

CLONEAMIENTO Y TRANSFORMACION GENETICA EN

Neurospora crassa

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

MARGARITA MARIA de F. CARU MARAMBIO

1987



TUTOR DE TESIS: Dr. Guido Pincheira V.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Margarita María de Fátima Carú Marambio

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de **Doctor en Ciencias con mención en Biología**, en el examen de defensa de Tesis rendido el 14 de Diciembre de 1987

Director de Tesis:

Dr. Guido Pincheira



Comisión Informante de la Tesis:

Dr. Danko Brncic



Dra. Alicia Carrasco



Dr. Carlos Jerez



Dr. Eugenio Spencer



A mi esposo

A mis padres

A G R A D E C I M I E N T O S

Mis sinceros agradecimientos:

Al Dr. Guido Pincheira V., por su apoyo durante mi perfeccionamiento y por su patrocinio en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr Antonio Jimenez (Centro de Biología Molecular, Madrid) por sus valiosas sugerencias y por las facilidades otorgadas en la realización de algunos experimentos.

A la Dra. Alicia Carrasco por su valiosa colaboración y sus consejos.

A la Prof. Madeleine Lamborot por su interés en mi trabajo y su constante estímulo.

A mi amigo y colega Víctor Cifuentes por sus valiosas críticas y porque siempre estuvo dispuesto a ayudarme.

A mis amigas Gittith Sanchez y Marta Gajardo por su ayuda en los experimentos inmunológicos.

Al Sr. Carlos Pino por su excelente asistencia técnica y su buena voluntad.

A la Sra. Pilar Martínez quien siempre tuvo tiempo para mecanografiar mi trabajo.

A mis compañeros del Programa de Postgrado en Genética por el apoyo brindado y su amistad.

En especial agradezco a mi esposo por su paciencia y comprensión en los momentos difíciles, y a mis padres por su constante preocupación.

Finalmente le doy las gracias a todas aquellas personas que ayudaron y contribuyeron a mi formación.

I N D I C E

	página
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMEN	iv
SUMMARY	vi
ABREVIATURAS	vii
LISTA DE MARCADORES GENETICOS	ix
PROPOSITO DE LA TESIS	x
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	9
I.- MATERIALES	9
1. Material biológico	9
1.1 Bacterias	9
1.2 Levaduras	9
1.3 <u>Neurospora crassa</u>	9
1.4 Enzimas	10
1.5 Acidos desoxirribonucleicos	10
1.6 Fracción membranosa (P2)	10
2.- Reactivos Químicos	11
II. METODOS	12
1. Cultivo de microorganismos	12
1.1 Bacterias	12
1.2 Levaduras	12
1.3 <u>Neurospora</u>	12
2. Mantenición de las cepas	13
3. Preparación de extractos crudos	14
3.1 Extracto crudo de <u>Neurospora crassa</u>	14
3.2 Extracto crudo de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	14
3.3 Extracto crudo de <u>Escherichia coli</u>	15
4. Determinación de proteína	15
5. Actividad enzimática	16
6. Purificación de DNA	16
6.1 Purificación de DNA plasmidial	16
6.1.1 Centrifugación en gradientes de CsCl	18
6.1.2 Método de la lisis alcalina	18
6.2 Purificación de DNA de <u>Neurospora</u>	20
6.3 Purificación de DNA de <u>S. cerevisiae</u>	21
7. Electroforesis de DNA	22
7.1 Geles de agarosa	22
7.2 Visualización del DNA en geles de agarosa	22
7.3 Curva de calibración	23
8. Extracción de DNA de geles de agarosa	23
9. Determinación de la concentración de DNA	25
9.1 Medición de densidad óptica	25
9.2 Método del mini-gel	25

10.	Electroforesis de proteína	26
10.1	Geles de poliacrilamida	26
10.2	Tinción de actividad enzimática	27
11.	Hibridación DNA:DNA	27
12.	Ensayos enzimáticos	29
12.1	Tratamiento de DNA con endonucleasa de restricción	29
12.2	Reacción con DNA ligasa de T4	30
12.3	Reacción de "Nick Translation"	30
13.	Purificación de la invertasa extracelular de <u>Neurospora crassa</u>	31
14.	Obtención de suero inmune anti-invertasa	32
15.	Ensayos inmunológicos	33
15.1	Inmunodifusión radial doble	33
15.2	Inmunolectroforesis	33
16.	Clonamiento Molecular	34
16.1	Obtención del plásmido pNC2.1	34
16.2	Obtención del plásmido pNC2.3	34
16.3	Obtención del plásmido pNC2.5	35
16.4	Detección de recombinantes	35
17.	Transformación Genética	36
17.1	<u>Escherichia coli</u>	36
17.2	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	37
17.3	<u>Neurospora crassa</u>	38
18.	Análisis Genético	40
18.1	Cruzamientos de <u>Neurospora crassa</u>	40
	RESULTADOS	41
1.-	Detección de actividad enzimática de invertasa en <u>Neurospora</u>	41
2.-	Purificación de la invertasa de <u>Neurospora crassa</u>	46
3.-	Preparación de un suero inmune anti-invertasa de <u>Neurospora</u>	46
4.-	Clonamiento del gen estructural de invertasa <u>Neurospora crassa</u>	52
4.1	Selección del gen de invertasa	55
4.2	Transformación de <u>Escherichia coli</u> C600 con DNA plasmidial recombinantes	55
4.3	Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> MR17A con DNA plasmidial	57
5.-	Características de los plásmidos recombinantes	61
5.1	Determinación del tamaño del inserto	61
5.2	Digestión con endonucleasas de restricción y construcción de un mapa físico	61
5.3	Identidad genética de los plásmidos	71
5.4	Presencia de un inserto cromosómico de <u>Neurospora crassa</u>	71
6.-	Determinación de la presencia del gen inv en los plásmidos recombinantes	74
6.1	Comportamiento de los transformantes	74
6.2	Análisis inmunológico	75
6.3	Transformación genética de <u>Neurospora</u>	81
7.-	Análisis de los transformantes de <u>Neurospora</u>	86

7.1 Presencia del DNA transformante en el genoma de la cepa receptora	87
7.2 Análisis de ligamiento de los transformantes de <u>Neurospora</u>	91
8.- Determinación de la ubicación del gen de invertasa en el inserto de pNC2	105
8.1 Construcción del subclón pNC2.1	105
8.2 Construcción del subclón pNC2.3	109
8.3 Construcción del subclón pNC2.5	113
8.4 Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	116
DISCUSION	118
1.- Clonamiento del gen <i>inv</i> '	118
2.- Transformación genética de <u>Neurospora crassa</u>	125
3.- Sistema genético de invertasa	133
4.- Proyecciones	137
Apéndice 1: Medios de Cultivo	139
Apéndice 2: Preparación del Fenol:cloroformo Preparación de las soluciones CETAB	141
Apéndice 3: Tamaño y peso molecular de λ /HindIII	142
Apéndice 4: Soluciones para la hibridación DNA:DNA	143
Apéndice 5: Soluciones para "Nick translation"	144
Apéndice 6: Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida.	145
BIBLIOGRAFIA	146

L I S T A D E T A B L A S

Tabla 1	Relación porcentual entre las formas moleculares de invertasa intracelular y extracelular	45
Tabla 2	Purificación de invertasa (β -D-fructofuranósido fructohidrolasa) de <u>Neurospora crassa</u> 74A.....	47
Tabla 3	Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> con DNA de la genoteca	56
Tabla 4	Transformación de <u>Escherichia coli</u> C600 con DNA plasmidial	59
Tabla 5	Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> con DNA plasmidial	60
Tabla 6	Tamaño molecular de los fragmentos del plásmido pNC1 generados por digestión con diferentes endonucleasas de restricción	67
Tabla 7	Tamaño molecular de los fragmentos del plásmido pNC2 generados por digestión con diferentes endonucleasas de restricción	68
Tabla 8	Crecimiento de <u>Sacchaaromyces cerevisiae</u> MR17A en medios selectivos	76
Tabla 9	Actividad de invertasa en los transformantes (Suc ⁺) de <u>Saccabromyces cerevisiae</u> con DNA plasmidial	77
Tabla 10	Actividad de invertasa de los transformantes (inv ⁺) de <u>Neurospora crassa</u> con DNA cromosómico de la cepa silvestre 74A	82
Tabla 11	Actividad de los transformantes (inv ⁺) de <u>N. crassa</u> con DNA plasmidial recombinante	83
Tabla 12	Transformación de <u>N. crassa</u> (inv ⁻) con DNA cromosómico de la cepa silvestre 74A de <u>N. crassa</u>	84
Tabla 13	Transformación de <u>N. crassa</u> (inv ⁻) con DNA plasmidial..	85
Tabla 14	Grado de heterocariosis de los transformantes	88
Tabla 15	Análisis de ligamiento de los transformantes con DNA cromosómico	95

Tabla 16	Análisis de ligamiento de los transformantes con DNA plasmidial	98
Tabla 17	Segregación del gen <i>inv⁻</i> en cruzamientos de los transformantes con la cepa silvestre 74A	100
Tabla 18	Transformación de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> MR17A con DNA de los subclones	117

L I S T A D E F I G U R A S

Figura	1 Curva de actividad enzimática	42
Figura	2 Electroforesis en geles de poliacrilamida de la invertasa extracelular de <u>Neurospora crassa</u> (74A)	43
Figura	3 Electroforesis en geles de poliacrilamida de la invertasa intracelular de <u>Neurospora crassa</u> (74A)	44
Figura	4 Densitometria de la preparación de invertasa de <u>Neurospora crassa</u> cepa (74a)	48
Figura	5 Inmunodifusión radial doble de los sueros pre-inmune e inmune anti-invertasa de <u>N. crassa</u>	49
Figura	6 Inmunodifusión radial doble con el suero inmune anti-invertasa de <u>N. crassa</u> 74A	51
Figura	7 Mapa de restricción del plásmido YRp7	53
Figura	8 Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos recombinantes de la genoteca de <u>Neurospora crassa</u>	54
Figura	9 Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos recombinantes pNC1 y pNC2	58
Figura	10 Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial digerido con BamHI.....	63
Figura	11 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC1 con algunas enzimas de restricción	64
Figura	12 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC1 con algunas enzimas de restricción.	65
Figura	13 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC2 con algunas enzimas de restricción	66
Figura	14 Mapa de restricción del plásmido pNC1	69
Figura	15 Mapa de restricción del plásmido pNC2	70
Figura	16 Autorradiografía del DNA plasmidial hibridado con DNA plasmidial marcado con ^{32}P - α ATP	72

Figura 17	Autorradiografía del DNA cromosómico de <i>N. crassa</i> hibridado con DNA plasmidial marcado con $^{32}\text{-}\alpha\text{I}$ ATP	73
Figura 18	Inmunodifusión radial doble con el suero inmune anti-invertasa de <i>N. crassa</i> (74A)	78
Figura 19	Inmunolectroforesis de extractos crudos	80
Figura 20	Autorradiografía del DNA de los transformantes hibridado con DNA de pNC2 marcado con $^{32}\text{-}\alpha\text{I}$ ATP	89
Figura 21	Esquema de los eventos de recombinación en la integración del DNA plasmidial ligada al locus <i>inv</i>	92
Figura 22	Esquema de los eventos de recombinación en una transformación por reemplazo no-ligada al locus <i>inv</i>	93
Figura 23	Esquema de los eventos de recombinación en una transformación por reemplazo ligada al locus <i>inv</i>	94
Figura 24	Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento para una transformación por reemplazo	97
Figura 25	Resultados esperados en el análisis genético para una transformación por un gen portador de una mutación supresora intergénica	101
Figura 26	Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento y segregación del gen <i>inv</i> ⁺ en una transformación por integración ligada al locus <i>inv</i>	103
Figura 27	Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento y segregación del gen <i>inv</i> ⁺ en una transformación por reemplazo no-ligada al locus <i>inv</i>	104
Figura 29	Subclones del plásmido pNC2	106
Figura 29	Esquema de la estrategia de delección del fragmento de restricción XhoI/XhoI del plásmido pNC2	107
Figura 30	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA del subclón pNC2.1 y del plásmido pNC2	108
Figura 31	Esquema de la estrategia de subclonado de los fragmentos de restricción BamHI/BglII y BglII/BglII de pNC2	110

Figura 32	Electroforesis en gel de agarosa del inserto de DNA cromosómico de <i>Neurospora crassa</i>	111
Figura 33	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA del subclón pNC2.3a y del plásmido pNC2	112
Figura 34	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA del subclón pNC2.5 y del plásmido pNC2	114
Figura 35	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA de los subclones pNC2.5a, pNC2.5b y del plásmido pNC2....	115

R E S U M E N

El trabajo realizado presenta una estrategia de clonamiento para genes de Neurospora crassa mediante complementación genética de mutantes de Saccharomyces cerevisiae y la transformación genética del huésped homólogo con el DNA clonado.

Para el clonamiento se eligió el marcador genético (inv) el cual codifica para la exoenzima invertasa. Tal decisión se basó en la posibilidad de disponer de genes que permitan una selección directa de los transformantes. Además el sistema genético de invertasa es interesante ya que permitiría estudiar la regulación de la síntesis y excreción de una exoenzima.

Se procedió a construir una genoteca de DNA cromosómico de una cepa silvestre de Neurospora crassa (74A) en el plásmido YRp7. A partir de esta genoteca se aislaron los plásmidos recombinantes (pNC1 y pNC2), capaces de complementar una mutación deficiente en invertasa (suc^o) en la cepa de Saccharomyces cerevisiae MR17A.

El análisis de restricción y de hibridación de los plásmidos recombinantes muestra que pNC1 y pNC2 llevan un inserto de DNA cromosómico de Neurospora crassa de 3.4 y 7.6 Kb respectivamente.

Los experimentos de transformación de Neurospora crassa con DNA clonado muestran que ambos plásmidos

restablecen la síntesis de invertasa activa en la cepa de Neurospora crassa (*inv*⁻) deficiente en la actividad de dicha exoenzima.

Tanto el análisis genético como inmunológico sugiere que pNC1 es portador de un gen supresor de la mutación *inv*⁻ y que pNC2 contiene el gen estructural de la enzima.

La transformación genética de Neurospora crassa revela diferentes posibilidades para el destino del DNA transformante en la célula receptora. Los resultados de este trabajo indican que:

- i) La integración del DNA puede ocurrir ligada al locus *inv* en el grupo de ligamiento V, o también en forma no ligada, insertándose el DNA en otros sitios del genoma del hongo.
- ii) la integración puede incluir al vector de clonado o bien sólo al fragmento cromosómico portador del gen *inv*.

Los transformantes se caracterizan por una baja fertilidad, la cual se demuestra en la alta proporción de productos meióticos inviábiles. Este hecho podría ser consecuencia de mutaciones cromosómicas producidas durante el proceso de integración del DNA transformante.

S U M M A R Y

The present work shows a cloning strategy for Neurospora crassa genes through genetic complementation of Saccharomyces cerevisiae mutants and genetic transformation of the homologous host by the foreign DNA.

The *inv* genetic marker, coding for the invertase exoenzyme, was chosen as it enables a direct identification of the transformant cells. Moreover, the invertase genetic system opens up possibilities for the study of the synthesis regulation and excretion of an exoenzyme.

Two recombinant plasmid, pNC1 and pNC2, which complemented the Saccharomyces cerevisiae MR17A (*suc^o*) strain, (an invertase deficient mutant) were isolated from a Neurospora crassa 74A genomic library.

Plasmid restriction and hybridization analysis showed a 3.4 (pNC1) and 7.6 (pNC2) Kb Neurospora DNA inserts.

Genetic transformation with recombinant plasmids restores invertase activity in Neurospora crassa *inv⁻* mutants.

Genetic and immunologic analyses suggested the presence of an *inv⁻* suppressor gene in pNC1 and the invertase structural gene in pNC2.

Different alternatives for the integration of the transforming DNA in their host cells are suggested by Neurospora crassa transformation:

- i) DNA integration may or may not be linked to the *inv* locus, in linkage group V.
- ii) The plasmid vector may or may not be included in the integration event.

Transformant cells presented a decreased fertility as shown by the presence of high numbers of non-viable meiotic products. The above phenomena may be due to chromosomal mutations induced during the integration events.

A B R E V I A T U R A S

CETAB	bromuro de cetil-trimetilamonio
BSA	seroalbúmina de bovino
dNTP	desoxirribonucleótidos
DNS	ácido 3'-5' dinitrosalisílico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Kb	kilobase
LB	caldo Luria
PEG	polietilénglicol
PVP	polivinilpirrolidona
SDS	dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TTC	cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
u. m.	unidad mapa

LISTA DE MARCADORES GENETICOS

Marcadores Genéticos de Escherichia coli

Símbolo del gen	Fenotipo
thi1	auxotrofia para tiamina
thr1	auxotrofia para treonina
leuB	Auxotrofia para leucina (β - isopropilmalato deshidrogenasa)
tonA21	resistencia a fagos T1, T5 y ϕ 80 (receptor de ferricromo)
supE44	supresor mutación ambar (UAG)
hdsS20	especificidad de huesped (restricción-modificación negativa)
recA13	deficiente en recombinación homóloga (proteína RecA).
ara14	no utiliza arabinosa
proA2	auxotrofia para prolina (γ -glutamil fosfato reductasa)
lacY1	no utiliza lactosa (galactósido permeasa)
galK2	no utiliza galactosa (galactoquinasa)
rpsL20	resistencia a estreptomicina (Prot. ribosómica S12)
xyl5	no utiliza xilosa
mtl1	no utiliza manitol

Marcadores Genéticos de Saccharomyces cerevisiae

Símbolo del gen	Fenotipo
trp1	auxotrofia para triptófano (fosforibosil antranilato isomerasa)
leu1	auxotrofia para leucina (α -isopropilmalato deshidrogenasa)
mal ^o	no fermenta maltosa (regulador de la síntesis de α -glucosidasa)
suc ^o	no fermenta sacarosa (invertasa)
lys	auxotrofia para lisina
met6	auxotrofia para metionina (homocisteína metiltransferasa)
his4	auxotrofia para histidina (histidinol deshidrogenasa)
can1	resistencia a canavanina (permeasa de arginina)
MAT	locus de "mating type" (alelo A y α)

Marcadores Genéticos de Neurospora crassa

Símbolo del gen	Fenotipo
al3	deficiente en carotenoídes (geranil pirofosfato sintetasa)
inv	no utiliza sacarosa (invertasa)
A-a	alelos de "mating type"

PROPOSITO DE LA TESIS

En eucariontes es esencial tener un mayor número de marcadores genéticos aislados y conocer el mecanismo de transferencia génica, por transformación, para el desarrollo de sistemas de clonamiento.

En relación a lo anterior la presente tesis tiene como objetivos:

- a) Estudiar una estrategia que haga posible el clonamiento de genes de Neurospora crassa mediante complementación de marcadores genéticos de Saccharomyces cerevisiae y
- b) Determinar algunas de las características del mecanismo de transferencia genética en hongos filamentosos.

Específicamente se propone:

- Aislar y clonar un fragmento de DNA genómico que lleve el gen *inv*' de Neurospora crassa (cepa silvestre 74A).
- Obtención de transformantes de Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae y Neurospora crassa con DNA de plásmidos recombinantes.
- Estudiar los transformantes de Neurospora crassa mediante hibridación de DNA y análisis de ligamiento con técnicas genéticas clásicas.
- Determinar algunas características generales del proceso de transformación genética de Neurospora crassa.

Hipótesis de trabajo:

- a) La complementación de mutaciones de Saccharomyces cerevisiae puede ser una alternativa metodológica para el aislamiento de genes que no se expresan en sistemas bacterianos.
- b) La transformación de Neurospora crassa con plásmidos de integración puede ocurrir por inserción del DNA transformante en el genoma del hongo, tanto en regiones que tienen una relación de homología con el DNA que se incorpora, como también puede ocurrir en regiones que carecen de dicha homología.

I N T R O D U C C I O N

La caracterización física y genética de genes aislados mediante clonamiento molecular es una alternativa a los métodos genéticos clásicos, particularmente en organismos eucarióticos donde el mapeo de mutaciones puede ser un procedimiento muy laborioso o bien imposible. A nivel molecular las relaciones de ligamiento pueden ser estudiadas con mayor precisión, como también el análisis permite distinguir regiones de control (promotores, reguladores) de genes específicos.

Los hongos constituyen un sistema muy conveniente para los estudios de genética molecular, debido a que comparten características con los eucariontes superiores tanto en lo que a la estructura cromosómica se refiere (organización nucleosomal y presencia de histonas) como también a los mecanismos básicos responsables de la expresión génica diferencial. Sin embargo, difieren en otros aspectos ya que los hongos, en general, carecen de secuencias intrónicas, como también carecen de abundantes secuencias repetidas de DNA (Krummlauf et al, 1979).

El desarrollo de transformación genética en hongos, proporciona un método excelente para el clonamiento molecular de genes eucarióticos que no pueden

ser seleccionados por complementación en bacterias. En particular la transferencia intergenérica de genes de Neurospora y Saccharomyces puede considerarse una aproximación válida para el aislamiento de genes fúngicos, en especial aquellos genes que requieren un procesamiento molecular para su expresión.

Aunque los estudios de genética molecular en Neurospora crassa no están tan desarrollados como en Saccharomyces cerevisiae, hay evidencias de transformación genética en N. crassa (Mishra, 1976; 1979; Case *et al*, 1979; Wootton *et al*, 1980). Esta evidencia está basada en i) la demostración que el DNA dador codifica para un producto génico, ii) en la expresión fenotípica específica del DNA dador y la presencia física del DNA en los transformantes y iii) el destino del DNA después de su entrada en la célula receptora (Kinsey *et al*, 1984; Paietta *et al*, 1985b).

En la actualidad se han desarrollado metodologías que permiten la transformación genética funcional ya sea mediante la obtención de esferoplastos en presencia de PEG-CaCl₂ (Case *et al*, 1979) o mediante el tratamiento de conidios germinados con acetato de litio para conseguir la competencia (Dhawale *et al*, 1984). Alternativamente, Buxton y Radford (1984) desarrollaron otro método para esferoplastos miceliales. No obstante todos ellos se caracterizan por la baja frecuencia de transformación (15-200 transformantes/ μ g de DNA).

Con el propósito de aumentar la frecuencia de transformación, se han hecho intentos para desarrollar vectores de replicación autónoma en este hongo. Aunque no se han encontrado plásmidos similares al de 2μ de levaduras (Gunge, 1983), se ha descrito una clase de plásmido mitocondrial, en la cepa silvestre Mauriceville-1c de Neurospora crassa (Collins et al, 1981). Este plásmido no tiene secuencias de homología detectables con el DNA mitocondrial y existe como una serie oligomérica de moléculas circulares con tamaño molecular de 3.6 Kb para el monómero. Stohl et al, (1982) han identificado dos nuevos plásmidos mitocondriales en las cepas silvestre P405-LaBelle y Fiji N6-6 de Neurospora intermedia con un tamaño de 4.2 y 5.1 Kb respectivamente. Estos plásmidos podrían ser de gran valor en el desarrollo de vectores de clonamiento para Neurospora. Stohl y Lambowitz (1983) utilizaron estos plásmidos para construir un vector de replicación autónoma en Neurospora y E. coli. El plásmido recombinante (pALS1) consiste del gen $qa-2^+$ de N. crassa, del plásmido pBR322 y el DNA del plásmido mitocondrial de la cepa P405-LaBelle de N. intermedia. Sin embargo, el plásmido sufre rearrreglos moleculares durante su propagación en Neurospora. Otro plásmido quimera designado como pDV1001, que contiene dos genes de selección en E. coli y el gen $qa-2^+$ de N. crassa, aparentemente puede replicarse autónomamente en ambos huéspedes (Hughes et al 1983a), pero

es difícil recobrar el plásmido de los transformantes de N. crassa (Hughes et al, 1983b). Hasta ahora, tampoco se dispone de un vector con un origen de replicación cromosómico del tipo *ars* (autonomous replicating sequence) que sea funcional en Neurospora (Suzi et al, 1983). La mayoría de los plásmidos usados para transformar N. crassa se integran en el genoma del hongo (Case et al, 1979) o sufren rearrreglos moleculares durante su propagación en Neurospora (Stohl et al, 1984; Paietta et al, 1985a; Kuiper et al, 1985).

Por estas razones al aislamiento de genes de N. crassa se ha logrado básicamente por complementación de mutaciones de Escherichia coli. Hay evidencias que el gen *qa-2* que codifica para la quinato deshidrogenasa (E.C. 4.2.1.19) puede ser expresado en E. coli como complemento de la mutación *aroD* de la bacteria (Vapnek et al., 1977; Hautala et al, 1979). Del mismo modo han sido aislados el gen *trp-1* que codifica para la enzima fosforibosil antranilato isomerasa que complementa la mutación *trpC* de E. coli (Keeseey et al., 1982); el gen *nit-3* que codifica la enzima nitrato reductasa (Smarrelli et al, 1982) y el gen estructural de la orotidina 5' fosfato carboxilasa (*pyr-4*) (Buxton y Radford 1983). Sin embargo, esta estrategia de clonamiento tiene sus limitaciones debido a la baja probabilidad de expresión de genes eucarióticos en Escherichia coli.

Otros métodos, como la hibridación con sondas de DNA marcado se han usado en el aislamiento de genes de N. crassa, entre ellos el gen am^+ que codifica para la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (Kinnaird et al., 1982) y los genes de las histonas H3 y H4 (Woudt et al, 1983). También se han utilizados genotecas de cDNA y el aislamiento se ha realizado mediante el uso de anticuerpos contra proteínas específicas. Este método permitió aislar el gen de la proteína transportadora que cataliza el intercambio de ADP y ATP a través de la membrana mitocondrial (Arends y Sebald, 1984). Alternativamente, se ha usado un método de clonamiento molecular mediante enriquecimiento del plásmido portador de la mutación que complementa la mutación en estudio. Este procedimiento puede ser aplicado sin la necesidad de disponer de un vector de clonado en N. crassa (Akins et al, 1985; Akins et al; 1986; Vollmer et al, 1986)

En el presente trabajo se ha considerado que la complementación de mutaciones génicas de Saccharomyces cerevisiae es una estrategia alternativa para el aislamiento de genes de hongos filamentosos. El clonamiento de genes de N. crassa responde por una parte, a una necesidad de disponer de un mayor número de marcadores genéticos clonados que pueden ser usados ya sea como genes de selección o sirvan de base para la construcción de vectores de expresión en estos hongos; como

también a la necesidad de caracterizar mejor los sistemas de regulación de la expresión génica en hongos.

Los genes relacionados con la síntesis de exoenzimas pueden ser buenos candidatos como marcadores de selección, como también pueden facilitar el estudio de aspectos regulatorios, de la síntesis y excreción de dichas enzimas.

Un ejemplo de estas exoenzimas es la invertasa de Neurospora crassa (β -D-fructofuranósido-fructohidrolasa E.C. 3.2.1.26) que cataliza la hidrólisis del enlace β -fructósido en una variedad de sustratos entre ellos la sacarosa, generando glucosa y fructosa como productos de la reacción. Metzenberg (1963) purificó la invertasa de N. crassa y caracterizó parcialmente la enzima. Sus resultados indican que la enzima existe en dos formas multiméricas activas: una especie de mayor tamaño de 10.3 S y otra de menor tamaño de 5.2 S (Metzenberg, 1964). Posteriormente, Meachum et al (1971) informaron que la invertasa corresponde a una glicoproteína que contiene un 11% de manosa y un 3% de glucosamina con un peso molecular de 210.000 y con una estructura tetramérica cuya subunidad sería de 51.500.

La invertasa de Neurospora crassa está localizada en el espacio intramural y su distribución es variable durante el crecimiento del hongo. La enzima está uniformemente distribuída en la periferia de los conidios, pero durante el crecimiento se concentra en el extremo

apical de la hifa. Del mismo modo se observa una mayor actividad asociada a los puntos de ramificación de nuevas hifas (Marzluf et al, 1967; Chung et al. 1970).

La mayoría de los organismos que hidrolizan sacarosa lo hacen sin incorporar el disacárido mismo. La existencia de un mutante de N. crassa que carece de invertasa funcional (inv^{-}) (Sargent et al. 1969) que es incapaz de crecer en sacarosa como única fuente de carbono, indicaría que la hidrólisis es una reacción esencial para la utilización de la sacarosa por este organismo.

Se han realizado algunos intentos para dilucidar los mecanismos genéticos de la excreción de esta exoenzima. Gratzner et al (1969, 1972) describieron un mutante que exhibe alteraciones de la pared celular debido a una mutación simple asociada con la hiperproducción extracelular de amilasa, invertasa y trehalasa. Trevithick y Metzenberg (1966a, 1966b) estudiaron el proceso de excreción de invertasa en Neurospora y propusieron que la enzima es secretada a través de poros de la pared celular.

En relación a la regulación de la síntesis de esta enzima, los estudios han mostrado que existe un control coordinado con la síntesis de otras exoenzimas. Metzenberg (1962) describió una mutación de Neurospora que afecta la represión de invertasa y trehalasa. Cifuentes (1981) presentó evidencias que indican que la biosíntesis de la invertasa en Neurospora está sujeta a represión catabólica de un modo similar al descrito en levaduras (Rodríguez et

al, 1978; Chu *et al.* 1980; Mormeneo *et al.* 1982; Carlson *et al.*, 1982). Sin embargo, los mecanismos que controlan estos procesos aún se desconocen.

Por lo tanto, el clonamiento de genes relacionados con la invertasa podría proporcionar una manera más directa para estudiar el control genético de la síntesis y excreción de la enzima, como también podrían utilizarse como marcadores genéticos en el desarrollo de vectores de Neurospora.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I.-MATERIALES

1.-Material Biológico

1.1 Bacterias: Escherichia coli cepa C600 (F^- , *thi1*, *thr1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ^-) (Appleyard, 1954); cepa HB101 [F^- , *hsdS20*, (*rE^-*, *mE^-*), *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (*Sm^r*), *xyl5*, *mtl1*, *supE44*, λ^-] (Boyer et al., 1969) fueron utilizadas para los experimentos de clonamiento molecular y en la obtención de los plásmidos YRp7 y sus derivados.

1.2 Levaduras: Saccharomyces cerevisiae cepa MR17A (*MAT α* , *trp1*, *leu1*, *mal^c*, *suc^c*, *lys⁻*, *met6*), Saccharomyces cerevisiae cepa Sc483 (*MAT α* , *leu2.3*, *leu2.112*, *his4*, *can1*). Las cepas de levaduras fueron proporcionadas por el Dr. Antonio Jiménez (Centro de Biología Molecular, Madrid, España). (Broach, J.R. 1981).

1.3 Neurospora crassa: Las cepas silvestres 74A (StA4) FGSC #262 y 77a FGSC #3834 de Neurospora crassa y los siguientes mutantes del mismo hongo: inv-A FGSC #1856, inv-a FGSC #1857 (Sargent et al., 1969), al-3A FGSC #2082, se obtuvieron del Fungal Genetics

Stock Center, Arcata, California, USA (Barrat et al., 1982; Perkins et al., 1982).

- 1.4 Enzimas: Las endonucleasas de restricción *Ava*I, *Egl*III, *Pvu*II se obtuvieron de Bio. Labs. Inc. USA. Las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Xho*I y las enzimas DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa I de *E. coli* y desoxirribonucleasa (DNasa) se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories Inc. USA. Fosfatasa alcalina de intestino de bovino se obtuvo de Boehringer Mannheim, Alemania. Lisozima, Ribonucleasa A (RNasa A), Proteinasa K y β -glucuronidasa tipo H2 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.
- 1.5 Acidos Desoxirribonucleicos: DNA del bacteriófago Lambda digerido con *Hind*III se obtuvo de Bethesda Research Laboratories Inc. USA, DNA de esperma de salmón tipo III de Sigma Chemical Co. St. Louis, USA. DNA del plásmido YRp7 (Tschumper et al., 1980) fue obsequiado por el Dr. Antonio Jiménez (Centro de Biología Molecular, Madrid, España).
- 1.6 La preparación membranosa de *E. coli* (Fracción P2) que se utilizó para obtener anaerobiosis en los medios de cultivo fue gentilmente proporcionada por la Dra. A. Carrasco.

2.-Reactivos Químicos

De Sigma Chemical Co. St. Louis USA, se obtuvo: Agarosa (tipo V), acrilamida, N-N-metilenbisacrilamida, ácido dinitrosalisílico, ampicilina, BSA (fracción V), bromuro de etidio, cloruro de Cesio, SDS, DTT, EDTA, ficoll, 8-hidroxiqulionina, polivinilpirrolidona, tetraciclina, TRIS, TEMED, TTC, nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, TTP), aminoácidos: histidina, leucina, lisina, prolina, treonina y triptófano. De Merck, Darmstadt, Alemania se obtuvo: Acetato de sodio, alcohol isoamílico, ácido bórico, ácido cítrico, arena de mar purificada, cloroformo, etanol absoluto, fenol, formamida, glicerol, glucosa, glicina, metanol, persulfato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y sacarosa.

Los medios de cultivos: triptona, peptona, caldo base con púrpura, extracto de levadura, extracto de malta, base de nitrógeno para levaduras, agar-agar se obtuvieron de Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA.

^{32}P - α dATP de New England Nuclear, Boston, Mass., fue gentilmente proporcionado por el Dr. Antonio Jiménez del Centro de Biología Molecular, Madrid, España.

Papel de nitrocelulosa de Millipore Filter Corporation.

Papel 3MM de Whatmann Ltd., Inglaterra.

II.-METODOS

1.- Cultivo de microorganismos

- 1.1 Bacterias: Escherichia coli se creció en medio de cultivo LB (apéndice Nº 1). Para cultivos sólidos se agregó agar-agar al 2%. En algunos casos, según el propósito del experimento, las bacterias se crecieron en medio mínimo Vogel-Bonner (Vogel y Bonner, 1956; Davis *et al.*, 1980) (apéndice Nº 1). Los medios líquidos inoculados se incubaron a 37° C en agitador Kottermann (130 rpm)
- 1.2 Levaduras: Las cepas de S. cerevisiae se crecieron en medio YEP (apéndice Nº 1). Para cultivos sólidos se agregó agar-agar al 2%. Cuando se cultivó en medio mínimo se usó una solución con la siguiente composición: 6.7 g de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 20g de glucosa o sacarosa (según el propósito del experimento), 40 mg del requerimiento metabólico de la mutante, 5 g de sulfato de amonio para un litro de solución. Los medios inoculados se incubaron a 30° C con agitación constante (130 rpm).
- 1.3 Neurospora crassa: La cepa silvestre y las mutantes de N. crassa se cultivaron en matraces de 250 ml con 50 ml de medio mínimo Vogel líquido (Vogel, 1956) (apéndice Nº 1) suplementado con 0.5% de azúcar como fuente de carbono (a menos que se indique de otra manera). Los

medios se inocularon con una suspensión de conidios suficientes para una concentración final de $2-5 \times 10^6$ conidios/ml de medio y se incubaron a 25°C con agitación constante a 130 rpm en agitador Kottermann modelo 4010 por el tiempo deseado (Davis y De Serres, 1970).

2.- Mantención de las cepas

Las cepas de bacterias se crecieron en medio LB a saturación. Se adicionó el antibiótico ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ cuando las bacterias poseían un plásmido que confería resistencia a este antibiótico. Un ml del cultivo se mezcló con un ml de glicerol al 80% esterilizado previamente y se dejaron a temperatura ambiente por 4 h y luego se guardaron a -20°C . En esta situación las células se mantuvieron viables por al menos 6-7 meses.

Las cepas de levadura se crecieron en medio YEP a saturación y se procedió de igual manera que con las cepas bacterianas.

Las cepas de *N. crassa* se crecieron en tubos con medio completo sólido (apéndice Nº 1) por 5 días a 25°C y se dejaron conidiar mediante exposición a la luz natural por 24 h. Los tubos se guardaron a 4°C . En estas condiciones la viabilidad del cultivo se mantuvo por 3-4 meses aproximadamente.

3.- Preparación de extractos crudos

- 3.1 Extracto crudo de Neurospora crassa: El micelio cultivado en medio líquido se cosechó mediante filtración al vacío y se lavó con 6 volúmenes de agua destilada para eliminar las sales y el azúcar del medio de cultivo. El micelio húmedo, congelado durante 1 h a -20°C , se molió en mortero con arena de mar estéril hasta obtener una pasta homogénea. Para ello, se adicionó tampón acetato de sodio 0.05M pH 5.3, en una relación de 3:1 con respecto al peso húmedo del micelio. El homogenizado se centrifugó a 5000 x g durante 15 minutos en centrifuga refrigerada Sorvall modelo RC5-B. El precipitado se descartó y se utilizó el líquido sobrenadante para la detección de actividad enzimática.
- 3.2 Extracto crudo de Saccharomyces cerevisiae: Las levaduras se crecieron en medio mínimo líquido durante 96 h a 30°C . Las células se colectaron por centrifugación a 7500 x g por 10 min, se lavaron con NaCl 10 mM estéril se centrifugaron en idénticas condiciones. Al sedimento celular se agregó aproximadamente 0.3 ml de tampón Tris-HCl 0.01M pH 7.5 y se adicionó aproximadamente 3 volúmenes de bolitas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. La mezcla se agitó en vortex a velocidad máxima durante 10 min (la agitación

en vortex se realizó en etapas, un min de agitación seguido por 2 min en hielo). Luego se centrifugó a 6000 x g durante 15 min. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. Este extracto se utilizó para la determinación enzimática y para los ensayos inmunológicos.

- 3.3 Extracto crudo de Escherichia coli: Las bacterias se crecieron en medio mínimo líquido durante 18 h a 37°C. Para obtener el extracto crudo se utilizó el mismo protocolo que para levaduras.

4.- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos:

- a) En extractos crudos, se utilizó el método de Lowry et al (1951). Como estándar se usó albúmina de bovino.
- b) En las muestras de proteína extracelular y en las muestras de las diferentes etapas de purificación de la enzima, se midió la densidad óptica a 280 nm en espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-150-02. En algunos casos se aplicó la siguiente corrección (Schleif et al., 1981): Concentración de proteína mg/ml = $1.5 \times D.O._{280} - 0.75 \times D.O._{260}$.

5.- Actividad enzimática

La actividad de invertasa se determinó por el método de Bernfeld (1955) para azúcares reductores. La invertasa se enzóyó utilizando como sustrato sacarosa al 1% en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.3. A un ml de la muestra enzimática se adicionó un ml de sustrato y se incubó a 37°C por 5 min. La reacción se detuvo agregando 2 ml del reactivo ácido 3'-5'-dinitrosalisílico. La mezcla se calentó en baño de agua a ebullición durante 5 min y se enfrió rápidamente. Se diluyó con 20 ml de agua destilada y se leyó la D.O.₅₄₀ nm en espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-150-02. Una unidad de invertasa se definió como la cantidad necesaria de enzima requerida para producir 1 mg de azúcares reductores por min a 37°C.

6.- Purificación de DNA

6.1 Purificación de DNA plasmidial: El DNA plasmidial se purificó por una modificación del método del lisado aclarado descrito por Clewell *et al* (1969). A partir de un litro de cultivo efectuado durante la noche de *E. coli* en medio LB se obtuvieron las células por centrifugación a 7000 x g por 10 min. Las células se resuspendieron en 10 ml de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM pH 8. A esta suspensión celular se agregó lisozima y EDTA a una concentración final de 500 µg/ml

y 75 mM respectivamente. La mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Luego se agregó 16 ml de mezcla lítica (Tritón X-100 0.1% en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM) y se incubó por 15 min en hielo.

La mezcla se centrifugó a 45000 x g durante 90 min en rotor SS34, Sorvall RC5-B. El líquido sobrenadante obtenido corresponde al lisado aclarado el cual se desproteinizó mediante la adición de un volumen de fenol:cloroformo (Apéndice Nº 2). La mezcla se centrifugó a 8000 x g durante 5 min y se recuperó la fase acuosa, la cual se sometió a este procedimiento 2 veces más. A la fase acuosa resultante se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) . La mezcla se agitó y se centrifugó en idénticas condiciones. Los ácidos nucleicos se precipitaron de la fase acuosa mediante la adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío (-20°C). La mezcla se dejó a -20°C durante 60 min y se centrifugó a 10000 x g durante 40 min a 0°C. El líquido sobrenadante se eliminó. El precipitado se secó al vacío en un desecador mediante un breve tratamiento de 2-4 min. Los ácidos nucleicos precipitados se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) que contenía RNasa A a una concentración de 30 µg/ml.

6.1.1 Centrifugación en gradientes de Cloruro de Cesio:

Ocasionalmente, el DNA plasmidial se purificó en gradientes de cloruro de cesio. Se agregó 1.05 g de CsCl y 0.15 ml de una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) por cada ml de lisado original (Métodos, sección 6.1) y se centrifugó por 46-48 h, en rotor RPS 40, a 38000 rpm a 10°C en centrifuga Hitachi modelo 55P. Las bandas de DNA plasmidial se visualizaron con luz ultravioleta y se extrajeron directamente mediante punción del tubo. El bromuro de etidio se eliminó mediante extracciones sucesivas con isopropanol (2 volúmenes de una mezcla isopropanol:agua en proporción de 9:1). La fase inferior que contiene el DNA se diluyó 2 veces con agua y se agregaron 2 volúmenes de etanol enfriado a -20°C. Se dejó 2 h a -20°C. El precipitado se obtuvo centrifugando por 20 min a 17000 x g. El precipitado obtenido se disolvió en un volumen apropiado de tampón TE y se dializó contra el mismo tampón a 4°C durante 12 h.

6.1.2 Método de la lisis alcalina: En el análisis de los plásmidos recombinantes se usó el método rápido de purificación de DNA que corresponde a una modificación del método descrito por Birnboim *et al*, 1979.

Las colonias bacterianas se crecieron en placas con medio LB que contiene el antibiótico correspondiente. Con asa estéril se extrajo aproximadamente 2 cm² de cultivo bacteriano y se resuspendió en 100 µl de una solución de lisozima 4 mg/ml en glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0. La suspensión bacteriana se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se adicionó 200 µl de NaOH 0.2 N, SDS 1%, y se dejó en hielo por 5 min. Luego se agregó 150 µl de una solución fría de acetato de potasio 5 M. El tubo se agitó suavemente y se dejó en hielo por 5 min más. La mezcla se centrifugó durante 5 min en centrifuga Eppendorf a 4°C. El líquido sobrenadante se transfirió a tubo estéril y se adicionó un volumen de fenol:cloroformo (1:1) (apéndice Nº 2), se mezcló y se centrifugó por 2 min. en centrifuga Eppendorf. A la fase acuosa se agregó un volumen de cloroformo puro. Las fases se separaron por centrifugación. A la fase acuosa resultante se adicionó 2 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se dejó a -20°C por 30 min. Los ácidos nucleicos se recobraron por centrifugación durante 5 min a temperatura ambiente. El precipitado se secó en un desecador al vacío, luego se resuspendió en 50 µl de tampón TE pH 8.0 que contiene RNasa A a una concentración de 30 µg/ml y se incubó durante 15 min a 37° C.

6.2 Purificación de DNA cromosómico de Neurospora crassa:

Para purificar el DNA se cultivó la cepa en estudio en 500 ml de medio completo (apéndice N^o 1). El DNA cromosómico de N. crassa se purificó a partir de un fracción nuclear cruda de acuerdo al método de Reich *et al*, 1961.

El sedimento nuclear obtenido se resuspendió en una solución salina (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 M pH 8.0 SDS 1%) en una relación de 0.5 ml por gramo de micelio húmedo. Luego se agregó proteínasa K a una concentración final de 500 µg/ml. La suspensión se incubó a 37°C por 2 h, luego se llevó a 70°C durante 15 min y posteriormente se transfirió a un baño agua-hielo. En esta etapa se agregó 1/10 de volumen de acetato de potasio 5 M y se dejó 30 min en hielo, hasta formar un precipitado blanco. La suspensión se centrifugó a 12000 x g durante 10 min y el líquido sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo estéril. Se agregó RNasa A, previamente tratada a 90°C por 5 min, a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 37°C durante 1 h. La muestra se desproteinizó 2 veces con un volumen de una mezcla de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1 v/v), se separaron las fases correspondientes por centrifugación a 3000 x g por 5 min. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo estéril y se adicionó 2 volúmenes de etanol enfriado a -20°C. El DNA precipitado se colectó mediante centrifugación a 12000 x g durante 40

min. El precipitado se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). El exceso de sales se removió por diálisis contra tampón TE a 4°C (Hautala et al. 1977).

6.3 Purificación del DNA total de Saccharomyces cerevisiae:

Las células de levadura se crecieron en 40 ml de medio mínimo a saturación. Las células se recuperaron por centrifugación a 3000 x g por 5 min y se resuspendieron en 3 ml de sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M pH 7.5. A la suspensión celular se adicionó 100 µl de β-glucuronidasa tipo H-2 y se incubó a 37°C durante 10 min. Los esferoplastos se obtuvieron por centrifugación a 1000 x g por 5 min, se resuspendieron en 5 ml de Tris-HCl 50 mM EDTA 20 mM pH 7.4 y se agregó 0.5 ml de SDS 10%. La mezcla se incubó a 65°C por 30 min. Luego se adicionó 1.5 ml de acetato de potasio 5 M y se dejó en hielo por 60 min. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se agregó 2 volúmenes de etanol enfriado a -20°C. Los ácidos nucleicos se obtuvieron por centrifugación a 12000 x g durante 40 min. El precipitado se secó al vacío y luego se resuspendió en 3 ml de tampón TE que contenía 30 µg/ml de RNasa A. En estas condiciones, la mezcla se incubó a 37°C durante 15 min.

7.- Electroforesis de DNA

7.1 Geles de agarosa: La electroforesis de DNA se realizó en geles de agarosa al 0.7% (Johnson et al, 1977). La agarosa se disolvió en tampón TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M pH 8) por calentamiento hasta ebullición. Una vez enfriada a 60°-65°C se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml (a partir de una solución stock de 5 mg/ml). El gel se preparó en placas de vidrio (14.5 x 16.5 cm) provista de una peineta con espaciadores de 0.6 mm. El gel se colocó en una cámara para electroforesis horizontal. El tampón de corrida utilizado fue TBE que contenía 0.5 µg/ml de bromuro de etidio.

Las muestras en un volumen final de 10-30 µl se mezclaron con tampón de carga 6x (ficoll 2%, azul de bromofenol 0.25%, glicerol 35% en TBE) en una proporción de 5:1. Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 80 volts para el caso de geles grandes y a 40 volts para mini-gel (5 x 6.5 cm).

7.2 Visualización del DNA en geles de agarosa: Los geles que no contenían bromuro de etidio, fueron sumergidos por 10-15 min en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml en agua destilada. Transcurrido este tiempo, los geles se lavaron en sulfato de magnesio 1 mM por una

hora a temperatura ambiente para eliminar el bromuro de etidio libre. Posteriormente se observaron en un transiluminador DESAGA modelo UVIS con luz ultravioleta de onda corta. Los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid CV-5 utilizando película Polaroid tipo 55.

7.3 Curva de calibración: Para determinar el peso o tamaño molecular de los productos de digestión del DNA con las distintas endonucleasas de restricción, se incluyó un patrón de peso molecular en los geles de agarosa. El estándar utilizado fue DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción HindIII (Minter *et al*, 1982). El número de fragmentos y los correspondientes pesos moleculares de estándar están detallados en el apéndice Nº 3. El procedimiento consistió en graficar el peso molecular en Kilobase (Kb) de cada fragmento del estándar contra su movilidad electroforética en un papel semilogarítmico. De este modo se obtuvo una curva donde se interpolaron las migraciones electroforéticas de los fragmentos problemas (Aaij y Borst, 1972).

8.- Extracción de DNA de geles de agarosa

El DNA se sometió a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. El DNA se extrajo con bromuro de cetil-trimetil amonio (CETAB) (Langridge *et al*, 1980).

La agarosa se disolvió en Tris-HCl (pH 7.9) 40 mM de acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM y bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La electroforesis se realizó en el mismo tampón, durante la noche, a 15 volts. Una vez finalizada la corrida se procedió a cortar con bisturí la banda de DNA que interesaba. El trozo de agarosa se fundió a 65°C durante 30 min. A la muestra se agregó un volumen de una solución agua-CETAB y un volumen de una solución butanol-CETAB (apéndice N^o 2). Se mezcló en vortex y se centrifugó en una centrifuga Eppendorf durante 1 min a 37°C . Se extrajo la fase butanol (superior) y se agregó 1/4 de volumen de acetato de sodio 0.3M. La suspensión se agitó en vortex y se centrifugó en las mismas condiciones. Se extrajo la fase inferior y se agregó un volumen de cloroformo. Se mezcló en vortex y se dejó en hielo durante 5 min. La suspensión se centrifugó durante 1 min a 4°C y se recogió la fase superior. Los ácidos nucleicos se precipitaron agregando 2-4% (v/v) de acetato de sodio 3M y 3 volúmenes de etanol a -20°C . La mezcla se colocó a -20°C durante 60 min y luego se centrifugó durante 15 min en centrifuga Eppendorf a 4°C . El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en un volumen apropiado (10-20 μl de agua estéril).

9.- Determinación de la concentración de DNA.

9.1 Mediciones de densidad óptica: Para determinar la concentración de ácidos nucleicos presentes en las muestras, se midió la densidad óptica a 260 nm, en una celda de 1 ml, en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-150-02. Se consideró que 1 unidad de absorbancia (D.O.) a 260 nm corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de doble hebra (Maniatis *et al*, 1982). La razón entre las lecturas de densidad óptica a 260 y 280 nm ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$) proporcionan una estimación de la pureza de la preparación de ácido nucleico. Se utilizaron preparaciones de DNA que tenían una razón de 1.8 o más.

9.2 Método del mini-gel: La electroforesis en mini-gel proporciona una manera rápida y conveniente para cuantificar el DNA y analizar su estado físico. Para ello se preparó un gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE (Métodos, sección 7.1) que contenía 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Se colocó 10 μl de una solución estándar de DNA (30-100 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

La concentración del DNA se estimó comparando la intensidad de fluorescencia de la muestra de DNA problema, con las muestras de la solución estándar.

10.- Electroforesis de proteína

10.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida: En la electroforesis se utilizaron geles de poliacrilamida al 7% (Hames, 1981). Los geles se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida : N-N'-metilenbisacrilamida en una relación de concentración de 30 : 0.8%.

La electroforesis se realizó en tubos verticales de 80 x 6 mm, utilizando tampón Tris-glicina pH 9.05 (5.16 g/l de Tris, 3.48 g/l de glicina) en ambos electrodos. Las muestras se corrieron a 4°C a una corriente constante de 4 mA por gel, hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol 0.01%) migró un 90-95% del largo total del gel. La preparación de los geles se realizó a partir de una mezcla de soluciones acuosas en la siguiente relación de volúmenes : 1A : 2B : 1 H₂O : 4 C. (apéndice Nº 6), (Grossman et al. 1979).

La mezcla se sometió al vacío por 5 min para remover el aire disuelto en ella. Con la solución se llenaron tubos de vidrio previamente lavados con una solución de Agepón (Kodak) diluido 200 veces. Después de la polimerización cada gel se cargó con 30-50 µl de muestra de proteína con azul de bromofenol 0.01% p/v y glicerol al 15% concentración final.

Los geles se fijaron y tñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R al 0.025% (p/v), disuelto en

una solución acuosa de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 9% (v/v), durante 3 h a temperatura ambiente. Los geles se destañaron en el mismo solvente durante al menos 1-2 h y se completó el desteñido con ácido acético al 10% (v/v).

10.2 Tinción de actividad enzimática en geles de poliacrilamida: La actividad de invertasa en geles de poliacrilamida se reveló mediante la técnica descrita por Grossman *et al* (1979). Los geles se colocaron en una solución de sacarosa 0.1M en tampón acetato de sodio 0.05M pH 5.3 a 37°C por 30 min. Luego, se lavaron con agua destilada y se transfirieron a un tubo con una solución de TTC al 0.2% en NaOH 0.6 N. Los tubos de revelado se colocaron en un baño de agua hirviendo hasta que aparecieron las bandas de rojo de formazán.

11.- Hibridación DNA:DNA

Para la hibridación de ácidos nucleicos se utilizó la metodología descrita por Southern (1975). La electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 7.1) se realizó con 3-5 ug de DNA cromosómico por canal o 0.1 µg de DNA plasmidial en presencia de bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Para desnaturalizar el DNA, el gel se trató con una solución de NaCl 1.5M, NaOH 0.5M durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. Luego el gel se

neutralizó con Tris-HCl 1M (pH 8), NaCl 1.5 M durante 1 h. El pH del gel se midió con papel indicador. El DNA se transfirió al papel de nitrocelulosa de la siguiente manera: A una cubeta provista de un puente central, se agregó 750 ml de SSC 10X (apéndice N° 4). Sobre el puente se colocaron 2 tiras de papel 3MM cuyos extremos se sumergieron en el tampón de la cubeta. Sobre el papel 3MM se colocó el gel de agarosa neutralizado, luego una hoja de papel de nitrocelulosa previamente humedecida en SSC 2X de iguales dimensiones que el gel, encima 2 hojas de papel 3MM y por último varias hojas de papel filtro. Para facilitar la transferencia se colocó un peso de 500 g. En estas condiciones se dejó que ocurriera la transferencia durante la noche a temperatura ambiente. Una vez finalizada la transferencia del DNA, el papel de nitrocelulosa se lavó con SSC 3X y se secó a 80°C al vacío durante 2 h. El papel de nitrocelulosa seco se trató con una solución de prehibridación (Apéndice N° 4) durante 18 h a 42°C. La reacción de hibridación se realizó por 24 h a 42°C. La sonda radioactiva (Métodos, sección 12.3) se desnaturalizó durante 5-10 min a 90°C. Finalizada la hibridación, el papel de nitrocelulosa se sometió a los siguientes lavados: i) Con una solución de SSC 3X, SDS 0.1% durante 1 h con agitación a 45°C, ii) Con una solución SSC 0.1X, SDS 0.1% calentada a 45°C, se hicieron 3 cambios de solución cada 30 min. Los lavados se realizaron a 45°C con agitación. El papel de

nitrocelulosa lavado, se secó entre papel filtro y se cubrió con papel plástico (Saran-Wrap). Luego se expuso a placas autorradiográficas X-ray film tipo R con pantalla intensificadora. La exposición se realizó a -70°C . El tiempo de exposición fue variable según la intensidad de la marca radiactiva. Las placas se revelaron y fijaron mediante procedimiento estándar.

12.- Ensayos Enzimáticos

12.1 Tratamiento del DNA con endonucleasa de restricción: aproximadamente 0.5-1.0 μg de DNA plasmidial y 2-4 μg de DNA cromosómico se incubaban durante 3-4 h con 6-8 unidades de enzima. Las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica fueron las recomendadas por Maniatis *et al* (1982). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl . La reacción se detuvo por la adición de EDTA (pH 7.5) a una concentración final de 10 mM. Cuando los productos de la digestión se analizaron por electroforesis se agregó 5 μl del tampón de carga (Métodos, sección 7.1). Si el DNA tratado se requería para otra reacción enzimática, se hizo una extracción con fenol:cloroformo (1:1), una extracción con cloroformo y luego se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20°C (Métodos, sección 6.1.2).

12.2 Reacción con DNA ligasa del bacteriófago T4: Aproximadamente 0.6 - 0.8 μg de fragmentos de DNA cromosómico se ligaron a 0.6 μg de DNA del vector YRp7 o de su derivado pNC2, previamente linearizado con endonucleasas de restricción. Para obtener plásmidos híbridos, la mezcla de ligado se trató con 0.5 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (Weiss et al, 1968) durante toda la noche a 12°C, en un volumen final de 20 μl de Tris-HCl (pH 7.5) 66 mM, MgCl_2 5mM, DTT 5mM y rATP 1mM. Después de la incubación, la mezcla de ligado se mantuvo a -20°C hasta el momento de la transformación de Escherichia coli.

12.3 Reacción de "Nick translation": Los DNAs plasmidiales se marcaron con ^{32}P para usarlos como sondas radioactivas en los experimentos de hibridación DNA:DNA.

Aproximadamente 150-200 ng de DNA plasmidial se incubaron con 10 U de DNA polimerasa I de E. coli, 10 μCi de [α - ^{32}P]dATP (actividad específica 400 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 3 μl de sales de nick 5X (apéndice N^o 5), 1 μl de DNasa (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y agua hasta completar 15 μl , durante 100 min a 12°C. Finalizada la reacción se agregó 5 μl de EDTA 250 mM, 1 μl de DNA de espermatozoos de salmón 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se completó hasta 100 μl con tampón TE pH 8.0

Para separar los nucleótidos no incorporados al DNA, la muestra se centrifugó a través de una pequeña columna de Sephadex G-50 equilibrada con tampón STE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM pH 8). En una jeringa de 1 ml se preparó una columna de Sephadex G-50 de 0.9 ml. La jeringa se colocó en un tubo y se centrifugó a 1600 xg durante 4 min. en rotor HS Sorvall. Una vez empacada la columna a un volumen de 0.9 ml, se agregó 0.1 ml de tampón STE y se centrifugó en iguales condiciones. Luego se agregó la muestra de DNA en un volumen de 100 μ l y se centrifugó a la misma velocidad y tiempo. Se colectó 100 μ l del efluente de la columna. Los dNTPs no incorporados permanecen en la columna. El DNA marcado fue colectado en un tubo Eppendorf (Rigby et al. 1977).

13.- Purificación de la invertasa extracelular de Neurospora crassa

La invertasa de la cepa silvestre 74A de Neurospora crassa se purificó a partir del medio de cultivo. Aproximadamente 1800 ml de medio de cultivo se concentraron en un sistema de filtración AMICON con una membrana PM30 hasta un volumen aproximado de 300 ml. La solución resultante se sometió a 3 fraccionamientos con sulfato de amonio, según el método descrito por Metzzenberg (1963).

14.- Obtención de suero inmune anti-invertasa

El suero anti-invertasa se obtuvo mediante inyección intramuscular de dos conejos machos, de aproximadamente 3 meses de edad, con 1 mg de la enzima obtenida de la cepa silvestre de *N. crassa* (74A) purificada según Métodos, sección 13. Para preparar la inyección, la muestra enzimática se dializó contra NaCl 0.15M durante 12 h y luego 1 mg de invertasa se mezcló con coadyuvante de Freund completo en una proporción de 1:1. A intervalos de 10-12 días se colocaron dos nuevas inyecciones de 1 mg de enzima en idénticas condiciones. Transcurridos 10 días después de la última inyección se colocó una nueva dosis mediante inyección subcutánea en el vientre y sin coadyuvante de Freund (dosis desencadenante). Después de 10 días de la última inyección, se obtuvo sangre de la arteria de la oreja. La obtención del suero control se hizo mediante extracción de 10 ml de sangre antes de comenzar la inmunización.

Los sueros control e inmune se obtuvieron por centrifugación a 900 x g durante 15 min a temperatura ambiente en centrifuga clínica, después de haber incubado la sangre durante 2-3 h a temperatura ambiente. Ambos sueros se mantuvieron a 4°C con azida de sodio al 0.1% (p/v).

15.- Ensayos inmunológicos

15.1 Inmunodifusión radial doble: Se prepararon geles de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 0.01M pH 8 sobre un portaobjetos de tamaño estándar. Se hicieron orificios de 1.5 mm de diámetro en forma de roseta. En el orificio central se colocó 5 μ l de antisuero y en los orificios laterales 5 μ l de antígeno (Muñoz et al, 1971). Las placas se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al término del período de incubación se procedió a lavar exhaustivamente con NaCl 0.15M durante 24 h, con tres cambios de solución salina y por último se lavó una vez con agua destilada durante 2 h. Las placas se secaron a 37°C y se tñieron Azul Brillante de Coomassie 0.025% para proteínas (Métodos, sección 10.1). Luego se destñieron con sucesivos lavados en ácido acético 5% v/v más glicerina al 5% v/v.

15.2 Inmunolectroforesis: Los geles se prepararon con agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 0.01 M pH 8 con una dilución de antisuero de 1/200, en placas de vidrio de 5 x 6.5 cm. En el extremo del gel se hicieron pocillos de 2.5 mm de diámetro. Los pocillos se cargaron con 20 μ l de muestra. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal. El tampón de corrida fue Tris-HCl 0.01 M pH 8. La electroforesis se corrió a 6

volts constantes hasta que el colorante azul de bromofenol (0.01% p/v) migró aproximadamente el 95% de la longitud del gel. Una vez terminada la electroforesis se procedió a lavar, teñir y desteñir el gel de igual manera que la indicada en Métodos, sección 15.1.

16.- Clonamiento molecular

16.1 Obtención del plásmido pNC2.1: El DNA del plásmido pNC2 (0.6 ug) se digirió con la enzima de restricción XhoI. La presencia de moléculas lineales se verificó por electroforesis en gel de agarosa. La muestra se desproteinizó con fenol : cloroformo y se precipitó con etanol a -20°C . El DNA precipitado se resuspendió en 15 μl de agua destilada y se ligó de acuerdo a la reacción descrita en Métodos, sección 12.2

16.2 Obtención del plásmido pNC2.3: El DNA del plásmido pNC2 se digirió con la endonucleasa de restricción BamHI y se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 1%. El fragmento correspondiente al inserto de DNA cromosómico de Neurospora, se extrajo del gel mediante CETAB (Métodos, sección 8). EL DNA obtenido se resuspendió en 15 μl de agua destilada estéril y se trató con la endonucleasa de restricción BglII durante 3 h a 37°C . La muestra se desproteinizó con fenol :

cloroformo y se mezcló con aproximadamente 0.4 µg del plásmido vector YRp7 tratado con la enzima BamHI. La reacción de ligado se realizó de acuerdo a Métodos, sección 12.2.

16.3 Obtención del plásmido pNC2.5: El DNA del plásmido pNC2 (0.6 µg) se trató con la endonucleasa XhoI. La mezcla de digestión se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 1%. El fragmento XhoI correspondiente al inserto cromosómico de N. crassa, se extrajo del gel mediante CETAB (Métodos, sección 8). La muestra se desproteinizó con fenol : cloroformo y se precipitó con etanol a -20°C. El DNA precipitado se resuspendió en 10 µl de agua destilada estéril. La reacción de ligamiento entre el fragmento XhoI y el vector YRp7 linealizado con la enzima Sal I se realizó en un volumen final de 20 µl según Métodos, sección 12.2.

16.4 Detección de recombinantes: Con los productos de las reacciones de ligamiento se transformó Escherichia coli cepa HB101 (Métodos, sección 17.1). Los transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y sensibilidad a tetraciclina. Para verificar que las colonias bacterianas contenían insertos en el vector de clonamiento se procedió a extraer el DNA plasmidial por el método de la lisis alcalina (Métodos, sección

6.1.2) y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 7.1). Las características del inserto se determinaron mediante análisis por electroforesis de los fragmentos de restricción obtenidos para cada uno de los subclones.

17.- Transformación genética

17.1 Transformación genética de Escherichia coli: Las cepas C600 y HB101 se utilizaron como receptoras de DNA plasmidial en los experimentos de transformación genética. Se utilizó 0.5 ml de cultivo crecido durante la noche para inocular 20 ml de medio LB y se incubó con agitación a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.5-0.6 (aprox. 2×10^8 cel/ml). El cultivo se centrifugó a 7000 x g durante 5 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgSO₄ 10 mM y se incubaron en hielo por 30 min. Al final de la incubación se centrifugaron a 7000 x g durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 1/2 volumen de una solución de Tris-HCl (pH 7.8) 10 mM, CaCl₂ 50 mM (tampón de competencia) y se dejó en hielo durante 20 min. Luego se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Las células competentes se resuspendieron en 1/10 de volumen de tampón de competencia. En un tubo estéril se mezcló 0.1 ml de células competentes, 5 µl de DNA (0.2-0.6 µg), 40

μ l de tampón TE y 5 μ l de $MgCl_2$ 100 mM. La mezcla se incubó en hielo por 30 min. Luego se sometió a un pulso térmico de 42°C durante 2 min. Luego, se agregó 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación. Se hicieron diluciones apropiadas y se sembraron en placas de LB solidificado con agar al 2%, que contenía además el antibiótico de selección correspondiente (Cohen et al., 1972).

17.2 Transformación genética de Saccharomyces cerevisiae: Se usó S. cerevisiae cepa MR17A como levadura receptora de los plásmidos recombinantes de la genoteca. Las levaduras se crecieron en 20 ml de medio YEP a 30°C durante la noche. 100 ml de medio YEP se inocularon con 10 ml del cultivo de levadura y se incubó a 30°C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica a 650 nm de 0.45-0.50. El cultivo se centrifugó a 7000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento celular se lavó 2 veces con 15 ml de sorbitol 1 M centrifugando en las mismas condiciones. Luego, se resuspendió en 10 ml de SED (sorbitol 1M, EDTA 25 mM, DTT 50 mM) y se incubaron a 30°C por 10 min con agitación suave (60 rpm). Después de la incubación, las células se lavaron con sorbitol 1M. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 10 ml de sorbitol 1M que contenía 200 μ l de β -glucuronidasa tipo H-2 y se incubó a 37°C por 1-2 hrs.

Los esferoplastos se centrifugaron a 1000 x g durante 3 min a temperatura ambiente y se lavaron una vez con 10 ml de sorbitol 1 M y una vez con 10 ml de STC (sorbitol 1M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl₂) centrifugando cada vez a 1000 x g durante 3 min a temperatura ambiente. El sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de STC. Un volumen de 0.2 ml de esferoplastos se transformaron con 20-30 µg de DNA cuando éste provenía de la mezcla de la genoteca o con 1-3 µg de DNA cuando se trataba de una especie plasmidial única.

La mezcla de transformación se dejó a temperatura ambiente (25°C) durante 15 min y luego se agregó PEG (PEG 4000 40%, Tris-HCl 10 mM pH7.5, CaCl₂ 10 mM) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Después de la incubación los esferoplastos se centrifugaron a 1000 x g durante 3 min y se resuspendieron en 150 µl de SOS (sorbitol 1 M, YEP 0.3X, CaCl₂ 7 mM, requerimientos metabólicos no seleccionados 25 µg/ml, requerimiento metabólico seleccionado 10 µg/ml) se incubó durante 20 min a 30°C, luego se agregó 6 ml de agar de regeneración (apéndice N°1). Se mezcló rápidamente y se vació sobre placas que contenían el mismo medio de regeneración (Hinnen et al., 1978).

17.3 Transformación genética de Neurospora crassa: la transformación genética se realizó mediante el

tratamiento de los conidios con acetato de litio descrito por Dhawale *et al.* (1984). Conidios de 7-8 días de edad se germinaron en medio mínimo Vogel por 150 min a 30°C a una concentración aproximada de $2-5 \times 10^7$ conidios/ml. Los conidios germinados se colectaron por centrifugación a 4500 x g por 10 min y se lavaron con 30 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5. Los conidios lavados se resuspendieron en una solución de acetato de litio 0.1 M a una densidad de $1-2 \times 10^7$ conidios/ml y se incubaron a 30°C por 30 min con agitación. Los conidios se colectaron por centrifugación a 4500 x g por 10 min y se resuspendieron en un volumen apropiado de acetato de litio 0.1M. Un total de $5-8 \times 10^7$ conidios se transformaron con 8-10 µg de DNA en un volumen de 0.4 ml y a una concentración final de acetato de litio de 0.1M. La mezcla de transformación se incubó durante 30 min a 30°C con agitación. Luego se agregó 4 ml de PEG 4000 al 40% en acetato de litio 0.1M y la incubación se continuó por 1 h más. Después de la incubación, los conidios se calentaron a 37°C por 5 min, se colectaron y lavaron una vez con agua destilada estéril y se resuspendieron en agua destilada. Finalmente los conidios se plaquearon en medio selectivo a una concentración de $1-2 \times 10^6$ conidios por placa (15 x 100 mm) y se incubaron a 30°C por 5 días. Los transformantes fueron resebrados en el mismo medio

selectivo (medio mínimo Vogel sin citrato y suplementado con sacarosa al 1%).

18.- Análisis genético

18.1 Cruzamientos de Neurospora crassa: Los diferentes cruzamientos entre las cepas estudiadas se realizaron en tubos de ensayos (1.5 x 20 cm) que contenían medio Westergaard 1X (Westergaard et al., 1947) suplementado con 1% de glucosa y 2% de agar-agar. Los tubos de cruzamiento se incubaron a 25°C durante 12-15 días. El análisis genético de los cruzamientos se realizó mediante el aislamiento de esporas al azar (análisis de cromátidas) o en orden (análisis de tétradas). Para la activación de la germinación de las esporas se utilizó un shock térmico a 60°C durante 30 min.

La obtención de micelios dobles mutantes se consiguió mediante el cruzamiento de los mutantes simples.

Cruzamiento: al3A x inv-a

Las esporas de cada cruzamiento se caracterizaron en cuanto a su tipo de apareamiento (A,a), fenotipo morfológico (albino, silvestre), fenotipo enzimático (mutantes de invertasa). Los micelios dobles mutantes obtenidos se denominaron : inv-al3A, inv-al3a. Se tuvo especial cuidado en elegir mutantes simples que comparten el mismo fondo genético que la cepa silvestre 74A.

R E S U L T A D O S

1.- Detección de actividad enzimática de invertasa en Neurospora

La actividad enzimática de invertasa se midió a diferentes tiempos de cultivo del hongo (Fig.1). La curva muestra que aproximadamente a las 36 hrs de cultivo comienza a detectarse actividad de invertasa y ésta se incrementa a medida que disminuye la fuente de carbono en el medio de cultivo.

La electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos crudos y concentrados del medio de cultivo de la cepa silvestre 74A muestra que la enzima se presenta en 2 formas moleculares (Fig.2 y 3). El análisis electroforético muestra diferencias cuantitativas de las formas liviana y pesada de la enzima tanto intracelular como extracelular. La actividad enzimática extracelular está principalmente representada por la forma de migración menor. Por el contrario, intracelularmente ambas especies enzimáticas tienen igual actividad.

En la tabla 1 se muestran las relaciones porcentuales entre la enzima intracelular y extracelular, determinada por densitometría de las bandas en geles de poliacrilamida.

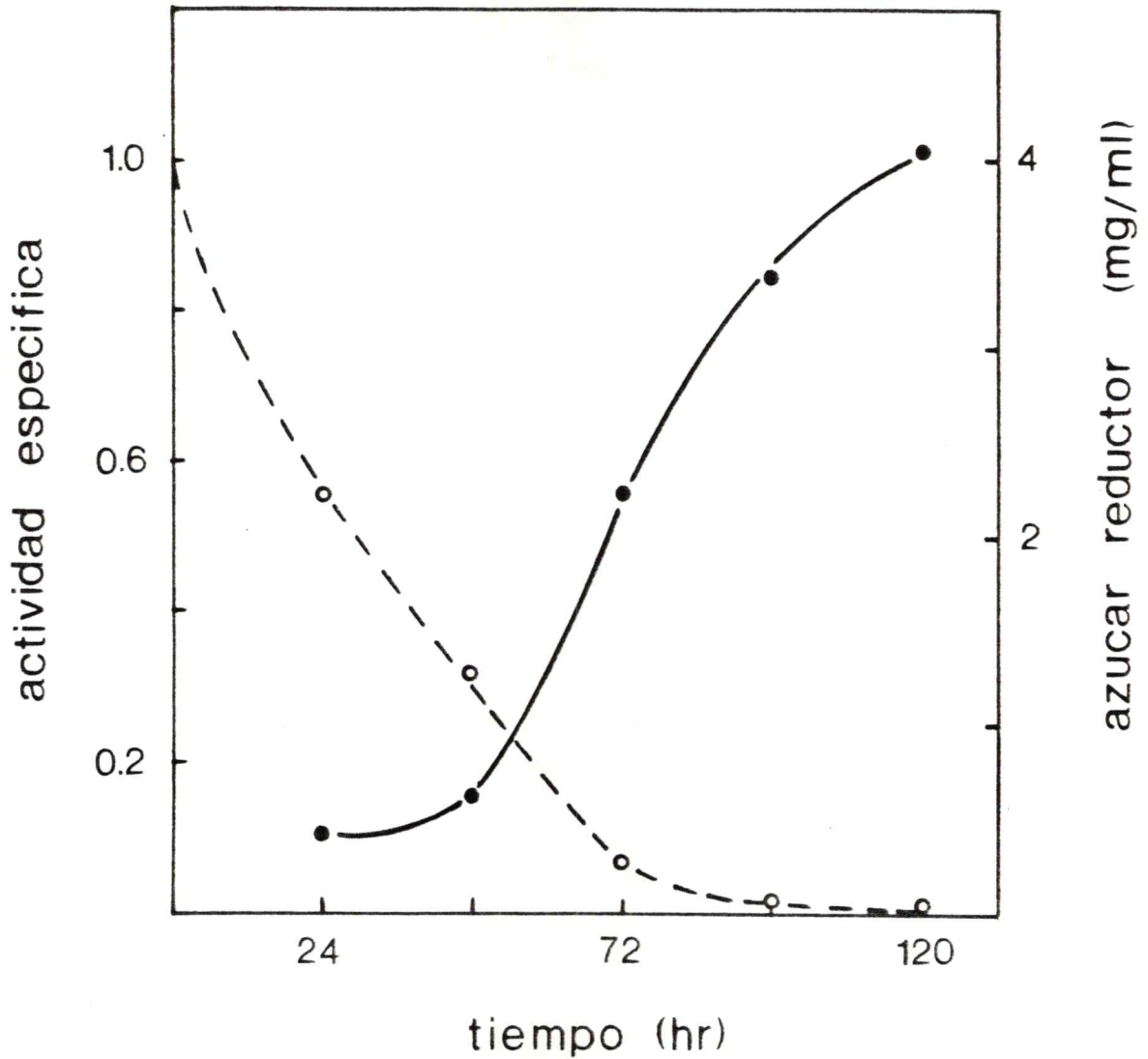


Figura 1

Curva de actividad enzimática de invertasa extracelular: *N. crassa* (74A) se cultivó en medio mínimo Vogel suplementado con 0.5% de maltosa a 25°C con agitación. A los diferentes tiempo, se determinó la actividad enzimática mediante el método de Bernfeld para azúcares reductores. Actividad Específica: mg de azúcares reductores/min/mg de proteína a 37°C (●—●). Azúcar residual (O---O).

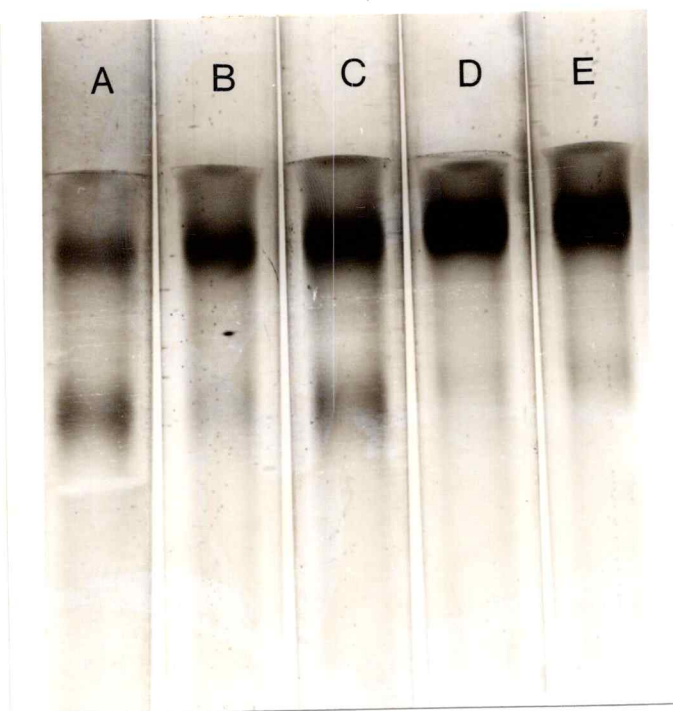


Figura 2:

Electroforesis en geles de poliacrilamida de la invertasa extracelular de Neurospora crassa (74A): El hongo se cultivó en medio mínimo Vogel suplementado con maltosa al 0.5% a 25°C con agitación. A los diferentes tiempos se tomó una muestra del medio de cultivo, correspondiente a 0.1 mg de proteína total y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%. Los geles se tñieron para actividad de invertasa (Métodos, sección 10.2). A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h, D) 96 h, y E) 120 h. de cultivo.

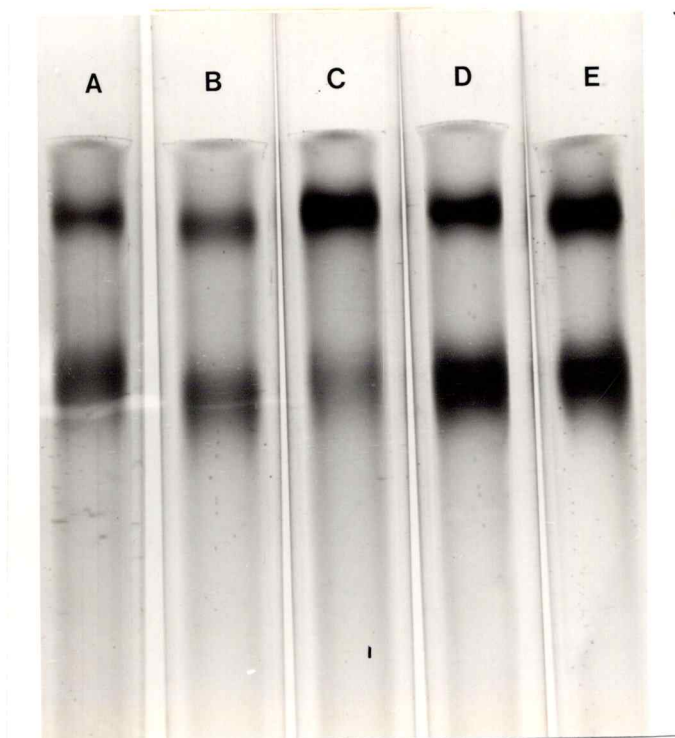


Figura 3:

Electroforesis en geles de poliacrilamida de la invertasa intracelular de Neurospora crassa (74A): El hongo se cultivó en medio mínimo Vogel suplementado con maltosa al 0.5% a 25°C con agitación. A los diferentes tiempos se tomó una muestra del extracto crudo, correspondiente a 0.1 mg de proteína total y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%. Los geles se tificaron para actividad de invertasa (Métodos. sección 10.2). A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h, D) 96 h y E) 120 h de cultivo.

TABLA 1

Relación porcentual entre las formas moleculares de invertasa intracelular y extracelular

Tiempo (horas)	Extracelular		Intracelular	
	I	II	I	II
24	36.2	63.8	53.1	46.9
48	82.9	17.1	51.1	48.9
72	84.5	15.5	68.5	31.5
96	92.7	7.3	44.1	55.9
120	97.5	2.5	43.3	56.7

Neurospora crassa cepa 74A se cultivó en medio mínimo Vogel suplementado con maltosa al 0.5% con agitación. Una muestra de 0.1 mg de proteína total extracelular e intracelular se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y los geles se tñieron para actividad enzimática (Métodos, sección 10.2). Los valores porcentuales de las formas enzimáticas se obtuvieron por densitometría de los geles de poliacrilamida (longitud de onda 600 nm.). La relación entre la proteína intracelular (extracto crudo): extracelular es 10:1

2.- Purificación de la invertasa de Neurospora crassa cepa 74A.

La purificación se realizó mediante precipitación diferencial con sulfato de amonio.

En la tabla 2 se muestran las etapas de purificación de la enzima, a partir del medio de cultivo. La enzima extracelular se purificó 25 veces con una actividad específica de 14.69 U/mg de proteína. La homogeneidad de la preparación se confirmó en geles de poliacrilamida al 7%. La densitometría muestra que a la banda de proteína (Fig.4A) le corresponde una banda de actividad de invertasa (Fig.4B).

3.- Preparación de un suero inmune anti-invertasa de Neurospora.

Para determinar la presencia del producto génico del gen *inv* de Neurospora crassa se utilizó un método inmunoquímico. Se obtuvo un suero inmune anti-invertasa usando como antígeno la preparación de enzima extracelular proveniente de la cepa silvestre 74A.

Mediante inmunodifusión radial doble se realizaron los controles de la preparación de suero inmune. En la figura 5A se muestra el suero inmune anti-invertasa frente a antígenos purificados (α -amilasa e invertasa) y mezclas de antígenos (extractos crudos). El suero

Tabla: 2 Purificación de Invertasa (B - D fructofuranósido - fructohidrolasa E.C. 3.2.1.26) de Neurospora crassa cepa silvestre 7⁴A.

	Volumen (ml)	U. totales	Proteínas totales (mg)	A.E. U/mg	Rendimiento total (%)	Purificación total
Medio de cultivo	1800	1219.7	2054	0.59	100	-
Concentrado del AMICON PM-30	280	988.4	504	1.96	81.1	3.3
Sulfato de amonio pH 5.0	16.6	364.8	72.7	5.02	30.0	8.5
Sulfato de amonio pH 8.1	4.0	323.4	56.8	5.65	26.5	9.6
Sulfato de amonio pH 4.1	2.5	301.2	20.5	14.69	24.7	25.0

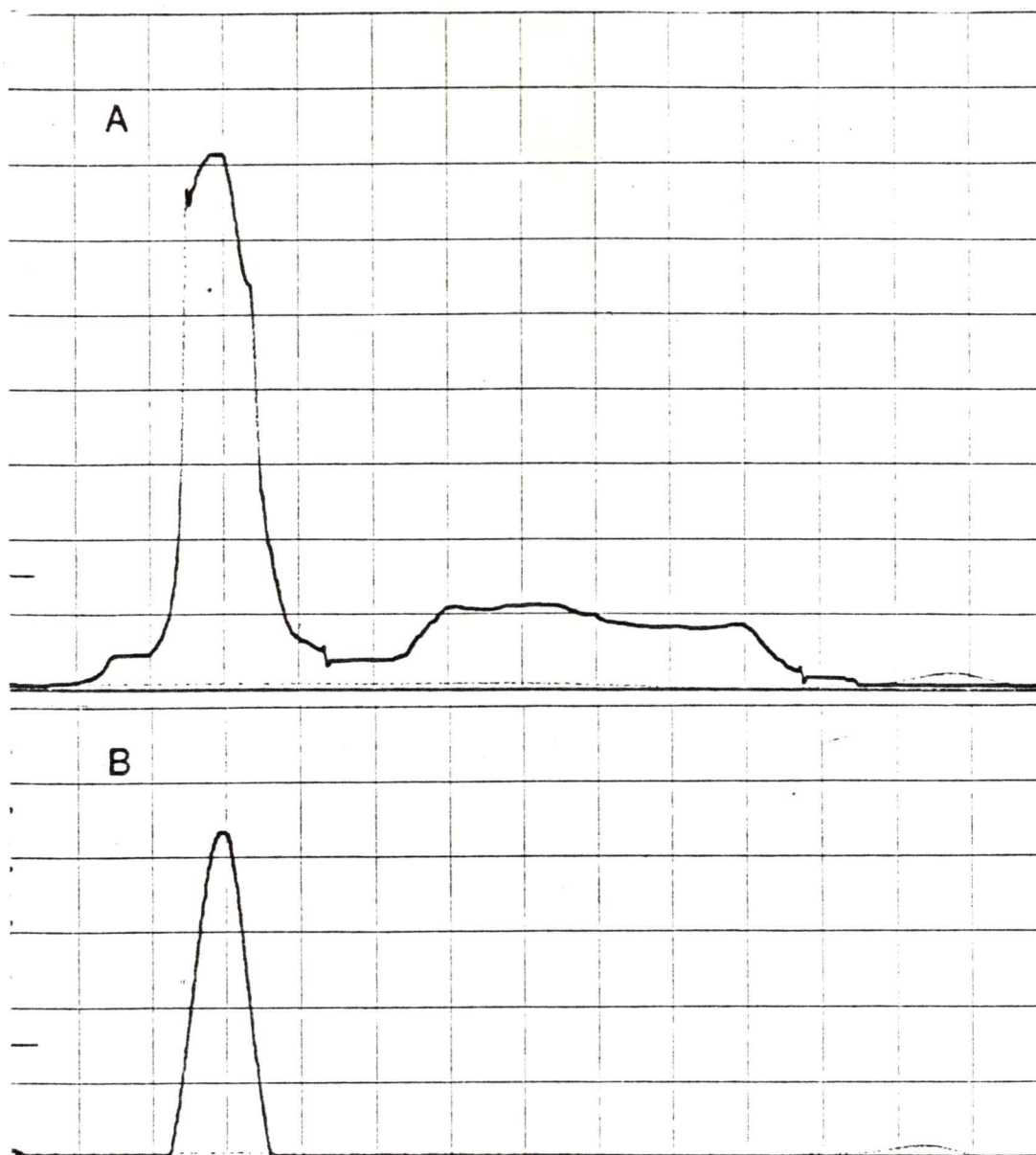


Figura 4

Densitometría de la preparación de invertasa de *N. crassa* (74A): La invertasa extracelular de *N. crassa* se purificó (Métodos, sección 13) y se analizó en geles de poliacrilamida al 7% (Métodos, sección 10.1). A) Densitometría del gel de poliacrilamida teñido para proteínas totales con Azul Brillante de Coomassie, B) Densitometría del gel de poliacrilamida teñido para actividad de invertasa con 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro.

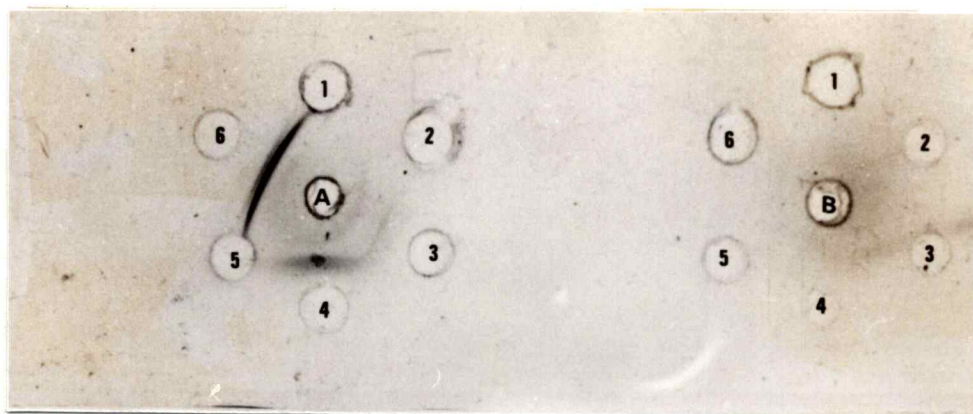


Figura 5:

Inmunodifusión radial doble de los sueros preinmunes e inmunes anti-invertasa de Neurospora crassa: La reacción inmunológica se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 0.01M pH 8.0 (Métodos, sección 15.1). En los orificios centrales se colocó 5 μ l del antisuero (A) y suero control (B). En los orificios laterales se colocó 5 μ l de las siguientes muestras: 1. Seroalbúmina de bovino 0.5%; 2. α -amilasa de B. subtilis 0.5%; 3. Extracto crudo de N. crassa 74 A; 4. Invertasa extracelular de N. crassa 74A ; 5. Extracto crudo de S. cerevisiae Sc 483; 6. Invertasa purificada de N. crassa 74A (1 μ g). Las proteínas se tificaron con Azul Brillante de Coomassie 0.025% (p/v).

anti-invertasa precipitó a la enzima purificada y a la preparación extracelular e intracelular de la cepa silvestre. En la figura 5B se muestra el suero preinmune, el cual no muestra reacción cruzada con los diferentes antígenos ensayados.

En la figura 6A se observa que el suero inmune anti-invertasa precipita todos los antígenos ensayados dando un anillo continuo. Esta reacción revela identidad inmunológica entre los antígenos y sugiere similitud estructural de la enzima extracelular e intracelular como también entre la enzima del tipo silvestre y la cepa mutante. En la figura 6B se muestra el comportamiento del suero inmune anti-invertasa frente a los antígenos heterólogos como son los extractos crudos de levadura. Es de especial interés el comportamiento del suero inmune frente a los antígenos de Saccharomyces cerevisiae, ya que la cepa MR17A se utilizó como receptor en los experimentos de transformación genética que permitieron aislar el gen *inv* de Neurospora. La cepa MR17A de levadura posee el alelo suc^0 indicando que no es capaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono. La cepa Sc483 de levadura se utilizó como control positivo. En ambos casos no se observa banda de precipitación (Fig 6 pozuelos 2 y 3) con el suero anti-invertasa de N. crassa, indicando que no hay reacción cruzada con los antígenos de levadura.

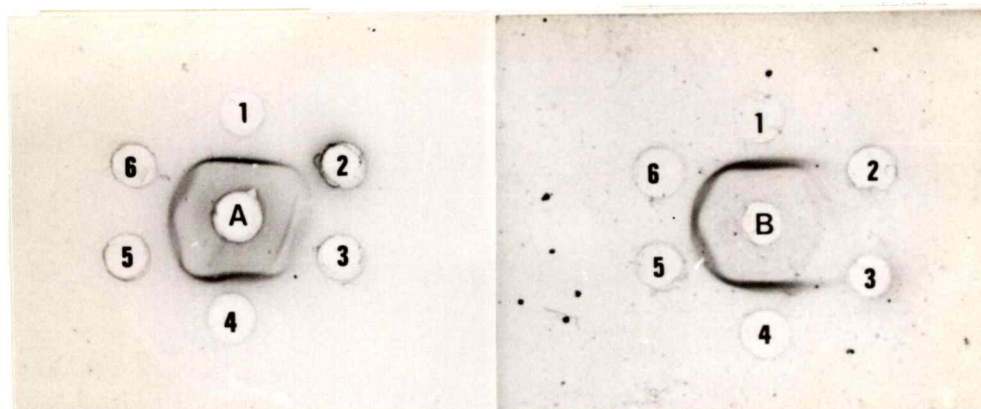


Figura 6:

Inmunodifusión radial doble con el suero inmune anti-invertasa de Neurospora crassa: La reacción inmunológica se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl pH 8.0 (Métodos, sección 15.1). En los orificios centrales se colocó 5 μ l de suero inmune. En los orificios laterales se colocó 5 μ l de: 1A. Invertasa purificada de N. crassa (1 μ g); 2A. medio extracelular de N. crassa inv A; 3A. medio extracelular de N. crassa 74A; 4A. invertasa purificada de N. crassa (1 μ g); 5A. extracto crudo de N. crassa 74A; 6A. extracto crudo de N. crassa inv-A. B: 1B. invertasa purificada de N. crassa (1 μ g); 2B. extracto crudo S. cerevisiae Sc 483; 3B. extracto crudo S. cerevisiae MR17A; 4B. invertasa purificada de N. crassa (1 μ g); 5B. extracto crudo N. crassa 74A; 6B. extracto crudo N. crassa inv-A.

4.- Clonamiento del gen estructural de invertasa de Neurospora crassa.

Para el clonamiento del gen estructural de invertasa se utilizó una genoteca de la cepa silvestre de N. crassa 74A. La genoteca se construyó en el plásmido YRp7 (Fig.7).

Para construir la genoteca se usó la endonucleasa de restricción BamHI, la cual realiza un corte endonucleolítico dentro del gen de resistencia a tetraciclina. El DNA cromosómico de N. crassa tratado parcialmente con la misma enzima produce fragmentos discretos de DNA que poseen extremos complementarios al del plásmido receptor. Los plásmidos recombinantes se seleccionaron a partir de los clones bacterianos resistentes a ampicilina y sensibles a tetraciclina. En la figura 8 se muestra una electroforesis de 10 grupos de plásmidos recombinantes tratados con la endonucleasa de restricción BamHI. Los plásmidos así tratados generan como producto de la reacción una banda prominente de 5.8 Kb correspondiente al vector de clonado y una serie de bandas de distinto tamaño molecular que corresponden a los diferentes insertos de DNA exógeno. Cada uno de los grupos (Fig.8 c-1) representa aproximadamente 800 clones diferentes.

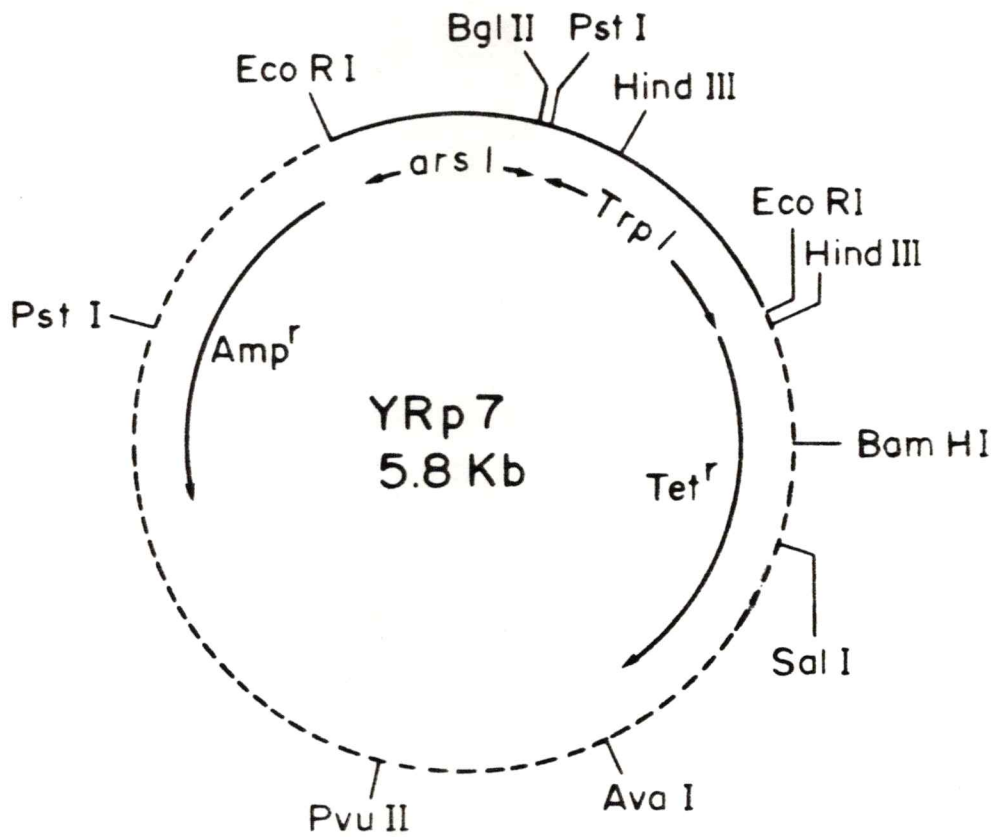


Figura 7:

Mapa de restricción del plásmido YRp7: DNA de pBR322 (----), DNA cromosómico de Sacharomyces cerevisiae (—).

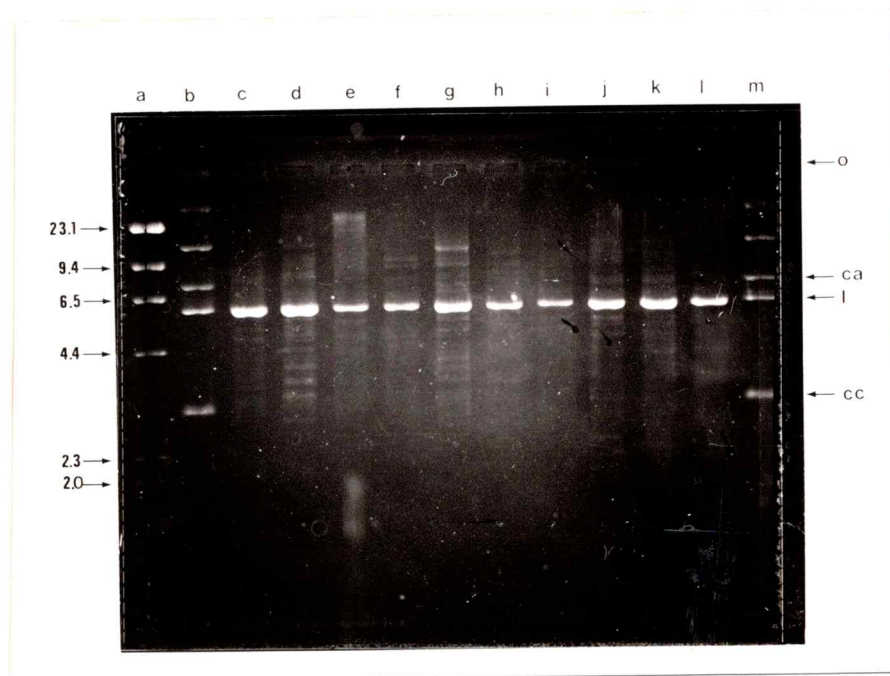


Figura 8:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos recombinantes de la genoteca de Neurospora crassa:. Los DNA (s) obtenidos (Métodos, sección 6.1) se trataron con la endonucleasa de restricción BamHI y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 7). a) DNA del bacteriófago λ + HindIII, b) y m) DNA del plásmido YRp7, c)- l) corresponde a grupos (designados como YR-74.1 hasta YR-74.10) de aproximadamente 800 clones cada uno que llevan plásmidos recombinantes. 0= origen, cc= circular cerrado, l= lineal, ca= circular abierto.

4.1 Selección del gen de invertasa

A partir de estos 10 grupos de plásmidos recombinantes se seleccionó el gen de invertasa de N. crassa. La estrategia de clonamiento para la selección de este gen está basada en la complementación funcional de células mutantes de S. cerevisiae cepa MR17A por plásmidos provenientes de la genoteca de N. crassa.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en la transformación de Saccharomyces cerevisiae MR17A con los diferentes grupos de plásmidos de la genoteca denominados YR-74.1 - YR-74.10. Se aislaron 22 transformantes que eran independientes del triptófano para crecer y utilizaban la sacarosa como única fuente de carbono.

Con el DNA total de los transformantes de Saccharomyces cerevisiae (SUC⁺ TRP1⁺) se transformó Escherichia coli C600 para rescatar el plásmido recombinante. En la tabla 3 se muestra que se obtuvo dos transformantes bacterianos resistentes a ampicilina.

4.2 Transformación de Escherichia coli C600 con DNA plasmidial recombinante

El DNA de los clones resistentes a ampicilina se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%

TABLA 3

Transformación de Saccharomyces cerevisiae MR17A y Escherichia coli C600 con DNA de la genoteca.

DNA de la genoteca	<u>S. cerevisiae</u> colonias suc ⁺	<u>E. coli</u> colonias amp ^r
YR-74.1	10	2
YR-74.2	1	0
YR-74.2	0	0
YR-74.4	2	0
YR-74.5	3	0
YR-74.6	0	0
YR-74.7	0	0
YR-74.8	3	0
YR-74.9	2	0
YR-74.10	1	0

La cepa de Saccharomyces cerevisiae MR17A (Suc⁻, trp1⁻), fue usada como receptor en la transformación. La cepa MR17A fue transformada con DNA plasmidial recombinante (Métodos, sección 17.2) preparado de 10 grupos de clones. Las colonias suc⁺, TRP1⁺ aparecieron aproximadamente a los 10-12 días de incubación a 30°C en medio mínimo-sacarosa.

para verificar la presencia de DNA plasmidial. En la figura 9 se muestra el patrón de migración de los plásmidos recombinantes denominándolos pNC1 al de menor tamaño (carril b) y pNC2 (carril a). Ambos plásmidos son de mayor tamaño que el plásmido vector YRp7. Con el objeto de verificar que el DNA plasmidial aislado contenía el DNA del vector YRp7, se transformó Escherichia coli C600, sensible a ampicilina y se seleccionó por resistencia a este antibiótico. En la tabla 4 se indica la frecuencia de transformación (N° de transformantes/ug de DNA) con los plásmidos recombinantes y el plásmido control. La frecuencia de transformación se reduce con el incremento en el tamaño del plásmido.

4.3 Transformación de Saccharomyces cerevisiae MR17A con DNA plasmidial

Con el DNA plasmidial recombinante (pNC1 y pNC2) se transformó la cepa MR17A de Saccharomyces cerevisiae y se seleccionó por prototrofia para triptófano. La frecuencia de transformación se indica en la tabla 5. Con los resultados obtenidos se demuestra que los plásmidos recombinantes llevan los marcadores genéticos del plásmido YRp7.

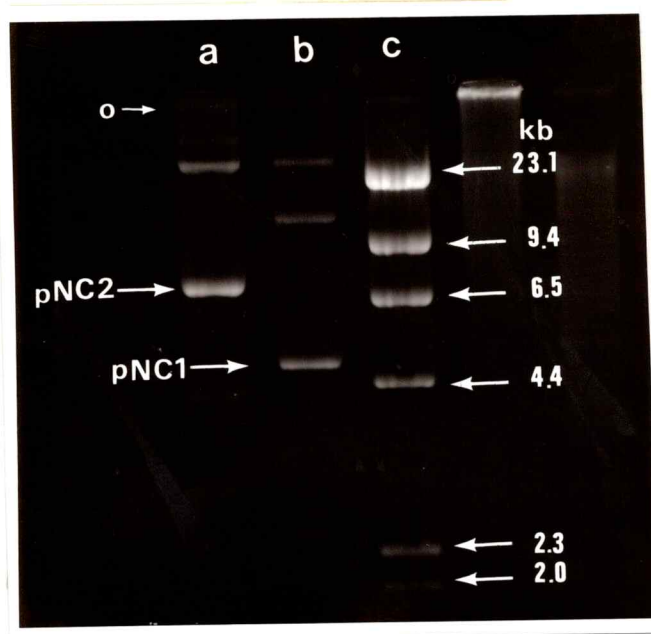


Figura 9:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los plásmidos recombinantes pNC1 y pNC2: Los DNA (s) plasmidiales se obtuvieron por mini preparaciones de DNA (Métodos, sección 6.1.2) a partir de los transformantes de *E. coli* C600 Amp^r. El DNA obtenido (1 µg) se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 7). a) DNA de pNC2, b) DNA de pNC1 y c) DNA del bacteriófago λ + Hind III. 0 = origen del gel.

TABLA 4

Transformación de Escherichia coli C600 con DNA plasmidial

DNA plasmidial	PM (Kb)	Nº transf/ug DNA
sin DNA	---	0
YRp7	5.8	5-8 x 10 ⁴
pNC1	9.2	5-6 x 10 ⁴
pNC2	13.4	1-2 x 10 ⁴

Escherichia coli C600 se transformó con 0.2-0.4 ug de DNA plasmidial (Métodos, sección 17.1). Los transformantes se seleccionaron en medio LB-ampicilina.

TABLA 5

Transformación de *S. cerevisiae* cepa MR17A con DNA plasmidial

DNA plasmidial	Nº transf. Trp1 ⁺ /ug DNA
sin DNA	0
YRp7	135
pNC1	120
pNC2	100

La cepa MR17A (*trp1*⁻) se transformó con 1-2 ug de DNA plasmidial. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo con los suplementos nutricionales de la cepa con excepción del triptófano. Las colonias Trp1⁺ aparecieron aproximadamente a los 10 días de incubación a 30°C.

5.- Caracterización de los plásmidos recombinantes

5.1 Determinación del tamaño del inserto

Los plásmidos recombinantes rescatados de los transformantes amp^r de Escherichia coli C600 se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. En la figura 10 se muestra el patrón de migración de cada uno de los plásmidos digeridos previamente con la endonucleasa de restricción BamHI. En ambos plásmidos se puede reconocer la banda de 5.8Kb correspondiente al vector YRp7 lineal. En el plásmido pNC1 el inserto de DNA de Neurospora es de 3.4 Kb y en el plásmido pNC2 el inserto cromosómico tiene un tamaño de 7.6 Kb.

5.2 Digestión con endonucleasas de restricción y construcción del mapa físico de los plásmidos

Para construir un mapa físico se determinó el tamaño de los fragmentos generados con las diferentes endonucleasas de restricción y se determinó sus relaciones con la región de la molécula correspondiente al vector.

A.- pNC1: Este plásmido es sustrato para todas las endonucleasas de restricción ensayadas. En el fragmento cromosómico de Neurospora crassa se encuentran

secuencias únicas para las endonucleasas de restricción XhoI (Fig.11 carril f) y Ava I (Fig.12 carril d). Las otras enzimas de restricción ensayadas tienen más de un sitio de corte con excepción de PstI y Sall que no cortan en el inserto cromosómico. En las figuras 11 y 12 se muestran algunos patrones de migración de los productos de digestión con las diferentes endonucleasas.

B.- pNC2: Este plásmido recombinante lleva el inserto cromosómico de mayor tamaño. En la figura 13 se muestra el patrón de migración de los fragmentos producidos con algunas endonucleasas de restricción. En general las enzimas ensayadas reconocen pocos sitios en este plásmido. En particular el inserto cromosómico no posee sitios de corte para las endonucleasas HindIII, PstI y PvuII. Entre las enzimas que generan más fragmentos se encuentran BglII, EcoRI y Sall, todas ellas con secuencias de reconocimiento tanto en el vector como en el inserto cromosómico.

Los tamaños moleculares de los fragmentos de restricción estimados por electroforesis se resumen en las tablas 6 y 7. La información obtenida de las digestiones simples y dobles de los plásmidos se utilizó para construir un mapa físico de cada uno de los plásmidos recombinantes (Fig. 14 y 15).

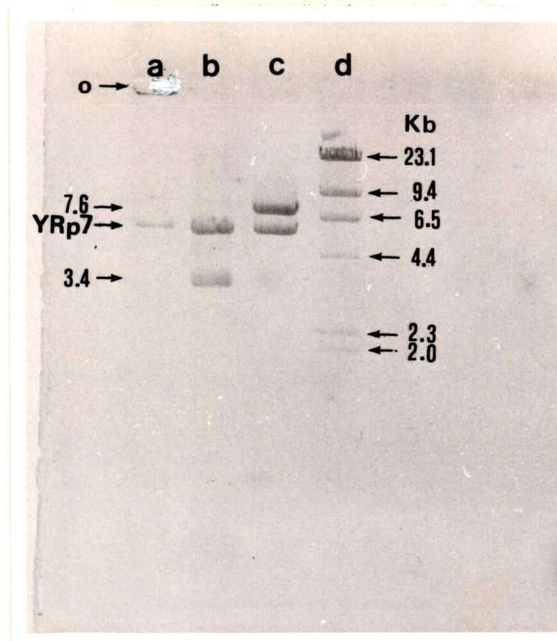


Figura 10:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial digerido con BamHI: Los DNA (s) plasmidiales se obtuvieron por lisis alcalina (Métodos, sección 6.1.2) a partir de los transformantes de *E. coli* C600 Amp^r. El DNA obtenido se digirió con la endonucleasa de restricción BamHI y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 7). a) DNA de YRp7 + BamHI, b) DNA de pNC1 + BamHI, c) DNA de pNC2 + BamHI y d) DNA del bacteriófago λ + Hind III
o = origen del gel. Las flechas a la izquierda indican las posiciones del vector YRp7 y los insertos de DNA cromosómico de *N. crassa* en cada plásmido.

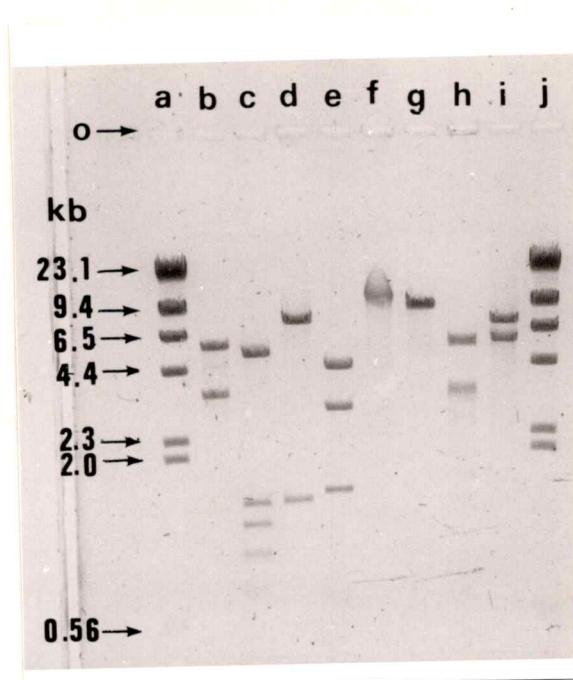


Figura 11:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC1 con algunas enzimas de restricción: El DNA plasmidial purificado (Métodos, sección 6.1) se trató con diferentes endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. a) DNA del bacteriófago λ + Hind III, b) BamHI, c) HindIII, d) PstI, e) EcoRI, f) XhoI, g) Sall, h) BglII, i) pNC2 + BamHI, j) DNA del bacteriófago λ + Hind III. o= origen. Las flechas indican la migración de los fragmentos del DNA del bacteriófago λ + HindIII (Apéndice Nº 3).

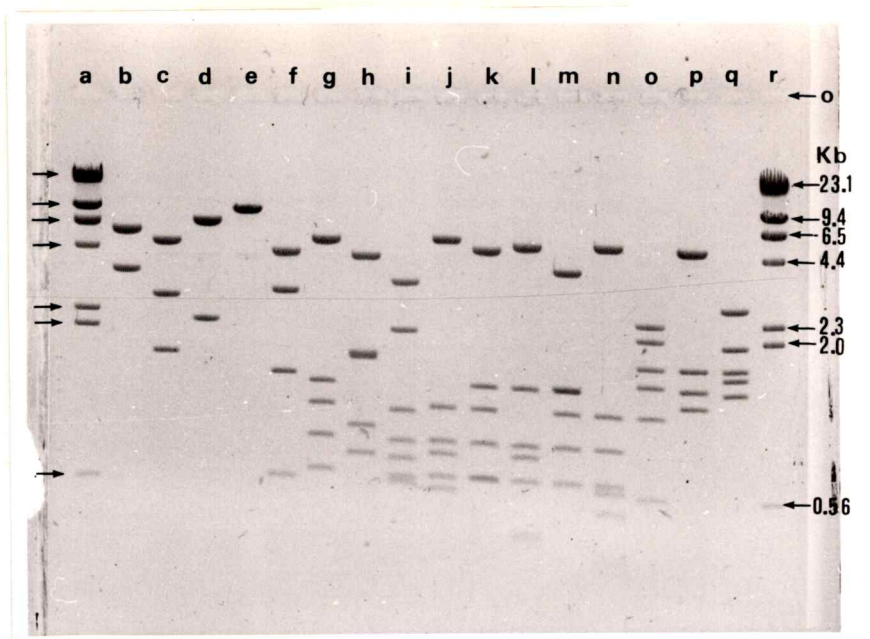


Figura 12:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC1 con algunas enzimas de restricción: El DNA plasmidial purificado (Métodos, sección 6.1) se trató con diferentes endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. a) DNA del bacteriófago λ + Hind III, b) BamHI, c) PvuII, d) Aval, e) Sall, f) EcoRI, g) HindIII, h) BamHI + PvuII, i) HindIII + PvuII, j) HindIII + XhoI, k) HindIII + Sall, l) HindIII + BamHI, m) HindIII + PstI, n) HindIII + BglII, o) EcoRI + PvuII, p) Sall + PvuII, q) PstI + PvuII, r) DNA del bacteriófago λ + HindIII. O= origen.

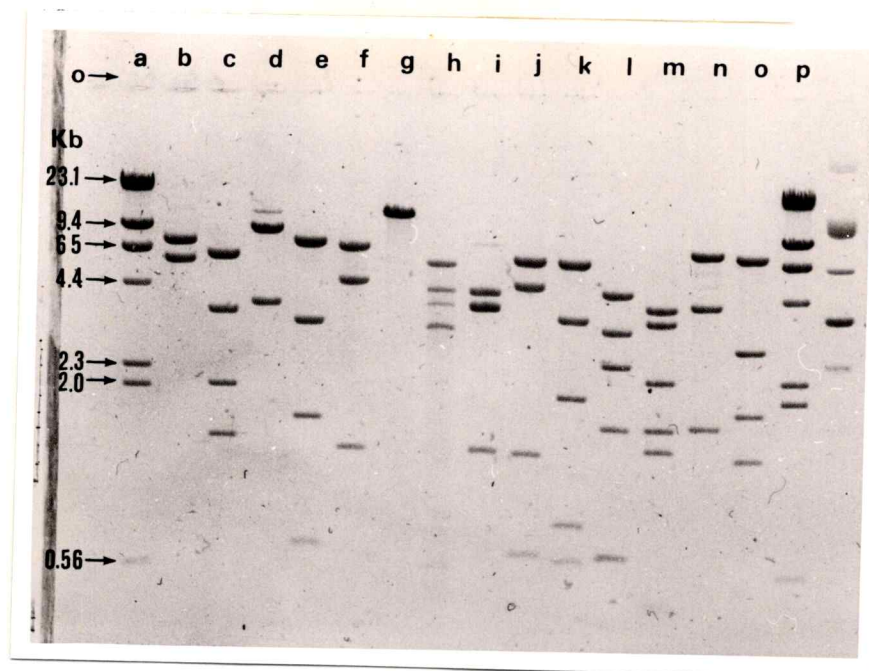


Figura 13:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA de pNC2 con algunas enzimas de restricción: El DNA plasmidial purificado (Métodos, sección 6.1) se trató con diferentes endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a) DNA del bacteriófago λ + Hind III, b) BamH I, c) EcoR I, d) Xho I, e) Sal I, f) Bgl II, g) Pvu II, h) BamH I + Xho I, i) Pst I + Xho I, j) Hind III + Bgl II, k) EcoR I + Hind III, l) Sal I + Hind III, m) BamH I + EcoR I, n) Pvu II + BamH I, o) Pvu II + Bgl II, p) DNA del bacteriófago λ + Hind III. O= origen.

TABLA 6

Tamaño molecular de los fragmentos de restricción del plásmido pNC1 utilizados para la construcción del mapa de restricción.

Enzima(s)	Tamaño molecular (Kb)								
BamHI	5.8	3.4							
SalI	9.2								
XhoI	9.2								
PstI	7.8	1.4							
AvaI	7.1	2.1							
PvuII	4.8	2.8	1.6						
BglII	5.5	3.2	0.5						
EcoRI	4.35	2.8	1.45	0.6					
HindIII	5.1	1.45	1.05	0.95	0.65				
BamHI + PvuII	4.2	1.6	1.6	1.0	0.8				
HindIII + PvuII	3.1	2.0	1.05	0.95	0.85	0.65	0.6		
HindIII + XhoI	5.1	1.05	0.95	0.9	0.65	0.55			
HindIII + SalI	4.45	1.45	1.05	0.95	0.65	0.65			
HindIII + PstI	3.5	1.45	1.4	1.05	0.95	0.65	0.2		
HindIII + BamHI	4.9	1.45	0.95	0.8	0.65	0.35	0.1		
HindIII + BglII	4.8	1.05	0.95	0.65	0.6	0.55	0.3	0.3	
EcoRI + PvuII	2.3	2.0	1.6	1.45	1.05	0.5	0.3		
PstI + PvuII	2.8	1.85	1.6	1.55	1.4				
SalI + EcoRI	3.65	2.9	1.45	0.6	0.6				
XhoI + EcoRI	4.35	2.6	1.45	0.6	0.2				
SalI + PvuII	4.8	1.6	1.45	1.35					
BamHI + XhoI	5.8	2.3	1.1						
BglII + PstI	4.2	3.15	1.35	0.5					
BglII + BamHI	4.6	1.9	1.2	1.0	0.5				
BamHI + PstI	3.4	3.2	1.4	1.2					
XhoI + PstI	4.3	3.5	1.4						
XhoI + SalI	7.8	1.4							

TABLA 7

Tamaño molecular de los fragmentos de restricción del plásmido pNC2 utilizados para la construcción del mapa de restricción

Enzima(s)	Tamaño molecular (Kb)					
BamHI	7.6	5.8				
HindIII	12.7	0.7				
PstI	12.0	1.4				
BglII	7.2	4.7	1.5			
XhoI	9.6	3.8				
EcoRI	6.2	3.5	2.25	1.45		
Sall	7.6	3.3	1.7	0.8		
PvuII	13.4					
BamHI + XhoI	5.8	3.8	3.2	0.6		
BamHI + EcoRI	3.95	3.5	2.3	1.8	1.45	0.4
BamHI + Sall	5.5	3.3	2.1	1.4	0.8	0.3
XhoI + EcoRI	4.6	2.25	2.25	1.55	1.45	1.3
XhoI + Sall	7.5	2.2	1.1	0.9	0.9	0.8
PstI + XhoI	4.4	3.8	3.8	1.4		
BglII + HindIII	6.25	4.7	1.5	0.7	0.25	
EcoRI + HindIII	6.2	3.5	2.25	0.85	0.60	
Sall + HindIII	4.5	3.3	2.35	1.7	0.80	0.75
BamHI + PvuII	7.6	4.1	1.7			
PvuII + BglII	7.2	2.8	1.9	1.5		

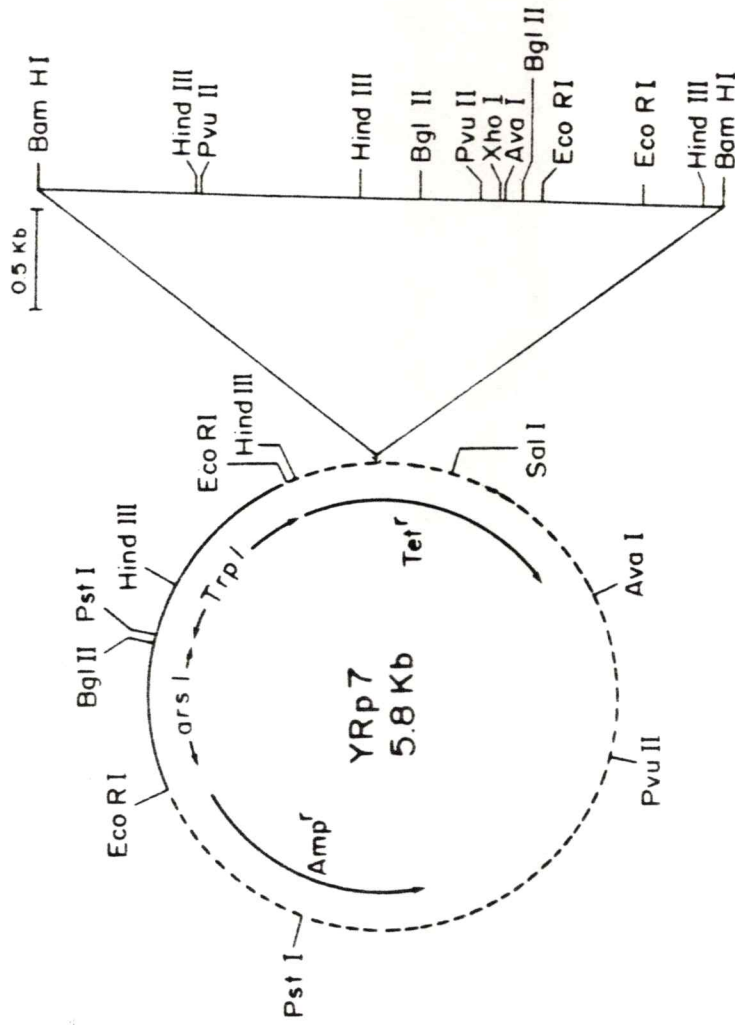


Fig. 14 Mapa de restricción del plásmido pNC1

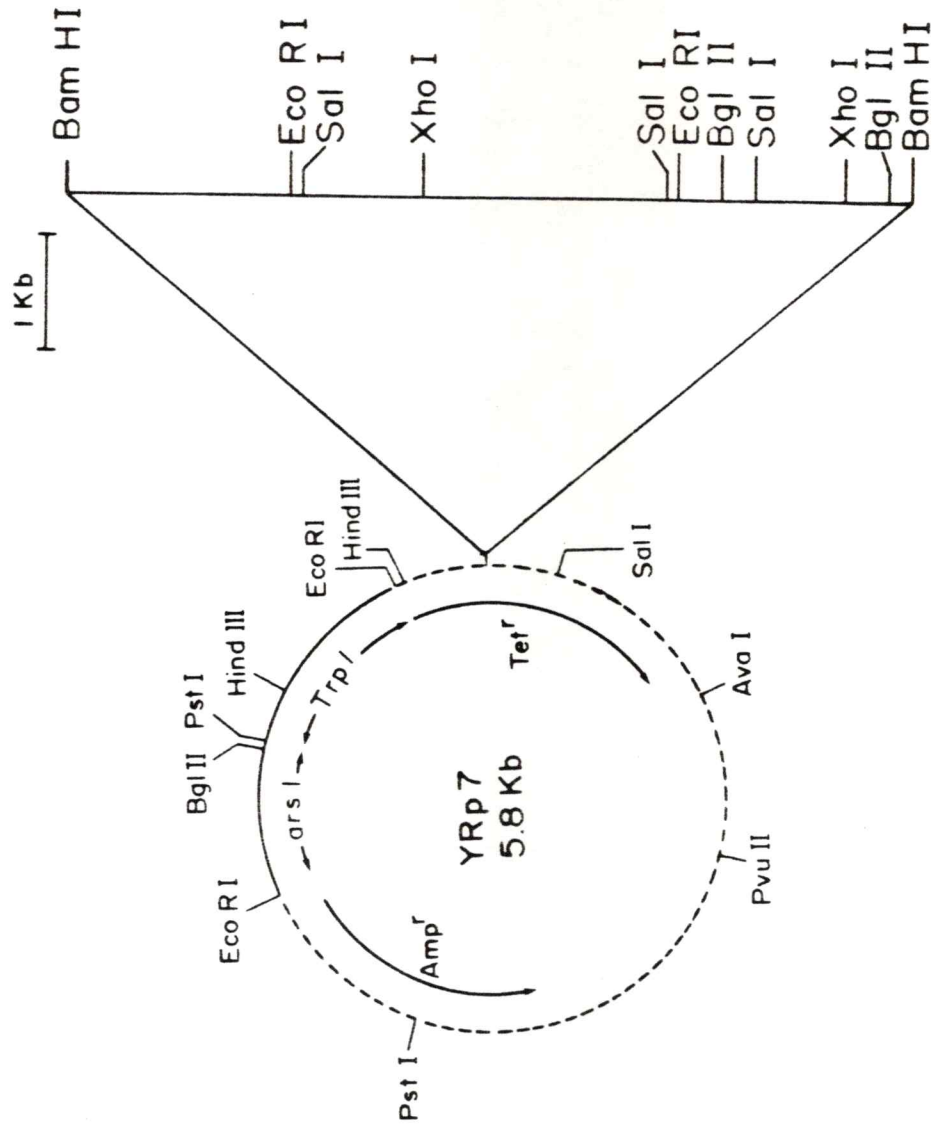


Fig. 15 Mapa de restricción del plásmido pNC2

5.3 Identidad genética de los plásmidos recombinantes

Los mapas de restricción de cada uno de los plásmidos indican que estas dos moléculas tienen en común solamente la región del vector. Para determinar si había regiones de homología en los insertos cromosómicos se realizó una hibridación entre los plásmidos. En la figura 16 se muestra una autorradiografía de los DNAs plasmidiales. Se puede observar que la sonda radioactiva (pNC1) se reconoce asimismo, generando 2 bandas de hibridación. Una de ellas corresponde al vector YRp7 y la de menor tamaño corresponde al inserto de 3.4 Kb (carril a). Cuando la sonda radiactiva (pNC1) se prueba contra el plásmido pNC2 digerido con BamHI (carril b) hibrida solamente con la banda correspondiente al vector. Este resultado indica que los plásmidos llevan insertos cromosómicos diferentes.

5.4 Presencia de un inserto cromosómico de Neurospora crassa

Para determinar si los plásmidos en estudio llevan un inserto de DNA cromosómico de Neurospora crassa se realizó una hibridación DNA cromosómico : DNA plasmidial. La figura 17 muestra la autorradiografía obtenida en los experimentos de hibridación.

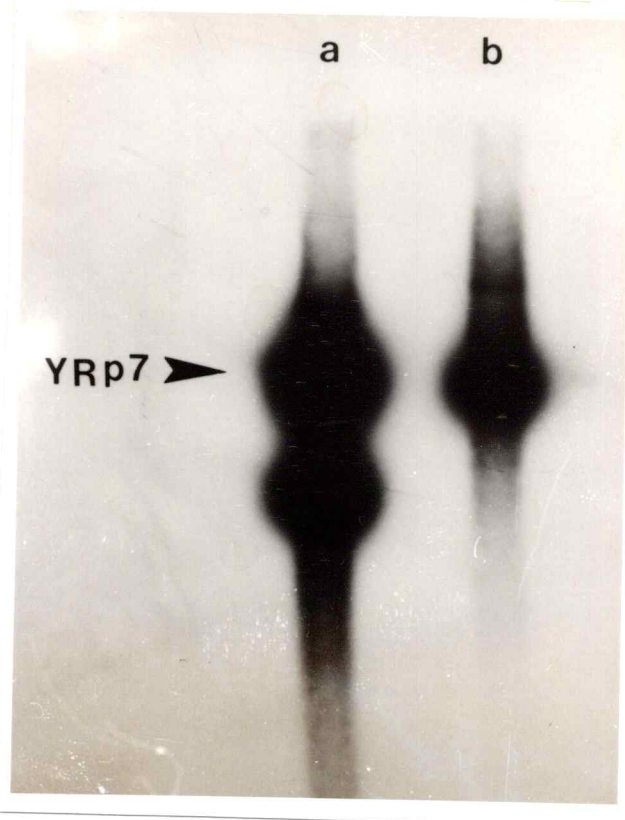


Figura 16:

Autorradiografía del DNA plasmidial hibridado con DNA plasmidial marcado con ^{32}P - α ATP: El DNA de los plásmidos (0.2 μg) pNC1 y pNC2 se digirió con la enzima de restricción BamH I (Métodos, sección 12.1). Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa por el método de Southern (Método, sección 11). El DNA se hibridó con DNA del plásmido pNC1 marcado con ^{32}P . a) DNA de pNC1 + BamHI, b) DNA de pNC2 + BamHI.

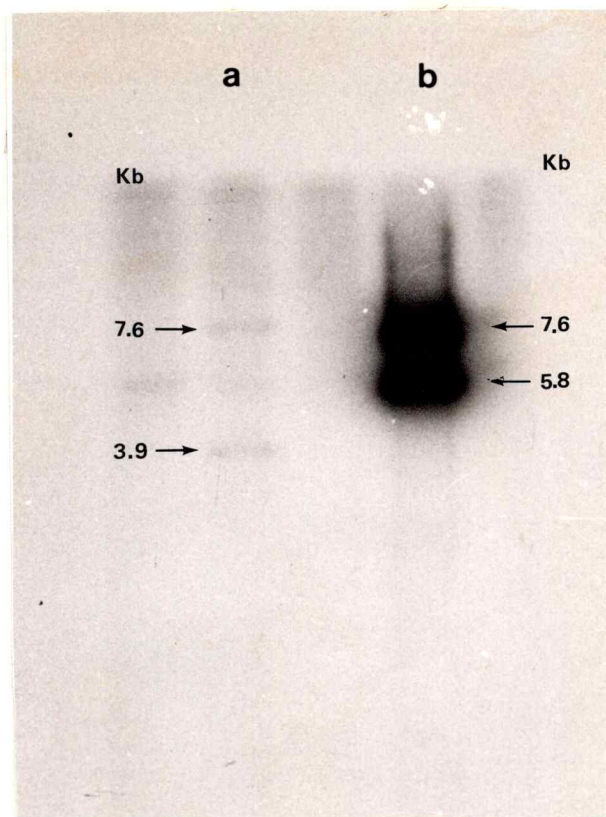


Figura 17:

Autorradiografía del DNA cromosómico de Neurospora crassa hibridado con DNA plasmidial marcado con ^{32}P - α ATP: EL DNA cromosómico (2-4 μg) de Neurospora crassa cepa 74A y el DNA de pNC2 se trataron con la enzima de restricción BamH I. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0.7% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa por el método de Southern (Métodos, sección 11). El DNA se hibridó con DNA del plásmido pNC2 marcado con ^{32}P . a) DNA cromosómico de Neurospora crassa + BamHI y b) DNA de pNC2 + BamHI.

El plásmido pNC2 hibrida con un fragmento de DNA cromosómico de 7.6 Kb que corresponde al inserto y además se revela una segunda banda de hibridación de menor tamaño de 3.9 Kb.

Para el plásmido pNC1 se observa una situación similar. El plásmido marcado con ^{32}P y utilizado como sonda reconoce dos bandas de hibridación

6.- Determinación de la presencia del gen *inv* en los plásmidos recombinantes.

Los plásmidos recombinantes pNC1 y pNC2 se analizaron para comprobar la presencia de gen(es) relacionado(s) con la síntesis de invertasa.

6.1 Comportamiento de los transformantes

A.- Escherichia coli: A partir de los transformantes bacterianos resistentes a ampicilina se prepararon extractos crudos de Escherichia coli para determinar actividad enzimática. Los resultados no mostraron actividad de invertasa en ninguno de los clones ensayados.

B.- Saccharomyces cerevisiae: los transformantes de levadura *trp1⁺* obtenidos se sometieron a un régimen de cultivo adecuado para determinar su capacidad para

utilizar sacarosa como única fuente de carbono. En la tabla 8 se muestra el crecimiento de las colonias transformadas y la cepa receptora en los medios de cultivo diferencial. En condiciones, anaeróbicas el crecimiento en el caldo base con púrpura (Difco) es posible si el microorganismo fermenta el hidrato de carbono disponible en el medio.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la actividad enzimática asociada a las células intactas (extracelular) y la actividad detectada en los extractos crudos (intracelular). Los controles con la cepa MR17A no muestran actividad enzimática detectable con el ensayo utilizado en este estudio.

6.2 Análisis Inmunológico

La actividad de invertasa detectada en los transformantes de levadura sugiere que los fragmentos insertados podrían llevar el gen estructural para la enzima o bien una mutación supresora que afecta los genes SUC. Para establecer que los transformantes de levadura sintetizan un producto génico similar a invertasa de Neurospora se realizaron dos ensayos inmunológicos: i) Inmunodifusión radial doble e ii) inmunolectroforesis. En la figura 18 se muestra que el suero inmune anti-invertasa precipita antígeno(s) presentes en los extractos crudos de los

TABLA 8

Crecimiento de Saccharomyces cerevisiae cepa MR17A en medio selectivo

Cepa	Medio púrpura ¹		Medio mínimo ²
	Anaerobiosis	aerobiosis	
MR17A	-	-	-
MR17A/YRp7	-	+	-
MR17A/pNC1	+	+	+
MR17A/pNC2	+	+	+

1 = Caldo base con púrpura (Difco), para determinar utilización de azúcares en anaerobiosis o aerobiosis. Se utilizó sacarosa al 1%. La anaerobiosis se consiguió adicionando la fracción P₂ de E. coli. La incubación se realizó a 30°C por 96 h.

2 = En el medio mínimo se utilizó base de nitrógeno para levaduras (Difco), suplementado con sacarosa y los requerimientos metabólicos de la cepa excepto triptófano para el caso de las cepas con plásmido

TABLA 9

Actividad de invertasa en los transformantes (SUC⁺) de Saccharomyces cerevisiae con DNA plasmidial

Cepa	Act. extracelular (U)	Act. intracelular (U)
MR17A	0.0	0.0
MR17A/YRp7	0.0	0.0
MR17A/pNC1	2.96	14.0
MR17A/pNC2	2.67	17.0

Los transformantes se crecieron en medio mínimo sacarosa por 48 h a 30°C con excepción de los controles que se crecieron en medio mínimo glucosa. La actividad enzimática extracelular se determinó en células intactas. Los azúcares reductores se determinaron por el método del DNS. U = mg de azúcares reductores/ml/h a 37°C.

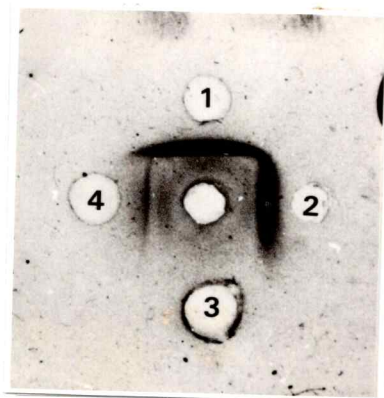


Figura 18:

Inmunodifusión radial doble con el suero inmune anti-invertasa de Neurospora crassa 74A: La reacción inmunológica se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 0.01M pH 8.0 . En el orificio central se colocó 5 μ l de suero inmune. En los orificios laterales se colocó 5 μ l de 1) y 2) invertasa purificada de Neurospora crassa (1 μ g); 3) extracto crudo de Saccharomyces cerevisiae MR17A (pNC1) y 4) extracto crudo de Saccharomyces cerevisiae MR17A (pNC2).

transformantes obtenidos con el plásmido pNC2. En la figura 19 se muestra una inmunoelectroforesis de los extractos crudos de Saccharomyces cerevisiae y Escherichia coli en agarosa al 1% en presencia del suero inmune anti-invertasa. Los resultados indican que las bacterias que portan los plásmidos pNC1 y pNC2 (carril b y c) no difieren del control con YRp7 (carril a). Este resultado sugiere que no hay producto génico inmunológicamente relacionado con invertasa de N. crassa.

Cuando se comparan los extractos crudos de levadura con sus respectivos controles se observa que los transformantes con pNC2 (carril h) dan una banda de precipitación similar a la obtenida con el extracto crudo de Neurospora crassa 74A (carril i). Los transformantes obtenidos con pNC1 dan una banda de precipitación similar al control de levadura que porta el plásmido YRp7 (carril f). La cepa control de levadura utilizada como receptor en los experimentos de transformación no muestra banda de precipitación (carril e). Consistentemente con lo esperado esta cepa no posee un producto génico inmunológicamente relacionado con la invertasa de N. crassa. Como control positivo del ensayo inmunológico se utilizó una preparación enzimática purificada. En este ensayo la migración de la banda de precipitación es una medida de la concentración del antígeno en la muestra.

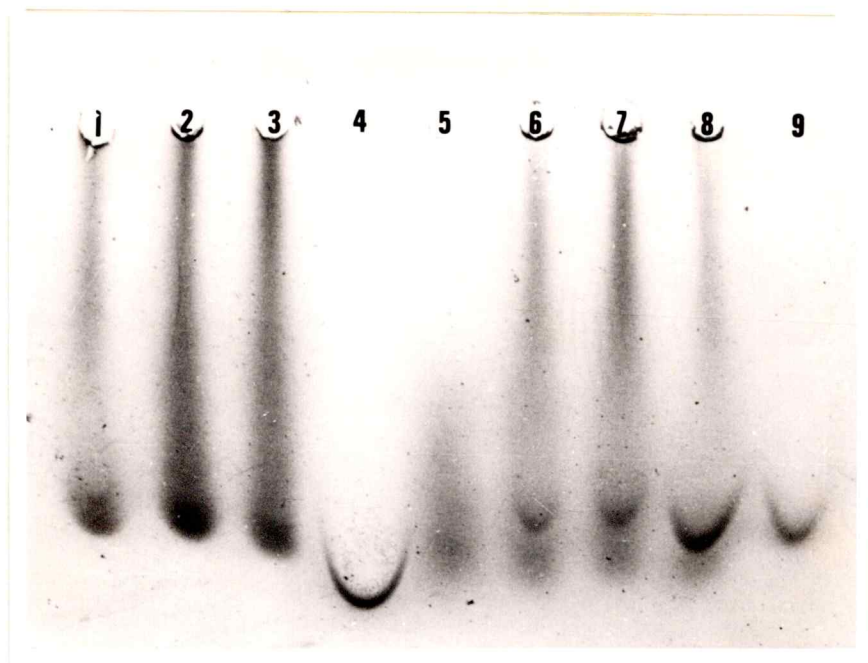


Figura 19:

Inmunoelectroforesis de extractos crudos: La inmunoelectroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón Tris-HCl 0.01M pH 8.0 en presencia de suero inmune anti-invertasa. Los pocillos se cargaron con 20 μ l de extracto crudo de: 1) *E. coli* C600 (YRp7), 2) *E. coli* C600 (pNC1); 3) *E. coli* C600 (pNC2); 4) invertasa de *N. crassa* purificada (2 μ g); 5) *S. cerevisiae* MR17A; 6) *S. cerevisiae* MR17A (YRp7); 7) *S. cerevisiae* MR17A (pNC1); 8) *S. cerevisiae* MR17A (pNC2); e 9) *N. crassa* 74-A.

6.3 Transformación genética de Neurospora crassa

La cepa mutante de Neurospora crassa *inv⁻* se utilizó como receptor en los experimentos de transformación ya sea con DNA cromosómico o DNA plasmidial.

Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para utilizar sacarosa como única fuente de carbono. En la tabla 10 se indican los valores de actividad enzimática obtenidos en los transformantes con DNA cromosómico y en la tabla 11 los valores obtenidos para transformantes con DNA plasmidial. En todos los casos ensayados la actividad enzimática detectada es similar a la obtenida con el control 74A, cuando las colonias son homocarióticas.

Las frecuencias de transformación obtenidas para N. crassa cuando se usa DNA cromosómico total se indican en la tabla 12 y DNA plasmidial recombinante en la tabla 13. En el primer caso la frecuencia de transformación es ligeramente superior a la frecuencia de reversión de la mutación *inv⁻* a *inv⁺* por lo tanto las colonias obtenidas pueden corresponder a transformantes o revertantes. En el segundo caso la frecuencia de transformación es superior a los valores de frecuencia de reversión.

TABLA 10

Actividad de invertasa de los transformantes (inv⁺) de Neurospora crassa con DNA cromosómico de la cepa silvestre 74A

Transformante	Act. Esp. invertasa U/mg de proteína	ug de prot./ml
tn-1 A	1.50	62
tn-2 A	1.51	76
tn-3 A	1.69	62
tn-15 A	1.69	58
tn-16 A	1.62	74
tn-18 a	1.54	78
inv-A	0.00	58
74-A	1.68	69

Las colonias transformadas se sembraron en medio mínimo suplementado con maltosa al 0.5% y se crecieron por 72 h. a 25°C. La actividad enzimática se determinó por el método del DNS para azúcares reductores. Una unidad (U) = mg de azúcares reductores/ml/hr a 37°C.

TABLA 11

Actividades de los transformantes homocarióticos (*inv*⁺) de *Neurospora crassa* con DNA plasmidial recombinante.

Transformante	DNA	Act. Esp. invertasa U/mg de proteína
TN 7.4a	pNC2	1.69
TN 3.1a	pNC2	1.58
TN 3.11a	pNC2	1.74
TN 3.16A	pNC2	1.72
TN 3.2a	pNC2	1.69
TN 31.3a	pNC1	1.54
74-A (silvestre)	----	1.68

Las colonias transformadas se sembraron en medio mínimo suplementado con maltosa al 0.5% y se crecieron por 72 h. a 25°C. La actividad enzimática se determinó por el método de DNS para azúcares reductores. Una unidad (U) = mg de azúcares reductores/ml/min. a 37°C.

TABLA 12

Transformación de N. crassa (inv^{-}) con DNA cromosómico de la cepa silvestre 74A de N. crassa

Conidios tratados	$5-6 \times 10^7$
Frec. de transformación	$4-5 \times 10^{-7}$
Nº transformantes/ μ g DNA	0.4
Frec. de reversión	1×10^{-7}

Los conidios se trataron con acetato de litio 0.1 M y se transformaron con 8-10 μ g de DNA (Métodos, sección 17.3). Los conidios transformados se plaquearon en medio selectivo a una concentración de $1-2 \times 10^6$ conidios/placa y se incubaron a 30°C.

TABLA 13

Transformación de *N. crassa* (inv^-) con DNA plasmidial

DNA	Tamaño del plásmido (Kb)	Nº transf./µg DNA
-	-	0
YRp7	5.8	0
pNC1	9.2	20-24
pNC2	13.4	45-50
cromosómico	4-20	0.1-0.4

Los conidios se trataron con acetato de litio 0.1 M y se transformaron con 8-10 µg de DNA (Métodos, sección 17.3). Los conidios tratados se plaquearon a una densidad de 1-2 x10⁶ conidios/placa y se incubaron a 30°C.

7.- Análisis de los transformantes de Neurospora crassa

La cepa de Neurospora crassa *inv⁻* se transformó con DNA cromosómico lineal proveniente de la cepa silvestre 74A y DNA plasmidial (pNC1 y pNC2). Los transformantes de Neurospora crassa, subcultivados en medio mínimo, no siempre presentaban actividad de invertasa. Estos transformantes abortivos que perdían la capacidad de crecer en sacarosa representan el 50% en los experimentos de transformación con DNA de pNC1 y un 30-35% cuando se transforma con pNC2. Los cálculos de frecuencia de transformación no incluyen a estos transformantes abortivos. Los transformantes estables que se aislaron resultaron ser heterocarióticos en su mayoría, debido a que se usaron macroconidios como receptores en la transformación. Para obtener transformantes homocarióticos *inv⁺* se realizaron rutinariamente cruzamientos entre las colonias *inv⁺* seleccionadas y la cepa mutante *inv⁻*. En la tabla 14 se muestra el grado de heterocariosis de las colonias iniciales. La proporción nuclear del micelio transformado se determinó a partir de la relación de esporas *inv⁻* : *inv⁺* en la progenie. Los resultados indican la presencia de micelios heterocarióticos con diferentes proporciones nucleares y micelios homocarióticos, estos últimos probablemente se producen como resultado de la transformación de un conidio

uninucleado. La progenie de un cruzamiento entre el mutante inv^- y un micelio homocariótico invariablemente dará una proporción de $1 inv^- : 1 inv^+$.

No siempre se obtuvieron transformantes homocarióticos, en algunos casos la progenie del cruzamiento indicado no tenía esporas con el fenotipo transformado.

7.1 Presencia del DNA transformante en el genoma de la cepa receptora

Con el propósito de determinar la presencia de DNA transformante en el genoma de la cepa receptora se realizó la hibridación de DNA plasmidial: DNA cromosómico de algunos transformantes.

En la figura 20 se muestra una autorradiografía del DNA de los transformantes y el control hibridado con DNA del plásmido pNC2 marcado con $^{32}P-\alpha$ ATP.

Los transformantes T3.4, T3.11 y T3.1 (Fig 20 carril a, b y c respectivamente) se caracterizan por la presencia de 3 bandas de hibridación de aproximadamente 12, 8, y 1.4 Kb. Son de especial interés las bandas de 12 y 1.4 Kb las cuales comigran con los fragmentos PstI del plásmido pNC2 (carril h).

Considerando el patrón de bandas de los transformantes se podría sugerir al menos dos tipos de transformación:

TABLA 14

Proporción de núcleos en los transformantes de *N. crassa*.

Cruzamiento	Relación de esporas inv ⁺ : inv ⁻	Proporción de núcleos
* T7.4a x inv ⁻ A	1 : 3	1 inv ⁻ : 1 inv ⁺
* T3.1a x inv ⁻ A	1 : 1	0 inv ⁻ : 1 inv ⁺
* T3.11a x inv ⁻ A	1 : 1	0 inv ⁻ : 1 inv ⁺
* T3.16A x inv ⁻ a	1 : 5	2 inv ⁻ : 1 inv ⁺
** T31.3a x inv ⁻ A	1 : 14	6 inv ⁻ : 1 inv ⁺
74A x inv ⁻ a	1 : 1	0 inv ⁻ : 1 inv ⁺

(*) Transformante con pNC2

(**) Transformante con pNC1

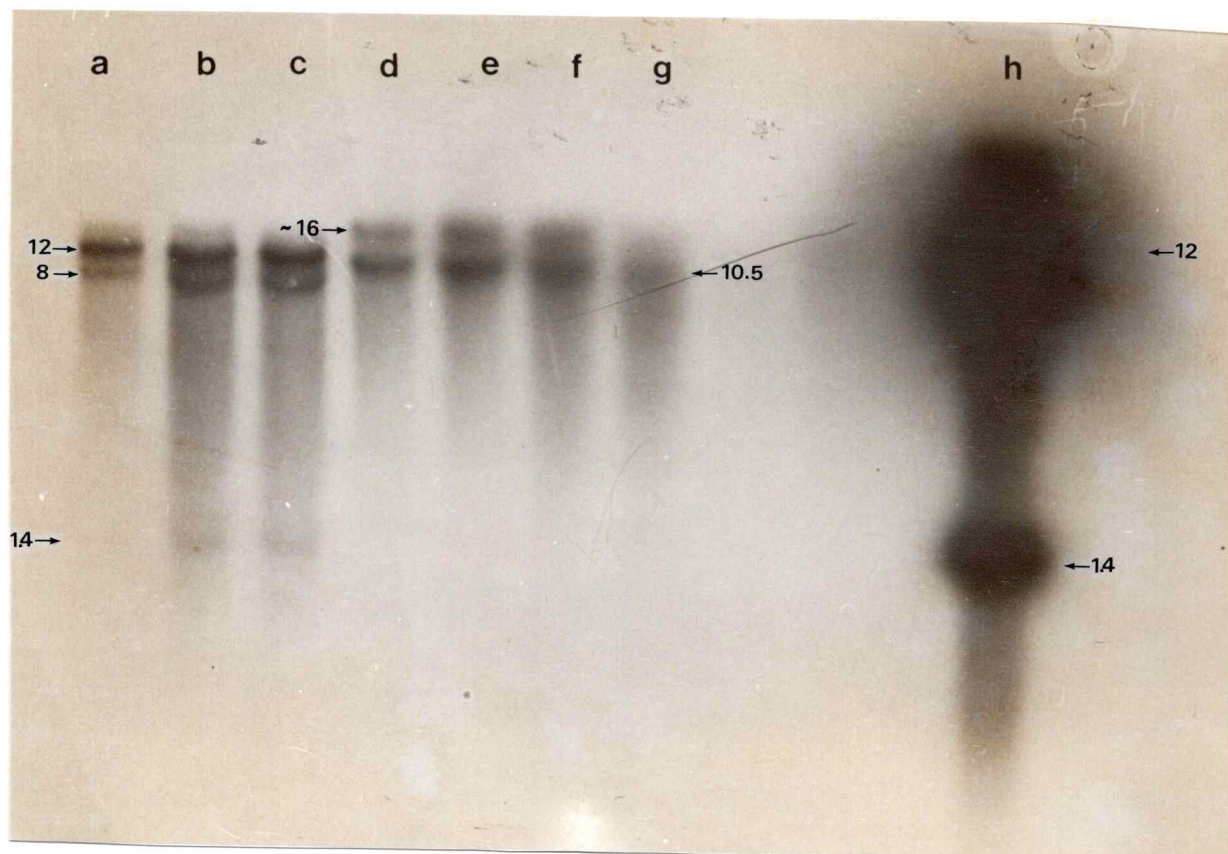


Figura 20:

Autorradiografía del DNA de los transformantes hibridado con DNA de pNC2 marcado con ^{32}P - α ATP: El DNA cromosómico (2-4 μg) de los transformantes de *Neurospora crassa* se digirió con la endonucleasa Pst I. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa por el método de Southern (Método, sección 11). El DNA cromosómico se hibridó con DNA plasmidial (pNC2) marcado con ^{32}P . a) T3.4; b) T3.11; c) T3.1; d) T3.16; e) T7.4; f) T3.47; g) inv^- y h) pNC2 + Pst I.

a) Transformación sin integración: El DNA plasmidial se mantiene en forma extracromosómica.

b) Transformación con integración: El DNA plasmidial se integra en el genoma de la cepa receptora.

Para distinguir entre estos dos procesos se realizaron experimentos de transformación de Escherichia coli con DNA total de los transformantes de Neurospora crassa. Ninguna de las muestras de DNA ensayadas dio transformantes resistentes a ampicilina, lo cual indicaría que el DNA no se mantiene extracromosómico. Otro resultado que apoya lo anterior es el patrón de bandas. A pesar que dos de ellas comigran con el DNA plasmidial, la tercera banda presente es de menor tamaño que la banda de hibridación que se encuentra en la cepa receptora (Fig 20 carril g). Por lo tanto no corresponde a la banda de la cepa receptora y sería mas bien un producto de digestión diferente de DNA cromosómico .

Si la transformación ocurre por integración del DNA plasmidial en el genoma del huésped, entonces el patrón de bandas de los transformantes debe mostrar al menos la presencia del fragmento PstI de menor tamaño. El fragmento PstI de 1.4 Kb corresponde a un segmento del plásmido vector (YRp7) por lo tanto su presencia en la autorradiografía indicaría que la transformación ocurrió con inserción de la molécula de DNA plasmidial.

En la figura 21 se muestran los eventos de recombinación que permiten la integración del gen *inv*⁺ y del plásmido vector y las bandas resultantes como consecuencia de la digestión con la enzima PstI. Los resultados de estos tres transformantes son compatibles con una integración ligada con duplicación.

Los transformantes T3.16, T7.4 y T3.47 (Fig 20 carril d, e y f) presentan 2 bandas de hibridación. La banda de menor tamaño (aprox. 10.5 Kb) comigra con la banda del control. Este resultado sugiere que la integración del DNA transformante no ocurre ligada al locus *Inv* y que la inserción está acompañada de al menos dos eventos de crossing-over de tal manera que el DNA vector no se integra en el genoma. En la figura 22 se esquematizan los eventos probables para una transformación no-ligada. En la figura 23 se indican los resultados esperados si la transformación ocurriera por reemplazo del alelo mutante por el alelo silvestre *inv*⁺.

7.2 Análisis de ligamiento de los transformantes de Neurospora

Se establecieron las relaciones de ligamiento entre el locus *Inv* y *al-3* para algunos transformantes. En la tabla 15 se muestran los valores de recombinación obtenidos para transformantes con DNA cromosómico

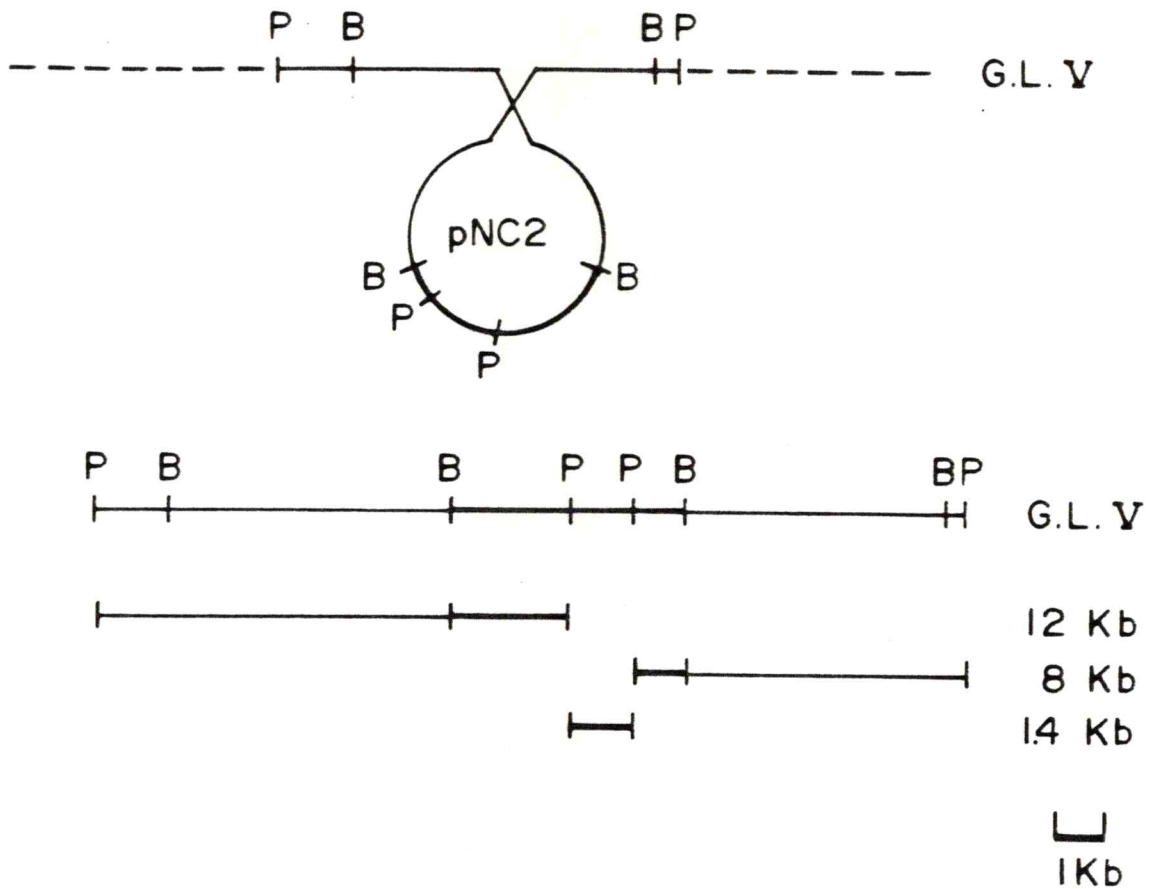


Figura 21

Esquema de los eventos de recombinación en la integración del DNA plasmidial ligada al locus *Inv* en el grupo de ligamiento V (G.L.V). Las bandas inferiores representan los productos de digestión del DNA cromosómico con la enzima PstI (P). B=BamHI

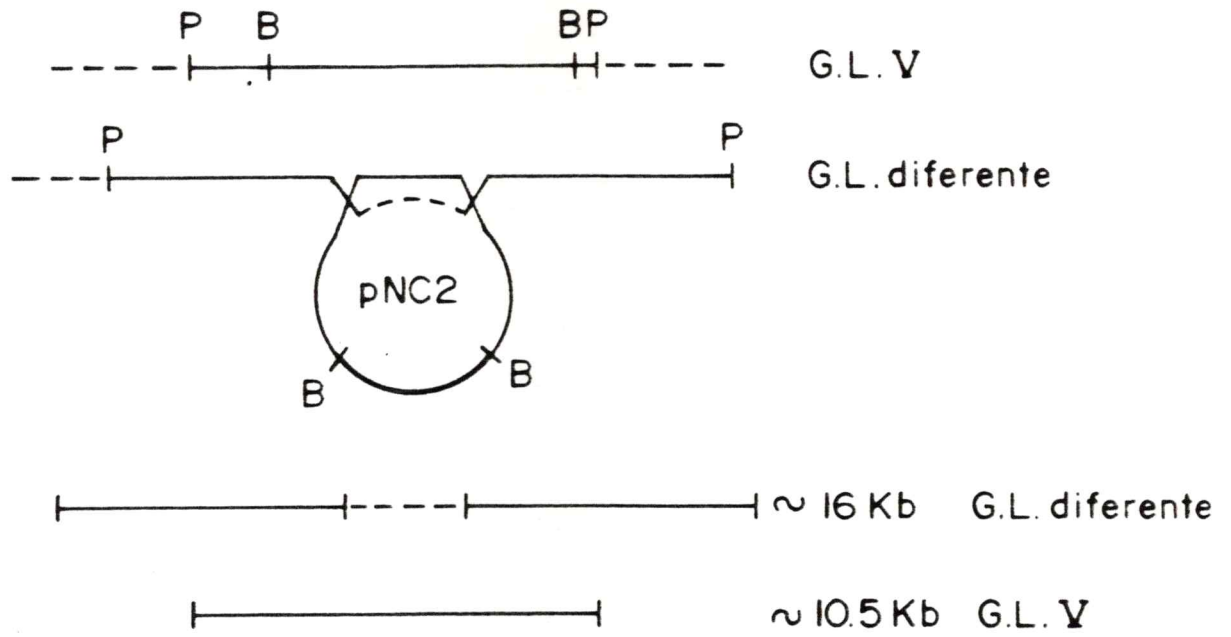


Figura 22

Esquema de los eventos de recombinación en una transformación por reemplazo o disrupción no-ligada al locus *Inv* (Grupo de ligamiento diferente de GL V): Las bandas inferiores representan los productos de digestión del DNA cromosómico con la enzima PstI (P). B=BamHI.

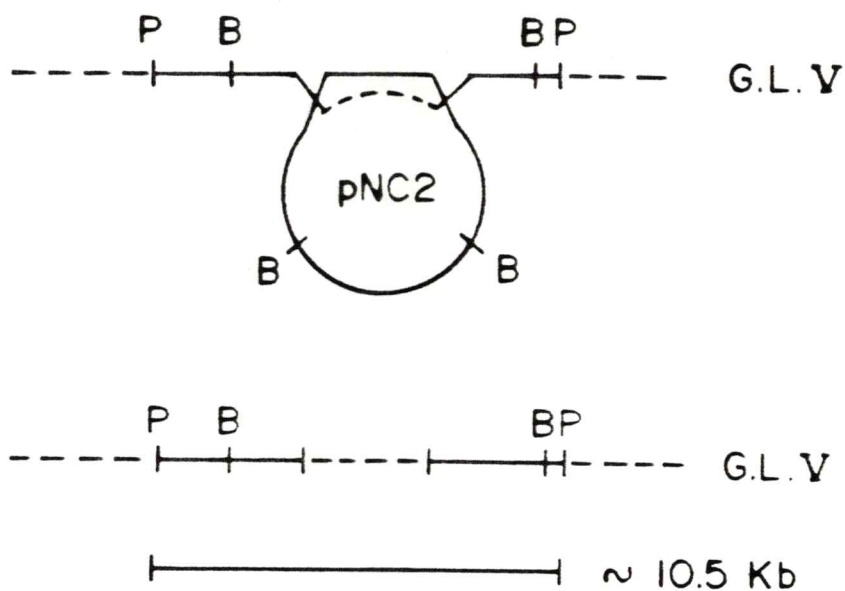


Figura 23

Esquema de los eventos de recombinación en una transformación por reemplazo ligada al locus *Inv*. La banda inferior representa el producto de digestión del DNA cromosómico con la enzima PstI (P). B=BamHI.

Tabla: 15 Análisis de ligamiento de los transformantes con DNA cromosómico
Fenotipos de las esporas

Cruzamiento	al ⁺ , inv ⁺	al ⁺ , inv ⁻	al ⁻ , inv ⁺	al ⁻ , inv ⁻	Total	% Recombinación
al 3A x inv ⁻	19	84	67	13	183	17,4%
tn 1A x al-3, inv ⁻ a	99	15	14	76	204	14,2%
tn 2A x al-3, inv ⁻ a	58	10	9	43	120	15,8%
tn 3A x al-3, inv ⁻ a	56	12	8	48	124	16,1%
tn16A x al-3, inv ⁻ a	41	8	11	52	112	16,9%

lineal de Neurospora crassa. Los valores de recombinación indican que hay ligamiento entre los loci *inv* y *al-3* similar al encontrado en la cepa silvestre 74A. Según estos resultados el mecanismo de transformación podría ser por reemplazo del gen mutante *inv*⁻ por su alelo silvestre (Fig. 23) o por inserción ligada al gen mutante *inv*⁻. Este último caso es poco probable dado que en los cruzamientos entre los transformantes y la cepa silvestre 74A o 77a no se observó segregación del gen mutante *inv*⁻ con respecto de su alelo silvestre. El análisis se realizó sobre un promedio de 180-200 esporas. En la figura 24 se indican los resultados de ligamiento esperados para una transformación por reemplazo con los correspondientes genotipos de las esporas. Considerando los resultados de ligamiento y la frecuencia de transformación ($4-5 \times 10^{-7}$) obtenida con DNA lineal, la cual es del mismo orden de magnitud que la tasa de reversión de la mutación *inv*⁻ a *inv*⁺, no es posible distinguir entre estos dos eventos genéticos.

Los resultados de ligamiento obtenidos para los transformantes con DNA plasmidial se detallan a continuación.

A.- Transformante con DNA de pNC1. En la tabla 16 se muestra un ejemplo para un transformante con este plásmido denominado T31.3a. Los resultados del cruzamiento entre T31.3a x *inv*⁻,*al-3A* indican que el

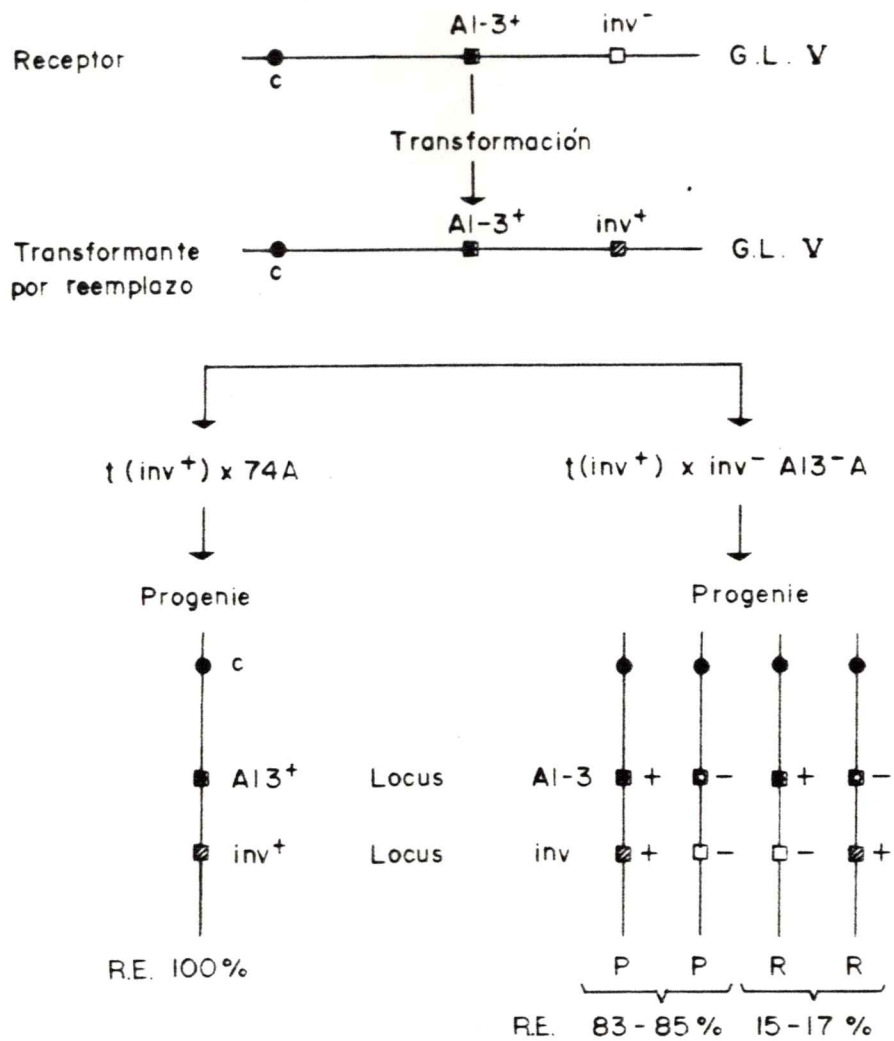


Figura 24

Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento para una transformación por reemplazo del alelo mutante inv^- . c = centrómero; R.E. = resultados esperados; G.L. = grupo de ligamiento; P = genotipos parentales; R = genotipos recombinantes.

Tabla: 16 Análisis de ligamiento de los transformantes con DNA plasmidial
Fenotipos de las esporas

Cruzamiento	al ⁺ , inv ⁺	al ⁺ , inv ⁻	al ⁻ , inv ⁺	al ⁻ , inv ⁻	Total	% Recombinación
al 3A x inv ⁻	19	84	67	13	183	17,4%
T7.4a x al-3, inv ⁻ A	76	56	40	48	220	43,6%
T3.1a x al-3, inv ⁻ A	84	24	18	72	198	21,2%
T3.11a x al-3, inv ⁻ A	82	14	17	76	189	16,4%
T3.16A x al-3, inv ⁻ a	42	53	30	54	179	46,7%
T31.3a x al-3, inv ⁻ a	78	15	13	69	172	15,7%

gen *inv*⁺ está ligado al locus *al-3* a una distancia de 15.7 u.m. La evidencia inmunológica indica que el plásmido pNC1 no codifica para un producto génico relacionado con la enzima invertasa, sin embargo el plásmido puede transformar la cepa *inv*⁻ de Neurospora. Los resultados de segregación del gen *inv*⁻ se muestran en la tabla 17 y son compatibles con una transformación por supresión del gen *inv*⁻ como se esquematiza en la figura 25. Sin embargo, los datos obtenidos no son suficientes para concluir que el fragmento clonado en pNC1 lleva un gen supresor.

B.- Transformantes con DNA de pNC2: Los transformantes obtenidos con este plásmido se denominaron T7.4a, T3.1a, T3.11a y T3.16a. Los porcentajes de ligamientos (Tabla 16) sugieren que hay al menos dos tipos de transformantes.

i) Transformación por reemplazo o inserción no-ligada: En este caso el gen *inv*⁺ aparece segregando independientemente del locus *al-3*. Ejemplo de este tipo de transformación son T7.4a y T3.16A.

ii) Transformación por reemplazo o por inserción ligada: El porcentaje de recombinación de 16.4% y 21.2% (Tabla 16) indica que las combinaciones alélicas parentales en los dos loci tienden a permanecer juntas en la progenie. Ejemplo de este tipo de transformante son T3.11a y T3.1a.

Tabla: 17 Segregación del gen inv^- en cruzamientos de los transformantes con la cepa silvestre 74A
Fenotipo de las esporas

Cruzamiento	inv^+ (%)	inv^- (%)	Total	% de Infertilidad
T7.4a x 74A	102 (79.6)	26 (20.3)	128	53.6
T3.1a x 74A	116 (96.7)	4 (3.3)	120	53.8
T3.11a x 74A	178 (98.9)	2 (1.1)	180	44.4
T3.16A x 77a	75 (73.6)	27 (26.4)	102	45.2
T31.3a x 74A	101 (68.7)	46 (31.3)	147	80.8
77a x 74A	79 (100)	0 (0)	79	32.5

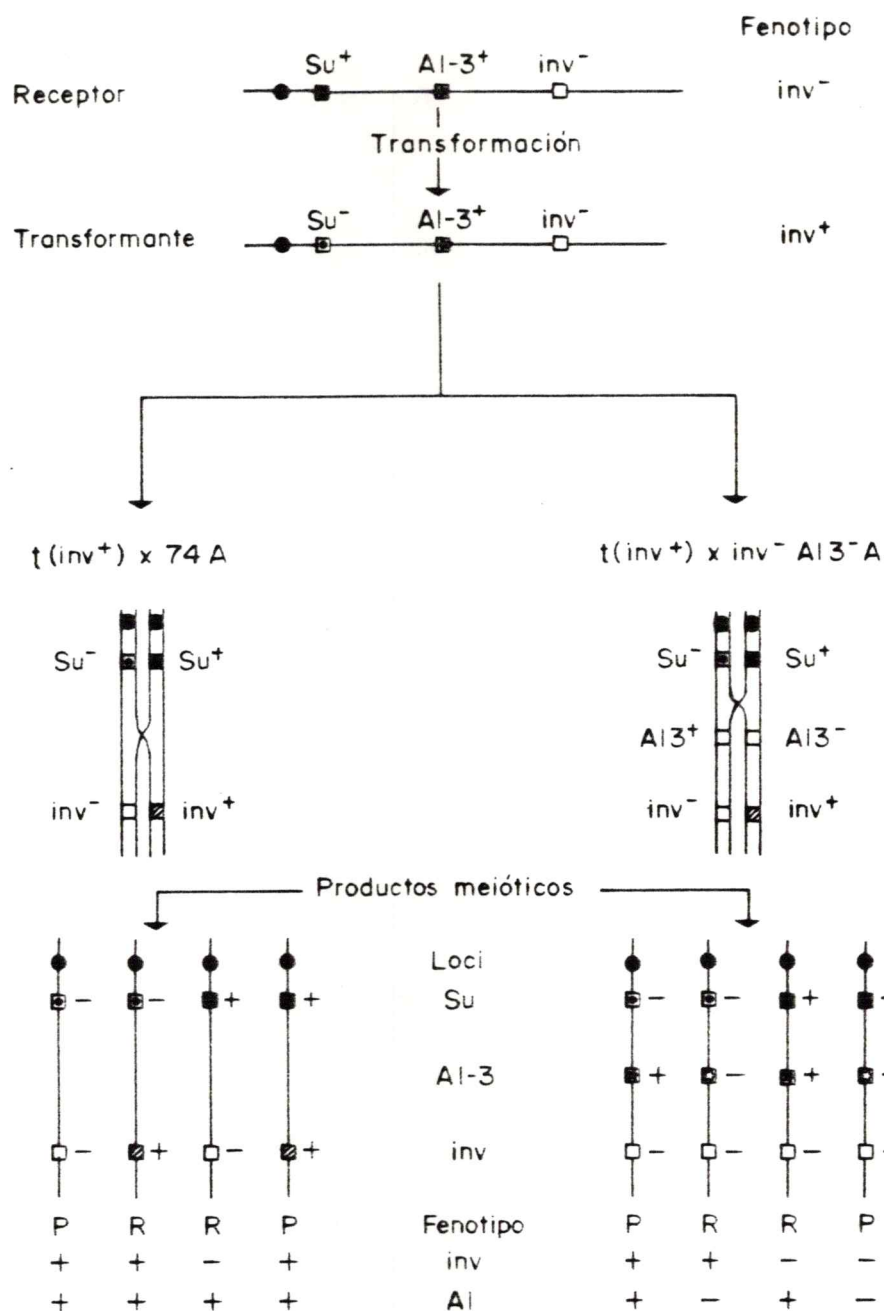


Figura 25

Resultados esperados en el análisis genético para una transformación por un gen portador de una mutación supresora intergénica. Su = mutación supresora del alelo inv^- .
 R = genotipos recombinantes; P = genotipos parentales.

Para distinguir entre una inserción o reemplazo se determinó si en el genoma del transformante existe aún la copia del gen *inv⁻*. En la figura 24 se muestra un esquema de transformación por reemplazo y los resultados esperados en cruzamientos con las cepas probadoras.

En todos los transformantes analizados se encuentran esporas *inv⁻* en la progenie, esto indicaría que la transformación ocurre por inserción del gen *inv⁺* sin pérdida de la copia *inv⁻* en el genoma de la cepa receptora. Si se produce duplicación del gen *inv*, las copias del gen deberán segregarse durante el proceso meiótico que experimenta el cigoto para la formación de esporas. En la tabla 17 se muestra la relación porcentual de esporas *inv⁻* e *inv⁺* en los cruzamientos para los distintos transformantes analizados. La figura 26 muestra un esquema de los eventos de crossing-over y las combinaciones alélicas resultantes ya sea para i) inserción ligada al locus *inv* o ii) inserción no-ligada al locus *inv*. En ambos casos el gen *inv⁺* aparece ligado al locus *al-3* (Ej. T3.1a).

En la figura 27 se muestra un esquema de transformación por inserción no-ligada. En este caso el gen *inv⁺* transformante se insertaría en otro grupo de ligamiento.

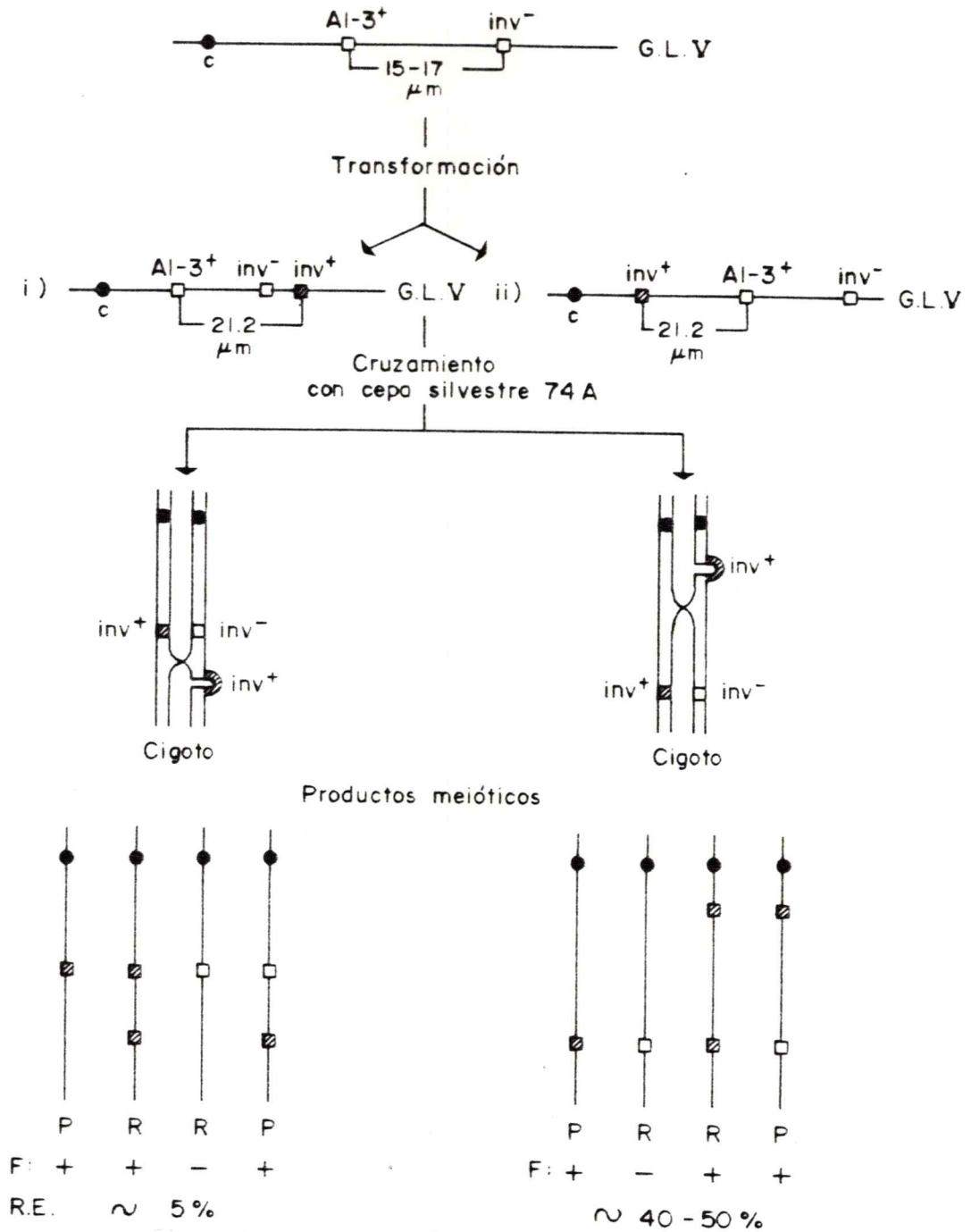


Figura 26

Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento y segregación del gen inv^+ en una transformación por integración ligada al locus inv .
 c= centrómero; G.L.= grupo de ligamiento; P= genotipos parentales; R= genotipos recombinantes; R.E.= resultados esperados; F= fenotipo.

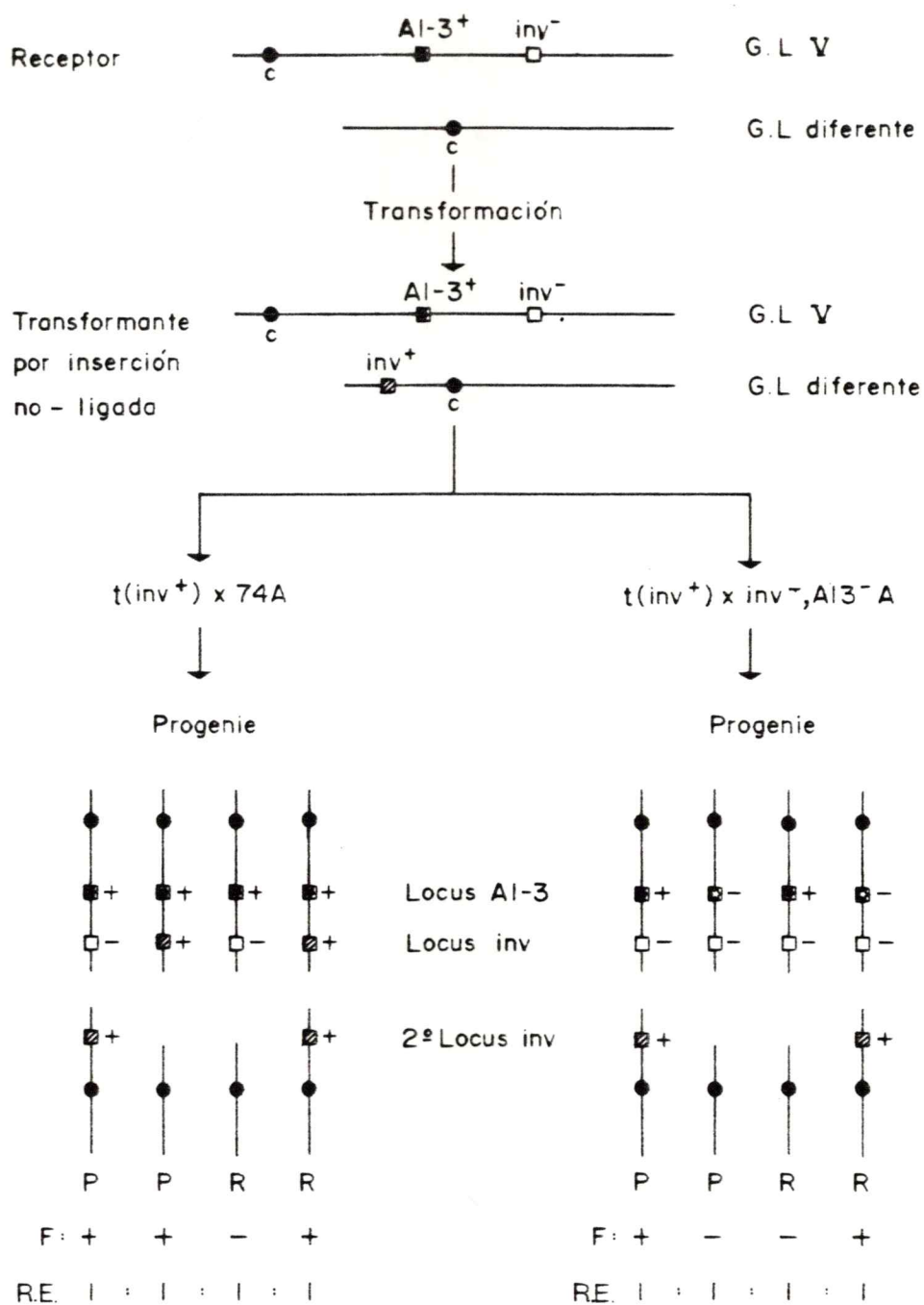


Figura 27

Resultados esperados en el análisis genético de ligamiento y segregación del gen *inv*⁺ en una transformación por reemplazo no-ligada al locus *inv*.

c = centrómero; G.L. = grupo de ligamiento; P = genotipos parentales; R = genotipos recombinantes; F = fenotipo.

8.- Determinación de la ubicación del gen de invertasa en el inserto de pNC2.

Con el propósito de determinar la ubicación del gen estructural de invertasa en el inserto del plásmido pNC2, se procedió a subclonar diferentes sectores de la molécula. En la figura 28 se indican los subclones obtenidos.

8.1 Construcción del subclón pNC2.1

El subclón pNC2.1 corresponde a un plásmido híbrido con una deleción del fragmento XhoI del inserto cromosómico. En la figura 29 se esquematiza la estrategia de deleción.

Con la mezcla de ligamiento se transformó Escherichia coli C600 y se seleccionaron transformantes amp^r y tc^r. El DNA de las colonias aisladas se analizó por electroforesis en geles de agarosa. De entre ellas se aisló las que poseían un plásmido con un inserto de tamaño menor que el de pNC2 y además se caracterizara por poseer un sitio para la enzima XhoI. En la figura 30 se muestra la electroforesis de los productos de digestión del subclón pNC2.1 el cual ha perdido el fragmento XhoI interno del inserto. Al digerir el plásmido pNC2.1 con BamHI (carril b) se observa una banda de 5.8 Kb que corresponde al vector y que comigra

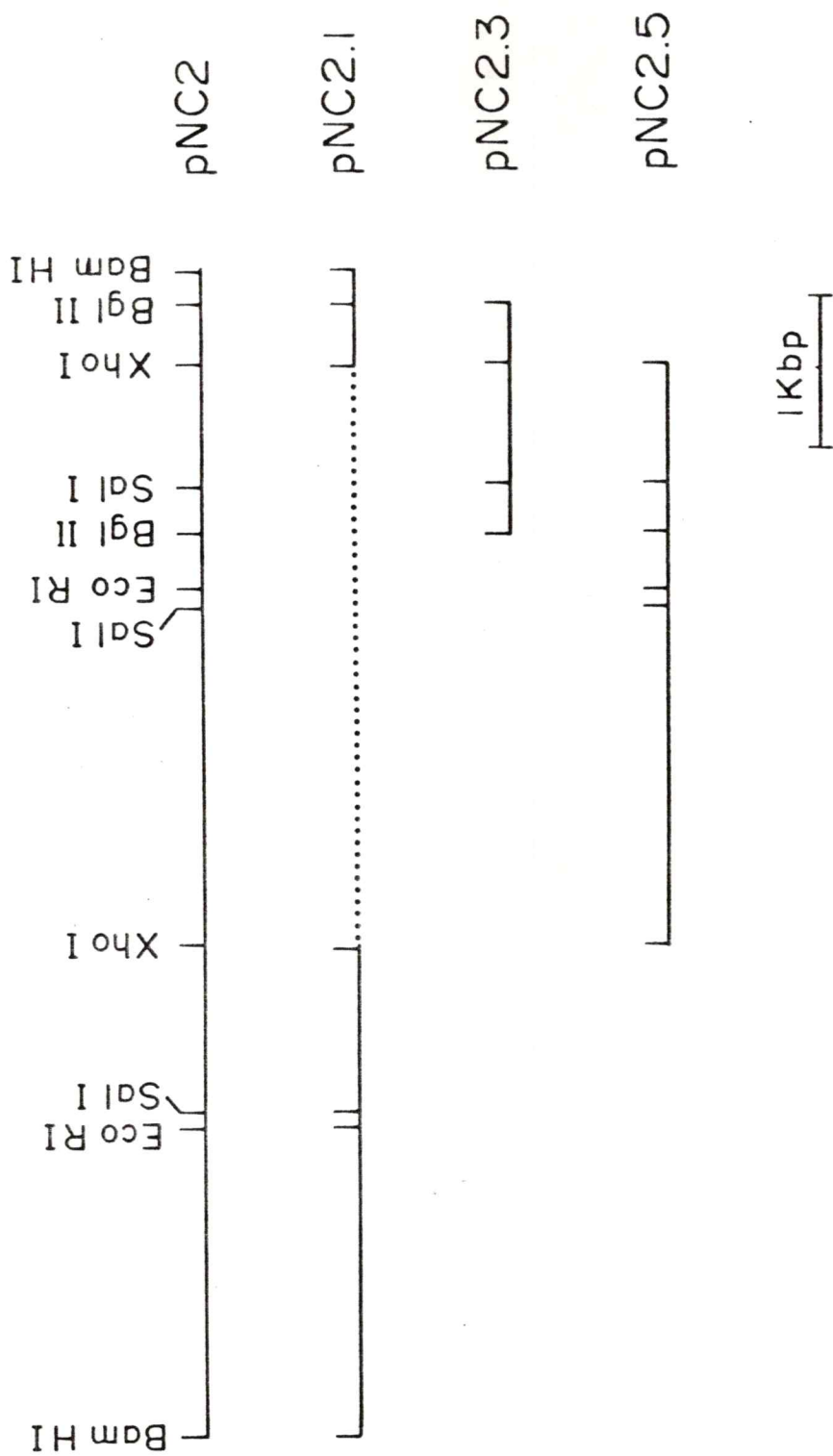


Fig. 28 Subclones del plásmido pNC2

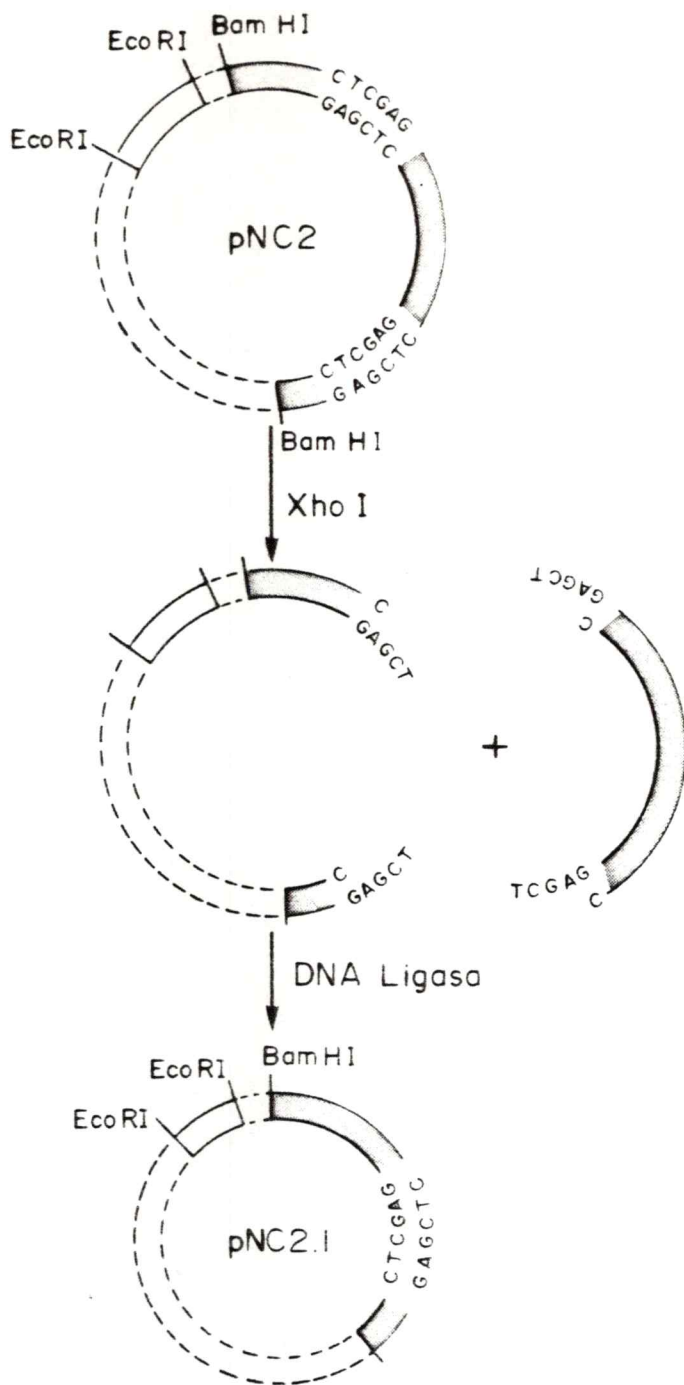


Figura 29

Esquema de la estrategia de delección del fragmento de restricción XhoI/XhoI del plásmido pNC2. DNA de YRp7 (-----); DNA de *S. cerevisiae* (=====); DNA de *N. crassa* (.....).

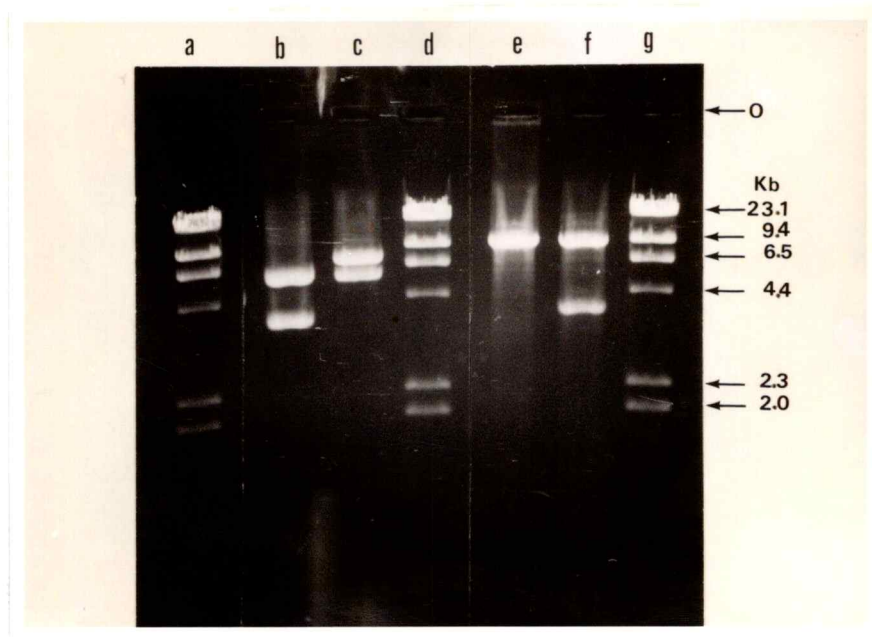


Figura 30

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión del DNA del subclón pNC2.1 y del plásmido pNC2: El DNA plasmidial obtenido por mini preparaciones de DNA (Métodos, sección 6.1.2) se trató con endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. a), d) y g) DNA del bacteriófago λ + Hind III b) pNC2.1 + BamH I, c) pNC2 + BamH I, e) pNC2.1 + Xho I, f) pNC2 + Xho I. O= origen del gel.

con la banda de menor tamaño generada por digestión de pNC2 con la misma enzima (carril c). Al comparar los insertos de ambos plásmidos se observa que pNC2.1 posee un inserto de menor tamaño que pNC2. Al digerir el DNA de pNC2.1 con XhoI (carril e) se genera una sola banda de 9.6 Kb que indica que la molécula de DNA posee un sitio para la enzima XhoI. En el carril f se muestran los productos de digestión de pNC2 con XhoI. La banda adicional de menor tamaño es la delecionada en pNC2.1.

8.2 Construcción del subclón pNC2.3

El subclón pNC2.3 se obtuvo mediante el subcloneamiento del fragmento BamHI/BglIII (1.5 Kb) del inserto de DNA cromosómico de Neurospora. Los plásmidos pNC2.2 y pNC2.4 no se obtuvieron en los ensayos de subcloneamiento. En la figura 31 se muestra un esquema del subcloneamiento molecular.

En la figura 32 se muestra la electroforesis de los productos de digestión del inserto. El fragmento BglIII/BamHI de 0.2 Kb no se detectó en el gel debido a su tamaño reducido. La caracterización de los plásmidos recombinantes se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. En la figura 33 se muestran los productos de digestión del subclón pNC2.3a. En el carril a se muestra el subclón pNC2.3a digerido con la

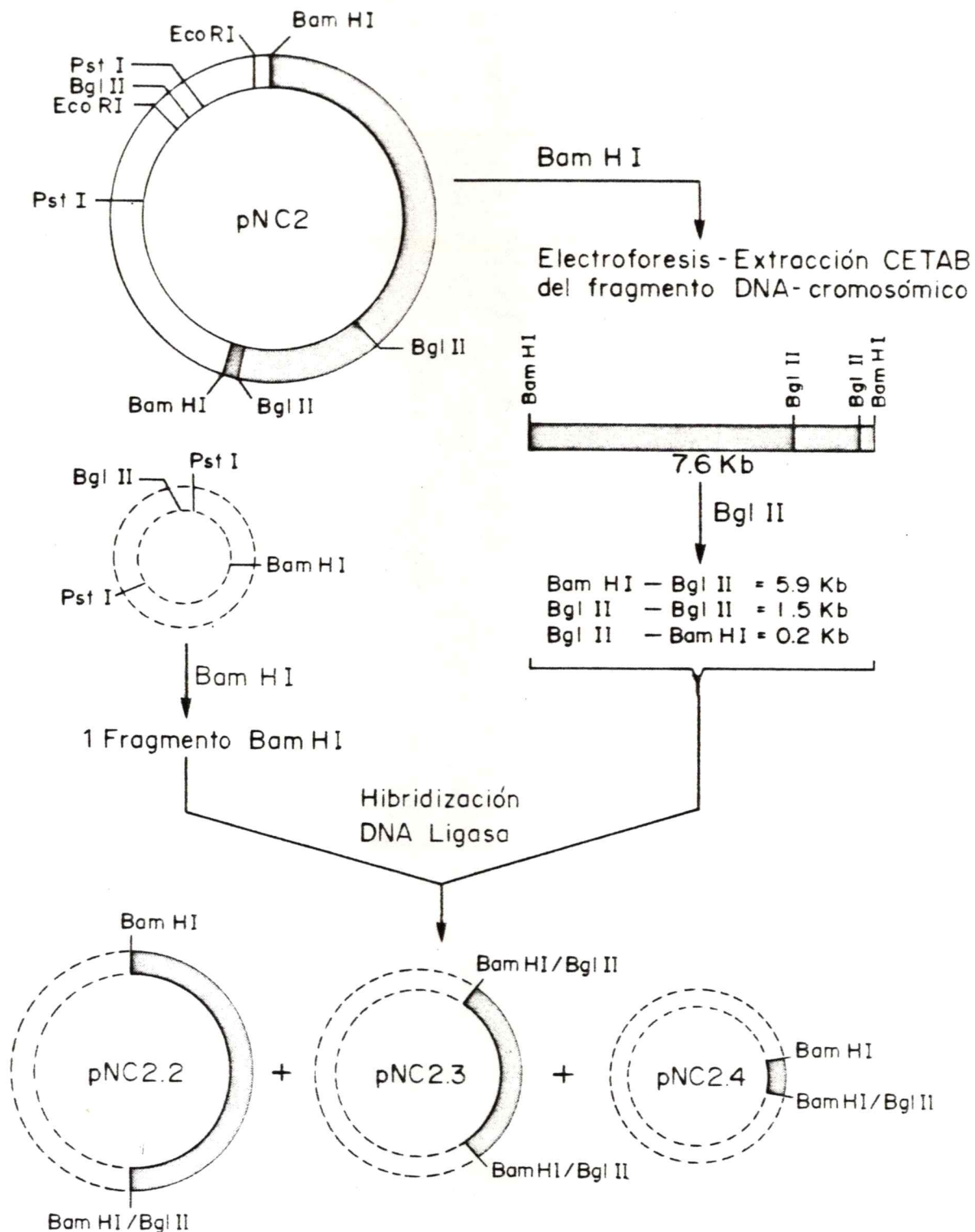


Figura 31

Esquema de la estrategia del subclonado de los fragmentos de restricción BamHI/ BglIII y BglIII/BglIII de pNC2. DNA de YRp7 (==); DNA de *N. crassa* (▨▨▨▨).

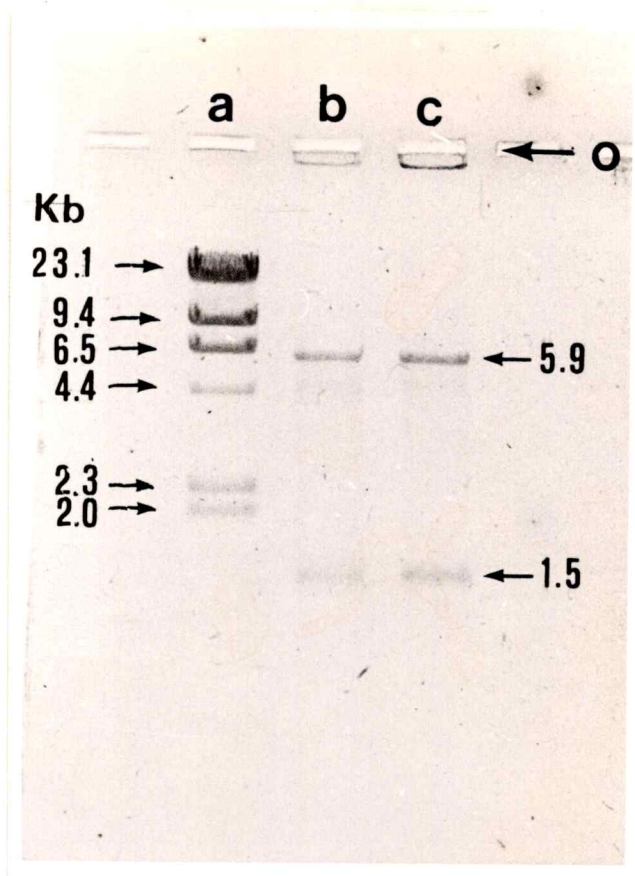


Figura 32:

Electroforesis en gel de agarosa del inserto de DNA cromosómico de Neurospora crassa: El DNA del plásmido pNC2 se digirió con la endonucleasa de restricción BamHI y se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. La banda correspondiente al inserto de DNA cromosómico se extrajo por CETAB y se digirió con la endonucleasa Bgl II. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en agarosa al 0.7%. a) DNA del bacteriófago λ + Hind III, b) y c) inserto de DNA cromosómico de N. crassa del plásmido pNC2 tratado con Bgl II.

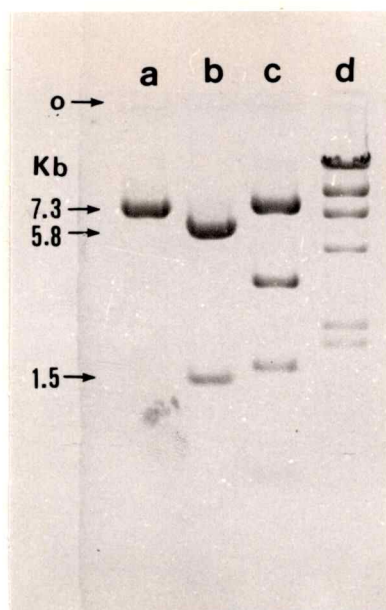


Figura 33:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA del subclón pNC2.3a y del plásmido pNC2: El DNA plasmidial obtenido por mini preparaciones (Métodos, sección 6.1.2) se trató con endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. a) pNC2.3a + Xho I, b) pNC2.3a + Sal I, c) pNC2 + Sal I y d) DNA del bacteriófago λ + Hind III. O = origen del gel.

endonucleasa XhoI. Se observa una sola banda de 7.3 Kb. Esto indica la presencia de un sitio para esta enzima. La restricción del plásmido con la enzima Sall nos revela la presencia de 2 sitios de reconocimiento para esta endonucleasa (carril b) Los fragmentos resultantes (5.8 y 1.5 Kb) permiten determinar la orientación del inserto. En este caso se orienta de igual manera que en el plásmido original y se designó como pNC2.3a para distinguirlo del plásmido pNC2.3b que lleva la orientación opuesta.

8.3 Construcción del subclón pNC2.5

El subclón pNC2.5 corresponde a un plásmido recombinante que lleva el fragmento XhoI del inserto cromosómico de pNC2. La figura 34 muestra los productos de restricción del subclón pNC2.5 comparados con los obtenidos con el plásmido original pNC2. La presencia de la banda de 0.8Kb en el subclón confirma el clonamiento del fragmento XhoI del inserto cromosómico. En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos para el subclón en ambas orientaciones: directa, pNC2.5a (carril d y f); e inversa, pNC2.5b (carril g).

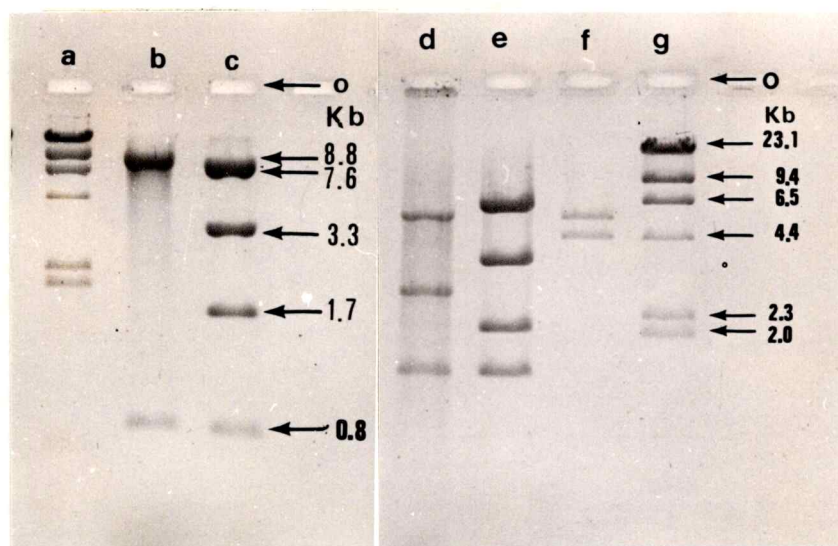


Figura 34:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA del subclón pNC2.5 y del plásmido pNC2: El DNA purificado por mini preparaciones (Métodos, sección 6.1.2) se trató con endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. a) DNA del bacteriófago λ + Hind III, patrón de migración para los carriles b y c; b) pNC2.5 + Sal I; c) pNC2 + Sal I; d) pNC2.5 + EcoR I; e) pNC2 + EcoR I; f) pNC2.5 + Bgl II y g) DNA del bacteriófago λ + Hind III. O = origen del gel.

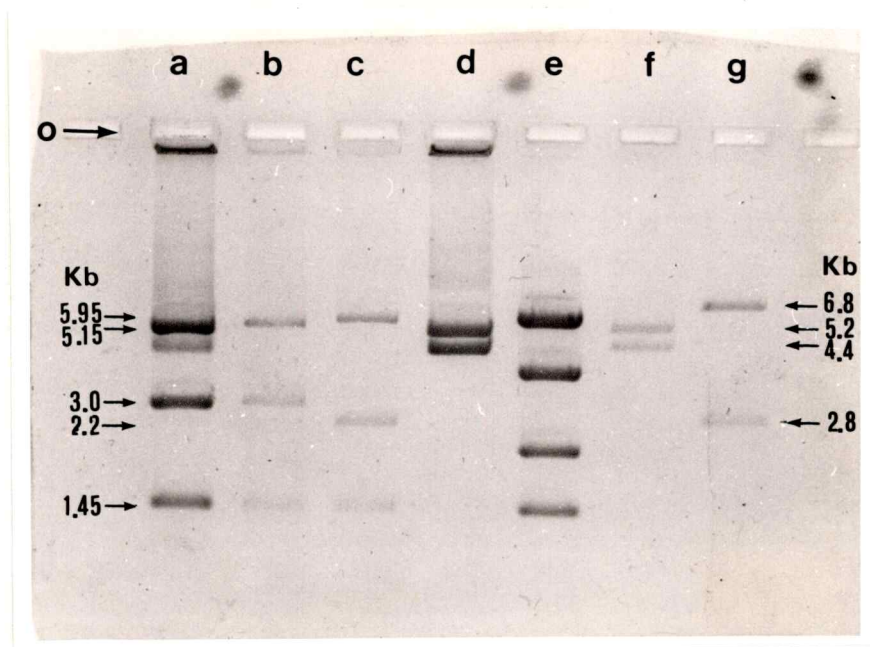


Figura 35:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA de los subclones pNC2.5a, pNC2.5b y del plásmido pNC2: El DNA purificado por mini preparaciones (Métodos, sección 6.1.2) se trató con endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a) pNC2.5a + EcoR I, b) pNC2.5a + EcoR I, c) pNC2.5b + EcoR I, d) pNC2.5a + Bgl II, e) pNC2 + EcoR I, f) pNC2.5a + Bgl II, g) pNC2.5b + Bgl II. O = origen del gel.

8.4 Transformación de Saccharomyces cerevisiae

La cepa MR17A de Saccharomyces cerevisiae se transformó con DNA de los subclones obtenidos de pNC2. Se seleccionaron transformantes prototróficos para triptófano. Las colonias seleccionadas se probaron para actividad de invertasa. En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes plásmidos recombinantes. El subclón pNC2.5 conserva la capacidad para transformar la cepa suc° en SUC^{+} , y es independiente de la orientación del inserto cromosómico.

TABLA 18

Transformación de *S. cerevisiae* MR17A con DNA plasmidial

DNA	Tamaño Molecular (Kb)	Transformantes inv ⁺
sin DNA	--	-
pNC2	13.4	+
pNC2.1	9.6	-
pNC2.3a	7.3	-
pNC2.5a	9.6	+
pNC2.5b	9.6	+

Los esferoplastos de la cepa MR17A se transformaron con 1-2 ug de DNA plasmidial. Los transformantes se seleccionaron por prototrofia para triptófano y luego se probaron para actividad de invertasa.

+ = reacción de invertasa positiva
 - = reacción de invertasa negativa.

D I S C U S I O N

1.- Cloneamiento del gen inv.

Un procedimiento para clonar genes de Neurospora crassa es mediante complementación funcional de mutaciones específicas de Saccharomyces cerevisiae. A partir de una población de DNA cromosómico de Neurospora insertado en un vector de levadura fue posible seleccionar un gen relacionado con la síntesis de invertasa.

Para el cloneamiento molecular del gen inv^+ de Neurospora crassa se utilizó una genoteca construida en el plásmido YRp7. Este plásmido es un híbrido entre DNA del plásmido bacteriano pBR322 (Bolivar *et al*, 1977; Balbás *et al*, 1986) y DNA cromosómico de Saccharomyces cerevisiae. El plásmido vector posee dos genes de resistencia bacteriana del pBR322 que permiten la selección de transformantes en Escherichia coli. El gen $trp-1$ de levadura permite la selección en S. cerevisiae. La presencia de la secuencia $ars-1$ permite que el vector se replique autónomamente en levadura (Tschumper *et al*, 1980).

El gen fue clonado por complementación genética funcional de una mutación suc^o de levadura. La cepa receptora MR17A de S. cerevisiae lleva dos mutaciones que

son necesarias para el clonamiento: $trp1^-$ y suc^o . El defecto en la biosíntesis del triptófano puede ser complementado por el gen $Trp1^+$ presente en el vector plasmidial YRp7 (Fig. 7). La mutación suc^o indica que los alelos negativos son de origen natural y permite distinguirla de las mutantes negativas inducidas derivadas de genes suc^+ activos de laboratorio (Carlson *et al*, 1980). Se desconoce la naturaleza de los alelos negativos de este gen, ya que el único gen silencioso de invertasa en Saccharomyces cerevisiae es $suc2^o$. Los alelos negativos suc^o de los otros genes SUC no contienen secuencias homólogas a los loci SUC (Carlson *et al*, 1983).

Siendo Neurospora y Saccharomyces hongos de la clase Ascomycete, es posible esperar que ambos organismos posean funciones génicas similares. En particular se conoce que estos dos eucariontes producen una enzima extracelular (invertasa) responsable de la hidrólisis del enlace β -fructósido de azúcares como la sacarosa. Por lo tanto, una alternativa para la selección de este gen es mediante la complementación de la mutación deficiente en invertasa (suc^o) de Saccharomyces cerevisiae.

Además de las ventajas mencionadas, el sistema de transformación de levaduras constituye una alternativa interesante para el clonamiento de genes fúngicos debido a i) las relaciones filogenéticas entre los organismos, se espera que haya similitud en los sistemas de transcripción y de traducción, y ii) a la disponibilidad

de una gran variedad de plásmidos recombinantes con replicación autónoma en levadura, (Stinchcomb *et al*, 1979; Struhl *et al*, 1979) lo cual permite rescatarlos para su amplificación y comparar su expresión en un sistema bacteriano como Escherichia coli.

Hasta ahora no se utilizado una estrategia de clonamiento de genes de N. crassa en Saccharomyces, ya que algunos genes de levadura como *trp1*, *his3* y *leu2* no se expresan en en Neurospora. Sin embargo, el gen *pyr 4* de N. crassa se expresa en S. cerevisiae aún cuando el gen *ura3* de levadura no es funcional en N. crassa. (Ballance *et al*, 1983).

Estos aspectos son muy importantes cuando se diseña una estrategia de clonamiento directo, mediante complementación génica, ya que hay genes eucarióticos que poseen intrones, los cuales deben ser procesados correctamente para que den un producto génico funcional. Del mismo modo, hay productos génicos que requieren de un procesamiento postraducciona, como ocurre con las exoenzimas glicoproteicas (Esmon *et al*, 1981; Novick *et al*, 1981; Schekman, 1982).

La transformación genética de Saccharomyces ha permitido el clonamiento exitoso de genes tanto de levadura como de otros eucariontes (Nasmyth *et al*, 1980; Henikoff *et al*. 1981). Estos resultados indican que la utilización de levadura como también de algunos hongos filamentosos proporcionan un sistema alternativo para el

cloneamiento de genes que controlan la síntesis de glicoproteínas ya que la adición de carbohidrato al polipéptido y las vías de secreción en levaduras parecen ser similares a la otros eucariotes superiores (Hitzeman *et al*, 1981). Sin embargo, hay evidencias que indican que el sistema de levaduras no siempre permite la expresión de genes eucarióticos. Aunque no es claro cuales serían las causas, la barrera para la expresión de genes heterólogos podría atribuirse a la presencia de secuencias intrónicas (Beggs *et al* 1980). Sin embargo, Saccharomyces cerevisiae podría tener un sistema de procesamiento de RNAs mensajeros ya que se ha encontrado que el gen de actina de levadura contiene una secuencia intrónica (Gallwitz y Sures, 1980). Igualmente se ha demostrado que levadura puede procesar correctamente el intrón del gen para la histona H3 de Neurospora (Woudt *et al*, 1985).

Obviamente la complementación génica de mutaciones bacterianas constituye el mecanismo de selección más directo de un gen. Sin embargo, para el caso del gen inv- este procedimiento no se pudo utilizar ya que en Escherichia coli no hay expresión de este gen eucariótico. Es probable que las células procarióticas no reconozcan las señales de control para la expresión fisiológica de genes eucarióticos. Los RNAs mensajeros eucarióticos difieren de los procarióticos en lo que se refiere a la estructura del mRNA, al procesamiento de los productos de transcripción y al proceso de iniciación de la síntesis

proteica (Kozak, 1983). A este respecto, las levaduras parecen proporcionar un ambiente natural más apto para la expresión de RNAs mensajeros eucariontes. Los RNAs mensajeros de levadura experimentan poliadenilación y "capping" de modo semejante a otros eucariontes y también poseen un mecanismo que permite el procesamiento de intrones ("splicing"). Los huéspedes de clonamiento procarióticos como Escherichia coli carecen de estos mecanismos de procesamientos por lo cual, no siempre es posible conseguir que genes exógenos complementen mutaciones bacterianas.

Por esta razón, la mayoría de los genes clonados en Escherichia coli no pueden producir una enzima funcional y por lo tanto, no son detectados por métodos de selección que utilizan la complementación genética. En aproximadamente el 25% de los casos de clonamiento molecular de genes de hongos, se encuentra que complementan una mutación de Escherichia coli (Ratzkin et al, 1977; Struhl et al, 1976; Clarke et al, 1978; Vapnek et al, 1977; Keesey y DeMoss, 1982; Buxton et al, 1983; Smarrelli et al, 1982). Sin embargo, estos casos son más bien una excepción, en general se ha requerido de método indirectos para el clonamiento de genes fúngicos como son la utilización de DNA complementario (cDNA) (Boel et al, 1984) u oligonucleótido sintético usado como sonda radiactiva (Kinnaird et al, 1982).

En el presente trabajo , los plásmidos descritos contienen DNA genómico de Neurospora crassa y complementan las cepas de S. cerevisiae y N. crassa que carecen de invertasa funcional. Es muy probable que el fragmento de DNA de Neurospora de 7.6 Kb inserto en pNC2, lleve el gen estructural de invertasa. Sin embargo, es importante establecer que la complementación es debida a la expresión del gen fúngico y no a alguna clase de supresión de la función defectiva del huésped. Esta posibilidad podría probarse ensayando la enzima de la cepa de levadura transformada, y demostrando que tiene las mismas propiedades físicas de la enzima de Neurospora y no las correspondiente a la enzima de levadura. Esto último se cumple para el plásmido pNC2 que muestra una reacción cruzada con el antisuero anti-invertasa, no así para el plásmido pNC1 en cual no se observa la presencia de un producto génico inmunológicamente relacionado con la invertasa de Neurospora.

Otro aspecto interesante del clonamiento del gen inv^+ de Neurospora es que el DNA clonado, aparentemente se expresa independiente de la orientación que tenga en el vector de clonado como se demuestra por la capacidad de transformar mutantes suc^o a SUC^+ por los subclones pNC2.5a y pNC2.5b (Tabla 18). Esto estaría indicando que el gen se expresaría a partir de un promotor presente en el fragmento cromosómico de Neurospora, y no requiere de secuencias del vector para su expresión. Este fenómeno ya

se ha observado para otros genes de Neurospora que se han clonado en sistemas bacterianos, como por ejemplo pyr-4 (Buxton *et al*, 1983). Aunque los promotores de levadura y Neurospora no sean necesariamente idénticos, el hecho que el gen *inv*⁺ se exprese en levaduras necesariamente implica que la RNA polimerasa de levadura y el sistema de síntesis proteica son capaces de reconocer las señales de control apropiadas para la transcripción y traducción precisa del mensaje fúngico. También es probable que el proceso de glicosilación y reconocimiento de las señales de excreción sean funcionales durante la la expresión del gen clonado de invertasa.

2.- Transformación Genética de Neurospora crassa

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la transformación genética de Neurospora crassa con DNA plasmidial ocurre con baja frecuencia y que el mecanismo de transformación involucra eventos de recombinación genética homóloga y no-homóloga. El análisis genético de los transformantes y los experimentos de hibridación DNA:DNA sugieren que el DNA dador puede integrarse en más de un sitio en el genoma receptor, ya sea i) adyacente o ligado al locus *inv* o ii) no-ligado al locus *inv*, es decir, en otro grupo de ligamiento. El gen *inv* de Neurospora crassa está normalmente ubicado en el grupo de ligamiento V a 16 u.m. del locus *al-3*. Analizando los porcentajes de recombinación entre estos loci se observa que algunos transformantes tienen un gen *inv*⁺ no ligado al locus *al-3*. Estos resultados podrían corresponder a la integración del gen *inv*⁺ en otro grupo de ligamiento, o bien, en una posición lejana del locus *al-3* en el mismo grupo de ligamiento. Ejemplo de este tipo de transformante es T3.16A en el cual el gen *inv*⁺ aparece segregando de manera independiente de *al-3* dando un 46.7% de recombinación. Del mismo modo en cruzamientos con el tipo silvestre se obtiene un 26.4% de esporas *inv*⁻. En la figura 26 se muestran los genotipos recombinantes propuestos para la progenie, los cuales serían el resultado de permutación cromosómica.

Cuando la recombinación ocurre en regiones homólogas generalmente no va acompañada del reemplazo del gen inv^- por inv^+ , sino que frecuentemente se producen duplicaciones en el genoma. Estas duplicaciones pueden detectarse por segregación de los genes duplicados. En cruzamientos entre los transformantes (inv^+) y la cepa silvestre 74A generalmente se aislaron esporas inv^- . La presencia de dichas esporas indica que el gen inv^- aún permanece en el genoma del transformante. Dicho gen segrega durante el proceso meiótico que lleva a la formación de esporas genéticamente haploides.

La ubicación del gen inv^+ se determinó a partir de la frecuencia de segregantes inv^- . Si el gen inv^+ clonado se inserta cercano al gen inv^- de la cepa receptora, encontraremos un reducido porcentaje de recombinación entre los genes inv duplicados. Por ejemplo, el resultado obtenido en el cruzamiento entre el transformante T3.1a y el doble mutante inv^- , al-3A nos indica que el gen inv^+ se encuentra a 21.2% (Tabla 16). Según esto, el gen inv^+ puede tener 2 ubicaciones posibles respecto del gen al-3 como se muestra en la figura 25. En un cruzamiento entre el transformante T3.1a y el tipo silvestre, el gen inv^- deberá segregar con respecto a inv^+ . Las esporas inv^- representan la mitad de los recombinantes, ya que la otra mitad es indistinguible fenotípicamente de los parentales. Los resultados para este cruzamiento (un 3% de esporas inv^-), indican que los dos genes están ligados a una distancia

aproximada de 6 u.m. Esta determinación de la distancia entre los dos genes concuerda con la estimación calculada por sustracción de la distancia de ligamiento al locus *al-3*, para cada uno de los genes *inv* (Fig. 25).

Por el contrario cuando el evento de recombinación se produce por reemplazo del gen mutante, la progenie de un cruzamiento entre un transformante por reemplazo y la cepa silvestre 74A invariablemente dará un 100% de esporas *inv+*. Este resultado se encontró para el caso de transformantes con DNA lineal. Sin embargo, una situación similar se observaría si se tratase de reversión génica. Es difícil poder discriminar la ocurrencia de estos dos eventos genéticos con los resultados obtenidos, debido a que la cepa receptora tiene una frecuencia de reversión similar a la frecuencia de transformación con DNA lineal.

Los resultados de transformación obtenidos con DNA plasmidial muestran que generalmente se producen inserciones no-ligadas. Si estos eventos son frecuentes en Neurospora, es posible sugerir que la transformación no requiere de alta homología para que ocurra la integración. Paietta et al. (1985b) utilizando el gen *qa-2+* para transformar Neurospora observó que solamente en el 10% de los casos la integración ocurre en regiones homólogas. Sin embargo, es probable que la frecuencia con que ocurre cada uno de estos eventos varíe según sea el gen en estudio, es decir, un gen podría tener distintos sitios de integración simplemente por las secuencia nucleotídica de flaqueo que

acompañan al gen. Un caso típico es el gen *leu-2* de levadura (Hinnen *et al*, 1978).

Aunque el mecanismo de integración del DNA transformante es desconocido, la recombinación por integración requiere de al menos un evento de "crossing-over" el cual permite la inserción completa de la molécula de DNA transformante. Sin embargo, otros eventos de recombinación pueden ocurrir sin que el DNA del vector YRp7 esté integrado en el genoma. Esto significa que la recombinación debió ocurrir mediante dos "crossing-over", o bien ocurre una excisión posterior del DNA del vector.

En algunos casos el DNA transformante se integra en regiones no-ligadas al locus original. Este fenómeno se ha observado para el caso del gen *qa2⁺* (Case *et al*, 1979; Rossier *et al*, 1985) y el gen *am⁺* que codifica para glutamato deshidrogenasa de *N. crassa* (Paietta *et al* 1985b). En general la integración no-homóloga parece ser un fenómeno común en los hongos filamentosos. El análisis de transformantes de *Penicillium chrysogenum* con el gen *trpC* (Sánchez *et al*, 1987) y de *Aspergillus nidulans* con el gen *amdS* (Tilburn *et al*, 1983) muestran eventos de integración en otras regiones del genoma de estos hongos.

Esto plantea necesariamente un problema. Si el DNA transformante se integra en un sitio nuevo, entonces un fragmento de DNA receptor podría perderse como consecuencia de la inserción por dobles "crossovers". Si efectivamente fragmentos de DNA se pierden como consecuencia del proceso

de integración , entonces se podría esperar que la mayoría de los eventos de transformación sean letales. Si se considera que en Neurospora crassa la transformación genética ocurre generalmente por recombinación en regiones no-homóloga, entonces no es raro encontrar un alto porcentaje de transformantes abortivos y/o transformantes con fertilidad reducida cuya progenie tiene un alto número de esporas no-viables.

Hasta ahora se desconoce la naturaleza de los procesos de integración del DNA transformante. Sin embargo, analizando los eventos de "crossing-over" necesarios para explicar los resultados del análisis genético y de hibridación, se podría sugerir que la transformación puede inducir la ocurrencia de arreglos cromosómicos que originan deleciones y duplicaciones. Estos cambios cromosómicos se caracterizan por un descenso en la viabilidad de la progenie. Los resultados obtenidos en Neurospora crassa en los cruzamientos entre los transformantes y el tipo silvestre, indican que la progenie tiene un alto porcentaje de esporas no-viables. Considerando estos resultados, no se puede descartar que los eventos de transformación estén asociados a mutaciones cromosómicas especialmente del tipo deleción o duplicación.

Otra característica del proceso de transformación genética es que ésta puede ocurrir mediante eventos de integración múltiple en un núcleo (Paietta *et al*, 1985b). El análisis de ligamiento y de segregación génica de los

transformantes sugiere que estos se producen por eventos de integración únicos, aunque no se puede descartar la presencia de copias extras del gen *inv+* integrado en otros sectores del genoma. Si ocurriera una integración múltiple, podría detectarse mediante hibridación. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran bandas de hibridación extras. Por el contrario Grantz *et al* (1985) han observado la presencia de bandas de hibridación múltiples para el caso de la transformación con el gen *am+* de *N. crassa*, lo cual sugiere que el DNA transformante puede insertarse en varios sitios del genoma en un evento de transformación. Sin embargo, los resultados de la literatura indican que en este caso las copias extras no son funcionales.

Otro rasgo interesante del proceso de transformación de *Neurospora crassa*, es la producción de un gran número de transformantes abortivos. Estos transformantes muestran un crecimiento normal sobre las placas selectivas, pero en posteriores subcultivos o bajando la presión selectivas se pierde el carácter *inv+* (no se detecta actividad enzimática) y la capacidad para crecer en medio selectivo. La explicación para este fenómeno ha sido generalmente atribuida a la presencia de plásmidos que no se han integrado establemente en el genoma (Kinsey *et al*, 1984). Sin embargo, no es la única explicación posible. Es muy frecuente que los transformantes de *Neurospora crassa* sean heterocarióticos. El grado de heterocariosis refleja

el número de núcleos presentes en el conidio receptor del DNA transformante. En general los protocolos de transformación requieren conidios germinados, esto significa que el número de núcleos podría ser aún mayor. Las colonias transformadas (*inv+*) aisladas formarán micelios heterocarióticos que llevarán núcleos transformados *inv+* y núcleos no-transformados *inv-*. Los micelios heterocarióticos con bajo porcentaje de núcleos transformados, se mantendrán en la medida que la tasa de división de los tipos nucleares presentes sea igual. Cualquier retraso en la división del núcleo transformado significará que su efecto se pierde por dilución en el micelio.

Complicaciones adicionales al análisis genético se presentan para el caso de los transformantes inestables. Estos transformantes se caracterizan porque no pueden obtenerse los correspondientes homocariones. Es decir no se obtienen esporas de fenotipo *inv+*. Aparentemente dichos transformantes se mantienen en una heterocariosis obligada. Una explicación de estos resultados se podría atribuir a la integración del DNA transformante en un gen esencial de Neurospora (Davis, 1984).

Asociados a los eventos de transformación se ha descrito además, la producción de mutaciones por efecto de la incorporación del DNA en el genoma del huésped (Mishra, 1977). En los resultados presentados para el sistema de invertasa también se han encontrado algunos fenotipos

aberrantes aparentemente como consecuencia del proceso de transformación. Los mutantes detectados son auxotróficos para adenina y triptófano. Debido a que no se realizó una búsqueda sistemática de mutantes es probable que aparezcan otras mutaciones. Estos eventos no son raros en los procesos de transformación y se producirían básicamente como consecuencia de la inserción de DNA dador en regiones no homólogas. Estos cambios inducidos por el DNA exógeno durante la transformación de Neurospora crassa han sido observados por otros autores (Case *et al*, 1979). También en levadura se ha observado este tipo de cambio (Hicks *et al*, 1978).

3.- Sistema genético de invertasa

Los resultados obtenidos muestran que la invertasa de Neurospora crassa presenta dos formas activas con ubicación tanto intracelular como extracelularmente. Los resultados concuerdan con lo encontrado por Meachum *et al* (1971) que indica que la enzima se encuentra en dos formas multiméricas: 10.3 S y 5.2 S

El análisis inmunológico sugiere que hay a lo menos una similitud estructural entre las forma intracelular y extracelular de la enzima. La ausencia de actividad enzimática tanto intra como extracelularmente en el mutante *inv⁻* indica que también existe una relación biosintética entre ambas formas enzimáticas

La relación entre la enzima intracelular y extracelular es de aproximadamente 10 : 1. La relación porcentual entre los componentes I (10.3 S) y II (5.2 S) de la invertasa varía durante el crecimiento del hongo en especial para la enzima extracelular. El comportamiento de la enzima extracelular podría explicarse por el mecanismo de control que opera en la expresión del gen *inv*. Metzberg (1962) y Cifuentes (1981) mostraron evidencias que indican que la síntesis de invertasa esta afectada por la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo (represión catabólica), por lo tanto la síntesis de

la enzima aumenta cuando se agota la fuente de carbono disponible en el medio.

Aunque la invertasa de Neurospora ha sido poco estudiada, muchas de las características del sistema genético parecieran ser similares al sistema de los genes SUC de levadura.

La invertasa de levadura también se presenta en dos formas isoenzimáticas: la forma externa que se encuentra en el espacio periplásmico (Neumann *et al* 1967) y una forma interna que esta localizada intracelularmente (Gascón *et al*, 1968a; 1968b). La diferencia con la enzima de Neurospora es que en este organismo, las dos formas moleculares están presentes tanto intra como extracelularmente.

Además, esta descrito que la síntesis de invertasa en ambas especies está regulada por glucosa (Cifuentes, 1981; Mormeneo *et al*, 1982). Además, si se considera que estos organismos están relacionados filogenéticamente es probable que tengan mecanismos de regulación similares.

Otro aspecto interesante de este sistema genético se desprende del análisis de hibridación de los plásmidos descritos en este trabajo. En ellos se muestra que los plásmidos reconocen más de una banda en el DNA cromosómico de Neurospora. Para el caso del plásmido pNC2 se encuentra que tiene homología con una banda de 7.6 Kb que corresponde a la que está clonada y con una banda de 3.9 Kb. Estos resultados sugieren que el gen de invertasa se encontraría

duplicado en el genoma del hongo . Esta posibilidad no es sorprendente, ya que una situación similar se encuentra para el caso de los genes que codifican la invertasa de Saccharomyces. Los genes SUC aparecen como una familia de genes que están dispersos en el genoma de la levadura (Carlson *et al*, 1981; Carlson *et al*, 1983). El análisis genético estableció que en levadura existen al menos seis genes no alélicos que controlan la síntesis de invertasa y que basta un solo gen funcional para la formación de la enzima y la fermentación de sacarosa o rafinosa (Ottolenghi, 1971; Haeckel, 1975; Grossman *et al*, 1979; Carlson *et al*, 1981).

Una explicación alternativa, a los resultados encontrados con Neurospora crassa podría ser que la banda de 3.9 Kb corresponde a la hibridación con las zonas adyacentes al gen de invertasa. Este fenómeno también se ha observado en levaduras para los genes SUC. La comparación de los fragmentos de restricción de los diferentes loci SUC sugiere que en algunos casos las secuencias adyacentes que acompañan a los genes estructurales conservan algunos sitios de restricción, lo cual podría indicar que los genes están flanqueados por secuencias homólogas. El tamaño de los fragmentos conservados sería de al menos 10 Kb (Carlson *et al*, 1983)

Cualquiera sea la situación de duplicación, este hallazgo apoya en parte los resultados obtenidos en la transformación genética de Neurospora crassa. La presencia

de secuencias insertadas en sectores del genoma diferente del locus original, podría explicarse como un proceso de intercambio genético por homología debido a la presencia de secuencia duplicadas. La transformación con el gen *leu2⁺* de *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo que puede ilustrar la producción de transformantes por inserción no-ligada debido a la presencia de secuencias repetidas adyacentes al gen (Hicks *et al*, 1978).

4.- Proyecciones

Neurospora crassa es un organismo que ofrece ventajas para estudiar diferentes aspectos de la fisiología génica mediante técnicas de DNA recombinante, principalmente por el conocimiento que se tiene de su aparato genético-bioquímico.

El desarrollo de sistemas de clonamiento molecular en hongos filamentosos permitirá abrir nuevas posibilidades para aislar, amplificar y expresar genes eucarióticos de origen heterólogo que no pueden ser expresados eficientemente en sistemas bacterianos. Esto último puede ayudar en la caracterización tanto estructural como fisiológica de los genomas eucarióticos, como también en el aprovechamiento biotecnológico de la gran capacidad biosintética de los hongos filamentosos (Saunders *et al*, 1986).

Con el advenimiento de las técnicas de DNA recombinante han aumentado las expectativas sobre los productos obtenidos a partir de organismos manipulados genéticamente, en especial la producción de proteínas animales y muchos otros productos de interés industrial y farmacéutico. Esta posibilidad biotecnológica ya está siendo explorada para sistemas como levadura. Intentos de este tipo lo constituyen la producción de interferón humano (Hitzeman *et al*, 1981; Chang N. *et al*, 1986) y el antígeno

de superficie del virus de la hepatitis B (Valenzuela et al, 1982). Aunque Neurospora aún no está establecido como sistema de transformación con fines biotecnológicos, estos hongos podrían ser muy eficientes en la síntesis y excreción de productos génicos heterólogos de interés industrial.

La invertasa ha parecido una enzima especialmente interesante por varios aspectos: El clonamiento de genes relacionado con la síntesis de invertasa permitiría estudiar la regulación de la síntesis de la enzima y las relaciones entre las formas isoenzimáticas intracelular y extracelular. Además, por tratarse de una exoenzima, el sistema de invertasa podría usarse como modelo en el estudio de los procesos de excreción y de glicosilación. Desde un punto de vista biotecnológico el aspecto más atrayente en el desarrollo de vectores y de huéspedes de hongos filamentosos está en la producción de glicoproteínas y en los procesos de secreción (Berman et al, 1985).

A P E N D I C E N^o 1

Medios de cultivo

1.- Medio LB

Triptona	10 g/lt
extracto de levadura	5 g/lt
cloruro de sodio	5 g/lt

2.- Medio mínimo Vogel Bonner 25X

MgSO ₄	5.0 g/lt
ácido cítrico x H ₂ O	50.0 g/lt
K ₂ HPO ₄ anhidro	250.0 g/lt
NaNH ₄ PO ₄	87.5 g/lt
Las bacterias se cultivaron en medio mínimo Vogel-Bonner 1X suplementado con:	
glucosa	0.50 %
L-leucina	0.30 mM
L-treonina	0.30 mM
vitamina B1	0.32 mM

3.- Medio Vogel 25X

citrato de sodio x 5H ₂ O	75.0 g/lt
KH ₂ PO ₄ anhidro	125.0 g/lt
NH ₄ NO ₃ anhidro	50.0 g/lt
MgSO ₄ x 7H ₂ O	5.0 g/lt
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2.5 g/lt
Elementos trazas	2.5 ml
Biotina	24.0 mg/lt

4.- Solución "stock" de Elementos trazas

ácido bórico	0.50 g/lt
CuSO ₄ x 5H ₂ O	2.50 g/lt
KI	0.06 g/lt
MnSO ₄	0.50 g/lt
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.50 g/lt
ZnSO ₄	50.00 g/lt
FeCl ₃ x 6H ₂ O	10.00 g/lt

5.- Solución "stock" Westergaard 2X

KNO ₃	2.0	g/lt
KH ₂ PO ₄	2.0	g/lt
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.0	g/lt
CaCl ₂	0.2	g/lt
NaCl	0.2	g/lt
Elementos trazas	2.0	ml
Biotina	9.6	mg/lt

6.- Medio YEP

peptona	20	g/lt
extracto de levadura	10	g/lt
glucosa	20	g/lt
Ajustar a pH 5.3 con HCl.		

7.- Agar de regeneración

sulfato de amonio	5.0	g/lt
sorbitol	182.0	g/lt
agar	20.0	g/lt
Base de nitrógeno para levaduras	6.7	g/lt
sacarosa	20.0	g/lt
aminoácidos 1%	5.0	ml
agua hasta 1000 ml		

8.- Medio Completo de Neurospora

sacarosa	10.0	g/lt
extracto de malta	7.5	g/lt
extracto de levadura	2.5	g/lt
Vogel 25X	40.0	ml/lt

A P E N D I C E N^o 2

Preparación de Fenol:Cloroformo

El fenol redestilado se fundió a 60°C y se agregó 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%. El fenol fundido se extrajo varias veces con un volumen igual de tampón Tris 100 mM pH 8 y 0.2% de β-mercaptoetanol hasta que el pH de la fase acuosa fue superior a 7.6. El fenol saturado con tampón se mantuvo a 4°C. Para preparar fenol:cloroformo, se mezcló un volumen de fenol saturado con un volumen de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 24:1.

Preparación de las soluciones con CETAB

Las soluciones agua-CETAB y butanol-CETAB se obtuvieron de la siguiente manera: Un volumen de butanol se equilibró con un volumen de agua mezclándose repetidas veces. Se disolvió 1 g de CETAB en 100 ml de butanol saturado en agua y se agregó 100 ml de agua saturada en butanol. se mezcló y dejó a temperatura ambiente hasta que se separaron las fases. Cada fase se guardó por separado. La fase superior es la solución butanol-CETAB y la fase inferior es la solución agua-CETAB.

A P E N D I C E N^o 3

Tamaño y peso molecular de los fragmentos obtenidos al tratar el DNA del bacteriófago Lambda con la endonucleasa de restricción HindIII.

N ^o fragmento	Tamaño Molecular (Kb)	Peso Molecular dalton x 10 ⁻⁶
1	23.130	15.00
2	9.419	6.12
3	6.557	4.26
4	4.371	2.84
5	2.322	1.51
6	2.028	1.32
7	0.564	0.37
8	0.125	0.08

A P E N D I C E N^o 4

Soluciones empleadas en hibridación DNA-DNA

1.- Solución de prehibridación

Formamida	50%
SSC	3X
Denhardt	1X
DNA esperma Salmón denat.	50-100 µg/ml
Tris-HCl pH 7.4	50 mM

2.- Solución de hibridación

Formamida	50%
SSC	3X
Denhardt	1X
DNA esperma Salmón denat.	50-100 µg/ml
Tris-HCl pH 7.4	50 mM
sonda denaturada (5-10 min a 90°C).	

3.- SSC 20X

NaCl	175.3 g/lit
Citrato de sodio	88.2 g/ml
Ajustado a pH 7.0 con NaOH 2 N.	

4.- Denhardt 50X

Ficoll	1%
PVP	1%
BSA (fracción V)	1%

A P E N D I C E N^o 5

Soluciones empleadas en la marcación del DNA por "Nick translation"

1.- Tampón de Nick 5X

Tampón de pre-Nick 10X	100 μ l
dTTP 25 mM	1 μ l
dGTP 25 mM	1 μ l
dCTP 25 mM	1 μ l
agua	97 μ l

2.- Tampón de pre-Nick 10X

Tris-HCl pH 8.0	500 mM
MgCl ₂	50 mM
gelatina	0.05 %
DTT	5 mM

A P E N D I C E N^o 6

Soluciones empleadas en la preparación de geles de poliacrilamida

1.- Solución A

Tris	6.85 g
HCl 1N	48.00 ml
TEMED	0.32 ml
completar con agua hasta 100 ml pH 8.4	

2.- Solución B

Acrilamida	30.0 % p/v
Bisacrilamida	0.8 % p/v

3.- Solución C

Persulfato de amonio	0.14 % p/v
----------------------	------------

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

Aaij, C. y Borst, P. 1972
The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 269: 192-200

Akins, R.A.; Lambowitz, A.M. 1985
General methods for cloning Neurospora crassa nuclear genes by complementation of mutants. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2272-2278

Akins, R.A.; Kubelik, A.R.; Lambowitz, A.M. 1986
Map of plasmid pRAL1. *Fungal Genetics Newslett.* 33: 22

Appleyard, R.K. 1954
Segregation of new lysogenic types during of a growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K12. *Genetics* 39: 440-444

Arends, H. Sebald, W. 1984
Nucleotide sequence of the cloned mRNA and gene of the ADP/ATP carrier from Neurospora crassa. *EMBO J.* 3: 377-382

Ballance, D.J.; Buxton, F.P.; Turner, G. 1983
Transformation of Aspergillus nidulans by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of Neurospora crassa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112: 284-289

Balbás, P.; Soberón, X.; Merino, E.; Zurita, M.; Lomeli, H.; Valle, F.; Flores, N.; Bolívar, F. 1986
Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives- a review. *Gene* 50: 3-40

Barrat, R.W.; Rimbey, R.L. 1982
Neurospora stock list. *Neurospora Newslett.* 29: 45-106

Beggs, J.D.; van der Berg, J.; van Ooyen, A.; Weissmann, C. 1980
Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* 283: 835-840

Bernfeld, D. 1955
Amylases α and β . En Methods in Enzymology vol. I (ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan) pp 149-158 Academic Press Inc.

Berman, P.W.; Lasky, L.A. 1985
Engineering glycoproteins for use as pharmaceuticals. Trends Biotech. 3: 51-53

Birboim, H.C. y Doly, J. 1979
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7: 1513-1523

Bolivar, R.; Rodriguez, R.L.; Greene, P.J.; Betlach, M.C.; Heyneker, H.L. y Boyer, H.W. 1977
Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95-113

Boel, E.; Hjort, I.; Svensson, B.; Norris, F.; Norris, K.E. y Fiil, N.P. 1984
Glucoamylases G1 and G2 from Aspergillus niger are synthesized from two different but closely related mRNAs. EMBO J. 3: 1097-1102

Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix, D. 1969
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41: 459-472

Broach, J.R. 1981
Genes of Saccharomyces cerevisiae. En The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces I. Life cycle and inheritance (ed. J. Strathern; E.W. Jones; J.R. Broach) Cold Spring Harbord Laboratory pp 655-709 CSHL, New York

Buxton, F.P. y Radford, A. 1983
Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of Neurospora crassa by expression in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 190: 403-405

Buxton, F.P. y Radford, A. 1984
The transformation of mycelial spheroplasts of Neurospora crassa and attempted isolation of an autonomus replicator. Mol. Gen. Genet. 196: 339-344

Carlson, M.; Osmond, B.C. y Botstein, D. 1980
SUC Genes of yeast: A dispersed gene family. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 799-803

Carlson, M.; Osmond, B. y Botstein, D. 1981
Genetic evidence for silent SUC in yeast. Genetics 98: 41-54

Carlson, M. y Botstein, D. 1982
Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell 28: 145-154

Carlson, M. y Botstein, D. 1983
Organization of the SUC gene family in Saccharomyces. Mol. Cell. Biol. 3: 351-359.

Case, M.; Schweizer, M.; Kushner, S. y Giles, N. 1979
Efficient transformation of Neurospora crassa by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263

Cifuentes, V. 1981
Control genético de la síntesis y excreción de invertasa de Neurospora crassa. Tesis de Licenciatura en Biología Universidad de Chile. 62 pp.

Clewell, D. y Helinski, D. 1969
Supercoiled circular DNA-protein Complex in Escherichia coli: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62: 1159-1166

Cohen, S.; Chang, A. y Hsu, L. 1972
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114

Collins, R.A.; Stohl, L.L.; Cole, M.D. y Lambowitz, A.M. 1981
Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of Neurospora crassa. Cell 24: 443-452

Chang, Ch.N.; Matteucci, M.; Perry, L.J., Wulf, J.J.; Chen, C.Y. y Hitzeman, R.A. 1986

Saccharomyces cerevisiae secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1812-1819

Chu, F.K.; Maley, F. 1980

The effect of glucose on the synthesis and glycosylation of the polypeptide moiety of yeast external invertase. *J. Biol. Chem.* 255: 6392-6397

Chung, P.L. y Trevithick, J.R. 1970

Biochemical and histochemical localization of invertase of Neurospora crassa during conidial germination and hyphal growth. *J. Bacteriol.* 102:423-429

Clarke, L. y Carbón, J. 1978

Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli : Specific complementation of argininosuccinate lyase (arg H). *J. Mol. Biol.* 120: 517-532

Davis, R.H. 1984

Transformation and reversion: Pitfalls imposed by heterokaryosis. *Neurospora Newslett.* 31: 21-22

Davis, R.H.; De Serres, F.J. 1970

Genetic and microbiological research techniques for Neurospora crassa. En *Methods in Enzymology* vol XVIIIA (ed. H. Tabor & W. Tabor) pp. 79-143 Academic Press Inc.

Davis, R.; Botstein, D. y Roth, J. 1980

Advanced Bacterial Genetics. A manual for Genetics Engineering. pp 202-203. Cold Spring Harbor Laboratory, CSHL, New York

Dhawale, S.S.; Paietta, J.V. y Marzluf, G.A. 1984

A new, rapid and efficient transformation procedure for Neurospora. *Curr. Genet.* 8: 77-79

Esmon, B.; Novick, P.; Scekman, R. 1981

Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast. *Cell* 25: 451-460

Gallwitz, D. y Sures, I. 1980

Structure of split yeast gene: Complete nucleotide sequence of the actin gene in Saccharomyces cerevisiae *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2546-2550

Gascon, S. y Lampen, O. 1968a
Purification of the internal invertase of yeast. J. Biol. Chem. 243: 1567-1572

Gascon, S.; Neumann, N.P. y Lampen, O. 1968b
Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. J. Biol. Chem. 243: 1573-1577

Grantz, D.M.; Lambowitz, A.M.; Rambosek, J.A.; Kinsey, J.A. 1984
Transformation of Neurospora crassa with recombinant plasmids containing the cloned glutamate dehydrogenase (*am*) gene: evidence for autonomous replication of the transforming plasmid. Mol. Cell. Biol. 4: 2041-2051

Gratzner, H.G. y Sheehan, D.N. 1969
Neurospora mutant exhibiting hyperproduction of amylase and invertase. J. Bacteriol. 97: 544-549

Gratzner, H.G. 1972
Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 111: 443-446

Grossman, M.K. y Zimmermann, F.K. 1979
The structural genes of internal invertase in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 175: 223-229

Gunge, N. 1983
Yeast DNA plasmids. Ann. Rev. Microbiol. 37: 253-276

Hackel, R.A. 1975
Genetic control of invertase formation in Saccharomyces cerevisiae I. Isolation and characterization of mutants affecting sucrose utilization. Mol. Gen. Genet. 140: 361-370

Hames, B.D. 1981
An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En Gel Electrophoresis of Proteins: A practical approach. ed. B.D. Hames y D. Rickwood pp. 1-86 IRL Press Limited

Hautala, J.A.; Conner, B.H.; Jacobson, J.W.; Patel, G.C. y Giles, H.H. 1977
Isolation and characterization of nuclei from Neurospora crassa. J. Bacteriol. 130: 704-713

Hautala, J.A.; Schweitzer, M.; Giles, N.H.; Kushner, S.R. 1979
Constitutive expression in Escherichia coli of the Neurospora crassa structural gene encoding the inducible enzyme catabolite dehydrogenase. Mol. Gen. Genet. 172: 93-98

Henikoff, S.; Tatchell, K.; Hall, B.D. y Nasmyth, K.A. 1981
Isolation of a gene from Drosophila by complementation in yeast. Nature 289: 33-37

Hicks, J.B.; Hinnen, A. y Finks, G.R. 1978
Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 1305-1313

Hinnen, A.; Hicks, J.B. y Fink, G.P. 1978
Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933

Hitzeman, R.A.; Hagie, F.E.; Levine, H.L.; Goeddel, D.V.; Ammerer, G. y Hall, B.D. 1981
Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293: 717-722

Hughes, K.; Case, M.; Geever, R.; Vapnek, D. y Giles, N. 1983a
Chimeric plasmid that replicates autonomously in both Escherichia coli and Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1053-1057

Hughes, K.; Case, M.; Geever, R.; Vapnek, D. y Giles, N. 1983b
Chimeric plasmid that replicates autonomously in both Escherichia coli and Neurospora crassa (Retraction). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7678

Johnson, P.H. y Grossman, L.I. 1977
Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single stranded DNAs. Biochemistry 16: 4217-4225

Keeseey, J.K. y Demoss, J.A. 1982
Cloning of the *trp-1* gene from Neurospora crassa by complementation of a *trpC* mutation in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 152: 954-958

Kinnaird, J.H.; Keighren, M.A.; Kinsey, J.A.; Eaton, M. y Fincham, J.R.S. 1982
Cloning of the *am* (glutamate dehydrogenase) gene of Neurospora crassa through the use of a synthetic DNA probe. Gene 20: 387-396

Kinsey, J.A.; Rambosek, J.A. 1984
Transformation of Neurospora crassa with the cloned *am* (glutamate dehydrogenase) gene. Mol. Cell. Biol. 4: 117-122

Kozak, M. 1983
Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. Microbiol. Rev. 47: 1-45

Krumlauf, R. y Marzluf, G.A. 1979
Characterization of the sequence complexity and organization of the Neurospora crassa genome. Biochemistry 18: 3705-3713

Kuiper, M.T.R.; de Vries, H. 1985
A recombinant plasmid carrying the mitochondrial plasmid sequence of Neurospora intermedia LaBelle yields new plasmid derivatives in Neurospora crassa transformants. Curr. Genet. 9: 471-477

Langridge, J.; Langridge, P. y Bergquist, P.L. 1980
Extraction of nucleic acids from agarose gels. Anal. Biochem. 103: 264-271

Lowry, O.; Rosebrough,; Farr, A. y Randall, R. 1951
Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-2

Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (Eds.) 1982
Molecular Cloning. A laboratory manual. pp. 98-106 Cold Spring Harbor Laboratory. CSHL, New York

Marzluf, G.A.; Metzenberg, R.L. 1967
Studies on the functional significance of the transmembrane location of invertase in Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 120: 487-496

Meachum, Z.D.; Colvin, H.J. y Braymer, H.D. 1971
Chemical and physical studies of Neurospora crassa invertase. Molecular weight, amino acid and carbohydrate composition, and quaternary structure. Biochemistry 10: 326-332

Metzenberg, R.L. 1962
A gene affecting the repression of invertase and trehalase in Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 96: 468-474

Metzenberg, R.L. 1963
The purification and properties of invertase of Neurospora. Arch. Biochem. Biophys. 100: 503-511

Metzenberg, R.L. 1964
Enzymatically active subunits of Neurospora invertase. Biochim. Biophys. Acta 89: 291-302

Minter, S.; Sealey, P. 1982
Nucleic acid molecular weight markers. En Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A practical approach. ed. R. Rickwood y B.D. Hames pp 227-232 IRL Limited.

Mishra, N.C. 1976
Episome-like behaviour of donor DNA in transformed strains of Neurospora crassa. Nature 264: 251-253

Mishra, N.C. 1977
Genetics of certain conditional mutants which originated during transformation in Neurospora. Genet. Res. 29: 9-19

Mishra, N.C. 1979
DNA-mediated genetic changes in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 113: 255-259

Mormeneo, S. y Sentandreu, R. 1982
Regulation of invertase synthesis by glucose in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 152: 14-18

- Muñoz, J. 1971
Double diffusion in plates. En *Methods in Immunology and Immunochemistry* Vol. III pp. 146-160.
Editores Williams, C.A. y Chase, M.W. Academic Press, New York.
- Nasmyth, K.A.; Reed, S.I. 1980
Isolation of genes by complementation in yeast: Molecular cloning of a cell-cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2119-2123
- Neumann, N.P. y Lampen, J.O. 1967
Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry* 6: 468-475
- Novick, P.; Ferro, S.; Sckekman, R. 1981
Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25: 461-469
- Ottolenghi, P. 1971
A comparison of five genetically distinct invertase from Saccharomyces. Some enzymatic characteristics. *Eur. J. Biochem.* 18: 544-552
- Paietta, J.V. y Marzluf, G.A. 1985a
Plasmid recovery from transformants and the isolation of chromosomal DNA segments improving plasmid replication in Neurospora crassa. *Curr. Genet.* 9: 383-388
- Paietta, J.V. y Marzluf, G.A. 1985b
Gene disruption by transformation in Neurospora crassa. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1554-1559
- Perkins, D.D.; Radford, A.; Newmeyer, D. y Bjorkman, M. 1982
Chromosomal loci of Neurospora crassa. *Microbiol. Rev.* 46: 426-570
- Ratzkin, B. y Carbon, J. 1977
Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 487-491
- Reich, E. y Tsuda, S. 1961
isolation of nuclei of Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta* 53: 574-575

Rigby, P.W.; Dieckmann, M.; Rhodes, C. y Berg, P. 1977
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity
in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J.
Mol. Biol. 113: 237-251

Rodriguez, L.; Ruiz, T.; Villanueva, J. y Sentandreu, R.
1978
Yeast invertase: subcellular distribution and possible
relationship between the isoenzymes. Curr. Microbiol.
1:41-44

Rossier, C.; Pugin, A.; Turian, G. 1985
Genetic analysis of transformation in microconidiating
strain of Neurospora crassa. Curr. Genet. 10: 313-320

Sánchez, F.; Lozano, M.; Rubio, V.; Peñalva, M.A. 1987
Transformation in Penicillium chrysogenum. Gene 51:97-102

Sarrgent, M.L. y Woodward, D.O. 1969
Gene-enzyme relationship in Neurospora invertase. J.
Bacteriol. 97: 867-872

Saunders, G.; Tuite, M.F.; Holt, G. 1986
Fungal cloning vectors. TIBTECH-April 93-98

Schleif, R.F. y Wensink, P.C. 1981
Determining protein concentration. En "Practical Methods
in Molecular Biology" pp 74-76. Springer-Verlag, New York
Inc.

Schekman, R. 1982
the secretory pathway in yeast. TIBS-July 243-246

Smarrelli, J. y Garret, R.H. 1982
Isolation of Neurospora nitrate reductase structural
gene: Evidence for its expression in E. coli. Neurospora
Newslett. 29:11

Southern, E. 1975
Detection of specific sequences among DNA fragments
separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517

Stinchcomb, D. T.; Struhl, K.; Davis, R. W. 1979
Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43

Stohl, L. L.; Collins, R. A.; Cole, M. D.; Lambowitz, A. M. 1982
Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type Neurospora intermedia strains. *Nucl. Acids Res.* 10: 1439-1458

Stohl, L. L. y Lambowitz, A. M. 1983
Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus Neurospora crassa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1058-1062

Stohl, L. L.; Akins, R. A.; Lambowitz, A. M. 1984
Characterization of deletion derivatives of an autonomously replicating Neurospora plasmid. *Nucl. Acids Res.* 12: 6169-6178

Struhl, K.; Cameron, J. R. y Davis, R. W. 1976
Functional genetic expression of eukaryotic DNA in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1471-1475

Struhl, K.; Stinchcomb, D. T.; Scherer, S.; Davis, R. W. 1979
High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039

Suzoi, A. y Radford, A. 1983
ARS8 sequences in the Neurospora genome. *Neurospora Newslett.* 30:13

Tilburn, J.; Scazzichio, C.; Taylor, G. G. ; Zabicky-Zissman, J. H.; Lockington, R. A.; Davies, R. W. 1983
Transformation by integration in Aspergillus nidulans. *Gene* 26: 201-221

Trevithick, J. R. y Metzenberg, R. 1966a
Molecular sieving by Neurospora cell walls during secretion of invertase isoenzymes. *J. Bacteriol.* 92:1010-1015

Trevithick, J.R. 1966b
Genetic alteration of pore size and other properties of the Neurospora cell wall. J. Bacteriol. 92: 1016-1020

Tschumper, G. y Carbon, J. 1980
Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. Gene 10:157-166

Valenzuela, P.; Medina, a.; Rutter, W.J.; Ammerer, G. y Hall, B.D. 1982
Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature 248: 347-350

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

Vogel, H.J. 1956
A convenient growth medium for Neurospora (Medium N). Microbiol. Genet. Bull. 13:42-43

Vogel, H. y Bonner, D. 1956
Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial Purification and some properties. J. Biol. Chem. 218:97-106

Vollmer, S.J.: Yanofsky, Ch. 1986
Efficient cloning of genes of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4869-4873

Weiss, B.; Jacquemin-Sablon, A.; Live, T.R.; Fareed, G.C. y Richardson, C. 1968
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with Bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 243:4543-4555

Westergaard, M. y Mitchell, H.K. 1947
Neurospora: A synthetic medium favouring sexual reproduction. Am. J. Bot. 34: 573-577

Wootton, J.C.; Frase, M.J. y Baron, A.J. 1980
Efficient transformation of germinating Neurospora
conidia using total nuclear fragments. Neurospora
Newslett. 27: 33

Woudt, L. P.; Pastink, A.; Kempers-Veenstra, A.E.;
Jansen, A.E.M.; Mager, W.H. y Planta, R.J. 1983
The genes coding for histone H3 and H4 in Neurospora
crassa are unique and contain intervening sequences.
Nucl. Acids Res. 11: 5347-5360

Woudt, L.P.; van den Heuvel, J.J.; van Raamsdonk-Duin,
M.M.C.; Mager, W.H. y Planta, R.J. 1985
Correct removal by splicing of a Neurospora intron in
yeast. Nucl. Acids Res. 13: 7729-7739.