseñó otro experimento basándose en los datos obtenidos anteriormente e introduciendo algunas recomendaciones hechas por F. Sánchez. Se hibridizó a 37°C con 35% de formamida variando los tiempos de hibridación en unos casos y en otros la forma de desnaturalizar el ADN o la concentración de ADN por filtro. También se ensayó la prehibridación con ARN de transferencia de levadura (0.5 µg/ml) durante las 6 horas previas a la hibridación.

En la Fig. 7 se muestran los resultados obtenidos y en la Fig. 8 se analizan los datos del barrido de la fluorografía. En la cinética de hibridación se observa que el tiempo óptimo se encuentra alrededor de las 18 horas, por debajo de este óptimo están los valores obtenidos al variar la forma de desnaturalizar el ADN y al emplear una concentración mayor de ARN. También se observa que no se logra aumentar la recuperación ni tener más limpios los filtros al prehibridar. De nuevo se vuelve a observar que la concentración de ADN es limitante en la reacción de hibridación. En estos experimentos se encontró que la banda que corresponde al mensajero más concentrado de Neurospora no se eliminó al lavar los filtros, esto se pudiera explicar por el hecho de haber utilizado condiciones muy laxas de hibridación y lavado, ya que se combinó una baja temperatura con una baja concentración de formamida, esto posiblemente permitió que las colas de poli A de los mensajeros se unieran y no se eluyeran de las secuencias de poli T (alrededor de 100 pb)

que tiene el pOV230 para unir el ADNc con el vehículo. Este problema lo habíamos previsto desde un principio pero se decidió no utilizar poli A<sup>+</sup> comercial para saturar las colas de poli T, pues los plásmidos y fagos recombinantes de los bancos de ADN de Neurospora, que se utilizarían posteriormente, no contiene colas de poli T.

Para evaluar la posibilidad de utilizar mezclas de --ADNs en los filtros y determinar la mínima cantidad de ADN específico que se necesita, lo cual es crítico para establecer las condiciones para un "screening" de las clonas recombinantes, se prepararon filtros con diferentes proporciones de pOV230 y pBR322. También se probaron diferentes concentraciones de ARN.

La fluorografía se muestra en la Fig. 9 y los datos obtenidos se graficaron en la Fig. 10. Se observó de nuevo que la hibridación depende de la concentración de ADN; se encontró un límite, situado entre 1 y 3.3 µg de ADN, abajo del cual, en estas condiciones, ya no se obtienen productos de traducción. Con 30 µg de pOV230 se obtiene una banda de intensidad menor que con 15 µg. En estos experimentos también se volvió a tener un efecto negativo con una mayor concentración de ARN.

#### DISCUSION

Casi simultáneamente se emprendieron diferentes caminos para resolver el problema de la selección de las clonas recombinantes de ADN que llevaran los genes de glutamino sintetasa y de la deshidrogenasa glutámico de N. crassa. Se es

cogió la hibridación traducción como una alternativa muy factible dado que no se requiere la expresión de la información ni la existencia de homología con los genes de otras especies.

Además era indispensable contar con la técnica de hibridación-traducción no sólo para seleccionar clonas de bancos sino también y más importantemente, para asegurarse que una clona tiene la información que se presume que lleva.

Dentro de las posibilidades para hibridar y seleccionar un mensajero se escogió aquella en la que el ADN se fija a nitrocelulosa, esta opción también había sido elegida en otros laboratorios (J. Seidman, F. Sánchez y E. Calva curso de Cold Spring Harbor , comunicaciones personales).

El haber podido disponer de un sistema modelo como el de la ovalbumina fue una enorme ventaja para establecer las condiciones. En el Apéndice I se describe en detalle toda la técnica tal como se estableció en este trabajo de tesis.

Una vez que se ha tenido éxito con el sistema de ovalbumina, se intentará probar algunas de las clonas de los bancos de ADN y ADNo de N. crassa construidos en fagos Caronte y en el pBR322, respectivamente, así como la hibridación heteróloga utilizando el plásmido pACR-34 que lleva clonado el gene de la glutamino sintetasa de E. coli (Covarrubias et al, 1980) y el pRSP-5 que lleva el gene de la deshidrogenasa glutámica también de E. coli (Sánchez P. et al, datos no publicados).

Un problema que se presenta con los fagos recombinantes es que la proporción de ADN específico con respecto al ADN total (vehículo y demás material pasajero) es menor que la

proporción entre el gene de ovalbumina y el pOV230. Un  $\mu\text{g}$  de pOV230 significa 0.23  $\mu\text{g}$  de gene de ovalbumina, un  $\mu\text{g}$  de pBR322-ADNc de Neurospora llevaría aproximadamente -- 0.17  $\mu\text{g}$  de un gene cuya proteína fuera de 50 000 de peso molecular, por otro lado un  $\mu\text{g}$  de fago recombinante tendría 0.022  $\mu\text{g}$  de un gene cuya proteína también fuera de 50 000. Por esto se propone que se utilice una mayor concentración de ADN de fagos recombinantes. Además, para resolver este problema se podrían eliminar los brazos de los Carontes que representan un 66% del ADN total del fago. Esto sería importante para un "screening" de las clonas recombinantes y se lograría digiriendo grupos de 10 fagos diferentes con EcoRI (que corta entre los insertos y los brazos del fago) e hibridando en condiciones en las que sólo los brazos (que estarían diez veces más concentrados que cualquier secuencia del inserto) se reasocian, posteriormente se separarían mediante hidroxapatita.

Dentro de las metas de este grupo de investigación el aislamiento de los genes de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio sigue teniendo un lugar prioritario. En este momento se replantean las estrategias y aparecen nuevas posibilidades: transformar con bancos de ADN de Neurospora a levadura o aislar los genes de otros sistemas en los que los productos sean abundantes.

Por otro lado, parece cercano el aislar el gene de la deshidrogenasa glutámica de N. crassa a partir de bancos

de fagos Caronte utilizando el pRSP-5\* o el pSAE-4\*\* como detectores en la hibridación en placas de lisis. Para realizar esto, es necesario primero determinar si realmente estos plásmidos hibridan con los genes de la deshidrogenasa glutámica de N. crassa o si la hibridación se debe a algún otro gene de E. coli del pRSP-5 y del pSAE-4. Aquí la hibridación-traducción sería una herramienta pues permitiría verificar si el producto sintetizado por el mensajero de Neurospora complementario a estos plásmidos corresponde con la deshidrogenasa glutámica de N. crassa.

Finalmente es muy útil contar con la hibridación-traducción para comprobar la información que llevara una clona aunque fuera seleccionada siguiendo algún otro camino alternativo como la transformación de N. crassa o de levadura o la hibridación heteróloga.

In Addendum, con respecto a las otras estrategias emprendidas para identificar clonas se han tenido los siguientes avances:

- Se exploró la hibridación heteróloga en experimentos

---

\* El pRSP-5 lleva además del gene de la deshidrogenasa glutámica, un segmento de cromosoma en el que pudieran haber otros genes.

\*\* El pSAE-4 es un derivado del pRSP-5 con un inserto menor que también lleva el gene de GDH de E. coli.

tipo Southern, en los que el ADN total de Neurospora se hibridó con los plásmidos pRSP-5 y pACR-34 marcados in vitro con  $P^{32}$  y se encontró que posiblemente el pRSP-5 hibrida con el ADN de Neurospora, mientras que el pACR-34 no. Para aumentar las posibilidades de hibridación con el pACR-34 se ha pensado en segmentar el gene de GS de E. coli, (recortando la banda y digiriéndola posteriormente con enzimas de restricción) y marcar los diferentes segmentos con  $P^{32}$ , los cuales se utilizarían separadamente en la hibridación; esto bajo la hipótesis de que alguna secuencia del gene de N. crassa sea semejante al de E. coli.

- En cuanto a la transformación muy recientemente se ha logrado tener la complementación de una auxotrofia de Neurospora (leu-2) con una frecuencia dos veces mayor que de reversión de la mutante (G. Dávila, comunicación personal). Para aumentar la frecuencia de transformación se ha pensado -- construir un vehículo que lleve alguna secuencia de Neurospora que establezca al plásmido, por ejemplo, se podrían clonar los genes 5S ribosomal de N. crassa.

## APENDICE 1

### Linearizar plásmidos:

- Incubar el plásmido con una enzima de restricción (que reconozca un sólo sitio en el plásmido) a 37°C durante un tiempo adecuado.

- Extraer el ADN 2 veces con un vol de fenol-cloroforno y una vez con un vol de cloroforno. Centrifugar entre cada extracción 4 min en la microfuga y precipitar el ADN con 1/25 NaCl 5M y 2 vols de etanol a -20°C durante 12 horas.

- El precipitado seco se resuspende en H<sub>2</sub>O y se le añade un vol de una solución para tener finalmente:

1 mg/ml de proteinasa K

1% SDS

0.05M Tris pH 7.5

10 mM EDTA

- El ADN se extrae con fenol igual que antes, se precipita y se resuspende en Tris 10 mM, EDTA 1mM (pH 8).

- El ADN de los fagos se trata con proteinasa K igual que los plásmidos.

### Preparar filtros:

- Coger los filtros con pinzas estériles y usar guantes.

- Marcar círculos con un diámetro de 0.55 cm en el filtro Schleicher y Schuell BA-85-R597.

- Añadir a las soluciones de ADN 1/10 de NaOH IN SSC 6X.

- Pipetear estas soluciones en los filtros y dejarlos secar.

- Lavar los filtros con suficiente SSC 6X hasta neutralizarlos.

- Hornear 4 horas a 80°C al vacío.

#### Híbridación

- Usar soluciones estériles y filtradas a través de Millex GS (.22  $\mu$ ).

- Utilizar formamida (Eastman) filtrada y conservada a -70°C después de desionizarla durante una hora agitando con la resina AG-501-X9 (20-50 mesh) de Bio-Rad.

- Cortar los círculos de los filtros.

- Lavarlos en 200  $\mu$ l de formamida (desionizada y filtrada), 2  $\mu$ l de Tris 1M pH 7.8 a 65°C durante 30 min.

- Enjuagar los filtros en una solución de formamida 35%, Pipes 0.1 M (pH 7.2), NaCl 0.5 M y EDTA 10 mM.

- Pasar los filtros (3-5 filtros/tubo) a tubos conteniendo 100  $\mu$ l de una mezcla que lleva:

35  $\mu$ l de formamida

10  $\mu$ l de Pipes 1 M pH 7.2

10  $\mu$ l de NaCl 5 M

4  $\mu$ l de EDTA 0.25 M

6  $\mu$ l de ARN (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) poliadenilado de diferentes orígenes

35  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

- Incubar 18 horas a 37°C.
- Después de la incubación pasar los filtros individualmente a tubos que contengan un ml de la solución de hibridación (descrita anteriormente) sin ARN.
- Agitar en vortex e incubar 5 minutos a 37°C.
- Succionar el líquido y añadir un ml de la misma solución, agitar en vortex y volver a incubar 5 - minutos. Repetir esta operación 9 veces más.
- Pasar cada filtro a otro tubo con 200  $\mu$ l de formamida y 2  $\mu$ l de Tris 1M pH 7.8 y 10  $\mu$ g de tRNA - de levadura (previamente extraído con fenol).
- Incubar 5 min a 65°C, agitar rápidamente en - vortex y sacar el filtro.
- Centrifugar el eluido 5 min en microfuga y pasar el líquido a otro tubo.
- Precipitar el eluido añadiendo:
  - 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
  - 20  $\mu$ l de acetato de sodio 2M pH 5.5
  - 2,5 vols de etanol
- Guardar a -20°C - 12 hrs ó  
2 hrs a -20°C  
seguidas de 15 min a -70°C
- Centrifugar 5 min a 4°C en la microfuga, lavar los precipitados 3 a 5 veces con etanol al 70%.

- Resuspender el ARN en 1.66  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y traducir añadiendo 6.6  $\mu$ l de lisado de reticulocitos. Se recupera el 10% del mensajero original.

## ESQUEMA I

## CONSTRUCCION DE BANCOS

Plásmidos y fagos con ADN de N. crassa

Plásmidos con ADNc de N. crassa



IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS

- a) Transformación-complementación
- b) Hibridación y traducción
- c) Hibridación con detectores heterólogos  
(genes de deshidrogenasa glutámica y  
glutamino sintetasa de E. coli)

## ESQUEMA II

## METODO UTILIZADO PARA LA HIBRIDACION-TRADUCCION

1. Absorber el ADN problema a un filtro de nitrocelulosa

2. Incubar el ADN con una mezcla de mensajeros

3. Seleccionar por hibridación el mensajero complementario

4. Eliminar los mensajeros que no formen híbridos

5. Eluir el RNA del filtro

6. Traducir el RNA in vitro

7. Analizar los productos en electroforesis

8. Hacer fluorografía

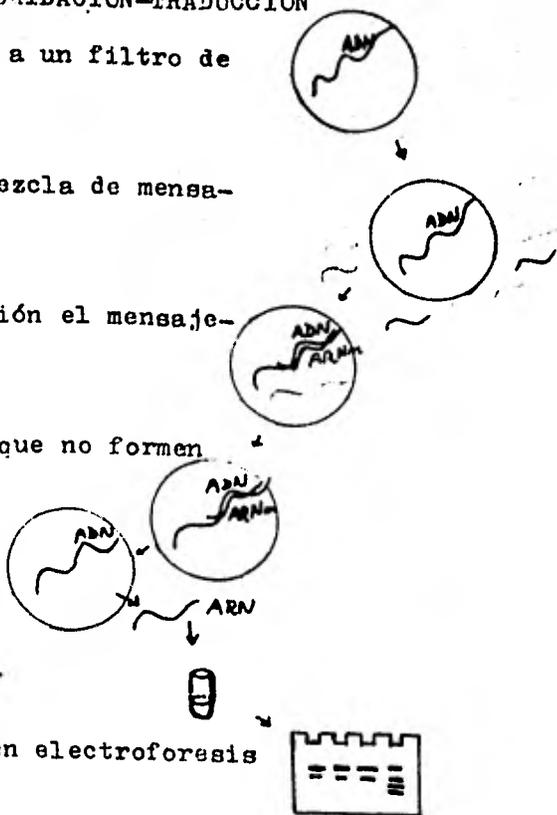


FIG 1

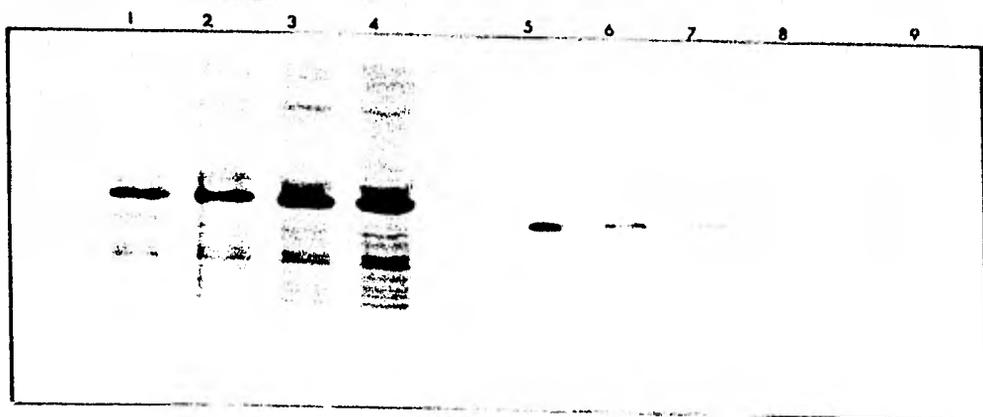


FIG 2



FIG 3

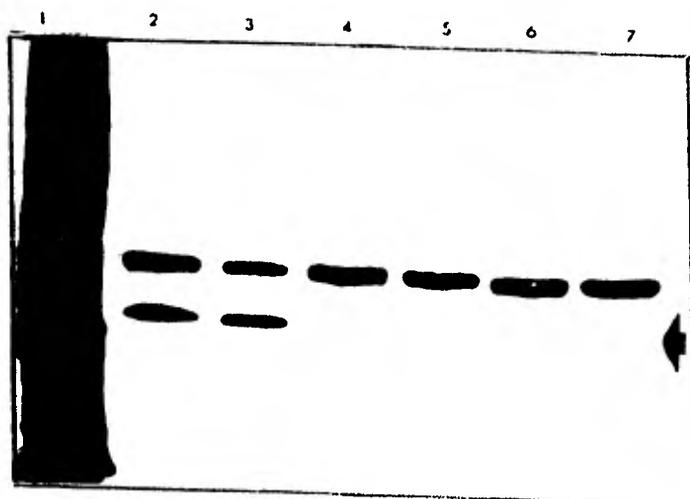


FIG 4

Fig. 1 Un filtro de nitrocelulosa con bromuro de etidio. La flecha señala el círculo fluorescente de pOV230 (6.6  $\mu$ g).

Fig. 2 Fluorografía de los productos totales de la traducción y de los inmunoprecipitados obtenidos con anticuerpos antiovalbumina y anti-glutamino sintetasas. Traducciones con 500 ng de ARNm de Neurospora y distintas concentraciones de ARNm de oviducto. 1) 100 ng de ARNm de oviducto; 2) 50 ng idem; 3) 25 ng idem; 4) 10 ng idem; 5) inmunoprecipitado de ovalbumina IPP-OV de 1); 6) IPP-OV de 2); 7) IPP-OV de 3); 8) IPP-OV de 4); 9) inmunoprecipitado de glutamino sintetasa de una traducción con 500 ng de ARNm de Neurospora.

Fig. 3 Gel de Agarosa con bromuro de etidio con 1  $\mu$ g de pOV230 después de linearizarlo con Hind III.

Fig. 4 Fluorografía de los productos traducidos con: - 1) 2.6  $\mu$ g de ARNm de N. crassa y 0.3  $\mu$ g de ARNm de oviducto; 2) 0.6  $\mu$ g de ARNm de oviducto; 3) idem; 4) 1/100 de 1); 5) H<sub>2</sub>O; 6) ARNm eluido de un filtro (pOV230) no lavado; 7) ARNm eluido de un filtro (pOV230) lavado.

Los filtros se prepararon con 6.6  $\mu$ g de pOV230, de aquí en adelante esta cantidad se designa como ADN IX. En la hibridación se utilizó una mezcla (100  $\mu$ l) conteniendo 5.2  $\mu$ g de mensajero poliadenilado de Neurospora y 0.6  $\mu$ g de mensajero de oviducto, esta concentración se designa como ARN IX en los experimentos siguientes. Tiempo de exposición de la placa: 6 días.

CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
FORMAMIDA %	50	30	50	50	50	50	50	40	30	50	50	50		
ADAJ	pBR322 10 $\mu$ g	pBR322 10 $\mu$ g	pOV 1X	pOV 25X	pOV 0.5X	pOV 1X								
ARN	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	3X		
TIEMPO (HIBRIDACION HRS)	2	2	18	18	4	1	2	2	2	2	2	2		
TEMPERATURA °C	50	50	37	37	50	50	50	50	50	50	50	50	H <sub>2</sub> O	ARN <sub>m</sub> OV



FIG 5

Electroforesis de los productos de traducción obtenidos con mensajeros clínicos de filaxia (condiciones de hibridación indicadas arriba, carriles 1 - 12); con el mensajero de extracto -- pBR322 (carril 14) -- con H<sub>2</sub>O (carril 13). Tiempos de exposición: 5-15 min.

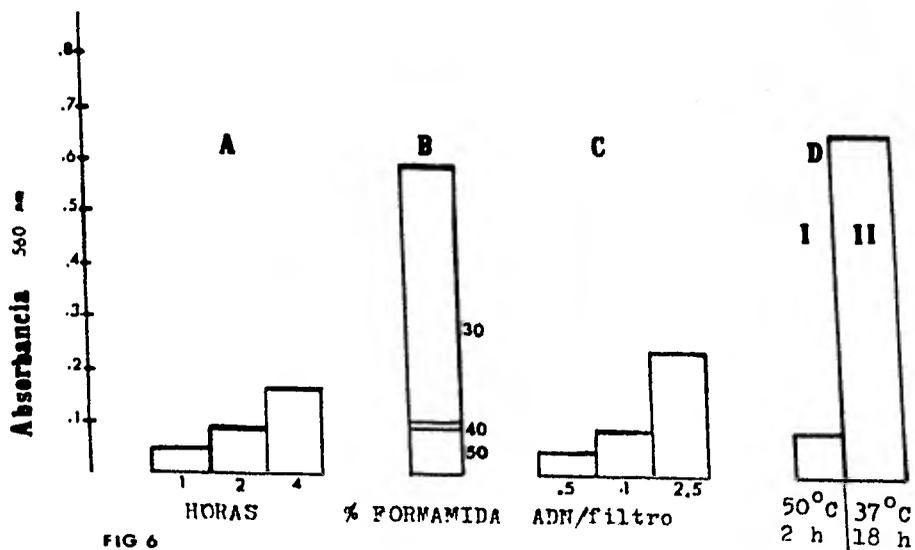


FIG 6

Gráfica de las absorbancias a 560 nm de las bandas de ovalbumina de la fluorografía de la Fig. 5. La escala de absorbancia es arbitraria. Se comparan algunas diferentes condiciones de hibridación:

A. horas; B. concentración de formamida; C. concentración de ADN; D. I) 50°C, 2 horas y II) 37°C, 18 horas.



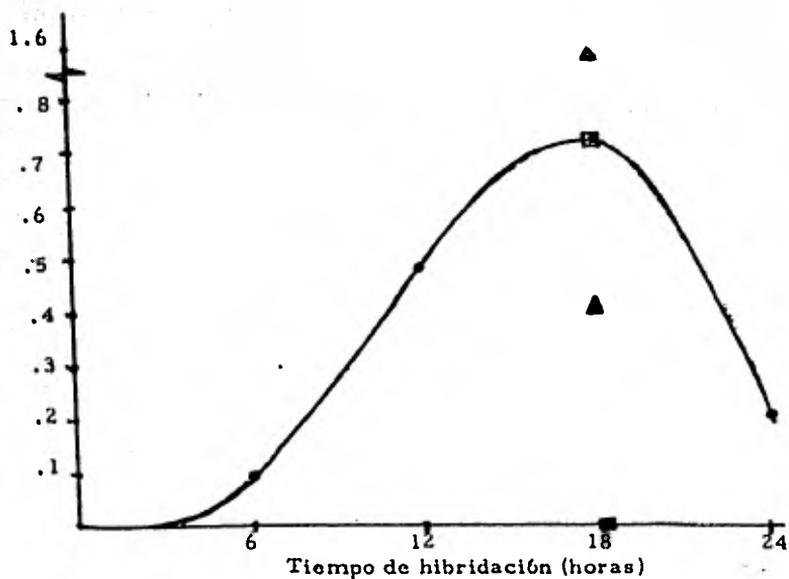


FIG 8

Gráfica de las absorbancias a 560 nm de fluorografía de la Fig. 7 ▲ ADN hervido, ■ filtro pBR322, □ filtro prehibridado, ● cinética (6, 12, 18 y 24 horas de hibridación) con 1X ADN, 1X ARN.

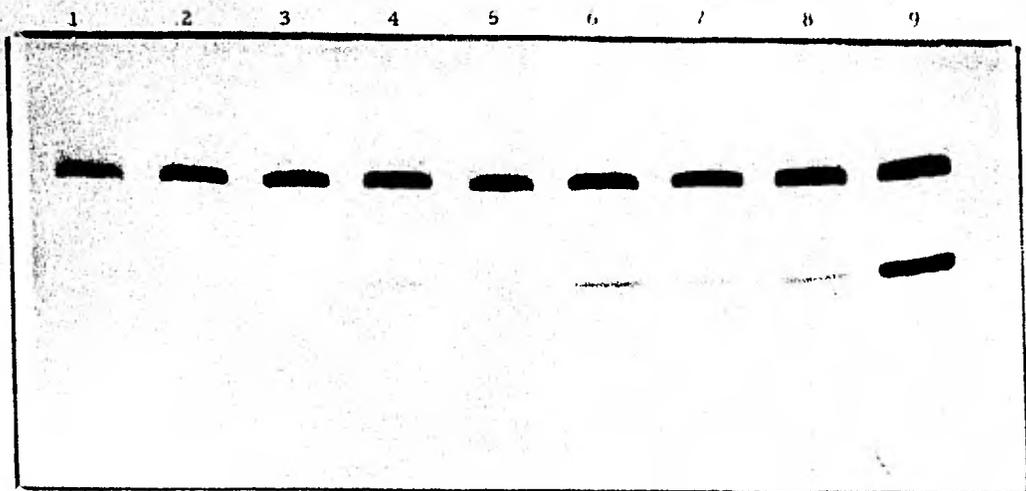


FIG. 9

Microautoradiografía de los productos de la reacción obtenidos por separación de los fluidos de filtración de un cultivo de células reactivas infectadas con el virus de NY 249 y células de NY 14. — 1) NY 14; 2) NY 14, células de NY 14; 3) idem con 2X APNa 4) NY 14, células de NY 14; 5) idem con 2X APNa; 6) NY 14; 7) idem con 2X APNa; 8) idem con 2X APNa de APNa de producto (carril 9). Ver texto. Tiempo de exposición 2.5 días.

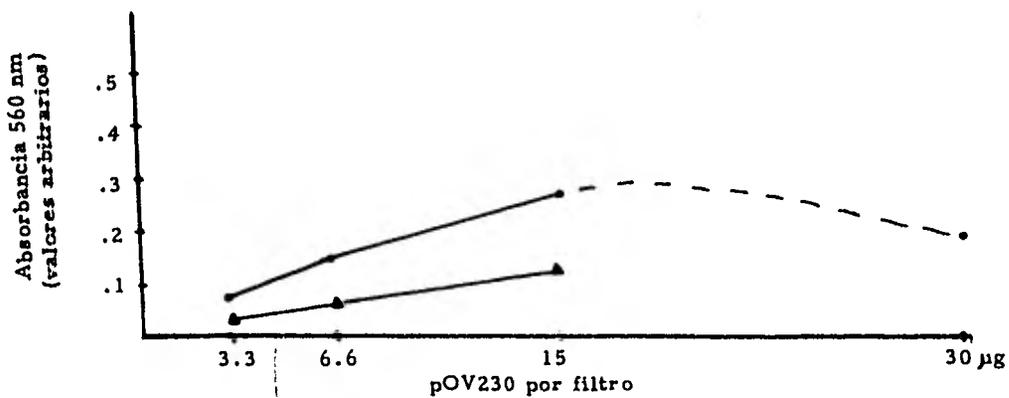


FIG 10

Gráfica de absorbancias a 560 nm de la fluorografía de la Fig. 9 • 1X ARN y  $\Delta$  2X ARN.

## BIBLIOGRAFIA

1. Avery, O. T., Macleod, C. M. y McCarty, M., J. Exp. Med., 79: 137-158 (1944).
2. Becker, A. y Gold, M., Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 581-585 (1975).
3. Becker, A. y Gold, M., Proc. Nat. Acad. Sci., 75: 4199-4203 (1978).
4. Berget, S. M., Moore, C. y Sharp, P. A., Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 3171-3175 (1977).
5. Betlach, M. C., Hearschfield, V., Chow, L., Brow, W., Goodman, H. M. y Boyer, H. W., Fed. Proc., 35: 2037-2043 (1976).
6. Blattner, F. R., Science, 196: 161-169 (1977).
7. Blumenthal, K. M. y Smith, E. L., J. Biol. Chem., 248: 6002-6008 (1973).
8. Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Croasa, J. y Falkow, S., Gene, 2: 95-113 (1977).
9. Bolivar, F., Naturaleza, 10: 23-32 (1979).
10. Bonner, W. M. y Laskey, R. A., Eur. J. Biochem., 46: 83-88 (1974).
11. Brack, C., HIRAMA, M., Lenhard-Schuller, R. y Tonegawa, S., Cell, 15: 1-14 (1978).
12. Brack, S. y Tonegawa, S., Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 5652-5656 (1977).

13. Breathnach, R., Mandel, J. L. y Chambon, P., *Nature*, 270: 314-319 (1977).
14. Brimacombe, R., Truping, J., Nirenberg, M., Leder, P., Bernfield, M. y Jaouni, T., *Biochem.*, 54: 954-960 - (1965).
15. Broome, S. y Gilbert, W., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 2746-2749 (1978).
16. Carbon, J. y Clarke, L., *Meth in Enzymol.*, 68: 396-408 Academic Press, New York, Editor Wu, R. (1979).
17. Case, M. E., Schweizer, M., Dushner, S. R. y Giles, N. H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 5259-5263 (1979).
18. Clarke, L. y Carbon, J., *Cell*, 9: 91-99 (1976).
19. Clarke, L. y Carbon, J., *J. Mol. Biol.*, 120: 517-532 (1978).
20. Clarke, L. y Carbon, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 2173-2177 (1980).
21. Clarke, L., Hitzeman, R. y Carbon, J., *Meth in -- Enzymol*, 68: 426-442 Academic Press, New York, Editor We, R. (1979).
22. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. y Hsu, L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69: 2110-2114 (1972).
23. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. y Helling, R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 3240-3244 (1973).
24. Covarrubias, A. A., Rocha, M., Bolivar, F. y Bastarrachea, F., *Gene*, 11:239-251 (1980).

25. Chow, L. T., Gelinas, R. E., Brocker, T. R. y Roberts, R. J., *Cell*, 12: 1-8 (1977).
26. Dávila, G., Lara, M., Guzmán, J. y Mora, J., *Biochem and Biophys, Res. Comm.*, 92: 134-140 (1979).
27. Doel, M. T., Houghton, M., Cook, E. A. y Garey, N. H., *Nature*, 4: 3701-3713 (1979).
28. Fyrberg, E. A., Kindle, K. L y Davidson, N., *Cell*, 19: 365-378 (1980).
29. Glover, D. M. y Hogness, D. S., *Cell*, 10: 167-176 (1977).
30. Goldberg, M. L. y Hogness, D. S., ver Minty y Newmark (1980).
31. Goldberg, M. L., Lifton, R. P., Stark, G. R. y Williams, J. G., Academic Press, New York, Editor Wu, R. 68 (1979).
32. Goodman, H. M., Olson, M. V. y Hall, B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 5453-5457 (1977).
33. Gray, R. E. y Cashmore, A. B., *J. Mol. Biol.*, 108: -- 595-608 (1976).
34. Harpold, M. M., Dobner, P. R., Evans, R. M. y Bancron, F. C., *Nucl. Acids. Res.*, 5: 2039-2053 (1978).
35. Hastie, N. D. y Held, W. A., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 1217-1221 (1978).
36. Hinmen, A., Hicks, J. B. y Fink, G. B., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 1929-1933 (1978).
37. Hbino, C. L. y Carbon, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 3829-3833 (1979).

38. Hummelt, G. y Mora, J., *Biochem, Biophys, Res. Comm.*, 92: 127-133 (1980).
39. Jeffreys, A. J. y Flavell, R. A., *Cell*, 12: 1097-1108 (1977).
40. Kafatos, F. G., Jones, C. W. y Efstrafiadis, A., *Nucl. Acids. Res.* 7: 1541-1552 (1979).
41. Khorana, H. G., ver Nishimura (1965).
42. Krumlauf, R. y Marzluf, G. A., *J. Biol. Chem.* 255: - 1138-1145 (1980).
43. Laemmli, U. K., *Nature*, 227: 680-685 (1970).
44. Lewis, J. B., Atkins, J. F., Anderson, C. W., Baum, P. R. y Gesteland, R. F., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 1344-1348 (1975).
45. McReynolds, L. A., Catterall, J. F. y O'Malley, B. W., *Gene*, 2: 217-231 (1977).
46. Minty, A. y Newmark, P., *Nature*, 288: 210-211 (1980).
47. Mora, J., Dávila, G., Espín, G., González, A., Guzmán, J., Hernández, G., Hummelt, G., Lara, M., Martínez, E., Mora, Y. y Romero, D., *Glutamine Metabolism in Neurospora crassa*, en *Glutamine: Metabolism, Enzymology, and Regulation*, Academic Press, Mora y Palacios Editores (1980).
48. Nirenberg, M., Matthaei, J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 1588-1602 (1961).
49. Nirenberg, M., Leder, P., *Science*, 145: 1399-1400 (1964).

50. Nishimura, S., Jones, D. S., Wells, R. D., Jacob, T. M. y Khorana, H. G., *Fed. Proc.*, 24: 409 (1965).
51. Noyes, B. E. y Stark, G. R., *Cell*, 5: 301-310 (1975).
52. Ochoa, M. y Weinstein, I. B., *Proc. Amer. Assoc. Cancer, Res.*, 4: 49 (1963).
53. Palacios, R., *J. Biol. Chem.* 251: 4787-4791 (1976).
54. Palacios, R., Campomanes, M. y Quinto, C., *J. Biol. Chem.*, 252: 3028-3034 (1977).
55. Palacios, R., Blanco, L., Calva, E., Campomanes, M., Chávez, O., Collado, J., López, S., De la Peña, J. M., Quinto, C. y Sánchez, F., Neurospora crassa Glutamine Synthetase: a model to study Gene Expression in Eukaryotes, en *Glutamine: Metabolism Enzymology, and Regulation*, Academic Press, Mora y Palacios Editores (1980).
56. Paterson, B. M., Bryan, E. R. y Kuff, E. L., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 4370-4374 (1977).
57. Pelham, H. R. B. y Jackson, R. J., *Eur. J. Biochem.*, 67: 247-256 (1976).
58. Pribnow, D., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 784-788 (1975).
59. Quinto, C., Mora, J. y Palacios, R., *J. Biol. Chem.*, 252: 8724-8727 (1977).
60. Ricciardi, R. P., Miller, J. S. y Roberts, B. E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 4927-4931 (1979).
61. Sánchez, F., Campomanes, M., Quinto, C., Hansberg, W., Mora, J. y Palacios, R., *J. Bact.*, 136: 880-885 (1978).
62. Sgaramella, V., Van de Sande, J. H. y Khorana, H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 67: 1452 (1970).

63. Shine, J. V. y Dalgarno, L., *Nature*, 254: 34-38 (1975).
64. Smith, H. y Wilcox, K., *J. Mol. Biol.*, 51: 379--(1970).
65. Struhl, K., Cameron, J. R. y Davis, R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73: 1471-1475 (1976).
66. Struhl, K. y Davis, R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 5255-5259 (1977).
67. Thomas, M., White, R. L. y Davis, R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73: 2294-2298 (1976).
68. Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Seidman, J. G., Matija Peterlin, B., Sullivan, M., Maizel, J. V. y Leder, R., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 725-729 (1978).
69. Tobin, S. L., Zulauf, E., Sánchez, P., Craig, E. A. y McCarthy, B. J., *Cell*, 19: 121-131 (1980).
70. Tonegawa, S., Maxam, A. M., Tizard, R., Bernard, O. y Gilbert, W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 3518-3522 (1978).
71. Valenzuela, P., Venegas, A., Winberg, F., Bishop, R. y Rutter, W. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75: 190-194 (1978).
72. Vapnek, D., Hautala, J. A., Jacobson, J. W., Giles, N. H. y Kushner, S. R., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 3508-3512 (1977).
73. Watson, J. D. y Crick, F. H. C., *Nature*, 171: 736-738 (1953).
74. Weinand, U., Brusckke, C. y Feix, G., *Nuc. Acids. Res.*, 6: 2707-2715 (1979).

75. Wellauer, P. K. y Dawid, I. B., Cell, 10: 193-212 (1977).
76. Woolford, Jr., J. L., Hereford, L. M. y Rosbash, M., Cell, 18: 1247-1259 (1979).
77. Woolford, Jr. J. L. y Rosbash, M., Nuc. Acids. Res., 6: 2483-2497 (1979).

### Agradecimiento

Con mi más sincero agradecimiento a todos mis profesores por su dedicación y entusiasmo y - muy especialmente a Rafael, a Jaime y a Romilio por su apoyo en todo momento y por su invaluable amistad.