

Clonamiento de genes de *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

Victor Hugo Cifuentes Guzmán

1988

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 el candidato:

Víctor Hugo Cifuentes Guzmán

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 8 de Agosto de 1988.

Director de Tesis:

Dr. Guido Pincheira

Guido Pincheira

Comisión Informante de la Tesis:

Dra. Alicia Carrasco

Alicia Carrasco

Dra. Catherine Connelly

Catherine Connelly

Dra. Rosalba Lagos

Rosalba Lagos

Dr. Guido Mora

Guido Mora

Dr. Arturo Yudelevich

Arturo Yudelevich



A mi esposa

A mi madre

A mis tías



AGRADECIMIENTOS

Doy mis sinceros agradecimientos:

Al Dr. Guido Pincheira V. por su ayuda, estímulo y facilidades prestadas para el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Antonio Jiménez (Centro de Biología Molecular de Madrid) por sus valiosas críticas, sugerencias y por las facilidades prestadas para realizar algunos experimentos en su laboratorio.

A la Dra. Margarita Carú por sus valiosas críticas y por brindarme una verdadera y desinteresada amistad.

A la Prof. Madeleine Lamborot por su interés, estímulo y amistad.

A la Dra. Alicia Carrasco por sus consejos y estímulo.

Al Dr. Orlando Gutiérrez por su colaboración y consejos.

A la Sra. Pilar Martínez por su colaboración.

Al Sr. Carlos Pino por su valiosa asistencia técnica.

Al Sr. Rafael Negrete por su ayuda técnica.

Doy mis agradecimientos en forma especial a mi esposa por su constante apoyo, estímulo y comprensión; a mi madre y a mis tías quienes estuvieron siempre interesadas por mi trabajo.

Finalmente agradezco a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en la realización de esta tesis.

INDICE

	pagina
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMEN	iv
SUMMARY	vii
ABREVIATURAS	ix
PROPOSITO	xi
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	13
I.- MATERIALES	13
1. Material biológico	13
1.1 Bacterias	13
1.2 Levaduras	13
1.3 <i>Neurospora crassa</i>	13
1.4 Plásmidos	14
1.5 Enzimas	14
1.6 Acidos desoxirribonucleicos	15
2. Reactivos químicos	15
II.- METODOS	17
1. Cultivo de microorganismos	17
1.1 Bacterias	17
1.2 Levaduras	17
1.3 <i>Neurospora crassa</i>	17
2. Mantenición de las cepas	18
2.1 Bacterias	18
2.2 Levaduras	18
2.3 <i>Neurospora crassa</i>	18
3. Purificación de DNA	18
3.1 Purificación de DNA plasmidial	18
3.2 Minipreparación de DNA plasmidial	20
3.3 Purificación de DNA de <i>N. crassa</i>	21
3.4 Purificación DNA total <i>Saccharomyces</i>	23
3.5 Purificación plásmidos <i>Saccharomyces</i>	25
4. Electroforesis de DNA	27
4.1 Geles de agarosa	27
4.2 Visualización DNA en geles de agarosa	28
4.3 Determinación tamaños moleculares	28
5. Extracción de DNA a partir de agarosa de bajo punto de fusión	29
5.1 Extracción de DNA	29
5.2 Preparación de soluciones	31
6. Determinación de concentración de DNA	32
6.1 Densidad óptica	32
6.2 Metodo del minigel	32
7. Digestión con endonucleasas restricción	33
7.1 Digestión total DNA <i>Neurospora</i>	33
7.2 Digestión parcial DNA <i>Neurospora</i>	34

7.3 Digestión de DNA plasmidial	35
8. Desfosforilación del DNA	36
8.1 Tratamiento con fosfatasa alcalina	36
9. Ligado de DNA con DNA ligasa	37
9.1 Ligado de extremos cohesivos	37
9.2 Ligado de extremos romos	38
10. Reacción de "Nick translation"	38
11. Hibridación DNA:DNA	40
12. Transformación genética	42
12.1 Transformación de <i>E. coli</i>	42
12.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	43
12.3 Transformación de <i>N. crassa</i>	45
13. Obtención del gen <i>LEU2</i> a partir de pTS1.2	46
14. Obtención del gen <i>TRP1</i> y <i>ARS1</i> de YRp7	46
RESULTADOS	48
1. Construcción de vectores de clonado de <i>S. cerevisiae</i>	48
1.1 Orientación y mapa de restricción de pTS1.2	48
1.2 Construcción de VCp1	48
1.3 Transformación e <i>S. cerevisiae</i> con VCp1	53
1.4 Análisis del plásmido VCp1	56
2. Construcción de VCp2.1 y VCp2.2	56
2.1 Obtención de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2	56
2.2 Análisis de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2	58
2.2a Retransformación de <i>E. coli</i> C600	58
2.2b Análisis de restricción	61
2.3 Construcción de VCp2.3	61
3. Construcción de VCp3.1	67
3.1 Transformación de <i>E. coli</i> C600 con VCp3.1	70
3.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con VCp3.1	70
4. Construcción de genotecas de <i>N. crassa</i>	73
4.1 Digestión parcial de DNA de <i>N. crassa</i>	73
4.2 Genoteca en vector YRp7	75
4.2.1 Análisis de clones recombinantes	75
4.3 Genoteca en VCp1	80
4.4 Genoteca en VCp2.1	86
5. Aislamiento de secuencias de replicación autónoma de <i>N. crassa</i> en <i>S. cerevisiae</i>	89
5.1 Aislamiento de secuencias a partir de genoteca en VCp1	89
5.2 Aislamiento de secuencias a partir de genoteca en VCp2.1	97
6. Clonado del gen <i>leu1</i> de <i>N. crassa</i> en <i>E. coli</i>	103
6.1 Selección de clones <i>leu+</i> en <i>E. coli</i>	103
6.2 Retransformación de <i>E. coli</i> C600 con DNA	

de plásmidos recombinantes	103
6.3 Análisis electroforético de DNA plasmidial recombinante	105
6.4 Análisis de restricción de pLA13	107
7. Subclonado del gen <i>leu1</i>	110
7.1 Elaboración de un mapa de restricción de YRp74.2	113
8 Subclonado del fragmento BamHI de 8.8 kb	117
8.1 Retransformación de <i>E. coli</i> C600 con plásmidos YRp23.1-10	119
8.2 Elaboración del mapa de restricción del subclon YRp23.2	119
9. Subclonado del fragmento BaHI-BglII de 3.95 kb	121
9.1 Elaboración del mapa de restricción del subclon BpG6	124
10. Reconstrucción del vector YRp7 en el subclon BpG6	128
11. Pruebas de hibridación	131
11.1 Hibridación de DNA de <i>N. crassa</i> al plásmido YRp74.2	131
11.2 Hibridación de DNA de <i>N. crassa</i> al subclon BpG6	134
12. Transformación genética de <i>N. crassa</i>	134
13. Análisis de los transformantes de <i>N. crassa</i>	136
DISCUSION	140
1 Clonamiento de DNA de <i>Neurospora crassa</i>	140
2 Clonamiento del gen <i>leu1</i> de <i>Neurospora crassa</i>	150
3 Transformación genética de <i>Neurospora crassa</i>	156
4 Proyecciones	164
Apéndice Nº 1: Medios de cultivo	166
Apéndice Nº 2: Desproteínización con fenol	168
Apéndice Nº 3: Tamaño de fragmentos HindIII de DNA λ	169
Apéndice Nº 4: Soluciones para "Nick translation"	170
Apéndice Nº 5: Soluciones para hibridación	171
REFERENCIAS	173

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Tamaño molecular de fragmentos de restricción del plásmido pTS1.2	51
Tabla 2	Selección de plásmido VCp1 y retransformación de <i>E. coli</i> C600	54
Tabla 3	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> Sc483	55
Tabla 4	Selección de clones con plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 en <i>E. coli</i> C600	59
Tabla 5	Retransformación de <i>E. coli</i> C600 con DNA aislado de clones leu ⁺	60
Tabla 6	Tamaño molecular de fragmentos de restricción de VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3	63
Tabla 7	Transformación de <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> con VCp3.1	71
Tabla 8	Transformación de <i>E. coli</i> C600 con mezcla de ligado de genoteca en YRp7	78
Tabla 9	Tamaños moleculares de los insertos de 30 plásmidos analizados por digestión con BamHI	82
Tabla 10	Transformación de <i>E. coli</i> C600 con mezcla de ligado de genoteca en VCp2.1	88
Tabla 11	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> Sc483 con DNA de genoteca en VCp1	90
Tabla 12	Tiempos de duplicación de transformantes de levadura Sc483 con plásmidos híbridos	93
Tabla 13	Retransformación de <i>S. cerevisiae</i> Sc483 con DNA del plásmido SCp14	98
Tabla 14	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> Sc483 con DNA de genoteca en VCp2.1	100
Tabla 15	Tiempo de generación de transformantes de levadura Sc483 con genoteca en VCp2.1	102
Tabla 16	Transformación de <i>E. coli</i> C600 con DNA de clones leu ⁺	104
Tabla 17	Tamaños moleculares de fragmentos productos de restricción del plásmido pLA13	109

Tabla 18	Transformación de <i>E. coli</i> C600 con DNA de plásmidos subclonados	112
Tabla 19	Tamaños moleculares de los fragmentos productos de restricción del plásmido YRp74.2	115
Tabla 20	Retransformación de <i>E. coli</i> C600 con DNA de subclones leu ⁺	120
Tabla 21	Tamaños moleculares de los productos de restricción de YRp23.2	123
Tabla 22	Transformación de <i>E. coli</i> C600 con YRp74.2 y sus derivados	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de restricción del plásmido pTS1.2	49
Figura 2	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del plásmido pTS1.2	50
Figura 3	Esquema del procedimiento empleado para la construcción del vector VCp1	52
Figura 4	Esquema del procedimiento empleado para la construcción de los vectores de integración VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3	57
Figura 5	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2	62
Figura 6	Mapa de restricción de los plásmidos VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3	64
Figura 7	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión doble con BamHI y EcoRI de los clones VC2.2ER	66
Figura 8	Esquema del procedimiento empleado para la construcción del plásmido VCp3.1	68
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp3.1	69
Figura 10	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión parcial de DNA de <i>N. crassa</i> con las enzimas BamHI, PstI y Sau3AI	74
Figura 11	Esquema del procedimiento empleado para la construcción de una genoteca de <i>N. crassa</i> en YRp7	76
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de ligamiento de DNA	77
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial de 18 clones recombinantes	79
Figura 14	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con BamHI	81
Figura 15	Esquema del procedimiento utilizado para la construcción de la genoteca en VCp1	83
Figura 16	Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial de 7 grupos de clones recombinantes	85

Figura 17	Esquema del procedimiento empleado en la construcción de la genoteca en VCp2.1	87
Figura 18	Curva de crecimiento de transformantes leu ⁺ de <i>S. cerevisiae</i> Sc483	91
Figura 19	Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmidial del transformante Sc14.12	96
Figura 20	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con BamHI de clones leu ⁺	106
Figura 21	Electroforesis en gel de agarosa de digestión de pLA13 con diferentes enzima de restricción	108
Figura 22	Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos subclones digeridos con BamHI	111
Figura 23	Electroforesis en gel de agarosa de digestión de YRp74.2 con enzima de restricción	114
Figura 24	Mapa de restricción del fragmento de DNA de <i>N. crassa</i> portador del gen leu1	116
Figura 25	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de subclones YRp23	118
Figura 26	Electroforesis de los productos de digestión de YRp23.2 con enzima de restricción	122
Figura 27	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los subclones BpG6 y BpG72	125
Figura 28	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del subclon BpG6	127
Figura 29	Electroforesis en agarosa de los productos de restricción de 8 clones 6SP	130
Figura 30	Autoradiografía de hibridación del DNA cromosómico de <i>N. crassa</i>	133
Figura 31	Autoradiografía de DNA cromosómico de <i>Neurospora</i> con BpG6 como sonda	135
Figura 32	Hibridación del DNA de transformantes leu ⁺ de <i>N. crassa</i>	137
Figura 33	Hibridación del DNA de transformantes leu ⁺ de <i>Neurospora</i> con YRp7 como sonda	138

RESUMEN

El desarrollo de un sistema de clonamiento génico eficiente requiere de sistemas de transferencia de material genético y la adecuada expresión del mismo. En *Neurospora crassa*, este tipo de estudio está limitado por la carencia de vectores adecuados a las características del hongo. Tales vectores deben ser portadores de orígenes de replicación que les permitan replicarse y mantenerse en forma extracromosómica en las células. Además, deben disponer de genes estructurales que puedan ser utilizados como marcadores selectivos.

El presente trabajo desarrolla un procedimiento que permite clonar secuencias de DNA de *N. crassa* mediante su selección ya sea en *Escherichia coli* o en *Saccharomyces cerevisiae*.

Para tales efectos, se construyeron tres genotecas de *N. crassa*. Dos de ellas fueron diseñadas y construidas en vectores de integración de *S. cerevisiae* con el objeto de aislar secuencias de replicación autónomas (ARS) de *Neurospora* en levadura. A partir de ellas, se pudo aislar un plásmido portador de un inserto que corresponde a un fragmento PstI de 3.5 kb de DNA del hongo. Tal inserto, sería portador de una secuencia del tipo ARS inicialmente funcional en levadura.

Una tercera genoteca fue diseñada y construida en el vector de replicación autónoma YRp7 de levadura con el objeto de aislar genes de *Neurospora* por complementación genética en *E. coli* o *S. cerevisiae*.

A partir de esta última, se aisló un plásmido recombinante, portador de un fragmento BamHI de 21 kb, con capacidad de complementar una mutación del gen *leuB* de *E. coli*.

El análisis de restricción y subclonamiento del plásmido, permitió elaborar su mapa de restricción y ubicar al gen en una región aproximada del inserto. A partir del plásmido subclonado YRp74.2, se pudo determinar la presencia de un sitio de reconocimiento BamHI a una distancia de 0.75 kb de uno de los extremos del inserto que afecta la capacidad de complementar la mutación *leuB6* de *E. coli*.

El análisis de hibridación de los plásmidos recombinantes, indica que ellos son portadores de un inserto de DNA cromosómico de *N. crassa*.

Experimentos de transformación genética de la cepa *leu1⁻* de *Neurospora*, indican que el DNA clonado tiene la capacidad de complementar la mutación del gen *leu1* del hongo. Experimentos de hibridación entre el DNA del plásmido recombinante YRp74.2 y el DNA de los transformantes de *Neurospora*, indica que ha ocurrido integración del DNA plasmidial. En algunos casos el evento integrativo incluye al vector; también puede ocurrir

integración simultánea en otros sitios del genoma del hongo.

Los resultados sugieren que el inserto de DNA de *Neurospora*, presente en el plásmido YRp74.2 correspondería al gen *leu1* del hongo. Tal gen, codifica por la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa de *Neurospora* y es análoga al producto del gen *leuB* de *E. coli*.

SUMMARY

The development of an efficient procedure for cloning genes of *Neurospora crassa* depends on the availability in that organism of systems for gene transfer and expression. This, in turn, depends on the existence of vectors satisfying the requirements of the fungus. These vectors should carry the structural genes needed as selective markers, and the replication origins to permit them to replicate extrachromosomally within the cells.

This work describes a procedure for cloning DNA sequences of *N. crassa* through selection in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Three genomic libraries of *N. crassa* were prepared. Two of them were developed using integration vectors of *S. cerevisiae* with the purpose of isolating autonomously replication sequences (ARS) of *Neurospora* in yeast. A plasmid was thus isolated carrying an insert that corresponded to a 3.5 kb PstI fragment from the fungus DNA. This insert would be the carrier of a type ARS sequence initially functional in yeast.

A third genomic library was designed and obtained in the yeast YRp7 autonomous vector, with the purpose of isolate *Neurospora* genes through genetic complementation in *E. coli* and *S. cerevisiae*. From this gene library a recombinant plasmid was isolated that is the carrier of a

21 kb BamHI fragment with the capacity of complementing a mutation of the *leuB* gene of *E. coli*.

Through an analysis of plasmid restriction and subcloning, a restriction map was drafted with the purpose of determining the approximate position of the gene within the insert. From the subcloned plasmid YRp74.2, the existence of a recognition site was ascertained at a distance of 0.75 kb from an end of the insert which affects the capacity of complementing the mutation *leuB6* of *E. coli*.

Hybridization analysis of the recombinant plasmids shows that they are carriers of a chromosomal DNA insert of *N. crassa*.

Experiments on the genetic transformation of the *Neurospora* stock *leu⁻* led to the conclusion that the cloned DNA has the capacity to complementing the mutation of fungus gene *leu1*. Also, hybridization experiments between DNA from the recombinant plasmid YRp74.2 and DNA from *Neurospora* transformants demonstrate the integration of the vector itself and sometimes the simultaneous integration in other loci of the fungus genome.

These results suggest that the insert of *neurospora* DNA present in the YRp74.2 plasmid may correspond to the fungus gene *leu1*. This gene codes for the *Neurospora* enzyme β -isopropilmalate dehydrogenase and is similar to the product of the *E. coli* gene *leuB*.

ABREVIATURAS

ARS	secuencia de replicación autónoma
BSA	seroalbumina de bovino
CTAB	bromuro de cetil-trimetilamonio
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
D.O.	densidad óptica
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
hr	hora
H ₂ O	agua
lt	litro
kb	kilobase
LB	caldo Luria
M	molar
mg	milígramo
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milímol
N	normal
nm	nanómetro
PEG	polietilenglicol

RNA	ácido ribonucleico
RNasa A	ribonucleasa A
SD	medio sintético para levadura
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TTP	timidina 5'-trifosfato
μCi	microcurie
μg	microgramo
μl	microlitro

PROPOSITO DE LA TESIS

El clonamiento eficiente de genes eucarióticos en *Neurospora crassa* requiere de vectores adecuados, específicamente dotados con marcadores genéticos fácilmente seleccionables y con secuencias de DNA que permitan su replicación autónoma en dicho organismo.

En relación a lo anterior, la presente tesis propone un procedimiento que permita el clonamiento de genes de *Neurospora* con el propósito de estudiar y conocer la organización del genoma de este hongo filamentoso. Para tal efecto, considera los siguientes objetivos.

- Clonar genes de *N. crassa* en *E. coli* y en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Construir vectores de clonado derivados de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Construir genotecas de *Neurospora crassa* en vectores tanto de integración como de replicación autónoma de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Probar el sistema indicado mediante el clonamiento del gen *leu1* de *Neurospora crassa* por complementación en *Escherichia coli*.
- Realizar transformación genética de *Escherichia coli*, y *Neurospora crassa* con plásmidos portadores del gen *leu1* de *N. crassa*.

- Clonar un fragmento de DNA de *N. crassa*, portador de una secuencia de replicación autónoma en *S. cerevisiae*.

La posibilidad de tener éxito en dichos objetivos deriva de la siguiente hipótesis de trabajo:

Dado que *N. crassa* y *S. cerevisiae* comparten características genéticas similares y que mutaciones de *E. coli* pueden ser complementadas por funciones génicas de *Neurospora*, entonces sería factible aislar genes estructurales y/o regulatorios de *N. crassa* en un sistema híbrido *Saccharomyces-E. coli*.

INTRODUCCION

El análisis de secuencias de DNA eucariótico ha sido facilitado por la simplicidad con la cual el DNA de estos organismos puede ser clonado en procariontes mediante los sistemas de transformación (Cohen *et al*, 1972) y vectores desarrollados para estos últimos (Balbas *et al*, 1986; Bolivar *et al*, 1977 y 1977b).

Secuencias de DNA eucarióticas pueden ser obtenidas y alteradas fácilmente *in vivo* e *in vitro* mediante el uso de técnicas de genética bacteriana y de DNA recombinante. Esto permite estudiar el efecto de cambios inducidos experimentalmente sobre la función y expresión de los genes analizados.

En general, los procedimientos de clonamiento molecular requieren de al menos cinco etapas: i) un método para generar fragmentos de DNA del organismo en cuestión; ii) un vector que sea un vehículo portador de las secuencias de DNA a estudiar; iii) reacciones que permitan la unión del DNA al vector; iv) un medio para introducir las moléculas recombinantes en una célula huésped donde pueda replicarse; y v) un método de selección de los clones recombinantes a partir de la célula receptora.

En atención a lo anterior, la mayoría de los estudios que se realizan a este nivel, requieren de la construcción

de una genoteca del organismo en un vector adecuado para el huésped a utilizar.

Algunos genes de organismos eucariontes inferiores se expresan en *E. coli*. El primer gen codificador de una proteína de *S. cerevisiae* clonado, fue aislado por su capacidad de funcionar en la bacteria *E. coli* (Struhl et al, 1976; Ratzkin et al, 1977; Struhl et al, 1977). Ello ha permitido disponer de una estrategia para clonar genes de levadura, en base a la capacidad de tales genes para complementar mutaciones auxotróficas de *E. coli*.

Muchos de los genes de levadura que se expresan en *E. coli* presentan un grado de funcionalidad variable, existiendo genes del mismo hongo que no llegan a expresarse en la bacteria. Esta situación hace necesario recurrir a otras estrategias para su aislamiento (Kramer et al, 1976).

Fenómenos similares a los recién descritos existen también en *Neurospora crassa*, organismo del cual se sabe que algunos de sus genes pueden funcionar en *E. coli*. El sistema de clonado de genes de *Neurospora* basado en la complementación génica de mutaciones de *E. coli* con DNA proveniente del hongo no ha sido totalmente exitosa. Es así como se ha podido aislar sólo un número reducido de genes que se expresan en *E. coli*, por ejemplo, el gen *pyr-4* (Buxton et al, 1983 a,b), el gen *nit-3* (Smarrelli et al, 1982) y el gen *trp-1* (Keeseey et al, 1982), el cual, sin embargo, muestra una expresión aberrante en la

bacteria (Schechtman *et al*, 1983). Otro caso es el gen *qa-2*, ubicado en un cluster en el grupo de ligamiento VII (Alton *et al*, 1978; Vapnek *et al*, 1977). El funcionamiento del gen *qa-2* en *E. coli* ha sido detectado por complementación de la mutación *aroD6*. Sin embargo los genes *qa-3* y *qa-4*, también del cluster mencionado, son incapaces de funcionar en *E. coli*. No obstante, el gen *qa-3* se expresa en *Neurospora* al retrotransformar este organismo (Schweizer *et al*, 1981 a,b).

Las limitaciones para la expresión de genes de organismos eucariontes en *E. coli*, pueden desde luego deberse a diferentes aspectos de la fisiología génica.

La síntesis de una proteína funcional depende de la naturaleza de las señales de control y de la eficiencia de los mecanismos que realizan la transcripción y la traducción de la información génica. Además, generalmente es necesario un procesamiento del RNA mensajero y en algunos casos, el procesamiento y/o compartimentalización del polipéptido que se sintetiza.

La utilización de hongos como huéspedes de clonado, podría ser ventajosa como estrategia de clonamiento de genes que no se expresan en *E. coli*. En relación a esto, *Saccharomyces* puede constituir una alternativa conveniente para el clonado molecular de aquellos genes eucarióticos que no pueden ser seleccionados por complementación en *E. coli*. De hecho la levadura ha demostrado ser un buen organismo para el clonado de genes

heterólogos (Carú, 1987) e incluso ha sido descrito que algunos genes procarióticos han podido ser clonados y expresados en *S. cerevisiae* (Jiménez et al, 1980; Rose et al, 1981; Cohen et al, 1980).

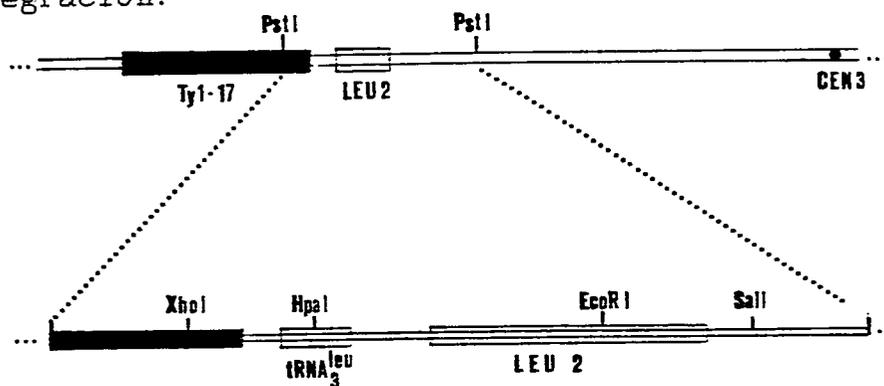
Además, varios genes de *Saccharomyces* (Broach et al, 1979; Hsio et al, 1979; Letts et al, 1984; Arndt et al, 1987), de *Neurospora* (Schweizer et al, 1981; Huiet, 1984), de otros hongos (Kawamura, 1983) y de organismos eucariontes superiores (Henikoff et al, 1981, 1983; Beggs et al, 1980; Hitzeman et al, 1981; Moir et al, 1987) que no pudieron ser detectados por complementación en *E. coli*, pudieron ser clonados y expresados después de ser reintroducidos en hongos.

La eficiencia de los sistemas de clonado de genes en hongos depende de la disponibilidad de vectores para el desarrollo de los respectivos sistemas de transferencia y expresión génica.

El sistema mejor desarrollado en la actualidad es el de *Saccharomyces cerevisiae* (Botstein et al, 1979; Falco et al, 1983), para lo cual se dispone de una serie de vectores de clonado capaces de funcionar como plásmidos extracromosómicos.

Algunos de los plásmidos usados corrientemente son híbridos de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Dependiendo del modo de replicación de tales plásmidos en levadura, se distinguen al menos tres tipos de vectores (Hinnen, 1978; Ratzkin, 1977; Beggs, 1978; Struhl, 1979).

(a) Vectores de integración (Hinnen, 1978), que transforman con baja frecuencia (aproximadamente 1-10 transformantes por μg de DNA), integrándose en una región de homología en el genoma de la levadura y generalmente son estables mitóticamente. Una excepción a esto ocurre con aquellos vectores de integración que son portadores del gen *LEU2* de este organismo. En el esquema adjunto, se muestra la organización de la región del cromosoma III de *S. cerevisiae* donde se encuentra ubicado el gen *LEU2*. Adyacente al gen *LEU2*, en la posición 5' respecto a la dirección de transcripción de dicho gen, se encuentra ubicada una de las 50 copias del transposón Ty1 de este organismo (Cameron *et al*, 1979; Scherer *et al*, 1980; Kingsman *et al* 1981). En ambos extremos de dicho transposón existen 2 secuencias repetidas directas (DR). Estas características, hacen que los vectores de integración portadores del gen *LEU2* transformen con una frecuencia mayor de la esperada para un vector de integración.



Organización del locus *LEU2* en el cromosoma III de *S. cerevisiae*.

Por estas razones, todos los plásmidos que llevan el gen *LEU2* poseen parte de un extremo de dicho elemento genético (un segmento que forma parte de una de las secuencias repetidas directas (DR)) y por lo tanto pueden integrarse por homología en otras regiones fuera de la región del gen *LEU2*, aumentando la frecuencia de transformación.

(b) Vectores de replicación extracromosómica (Beggs, 1978; Hicks, 1979a; Struhl, 1979), que se caracterizan por transformar a la levadura con alta frecuencia. De estos vectores existen 2 tipos principales, aquellos derivados del plásmido de 2u (Broach *et al*, 1980; Royer *et al*, 1977; Gerbaud *et al*, 1979; Toh-e *et al*, 1981) y denominados YEp (YEp13 por ejemplo) y aquellos que poseen una secuencia de replicación autónoma (ARS), de origen cromosómico (Beggs, 1978), denominados YRp (YRp7 por ejemplo). Estos plásmidos transforman a *Saccharomyces* con alta frecuencia, pero los transformantes son extraordinariamente inestables mitóticamente, segregando a tasas de alrededor del 1-3% por generación de crecimiento en medio no-selectivo. Acompañando a estas características, también se observa un incremento en el tiempo requerido para la duplicación celular, aumentando el tiempo generacional (Stinchcomb *et al*, 1979; Stinchcomb *et al*, 1980; Struhl *et al*, 1979; Chan *et al*, 1980; Tschumper *et al*, 1980).

(c) vectores que poseen secuencias centroméricas y teloméricas, que se caracterizan por transformarse con alta frecuencia y ser muy estables, llegando a constituir verdaderos cromosomas artificiales (Szostak et al, 1982; Clarke et al, 1980 a,b; Clarke et al, 1983; Chan et al, 1983; Dani et al, 1983; Murray et al, 1983; Yeh et al, 1986; Burke et al, 1987).

Por otro lado, los sistemas de transformación en hongos filamentosos han estado limitados por las características estructurales de estos organismos, en especial la existencia de la pared celular. Sin embargo, algunos sistemas basados en las técnicas descritas para *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen et al, 1978; Beggs, 1978) han sido desarrollados en *Neurospora crassa*. Algunas técnicas recurren a la formación de esferoplastos mediante la digestión enzimática parcial de la pared celular de conidios recién germinados (Case et al, 1979) o de micelio propiamente tal (Buxton et al, 1984). Ha sido descrito otro procedimiento de transformación de *Neurospora* en el cual el estado de competencia de conidios recién germinados se logra con un tratamiento con acetato de litio (Dhawale et al, 1984).

Las técnicas descritas para transformar *Neurospora* requieren la fusión de esferoplastos mediada por polietilenglicol en presencia de cloruro de calcio (Van Solingen et al, 1977).

No obstante la disponibilidad de estos sistemas, la transformación genética en *Neurospora* produce un bajo número de transformantes.

En *N. crassa* la mayoría de los vectores de clonado son del tipo de integración, llevando como marcador genético el gen *qa-2*. Existe al menos un vector derivado de un plásmido mitocondrial de *Neurospora* (Stohl *et al*, 1982) que tiene la capacidad de replicar extracromosómicamente y transformar al hongo con una frecuencia relativamente alta (Stohl *et al*, 1983). Sin embargo, se ha hecho necesario aislar secuencias que puedan funcionar como replicadores para la construcción de vectores adecuados a las necesidades de la genética de este organismo.

La carencia de vectores de clonado realmente eficientes en *N. crassa*, se debe en parte a la falta de buenos marcadores genéticos que se expresen tanto en *N. crassa* como en *E. coli*.

Uno de estos genes podría ser el gen *leu1* que en *N. crassa* codifica para la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.85) (Gross *et al*, 1969) y se encuentra ubicado en el grupo de ligamiento III de dicho organismo (Perkins *et al*, 1982). El gen *leu1* de *N. crassa* es equivalente al gen LEU2 de *S. cerevisiae* y al gen *leuB* de *E. coli*. Como tal, es un buen elemento para estudiar un sistema genético, principalmente con respecto a su regulación.

En *N. crassa* se dispone de varios mutantes del gen *leu1* (Barrat et al, 1980; Perkins et al, 1982) los cuales carecen de la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa y que han sido obtenidos por distintos métodos (Barrat et al, 1980). Estos diferentes alelos hacen posible disponer de cepas doble mutantes del gen *leu1* del hongo, disminuyendo la frecuencia de reversión de dicho gen a niveles inferiores a 10^{-12} , lo que facilitaría los estudios de transformación en *Neurospora*.

Por otro lado, el gen *leu1*, está sujeto a un sistema de control genético regulado por el gen *leu3* ubicado en el grupo de ligamiento I (Polacco et al, 1973; Olshan et al 1974). Dicho gen regulador posiblemente actúa como un elemento regulatorio positivo (Polacco et al, 1973), haciendo más interesante el estudio de este sistema genético relacionado con la biosíntesis de leucina, sobre todo si se llega a realizar estudios comparativos con otro ascomicete como levadura. En ambos organismos existen elementos similares, pero también hay marcadas diferencias que son difíciles de explicar. En ambos, los genes relacionados con la ruta de biosíntesis de leucina están ubicados en diferentes grupos de ligamiento (Perkins et al, 1982; Mortimer et al, 1980). Los factores regulatorios sobresalientes de la biosíntesis de leucina de *Neurospora* son similares a aquellos de *S. cerevisiae*, donde el α -isopropilmalato juega un rol esencial. En *Neurospora*, las tres enzimas específicas para leucina (α -isopropilmalato

sintetasa, isopropilmalato deshidratasa y β -isopropilmalato deshidrogenasa) tienen ubicación en el citosol y están codificadas por los genes *leu4*, *leu2* y *leu1* respectivamente (Gross, 1965; Reichenbecher *et al*, 1978). La síntesis de tales enzimas es regulada por un proceso que interrelaciona represión e inducción. La represión está mediada por leucina y la inducción está relacionada con el producto del gen *leu3* (Gross, 1965; Kashmiri *et al*, 1970). Por lo tanto, existirían al menos dos elementos regulatorios en la síntesis de las tres enzimas. Un elemento se une a leucina o un derivado y el complejo formado funciona como un represor de la expresión del gen estructural de α -isopropilmalato sintetasa (*leu4*). El otro elemento, interactúa con α -isopropilmalato y funciona como un inductor para la expresión de los genes *leu1* y *leu2*.

El análisis de diferentes mutantes del gen *leu3* sostiene el modelo (Olshan *et al*, 1974). Además, dichos mutantes pueden ser identificados sobre la base de bajos niveles de los productos de los genes *leu2* y *leu1*. Tales estudios indican que el gen *leu3* codifica por un elemento regulatorio positivo, el cual interactúa con α -isopropilmalato formando un complejo. Este complejo aparentemente sirve como un elemento regulador positivo para 7 u 8 cistrones (Polacco *et al*, 1973; Olshan *et al*, 1974). Por otro lado, se ha sugerido que el complejo formado por el producto del gen *leu3* y α -isopropilmalato podría participar en una represión temporal de la síntesis

de rRNA y proteínas (Amaleo, 1980). Así, el sistema *leu3*- α -isopropilmalato podría ser considerado como una señal de privación temporal para balancear la producción de leucina. Esto se lograría, variando los requerimientos de síntesis de RNA y de proteínas en la célula.

El análisis de mutantes auxótrofos para leucina en *N. crassa*, ha permitido detectar una interconexión regulatoria de las rutas de biosíntesis de leucina e histidina. En este sistema, señales específicas de la ruta de biosíntesis de leucina participan en el control de la síntesis de la enzima imidazolglicerol-fosfato deshidratasa (IGP-deshidratasa). Probablemente, el efecto de α -isopropilmalato es a nivel de la transcripción del gen *his1*, actuando específicamente como un inductor en forma similar al caso del gen *leu2* (Reichenbecher *et al*, 1978).

En atención a lo anterior, el clonamiento del gen *leu1* de *Neurospora crassa* podrá entregar información sobre los aspectos más relevantes del sistema de regulación recién mencionado. Indudablemente que una buena prueba de tal sistema, se puede obtener a nivel de la organización interna del gen. Además, permitirá estudiar a nivel molecular las interrelaciones que puedan haber con los otros genes participantes del sistema de regulación, una vez que se disponga de ellos. El gen *leu1* puede ser utilizado como una herramienta para comenzar a estudiar como actúan los elementos regulatorios a nivel de la secuencia de DNA, los tipos de promotores, etc.

El gen *leu1* de *N. crassa* se puede expresar en la bacteria *E. coli* en forma similar a como lo hace el gen LEU2 de levadura, el cual complementa la mutación *leuB6* de *E. coli* (Ratzkin et al, 1977) y el gen LEU2 de *Candida maltosa* (Kawamura et al, 1983) el cual, además de expresarse en *S. cerevisiae*, se expresa en *E. coli*.

Por otro lado, el disponer del gen *leu1* de *N. crassa* puede facilitar la experimentación para aislar fragmentos de DNA portadores de secuencias de replicación autónomas (ARS). Esto a su vez podría permitir la construcción de plásmidos con orígenes de replicación cromosómicos del hongo que funcionen como vectores *N. crassa-E. coli*. Ello facilitaría el estudio genético de los fenómenos de regulación de la expresión génica en *N. crassa*.

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⁻, *hsd20* (*r_B-*, *r_E-*), *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galk2*, *rpsL20* (*S_m-*), *xy15*, *mt11*, *supE44*, λ^-) (Boyer et al, 1969) fueron utilizados en los experimentos de clonado de DNA y en la obtención de plásmidos.
- 1.2 Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc483 (*a*, *leu2.3*, *leu2.112*, *his4*, *can1*) (Jiménez et al, 1980), Esta cepa fue proporcionada por el Dr. Antonio Jiménez (C.B.M., Madrid, España).
cepa D234-3B (α , *leu 2-3,112*; *his 3-11*; *ura 3-52*, *trp 1-289*; Tcm) (G.R.Fink, 1978). Esta cepa fue proporcionada por el Dr. J.W. Szostak (Harvard Medical School, Boston, MA., U.S.A.). Estas cepas de levadura se usaron en los experimentos de transformación.
- 1.3 *Neurospora crassa*: La cepa silvestre 74A FGSC # 264 y las cepas mutantes *leu1-A* FGSC # 28 , se

obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center, Arcata, California, U.S.A.) (Barrat *et al.*, 1982).

- 1.4 Plásmidos: Los plásmidos pBR-322 (Bolivar *et al.*, 1977), YEp13 (Carbon *et al.*, 1978), YRp7 (Tschumper *et al.*, 1980), se utilizaron en los experimentos de clonado.

El plásmido pTS1.2 es un derivado del plásmido pBR-322 al cual se le ha insertado en el sitio Sall un fragmento Sall/XhoI de 2 kb portador del gen *leu2* de levadura y fue obsequiado gentilmente por la Dra. Teresa Suárez, Dpto de Genética, Universidad de Salamanca, España.

- 1.5 Enzimas: Las endonucleasas de restricción Aval, BglI, BglII, HindIII, KpnI, MboI, PvuII, SmaI, SmaIII se obtuvieron de Bio. Labs. Inc. USA.

Las endonucleasas de restricción BamHI, EcoRI, HaeIII, Sall, HhoI, XmaIII, SstI, SstII y las enzimas DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa I de *E. coli*, Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y polinucleótido kinasa se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories Inc., Maryland USA. Del mismo laboratorio se obtuvo albúmina de suero de bovino.

Las endonucleasas de restricción PstI y Sau3AI y la enzima fosfatasa alcalina de ternera (CIP) se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Alemania.

Las enzimas lisozima, ribonucleasa A, proteinasa K, pronasa y β -glucuronidasa tipo H2 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.

- 1.6 Acidos desoxirribonucleicos: DNA del bacteriófago lambda (λ) digerido con la enzima de restricción HindIII se obtuvo de Bethesda Research Laboratories Inc. USA. DNA de esperma de salmón se obtuvo de Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.

2.- Reactivos Químicos

De Sigma Chemical Co. St. Louis USA, se obtuvo: Agarosa (tipo V), ampicilina, BSA (fracción V), bromuro de etidio, cloruro de cesio, SDS, DTT, EDTA, ficoll, 8-hidroxiquinolina, polivinilpirrolidona, tetraciclina, Tris, nucleotidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), aminoácidos: histidina, leucina, lisina, prolina, treonina y triptófano. De Merck, Darmstadt, Alemania se utilizó: Acetato de sodio, alcohol isoamílico, ácido bórico, ácido cítrico, arena de mar purificada, cloroformo, cloruro de magnesio, etanol absoluto, fenol, formamida, glicerol, glucosa, glicina, metanol, persulfato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sacarosa. De BioRad se utilizó agarosa de bajo punto de fusión.

De Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA.: triptona, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, base de nitrógeno para levaduras, agar-agar

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

De Millipore Filter Corporation, se obtuvo papel de nitrocelulosa.

De Whatmann Ltd., Inglaterra, papel 3MM.

II.- METODOS

1.- Cultivo de Microorganismos

- 1.1 Bacterias: *Escherichia coli* fue crecida en medio de cultivo LB (Apéndice N° 1). Para cultivos sólidos se agregó agar-agar al 2%. Cuando fue necesario las bacterias se crecieron en medio mínimo Vogel-Bonner (Vogel et al., 1956; Davis et al., 1980) (Apendice N° 1). Los cultivos bacterianos se incubaron a 37° C con agitación constante.
- 1.2 Levaduras: Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fueron crecidas en medio YEP (Apendice N° 1). Para cultivos sólidos se agregó agar-agar al 2%. En algunos experimentos, las cepas de levadura se crecieron en medio mínimo SD (Apendice N° 1) suplementado con 40 mg de los requerimientos metabólicos para un litro de solución. Los cultivos se incubaron a 30° C con agitación constante.
- 1.3 *Neurospora crassa*: Las cepas de *Neurospora* se crecieron en medio completo (Apendice N° 1). En algunos experimentos, las cepas del hongo se crecieron en medio mínimo Vogel (Apendice N° 1) suplementado con sacarosa al 1%. Los cultivos se incubaron a 25° C con agitación constante.

2.- Mantención de las cepas:

- 2.1 Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB hasta saturación. Para las bacterias portadoras de plásmidos el medio fue suplementado con ampicilina (100 µg/ml) o tetraciclina (20 µg/ml). Un ml de cultivo se mezcló con un ml de glicerol al 80% (previamente esterilizado). Se dejó a temperatura ambiente por 4 horas y luego se guardaron a -20° C. En estas condiciones las células se mantuvieron viables por más de 6 meses.
- 2.2 Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en medio YEP o en medio mínimo SD y los cultivos se trataron de la misma manera que las cepas bacterianas.
- 2.3 Las cepas de *Neurospora crassa* se crecieron en tubos con medio completo sólido durante 5 días a 25° C y se dejaron conidiar mediante exposición a la luz natural por 24 horas. Posteriormente se guardaron a 4° C. En estas condiciones los cultivos se mantuvieron viables por aproximadamente 4 meses.

3.- Purificación de DNA

- 3.1 Purificación de DNA plasmidial: El DNA plasmidial se purificó utilizando una modificación del método

de la lisis clarificada descrito por Clewell et al (1969). A partir de un litro de un cultivo nocturno de *E. coli* en medio LB suplementado con el antibiótico apropiado se obtuvieron las células por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min en una centrífuga Sorvall RC-5B utilizando un rotor SS34. Las células se resuspendieron en 10 ml de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM pH=8.0. Luego se agregó 1 ml de lisozima (8 mg/ml en Tris-HCl 25 mM pH=8.0) y 0.5 ml de EDTA 50 mM pH=8.0. La mezcla se incubó en hielo por 20 min, luego se agregaron 16 ml de mezcla lítica (triton X-100 al 0.1% en Tris-HCl 50 mM pH=8.0, EDTA 50 mM) y se incubó durante 30 min en hielo. La mezcla se centrifugó a 18000 rpm por 60 min en una centrífuga Sorvall RC-5B utilizando un rotor SS34. El líquido sobrenadante (que corresponde al lisado aclarado) fue colectado y diluido con un volumen de agua destilada estéril. Se agregó RNasa A a una concentración final de 30 µg/ml y se incubó a 37° C durante 15 min. Posteriormente el lisado se desproteinizó con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (apéndice Nº 2). El DNA se precipitó de la fase acuosa por adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío (-20° C). La mezcla se incubó a -20° C durante 60 min y luego se centrifugó a 10000 x g durante 45

min El DNA se resuspendió en un volumen apropiado de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH=8.0, EDTA 1 mM). Luego para extraer el exceso de sales, el DNA se dializó contra tampón TE a 4° C durante 24 hrs.

3.2 Minipreparación de DNA plasmidial: Para el análisis de plásmidos de los clones recombinantes se usó un método rápido de purificación de DNA en pequeña escala que corresponde a una modificación del método descrito por Birnboim *et al.*, 1979. Las colonias bacterianas se crecieron en tubos con 3 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. En tubo Eppendorf se colocó 1.5 ml del cultivo. Se centrifugó 1 min en una microcentrifuga Eppendorf y las células precipitadas se resuspendieron en 100 μ l de una solución compuesta por glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, tris-HCl 25 mM pH=8.0, lisozima 4 mg/ml. La suspensión bacteriana se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 μ l de solución de NaOH 0.2 N, SDS 1% recién preparado. Se mezcló invirtiendo 3-4 veces el tubo y se dejó inmediatamente en hielo por 5 min. Posteriormente se adicionó 150 μ l de una solución fría de acetato de potasio 5 M. El tubo se agitó suavemente en posición invertida en vortex a baja velocidad durante 10 seg e inmediatamente se dejó en hielo

por 5 min. La mezcla se centrifugó durante 5 min en una centrífuga Eppendorf a 4° C. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se desproteinizó 3 veces con fenol (apéndice Nº 2). Los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 2 volúmenes de etanol frío (-20° C) e incubación de la mezcla a -20° C durante 10 min. Luego los tubos se centrifugaron durante 5 min en una centrífuga Eppendorf a 4° C. El líquido sobrenadante se descartó. El tubo se dejó escurrir en posición invertida sobre papel filtro durante 5 min. El precipitado se secó en un desecador al vacío, luego se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH=8.0, EDTA 1 mM) que contenía RNasa A a una concentración final de 30 µg/ml. Los ácidos nucleicos se incubaron durante 15 min a 37° C. El DNA así obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa (sección 4.1) cargando 5 µl de la preparación por carril.

3.3 Purificación de DNA cromosómico de *Neurospora crassa*: El DNA cromosómico de *Neurospora* se purificó mediante una modificación de la técnica de Hautala et al. (1977) a partir de una fracción nuclear obtenida por el método de Reich et al., (1961).

El precipitado nuclear se resuspendió en una solución salina (NaCl 150 mM, EDTA 100 mM pH=8.0) en una relación de 0.5 ml por gramo de micelio húmedo. Luego se adicionó proteinasa K a una concentración final de 500 µg/ml y SDS a una concentración final del 1%. La mezcla se agitó suavemente invirtiendo el tubo 3 veces. Se incubó 2 hrs a 37° C, luego 15 min a 70° C y finalmente se enfrió en hielo. Posteriormente se agregó 1/10 de volumen de acetato de potasio 5 M frío, se incubó 30 min a 4° C hasta que apareció un precipitado blanco que se eliminó por centrifugación a 10000 x g durante 10 min. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se desproteinizó con un volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando a 3000 x g durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo estéril. Se agregaron 2 volúmenes de etanol (preenfriado a -20° C) y el tubo se invirtió 3 veces. Inmediatamente después de formarse el precipitado de ácidos nucleicos (que adquieren una forma de ovillo), éste fué retirado cuidadosamente con la ayuda de una pinza estéril y se depositó en un tubo corex de 15 ml, estéril. Los ácidos nucleicos se secaron al vacío y se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH=8.0) a temperatura ambiente con agitación suave. El RNA se

eliminó agregando RNasa A a una concentración final de 30 µg/ml e incubando a 37° C durante 15 min. El DNA se desproteinizó con un volumen de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y las fases se separaron por centrifugación a 3000 x g durante 5 min. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo estéril, se agregó 2 volúmenes de etanol preenfriado a -20° C y se incubó a -20° C durante 1 hr. El DNA se recuperó por centrifugación a 12000 x g durante 30 min. El precipitado se secó al vacío y luego se resuspendió en Tampón TE. El exceso de sales se removió por diálisis contra tampón TE a 4° C. Finalmente el DNA se sometió a examen mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE (Métodos, sección 4.1).

3.4 Purificación de DNA total de *Saccharomyces cerevisiae*: El DNA de *S. cerevisiae* fue purificado a partir de esferoplastos obtenidos con zimoliasa 60000, para lo cual las células de levadura se crecieron en 40 ml de medio mínimo SD hasta saturación o en el caso de transformantes hasta $D.O_{650} = 0.35-0.40$. Las células se recuperaron por centrifugación a 3500 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 agregó 100 µl de zimoliasa 60000 (2.5 mg/ml) preparada en el

momento de usar y se incubó a 37° C durante 1 hr con agitación suave. Los esferoplastos se recuperaron por centrifugación a 1000 x g durante 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 al 10%. La mezcla se incubó a 65° C durante 30 min. Se adicionó 1.5 ml de acetato de potasio 5 M y se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Después se incubó en hielo durante 1 hr y luego se centrifugó a 8000 x g durante 10 min. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo estéril, se agregaron 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcló invirtiendo 3 veces el tubo y se centrifugó a 7000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 3 ml de tampón TE a temperatura ambiente con agitación suave durante una noche. La suspensión se centrifugó a 8000 x g durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. A la solución se agregó 1 volumen de isopropanol y se agitó suavemente. El precipitado (con aspecto de ovillo) se extrajo con la ayuda de una pinza estéril y se depositó en un tubo Eppendorf estéril. El precipitado se resuspendió en tampón TE. El RNA se eliminó agregando RNasa A a una concentración final de 30 µg/ml e incubando a 37° C durante 15 min. El DNA se desproteinizó agregando un volumen

de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), las fases se separaron por centrifugación durante 30 seg en una centrifuga Eppendorf. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se agregó 2 volúmenes de etanol preenfriado a -20° C y se dejó durante 30 min a -20° C. Luego se centrifugó durante 5 min en una microfuga Eppendorf, el líquido sobrenadante se eliminó, el precipitado se secó al vacío y luego se resuspendió en tampón TE. El DNA total de levadura se chequeó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE (Métodos, sección 4.1).

3.5 Purificación de DNA plasmidial de *Saccharomyces cerevisiae*: Preparaciones de DNA plasmidial de levadura se realizaron por una modificación del método de Yeh et al., (1986). Las cepas de levadura se crecieron a 30° C durante una noche en medio YEP (Métodos, sección 1.2) con agitación constante. Los transformantes se crecieron en medio mínimo SD hasta $D.O_{650} = 0.35-0.4$ con agitación constante. Las células se colectaron por centrifugación a 3500 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 300 μ l de una solución estéril de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM pH=7.5, NaCl 200 mM preenfriada a 4° C. La suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf estéril. Se adicionó

0.6 g de esferas de vidrio (0.45-0.50 mm de diámetro, prelavadas en HCl 1 M y luego lavadas en H₂O estéril). La mezcla se agitó 3 veces en vortex a velocidad máxima durante un período de un min, incubando en hielo cada vez. La ruptura celular se comprobó por observación al microscopio óptico y determinación del porcentaje de células intactas. En algunos casos la agitación en vortex se continuó hasta que la mayoría de las células se rompieron. Al extracto celular se adicionó 300 µl de fenol saturado en Tris-HCl 50 mM pH=8.0, EDTA 1 mM y se agitó en vortex 2 veces por un período de un min. Luego se agregó 300 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agitó en vortex por un min y las fases se separaron por centrifugación durante 3 min en una centrifuga Eppendorf. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y el DNA plasmidial se precipitó agregando 1 ml de etanol frío (-20° C) e incubando a la misma temperatura durante 15 min. El DNA se recuperó por centrifugación durante 5 min en una centrifuga Eppendorf. El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 250 µl de tampón TE. La preparación plasmidial se reprecipitó agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, 2 volúmenes de etanol a -20° C e incubando a la misma temperatura durante 1 hr. La mezcla se centrifugó durante 5 min en una

centrífuga Eppendorf. El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 50 μ l de tampón TE.

4.- Electroforesis de DNA

4.1 Geles de agarosa: La electroforesis de DNA en geles de agarosa se realizó de acuerdo a la técnica de Johnson et al. (1977). La agarosa se disolvió en tampón TBE (Tris 8.9 mM, ácido bórico 8.9 mM, EDTA 2 mM pH=8.0) por calentamiento hasta ebullición. Luego se dejó que la temperatura se equilibrara a 60°-65° C y se agregó bromuro de etidio (proveniente de una solución stock de 5 mg/ml preparada en agua) a una concentración final de 0.5 μ g/ml. La solución así preparada se depositó en una placa de vidrio, provista de una peineta con espaciadores de 0.5 mm y se dejó gelificar a temperatura ambiente. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal. Para correr el gel se utilizó tampón TBE que contenía bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml. Las muestras de DNA a analizar se mezclaron en una proporción de 5:1 (v/v) con tampón de carga 6X [ficoll (tipo 400) 2%, azul de bromofenol 0.25%, glicerol 35%, en TBE 6X]. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 60 volts. Para el

caso de mini-geles (5 x 7 cm) se corrieron a 40 volts constantes.

4.2 Visualización de DNA en geles de agarosa: En los casos en que la electroforesis no se realizó en presencia de bromuro de etidio, los geles de agarosa se sumergieron en una solución de bromuro de etidio 1 $\mu\text{g/ml}$ en agua destilada durante 15 min. Luego los geles se lavaron en sulfato de magnesio 1 mM por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se observaron en un transiluminador Mineralight modelo TM-36 a una longitud de onda de 302 nm. Los geles se fotografiaron en una cámara Polaroid CV-5 usando película Polaroid tipo 55 o en una cámara Polaroid MP-4 usando película Polaroid tipo 66. En ambos casos se utilizó un filtro amarillo de gelatina y la película se expuso durante 30 seg.

4.4 Determinación de tamaños moleculares: Para determinar el peso o tamaño molecular de los fragmentos de DNA productos de la digestión con las diferentes endonucleasas de restricción, se construyó una curva de calibración utilizando como estandar de peso molecular el DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII (Williams et al., 1980). El DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII da 8 fragmentos cuyos tamaños son conocidos

y se detallan en el apéndice Nº 3. El procedimiento consistió en graficar en un papel semilogarítmico el peso molecular de los fragmentos del DNA estándar en la abscisa contra su movilidad electroforética en la ordenada. Se obtuvo una curva donde se extrapolan las migraciones electroforéticas de los fragmentos de tamaños desconocidos.

5.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

5.1 Extracción de DNA: Para extraer el DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión se utilizó la técnica descrita por Langridge *et al*, (1980), usando como agente extractor bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio (CTAB).

Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% preparada en tampón TEA (Tris-HCl 40 mM pH=7.9, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM), en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. La electroforesis se realizó en el mismo tampón durante toda la noche a 30 volts. Finalizada la electroforesis se cortó con un bisturí la zona del gel donde se ubicaba la banda de DNA de interés (visualizado bajo la luz

ultravioleta) y el trozo de gel se depositó en un tubo Eppendorf estéril. El gel se fundió a 65-68° C durante 20 min, agitando 2 o 3 veces en vortex para homogenizar. Cuando la agarosa estuvo fundida el tubo se transfirió a un baño termorregulado a 37° C, se agregó 1 volumen de una solución de agua-CTAB precalentada a 37°, 1 volumen de butanol-CTAB precalentado a 37° C y se agitó en vortex. La mezcla se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 1 min a 37° C para separar las fases. Se extrajo la fase butanol (superior) y se depositó en un tubo Eppendorf estéril. A la fase acuosa (inferior) se agregó 1/2 volumen de butanol-CTAB precalentado a 37° C, se agitó en un vortex y se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante un min. Se colectó la fase butanol (superior) y se juntó con la fase butanólica anterior. A la fase butanólica se agregó 1/4 de volumen de acetato de sodio 0.3 M. Se agitó en un vortex y se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante un min. La fase acuosa (inferior) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se adicionó un volumen de cloroformo y después de agitar en un vortex se incubó en hielo durante 5-10 min. La mezcla se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante un min a 4° C y se colectó la fase acuosa (superior). El DNA se precipitó agregando 2-4% (v/v) de acetato de sodio

3 M y 3 volúmenes de etanol preenfriado a -20° C. La mezcla se incubó a -20° C durante la noche o 30 min a -70° C. El DNA se recuperó por centrifugación en una microfuga Eppendorf durante 5 min a 4° C. El precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada estéril (10 a 20 μ l) y finalmente se analizó por electroforesis en un minigel de agarosa al 0.7% en TBE.

5.2 Preparación de soluciones: Las soluciones para la extracción CTAB se prepararon como se detalla a continuación. Para saturar el butanol con agua y viceversa, se mezcló un volumen de agua destilada con un volumen de butanol, se agitó y dejó equilibrar hasta que se separaran las fases (fase superior corresponde a la fase butanólica y la fase inferior corresponde a la fase acuosa). Ambas fases se colectaron por separado y transfirieron a matraces limpios. Se disolvió 1 g de CTAB en 100 ml de butanol saturado en agua, luego se agregó 100 ml de agua saturada en butanol. Se mezcló muy bien y se dejó a temperatura ambiente durante una noche o un tiempo adicional hasta que se separaran las fases. Cada fase se colectó por separado en frascos herméticos y se guardaron en un incubador a 37° C. La fase superior corresponde a la solución de

butanol-CTAB y la fase inferior a la solución de agua-CTAB.

6.- Determinación de la concentración de DNA.

6.1 Densidad óptica: La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm. Las muestras de ácidos nucleicos se depositaron en cubetas de cuarzo de 1 ml y la densidad óptica a 260 nm se midió en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-150-02. Se consideró que 1 unidad de absorbancia (D.O.) a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble hebra (Maniatis et al., 1982). La pureza de una preparación de DNA se determinó midiendo la razón entre la densidad óptica a 260 y 280 nm ($D.O._{260}/D.O._{280}$). Se estimó que una preparación estaba pura cuando la razón era igual o mayor a 1.8.

6.2 Método del minigel de agarosa: Otro método usado para estimar la concentración de DNA en las preparaciones corresponde a electroforesis en minigel de agarosa. Se preparó un minigel (5 x 7 cm) de agarosa al 0.7% en TBE en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml (Métodos, sección 4.1). A 5 µl de la muestra

de DNA se adicionó 1 μ l de tampón de carga 6X y la mezcla se cargó en el gel. La electroforesis se corrió en una cámara horizontal (utilizando tampón TBE que contenía bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml) a 40 volts hasta que el colorante alcanzó el extremo del gel. Se utilizó como estándar DNA del bacteriófago lambda digerido con HindIII a una concentración final de 40 ng/ μ l. El minigel se observó bajo luz ultravioleta en un transiluminador Mineralight modelo TM-36. Se comparó la intensidad de fluorescencia de la banda de DNA de la muestra en estudio con una banda de DNA del estándar que tuviera una intensidad igual o similar. A partir de la comparación se estimó la concentración de DNA de la muestra. En algunos casos donde se requería mayor exactitud en la determinación, se sacó una fotografía del gel en una cámara Polaroid CV-5 utilizando una película Polaroid tipo 55 y se realizó una densitometría del negativo en un fotodensitómetro Gelman modelo ACD-15.

7.- Digestión con endonucleasas de restricción.

7.1 Digestión total de DNA de *Neurospora crassa*: La digestión total se realizó incubando el DNA de *N. crassa* con la enzima de restricción a una

concentración de 2-4 unidades de enzima por μg de DNA. Las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura utilizadas se basaron en las descritas por Maniatis *et al* (1982). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20-30 μl y se incubó durante 2-3 hrs o por un tiempo mayor hasta que el DNA estuviera totalmente digerido. La reacción se chequeó por electroforesis en mini-gel de agarosa tomando una alícuota de 1 μl de la mezcla de reacción y corriéndola en un mini-gel. Cuando la digestión se completó, el DNA se desproteinizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y finalmente se precipitó con 2 volúmenes de etanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2 Digestión parcial del DNA de *Neurospora crassa*: Las condiciones de restricción parcial con las enzimas de restricción se establecieron de acuerdo al método descrito por Maniatis *et al* (1982). El DNA de *Neurospora* (9 muestras de 1 μg cada una) se trató en forma simultánea con concentraciones decrecientes de la enzima de restricción a utilizar (para BamHI 4 a 0 unidades/ μg de DNA, para Sau3AI 2 a 0 unidades/ μg de DNA). Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 15 μl y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min en el caso de

BamHI o 15 min en el caso de Sau3AI. La reacción se detuvo incubando en hielo y agregando EDTA a una concentración final de 20 mM. Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (Métodos, sección 4.1). En relación a lo anterior, las condiciones elegidas para la digestión parcial con BamHI y Sau3AI correspondieron a 0.5 y 0.2 U/ μ g de DNA respectivamente. El DNA después de digerido se desproteinizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y finalmente se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20 °C. El sedimento de DNA se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada estéril.

7.3 Digestión de DNA plasmidial: Se incubó aproximadamente 0.2-0.5 μ g de DNA plasmidial con 0.5 a 1 unidad de enzima de restricción durante 1-2 horas a 37 °C. Las condiciones de la digestión enzimática se basaron en las descritas por Maniatis *et al*, (1982), en un volumen final de 22 μ l. La reacción se detuvo por la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM. En algunos casos el DNA se trató con dos enzimas de restricción, la digestión se realizó en forma simultánea si ambas enzimas requerían condiciones de reacción

compatibles. En los casos en que las enzimas requerían tampones diferentes, el DNA se incubó primero con la enzima que requería el tampón con menor fuerza iónica, luego se agregó la cantidad de sal para subir la fuerza iónica de la solución y la segunda enzima de restricción. El DNA se incubó en estas nuevas condiciones por un período de tiempo adicional. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (ver métodos sección 4.1). Cuando los productos de la digestión se necesitaban para otra reacción enzimática, se desproteinizó 2 veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), luego 1 vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y luego se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20°C . El sedimento de DNA se resuspendió en un volumen apropiado de tampón TE.

8.- Desfosforilación del DNA.

8.1 Tratamiento con fosfatasa alcalina: Al DNA plasmidial linearizado con endonucleasas de restricción (ver Métodos, sección 7.3) se agregó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) a una concentración final de 0.5 unidades/ μg de DNA. La reacción se realizó en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 9.0, MgCl_2 1 mM, ZnCl_2 0.1 mM y

espermidina 1 mM. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por incubación a 68 °C durante 10 minutos en presencia de SDS al 0.5%, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM. Luego el DNA se desproteinizó 2-3 veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y finalmente se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20 °C. El sedimento de DNA se resuspendió en un volumen apropiado de H₂O destilada estéril.

9.- Ligado de DNA con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4.

9.1 Ligado de extremos cohesivos: Para unir fragmentos de DNA con extremos cohesivos se utilizó la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4. Se mezclaron los fragmentos de DNA y se trataron con la enzima DNA ligasa de T4 a una concentración final de 1 unidad (Weiss *et al.*, 1968) por cada µg de DNA. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl de tampón de ligado que contenía Tris-HCl 66 mM pH=7.5, MgCl₂ 66 mM, DTT 5 mM, y ATP 1 mM. La mezcla se incubó a 12° C durante 14 horas. Posteriormente con esta mezcla se transformó *E. coli*, en algunos casos la mezcla de ligado se guardó a 4° C hasta la transformación de la bacteria. El ligado de los fragmentos de DNA se

verificó mediante electroforesis en minigel de agarosa. Cuando la mayor parte del DNA se encontraba unido, se utilizó para transformar.

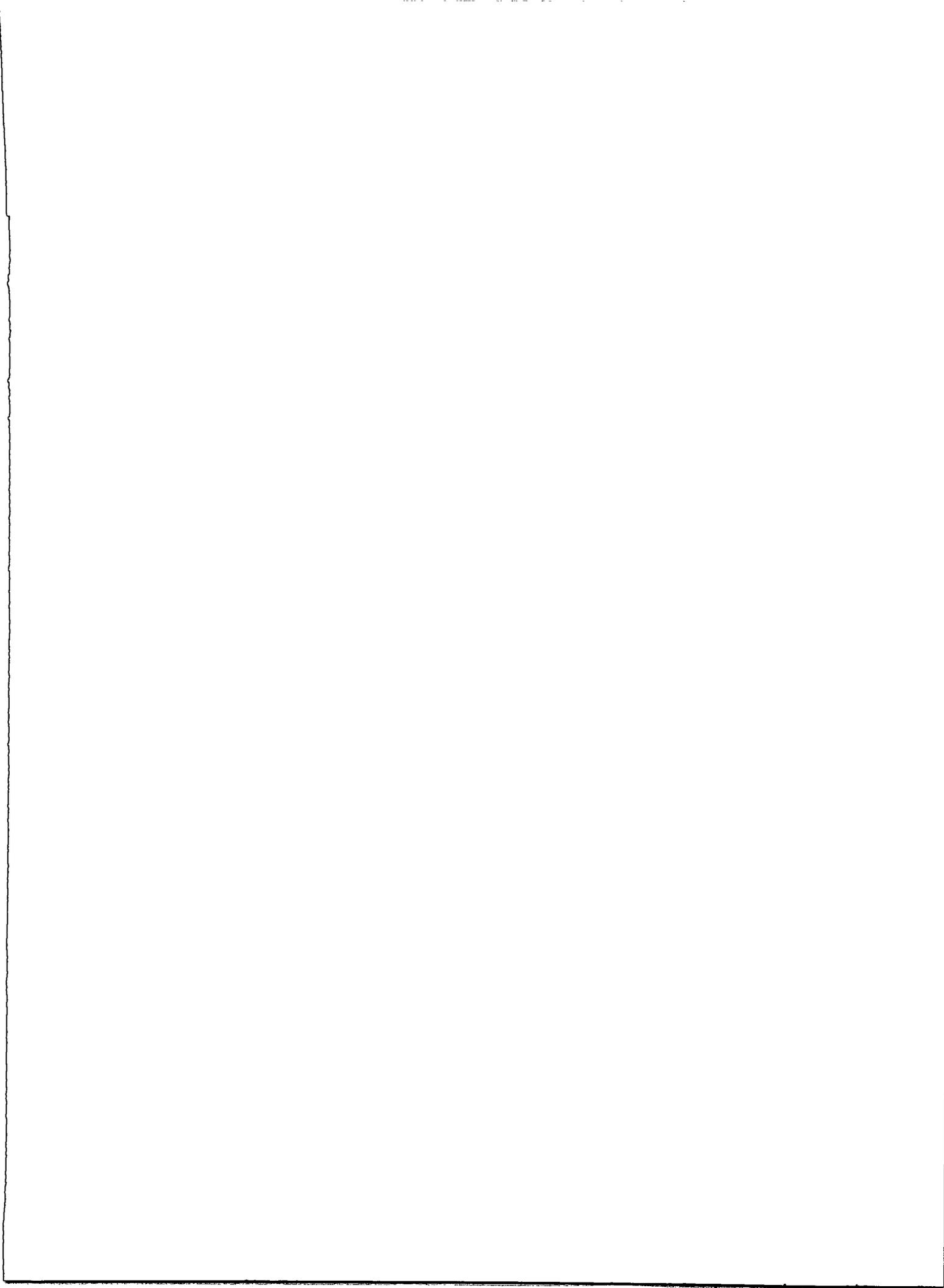
9.2 Ligado de extremos romos: En algunos casos se debió ligar fragmentos de DNA cuyos extremos provenían de la digestión con enzimas de restricción diferentes, por lo cual sus extremos de hebra simple no eran complementarios. Este problema se resolvió rellenando los extremos para generar extremos romos. El ligado de estos fragmentos se realizó en condiciones especiales que consistieron en aumentar la probabilidad de colisiones intermoleculares, haciendo la concentración efectiva mas alta. Los fragmentos de DNA se mezclaron en un volumen final de 5 a 8 μ l y se trató con la enzima DNA ligasa de T4 a una concentración de 2 a 3 unidades por cada 100 ng de DNA. La reacción se llevó a cabo a 12° C durante 14 horas. El tampón de ligado contenía Tris-HCl 66 mM pH=7.5, MgCl₂ 66 mM, DTT 5 mM y ATP 1 mM.

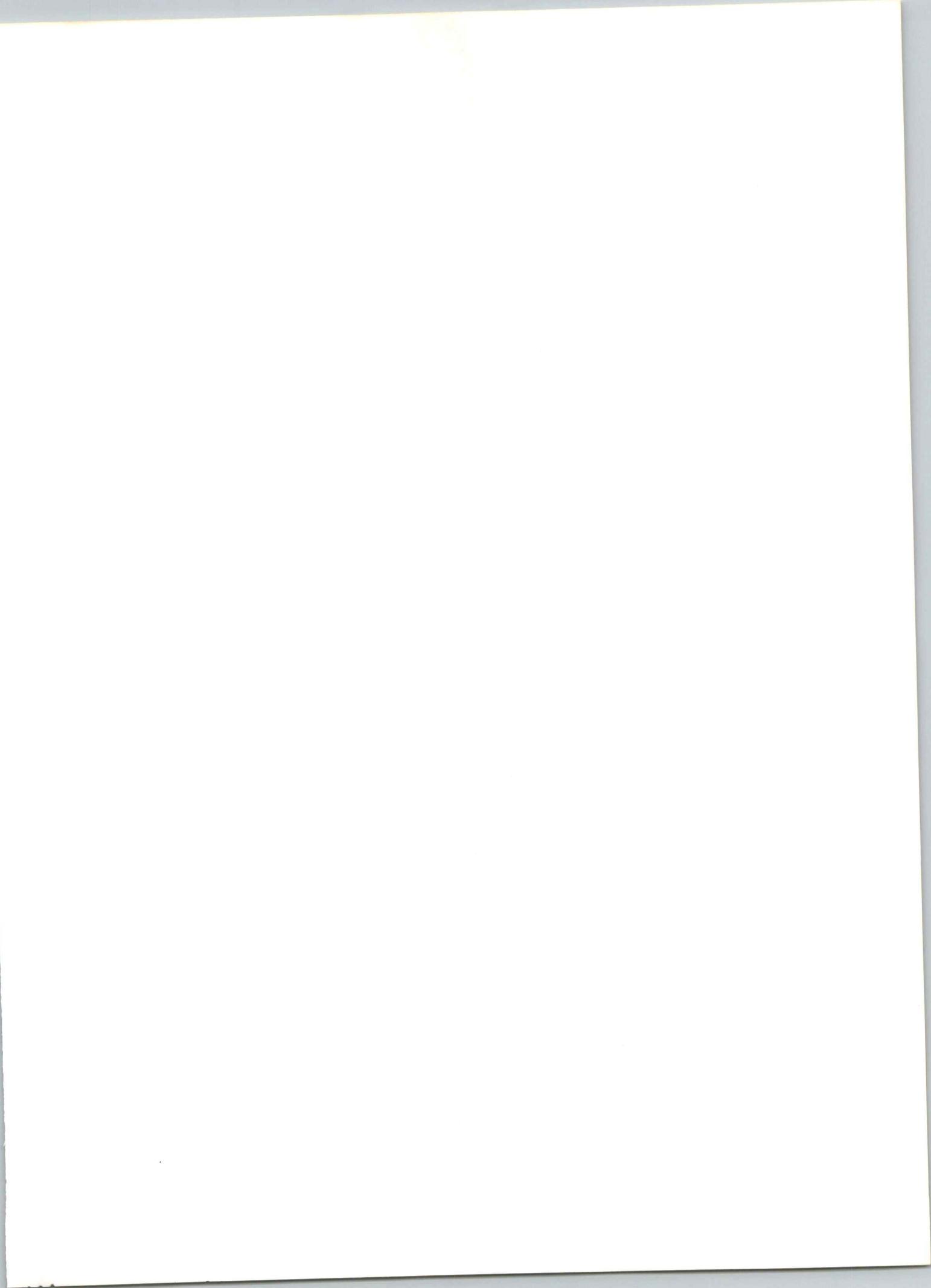
10.- Reacción de "nick translation": El DNA plasmidial se marcó con ³²P-dATP o con Biotina para usarlos como sondas radioactivas en los experimentos de hibridación DNA:DNA mediante la técnica de "nick translation" (Rigby et al., 1977).

Aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial se incubaron con 5-10 unidades de DNA polimerasa I de *E. coli*, 10 μCi de [α - ^{32}P]dATP (actividad específica 400 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 1 μl de DNasa (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3 μl de sales de nick 5X (Apendice N $^{\circ}$ 4), y agua hasta completar un volumen final de 15 μl durante 100 min a 12°C. Terminada la reacción se agregó 5 μl de EDTA 250 mM, 1 μl de DNA de esperma de salmón 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se completó hasta 100 μl con tampón TE.

En el caso de usar biotina para marcar al DNA, se incubaron aproximadamente 1 μg de DNA plasmidial con 5 μl de una mezcla de dCTP, dTTP, dGTP (Apendice N $^{\circ}$ 4), 2.5 μl de dATP biotinilado (Apendice N $^{\circ}$ 4), 5 μl de solución de Bionick, y agua hasta completar un volumen final de 50 μl , durante 90 min a 15°C. Terminada la reacción se agregó 5 μl de EDTA 250 mM y 1.25 μl de SDS al 5%.

Para separar los nucleótidos no incorporados al DNA, la muestra se centrifugó a través de una pequeña columna de Saphadex G-50 equilibrada con tampón TE. 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 2 min en rotor HS Sorvall. Una vez empacada la columna a un volumen de 0.9 ml, se agregó 100 μl de tampón TE y se centrifugó en iguales condiciones. Luego se agregó la muestra de DNA en un volumen de 100 μl y se centrifugó en iguales





condiciones. Se colectó los 100 μ l del efluente de la columna. Los dNTPs no incorporados permanecen en la columna.

11.- Hibridación DNA:DNA.

Los experimentos de hibridación de DNA se realizaron en base a la técnica descrita por Southern (1975). La electroforesis se realizó con 5-6 μ g de DNA cromosómico por carril o 0.1 μ g de DNA plasmidial en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml. El gel se trató con una solución de NaCl 1,5 M, NaOH 0.5 M a temperatura ambiente durante 1 hora para desnaturalizar el DNA. Posteriormente el gel se neutralizó con Tris-HCl 1M (pH 8), NaCl 1.5 M durante 1 hr. Se transfirió el DNA a un papel de nitrocelulosa como lo describe Southern (1975), utilizando una solución de citrato de sodio 10X (SSC 10X) como tampón de transferencia (Apendice Nº 5). La transferencia se realizó durante la noche a temperatura ambiente. Finalizada ésta, el papel de nitrocelulosa se lavó con SSC 3X y se secó a 80°C al vacío durante 2 hrs. El papel de nitrocelulosa seco se trató con una solución de prehibridación (Apendice Nº 5) durante 16-18 hrs a 42°C. La hibridización se realizó durante 24 hrs a 42°C, la sonda utilizada se desnaturalizó durante 5 min a 90°C. Una vez terminada

la hibridación, el filtro de nitrocelulosa se lavó con una solución de SSC 3X, SDS 0.1% durante 1 hora con agitación a 45°C, luego con una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% a 45°C durante 30 min repitiendo este último lavado 2 veces más. El papel de nitrocelulosa se secó entre papel filtro y se cubrió con papel plástico (Saran-Wrap). Luego se expuso a placas autorradiográficas X-ray tipo R con pantalla intensificadora. La exposición se realizó a -70°C. El período de exposición varió según la intensidad de la marca radioactiva. Las placas se revelaron y fijaron mediante los procedimientos rutinarios.

Para los casos de sondas biotiniladas, el papel de nitrocelulosa se lavó con tampón 1 (Apendice Nº 5) durante 1 min. Luego se lavó con tampón 2 (Apendice Nº 5) durante 20 min a 42°C y se secó entre papel filtro 3MM. El papel de nitrocelulosa se incubó en (1.5 ml/50 cm² de papel) una solución de estreptavidina (2 µg/ml) en tampón 1 durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave y ocasionalmente pipeteando la solución sobre el papel de nitrocelulosa. Luego se lavó 3 veces con tampón 1, usando al menos 40 veces el volumen anterior y agitando suavemente durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente el papel de nitrocelulosa se incubó con una solución de biotin(AP) (Apendice Nº 5) 1 µg/ml en tampón 1, usando 1.5 ml de solución por

cada 50 cm² de papel durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave y pipeteando ocasionalmente sobre el papel. La nitrocelulosa se lavó 2 veces con 40 veces el volumen recién empleado de tampón 1 durante 3 min con agitación suave. Luego se lavó 2 veces con 20 tampón 3 (Apendice Nº 5) en las mismas condiciones. Para visualizar el DNA biotinilado el papel de nitrocelulosa se incubó 3.7 ml de solución NTB-BCIP (Apendice Nº 5) por cada 50 cm² de papel en una bolsa de polietileno a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se desarrolló la coloración (4-6 horas). Finalmente el papel de nitrocelulosa revelado se lavó con una solución de Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 5 mM.

12.- Transformación genética

12.1 Transformación genética de *Escherichia coli*: Las cepas de *E. coli* fueron crecidas durante la noche. Luego, se inoculó 20 ml de medio LB con 0.2 ml del cultivo nocturno y se incubó a 37 °C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una D.O. = 0.5-0.6 a 650 nm. El cultivo se dejó enfriar en hielo durante 5 min y luego se centrifugó a 7000 x g durante 5 min. Las células se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgSO₄ 10 mM y se incubaron en hielo por 30 min. Las células se precipitaron por

centrifugación a 7000 x g durante 5 min, luego se resuspendieron en 1 volumen de Tris-HCl 10 mM pH 8, CaCl₂ 50 mM (Tampón λCa) y se incubaron en hielo durante 20 min. Las células se centrifugaron a 5000 x g durante 5 min y el sedimento se resuspendió en 1/10 de volumen de tampón λCa. En un tubo estéril se mezcló 100 μl de células competentes, x μl de DNA, 5 μl de MgCl₂ 100 mM, 45-x μl de tampón TE. La mezcla se incubó en hielo por 30 min. Luego se sometió a un pulso de calor de 42 °C durante 2 min. Se agregó 1 ml de LB pre-calentado a 37 °C y se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación suave. Las células se sembraron en placas de agar-LB suplementado con el antibiótico de selección.

12.2 Transformación genética de *S. cerevisiae*: Se creció la cepa receptora en medio YEP a 30 °C durante la noche. Luego se inoculó 100 ml de medio con 10 ml del cultivo nocturno y se incubó a 30 °C con agitación hasta que alcanzó una D.O. = 0.45-0.50 a 650 nm. El cultivo se centrifugó a 7000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Luego el sedimento celular se lavó 2 veces con 15 ml de sorbitol 1 M y las células se resuspendieron en 10 ml de SED (sorbitol 1M, EDTA 25 mM, DTT 50 mM) y se incubaron a 30 °C por 15 min con agitación suave. Las células se lavaron con sorbitol 1 M y el sedimento celular

obtenido después de centrifugar se resuspendió en 10 ml de sorbitol 1 M que contenía 200 μ l de β -glucuronidasa tipo H-2 y se incubó a 37 °C con agitación suave por 1-2 horas. 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 1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM) centrifugando cada vez a 1000 x g durante 3 min. El sedimento se resuspendió en 1 ml de STC. Para transformar se utilizó un volumen de 0.2 ml de esferoplastos y 1-2 μ g de DNA plasmidial único o 5-10 μ g de DNA de genotecas. La mezcla de transformación se dejó a temperatura ambiente 15 min y luego se agregó PEG (PEG 4000 al 40% en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM). Los esferoplastos se centrifugaron a 1000 x g durante 3 min y se resuspendieron en 150 μ l de SOS (sorbitol 1 M, YEP 0.3X, CaCl₂ 7 mM, requerimientos metabólicos no seleccionados 25 μ g/ml, requerimiento metabólico seleccionado 10 μ g/ml). Se incubaron durante 20 min a 30 °C, luego se mezclaron con 6 ml de agar de regeneración (Apéndice N^o 1) y se plaquearon sobre placas que contenían el mismo medio de regeneración.

12.3 Transformación genética de *Neurospora*: Conidios de 7 días, se germinaron en medio mínimo Vogel durante 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. luego se resuspendieron en una solución de acetato de litio 100 mM 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 centrifugaron a 4500 x g durante 10 min y se resuspendieron en un volumen apropiado de acetato de litio 100 mM. Un total de $5-8 \times 10^7$ conidios se transformaron con 5-10 µg de DNA en un volumen de 0.4 ml y a una concentración final de acetato de litio de 100 mM. 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 100 mM y la incubación se prolongó por 1 hr 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 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 resembrados en el mismo medio selectivo (Dhawale *et al*, 1984).

13.- Obtención del gen *LEU2* a partir del plásmido pTS1.2.

Para obtener el gen *leu2*, se digirió el plásmido pTS1.2 con las enzimas *SalI* y *HpaI* como se describe en métodos (sección 7.3). Luego los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. La banda de 1.8 kb portadora del gen *LEU2* se extrajo del gel mediante la técnica de CTAB (Métodos, sección 5.1). Los extremos cohesivos generados por la enzima *SalI* se rellenaron mediante la acción de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow). Para ello, se trató el DNA con una unidad de enzima en presencia de tampón de Nick (ver Apéndice Nº 4) 1X, en un volumen final de 20 µl.

El DNA del plásmido pBR322 se digirió con la enzima *EcoRI* como se describe en Métodos (sección 7.3). El DNA lineal se separó mediante una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se extrajo la banda correspondiente al DNA lineal (4.36 kb) mediante extracción CTAB (ver Métodos, sección 5.1). Luego los extremos cohesivos fueron rellenados mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* en forma similar al caso recién descrito.

14.- Obtención del gen *TRP1* y *ARS1* a partir de YRp7.

El fragmento de 1.45 kb portador del gen *TRP1* y de la secuencia de replicación autónoma *ARS1* de levadura se

obtuvo a partir del plásmido YRp7. Dicho plásmido se trató con la enzima EcoRI (Métodos, sección 7.3). Los productos de la digestión se trataron con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* y el fragmento de 1.45 kb se purificó a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión como se describe en Métodos (sección 5.1). Posteriormente, dicho fragmento fue ligado al plásmido VCp2.1 linearizado con PvuII mediante la acción de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 en condiciones de ligamiento de extremos romos (Métodos, sección 9.2).

RESULTADOS

1.- Construcción de vectores de clonado de *S. cerevisiae*.

1.1 Orientación y mapa de restricción de pTS1.2

Los vectores de integración se construyeron a partir del plásmido pTS1.2 (figura 1). La orientación del fragmento de DNA de levadura portador del gen *LEU2* en este plásmido se determinó en base a su mapa de restricción.

Los patrones electroforéticos de los productos de restricción se muestran en la figura 2 y los tamaños de estos fragmentos son indicados en la tabla 1. Los resultados obtenidos permitieron elaborar el mapa físico del plásmido pTS1.2 (figura 1).

1.2 Construcción del plásmido VCp1

La figura 3, ilustra la construcción de un primer plásmido de integración (VCp1). Al realizar la transformación de *E. coli* C600 con la mezcla de ligado del fragmento HpaI/AvaI de 5.5 kb derivado de pTS1.2 se seleccionaron 6 transformantes en LB-Amp, que no son capaces de crecer en el medio con tetraciclina (LB-Tet), pero que si lo hacen en un medio mínimo carente

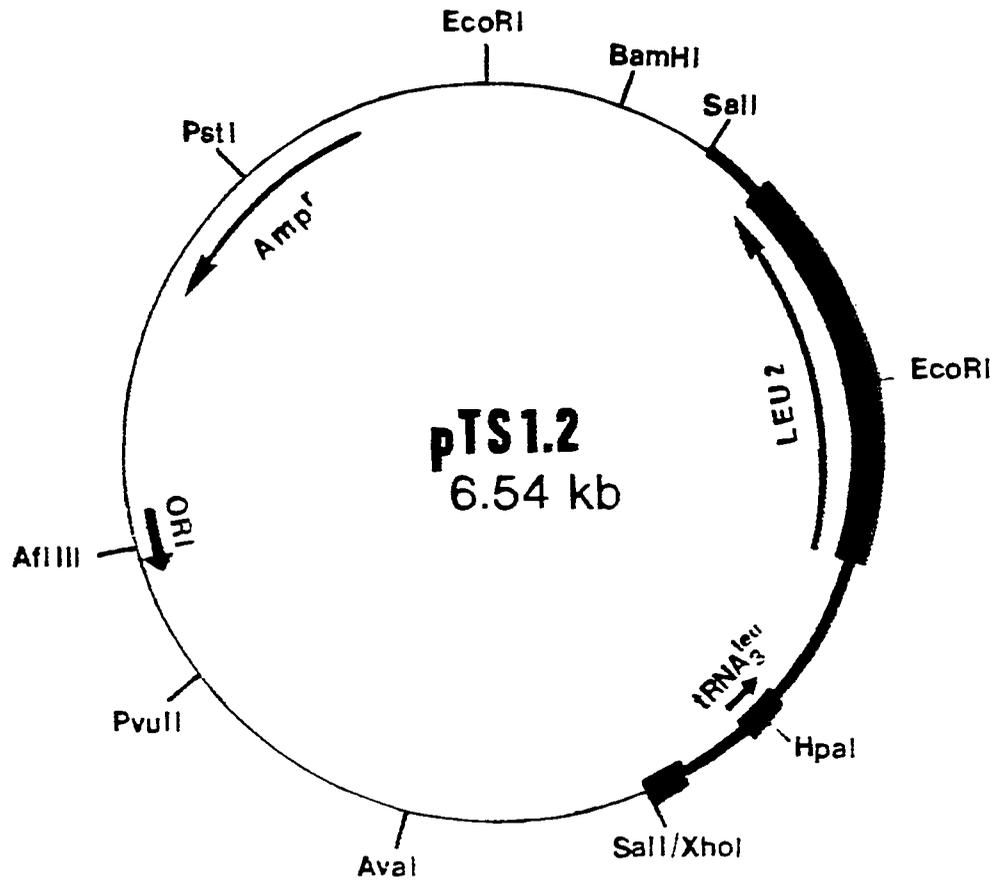


Figura 1:

Mapa de restricción del plásmido pTS1.2: Línea delgada = DNA del plásmido pBR322; Línea gruesa = DNA de *S. cerevisiae*.

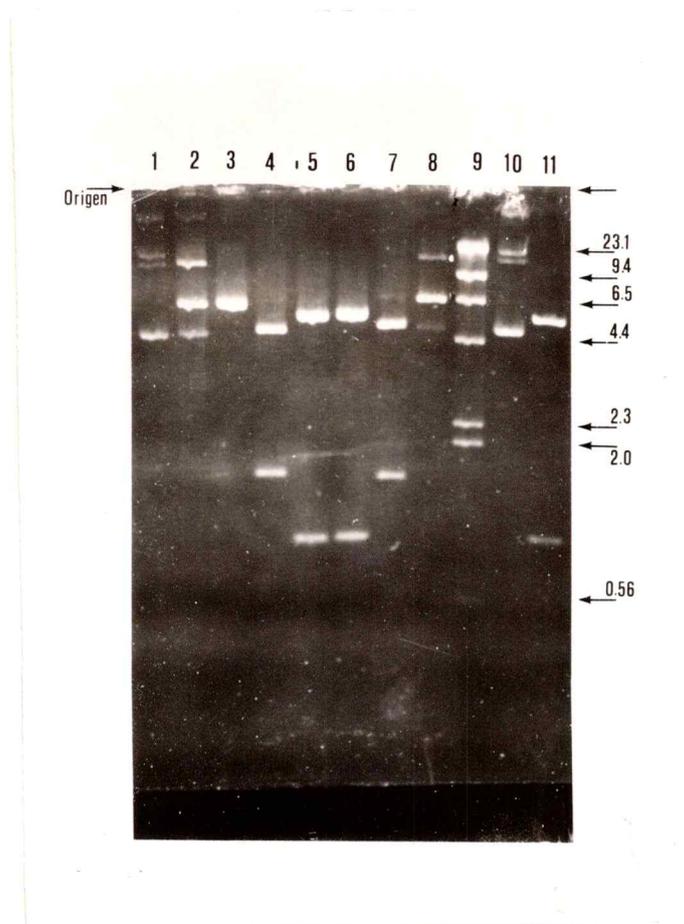


Figura 2:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del plásmido pTS1.2 con algunas enzimas de restricción. El DNA plasmidial fue tratado con diferentes endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) plásmido sin enzima, 2) Aval, 3) KpnI, 4) KpnI + Aval, 5) HpaI + Aval, 6) HpaI + Aval, 7) EcoRI, 8) Sall, 9) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 10) pTS1.2 sin enzima, 11) pTS1.2 + HpaI + Aval.

TABLA 1

Tamaño molecular de fragmentos de restricción del plásmido pTS1.2.

DNA	Tamaño [kbl]								
	Endonucleasas de restricción								
	AvaI	BamHI	HpaI	SalI	XmaIII	EcoRI	Ava/Hpa	Eco/Sal	Hpa/Xma
pTS1.2	6.54	6.54	6.54	6.54	6.54	5.04	5.50	5.05	5.90
	-	-	-	-	-	1.50	1.05	0.86	0.56
	-	-	-	-	-	--	--	0.64	--
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
total=	6.54	6.54	6.54	6.54	6.54	6.54	6.55	6.54	6.46

El DNA del plásmido pTS1.2 fue digerido en forma individual o en combinaciones de las enzimas de restricción que se indican en la tabla. Las condiciones de digestión se describen en métodos (sección 7.3). Los productos de digestión total fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (0.7% en tampón TBE).

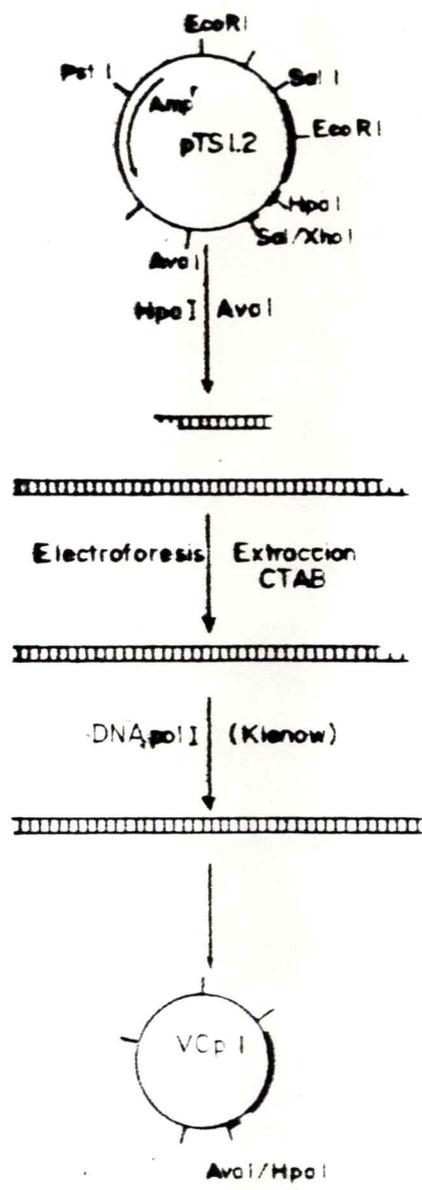


Figura 3:

Esquema del procedimiento empleado para la construcción del vector VCp1.

de leucina (tabla 2 A). El análisis del DNA plasmidial de las colonias transformantes, indicó que todas portan un plásmido del mismo tamaño. La capacidad de las células para crecer en el medio selectivo es debida a la presencia del plásmido VCp1, lo cual queda en evidencia al realizar una retransformación de *E. coli* C600 con DNA plasmidial de uno de estos clones. Los resultados de este experimento se indican en la tabla 2 B, de la cual se puede deducir que el plásmido seleccionado (VCp1) tiene la capacidad de retransformar a *E. coli* C600 complementando la mutación leuB6 que porta dicha cepa. La frecuencia de transformación obtenida, es del mismo orden de magnitud que los plásmidos controles YEp13 y pTS1.2 también portadores del gen *LEU2* de levadura.

1.3 Transformación de *S. cerevisiae* con VCp1

La tabla 3 muestra el resultado de un experimento de transformación realizado en la cepa Sc483 de *S. cerevisiae*. El nuevo vector VCp1 mantiene la capacidad de transformar a la levadura. La no existencia de secuencias relacionadas al transposón Ty1 hace que la frecuencia de transformación disminuya a 10 transformantes por μg de DNA plasmidial. Esto se observa claramente cuando se comparan las frecuencias de transformación con los plásmidos controles pTS1.2,

TABLA 2

Selección de plásmido VCp1 y retransformación de *E. coli* C600

(A) Selección de plásmido VCp1.

cepa	DNA	Nº de colonias/placa		
		LB-Amp	LB-Tet	MMPT-Amp
C600	-	0	0	0
C600	HpaI/AvaI (1)	6	0	6
C600	pTS1.2 (2)	110	0	87

100 µl de células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas con 100 ng de DNA.

HpaI/AvaI corresponde a la mezcla de ligamiento del fragmento HpaI/AvaI de 5.5 kb originado a partir del plásmido pTS1.2

- (1) Después del período de tiempo requerido para la expresión del gen de resistencia a ampicilina, se sembraron todas las células de la mezcla de transformación.
- (2) Después del período de expresión, las células se diluyeron 100 veces y se sembró una alicuota de 100 µl.

(B) Retransformación de *E. coli* C600 con DNA del plásmido VCp1.

cepa	plásmido	Nº de transformantes/µg de DNA	
		Amp ^r	leu ^r
C600	--	0	0
C600	VCp1	3.8×10 ⁵	3.6×10 ⁵
C600	pTS1.2	8.0×10 ⁵	7.8×10 ⁵
C600	YEpl3	7.2×10 ⁵	6.4×10 ⁵

100 µl de células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas con 500 ng de DNA plasmidial.

TABLA 3

Transformación de *S. cerevisiae* Sc483

cepa	DNA	Nº de transformantes LEU2 ⁺ /µg DNA
Sc483	-	0
Sc483	VCp1	10
Sc483	pTS1.2	110
Sc483	YEp13	1630

Los esferoplastos de levadura fueron transformados con 1 µg de DNA de los plásmidos indicados. Las células transformadas fueron sembradas en agar de regeneración e incubadas durante 2-5 días a 30°C.

también vector de integración o con YEpl3, que es un plásmido de replicación extracromosómica y por lo tanto transforma a la levadura con alta frecuencia.

1.4 Análisis del plásmido VCp1

El plásmido VCp1, posee el gen LEU2 de levadura, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y sitios únicos de clonamiento, tales como BamHI, HindIII, PstI, PvuII y Sall (mapa, figura 3). De estos sitios, el más útil es PstI, ya que la inserción de DNA en este sitio inactiva al gen de resistencia a ampicilina y por lo tanto permite una rápida selección de los clones híbridos. Sin embargo, al no quedar ningún marcador de resistencia a antibióticos, sólo resta seleccionar por prototrofia para leucina. En algunos casos, esto constituye un problema ya que la mayoría de las cepas de *E. coli* que portan mutaciones en el gen *leuB*, reversionan con una frecuencia de 10^{-6} - 10^{-7} .

2.- Construcción de VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3

2.1 Obtención de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2

La figura 4 muestra el procedimiento utilizado para construir los nuevos vectores de integración.

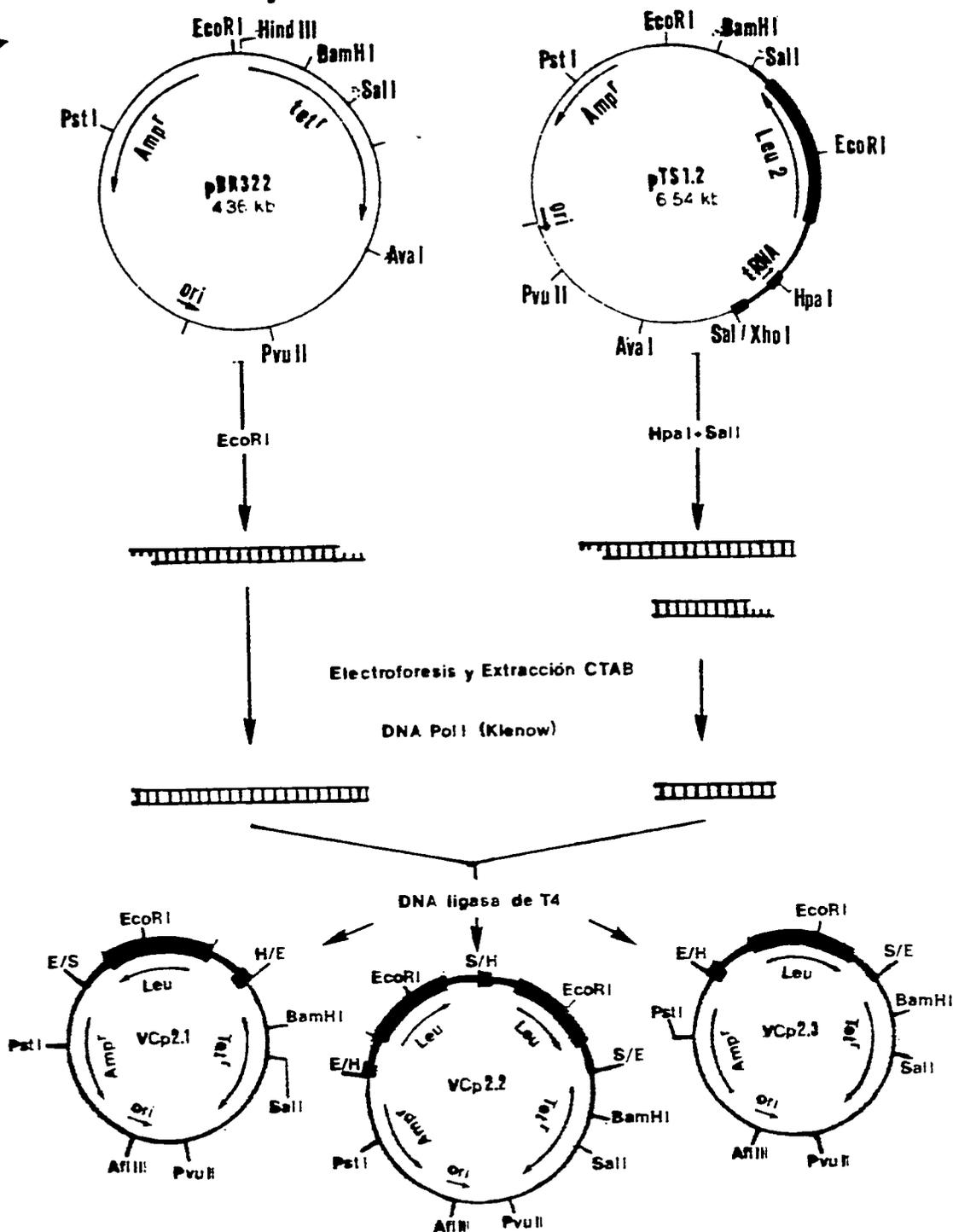


Figura 4:

Esquema del procedimiento empleado para la construcción de los vectores de integración VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3.

Al transformar *E. coli* C600 con la mezcla de ligado, se seleccionaron 342 colonias transformantes resistentes a ampicilina, las cuales fueron analizadas para determinar su resistencia a tetraciclina y prototrofia para leucina.

La Tabla 4 indica la selección de 2 clones capaces de crecer en medio mínimo complementando la mutación *leuB6* de *E. coli* y preservando las características de resistencia a ampicilina y tetraciclina. Las colonias transformantes con fenotipo *leu⁻*, *amp^r* y *tet^r*, fueron crecidas y sometidas a lisis alcalina para obtener DNA plasmidial. Estos plásmidos se denominaron VCp2.1 y VCp2.2. El DNA de dichos plásmidos, se analizó por su capacidad para retransformar a la bacteria *E. coli* C600 y mediante digestión con enzimas de restricción seguido por electroforesis en gel de agarosa.

2.2 Análisis de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2

(a) Retransformación de *E. coli* C600.

La tabla 5 muestra los resultados de la retransformación de *E. coli* con 80 ng de DNA de los plásmidos seleccionados. Los resultados indican que los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 tienen la capacidad de retransformar a *E. coli* cepa C600 y complementar la mutación *leuB6* con alta frecuencia, así como para

TABLA 4

Selección de clones con plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 en *E. coli* C600.

cepa	Nº de colonias		
	LB-Amp	LB-Tet	MMPT-Amp
C600	342	342	2

Las colonias transformantes de *E. coli*, fueron replicadas en los medios LB-amp, LB-tet y MMPT-amp. Las placas fueron incubadas 18 hrs a 37°C. Después del periodo de crecimiento, fueron seleccionadas aquellas colonias que son capaces de crecer en medio mínimo

TABLA 5

A) Retransformación de *E. coli* C600 con DNA aislado de clones leu⁺.

cepa	plásmido	Nº de colonias/placa		
		LB-Amp	LB-Tet	MMPT-Amp
C600	--	0	0	0
C600	VCp2.1	353	221	210
C600	VCp2.2	321	187	159
C600	VCp2.3	285	201	189
C600	pBR322	512	480	0

100 µl de células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas con 80 ng de DNA plasmidial. La transformación fue realizada como se describe en métodos (sección 12.2)

B) Transformación de *S. cerevisiae* Sc483

cepa	plásmido	DNA	Nº transformantes leu ⁺
Sc483	YEp13	1 ug	2160
Sc483	VCp2.1	2 ug	30
Sc483	VCp2.2	1 ug	13
Sc483	VCp2.3	2 ug	25
Sc483	--	--	0

Esferoplastos de *S. cerevisiae* Sc483 fueron transformados con DNA de los plásmidos indicados en la tabla. La transformación fue realizada como se describe en métodos (sección 12.2).

producir la co-transformación de los genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina.

(b) El análisis de restricción

El análisis de restricción de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 se muestra en la figura 5. El resultado indica que el plásmido VCp2.2 posee el gen LEU2 en una orientación opuesta a la presente en el plásmido VCp2.1. Además, cuando el plásmido VCp2.2 se digiere con EcoRI, aparece una banda extra de DNA de un tamaño de 1.8 kb (figura 5, carril 11), indicando que este plásmido es portador de una duplicación en tandem del gen LEU2, encontrándose 2 copias de dicho gen.

La Tabla 6 indica los tamaños de los fragmentos de DNA productos de la digestión enzimática. El tamaño del plásmido VCp2.1 es 6.2 kb y el tamaño del plásmido VCp2.2 es 7.9 kb. Además, estos experimentos permitieron elaborar los mapas físicos de estos vectores (ver figura 6).

2.3 Construcción de VCp2.3

A partir de VCp2.2 se construyó un tercer plásmido de integración (VCp2.3) que fue utilizado para transformar *E. coli* C600. Se seleccionaron 10 transformantes con fenotipo leu⁺, amp^r y tet^r a los cuales se les extrajo el DNA plasmidial y se analizó por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y

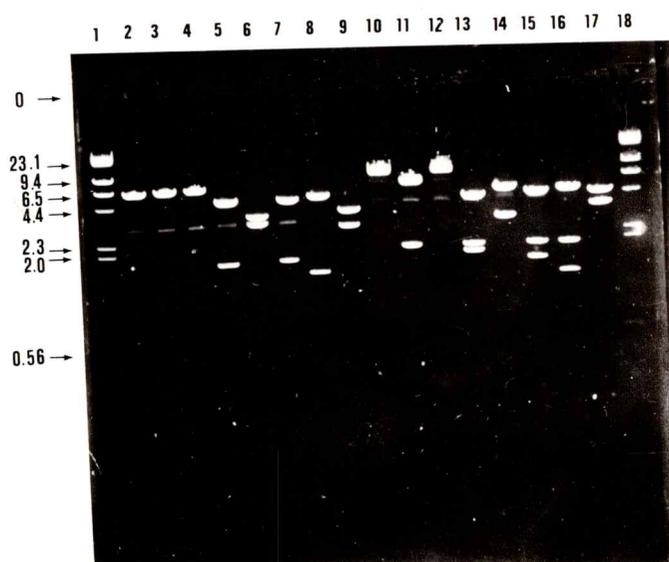


Figura 5:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 con diferentes endonucleasas de restricción. El DNA plasmidial fue tratado con las endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%:

1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) al 9) VCp2.1: 2) PstI, 3) EcoRI, 4) Sall, 5) PstI + EcoRI, 6) PstI + Sall, 7) EcoRI + Sall, 8) EcoRI + BamHI, 9) HindIII + PstI, 10) al 17) VCp2.2: 10) PstI, 11) EcoRI, 12) Sall, 13) PstI + EcoRI, 14) PstI + Sall, 15) EcoRI + Sall, 16) EcoRI + BamHI, 17) HindIII + PstI, 18) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

TABLA 6

Tamaño molecular de fragmentos de restricción de VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3.

		Tamaño [kb]							
		Endonucleasas de restricción							
		EcoRI	PstI	SalI	Eco/BamHI	Eco/PstI	Eco/Sal	Hind/PstI	Pst/SalI
DNA									
VCp2.1	6.2	6.2	6.2	4.75	4.60	4.40	3.60	3.30	
	-	-	-	1.40	1.55	1.75	2.60	2.90	
	----	----	----	----	----	----	----	----	
total	6.2	6.2	6.2	6.15	6.15	6.15	6.20	6.20	
DNA									
VCp2.2	6.2	7.9	7.9	4.80	4.40	4.50	4.50	5.00	
	1.8	-	-	1.80	1.80	1.80	3.40	2.90	
	-	-	-	1.30	1.70	1.60	--	--	
	----	----	----	----	----	----	----	----	
total	8.0	7.9	7.9	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	
DNA									
VCp2.3	6.2	6.2	6.2	4.85	4.40	4.50			
	-	-	-	1.30	1.70	1.60			
	----	----	----	----	----	----			
total	6.2	6.2	6.2	6.15	6.10	6.10			

El DNA de los plásmidos VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3 fue tratado con las enzimas de restricción que se listan en la tabla. Las condiciones de digestión se describen en métodos (sección 7.3). Los productos de la digestión total fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (0.7% en tampón TBE)

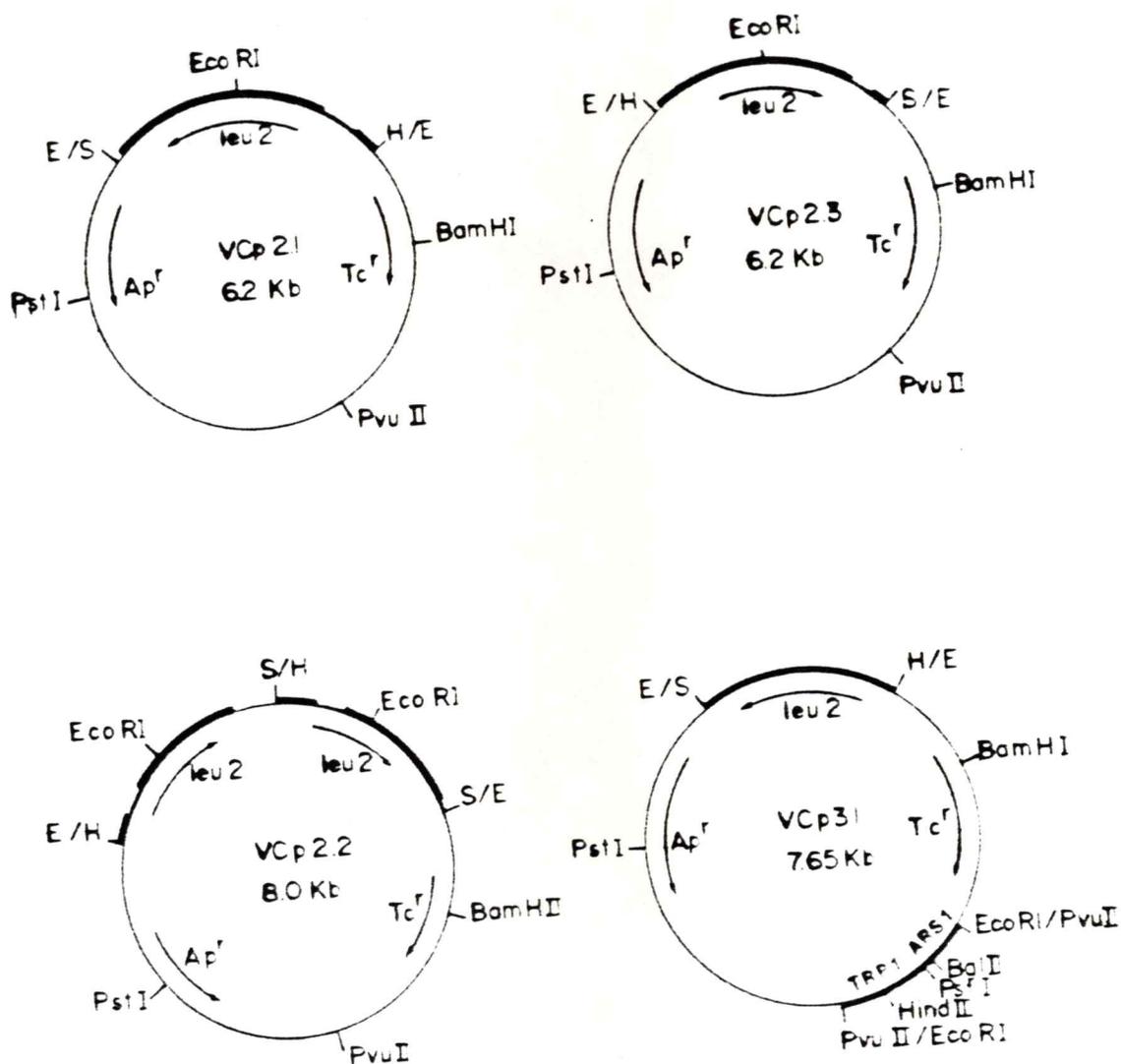


Figura 6:

Mapa de restricción de los plásmidos VCp2.1, VCp2.2, VCp2.3 y VCp3.1.

BamHI. La figura 7 muestra el patrón electrofóretico de los productos de dicha digestión. Como se puede observar en los carriles 2, 3, 4, 7, 10 y 11, aparecen 6 clones cuyos productos de digestión son los esperados para un plásmido portador de sólo una copia del gen LEU2 en la misma orientación del plásmido parental (VCp2.2), esto es 5.0 y 1.2 kb respectivamente. El resto de los clones (carriles 5, 6, 8, 9) poseen 2 copias del gen LEU2 y corresponden al plásmido parental intacto. De acuerdo a lo sugerido por la figura 7, se seleccionó un clon (EC2.2ER.10) cuyo DNA plasmidial es portador de sólo una copia del gen LEU2. A este plásmido se denominó VCp2.3 y es el que se observa en el carril 11 de la figura 7. Con este plásmido se retransformó a *E. coli* C600, los resultados se muestran en la tabla 5 e indican que al igual que los otros vectores, VCp2.3 tiene la capacidad de complementar la mutación leuB6 con alta frecuencia por transformación y que los 3 caracteres (leu⁺, amp^r y tet^r), co-transforman a *E. coli*. El mapa físico del vector VCp2.3 se muestra en la figura 6. Como se esperaba, este plásmido tiene un tamaño de 6.2 kb el cual es igual al tamaño del plásmido VCp2.1, pero la orientación del gen LEU2 en ambos vectores es opuesta.

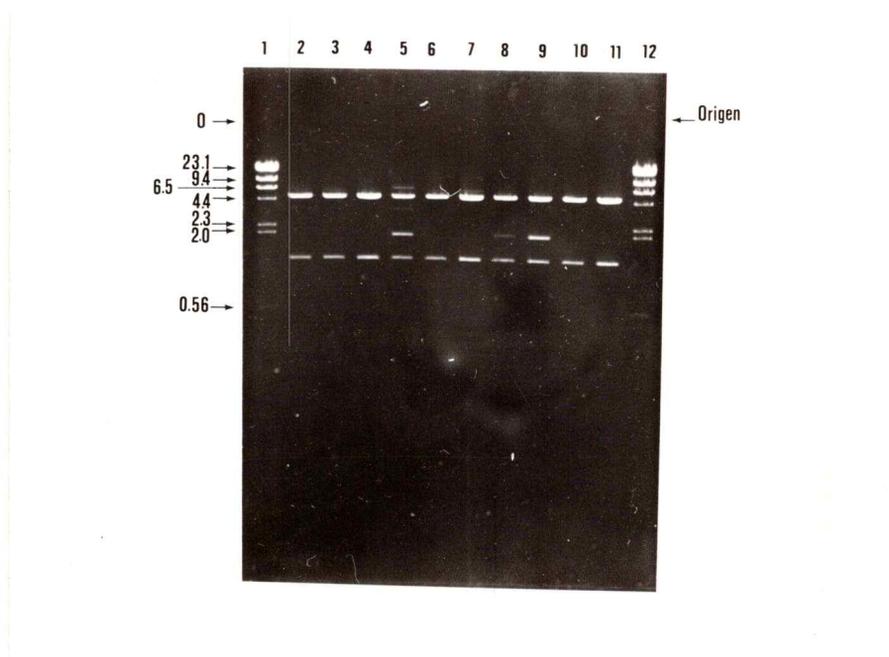


Figura 7:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestion doble con las enzimas de restriccion BamHI y EcoRI. El DNA plasmidial purificado de 10 clones VC2.2ER fue tratado con las endonucleasas de restriccion BamHI y EcoRI. Los productos de la reaccion fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriofago λ + HidIII, 2) VC2.2ER.1, 3) VC2.2ER.2, 4) VC2.2ER.3, 5) VC2.2ER.4, 6) VC2.2ER.5, 7) VC2.2ER.6, 8) VC2.2ER.7, 9) VC2.2ER.8, 10) VC2.2ER.9, 11) VC2.2ER.10, 12) DNA del bacteriofago λ + HindIII.

3.- Construcción de VCp3.1

Un nuevo vector de replicación autónoma de levadura fue construido insertando en el sitio PvuII del plásmido VCp2.1 un origen de replicación cromosómico de levadura que corresponde a una secuencia ARS1 obtenida del vector YRp7.

El procedimiento utilizado para la construcción de este vector se muestra en la figura 8. El origen de replicación se obtuvo como un fragmento EcoRI de DNA de la levadura proveniente del plásmido YRp7. Este fragmento es además portador del gen *TRP1* el cual se purificó y ligó al plásmido VCp2.1. Con la mezcla de ligado se transformó *E. coli* HB101. Se obtuvieron 104 colonias transformantes amp^r, las que se analizaron mediante minipreparación de DNA. De las 104 colonias analizadas, se encontró 1 que portaba un plásmido ligeramente mayor que el vector de origen (VCp2.1). Este plásmido, se analizó por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y PstI. La figura 9 muestra que el plásmido corresponde a una molécula de DNA cuyo tamaño es de 7.7 kb, concordando con el tamaño esperado. La orientación del fragmento de 1.45 kb en este nuevo vector se determinó a partir de los resultados de la figura 9 y de análisis rápidos de mapeo de restricción en relación a la ubicación del sitio BglII que existe en este fragmento. El mapa

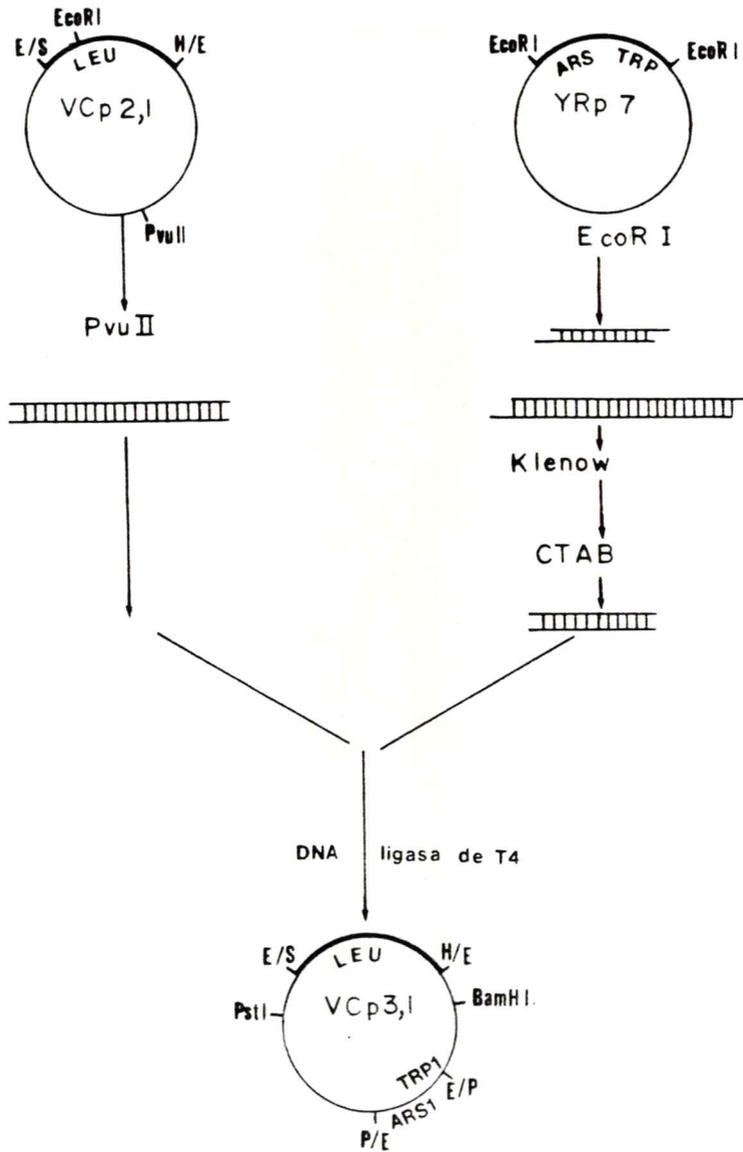


Figura 8:

Esquema del procedimiento empleado para la construcción del plásmido VCp3.1.

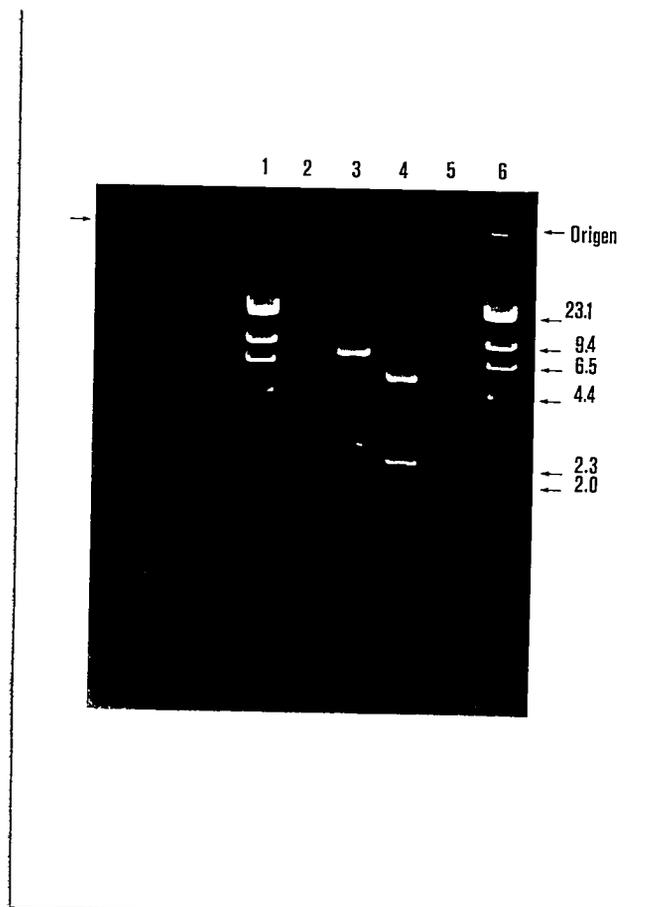


Figura 9:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp3.1 con enzimas de restricción. El DNA plasmidial fue tratado con las endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriofago λ + HindIII, 2) VCp2.1 + EcoRI, 3) VCp3.1 + EcoRI, 4) VCp3.1 + PstI, 6) DNA del bacteriofago λ + HindIII.

físico del plásmido, denominado VCp3.1, se muestra en la figura 6.

3.1 Transformación de *E. coli* C600 con VCp3.1

Dado que la cepa HB101 no posee mutaciones en el gen *leuB*, el DNA del plásmido VCp3.1 se utilizó para transformar la cepa C600. Como resultado se obtuvieron 12 transformantes *leu*⁺, *amp*^r y *tet*^r. Esto podía esperarse, porque la cepa C600 utilizada al parecer portaría un sistema del tipo restricción-modificación activo. El análisis del DNA plasmidial de 4 clones transformantes indicó que tienen el mismo tamaño esperado para VCp3.1 (figura 6). Al retransformar a la cepa C600 de *E. coli* (ver Tabla 7-A) se determinó que este nuevo vector transformaba con alta frecuencia a dicha bacteria, lo que indica que VCp3.1 tiene la capacidad de complementar la mutación *leuB6* que posee la cepa C600 y además conferir resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina.

3.2 Transformación de *S. cerevisiae* con vector VCp3.1

Finalmente para comprobar que estos vectores corresponden a los deseados, se realizó una transformación de la cepa *S. cerevisiae* D234-3B, portadora de mutaciones tanto en el gen *LEU2* como en el

Tabla 7

Transformación de *E. coli* y *S. cerevisiae* con VCp3.1

A) Retransformación de *E. coli* C600 con el plásmido VCp3.1.

cepa	plásmido	Nº colonias/placa		
		LB-amp	LB-tet	MMPT-amp
C600	---	0	0	0
C600	VCp2.1	298	276	281
C600	VCp3.1	279	272	234
C600	pBR322	427	402	0

100 μ l de células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas con 50 ng de cada plásmido. Después del período de expresión, se sembraron 100 μ l de una dilución 1/10 en cada placa selectiva.

B) Transformación de *S. cerevisiae*, cepa D234-3B, con el plásmido VCp3.1.

cepa	plásmido	Transformantes/ μ g DNA	
		leu ⁺	trp ⁺
D234-3B	--	0	0
D234-3B	YEp13	2725	0
D234-3B	VCp2.1	13	0
D234-3B	VCp3.1	983	957

La cepa D234-3B (leu 2-3,112;his3-11,ura3-52,trp1-289 Tcm) fue transformada con 1 μ g de DNA de cada plásmido. Se seleccionaron los transformantes leu⁺ y luego estos fueron replicados para determinar co-transformación a trp⁺, en medio SD carente de triptófano.

gen *TRP1*. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 7-B. A diferencia de los 3 vectores de integración (VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3) que se caracterizan por una baja frecuencia de transformación (aproximadamente 10 transformantes/ μ g de DNA), la frecuencia de transformación obtenida con el vector VCp3.1 es mayor (aproximadamente 1000 transformantes/ μ g de DNA) (tabla 7-B) y está más cercana de la frecuencia de transformación obtenida con el plásmido control YEp13 (2725 transformantes/ μ g de DNA) el cual lleva un origen de replicación derivado del plásmido 2u endógeno de la levadura.

Como se mencionó anteriormente, los vectores VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3 construidos en este trabajo cumplen con las características propias de vectores de integración o de vectores de replicación autónoma (VCp3.1). Como prueba final para el vector VCp3.1, el análisis de los transformantes de la levadura originados con este plásmido, presentan además el fenotipo *TRP1* como se esperaba para un plásmido que llevara el gen *LEU2* y el gen *TRP1* (tabla 7-B)

4.- Construcción de Genotecas de *N. crassa*.

4.1 Digestión parcial de DNA cromosómico de *Neurospora*.

En la figura 10, se muestran los resultados de la digestión parcial de DNA de *Neurospora* con las endonucleasas de restricción BamHI, PstI y Sau3AI.

Según estos resultados se puede indicar que la concentración adecuada de enzimas para obtener una óptima digestión parcial corresponde a: 0.5 unidades/ μ g de DNA para BamHI, 0.25 unidades/ μ g de DNA para PstI y 0.25 unidades/ μ g de DNA para Sau3AI.

Los productos de la digestión parcial fueron seleccionados por tamaños y purificados mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y extracción con CTAB (Métodos, sección 5.1).

Los fragmentos BamHI fueron seleccionados en dos grupos uno de 5-20 kb y otro de 2-5 kb.

Los fragmentos PstI fueron divididos en tres grupos de 0.6-0.8 kb, 0.8-2.4 kb y 3-8 kb.

Los fragmentos Sau3AI fueron divididos en dos grupos fragmentos de 2-5 kb y 5-18 kb.

Estos fragmentos de DNA obtenidos como se indicó antes, fueron utilizados para la construcción de genotecas de *N. crassa* en diferentes vectores de clonado.

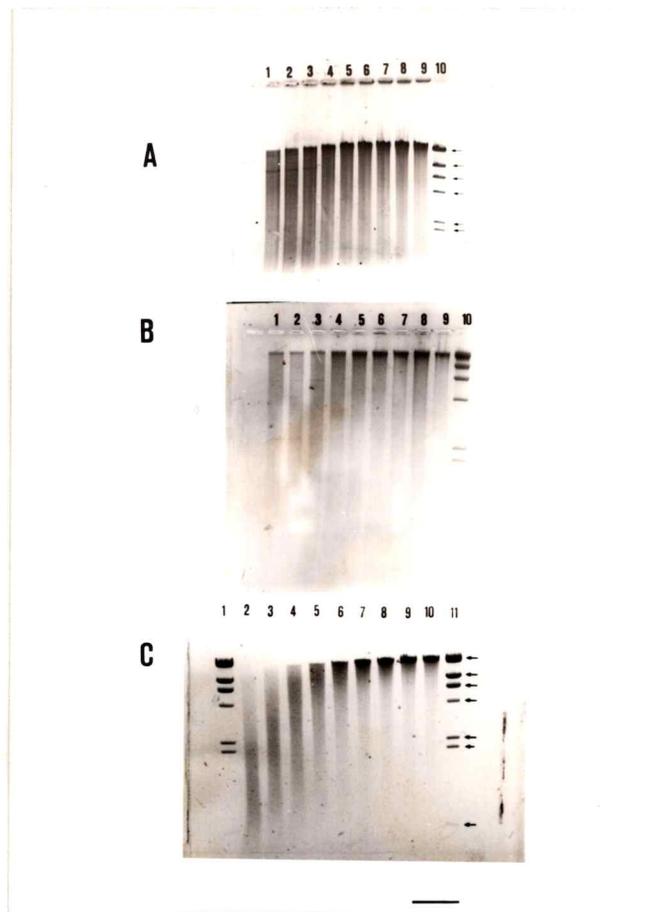


Figura 10:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión parcial de DNA de *Neurospora crassa* con las enzimas de restricción BamHI, Sau3AI y PstI. El DNA cromosómica de *N. crassa* fue tratado con diferentes concentraciones de endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

(A): Unidades (U) de BamHI por ug de DNA: 1) 4 U, 2) 2 U, 3) 1 U, 4) 0.5 U, 5) 0.25 U, 6) 0.12 U, 7) 0.06 U, 8) 0.03 U, 9) 0 U, 10) DNA del bacteriófago λ + HindIII. (B): Unidades (U) de PstI por ug de DNA.: 1) 2 U, 2) 1 U, 3) 0.5 U, 4) 0.25 U, 5) 0.12 U, 6) 0.06 U, 7) 0.03 U, 8) 0.015 U, 9) 0 U, 10) DNA del bacteriófago λ + HindIII. (C): Unidades (U) de Sau3AI por ug de DNA.: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) 2 U, 3) 1 U, 4) 0.5 U, 5) 0.25 U, 6) 0.12 U, 7) 0.06 U, 8) 0.03 U, 9) 0.015 U, 10) 0 U, 11) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

4.2 Genoteca en vector YRp7.

Se construyó una genoteca de *Neurospora* en el sitio BamHI del plásmido YRp7 siguiendo el procedimiento que se describe en la figura 11. La figura 12 muestra el resultado de la reacción de ligado después de 16 hrs.

La tabla 8 A y B, muestra los resultados de 2 experimentos de transformación de *E. coli* cepa C600 en gran escala, obteniéndose un promedio de \approx 400 colonias transformantes por placa. Esto corresponde a un número total de 14.123 colonias en el banco de genes.

4.2.1 Análisis de clones recombinantes

Un análisis de una población representativa de 200 colonias elegidas al azar reveló un 5% de religamiento del vector, indicando que se dispone de \approx 13400 colonias recombinantes de *E. coli* C600.

La figura 13 indica el resultado de un análisis del DNA plasmidial de 18 colonias amp^r,tc^m. Como se puede observar, todos los clones (carriles 1 a 18) presentan una movilidad electroforética menor que el plásmido parental YRp7 (carril 19), lo que indica que corresponden a moléculas plasmidiales de mayor tamaño que el vector de origen, tal como se esperaba para estos clones recombinantes.

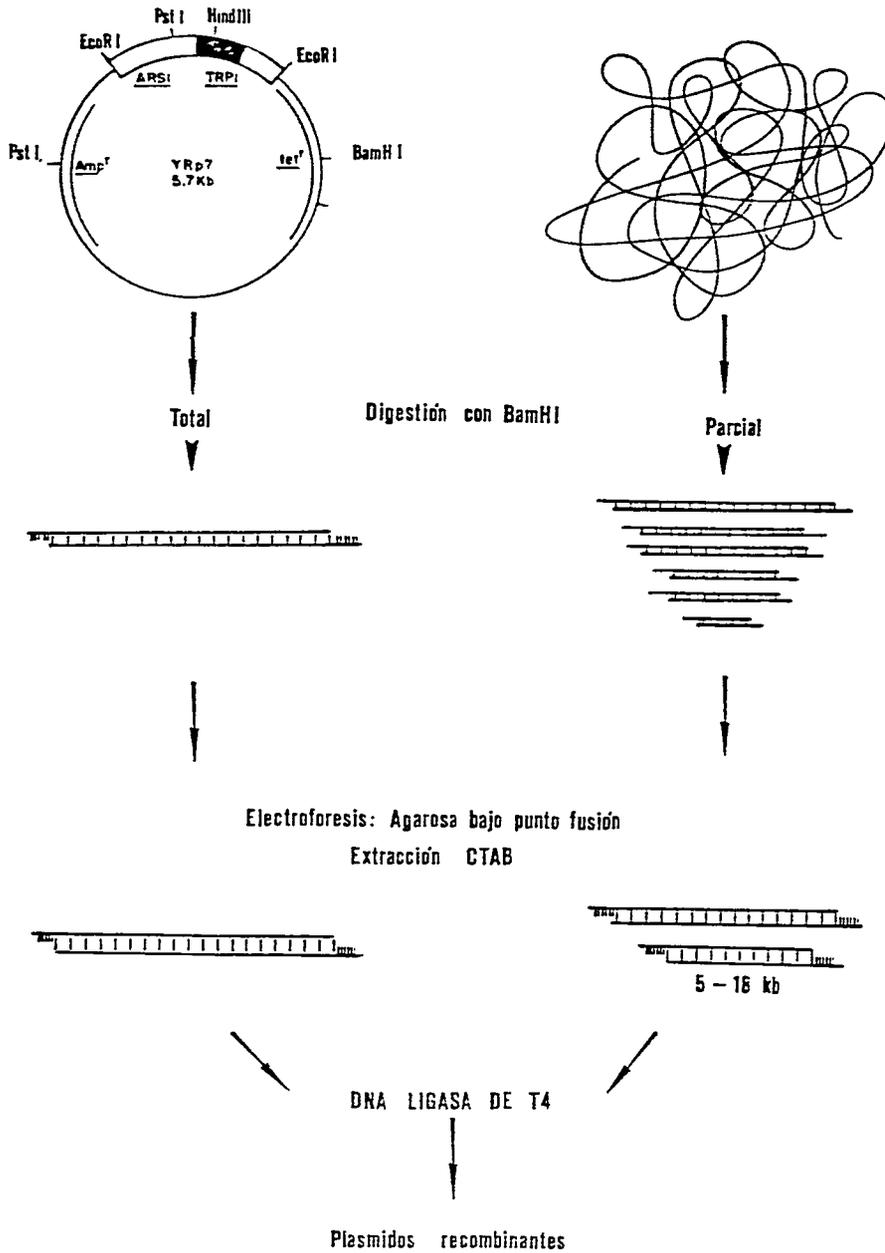


Figura 11:

Esquema del procedimiento empleado para la construcción de una genoteca de *N. crassa* en el sitio *Bam*HI del plásmido YRp7.

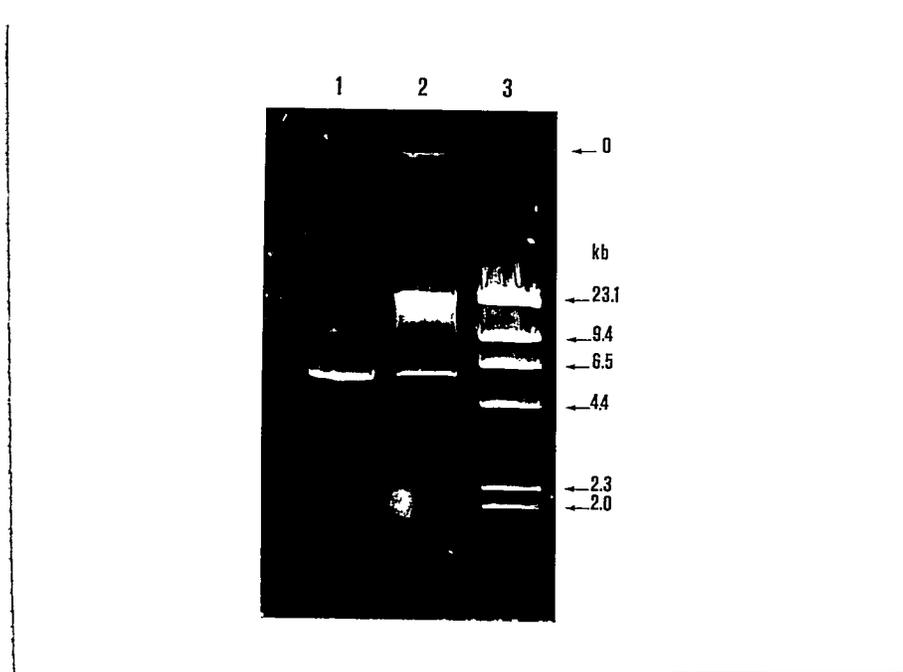


Figura 12:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de ligamiento de DNA de *N. crassa* e YRp7. El plásmido YRp7 linearizado con BamHI y los productos de 5-20 Kb de la digestión parcial de *N. crassa* con la misma enzima, fueron mezclados y tratados con DNA ligasa de T4. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) Control YRp7 + DNA de *N. crassa* sin ligar, 2) DNA de *N. crassa* ligado a YRp7, 3) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Tabla 8

Transformación de *E. coli* C600 con mezcla de ligado de genoteca de *N. crassa* en plásmido YRp7.

A) Experimento 1.

DNA	Nº colonias/placa		DNA	Nº colonias/placa	
	LB-amp			LB-amp	
---	0		YRp74.10	401	
YRp7	156		YRp74.11	425	
YRp74.1	386		YRp74.12	430	
YRp74.2	324		YRp74.13	315	
YRp74.3	471		YRp74.14	448	
YRp74.4	395		YRp74.15	412	
YRp74.5	380		YRp74.16	425	
YRp74.6	338		YRp74.17	430	
YRp74.7	313		YRp74.18	398	
YRp74.8	430		YRp74.19	467	
YRp74.9	404		YRp74.20	429	

B) Experimento 2.

DNA	Nº colonias/placa		DNA	Nº colonias/placa	
	LB-amp			LB-amp	
---	0		YRp74.28	386	
YRp7	213		YRp74.29	398	
YRp74.21	407		YRp74.30	425	
YRp74.22	402		YRp74.31	392	
YRp74.23	387		YRp74.32	457	
YRp74.24	464		YRp74.33	439	
YRp74.25	411		YRp74.34	416	
YRp74.26	422		YRp74.35	343	
YRp74.27	356				

En experimentos 1 y 2, se transformó *E. coli* C600 con 10 ng de YRp7 y con 50 ng de la mezcla de ligado (YRp74.1-35) Después del período de expresión todas las células tratadas con los diferentes tipos de plásmidos fueron sembradas en medio selectivo. En el caso de YRp7, se sembró una alícuota de 100 μ l de células tratadas.

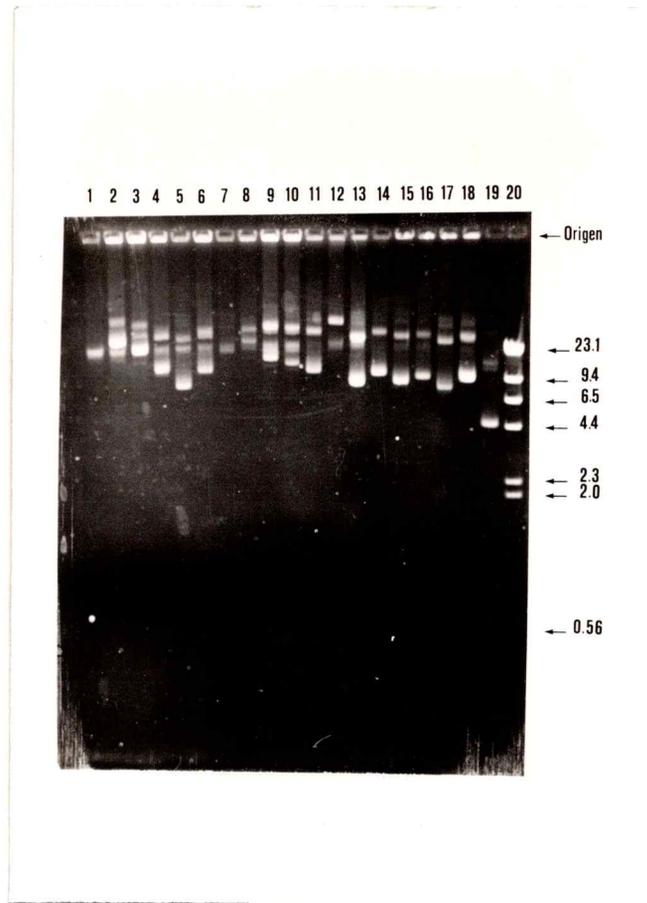


Figura 13:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial de 18 clones recombinantes de la genoteca de *N. crassa* en el plásmido YRp7. El DNA plasmidial purificado de los clones recombinantes fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) al 18) DNA de clones recombinantes, 19) YRp7, 20) DNA del bacteriofago λ + HindIII.

El resultado de un análisis de restricción del DNA plasmidial de algunos clones recombinantes se muestra en la figura 14. Todos los clones recombinantes presentan más de un fragmento de DNA (carriles 2 a 12). Todos los plásmidos poseen un fragmento BamHI de 5.8 kb (que corresponde al vector YRp7) y uno o más fragmentos extras de DNA, cuyo tamaño es variable y corresponde al DNA insertado en el sitio BamHI del vector.

La tabla 9 muestra resultados de un análisis de restricción con BamHI del DNA plasmidial de 30 clones diferentes en los que no se incluyen los 10 clones mostrados en la figura 14. El análisis del tamaño de los fragmentos de DNA insertados en el vector YRp7, indica que el tamaño promedio de insertos en la genoteca corresponde a aproximadamente 10 kb.

4.3 Genoteca en VCp1.

La figura 15 ilustra la estrategia utilizada en la construcción de una genoteca de *N. crassa* en el sitio PstI del vector VCp1.

El sitio de reconocimiento de la enzima PstI en el vector VCp1 está en el gen de resistencia a ampicilina, por lo que la inserción de DNA exógeno inactiva a dicho gen, dejando como marcador selectivo al gen *leu⁺* del plásmido.

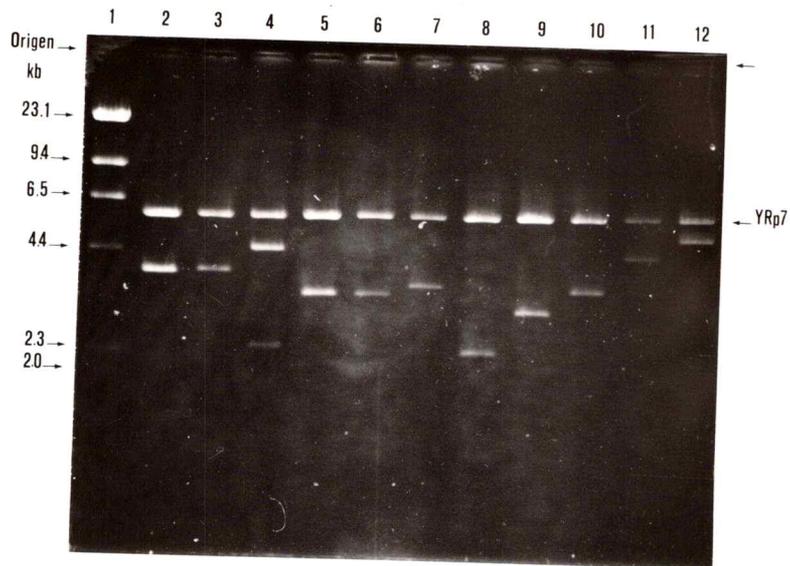


Figura 14:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con la enzima de restricción BamHI. El DNA plasmidial de 11 clones recombinantes provenientes de la genoteca de *N. crassa* en YRp7 fue tratado con la endonucleasa de restricción BamHI. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriofago λ + HindIII, 2) YRp74.16.2, 3) YRp74.16.6, 4) YRp74.16.7, 5) YRp74.16.8, 6) YRp74.16.13, 7) YRp74.16.15, 8) YRp74.16.16, 9) YRp74.16.17, 10) YRp74.16.18, 11) YRp74.16.19, 12) YRp74.16.20.

Tabla 9

Tamaños moleculares de los insertos de 30 plásmidos analizados por digestión con BamHI.

plásmido	Tamaño (kb)	plásmido	Tamaño (kb)
YRp7	5.8		
YR74.1	12.5, 5.8	YR74.16	7.5, 5.9, 2.2
YR74.2	9.6, 5.8	YR74.17	8.8, 5.8
YR74.3	5.8, 5.0, 2.1	YR74.18	12.7, 5.9
YR74.4	10.3, 5.8	YR74.19	15 , 5.7
YR74.5	7.7, 5.8, 3.9	YR74.20	17 , 5.8
YR74.6	13.5, 5.8	YR74.21	14.5, 5.8
YR74.7	12.5, 5.8	YR74.22	7.2, 5.8
YR74.8	15 , 5.8	YR74.23	10.5, 5.8
YR74.9	9.1, 5.8	YR74.24	5.8, 4.4
YR74.10	6.5, 5.8	YR74.25	5.8, 2.3
YR74.11	8.6, 5.9	YR74.26	9.2, 5.8
YR74.12	16.5, 5.7	YR74.27	16 , 5.8
YR74.13	14 , 5.8	YR74.28	13.5, 5.8
YR74.14	12.5, 5.8	YR74.29	10 , 5.7
YR74.15	10.5, 5.7	YR74.30	12.5, 5.8

El DNA plasmidial de 30 clones amp^r, tet^r fue analizado mediante digestión con la endonucleasa de restricción BamHI seguido de una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE (ver Métodos, sección 4.1).

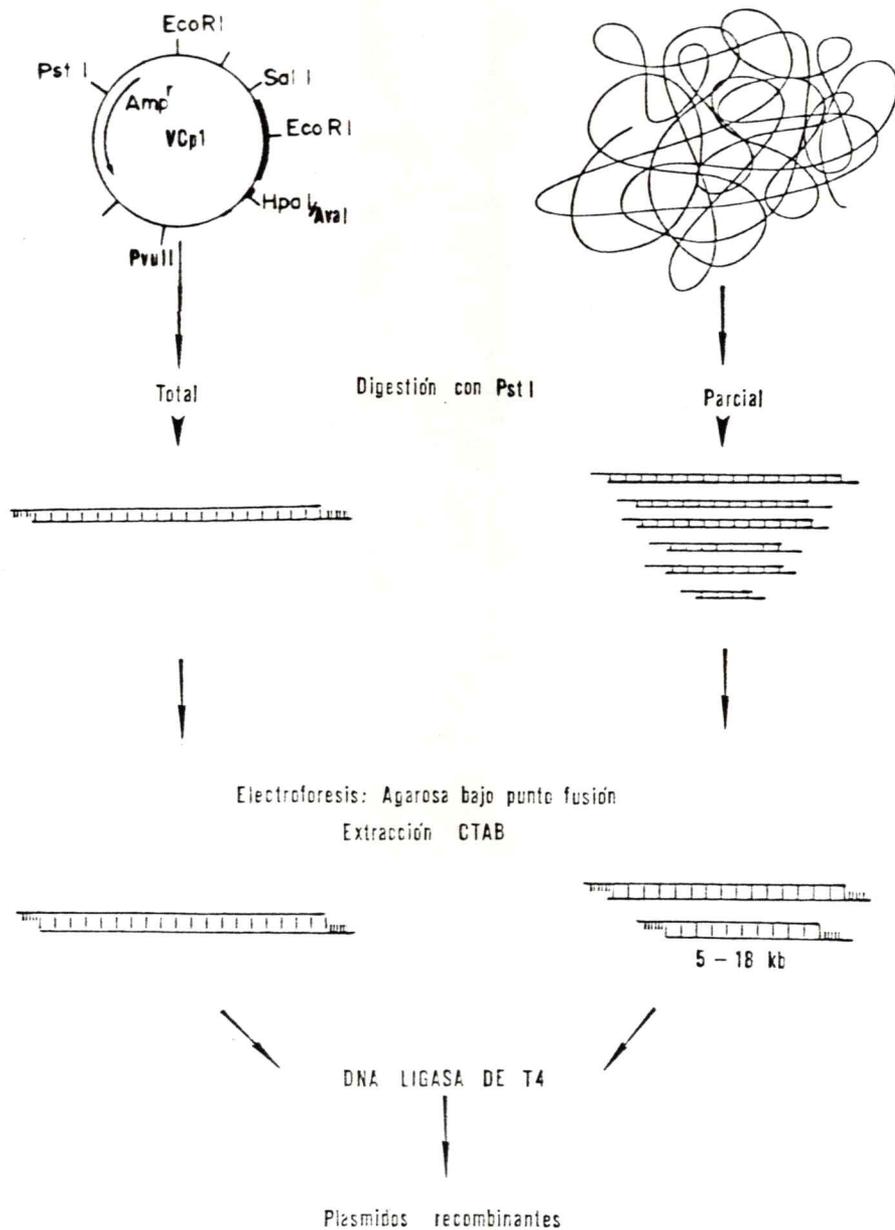


Figura 15:

Esquema del procedimiento utilizado para la construcción de una genoteca de *N. crassa* en el sitio PstI del plásmido VCp1.

El vector VCp1, linearizado con PstI y desfosforilado, se mezcló con el DNA de *Neurospora* digerido parcialmente con PstI. El ligamiento de fragmentos se hizo con DNA ligasa de T4 (Métodos, sección 9.1). Con la mezcla de ligado se procedió a transformar *E. coli* C600, obteniéndose 8345 colonias leu⁺. De éstas, 250 colonias presentaron un fenotipo leu⁺, amp^r, correspondientes a clones con plásmidos que no llevan inserto de DNA de *N. crassa*, constituyendo un 3% de religamiento del vector.

Las 8095 colonias recombinantes obtenidas, se distribuyeron en 12 grupos de 50 clones, 15 grupos de 100 clones y 12 grupos de 500 clones en tubos de almacenamiento.

El análisis de los clones recombinantes, se muestra en la figura 16. Se observa claramente en los carriles 2, 3, 4, 5, 7, 8, y 9, la aparición de múltiples bandas de DNA, lo que sugiere la presencia de un gran número de plásmidos de distintos tamaños en cada preparación. Se guardó el DNA plasmidial obtenido en este experimento congelado a -20°C para ser utilizados posteriormente en experimentos de transformación de levadura.

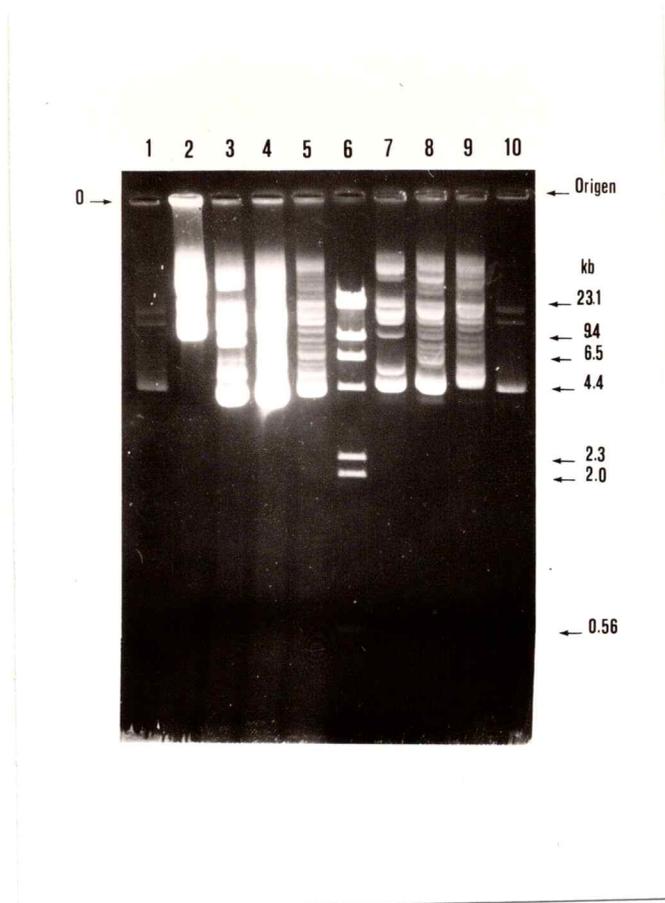


Figura 16:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial de 7 grupos de 100 clones recombinantes de la genoteca de *N. crassa* en el plásmido VCp1. El DNA plasmidial purificado de cada grupo de clones fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) pTS1.2, 2) T100.1, 3) T100.3, 4) T100.5, 5) T100.7, 6) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 7) T100.2, 8) T100.4, 9) T100.6, 10) VCp1.

4.4 Genoteca en VCp2.1

La figura 17 muestra el procedimiento utilizado en la construcción de una genoteca de *Neurospora* en el sitio BamHI del vector VCp2.1. El sitio de reconocimiento de la enzima BamHI en el vector VCp2.1, se encuentra ubicado dentro del gen de resistencia a tetraciclina, lo que hace que la inserción de DNA exógeno en este plásmido inactive a dicho gen.

Un total de 15 experimentos de transformación en paralelo con 100 ng de DNA, dieron como resultado, un promedio de 600 colonias por placa (tabla 10). Se determinó un 7% de religamiento del vector, después de replicar 300 colonias elegidas al azar en LB ampicilina y LB tetraciclina respectivamente. Las colonias aparecidas en cada placa de cultivo, se resuspendieron en medio de cultivo y se guardaron congeladas a -20°C en presencia de glicerol. Se preparó DNA plásmidial de cada grupo de clones para realizar posteriormente experimentos de transformación de levadura.

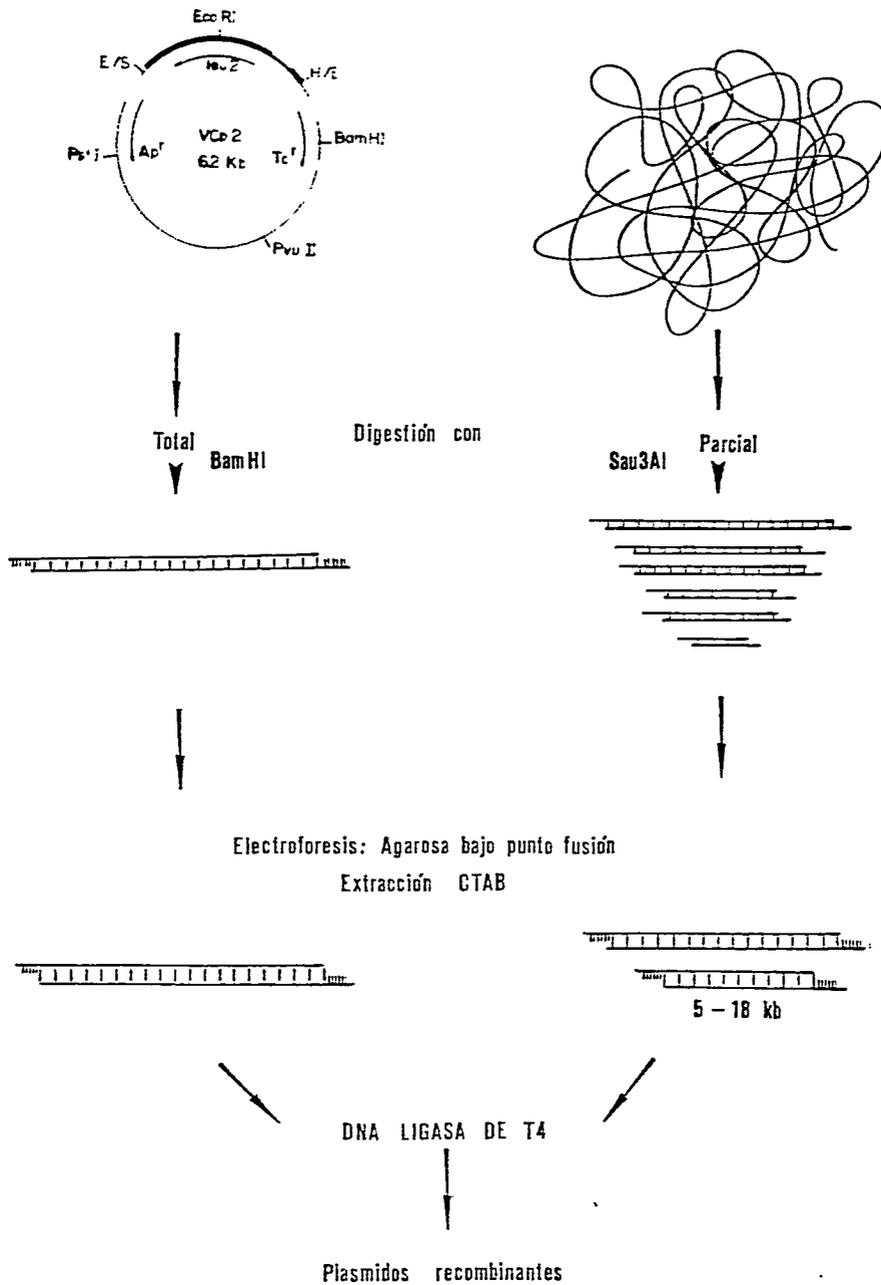


Figura 17:

Esquema del procedimiento utilizado para la construcción de una genoteca de *N. crassa* en el sitio BamHI del plásmido VCp2.1.

Tabla 10

Transformación de *E. coli* C600 con mezcla de ligado de genoteca de *N. crassa* en plásmido VCp2.1.

DNA	Nº colonias/placa LB-amp	DNA	Nº colonias/placa LB-amp
---	0		
VCp2.1	237	VC74.8	574
VC74.1	593	VC74.9	585
VC74.2	627	VC74.10	619
VC74.3	602	VC74.11	628
VC74.4	639	VC74.12	514
VC74.5	552	VC74.13	623
VC74.6	617	VC74.14	594
VC74.7	688	VC74.15	613

Células competentes de *E. coli* fueron transformadas con 100 ng de la mezcla de ligado o con 10 ng del vector VCp2.1. Después del período de expresión, las células fueron concentradas en 100 μ l y luego sembradas en medio selectivo. En el control con VCp2.1, se sembró una alícuota de 100 μ l de células de la mezcla de transformación.

5.- Aislamiento de secuencias de replicación autónoma de *Neurospora crassa* en *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1 Aislamiento de secuencias a partir de genoteca en VCp1

Se utilizó DNA plasmidial de los grupos de 500 y 100 clones de la genoteca de *Neurospora* construida en el vector VCp1 para transformar la cepa Sc483 de *S. cerevisiae*. Los resultados de dicha transformación se muestran en la tabla 11. En todos los casos, se obtuvieron 2 tipos de transformantes leu⁺. La mayoría corresponde a colonias de pequeño tamaño y otras en menor número, presentan un tamaño mayor.

Los transformantes leu⁺ obtenidos, se replicaron en medio SD-glucosa sólido suplementado con histidina, con el objeto de reseleccionar a los transformantes verdaderos de aquellos transformantes abortivos. Todos los transformantes que mantuvieron su capacidad de crecer en este medio selectivo, fueron transferidos a medio SD-glucosa líquido suplementado con histidina para medir la tasa de crecimiento y posteriormente purificar DNA total a partir de ellos.

Como resultado de este experimento, se observó que existen diferentes tipos de transformantes en relación a la velocidad de crecimiento en el medio mínimo. La figura 18 muestra las características de algunos de los transformantes analizados. Un grupo de

Tabla 11

Transformación de *S. cerevisiae* Sc483 con DNA de genoteca de *N. crassa* en VCp1.

DNA cepa	DNA	Tipo de transformante leu ⁺	
		Pequeño	Grande
Sc483	-	0	0
Sc483	YEp13	-	978
Sc483	VCp1	15	7
Sc483	Genoteca	599	255

Esferoplastos de la cepa Sc483 de la levadura, fueron transformados con 1 ug de los plásmidos YEp13 y VCp1 respectivamente y con 5 ug de las diferentes mezclas de DNA de la genoteca de *N. crassa*.

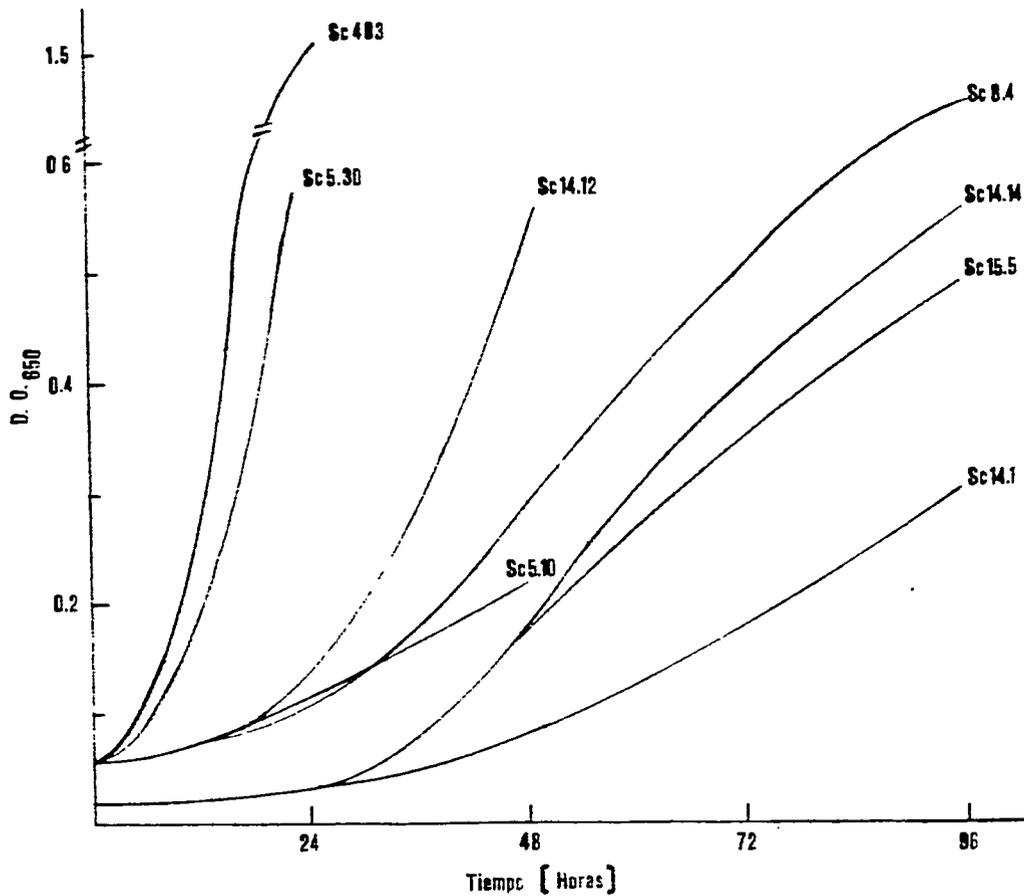


Figura 18:

Curva de crescimento de transformantes leu^+ de *S. cerevisiae* cepa Sc483. Todas las cepas de levadura fueron crecidas en medio selectivo (medio SD suplementado con histidina) a 30°C con agitación. La cepa Sc483 sin transformar, se creció en las mismas condiciones con la única excepción que el medio selectivo ~~también~~ fue suplementado con leucina.

transformantes, representados por el transformante Sc5.30, tiene una velocidad de crecimiento similar a la cepa Sc483 crecida en medio SD-glucosa suplementado con los aminoácidos requeridos por dicha cepa (figura 18), esto es, un tiempo de generación de aproximadamente 3.5 horas. Otro grupo (transformantes Sc14.12, Sc5.10, Sc15.5, Sc8.4, etc), presenta una velocidad de crecimiento menor que el control, con tiempos de generación mayores de 8 horas (figura 18). De hecho, el transformante denominado Sc5.10 presenta un tiempo de generación de aproximadamente 10 horas.

Dado que una de las características de los transformantes de levadura que portan un plásmido con una secuencia de replicación autónoma (ARS) es el aumento del tiempo generacional, acompañado de inestabilidad mitótica, se utilizó como criterio de selección adicional, el tiempo que demoran estos transformantes en duplicarse. La Tabla 12, muestra los tiempos de duplicación de alguno de los transformantes de levadura analizados, lo que permitió realizar una posterior selección de los transformantes que posiblemente portaran un plásmido de replicación autónoma.

Posteriormente, de todos los transformantes de levadura seleccionados, se purificó DNA total a partir de los cultivos en medio SD-glucosa líquido. El DNA purificado de estos transformantes de levadura, se

Tabla 12

Tiempos de duplicación de transformantes de la cepa Sc483 de la levadura, con plásmidos híbridos.

Transformante	Tiempo de duplicación
Sc483 (control)	3.5 horas
Sc483-Yep13	2.5 horas
Sc5.30	3.5 horas
Sc14.12	8.0 horas
Sc5.10	10.0 horas
Sc8.4	12.0 horas
Sc14.14	14.0 horas
Sc15.5	15.0 horas
Sc14.1	20.0 horas

Los transformantes de levadura fueron crecidas en medio mínimo (SD-glucosa) suplementado con histidina. El crecimiento se determinó como aumento de la D.O. ₆₅₀

utilizó para transformar *E. coli* C600 con el objeto de rescatar plásmidos de aquellos clones de levadura que porten una molécula de DNA extracromosómico.

En una serie de experimentos, se realizaron 50 transformaciones de *E. coli* C600 con DNA de transformantes de levadura. En cada experimento se utilizó una preparación de DNA de levadura diferente.

En otra serie de experimentos, se realizó 50 transformaciones de *E. coli* con DNA de levadura, pero en este caso, en cada experimento de transformación de la bacteria se utilizó una mezcla de DNA proveniente de al menos 5 clones diferentes de levadura. Por lo tanto, en esta serie, se analizaron más de 250 clones diferentes de *S. cerevisiae*.

Como resultado de tal experimento se seleccionaron 58 colonias de *E. coli* C600 leu⁺. Todos estos transformantes fueron analizados por réplica en medio mínimo suplementado con prolina, treonina o leucina en diferentes combinaciones. Además, se determinó su sensibilidad al antibiótico ampicilina. Posteriormente, se analizó la presencia de DNA plasmidial de todos aquellos clones leu⁺, amp^r, incapaces de crecer en medio mínimo sin prolina ni treonina. De éstos, sólo uno presentó DNA plasmidial. Este clon pertenecía a un transformante de *E. coli* del grupo T14, denominado EcT14. El DNA utilizado en este experimento de transformación provino de un transformante de levadura

del stock 14 de la genoteca de *N. crassa*, denominado Sc14.12 (ver figura 18).

La figura 19, muestra el resultado del análisis por electroforesis del DNA plasmidial aislado del clon EcT14 de *E. coli* C600, ahora denominado SCp14. La figura 19-A, muestra el DNA plasmidial de dicho transformante obtenido mediante la técnica de minipreparación. La figura 19-B muestra al mismo DNA plasmidial después de ser digerido con PstI. Se observa la presencia de 2 bandas de DNA, una corresponde al vector de clonado VCp1 (5.5 kb) y la otra, el inserto de 3.5 kb.

El fenotipo de la bacteria portadora del plásmido, corresponde al esperado. Además, las características del plásmido también corresponden a lo esperado. Como prueba adicional, se realizó una retransformación de *E. coli* C600 con el DNA plasmidial recién analizado. Como resultado de dicho experimento, se encontró que los transformantes mantienen las mismas características del clon original en cuanto a fenotipo y en cuanto a presencia de DNA plasmidial.

Dado que el plásmido SCp14 fue rescatado en *E. coli* a partir del DNA de un transformante de levadura, se sugiere que dicho plásmido se encontraba en forma extracromosómica en la levadura y por lo tanto era portador de una secuencia del tipo ARS de *N. crassa*. Bajo esas condiciones, el plásmido SCp14 debería

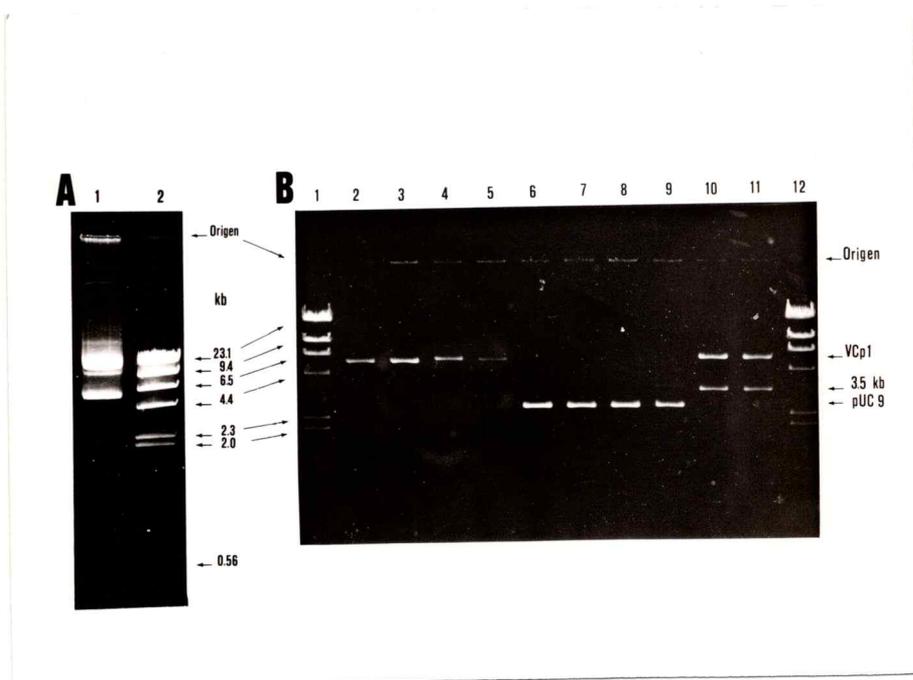


Figura 19:

Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial del transformante Sc14.12 de *S. cerevisiae* rescatado en *E. coli* C600.

A: DNA sin digerir con endonucleasas de restricción: 1) SCp14, 2) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

B: DNA plasmidial digerido con endonucleasas de restricción: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) al 5) VCp1 + PstI, 6) al 9) pUC9 + Sall, 10) y 11) SCp14 + PstI, 12) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

transformar a leu⁺ en alta frecuencia a la cepa Sc483 de *S. cerevisiae*. En la tabla 13 se muestra el resultado de experimentos de retransformación de la cepa Sc483 de la levadura con el plásmido SCP14. Tales resultados indican que la transformación ocurre en baja frecuencia. La determinación de la estabilidad mitótica y velocidad de crecimiento de los transformantes, sugiere que son del tipo de integración.

Experimentos de rescate de plásmidos en *E. coli* a partir del DNA de transformantes de *S. cerevisiae* no tuvieron éxito, sugiriendo la condición integrada del DNA plasmidial.

5.2 Aislamiento de secuencias a partir de genoteca en VCp2.1

Los resultados experimentales antes descritos motivaron otros procedimientos. Para ello se realizaron experimentos de transformación de levadura con DNA plasmidial proveniente de la genoteca de *N. crassa* en el vector VCp2.1. La diferencia de esta genoteca radica en el hecho que fue construida en el sitio BamHI del vector VCp2.1 con fragmentos de DNA de *N. crassa* generados por la endonucleasa de restricción Sau3AI.

Se realizaron experimentos de transformación de *S. cerevisiae* cepa Sc483 con preparaciones de DNA plasmidial proveniente de los 15 grupos de clones de la

Tabla 13

Retransformación de *S. cerevisiae* cepa Sc483 con DNA del plásmido SCp14.

cepa	plásmido	Nº de transformantes leu ⁺
Sc483	-	0
Sc483	YEp13	1724
Sc483	VCp1	17
Sc483	SCp14	14

Esferoplastos de la cepa Sc483 de la levadura fueron transformados con 1 ug de DNA plasmidial. Los transformantes leu⁺, fueron seleccionados en medio mínimo suplementado con histidina.

genoteca (tabla 14). Los resultados muestran 2 tipos de transformantes leu⁺: unos presentan un tamaño reducido y corresponden a los transformantes abortivos. Otros, de mayor tamaño, corresponden a los transformantes normales. Estos últimos son los que pueden crecer cuando se replican en medios SD-glucosa sin leucina. De éstos, se seleccionaron 49 transformantes en un primer experimento. En un segundo experimento, se obtuvieron resultados similares, procediendo a seleccionar un grupo adicional de 55 transformantes leu⁺, con un total de 104 transformantes leu⁺. Finalmente, fue posible disponer de 161 transformantes leu⁺ que pudieran ser portadores de las secuencias buscadas.

Una etapa de selección adicional, consistió en determinar la estabilidad mitótica de los transformantes en medio completo (YEP-Glucosa) y medio selectivo (SD-glucosa + histidina). Para ello se creció cada transformante en YEP sólido, luego las colonias fueron replicadas en el mismo medio y en medio selectivo. Como resultado de este análisis se encontró que 96 transformantes eran estables mitóticamente, con porcentajes de estabilidad mitótica que oscilaron entre el 96.5 al 99.4%. El resto de los transformantes, presentaron niveles de estabilidad mitótica que varió entre 83 al 91.7 %.

A los 8 clones transformantes, que mostraron una menor estabilidad mitótica les fue determinado su

Tabla 14

Transformación de *S. cerevisiae* Sc483 con DNA proveniente de la genoteca de *N. crassa* en VCp2.1.

cepa	DNA	Tipo de transformante leu ⁺	
		Pequeño	Grande
Sc483	-	0	0
Sc483	YEp13	10	1072
Sc483	VCp2.1	12	8
Sc483	genoteca	429	163

Esferoplastos de la cepa Sc483 de la levadura, fueron transformados con 1 ug de DNA de los plásmidos YEp13 y VCp2.1 respectivamente o con 5 ug de DNA de las diferentes mezclas de la genoteca.

El resultado corresponde al nº de transformantes leu⁺ obtenidos del total de los experimentos de transformación realizados.

tiempo de duplicación en medio selectivo. Este fue comparado a la cepa Sc483 utilizada como control y a 2 clones transformantes que pertenecen al grupo de los estables mitóticamente. La tabla 15 muestra el resultado de este análisis e indica que los tiempos de duplicación son similares en todos los transformantes estudiados.

Se purificó DNA de los 8 transformantes leu⁺ recién analizados y se transformó *E. coli* C600 con cada una de las preparaciones de DNA. Se plaqueó en medio LB-amp por un lado y en medio mínimo MMPT-amp por el otro. En ninguno de los experimentos se logró obtener transformantes de la bacteria, para resistencia a ampicilina o para prototrofia para leucina.

Tabla 15

Tiempo de generación de transformantes de la cepa SC483 de *S. cerevisiae* con DNA de genoteca de *N. crassa* en VCp2.1

Transformante	Tpo de duplicación
Sc483 (control)	3.5 horas
YeT-5	4.0 horas
YeT-19	4.1 horas
YeT-32	3.8 horas
YeT-41	3.5 horas
YeT-44	4.5 horas
YeT-67	4.6 horas
YeT-69	4.6 horas
YeT-70	4.4 horas

El tiempo de duplicación fue determinado mediante el crecimiento de los transformantes en medio mínimo suplementado con histidina. El crecimiento fue medido como el aumento de la D.O.₆₆₀.

El control, que corresponde a la cepa Sc483 sin transformar, fue crecido en medio mínimo suplementado con leucina e histidina.

6.- Clonado del gen *leu1* de *Neurospora crassa* en *E. coli*.

6.1 Selección de clones *leu*⁺ en *E. coli*

A partir de la genoteca de *N. crassa* en YRp7, se aislaron 12 clones capaces de crecer en medio mínimo. Estos clones se replicaron en medio mínimo carente de leucina y suplementado con ampicilina por un lado y en medio LB suplementado con tetraciclina por otro. Como resultado, se detectó que estos presentan un fenotipo (*leu*⁺, *amp*^r, *tet*^s) y se estudiaron detalladamente, usando como parámetros la presencia y tamaño de los plásmidos que poseían y su capacidad de retransformar *E. coli* C600.

Los clones portadores de DNA plasmidial de mayor tamaño que el vector fueron utilizados en experimentos de retransformación de *E. coli* C600.

6.2 Retransformación de *E. coli* C600 con DNA de plásmidos recombinantes

Los plásmidos aislados de los clones seleccionados se denominaron pLA. La Tabla 16 muestra los resultados de un experimento de retransformación de *E. coli* C600 con el DNA plasmidial de los 9 clones *leu*⁺, *amp*^r, *tet*^s seleccionados. Los plásmidos pLA1 y pLA10 no lograron retransformar *E. coli* a *leu*⁺, por lo cual es posible

TABLA 16

Transformación de *E. coli* C600 con DNA de clones leu⁺

Bacteria	plásmido	Nº de transformantes/ug DNA		
		amp ^r	tet ^r	leu ⁺
C600	--	0	0	0
C600	YRp7	6.0x10 ⁵	6.0x10 ⁵	0
C600	VCp1	6.0x10 ⁵	0	1.0x10 ⁵
C600	pLA1	2.0x10 ²	0	0
C600	pLA3	3.3x10 ⁴	0	1.4x10 ⁴
C600	pLA10	1.4x10 ⁴	0	0
C600	pLA11	1.2x10 ⁴	0	5.5x10 ³
C600	pLA13	1.5x10 ⁴	0	3.6x10 ³
C600	pLA21	2.0x10 ⁴	0	8.4x10 ³
C600	pLA22	2.0x10 ⁴	0	1.2x10 ⁴
C600	pLA30	1.5x10 ⁴	0	6.0x10 ³
C600	pLA33	3.0x10 ³	0	7.0x10 ²

Células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas con DNA de los plásmidos que se indican. El procedimiento seguido para la transformación se describe en Métodos, sección 12.1. Los transformantes fueron seleccionados en los medios LB-amp, LB-tet y MMPT-amp.

que los clones que lo portaban hayan resultado de reversión a leu⁺. Los plásmidos, pLA3, pLA11, pLA13, pLA21, pLA22, pLA30 y pLA33 poseen la capacidad de retransformar a *E. coli* C600. Para probar si esta capacidad de retransformar se mantenía, se purificó DNA plasmidial de los transformantes de cada plásmido y se volvió a retransformar a *E. coli* C600, observando que los plásmidos rescatados mantenían su capacidad de transformar a la bacteria.

6.3 Análisis electroforético de DNA plasmidial recombinante

La figura 20 muestra un análisis electroforético del DNA plasmidial digerido con BamHI. Se puede apreciar claramente que los plásmidos pLA3 y pLA13 tienen la misma movilidad electroforética (carriles 3 y 4). En los carriles 5, 6 y 7 de la figura 20, se muestra el resultado del análisis de restricción con BamHI de los 3 plásmidos con el objeto de detectar la presencia de inserto y determinar su similitud.

Los plásmidos pLA3 y pLA13 son parecidos entre si, ambos producen al menos 4 fragmentos BamHI que corresponden a las 4 bandas de DNA que aparecen en los carriles 6 y 7. En cada caso, el tamaño de dichos fragmentos es 9.5, 5.8, 2.2 y 0.75 kb respectivamente. La banda de DNA que migra en una posición equivalente a

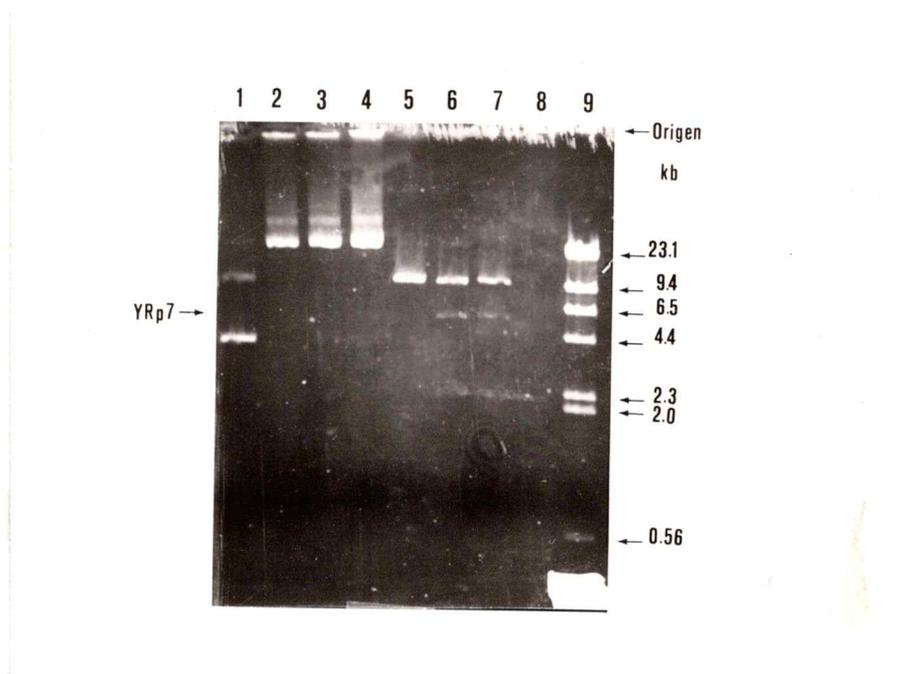


Figura 20:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestion con la enzima de restricci3n BamHI del DNA plasmidial de 3 clones leu⁺ de *E. coli* C600. El DNA plasmidial purificado fue tratado con la endonucleasa de restricci3n BamHI y los productos de la reacci3n fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) YRp7, 2) pLA1, 3) pLA3, 4) pLA13, 5) pLA1 + BamHI, 6) pLA3 + BamHI 7) pLA13 + BamHI, 8) YRp7 + BamHI, 9) DNA del bacteriofago λ + HindIII.

5.8 kb corresponde al vector YRp7 lineal y el resto de las bandas corresponden a DNA de *N. crassa*. El plásmido pLA1, incapaz de transformar a *E. coli* C600, presenta un patrón de bandeo diferente a los plásmidos restantes, lo que está confirmando el hecho que no retransforme a leu⁺.

6.4 Análisis de restricción de pLA13

Dado que los plásmidos que retransforman a *E. coli* C600 a leu⁺ son todos iguales, se eligió a pLA13 para realizar un análisis de restricción y estudios más a detallados.

La figura 21, indica el resultado de este análisis. La digestión de este plásmido con la enzima BamHI da 4 fragmentos.

El análisis cuantitativo de los productos de digestión del plásmido pLA13 con diferentes endonucleasas de restricción (figura 21), determinó que este plásmido tiene un tamaño promedio de 27 kb (ver Tabla 17), por lo cual se puede deducir que el inserto de DNA de *Neurospora* es de 21 kb aproximadamente.

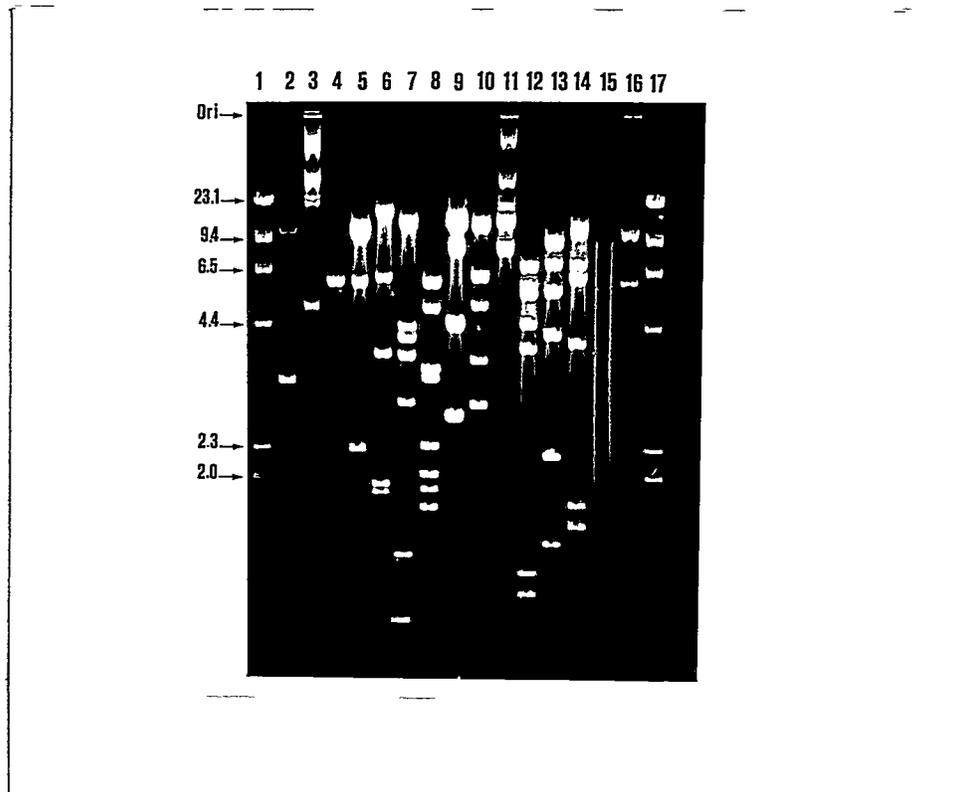


Figura 21:

Electroforesis en gel de agarosa los productos de digestión del plásmido pLA13 con diferentes enzimas de restricción. El DNA plasmidial fue tratado con las endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) YRp7 sin enzima, 3) pLA13 sin enzima 4) YRp7 + BamHI, 5) a 17) pLA13: 5) BamHI, 6) HindIII, 7) PstI, 8) Aval, 9) PvuII, 10) BglII, 11) SacI, 12) Sall, 13) EcoRI, 14) XhoI, 15) BstEII, 16) YRp7 + BstEII, 17) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Tabla 17

Tamaños moleculares de fragmentos productos de digestión del plásmido pLA13 con endonucleasas de restricción.

Enzima	Tamaños moleculares (kb)	total (kb)
BamHI	10, 5.8, 2.2, 0.7	18.7
HindIII	12, 6.0, 3.8, 1.9, 1.9, 1.8	27.4
PstI	11, 4.4, 4.0, 3.7, 2.7, 1.2, 0.9	27.9
AvaI	5.8, 5.0, 3.5, 3.2, 2.2, 2.0, 1.8, 1.7, 1.7, 0.9	27.8
PvuII	11.5, 9.0, 4.7, 2.5,	27.7
BglII	10.0, 6.1, 5.2, 3.6, 2.6	27.5
SalI	6.3, 5.8, 5.5, 4.6, 3.7, 1.1, 1.0	28.0
EcoRI	9.0, 6.4, 5.6, 4.2, 2.1, 1.3	28.6
XhoI	9.5, 6.3, 6.0, 4.0, 1.6, 1.5	28.9
YRp7 + BamHI	= 5.8	5.8

El plásmido pLA13 fue digerido con las endonucleasas de restricción indicadas en la figura 20 y se determinó los tamaños moleculares de los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE.

7.- Subclonado del gen *leu1*.

Los productos de digestión parcial de pLA13 con BamHI, fueron subclonados en el mismo sitio del vector YRp7. Los clones recombinantes obtenidos en este experimento comprenden fragmentos de 2.2, 9 y 9.5 kb.

Dos tipos de subclones están representados por: pA65 que es portador de un inserto de 9 kb y YRp74.2 que es portador de dos fragmentos de 8.8 y 0.75 kb.

El resultado de un análisis de restricción de tres subclones portadores del fragmento BamHI de 2.2 kb es mostrado en la figura 22.

Cuando se replicaron colonias de estos subclones en diferentes medios selectivos tal como LB-amp, LB-tet y MMPT-amp, sólo uno de ellos (YRp74.2) fue capaz de crecer en medio mínimo carente de leucina mostrando un fenotipo *leu*⁺, *amp*^r, *tet*^s.

La capacidad de complementar la mutación *leuB6* por el plásmido YRp74.2 está ilustrada en la Tabla 18-A. Se puede apreciar que el único plásmido capaz de complementar a un mutante *leu*⁻, es YRp74.2 el cual mantiene su capacidad de complementar a *leu*⁺ a través de sucesivos pasos de retransformación, probablemente debido a la presencia del fragmento BamHI de 9.5 kb.

La Tabla 18-B, muestra el resultado de experimentos de retransformación de *E. coli* C600 con los plásmidos pLA13 e YRp74.2 que portan la función *leu*⁺.

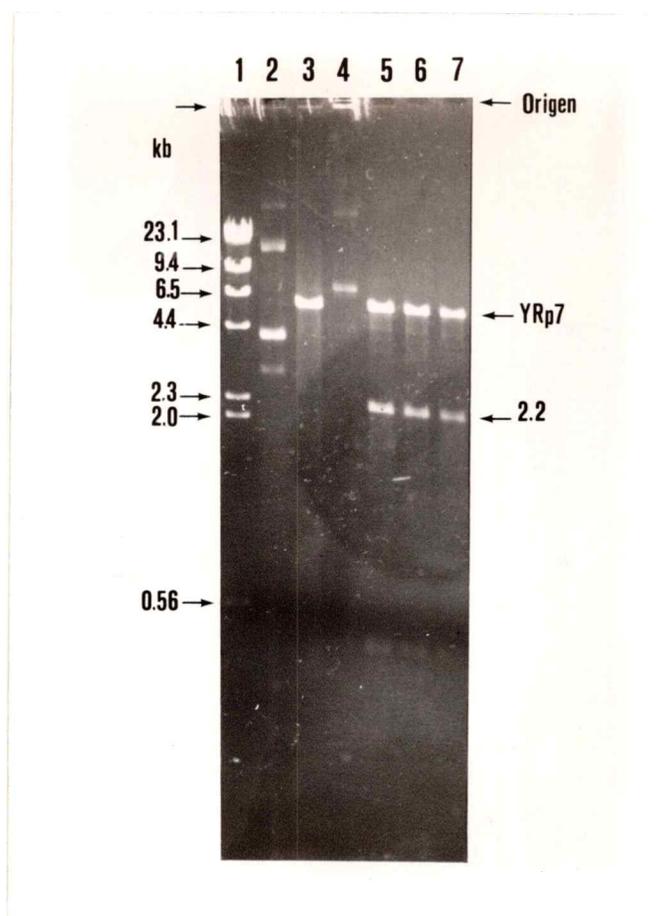


Figura 22:

Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos subclonados digeridos con la enzima de restricción BamHI. El DNA plasmidial purificado fue tratado con la endonucleasa de restricción BamHI y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) YRp7 sin digerir, 3) YRp7 + BamHI, 4) pLA13.1 sin digerir, 5) pLA13.1 + BamHI, 6) pLA13.2 + BamHI, 7) pLA13.3 + BamHI.

TABLA 18

A) Transformación de *E. coli* C600 con DNA de plásmidos subclonados.

cepa	plásmido	Nº de transformante/ug de DNA	
		LB amp	MMPT amp
C600	--	0	0
C600	VCp1	$>1.0 \times 10^6$	1.6×10^5
C600	pLA13.1	7.1×10^5	0
C600	pLA13.3	1.0×10^5	0
C600	pA65	3.4×10^4	0
C600	YRp74.2	$>6.0 \times 10^5$	1.0×10^5

B) Transformación de *E. coli* C600 con DNA plasmidial de subclones leu⁺.

cepa	plásmido	Nº de transformantes/ug de DNA	
		LB amp	MMPT amp
C600	--	0	0
C600	YRp7	1.0×10^6	0
C600	VCp1	1.0×10^6	1.0×10^5
C600	pLA13	2.0×10^4	7.0×10^3
C600	YRp74.2	1.8×10^5	1.2×10^5

Células competentes de *E. coli* C600 fueron transformadas como se describe en Métodos, sección 12.1. Después del periodo de expresión, las células tratadas fueron sembradas en medio rico (LB) y en medio mínimo (MMPT) suplementado con ampicilina.

7.1 Elaboración de un mapa de restricción de YRp74.2

El análisis de restricción del plásmido YRp74.2 es mostrado en la figura 23 y la tabla 19 muestra los tamaños moleculares de los fragmentos de DNA generados como productos de la digestión del plásmido YRp74.2 con las endonucleasas de restricción utilizadas en la figura 23 y con otras endonucleasas adicionales utilizadas en forma individual o en combinaciones de ellas.

Estos productos permitieron elaborar el mapa de restricción de YRp74.2 que se muestra en la figura 24-A. Como se observa en esta figura, el inserto de DNA de 9.5 kb de *Neurospora crassa* no posee sitio de reconocimiento para la endonucleasa EcoRI.

Además al analizar la ubicación de los sitios de corte para las endonucleasas estudiadas, no se observa ningún tipo de repetición del patrón de restricción ya sea en la forma directa o invertida.

Dado que la función que complementa la mutación leuB6 de la bacteria está presente en el fragmento de DNA que lleva el plásmido YRp74.2, es importante determinar cual es su posición dentro de él. Por lo tanto fué necesario seguir subclonando dicho fragmento para disminuir su tamaño.

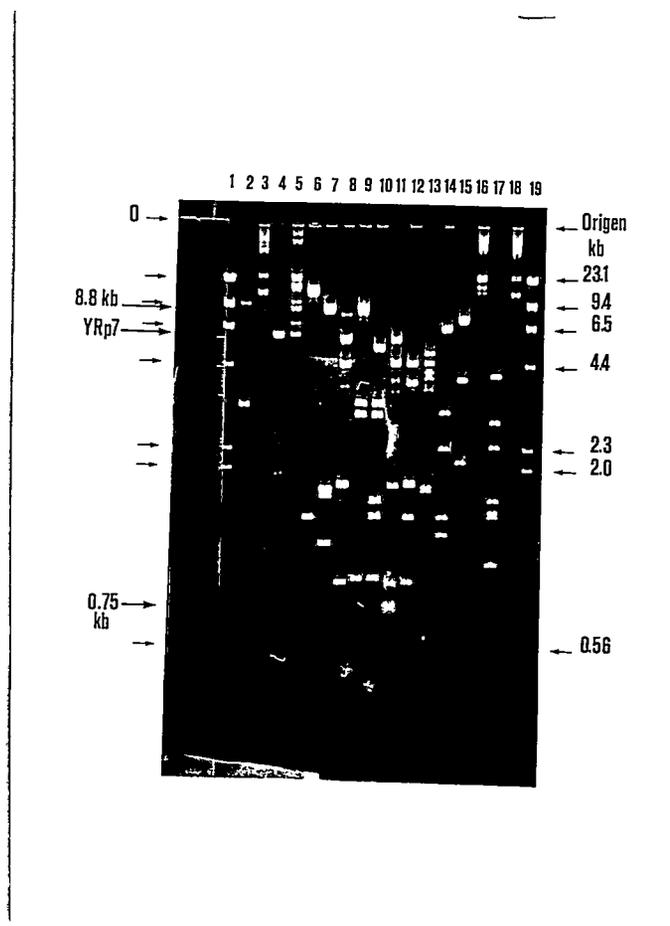


Figura 23:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de YRp74.2 con enzimas de restricción. El DNA plasmidial purificado fue tratado con diferentes endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) YRp7, 3) YRp74.2, 4) YRp7 + BamHI, 5) al 18) YRp74.2: 5) BamHI, 6) EcoRI, 7) BglII, 8) Sall, 9) XhoI, 10) EcoRI + XhoI, 11) Sall + BamHI, 12) EcoRI + Sall, 13) HindIII + BamHI, 14) EcoRI + PvuII, 15) SstI, 16) Aval, 17) BglII, 18) BclI, 19) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Tabla 19

Tamaños moleculares de los fragmentos productos de digestión del plásmido YRp74.2 con diferentes endonucleasas de restricción.

Enzima	Tamaño (kb)
BamHI	8.7, 5.8, 0.75
XhoI	8.4, 3.2, 2.8, 0.9
SalI	5.9, 4.4, 1.8, 1.8, 0.9, 0.3
HindIII	10.0, 1.8, 1.8, 0.65, 0.45
PvuII	6.5, 4.3, 2.9, 1.25,
BglII	8.5, 1.8, 1.8, 1.6, 1.2
PstI	7.4, 2.4, 2.3, 1.55, 1.3
EcoRI	13.5, 1.45
BamHI+XhoI	5.8, 3.3, 2.9, 1.1, 0.9, 0.74, 0.4
BamHI+SalI	5.5, 4.4, 1.8, 0.9, 0.74, 0.74, 0.3, 0.3, 0.25
BamHI+PvuII	6.5, 4.1, 1.7, 1.2, 0.74, 0.3
BamHI+HindIII	4.9, 4.5, 1.8, 1.8, 0.74, 0.62, 0.4, 0.3
BamHI+PstI	3.3, 3.3, 2.25, 1.6, 1.3, 1.15, 1.1, 0.74
BamHI+BglII	5.0, 3.3, 1.70, 1.70, 1.20, 1.10, 0.74, 0.50
BamHI+EcoRI	8.8, 4.35, 1.45, 0.74, 0.3
BglII+XhoI	5.9, 3.2, 1.85, 1.50, 1.30, 0.76, 0.52
BglII+EcoRI	8.1, 1.8, 1.8, 0.9, 0.9, 0.70, 0.65
EcoRI+XhoI	5.3, 3.20, 2.8, 1.60, 1.40, 0.90
EcoRI+SalI	4.7, 3.90, 1.8, 1.7, 1.40, 0.90, 0.52, 0.3
HindIII+PvuII	3.3, 2.9, 2.6, 1.8, 1.6, 1.35, 0.64, 0.4
HindIII+EcoRI	9.4, 1.8, 1.8, 0.8, 0.6, 0.4
PvuII+EcoRI	6.5, 2.9, 2.25, 1.4, 1.25, 0.62
PvuII+XhoI	4.4, 3.2, 2.9, 1.8, 1.25, 1.0, 0.2, 0.1

El plásmido YRp74.2 fue digerido con las endonucleasas de restricción que se indican y los tamaños moleculares de los productos fueron determinados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE.

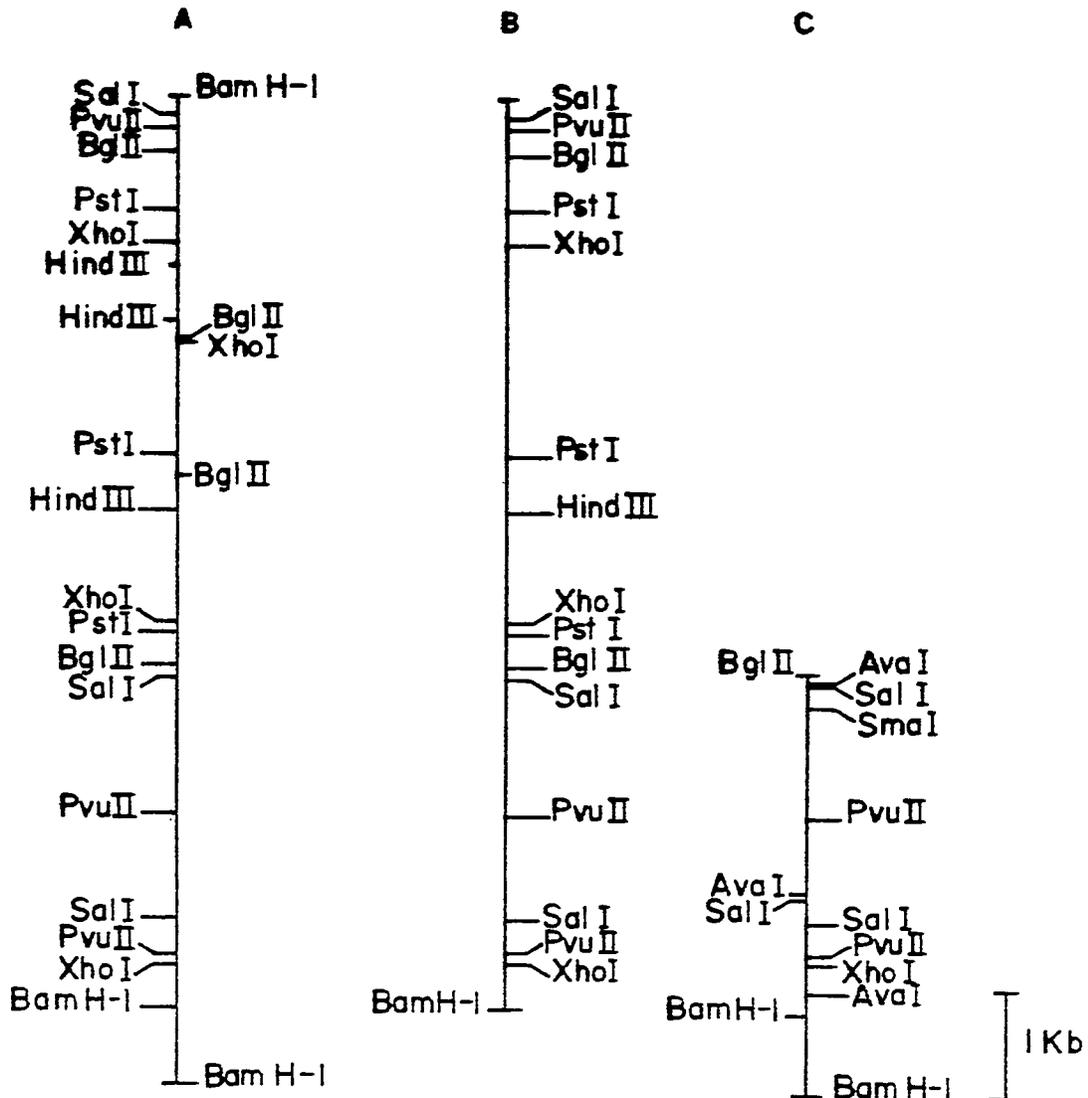


Figura 24:

Mapa de restricción del fragmento de DNA de *N. crassa* portador del gen *leu1*, presente en los plásmidos: (A) YRp74.2, (B) YRp23.2, (C) BpG6

8.- Subclonado del fragmento BamHI de 8.8 kb.

El subclonado del fragmento BamHI de 8.8 kb a partir del plásmido YRp74.2, se realizó por digestión parcial con la endonucleasa BamHI. Luego el fragmento de 14.6 kb purificado, fue ligado a si mismo y utilizado para transformar *E. coli* C600.

Como resultado, se obtuvieron 721 colonias amp^r, las cuales se replicaron en LB con tetraciclina y en medio mínimo con ampicilina (MMPT-amp). Ningún clon amp^r es resistente a tetraciclina. Además, de todas las colonias seleccionadas, ninguna tiene la capacidad de complementar la mutación leuB6 de *E. coli* C600 y por lo tanto son incapaces de crecer en medio mínimo carente de leucina.

Para determinar la presencia de un inserto de DNA que corresponda al fragmento de 8.8 kb en estudio, se seleccionaron 10 colonias con fenotipo leu⁻, amp^r, tet^s (denominadas YR23.1 a YR23.10) de las cuales se extrajo DNA plasmidial y se analizó mediante digestión con la endonucleasa de restricción BamHI. La figura 25 indica que efectivamente dicho fragmento de DNA ha sido subclonado. Como se observa en la figura 25 (carriles 2 al 11), los 10 plásmidos analizados (YRp23.1 a YRp23.10) presentan 2 bandas de DNA. Una de ellas corresponde al vector YRp7, figura 25, carril 12 y la otra corresponde al fragmento BamHI de 8.8 kb de

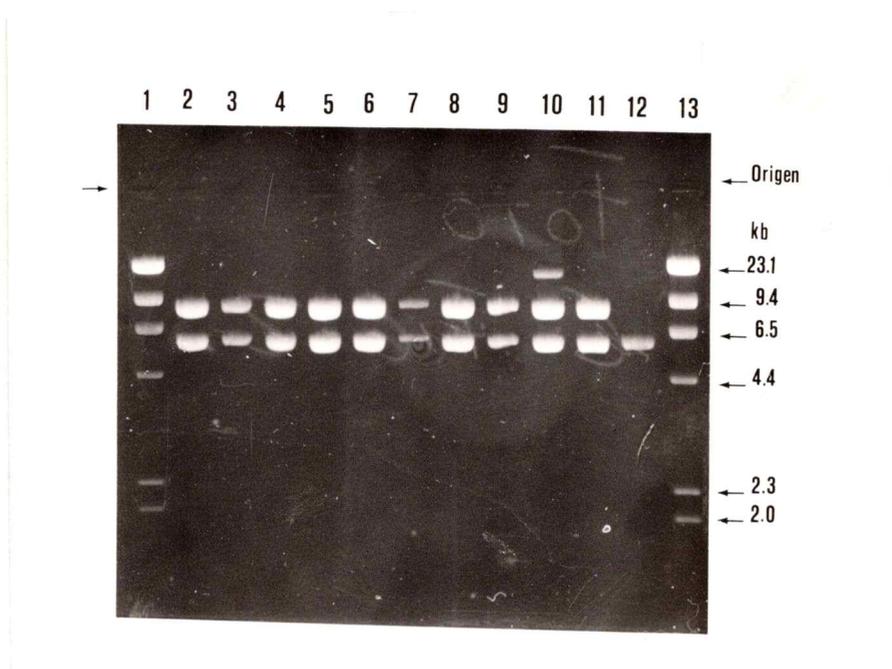


Figura 25:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA de 10 subclones YRp23 obtenidos a partir de YRp74.2. El DNA plasmidial de los subclones fue tratado con BamHI y los productos de reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) YRp23.1, 3) YRp23.2, 4) YRp23.3, 5) YRp23.4, 6) YRp23.5, 7) YRp23.6, 8) YRp23.7, 9) YRp23.8, 10) YRp23.9, 11) YRp23.10, 12) YRp7, 13) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Neurospora. Ninguno de los clones seleccionados mantiene la capacidad de complementar a leu^+ , indica que el fragmento BamHI de 0.75 kb, ausente en estos plásmidos, es requerido para expresar la función leu^+ .

8.1 Retransformación de *E. coli* C600 con plásmidos YRp23.1-10

Para demostrar que estos plásmidos no poseen la secuencia de DNA que los capacita para complementar a leu^+ , se realizó un experimento de retransformación de *E. coli* C600. El resultado de este experimento se muestra en la tabla 20, pudiéndose apreciar claramente que ninguno de los plásmidos subclonados, esto es, YRp23.1 a YRp23.10 transforma la bacteria a leu^+ , o sea, todos ellos mantienen sus características iniciales, dando a las células que los portan un fenotipo amp^r, tet^s, leu^- .

8.2 Elaboración del mapa de restricción del subclon YRp23.2

Con el objeto de completar el mapa de restricción del fragmento de DNA de *N. crassa* clonado, se realizó un experimento de mapeo con uno de los plásmidos recién subclonados.

Tabla 20

Retransformación de *E. coli* C600 con DNA de subclones leu^r (Plásmidos YRp23.1 a 10).

cepa	plásmido	Transformantes/ug DNA		
		amp ^r	leu ^r	tet ^r
C600	--	0	0	0
C600	YRp7	7.6*10 ⁵	0	5.2*10 ⁵
C600	VCp2.1	5.5*10 ⁵	4.9*10 ⁵	5.6*10 ⁵
C600	YRp23.1	4.1*10 ⁴	0	0
C600	YRp23.2	2.7*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.3	5.9*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.4	5.5*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.5	5.9*10 ⁴	0	0
C600	YRp23.6	7.1*10 ⁴	0	0
C600	YRp23.7	4.3*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.8	2.9*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.9	3.8*10 ⁵	0	0
C600	YRp23.10	6.1*10 ⁴	0	0

100 ul de células competentes fueron transformadas con 10 ng de DNA plasmidial. Después del periodo de expresión, las células tratadas fueron sembradas en los medios selectivos respectivos (LB-amp, LB-tet o MMPT-amp).

La figura 26 muestra el resultado de un análisis de restricción del plásmido YRp23.2 y la tabla 21 muestra los tamaños de dichos fragmentos.

De acuerdo a estos resultados, se pudo elaborar el mapa de restricción del fragmento de DNA subclonado (ver figura 24-B), el cual coincide en las posiciones de la mayoría de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción empleadas. Además, permitió ubicar inequívocamente algunos sitios de corte cuya posición en el mapa presentaba cierto grado de ambigüedad.

9.- Subclonado del fragmento BamHI-BglIII de 3.95 kb.

La posición del segmento de DNA que retiene la capacidad de complementar la mutación *leuB6* de *E. coli* C600, ha sido determinada en el mapa de restricción que se muestra en la figura 24-A.

Al analizar detenidamente dicho mapa de restricción, se deduce que existe un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BglIII a 3.95 kb de un extremo del fragmento de DNA de *N. crassa*. Este fragmento BamHI-BglIII, es portador del sitio BamHI interno, y por lo tanto, del fragmento BamHI de 0.75 kb que es importante para mantener la capacidad de complementación de *leu⁺*.

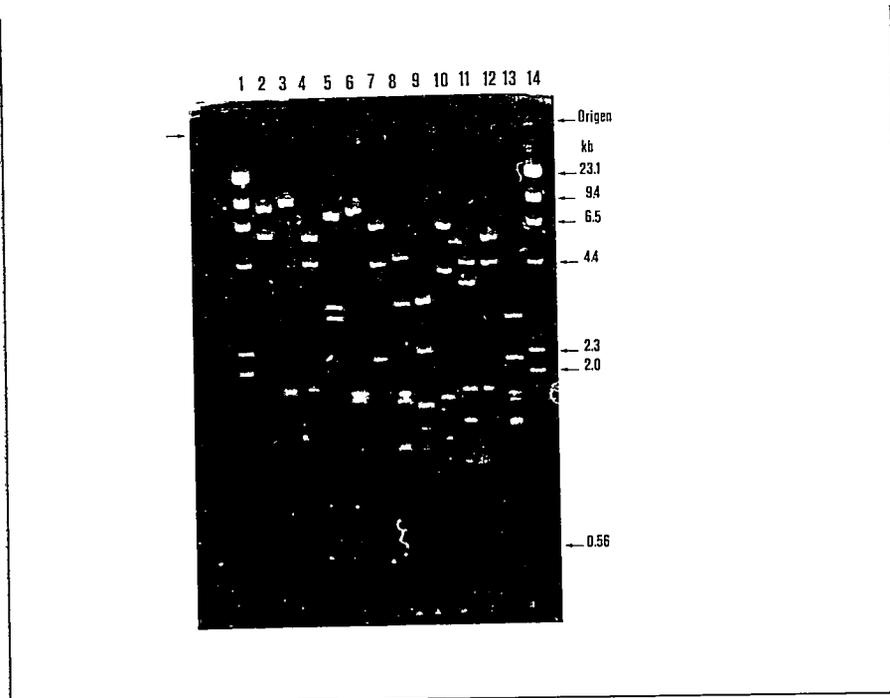


Figura 26:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de YRp23.2 con enzimas de restricción. El DNA plasmidial de YRp23.2 fue tratado con diferentes endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) BamHI, 3) HindIII, 4) Sall, 5) XhoI, 6) BglII, 7) PvuII, 8) BamHI + BglII, 9) BamHI + PstI, 10) BamHI + PvuII, 11) Sall + EcoRI, 12) BamHI + Sall, 13) BglII + PvuII, 14) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Tabla 21

Tamaños moleculares de los productos de digestión del plásmido YRp23.2 con diferentes endonucleasas de restricción.

Enzima	Tamaño (kb)
BamHI	8.8 , 5.8
BglII	7.8 , 1.8 , 1.8 , 1.6 , 1.1
HindIII	9.3 , 1.8 , 0.68, 0.44
PvuII	6.5 , 4.3 , 2.2 , 1.2
Sall	5.9 , 4.4 , 1.8 , 1.0 , 0.9 , 0.3
XhoI	7.5 , 3.2 , 2.8 , 0.9
BamHI+BglII	5.0 , 3.3 , 1.7 , 1.6 , 1.1 , 1.1 , 0.5
BamHI+PstI	3.3 , 3.3 , 2.0 , 1.6 , 1.3 , 1.1 , 1.1
BamHI+PvuII	6.5 , 4.1 , 1.7 , 1.2 , 0.5 , 0.3
BamHI+Sall	5.5 , 4.4 , 1.7 , 0.9 , 0.72, 0.3 , 0.3 , 0.25
BglII+PvuII	2.9 , 2.15, 1.8 , 1.7 , 1.4 , 1.3 , 1.2 , 1.1 , 0.4
Sall+EcoRI	4.7 , 3.8 , 1.7 , 1.4 , 1.0 , 1.0 , 0.9 , 0.5 , 0.3

El plásmido YRp23.2 fue digerido con las endonucleasas de restricción que se indican. Los tamaños moleculares de los productos fueron determinados por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE.

Además existe otro sitio BglIII en el fragmento de DNA de levadura del vector YRp7. De acuerdo a lo anterior, se procedió a subclonar dicho segmento de 3.95 kb de *Neurospora*, digiriendo al plásmido YRp74.2 con BglIII, purificando el fragmento de 8.5 kb y transformando *E. coli* C600 con la mezcla de ligado.

Se obtuvieron 253 colonias transformantes. Se seleccionaron 100 colonias para analizar mediante replica de placa en LB-tet y MMPT-amp. Todas ellas presentaron un fenotipo leu⁺, amp^r, tet^s. Luego, se seleccionó 20 colonias para realizar un estudio más detallado. Para esto, se purificó DNA plasmidial de cada una de ellas y se analizó mediante digestión con BamHI, seguido de electroforesis en gel de agarosa. El análisis electroforético indica que los 20 clones analizados poseen el fragmento pieza de DNA de 0.75 kb y otra de 7.7 kb que corresponde al tamaño esperado según el mapa de la figura 24-A.

9.1 Elaboración del mapa de restricción del subclon BpG6

Posteriormente, se realizó un análisis de restricción del DNA plasmidial de 2 clones, con el objeto de determinar si efectivamente corresponden al subclon esperado. Como se puede observar en la figura 27, el patrón de restricción de ambos plásmidos es similar, indicando la obtención del subclon. La

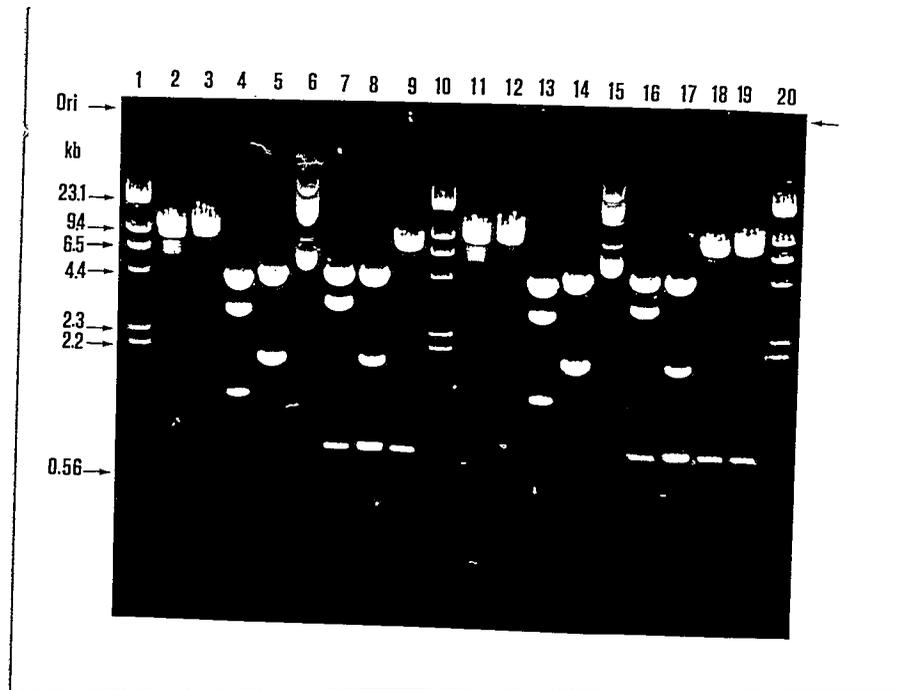


Figura 27:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA de los subclones BpG6 y BpG72. El DNA plasmidial fue tratado con diferentes endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) al 9) BpG6: 2) BglIII, 3) XhoI, 4) PvuII, 5) Sall, 6) HindIII, 7) BamHI + BglIII, 8) BamHI + Sall, 9) BamHI + XhoI, 10) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 11) al 19) BpG72: 11) BglIII, 12) XhoI, 13) PvuII, 14) Sall, 15) HindIII, 16) BamHI + BglIII, 17) BamHI + Sall, 18) BamHI + XhoI, 19) BamHI + HindIII, 20) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

digestión con la enzima BglII (figura 27, carriles 2 y 11) da como producto una banda de DNA lineal cuyo tamaño corresponde a 8.5 kb. El mismo resultado se obtiene con la enzima XhoI (figura 27, carriles 3 y 12). La enzima HindIII no corta a ambos plásmidos (figura 27, carriles 6 y 15) lo que es esperable, pues el sitio de reconocimiento para dicha enzima esta fuera del segmento subclonado, ver figura 24.

El DNA del plásmido BpG6 fue tratado con otras endonucleasas de restricción adicionales, para probar que se dispone del subclon propuesto. La figura 28 muestra dichos resultados. Como se esperaba para la construcción de un subclon con el fragmento BamHI-BglII, este plásmido no tiene sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BclI, ClaI, KpnI y XbaI. Además permitió ubicar en el mapa de restricción el sitio de reconocimiento para la enzima SmaI (figura 24-C).

Al realizar el subclonado con la endonucleasa de restricción BglII, se provocó una delección del plásmido original, perdiéndose secuencias tanto del vector (YRp7) como del inserto de DNA de *Neurospora*, lo cual es demostrado por la desaparición de todos los sitios HindIII (figura 27, carril 6), del sitio ClaI (ver figura 28, carril 4) y de algunos sitios de reconocimiento de otras enzimas tales como EcoRI, PstI, PvuII, XhoI, Sall (figuras 27 y 28).

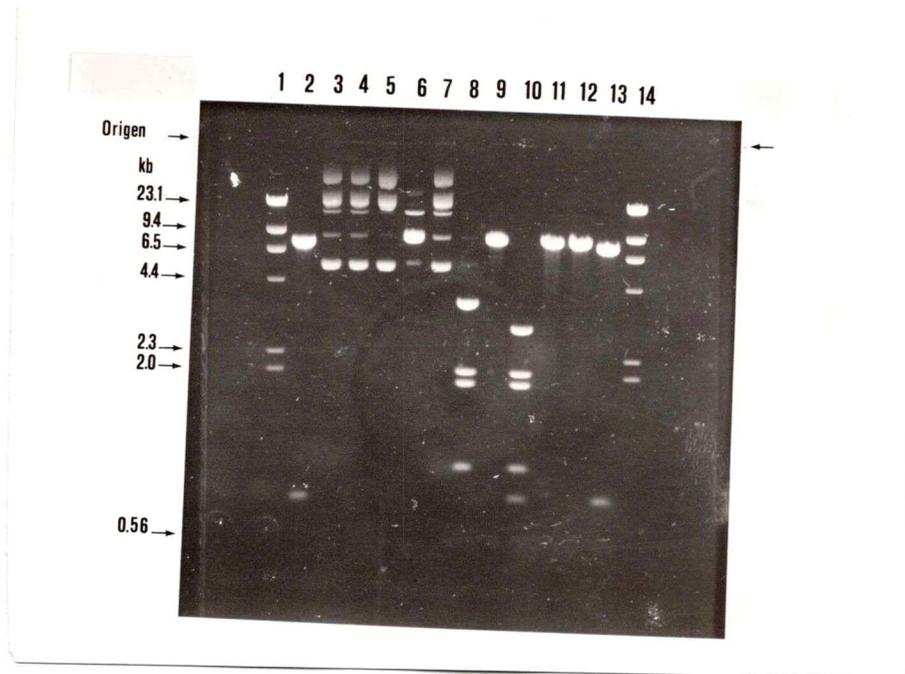


Figura 28:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA del subclon BpG6. El DNA plasmidial fue tratado con diferentes enzimas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) BamHI, 3) BclI, 4) ClaI, 5) KpnI, 6) SmaI, 7) XbaI, 8) AvaI, 9) BglII, 10) EcoRI + AvaI, 11) EcoRI + ClaI, 12) EcoRI + BclI, 13) EcoRI + SmaI, 14) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

10.- Reconstrucción del vector YRp7 en el subclon BpG6.

La construcción del subclon BpG6 requirió de la deleción de un segmento de 1.1 kb del DNA del vector, por lo cual fue necesario reconstituir dicho segmento. Para esto, se digirió el vector YRp7 con las endonucleasas de restricción BamHI y BglII en forma simultánea. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. La banda de DNA de 1.1 kb se extrajo del gel mediante la técnica de CTAB. Posteriormente se mezcló dicho fragmento con el plásmido BpG6 linearizado con la endonucleasa de restricción BglII y se ligó ambas moléculas mediante la acción de la enzima DNA ligasa de T4. Con la mezcla de ligado se transformo *E. coli* C600 y se seleccionó a los transformantes en medio mínimo carente de leucina y suplementado con ampicilina.

Como resultado, se obtuvieron 127 colonias transformantes, de las cuales, se replicaron 100 clones en medio LB-tet, LB-amp y MMPT-amp, todos ellos mostraron un fenotipo leu⁺, amp^r, tet^s. Luego se seleccionaron 30 clones recombinantes a los cuales se les extrajo el DNA plasmidial para ser analizado con endonucleasas de restricción y determinar la presencia y orientación del fragmento de 1.1 kb. insertado en el sitio BglII del plásmido BpG6.

En la figura 29, se muestra el resultado de un análisis del DNA plasmidial de 8 clones seleccionados a partir de los experimentos antes mencionados y que tienen la orientación correcta del fragmento de DNA de 1.1 kb. El DNA plasmidial de los clones 6sp11, 6sp17, 6sp21, 6sp35, 6sp44, 6sp72, 6sp76 y 6sp81 fue tratado sólo con la endonucleasa de restricción BamHI, o con las endonucleasas de restricción BamHI más BglII en conjunto. Los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa. La figura 29, carriles 2 al 9, muestra los productos de digestión de los plásmidos con la enzima BamHI. Todos los plásmidos (excepto el que se muestra en el carril 2) han incrementado el tamaño de la banda mayor en aproximadamente 1.1 kb en relación al plásmido parental (BpG6). Los plásmidos obtenidos fueron denominados YRp6.11, YRp6.17, YRp6.72, etc). La digestión simultánea con BamHI y BglII (figura 29, carriles 10 al 17) produce 3 bandas, una de las cuales, la intermedia, alcanza a 4.3 kb. Ello indica que la orientación del fragmento BglII-BamHI de 1.1 kb del vector es correcta en el plásmido.

El hecho que los clones portadores del plásmido BpG6, así como sus derivados portadores del vector (YRp7) reconstituído, tienen la capacidad de crecer en medio mínimo carente de leucina, indica que no hay algún efecto en la expresión del gen *leu1* debido

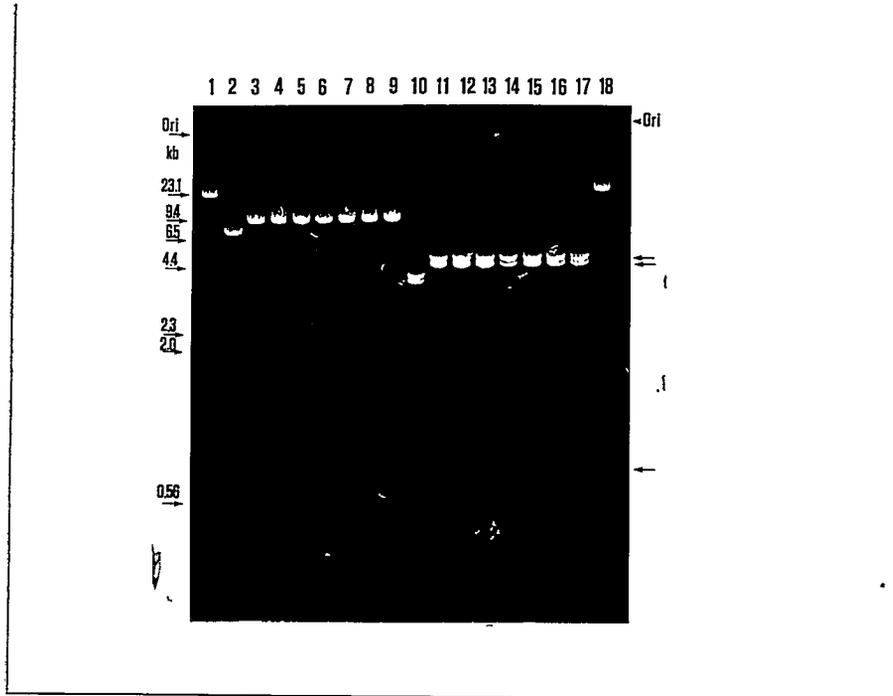


Figura 29:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del DNA de 8 clones 6SP. El DNA plasmidial fue tratado con la endonucleasa BamHI o con BamHI + BglII y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%: 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII, 2) al 9) digestión con BamHI de: 2) 6Sp11, 3) 6Sp17, 4) 6Sp21, 5) 6Sp35, 6) 6Sp44, 7) 6Sp72, 8) 6Sp76, 9) 6Sp81, 10) al 17) digestión con BamHI + BglII de: 10) 6Sp11, 11) 6Sp17, 12) 6Sp21, 13) 6Sp35, 14) 6Sp44, 15) 6Sp72, 16) 6Sp76, 17) 6Sp81, 18) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

a la presencia o ausencia de dicho fragmento. La tabla 22 muestra los resultados de experimentos de retransformación de *E. coli* C600 con los plásmidos portadores del gen *leu1* de *N. crassa*. En esta tabla se incluye uno de los plásmidos reconstituidos (YRp6.72).

11 Pruebas de Hibridación.

11.1 Hibridación de DNA de *N. crassa* al plásmido YRp74.2

Con el objeto de probar que el fragmento de DNA de 9.5 kb clonado en el plásmido YRp74.2 y poseedor de la capacidad de complementar la mutación *leuB6* de *E. coli* C600, pertenece a *Neurospora crassa*, se realizaron experimentos de hibridación.

En la figura 30, se muestra el resultado de estos experimentos utilizando como sonda radioactiva, DNA del plásmido YRp74.2 marcado con ^{32}P . Tales resultados indican que los fragmentos BamHI de 8.8 y 0.75 kb del plásmido YRp74.2 están presente en el DNA genómico de *Neurospora*, no así la secuencia relacionada con el vector YRp7.

Tabla 22

Transformación de *E. coli* C600 con YRp74.2 y sus derivados.

cepa	plásmido	Transformantes/ug DNA		
		amp ^r	leu ⁺	tet ^r
C600	--	0	0	0
C600	YRp7	7.2*10 ⁵	0	5.8*10 ⁵
C600	VCp3.1	5.5*10 ⁵	4.6*10 ⁵	5.1*10 ⁵
C600	YRp74.2	4.5*10 ⁵	4.2*10 ⁵	0
C600	YRp23.2	3.1*10 ⁴	0	0
C600	pA65	2.6*10 ⁵	0	0
C600	BpG6	8.7*10 ⁴	1.1*10 ⁵	0
C600	YRp6.72	2.3*10 ⁵	3.7*10 ⁵	0

100 ul de células competentes, fueron transformadas con 50 ng de DNA plasmidial. Luego de transcurrido el período de expresión, se sembró alicuotas de 100 ul de las células tratadas en los medios de selección respectivos (LB-amp, LB-tet o MMPT-amp).

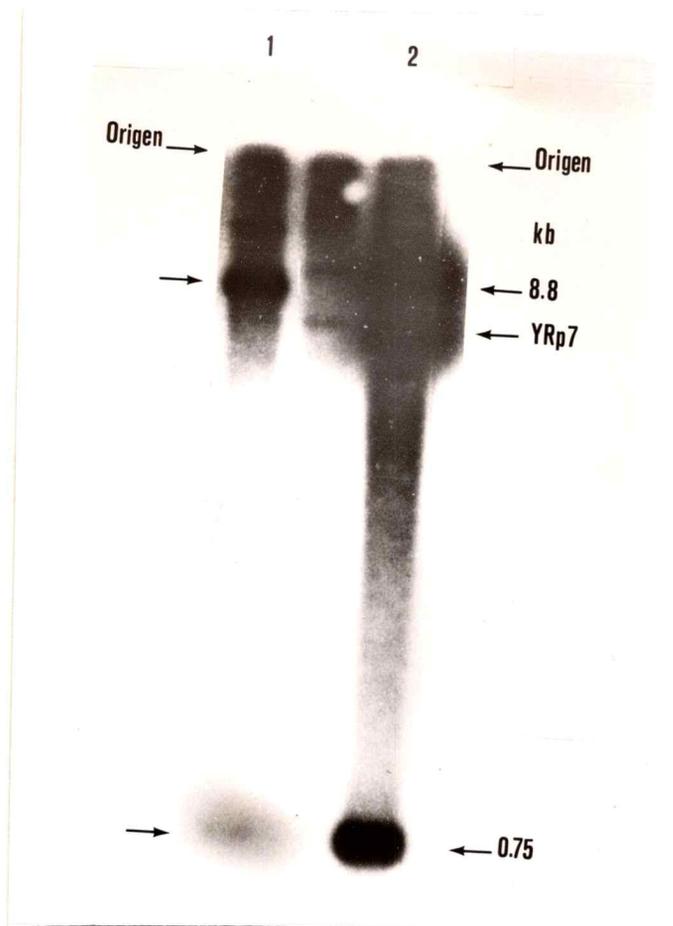


Figura 30:

Autoradiografía de una hibridación del DNA cromosómico de *N. crassa* con el DNA plasmidial marcado con ^{32}P - α l dATP. El DNA cromosómico de *N. crassa* y el plásmido YRp74.2 fueron tratados con la enzima de restricción BamHI. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y transferidos a un papel de nitrocelulosa mediante la técnica de Southern. Para la hibridación, se utilizó como sonda radioactiva al plásmido YRp74.2 marcado con ^{32}P : 1) DNA de *N. crassa* + BamHI, 2) YRp74.2 + BamHI.

11.2 Hibridación de DNA de *N. crassa* al subclon BpG6.

Para determinar que todos los subclones llevan DNA cromosómico de *Neurospora* y que están relacionados, se realizó una hibridación DNA:DNA.

La figura 31, muestra el resultado de un análisis de hibridación de DNA genómico de *Neurospora* (carriles 1 y 2), de los plásmidos YRp74.2 (carriles 3 y 4), YRp23.2 (carriles 5 y 6) y BpG6 (carriles 7 y 8) cuando se utiliza como sonda radioactiva al plásmido BpG6. Como se esperaba, todos los plásmidos están relacionados entre sí y cada uno de ellos posee una secuencia de DNA que pertenece a *Neurospora*. Común a todos ellos es la presencia de la banda de DNA de tamaño molecular de 0.75 kb, ausente en el plásmido YRp23.2 que corresponde al subclon incapaz de complementar a leu⁻.

12.- Transformación genética de *Neurospora crassa*.

En los experimentos de transformación se utilizó la cepa mutante leu1⁻ de *Neurospora* como receptora de DNA plasmidial.

Como resultados se obtuvieron 27 transformantes leu⁺ de los cuales 15 resultaron abortivos. La frecuencia se calcula a partir de los transformantes

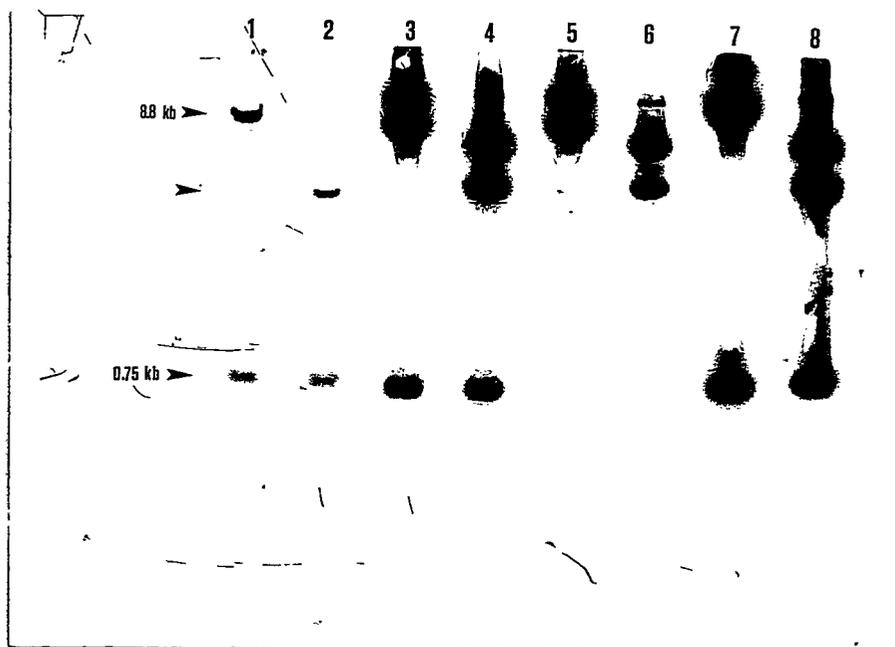


Figura 31:

Autoradiografía de una hibridación de DNA de *N. crassa* y DNA plasmidial con DNA plasmidial de BpG6 marcado con ^{32}P - α dATP. El DNA cromosómico de *Neurospora* y de los plásmidos YRp74.2, YRp23.2 y BpG6 fue tratado con BamHI o con BamHI + BglII y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El DNA fue luego transferido a un papel de nitrocelulosa mediante la técnica de Southern. Para la hibridación se utilizó como sonda radioactiva al plásmido BpG6 marcado con ^{32}P : 1) DNA de *N. crassa* + BamHI, 2) DNA de *N. crassa* + BamHI + BglII, 3) YRp74.2 + BamHI, 4) YRp74.2 + BamHI + BglII, 5) YRp23.2 + BamHI, 6) YRp23.2 + BamHI + BglII, 7) BpG6 + BamHI, 8) BpG6 + BamHI + BglII.

estables en aproximadamente 15 transformantes/ μ g de DNA.

13.- Análisis de los transformantes de *Neurospora crassa*.

Con el objeto de determinar la presencia de secuencias del DNA plasmidial donador en los transformantes leu⁺ de *Neurospora*, se realizaron experimentos de hibridación DNA plasmidial: DNA cromosómico.

La figura 32 muestra el resultado de la hibridación del DNA de los transformantes cuando se utiliza como sonda biotinilada al plásmido YRp74.2. De 12 clones transformantes analizados, 3 presentan bandas de hibridación claras. La banda de 1.45 kb es interesante ya que corresponde al fragmento EcoRI del vector YRp7, esta banda está presente sólo en los transformantes L74.2 y L74.11.

Para distinguir a que tipo de transformantes corresponde cada uno de ellos, se realizó un experimento de hibridación con el DNA de los clones, utilizando como sonda biotinilada DNA del vector YRp7.

La figura 33 indica que los transformantes L74.2 y L74.11 poseen bandas de hibridación similares al experimento anterior, manteniéndose en estos la banda de 1.45 kb. El transformante L74.7 al igual que la cepa huésped utilizada como control no poseen fragmentos de



Figura 32:

Hibridación del DNA de los transformantes *leu⁺* de *N. crassa*: DNA del plásmido BpG6 marcado con dATP biotinilado. El DNA cromosómico de los transformantes de *Neurospora* fue tratado con la enzima de restricción EcoRI y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El DNA fue transferido a un papel de nitrocelulosa e hibridado con el plásmido BpG6 marcado con biotina. El papel de nitrocelulosa fue revelado y fotografiado: 1) DNA del plásmido YRp74.2, 2) DNA *leu1⁻*, 3) al 14) DNA de transformantes: 3) TL44, 4) TL36, 5) L32, 6) L31, 7) T72.2, 8) T72.3, 9) T22, 10) L74.7, 11) L74.2, 12) L74.11, 13) TL23, 14) T57, 15) DNA del plásmido BpG6.

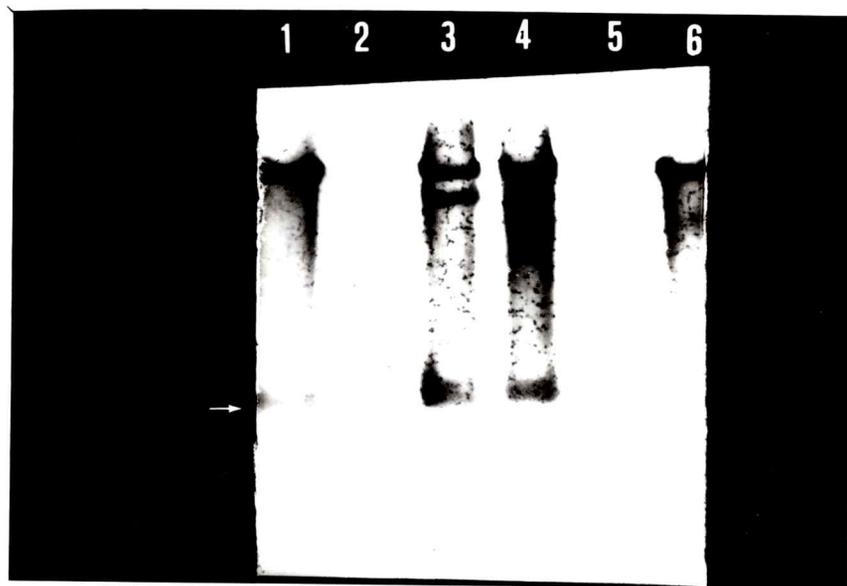


Figura 33:

Hibridación del DNA de transformantes *leu⁺* de *N. crassa* con DNA del plásmido YRp7 marcado con dATP biotinilado. El DNA de los transformantes de *N. crassa* fue digerido con EcoRI y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El DNA fue transferido a un papel de nitrocelulosa y luego hibridado con el plásmido YRp7 marcado con biotina: 1) YRp74.2, 2) DNA de la cepa *leu1⁻*, 3) al 5) DNA de transformantes: 3) L74.2, 4) L74.11, 5) L74.7, 6) YRp74.2.

DNA con homología con YRp7. Posiblemente se trate de un transformante por integración que excluye al vector o bien simplemente de un revertante.

DISCUSION

Clonamiento de DNA de *Neurospora crassa*.

Para el clonamiento de genes de *Neurospora crassa*, se construyó una genoteca del hongo en tres vectores diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Dos de estos, corresponden a los vectores de integración VCp1 y VCp2.1. El restante corresponde al vector de replicación autónoma YRp7 (Tschumper *et al*, 1980).

El objetivo de las genotecas construidas en los vectores de integración fue aislar y clonar fragmentos de DNA de *Neurospora crassa*, portadores de una secuencia de replicación autónoma (ARS) que sea funcional en levadura. El diseño experimental se basó en el hecho que en *S. cerevisiae*, las secuencias ARS aumentan la frecuencia de transformación del hongo cuando se introducen en un vector de integración (Struhl *et al*, 1979; Stinchcomb *et al*, 1980). Además los transformantes obtenidos con este tipo de plásmido presentan inestabilidad mitótica y meiótica asociada a un incremento del tiempo generacional. Se eligió el gen LEU2 como marcador seleccionable debido a que se dispone de cepas de levadura portadoras de dos mutaciones en dicho gen (*leu2^{am}*). Tales cepas muestran una frecuencia de reversión inferior a

10^{-14} , parámetro importante de tener en cuenta cuando se trabaja con frecuencias de transformación bajas.

Las secuencias del transposon Tyl, responsables de aumentar la frecuencia de transformación con plásmidos de integración, fueron eliminadas mediante la construcción de los vectores de integración portadores del gen LEU2 de *S. cerevisiae*. La frecuencia de transformación a leu⁺ obtenida con estos plásmidos es de aproximadamente 10 transformantes/ μ g de DNA. Esto está de acuerdo a lo esperado para un vector de esta naturaleza (Hicks *et al*, 1979). De hecho, al comparar esta frecuencia de transformación con la obtenida con el plásmido pTS1.2, se observa que los vectores contruidos a partir de este último, transforman aproximadamente 10 veces menos.

Cuando se compara las frecuencias de transformación de los vectores de integración VCp1, VCp2.1 y VCp2.2 con aquellas obtenidas con vectores episómicos como YEp13 o un vector de replicación autónoma como VCp3.1, se observa que en los primeros la eficiencia es 2 a 3 órdenes de magnitud menor, comportándose como verdaderos vectores de integración.

Por otro lado, el fragmento portador del gen LEU2 de levadura utilizado en estos vectores, ha sufrido una alteración de una secuencia ubicada entre el transposón Tyl y un gen codificante por tRNA^{leu} adyacente a LEU2 (Martínez-Arias *et al*, 1984). Esto permite una mayor

expresión de este gen, facilitando el crecimiento de los transformantes en los medios selectivos.

Los vectores aquí construidos, son además portadores de los genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina, poseen sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción tales como PstI, BamHI, Sall, HindIII etc, lo que facilita la inserción de secuencias de DNA heterólogas y su posterior selección en *E. coli*.

Dado que en *Neurospora crassa* no existe en la actualidad vectores de clonamiento molecular, portadores de secuencias de DNA cromosómicas que le confieran una replicación autónoma a tales plásmidos, y sólo se dispone de un vector basado en un plásmido mitocondrial (Stohl et al, 1983), se ha hecho necesario aislar secuencias que puedan funcionar como replicadores para la construcción de vectores adecuados a las necesidades de la genética de *Neurospora*.

En atención a lo anterior, en el presente trabajo se intentó clonar y aislar tales secuencias ARS, utilizando a la levadura como un huésped de clonado. Para ello se realizaron experimentos de transformación de levadura con DNA plasmidial proveniente de vectores de integración, portadores de segmentos de DNA de *N. crassa*.

Los resultados obtenidos de los experimentos de transformación de *Saccharomyces*, utilizando DNA proveniente de la genoteca de *N. crassa* construida en el sitio PstI del vector VCp1, mostraron la presencia de 2

tipos principales de transformantes. Un tipo corresponde a los transformantes por integración, que son colonias de mayor tamaño y muy estables; el otro tipo presenta un tamaño de colonia menor e inestabilidad mitótica.

A partir de DNA del último tipo de transformantes de levadura, se rescató un plásmido después de transformar *E. coli*. Este plásmido poseía al vector VCp1 completo y un inserto de 3.5 kb de DNA de *N. crassa*. Este resultado sugiere que dicho plásmido se encontraba en forma extracromosómica como una molécula circular cerrada en la levadura, dado que de otra manera no habría podido transformar a la bacteria.

Se esperaba que este plásmido recién aislado en *E. coli* retransformara en alta frecuencia a la levadura. Sin embargo, a pesar de llevar una secuencia de *N. crassa* con características de ARS, su comportamiento correspondió a un típico plásmido de integración. Una explicación de tal comportamiento podría ser que se tratara de un transformante en el cual el DNA plasmidial se encontraba en vías de integrarse; o un transformante abortivo. Sin embargo, es poco probable que esto ocurriera, puesto que según el procedimiento de selección y aislamiento de DNA de los transformantes, se requiere el crecimiento de éstos durante varios días. Esto, es tiempo suficiente para que cualquiera de los eventos ocurriese y por lo tanto los descarta con una alta probabilidad. Esta explicación

conduciría a pensar que el fragmento de DNA de 3.5 kb no corresponde a una secuencia del tipo ARS o similar.

Otra posibilidad es que las células de levadura fueran inicialmente transformadas por un plásmido híbrido portador de una secuencia de DNA perteneciente a *Neurospora crassa* con funciones tipo ARS. Estas secuencias podrían haber permitido que el vector original (VCp1) se comportara como un plásmido de replicación autónoma en el primer organismo. Además es posible que el inserto de DNA de *Neurospora* fuera posteriormente rearrreglado por algún evento de recombinación, produciéndose una delección de parte de dicho fragmento. Estos fenómenos de recombinación, que pueden llevar a delecciones, inversiones, etc. en vectores de clonamiento de levadura son frecuentes (Clancy et al, 1984). Se ha descrito algunos casos en los cuales los fragmentos exógenos de DNA han sido rearrreglados, llegando a ser completamente eliminados del vector donde se encuentran (Clancy et al, 1984; Scherer et al, 1979; Toh-e et al, 1981; Gerbaud et al, 1979). En otros casos, se ha observado que fragmentos de DNA de levadura presentes en vectores del mismo organismo sufren rearrreglos que generalmente terminan en delecciones (Clancy et al, 1984; Gerbaud et al, 1979). Por otro lado, dependiendo del vector utilizado en los experimentos de transformación los rearrreglos ocurrirán con mayor frecuencia. Los vectores portadores de secuencias del DNA de 2u de *S. cerevisiae* sufren

rearrreglos debido a que todas las cepas del hongo poseen sobre 10 copias por célula de dicho plásmido endógeno. Este hecho aumenta la posibilidad de un evento de recombinación homóloga entre la región 2u del plásmido híbrido con su homólogo endógeno. Por lo tanto, es muy probable que la situación ocurrida con el DNA de *Neurospora* presente en el plásmido rescatado de las células transformantes de levadura, corresponda a uno de los eventos anteriormente mencionados.

Las características de los transformantes de levadura, portadores de secuencias ARS, permitieron diseñar una estrategia para clonar y aislar secuencias de replicación autónoma de *Neurospora crassa* en *S. cerevisiae*. No obstante la relación filogenética existente entre ambos organismos, deben existir diferencias que hacen que secuencias de DNA de uno de ellos no puedan funcionar en el otro, o bien, si en algún momento son funcionales, estas secuencias pueden llegar a ser modificadas.

El procedimiento seguido utiliza fragmentos PstI de *N. crassa*. Los resultados están de acuerdo a los descritos con fragmentos BamHI (Stinchcomb et al, 1980), en los cuales fue posible aislar una secuencia funcional en *Saccharomyces*, denominada ARS8, la cual aparentemente tampoco es capaz de retransformar a la levadura. Además, esta secuencia no es funcional en *N. crassa* cuando se prueba por retrotransformación (Vapnek et al, 1981, Suzci et al, 1983). Es probable que dicho fragmento BamHI fuera

reconocido como un origen de replicación por la levadura, pero para funcionar como tal en *Neurospora* precisará de elementos extras, tales como secuencias no presentes en dicho fragmento. También es posible que uno de los sitios BamHI estuviera ubicado dentro o cerca del elemento responsable de la replicación autónoma y por lo tanto al ser clonado como fragmento BamHI, afectó en parte a su capacidad funcional. Sin embargo, los resultados de la presente tesis, sugieren que la levadura no es un buen organismo huésped para estos objetivos. Una prueba de la funcionalidad de una secuencia ARS deberá ser realizada en el propio organismo de donde proviene el material genético. Sin embargo, la carencia de un gen de *Neurospora* que pueda ser utilizable como un buen marcador genético para realizar experimentos de retrotransformación en dicho hongo, hacen que tales pruebas no sean factibles por ahora.

Con el objeto de corroborar los resultados anteriores, se realizaron experimentos similares utilizando la genoteca de *N. crassa* construida con fragmentos Sau3AI. Para tal evento, fue necesario construir un plásmido que fuera portador del gen *LEU2* de levadura y que además fuera portador de 2 genes de resistencia a antibióticos. El vector VCp2.1 cumple con tales características y permite insertar fragmentos de DNA en el sitio BamHI, inactivando al gen de resistencia a tetraciclina, pero dejando el gen de resistencia a ampicilina activo, permitiendo una doble

selección en *E. coli* (prototrofia para leucina y resistencia a ampicilina). Esto facilita un proceso selectivo más rápido. Se utilizaron fragmentos Sau3AI de DNA de *N. crassa* que se insertaron en el sitio BamHI del vector VCp2.1 debido a que ambas endonucleasas de restricción generan extremos cohesivos iguales, esto es 5'-GATC-3', los que pueden ser unidos por la enzima DNA ligasa de T4.

Los experimentos de transformación de levadura con la genoteca en VCp2.1 no permitieron aislar un plásmido como en el caso anterior. A pesar de ello, los resultados obtenidos son consistentes entre sí ya que si bien en un caso pudo aislarse un plásmido en *E. coli*, éste no fue capaz o perdió la capacidad de transformar en alta frecuencia a la levadura y además no pudo mantenerse extracromosómicamente. Por otro lado, si bien, en la literatura está descrita la selección de una secuencia de *Neurospora* con funciones tipo ARS en *S. cerevisiae*, no está claro si los plásmidos portadores de ARS8 rescatados en *E. coli* son capaces de retransformar en alta frecuencia a la levadura. Además, no es posible aislar DNA plasmidial de todos los transformantes inestables de la levadura por el sistema de selección de *E. coli* descrito por Stinchcomb, 1980.

En levadura existiría al menos 1 ARS por cada 40 a 50 kb de DNA cromosómico (Beach *et al*, 1980; Chan *et al*, 1980; 1983). Dada la cercanía filogenética entre

Saccharomyces y *Neurospora* uno podría esperar para *Neurospora* una disposición de las secuencias ARS similar a *Saccharomyces*, y por lo tanto debería ser posible su aislamiento si éstas se expresan en la levadura.

De acuerdo a la ecuación de Clarke *et al*, (1976), suponiendo un tamaño de inserto de 6 kb, los 8000 clones de la genoteca en VCp1 analizados representan aproximadamente el 55% del genoma de *N. crassa*, esto es 14800 kb. Por otra parte, si se supone que los 250 transformantes inestables de levadura, obtenidos con la genoteca en VCp1, corresponden a clones portadores de secuencias con algún tipo de función ARS, entonces se puede estimar que habría aproximadamente 1 ARS por cada 59 kb en *N. crassa*.

De la misma forma, al realizar un cálculo similar con la genoteca de *N. crassa* en VCp2.1, suponiendo un tamaño promedio de inserto de 10 kb, los aproximadamente 8000 clones representan el 65% del genoma del hongo, esto es, 17500 kb. Como se obtuvieron aproximadamente 160 transformantes seleccionados en mezclas mayores, lo cual podría ser corregido por un factor de 2 en relación al análisis anterior, resulta aproximadamente 1 ARS por cada 58.5 kb, resultado que estaría de acuerdo con el obtenido en la genoteca de VCp1 y con los descritos para levadura.

Debido a que en promedio un total superior a 14000 kb de DNA de *N. crassa* ha sido analizado en búsqueda de una secuencia ARS aislable y funcional, uno podría asumir que

estas secuencias no se expresan en *Saccharomyces cerevisiae*.

Clonamiento del gen *leu1* de *Neurospora crassa*.

Para el clonamiento de genes estructurales de *Neurospora crassa* fue necesario construir una genoteca de dicho hongo en un vector de clonado. En este caso, se utilizó al plásmido YRp7 con el objeto de disponer de un sistema de clonado de genes o secuencias de DNA de *Neurospora crassa* con un amplio rango de aplicabilidad.

La utilización del plásmido YRp7 como vehículo de clonamiento de genes estructurales de *Neurospora*, permite utilizar como huésped de clonado tanto a la bacteria *E. coli* como a *S. cerevisiae*, puesto que el vector es portador de orígenes de replicación de ambos organismos. Además, por ser un plásmido de replicación autónoma de levadura, permite utilizar dicha genoteca para el clonado y aislamiento de secuencias de *Neurospora* que se comporten como centrómeros en la levadura. Esto es posible, debido a que dichas secuencias centroméricas, confieren estabilidad mitótica y meiótica a los plásmidos replicativos que las posean. Esta propiedad, permite entonces disponer de un método de selección relativamente fácil de las secuencias de DNA que tengan dichas funciones centroméricas en levadura.

La utilización de *S. cerevisiae* como huésped para el clonado de genes eucariontes es factible, dado que se dispone de un amplio número de cepas portadoras de mutaciones, cuyas frecuencias de reversión son

relativamente bajas. Además, se debe considerar que los sistemas de transformación en este hongo están bastante desarrollados. Por otro lado, si uno lo mira desde el punto de vista de la utilidad que puede prestar para el clonado de genes estructurales de *N. crassa*, se encuentra con que es posible que pueda haber complementación entre ambos organismos. Esto es esperable debido a que existe una relación filogenética cercana entre ambos hongos. Ambos pertenecen a la clase Ascomicete, y por lo tanto es posible que compartan algunas funciones génicas. De hecho se ha descrito que levadura ha sido capaz de procesar una secuencia intrónica de *Neurospora* (Woudt et al, 1983).

Indudablemente que la primera etapa a realizar en un intento por clonar genes de algún organismo, sobre todo si tales genes están relacionados a la síntesis de enzimas que participan en alguna vía metabólica, es probar la complementación en *E. coli*. y como alternativa otro procedimiento que pueda ser más laborioso o complejo.

A partir de la genoteca en YRp7, fue posible clonar el gen *leu1* de *Neurospora crassa* por complementación de una mutación de un gen análogo de *E. coli*: el gen *leuB* de la bacteria. Esto es, un fragmento de DNA insertado en el plásmido YRp7, permitía que una cepa de *E. coli* incapaz de crecer en un medio mínimo, carente de leucina, adquiriera una capacidad de crecimiento normal. Como prueba inmediata para demostrar que esa capacidad recién adquirida se debía al plásmido híbrido y no a una reversión de la mutación

de la célula huésped, se determinó si plásmidos aislados de aquellos clones protótrofos eran capaces de retransformar, retransmitiendo dicha capacidad a otras células de la misma cepa bacteriana.

El tamaño del inserto en el plásmido pLA13, determinado por análisis de restricción corresponde a un fragmento de DNA de *Neurospora* de aproximadamente 21 kb. Dicha molécula, estaría formada por al menos 4 fragmentos BamHI. La determinación del tamaño exacto del inserto fue lograda después de realizar un análisis con varias enzimas de restricción. Dos de los fragmentos BamHI que estarían formando dicho inserto parecen tener tamaños similares (9 a 9.5 kb). Por lo tanto, la suma de los productos de la digestión con BamHI, no coincidió con la suma de los productos de la digestión con el resto de las enzimas analizadas. La comparación de tales resultados, indicó una diferencia de aproximadamente 9 kb. Además, un análisis de la intensidad de fluorescencia de la banda de 9-9.5 kb confirmó que ésta era doble. La corrección realizada de acuerdo al razonamiento anterior, permitió determinar que efectivamente el tamaño del inserto inicial capaz de complementar la mutación leuB6 de la bacteria corresponde a 21 kb.

El gran tamaño del inserto no es de extrañar, puesto que la genoteca de *Neurospora* fue construída en base a los productos de restricción parcial con BamHI. Además, como el procedimiento de selección permite crecer a aquellas

células que sean portadoras de una función que complemente su alteración genética, entonces basta con que exista un solo representante de tal plásmido para que sea detectado. El hecho que los clones transformantes, sean portadores de un mismo tipo de plásmido híbrido confirma lo recién expuesto. Además sugiere que inicialmente se formó una sola molécula de este tipo. Posteriormente en las etapas de amplificación de la genoteca el número de clones portadores de dicho plásmido aumentó.

El subclonamiento del inserto permitió reducir el fragmento BamHI a un tamaño de 9.5 kb presente en el plásmido YRp74.2. Este subclon mantiene la capacidad de complementar la mutación *leuB6* de la bacteria. Además, se realizó un estudio para determinar que dicha capacidad se debe al inserto y no al plásmido YRp7 utilizado como vector de clonado. Al comparar los plásmidos pLA13, YRp74.2 con el vector YRp7, se demuestra que este último no es capaz de complementar y por lo tanto dicha característica está presente sólo en los plásmidos mencionados. Además, dado que el resto de los subclones portadores de los otros fragmentos que forman parte del inserto original no transforman a *leu+*, se deduce que los fragmentos de 2.2 y 9 kb no son portadores del gen *leu1*.

El fragmento de DNA subclonado en YRp74.2 presenta un sitio BamHI interno adicional, ubicado a 0.75 kb de un extremo del inserto. Este sitio BamHI afecta la capacidad de complementar a *leu+*. El mapa de restricción de YRp74.2

confirma el hecho que el inserto de 9.5 kb se subdivide en 2 fragmentos BamHI de 8.8 y 0.75 kb. Los experimentos de subclonado del fragmento de 8.8 kb, sugieren que el fragmento BamHI de 0.75 kb es importante para la mantención de la capacidad de complementación. Esto a su vez indica la ubicación del gen dentro del fragmento de DNA de *Neurospora* y, más precisamente, en un extremo de éste.

La ubicación más precisa del gen en el inserto, se obtuvo mediante el subclonamiento del segmento BamHI-BglII de 3.95 kb. Este procedimiento, permitió acotar el gen a una secuencia menor de 3.95 kb en el plásmido BpG6. Por otro lado, sugiere que dicho gen se expresa en la bacteria por promotores propios que estarían ubicados dentro del último segmento subclonado. Además, el hecho que en este proceso se provocó una delección de un fragmento del vector que involucra tanto secuencias de pBR322 como de *TRP1* de levadura, descarta a éstas en la expresión de dicho gen. Por lo tanto, es probable que en el fragmento BamHI-BglII residan la mayoría o todas las funciones necesarias para la expresión del gen *leu1* de *Neurospora* en *E. coli*. Además, lo anterior se ve confirmado al analizar el subclón cuya delección de la región del vector ha sido reconstituída. Cuando se compara la capacidad de complementación de los plásmidos reconstituídos con sus plásmidos parentales, se observa que no hay diferencias

entre ellos, indicando también que la secuencia de 3.95 kb del hongo es autosuficiente para expresarse en *E. coli*.

Se dispone de una secuencia de DNA que es capaz de complementar la mutación *leuB6* de la cepa C600 de *E. coli*. La prueba directa que dicha secuencia pertenece a *Neurospora crassa*, ha sido demostrada por los experimentos de hibridización entre el DNA cromosómico del hongo y el plásmido YRp74.2. Además, esto se vio confirmado por los experimentos de hibridación adicionales realizados con los subclones, lo que finalmente elimina las dudas que puedan generarse respecto al origen de DNA clonado.

En el presente trabajo, se ha seguido la vía más simple para aislar un gen de *Neurospora crassa*. Esta corresponde a la transformación genética para detectar la complementación de una función bioquímica defectiva en *E. coli*. Como una etapa posterior, se ha demostrado que la adquisición de prototrofia por la célula receptora se debe al DNA dador y no a una reversión de la mutación que se ha intentado complementar. Esto se realizó aislando DNA de las células prototrofas y determinando su capacidad de retransformación en la misma cepa receptora. Además de observar la presencia de un plásmido que presente al vector original y a un inserto de DNA heterólogo. Luego se ha confirmado la identidad del fragmento de DNA portador del gen mediante las pruebas de hibridación con el DNA genómico de *Neurospora*.

La mutación *leuB6* corresponde a una mutación puntual (Appleyard, 1954), por lo tanto la probabilidad que ocurra una reversión no es despreciable. De hecho, se ha detectado en esta cepa bacteriana una frecuencia de reversión cercana a 10^{-7} . Sin embargo, la reversión de la mutación *leuB6* de la cepa C600 queda descartada por las pruebas de retransformación discutidas anteriormente.

La naturaleza de la mutación *leuB6* es desconocida. No se sabe si corresponde a una mutación sin sentido o a otro tipo. Por esta razón, podría existir la posibilidad que el fragmento de DNA de *Neurospora* sea portador del gen *leu1* o bien corresponda a un gen supresor. En general los genes supresores corresponden a tRNAs y los genes que los codifican son secuencias cortas de DNA. El tamaño del fragmento de DNA de *Neurospora* es lo suficientemente grande como para corresponder a un gen de tRNA. Además en tales genes es poco común que puedan ser expresados en una bacteria. De hecho genes que codifican algún tipo de tRNA de levadura (Petes et al, 1978) y de *Neurospora* (Selker et al, 1981) han sido clonados en *E. coli* sólo utilizando un tRNA como sonda radioactiva y no por expresión.

Transformación genética de *Neurospora crassa*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el gen determinante de la función expresada en *E. coli* también se expresa en el hongo. De hecho al transformar

una cepa portadora de una mutación en el gen *leu1* de *Neurospora* con el plásmido YRp74.2, se obtienen colonias transformantes del hongo. Esto indica que hay complementación. Como la cepa utilizada en estos experimentos carece de la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa, se corroboran los resultados obtenidos en la bacteria, en el sentido que también en el hongo el fragmento de DNA inserto en el plásmido YRp74.2 está supliendo dicha función alterada. La probabilidad que la mutación en *Neurospora* sea del mismo tipo que en la bacteria es muy baja, sobre todo si la mutación se ha conseguido por métodos distintos (Perkinss *et al*, 1982). Por lo tanto sugiere que el fragmento clonado es portador del gen *leu1*. Por otro lado, el resultado es importante puesto que es una prueba que confirma la identidad del gen *leu1*. De otra manera, habría sido muy difícil explicar que un gen de *Neurospora* no se exprese en el mismo organismo de donde proviene.

La determinación de la naturaleza de los transformantes debe realizarse por varios métodos. Uno de ellos es la complementación de una función defectiva, en este caso, de la mutación en la cepa *leu1⁻*, de *Neurospora*. Estas pruebas son muy importantes puesto que es la vía alternativa para clonar genes que no se expresan en bacterias. Otro método es la demostración de la presencia física del DNA dador en los transformantes a través de experimentos de hibridación con el DNA de tales transformantes. Esto apunta al hecho

que la adquisición de la prototrofia por las células receptoras podría deberse a reversión o a la presencia del DNA dador, en este caso, el plásmido YRp74.2. Los experimentos realizados en el presente trabajo indican que en los transformantes existe la presencia del plásmido portador del gen *leu1* de *Neurospora*. Además, pruebas posteriores, realizadas con aquellos transformantes en los cuales se ha detectado un patrón de hibridación claro demuestran la presencia de secuencias propias del vector YRp7. De hecho, cuando se realizó una hibridación del DNA de los transformantes L74.2 y L74.11 con YRp7 utilizado como sonda biotinilada, se detectó el mismo patrón de bandeo. Sin embargo no se observó ninguna evidencia de hibridación al DNA de la cepa *leu1*⁻ y del transformante L74.7 con YRp7 como sonda marcada. Estos resultados confirman el hecho que en aquellos transformantes, la capacidad de prototrofia adquirida después de los procedimientos de transformación se debe a la presencia del DNA plasmidial dador. La presencia de secuencias del vector de clonamiento (YRp7) en los transformantes, indica que es muy probable que el plásmido YRp74.2 se integrara entero en el genoma del hongo después de su ingreso a la célula. Además, el hecho que aparezcan 3 bandas de hibridación en uno de los transformantes, sugiere que en ese caso hubo al menos 2 eventos de integración. Tales eventos integrativos posiblemente ocurren en regiones de homología. Aunque no se puede descartar que ocurran en

otras regiones en las cuales exista poca o nada de homología.

El la actualidad la transformación en hongos está relativamente clara, principalmente en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, en *Neurospora* aún existen dudas referentes a este sistema. Los eventos que ocurren durante la transformación de *Neurospora* se han ido aclarando lentamente. De hecho se ha sugerido que en este organismo ocurren eventos de integración tanto en regiones de homología como en otras regiones dentro del genoma que no son homólogas (Mishra, 1976; Case et al, 1979; Wootton et al, 1980; Bull et al, 1984; Kim et al, 1988). En general, los tipos de integración se han estudiado por hibridación y por análisis genéticos clásicos mediante cruzamiento con las cepas adecuadas. Estos estudios han permitido tener un cuadro relativamente claro, y describen la mayoría de los eventos que pueden ocurrir con el DNA dador (Mishra, 1976; Case et al, 1979; Carú, 1987; Kim et al, 1988). El patrón de hibridación obtenido en el presente trabajo es suficiente para indicar los tipos de eventos principales que han ocurrido en las diferentes clases de transformantes. En los transformantes en que sólo aparece una banda de hibridación, representados por L74.7, cuando se utilizó como sonda marcada al plásmido YRp74.2, ha ocurrido integración solamente de secuencias de *Neurospora*. En este caso las secuencias pertenecientes al vector de clonado se pierden. Esto es fácilmente

demostrable ya que no aparece banda cuando se usa como sonda al vector YRp7. En este caso, está involucrado un evento de doble crossing over entre el genoma del huésped y la región fúngica del plásmido dador, correspondiendo a un típico caso de reemplazamiento de un fragmento por otro. En esta clase de transformantes, la progenie de un cruzamiento entre la cepa silvestre y el transformante dará un 100% de esporas de fenotipo silvestre (Carú, 1987). Por lo tanto el comportamiento genético de esta clase de transformantes es similar al comportamiento que mostraría una reversión génica.

En otra clase de transformantes, representados por L74.2, donde aparecen 3 bandas de hibridación cuando se utilizó YRp74.2 como sonda, es probable que ocurriera una inserción homóloga. En este caso, el evento de integración generalmente se lleva a cabo por una recombinación que involucra un solo crossing over entre el genoma del huésped y el plásmido dador, en un sitio de homología. Generalmente involucra a la región fúngica del plásmido en este proceso. Como resultado, hay una integración del plásmido completo, incluyendo las secuencias del vector de clonamiento (YRp7). Es evidente que en esta clase, se produce una duplicación de una parte del genoma del hongo. Además, en experimentos de hibridación deben aparecer fragmentos de restricción pertenecientes al vector de clonamiento. Esto ha quedado claramente evidenciado por la aparición de una banda de hibridación de 1.45 kb, que

corresponde al fragmento EcoRI de YRp7. Esta banda se detecta cuando se utiliza como sonda al plásmido YRp74.2 o al vector YRp7. El patrón de bandas de hibridación de este transformante se mantiene al utilizar al vector YRp7 como sonda marcada, esto es, aparecen las mismas tres bandas. De acuerdo a esto, es probable que realmente ocurriera una duplicación de parte de la secuencia dadora. En este caso también se da la posibilidad que parte del plásmido híbrido dador se hubiese insertado en otra región del genoma de *Neurospora* generando la aparición de la tercera banda. Este fenómeno ya ha sido descrito en otros casos de transformación (Paietta *et al*, 1985; Kim *et al*, 1988).

El transformante L74.11 es un representante de otra clase, en la cual, tanto con el plásmido YRp74.2 o con el vector de clonamiento (YRp7) se observa un patrón de bandeo similar. En ambos casos es evidente la presencia de la banda de DNA que corresponde al fragmento EcoRI de 1.45 kb. Como se ha mencionado antes, dicho fragmento corresponde al segmento de 1.45 kb de DNA de *S. cerevisiae*, en el cual se encuentra el gen *TRP1* y el ARS1 (Tschumper *et al*, 1980). Este resultado indudablemente indica que el plásmido dador se ha integrado completamente.

Los datos recién discutidos sugieren que en aquellos clones que han adquirido prototrofia para leucina, ha ocurrido transformación genética. Al menos está claro que

el DNA dador está presente en esos clones y por lo tanto descarta un evento del tipo reversión.

En general la transformación genética en *Neurospora* ocurre en baja frecuencia ya sea que se use DNA lineal o plasmidial (Mishra, 1976; Carú, 1987). A pesar de ello, es una prueba importante de realizar cuando se ha clonado una secuencia de DNA en la cual se supone la presencia de un gen. El comportamiento genético dependerá de la clase de evento de transformación que haya ocurrido. De hecho en cualquiera de los casos, se producirá heterocariosis, principalmente debido al número variable de núcleos presentes en los conidios que serán transformados. Este fenómeno puede ser la explicación del alto número de transformantes abortivos que se producen en el hongo. Cuando se transforma *Neurospora* con un DNA clonado en un plásmido, la frecuencia de transformación aumenta, indudablemente porque se está tratando con un alto número de copias exactas de la misma molécula. Sin embargo el destino final de el DNA dador dependerá de los eventos que ocurran después de la integración de éste. En general se tiende a pensar que en aquellos casos en que la integración ocurrió en regiones no homólogas al gen, resultará en la posterior pérdida de parte o todo el DNA dador. Este fenómeno, llevará a una disminución del número de transformantes reales.

Es evidente que de todos los estudios realizados con *Neurospora crassa*, emerge una necesidad común que está en

relación directa con la disponibilidad de vectores extracromosómicos, que transformen con alta frecuencia y que puedan ser rescatados posteriormente.

PROYECCIONES.

En el presente trabajo, se ha diseñado un procedimiento que permite clonar genes de *Neurospora*, basado principalmente en la cercanía filogenética de *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema de transformación de levadura entrega una oportunidad excelente para el clonado molecular de genes o secuencias que no pueden ser seleccionados por complementación en *Escherichia coli*. Por otra parte, permite también el clonamiento en la bacteria *E. coli*. En terminos generales, los objetivos planteados inicialmente se han cumplido, pues aparte de permitir clonar el gen *leu1* del hongo ha permitido analizar secuencias del tipo ARS de *Neurospora* en levadura. Además, la genoteca de *Neurospora crassa* en YRp7 podría ser utilizada para intentar clonar una secuencia de DNA con funciones centroméricas en levadura. De hecho, el disponer del gen *leu1*, ubicado en el brazo izquierdo del cromosoma III, facilitará la búsqueda del centromero de dicho cromosoma mediante un paseo cromosómico hasta el gen *acr2*, ubicado a la derecha del centromero y estrechamente ligado a este, en el mismo cromosoma. A pesar de esto, se debe tener en cuenta que existen diferencias entre ambos hongos, las que en algunos casos han impedido la expresión de algunos genes. Es así, como los genes *LEU2*, *HIS3*, *URA3* y *TRP1* de *Saccharomyces cerevisiae*, no complementan mutaciones comparables de

Neurospora crassa. Sin embargo, se ha observado que un intrón de *Neurospora* es procesado en levadura (Woudt et al, 1985) y posteriormente se ha llegado a clonar el gen *inv* de *Neurospora* por expresión en levadura (Carú, 1987). Esto, viene a constituir una demostración de la funcionalidad del sistema desarrollado y permitirá en el futuro, disponer de un número apropiado de genes o secuencias de DNA de *Neurospora* necesarios para profundizar el conocimiento de la organización genética de dicho hongo.

El establecimiento de un sistema de transferencia de genes en forma intergenérica entre *Neurospora* y *Saccharomyces cerevisiae* podría llegar a ser una buena alternativa para el estudio de secuencias de DNA de otros organismos eucariontes.

Apendice Nº 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 minimo Vogel-Bonner 25X

MgSO ₄	5.0 g/lt
Acido citrico 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

Para usar como medio mínimo, se debe diluir a 1X

3.- Medio minimo MMPT

Vogel-Bonner 1X suplementado con:

Glucosa	0.5 %
L-Prolina	0.5 mM
L-Treonina	0.3 mM
Vitamina B1	0.32 mM

4.- 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

5.- Solución "stock" de Elementos trazas

Acido 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 ₂₅	0.50 g/lt
ZnSO ₄	50.00 g/lt
FeCl ₃ x 6H ₂ O	10.00 g/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.	

6.- Medio mínimo SD

Base de nitrogeno para levadura	6.7 g/lt
glucosa	20.0 g/lt
aminoácidos 1%	5.0 ml
Sulfato de amonio	5.0 g/lt

7.- Agar de regeneración

Base de nitrogeno para levadura	6.7 g/lt
Sulfato de amonio	5.0 g/lt
Glucosa	20.0 g/lt
Aminoácidos 1%	5.0 ml/lt
Sorbitol	182.0 g/lt
Agar	20.0 g/lt

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

APENDICE Nº 2

Desproteínización con fenol

Preparación del fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1

Se fundió el fenol a 60°C y se agregó 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 1%. El fenol fundido se saturó con una solución de Tris 100 mM pH 8 y 0.2% de β -mercaptoetanol. Esto se logró a través de repetidas extracciones con dicha solución, hasta que el pH de la fase acuosa fue superior a 7.5. Luego el fenol saturado se mezcló con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y finalmente se guardó a 4°C.

Desproteínización

Un volumen de solución acuosa de DNA fue mezclado con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla fue agitada durante 1 minuto en vortex y luego centrifugada en microfuga Eppendorf durante 1 minuto. La fase acuosa (superior), fue colectada en un tubo limpio y mezclada con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La mezcla fue agitada durante 30 segundos y luego centrifugada en una microfuga Eppendorf durante 30 segundos. La fase acuosa (superior), fue colectada en un tubo Eppendorf limpio.

APENDICE Nº 3

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

Nº fragmento	Tamaño Molecular (kb)	Peso Molecular Megadalton
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

APENDICE Nº 4

Soluciones empleadas en marcación de DNA mediante "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

1.- Tampón de pre-Nick 10X

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

Soluciones para marcación con biotina

- 3.- A1 solución de nucleótidos no marcados a 0.2 mM en tampón Tris-HCl 500 mM pH 7.8, MgCl₂ 50 mM, 2-mercaptoetanol 100 mM, BSA 100 μ g/ml
- 4.- B 5 μ g de DNA de lambda en EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 120 mM
Esta solución solo se usa como control interno para cuantificar el DNA.
- 5.- C Solución de Bionick:
DNA polimerasa I de *E. coli* a 0.4 unidades/ μ l, DNasa I a 40 pg/ μ l, en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Acetato de Mg 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0.1 mM, 50% glicerol y BSA 100 μ g/ml.
- 6.- D Tampón de termino: EDTA 250 mM pH 8
- 7.- E Agua destilada esteril

APENDICE Nº 5

Soluciones empleadas en hibridación DNA:DNA

1.- Solución de Prehibridación

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

2.- Solución de hibridación

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

Para los casos en que se utilizó DNA biotinilado como sonda, la concentración de formamida fue bajada a 45% en ambas soluciones.

3.- SSC 20X

NaCl	175 g/lt
Citrato de sodio	88.2 g/lt
Ajustar a pH 7.0 con NaOH 2 N	

4.- Denhardt 50X

Ficoll	1%
PVP	1%
BSA (fracción V)	1%

5.- Biotin(AP): Fosfatasa de intestino de ternera biotinilada a 1 mg/ml en: NaCl 3 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 30 mM, trietanolamina 30 mM pH 7.6

6.- Tampón 1: Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2mM, Triton X-100 0.05% (v/v)

- 7.- Tampón 2: BSA 3% (w/v) en Tampón 1
- 8.- Tampón 3: Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM,
MgCl₂ 50 mM
- 9.- NBT: Nitro-blue tetrazolium a 75 mg/ml en
dimetilformamida al 70%
- 10.- BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato a 50
mg/ml en dimetilformamida

REFERENCIAS

- Alton, N.; Hautala, A.; Giles, N.H.; Kushner, R. y Vapnek, D.. 1978.
Transcription and translation in *E. coli* of a hybrid plasmid containing the catabolic dehydroquinase gene from *Neurospora crassa*. *Gene* 4: 241-259.
- Amaleo, D.. 1980.
Reporter on the tenth *Neurospora* information conference. *Neurospora Newlett* 27: 10.
- Appleyard, R.K.. 1954.
Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39: 440-444.
- Arndt, K.T.; Styles, C. y Fink, G.R.. 1987.
Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. *Science* 237: 874-880.
- Balbas, P.; Soberon, X.; Merino, E.; Zurita, M.; Lomeli, H.; Valle, F.; Flores, N. and Bolivar F.. 1986.
Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives: a review. *Gene* 50: 3-40.
- Barrat, R.W. y Rimbey, R.L.. 1980.
Neurospora stock list. *Neurospora Newslett.* 29: 45-106.
- Beach, D.; Piper, M. y Shall, S.. 1980.
Isolation of chromosomal origins of replication in yeast. *Nature(London)* 284: 185-187.
- Beggs, J.D.. 1978.
Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature(London)* 275: 104-109.
- Beggs, J.D.; VandenBerg, J.; VanDoyen, A. y Weissman, C.. 1980.
Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature(London)*. 283: 835-840.
- Birboim, H.C. y Doly, J.. 1979.
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7: 1513-1523.
- Bolivar, F.; Rodriguez, R.L.; Betlach, M.C. and Boyer, H.W.. 1977.
Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2: 75-93.

Bolivar, F.; Rodriguez, R.; Greene, P.J.; Betlach, M.; Heyneker, H.L.; Boyer, H.W.; Crosa, J. and Falkow, S.. 1977.

Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene* **2**: 95-113.

Botstein, D.; Falco, S.C.; Stewart, S.E.; Brennan, M.; Scherer, S.; Stinchcomb, D.T.; Struhl, K. y Davis, R.W.. 1979.
Sterile host yeast (SHY): a eucariotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17-24.

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.; Strathern, J.N. y Hicks, J.B.. 1979.
Transformation in yeast: Development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN* gene. *Gene* **8**: 121-133.

Broach, J.R. e Hicks, J.B.. 1980.
Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell* **21**: 501-508.

Bull, J.H. y Wootton, J.C.. 1984.
Heavily methylated amplified DNA in transformants of *Neurospora crassa*. *Nature*(London) **307**: 701-704.

Burke, D.T.; Carle, G.F. y Olson, V.. 1987.
Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**: 806-812.

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

Buxton, F.P. y Radford, A.. 1983b.
Cloning of the *Pyr-4* gene of *Neurospora crassa*. *Heredity* **50**: 210-211.

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

Cameron, J.R.; Loh, E.Y. y Davis, R.W.. 1979.
Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* **16**: 739-751.

- Carú, M.. 1987.
Clonamiento y transformación genética en *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en biología. Universidad de Chile. 153 pp.
- Case, M.E.; Schweizer, E.; Kushner, R. y Giles, N.H.. 1979.
Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5259-5263.
- Chan, C.S.M. y Tye, B.. 1980.
Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 6329-6333.
- Chan, C.S.M. y Tye, B.. 1983.
Organization of DNA sequences and replication origins at yeast centromeres. Cell 33: 563-573.
- Clancy, N.; Mann, C.; Davis, R.W. y Calos, M.P.. 1984.
Deletion of plasmid sequences during *Saccharomyces cerevisiae* transformation. J. Bacteriol. 159: 1065-1067.
- Clarke, L. y Carbon, J.. 1976.
A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Cell 9: 91-99.
- Clarke, L. y Carbon, J.. 1980a.
Isolation of yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature(London) 287: 504-509.
- Clarke, L. y Carbon, J.. 1980b.
Isolation of the centromere linked *CDC10* gene by complementation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2173-2177.
- Clarke, L. y Carbon, J.. 1983.
Genomic substitution of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature(London) 305: 23-28.
- Clewell, D. y Helinsky, 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.N.; Chang, A.C.Y. and Hsu, L.. 1972.
Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-Factor DNA. P.N.A.S. 69: 2110-2114.

- Cohen, J.D.; Eccleshall, T.R.; Needleman, R.B.; Fedoroff, B.A. y Marmur, J.. 1980.
Functional expression in yeast at the *Escherichia coli* plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1078-1082.
- Dani, G.M. y Zakian, V.A.. 1983.
Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3406-3410.
- 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.
- Eibel, H. y Philippsen, P.. 1984.
Preferential integration of yeast transposable element Ty into a promoter region. Nature (London) 307: 386-388.
- Falco, S.C.; y Botstein, D.. 1983.
A rapid chromosome-mapping method for cloned DNA fragments of yeast DNA. Genetics 105: 857-872.
- Gerbaud, C.; Fournier, H.; Blanc, H.; Aigle, M.; Heslot, H. y Guerinneau, M.. 1979.
High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2 μ m yeast plasmid. Gene 5: 233-253.
- Gross, S.R.. 1965.
The regulation of synthesis of the leucine biosynthetic enzymes of *Neurospora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 54: 1538-1546.
- Gross, S.R.. 1969.
Genetic regulatory mechanisms in the fungi. Ann. Rev. Genet. 3: 395-424.
- Hautala, J.A.; Conner, B.H.; Jacobson, J.W.; Patel, G.C. y Giles, N.H.. 1977.
Isolation and characterization of nuclei from *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 130: 704-713.
- Henikoff, S.; Tachell, B.; Hall, D. y Nasmyth, A.. 1981.
Isolation of a gene from *Drosophila* by complementation in yeast. Nature (London) 289: 33-37.
- Henikoff, S. y Furlong, C.E.. 1983.
Sequence of a *Drosophila* DNA segment that functions in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by a yeast promoter. Nucleic Acids Res. 11: 789-800.

- Hicks, J.; Hinnen, A. y Fink, G.R.. 1979.
Properties of yeast transformation. Cold. Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 43: 1305-1313.
- Hinnen, A.; Hicks, J.B. y Fink, G.R.. 1978.
Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 1929-1933.
- Hitzeman, R.A.; Hogle, 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(London). 293: 717-720.
- Hsiao, C.L. y Carbon, J.. 1979.
High frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned ARG4 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 3829-3833.
- Huiet, L.. 1984.
Molecular analysis of the *Neurospora* qa-1 regulatory region indicates that two interacting genes control qa gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 1179-1178.
- Jiménez, A. y Davis, J.. 1980.
Expression of a transposable antibiotic resistant element in *Saccharomyces*. Nature (London) 287: 869-871.
- 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. Biochem. 16: 4217-4225.
- Kashimiri, S.V.S. y Gross, S.R.. 1970.
Mutations affecting the regulation of production of the enzymes of leucine synthesis in *Neurospora*. Genetics 64: 423-492.
- Kawamura, K.; Takagi, M. y Yano, K.. 1983.
Cloning of a LEU gene and an ARS site of *Candida maltosa*. Gene 24: 157-162.
- Keesey, J.K. y DeMoss, J.A.. 1982.
Cloning of the trp1 gene from *Neurospora crassa* by complementation of a trpC mutation in *E. coli*. J. Bacteriol. 152: 954-958.
- Kim, S.Y. y Marzluf, G.A.. 1988.
Transformation of *Neurospora crassa* with the trp-1 gene and the effect of host strain upon the fate of the transforming DNA. Curr. Genet. 13: 65-70.

- Kingsman, A.J.; Gimlich, R.L.; Clarke, L.; Chinault, A.C. y Carbon, J.. 1981.
Sequence variation in dispersed repetitive sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 145: 609-632.
- Kramer, R.A.; Cameron, J.R. and Davis, R.W.. 1976.
Isolation of bacteriophage λ containing yeast ribosomal RNA genes: Screening by *in situ* hybridization to plaques. Cell 8: 227-232.
- Langridge, J.; Langridge, P. y Bergquist, P.L.. 1980.
Extraction of nucleic acids from agarose gels. Anal. Biochem. 103: 264-271.
- Letts, V.A.; Klig, L.S.; Baelee, M.; Carman, G.M. y Henry, S.. 1983.
Isolation of the structural gene for the membrane-associated enzyme phosphatidylserine synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7279-7283.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (Eds.) 1982.
Molecular cloning. A laboratory manual. Cold, Spring Harbor Laboratory. CSHL, New York.
- Martinez-Arias, A.; Yost, H.J. y Casadaban, M.J.. 1984.
Role of an upstream regulatory element in leucine repression of the *Saccharomyces cerevisiae* *leu2* gene. Nature(London) 307: 740-742.
- Mishra, N.C.. 1976.
Episome-like behavior of donor DNA in transformed strains of *Neurospora*. Genet. Res. 29: 9-19.
- Moir, D.T. y Dumais, D.R.. 1987.
Glycosylation and secretion of human alpha-1-antitrypsin by yeast. Gene 56: 209-217.
- Mortimer, R.K. y Schild, D.. 1980.
The genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. in Genetic Maps. O.Brien, S.J. Editor. NIH, Bethesda, Maryland.
- Murray, A.W. y Szostak, J.W.. 1983.
Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature(London) 305: 189-193.
- Olshan, A.R. y Gross, S.R.. 1974.
Role of the *leu-3* cistron in the regulation of the synthesis of isoleucine and valine biosynthetic enzymes of *Neurospora*. J. Bacteriol. 118: 374-384.
- Paietta, J.V. y Marzluf, G.A.. 1985.
Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. Curr. Genet. 9: 383-388.

- Perkins, D.D.; Radford, A.; Newmeyer, D. and Björkman, M.. 1982.
Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. Microbiol. Rev. 46: 426-470.
- Petes, T.D.; Broach, J.R.; Wensink, P.C.; Hereford, L.M.; Fink, G.R. y Botstein, D.. 1978.
Isolation and analysis of recombinant DNA molecules containing yeast DNA. Gene 4: 37-49.
- Polacco, J. y Gross, S.R.. 1973.
The product of the *leu-3* cistron as a regulatory element for the production of the leucine biosynthetic enzymes of *Neurospora*. Genetics 74: 443-459.
- Ratzkin, B. y Carbon, J.. 1977.
Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 487-491.
- Reichenbecher, V.E.; Fischer, M. y Gross, S.R.. 1978.
Regulation of isopropylmalate isomerase synthesis in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 133: 794-801.
- 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.
- Rose, M.; Casadaban, M.J. y Botstein, D.. 1981.
Yeast genes fused to β -galactosidase in *E. coli* can be expressed normally in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2460-2464.
- Royer, H.D. y Hollenberg, C.P.. 1977.
Saccharomyces 2 μ m DNA. An analysis of monomer and its multimers by electron microscopy. Mol. Gen. Genet. 155: 271-284.
- Scherer, S. y Davis, R.W.. 1979.
Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4951-4955.
- Scherer, S. y Davis, R.. 1980.
Recombination of dispersed repeated DNA sequences in yeast. Science 209: 1380-1384.

Schweizer, M.; Case, M.E.; Dyktra, C.C.; Giles, N.H. and Kushner, S.R.. 1981a.

Cloning the quinic acid (Qa) gene cluster from *Neurospora crassa*: Identification of recombinant plasmids containing both qa-2⁺ and qa-3⁺. Gene 14: 23-32.

Schweizer, M.; Case, M.E.; Dyktra, C.C.; Giles, N.H. and Kushner, S.R.. 1981b.

Identification and characterization of recombinant plasmids carrying the complete Qa gene cluster from *Neurospora crassa* including the qa-1⁺ regulatory gene. P.N.A.S. 78: 5086-5090.

Schechtman, M.G. y Yanoffky, C.. 1983.

Structure of a trifunctional *trp-1* gene from *Neurospora crassa* and its aberrant expression in *Escherichia coli*. J. Mol. Appl. Genet. 2: 83-99.

Smarrelli, J. and Garrett, R.H.. 1982.

Isolation of *Neurospora crassa* 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. and Davis, R.W.. 1979.

Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature 282: 39-41.

Stinchcomb, D.T.; Thomas, M.; Kelly, J.; Selker, E. y Davis, R.W.. 1980.

Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4559-4563.

Stohl, L.L.; Collins, R.A.; Cole, M.D. y Lambowitz, A.M.. 1982.

Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains. Nucleic 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: 1958-1062.

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. y Davis, R.W.. 1977.

- Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: Cloning and expression of yeast structural gene for imidazoleglycerol phosphate dehydratase (*his3*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5255-5259.
- Struhl, K.; Stinchcomb, D.; Scherer, S. y Davis, R.. 1979. High frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1035-1039.
- Suzci, A. y Radford, A.. 1983. ARS8 sequences in the *Neurospora* genome. *Neurospora Newlett* 30: 13.
- Szostak, J. W. y Blackburn, E. H.. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255.
- Toh-e, A. y Wickner, R. B.. 1981. Curing of the 2μ DNA plasmid from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 145: 1421-1424.
- Tschumper, G. y Carbon, J.. 1980. Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and *TRP1* gene. *Gene* 10: 157-166.
- Van Solingen, P. and Van Der Plaats, J. B.. 1977. Fusion of yeast spheroplasts. J. of Bacteriol. 130: 946-947.
- Vapnek, D.; Hautala, J. A.; Jacobson, J. W.; Giles, N. H. y Kushner, S. R.. 1977. Expression in *E. coli* K-12 of structural gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3508-3512.
- Vapnek, D. y Case, M.. 1981. Gene cloning in *Neurospora crassa*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96: 97-100.
- Vogel, H. y Bonner, D.. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218: 97-106.
- Vogel, H. J.. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbiol. Genet. Bull. 13: 42-43.
- Williams, B. G. y Blattner, F. R.. 1980. Bacteriophage λ vectors for DNA cloning. Genetics Engineering (ed. J. K. Setlow y A. Hollander) vol 2 p.201. Plenum Press, New York.

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

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

Yeh, E.; Carbon, J. y Bloom, K.. 1986.
Tightly centromere-linked gene (*SPO15*) essential for meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 158-167.

Yoder, O.C.. 1979.
Experience with the Applegate-Nelson-Metzemberg method of mutant enrichment in high sorbose medium. *Neurospora Newsletter* 26: 23-24.