

## El ADN, clave de la vida, antes y después de la doble hélice\*

Raúl N. Ondarza\*\*

### Introducción

Este año se cumple el XL aniversario del descubrimiento de la estructura tridimensional del ácido desoxirribonucleicoo ADN. Este material fue descubierto por Frederich Mischer en 1869 a partir de leucocitos humanos y se le llamó originalmente "nucleína". Más tarde en 1928 Griffith logró transformar *in vivo* un tipo de neumoco no patógeno en patógeno y finalmente Avery y colaboradores mediante experimentos *in vitro* establecieron el hecho de que la capacidad transformante se debe al ácido nucleico.

Estos grandes logros de la ciencia tienen antecedentes y consecuencias que vamos a analizar y que hemos señalado como: antes y después de la doble hélice.

En primer lugar, debemos definir a la biología molecular para después explicar cómo nació esta ciencia.

### ¿Qué es la biología molecular?

De acuerdo a Francis Crick,<sup>1</sup> es un término ambiguo que se emplea en dos diferentes formas: la primera en un sentido muy general, que puede aplicarse a cualquier cosa, como puede ser el entender algún problema biológico a nivel atómico o molecular; la segunda forma es más clásica, aunque es más estrecha y se refiere a las moléculas

biológicas de gran peso molecular, tales como los ácidos nucleicos y las proteínas. En un sentido biológico, esto significa "replicación" y "expresión" de genes, es decir, los genes y sus productos. En pocas palabras, un tema de la biología molecular del primer tipo, es el fenómeno de la contracción muscular que comprende las estructuras moleculares y un ejemplo del segundo tipo, es la replicación del ácido nucleico y la síntesis de proteínas.

El científico Crick, ofreció además una observación importante entre las muchas que ha dado a la biología moderna, y es que la "simplicidad" y la "universalidad" de los mecanismos básicos que operan en la biología, han permitido el avance espectacular de la biología molecular, sobre todo en el sentido clásico del término.

Una parte de la biología molecular se orienta hacia el campo de la física y de la química, y otra trae los fenómenos biológicos hacia las bases moleculares, pero cuando se dirige a entender a los mecanismos multicelulares como el hombre, entonces se enfrenta a los problemas del desarrollo, como la embriología y la diferenciación celular de órganos y tejidos, lo que implica un sinnúmero de problemas.

La biología molecular tuvo sus orígenes en dos escuelas: una estructural y tridimensional, constituida fundamentalmente por los británicos que trabajaban la cristalografía de rayos X, además de Linus Pauling, químico americano y la otra escuela

\* El material utilizado para esta conferencia forma parte del libro "Biología Molecular; antes y después de la doble hélice" Presentada el 14 de octubre de 1993

\*\* Profesor titular de Bioquímica Facultad de Medicina UNAM.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Raúl N. Ondarza. Director General del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad No. 655, Santa María Ahucatlán, 62508, Cuernavaca, Morelos

la, la de la genética, unidimensional, formada en gran parte por los americanos, del grupo de los fagos. Sin embargo, la escuela francesa de la biología molecular, también prosperó en esos días y se caracterizó por el uso de la genética microbiana para probar un tipo diferente de problema, que es un paso conceptual más allá de la expresión de la información del gene y que es la regulación y la interacción de los sucesos que determina el gene. Los trabajos de Jacob y Monod fueron los que dieron las ideas esenciales sobre los mecanismos de control celular.

## ¿Cómo nació la biología molecular?

Para algunas ciencias, cuando se plantea ésta pregunta, no se encuentra una respuesta totalmente satisfactoria, pero en el caso de la biología molecular, por ser una disciplina muy joven, desde ahora se dispone de documentos y estudios que permiten trazar un panorama, aunque no completo, que facilita la ubicación de los procesos que se llevaron a cabo para la práctica científica de esta disciplina.

En realidad, la biología molecular como otras ciencias, es rica en paradojas e incertidumbres, y aunque no es lineal, ya en lo particular es muy obvio que no nació de un coqueteo entre la física y la química, sino más bien del entrecruzamiento complicado de ideas y de investigaciones extremadamente diversas.

Según Mullins,<sup>2</sup> (citado por Pierre Thuillier del libro: *La Recherche en Biología Molecular*, 1975), es posible distinguir las diversas etapas por las que pasa la biología molecular a partir del "Grupo de los Fagos", formado por Max Delbrick y Salvador Luria a finales de los treinta hasta la institucionalización oficial de la biología molecular; para 1962, este autor distingue tres grandes períodos:

1. El período romántico, que comienza hacia 1935 con las primeras reflexiones de Delbruck sobre la genética, con las que intenta explicar la dualidad, la estabilidad y el cambio del gene.
2. El período dogmático, que va desde 1953 hasta 1963 aproximadamente y que fue dominado por los trabajos de James Watson y

Francis Crick,<sup>3,4</sup> al establecer la estructura de doble hélice y al enunciar el dogma central sobre las funciones del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

En este período Francois Jacob y Jacques Monod<sup>5</sup> amplían su teoría con los trabajos sobre el represor, el ácido ribonucleico mensajero y el operón, lo que según Stent, viene a ser la gran extensión del dogma durante este decenio.

3. Finalmente viene un período académico a partir de 1963, que corresponde a la estabilización de este campo de investigación.

En la primera fase del período romántico, está el grupo de los fagos o del "paradigma", en donde la figura principal es Max Delbruck, un físico para quien la biología ofrecía a los investigadores problemas nuevos e interesantes.

Durante la segunda fase del período romántico, el problema clave, de acuerdo a Delbruck,<sup>6</sup> consiste en saber "cómo la materia viva puede registrar y perpetuar su experiencia".

Aunque se piensa y se acepta que Max Delbruck era el centro del período romántico y del "grupo de los fagos", tal vez resulte una aseveración arbitraria, puesto que no fue ni el primer intento ni el único por alcanzar una respuesta a las preguntas que se hicieran Erwin Schrodinger y otros que veremos más adelante: también había bioquímicos como Chargaff, genetistas como Sturtevant, especialistas en química estructural como Linus Pauling, o de cristalografía de los rayos X, como Perutz y Kendrew, quienes intentaban determinar la estructura y la función de las macromoléculas con información biológica; aunque esto no impide que Delbruck sea especialmente importante, pues había expuesto los problemas en términos nuevos.

El segundo período consiste en definir la naturaleza del grupo; durante este período dogmático se define una conciencia común, ya que los miembros del grupo se dan cuenta claramente de su situación y de la especificidad de sus investigaciones. Después del trabajo fundamental de Watson y Crick sobre la doble hélice que aparece en la revista *Nature* en 1953, se propone el "dogma central" (Crick, 1958),<sup>7</sup> es decir, que la información genética es transmitida desde los ácidos nucleicos

a las proteínas y nunca en el sentido inverso, es decir (DNA-RNA-Proteína). Todos los trabajos hasta 1962 sirvieron para precisar y confirmar este dogma. Sin embargo, como veremos más adelante con el descubrimiento de la enzima "transcriptasa reversa", este dogma tiene que ser modificado.

Erwin Schrodinger. La contribución de la física a la biología

Vale la pena detenernos por unos momentos sobre otro gran personaje que contribuyó en forma radical al nacimiento de la biología molecular, se trata del físico Erwin Schrodinger, quien en febrero de 1943, dió una serie de conferencias en el Trinity College en Dublin, a la que asistieron alrededor de 400 personas. Estas conferencias fueron publicadas por la Cambridge University Press en 1944, como un pequeño libro que lleva el título ¿Qué es la vida?<sup>8</sup>

Las preguntas básicas que Schrodinger hace, son las siguientes:

La primera es de tipo general:

1. 'Cómo pueden los sucesos que toman lugar<sup>2</sup> dentro del ámbito espacial y en el tiempo de un organismo vivo, ser explicados por la física y la química.

En resumen, este autor da la siguiente respuesta preliminar:

"La obvia incapacidad de la física y de la química de ahora para explicar dichos sucesos, no es razón para dudar de que éstos pueden ser explicados por estas ciencias".

Enseguida se plantea las siguientes preguntas específicas:

2. ¿Cuál es la estructura física de las moléculas que se duplican cuando se dividen los cromosomas?
3. ¿Cuál es el proceso de duplicación que debe comprenderse?
4. ¿Cómo estas moléculas retienen su individualidad de generación en generación?
5. 'Cómo logran controlar el metabolismo de las células?

6. 'Cómo crean la organización que es visible en la estructura y función de los organismos superiores?

Este autor no contestó estas preguntas, pero al plantearlas puso en movimiento a la biología por largo de un camino que condujo a la época de los descubrimientos durante los siguientes 50 años;<sup>9</sup>

- a) el descubrimiento de la doble hélice y la clave en triadas,
- b) el análisis preciso y la síntesis completa de los genes Y,
- c) la medición cuantitativa de la divergencia evolutiva de las especies.

En esta conferencia desafortunadamente no contamos con el tiempo suficiente para reclamos a todos los descubrimientos que se han realizado en este periodo (de aproximadamente 40 años), después de la fecha en que fue publicado el trabajo de Watson y Crick sobre la doble hélice del ADN, como por ejemplo, la ADN polimerasa y la ARN polimerasa, el desciframiento de la clave genética, los ácidos ribonucleicos de transferencia, los diversos tipos de enzimas, como la ligasa, enzimas de restricción, transcriptasa reversa, intrones, exones, señales de iniciación, etc.

Sin embargo, daremos algunos datos interesantes en importantes sobre estos logros y sus repercusiones.

### Watson y Crick y la estructura del gene

El descubrimiento de la doble hélice como una estructura tridimensional para la molécula del ácido desoxirribonucleico, nació gracias a la asociación entre el biólogo americano James Dewey Watson y el físico inglés Francis Harry Compton Crick, quienes se conocieron en Cambridge en el año de 1951. Watson era un estudiante de Salvador Luria en la Universidad de Indiana y tenía desde un principio un gran interés por conocer cuál era la estructura del gene. Tanto Crick como Watson habían sido influenciados por el libro ¿Qué es la vida? del físico Erwin Schrodinger, quien popularizaba la genética, vista desde la perspectiva de un físico.

Aunque Crick todavía estaba trabajando en un proyecto de tesis para obtener su grado, referente a la estructura de la molécula de hemoglobina, tomó la oportunidad de trabajar con Watson y enseñarle algo del análisis de difracción de rayos X de las moléculas.

Cuando Watson se unió a Crick para estudiar la cristalografía de rayos X del ácido desoxirribonucleico, Watson no estaba todavía realmente preparado para tal proyecto. Sin embargo, Watson estaba tan interesado en la biología molecular, que aprendió rápidamente y pudo confrontar los problemas complejos.

La asociación de Watson con Crick resultó ser muy fructífera. Aunque al principio tuvieron falsos avances, poco después, en 1953, propusieron la estructura de doble hélice del ADN formada de dos cadenas complementarias de nucleótidos, cada una orientada en dirección opuesta. Esto se basó en su interpretación de fotografías sobre la difracción de rayos X que pudieron preparar en forma independiente de Maurice Wilkins.

La complementariedad era altamente específica: el apareamiento de la adenina (purina) con la timina (pirimidina) y de la guanina (purina) con la citosina (pirimidina), resultó ser correcta. Esta estructura de cadena doble, la localización interna de las bases y la organización helicoidal fueron infiriendo los patrones de difracción de rayos X en las fotografías.

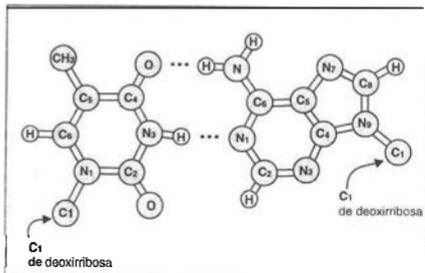


Figura 2a. Modelo de un par de bases Adenina-Timina unidas por dos puentes de hidrógeno.

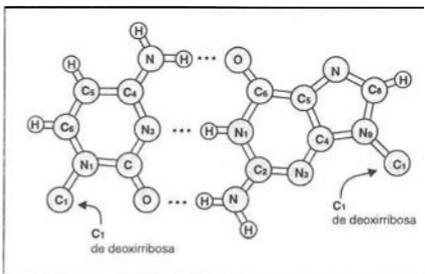


Figura 2b. Modelo de un par de bases Guanina-Citosina unidas por tres puentes de hidrógeno.

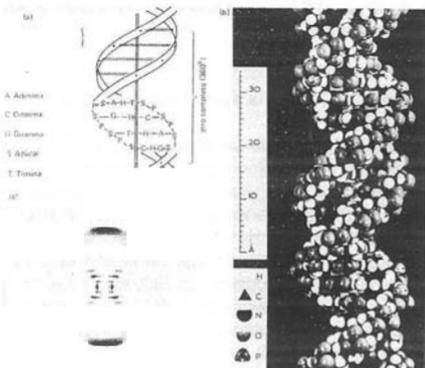


Figura 1 a) Modelo simplificado de la doble hélice del DNA forma B según la hipótesis de Watson y Crick. b) Modelo molecular del DNA de doble hélice. c) Patrón de difracción de rayos X del DNA-B, en forma semicristalina (Cortesía del profesor M. H. F. Wilkins, King's College, University of London).

El principio de pares de bases complementarias, sin embargo, no se derivó de la cristalografía de rayos X, sino de la fortuna de que Watson infirió la estructura física de las bases individuales, y lo confirmó haciendo un modelo de cartón y metal con representaciones de las piezas juntas. Basados en estos enfoques, las secuencias de las bases que ellos reconocían, podían ser no repe-

tivas (aperiódicas) y esto fue una implicación biológica popularizada previamente por Schrödinger, quien se refería a los genes como "cristales aperiódicos".

El modelo de doble hélice del ADN permitió a los genetistas, interpretar la replicación del gene y la duplicación de los cromosomas a un nivel molecular. también implicaba que las mutaciones se podían originar por cambios en la secuencia de las bases dentro de un gene, al copiarse errores o por otros mecanismos.

Estos investigadores no propusieron ninguna forma específica por la cual la información que estaba cifrada en los genes (el ADN), podía ser químicamente pasada adentro de la célula o para producir los productos de estos genes. A pesar de ello, el modelo de la doble hélice del ADN tuvo como gran contribución, el influenciar profundamente y estimular lo siguiente:

- a) el interés en la clave genética
- b) la expansión de la duplicación genética a procariones y eucariotes y:
- c) el papel de los genes para producir sus productos.

Las consecuencias de este descubrimiento son abrumadoras. El modelo del ácido desoxirribonucleico le satisfizo a muchos otros genetistas como a Muller, quien siempre había creído en la relación de la estructura química y física del gene. La doble hélice se convirtió en la base del enfoque molecular para una serie de ideas y experimentos de las ciencias de la vida.

### Teoría del operón

Sobre el surgimiento de la teoría del operón, Jacob dejó un relato originado por el hecho de que los laboratorios de Lwoff y Monod, en el Instituto Pasteur, estaban localizados en extremos opuestos, en el mismo corredor, y que su propio laboratorio localizado entre los dos, funcionaba como el sitio para el té de las cuatro de la tarde.

El usaba esta analogía del plan de piso, para describir sus contribuciones a sus aparentemente diferentes trabajos como una rápida visión que tuvo en 1958 que en sus situaciones disparadas,

ambos trabajaban sobre manifestaciones de los mismos mecanismos genéticos.

Jacob se percató de que cada fenómeno, la inducción del profago de Lwoff y la estimulación de la producción de la enzima por Monod, eran ambos el resultado de la expresión de un gene por la eliminación de un represor.

Esa perspectiva condujo a la elegante "teoría del operón", del "control genético" y del "ARN mensajero".<sup>5</sup> Esencialmente esta teoría sostiene que la elaboración de una enzima o proteína es "encendida", cuando una sustancia represora es eliminada de un sitio que controla el operador: por lo tanto, se dispara la transcripción de la clave del ADN en ARN que usa el mensaje para construir la proteína. Cinco años más tarde, en 1965, compartió el premio Nobel, por este trabajo, con André Lwoff y Jacques Monod, por sus contribuciones a la "regulación genética de la síntesis de enzimas y virus".

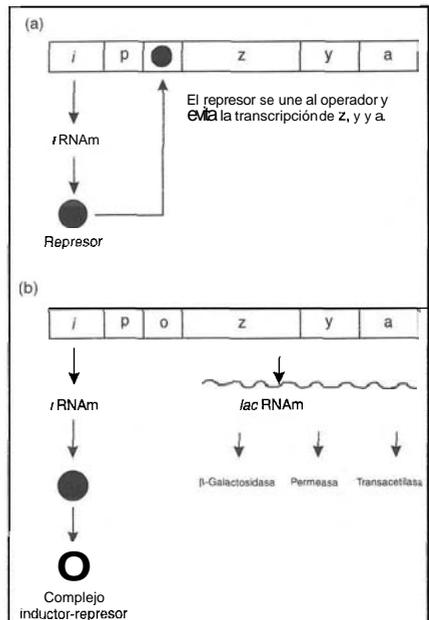


Figura 3. Diagrama del operón de la lactosa en los estados reprimido (a) e inducido (b).

## Ingeniería de plásmidos

La idea de transferir información genética, de una especie a otra, se le ocurrió a Paul Berg<sup>10</sup> de la Universidad de Stanford, cuando ya se tenían todos los implementos para llevar a cabo esta idea, es decir, en términos simples, "cortar", "pegar" y "combinar" genes e introducirlos a un nuevo huésped.

Lo anterior fue posible tomando en cuenta que ya desde 1970, Hamilton Smith<sup>11</sup> y Daniel Nathans<sup>12</sup> habían descubierto las "enzimas de restricción", que pueden ser empleadas a manera de "tijeras" para cortar la molécula de ADN en sitios específicos.

El grupo de Paul Berg junto con D. Jackson y R. Symons,<sup>13</sup> decidieron en 1972, estudiar y producir híbridos de genes bacterianos con moléculas de ADN del virus SV40 in vitro y este fue el primer método de combinar secuencias de ADN extraño dentro de células de mamífero.

Más tarde Stanley Cohen en 1973, con la colaboración de Annie Chang de la Universidad de Stanford y Herbert Helling de la Universidad de San Francisco,<sup>14</sup> lograron construir *in vitro* nuevas especies de plásmidos de ADN a partir de dos fuentes diferentes y les llamaron "quimeras", puesto que eran una reminiscencia de la criatura mitológica griega con una cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente.

Estos plásmidos resultaron biológicamente activos que al ser insertados a *Escherichia coli* previamente tratada. De este modo, fue posible reproducir copias exactas de un gene específico y obtenerlo en cantidades suficientes para efectuar un estudio completo de la molécula.

El principio básico para la reproducción de genes en eucariotes es el mismo; sin embargo, la metodología es más complicada, pues se requiere de la extracción del ADN en forma indirecta. Se sintetiza primero el ADN de interés in vitro a partir del ARN mensajero que sirve de molde por medio de la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima clave, presente fundamentalmente en los retrovirus como el virus del SIDA, fue descubierta en 1970 por H. Temin<sup>15</sup> y David Baltimore.<sup>16</sup> El ARN mensajero se aísla utilizando un marcador radioactivo que sirve como "sonda". En seguida este ARN mensajero se copia con la transcriptasa reversa y

se forma ADN de una sola hélice, el cual se duplica con la enzima ADN polimerasa y esta molécula de ADN se corta con una enzima de restricción para dar una copia del gene (ADNc). Después, este fragmento de ADN que es el gene, se "pega" a un vector (puede ser un plásmido) capaz de introducirse y expresarse dentro de un microorganismo. Para unir el gene al vector, se emplea la enzima T7 DNA ligasa, proveniente del fago T7; esta enzima es capaz de unir nucleótidos usando ATP y Mg<sup>++</sup> como cofactores.

Para determinar la secuencia de las bases que constituyen la información genética, puede seguirse el método de Fred Sanger, A. R. Coulson y S. Nicklen,<sup>17</sup> quienes fueron los primeros en establecer una secuencia por medio de técnicas enzimáticas en 1975. Con esta metodología fue factible conocer la secuencia de nucleótidos del bacteriófago lambda, que consiste de 48,502 pares de bases.

El año de 1977 se considera como la fecha de las biotecnologías, ya que Walter Gilbert y A. Maxam<sup>18</sup> desarrollaron un método diferente al de Sanger, empleando metodologías químicas para interrumpir la cadena de ADN en sitios específicos.

Este método de Maxam-Gilbert hace posible leer directamente la secuencia del ADN por medio de la electroforesis de los productos obtenidos por rompimiento de ácidos nucleicos marcados en un extremo de la cadena y utilizando genes de policlilamida y procesados por autoradiografía.

Fue en ese año que Baxter aisló y analizó el gene de la hormona del crecimiento humano. Y Keiichi Itakura y colaboradores, lograron por medio de la ingeniería genética, la expresión del gene de la somatostatina (una hormona hipotalámica aislada por R. Guillermin en 1972) en un microorganismo.<sup>19</sup> La hormona consiste de 14 residuos de aminoácido y su función en los mamíferos es inhibir la secreción de la hormona adenohipofisiaria conocida como somatotropina.

El empleo de la ingeniería genética para transportar información a partir de un organismo eucariote a la bacteria *Escherichia coli*, no solamente sirve para fines industriales en la producción de distintos compuestos como las hormonas insulina, somatotropina y otras moléculas biológicas, sino además para obtener información; sobre cómo estos nuevos genes insertados se puedan expresar y estudiarlos en forma eficiente y completa.

Las bacterias son huéspedes ideales para la amplificación de moléculas de ADN, puesto que pueden servir como fábricas para la producción de un alto margen de proteínas, tanto de procariones como de eucariotes. Sin embargo, las modificaciones postranscripcionales como son los rompimientos específicos de polipéptidos y la unión de unidades de carbohidratos, no son efectuados por la bacteria, porque están ausentes las enzimas necesarias. Es decir, que varios genes de eucariotes pueden ser expresados correctamente sólo en células huésped eucariotas.

Otra motivación para introducir moléculas de ADN recombinantes dentro de células de organismos superiores, es el conocer cómo los genes de estas células se hallan organizados y expresados, por ejemplo:

¿Cómo se encienden y se apagan estos genes en el desarrollo biológico?

¿Cómo un óvulo fertilizado da lugar a un organismo con células altamente diferenciadas que se organizan en el espacio y en el tiempo?

Estas preguntas que son centrales a la biología pueden ser abordadas en forma exitosa, porque ahora es posible expresar genes ajenos en células de mamífero lo mismo que en bacterias.

Actualmente también por medio de la tecnología recombinante del ADN, se pueden producir mutaciones específicas *in vitro* y es factible construir nuevos genes con propiedades diseñadas por medio de 4 tipos de cambios dirigidos: eliminación, inserción, transposición y sustitución.

Las nuevas proteínas pueden ser creadas por segmentos de genes fusionados, por ejemplo un gene para el anticuerpo puede ser unido a un gene para una enzima y producir una proteína química, útil como un agente terapéutico. Aún más, se pueden obtener nuevos sintetizándolos totalmente por el método de la fase sólida.

También es posible hacer cambios en la actividad enzimática, como es el caso de la glutatión reductasa y la tripanotión reductasa, por medio de la mutación dirigida a un sitio activo, lográndose transformar en gran medida una enzima en la otra y viceversa. Estos estudios contribuyen a entender el fenómeno de la especificidad enzimática y a diseñar drogas contra la tripanosomiasis.

Existe interés en utilizar esta técnica de la mutagénesis dirigida en la formación de vacunas

sintéticas, que podrían ser mucho más inocuas que las vacunas convencionales preparadas por medio de la inactivación de virus patógenos.

Por lo anterior se puede asegurar que, los resultados alcanzados han sido espectaculares y actualmente en la biotecnología moderna se funden las ciencias de la microbiología, la biología molecular, la química, la bioquímica, y la biología celular, para constituir un desarrollo tecnológico que se emplea principalmente en los campos de la agricultura, protección del ambiente y la salud.<sup>20</sup>

La biotecnología en la agricultura se dirige a la optimización de las propiedades genéticas de variedades de vegetales y en la creación de simbiosis útiles de plantas y microorganismos. Se emplean métodos de transferencia de genes de plantas y de técnicas de fusión celular, en especial, encaminadas a la adquisición de resistencia a los insectos y a los hongos. Esta nueva propiedad adquirida por variedades de maíz, arroz, trigo, soya y algodón permiten un menor uso de productos agroquímicos y a la larga se refleja en un gran beneficio hacia el ambiente y la biodiversidad.

En materia de salud, la biotecnología moderna ha contribuido en la prevención, el diagnóstico y la terapéutica de varias enfermedades. En relación con la prevención, se trabaja en la producción de vacunas contra el paludismo y contra el SIDA y ya se dispone de una vacuna contra la hepatitis B.

En lo que respecta al diagnóstico, se han obtenido un gran número de anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas y que sirven para la detección precoz del cáncer o para el diagnóstico de la hepatitis.

Referente a la terapéutica, la biotecnología ha dado sus frutos en el tratamiento de la diabetes mediante la producción de insulina humana por la ingeniería genética, lo mismo que en la producción de la hormona del crecimiento humano y del interferón alfa que se emplea en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como la leucemia y el sarcoma de Kaposi, común en los homosexuales.

En resumen, la molécula ADN es la clave de la vida que da lugar a la información necesaria para codificar a todas las especies vivientes y a las que ya desaparecieron; su conocimiento sobre cómo se halla constituida, tanto en su composición química como en su estructura física, ha permitido no sólo entender una serie de fenómenos esenciales

de los seres vivos como los de la herencia, la clave genética, la síntesis de proteínas y otros procesos, sino además el poder manipular la información genética de tal modo, que bien orientada, le reporte al hombre una serie de beneficios en los campos de la salud, de la alimentación y en el mejoramiento del ambiente.

## Referencias

1. Freeland JH. In: The eighth day of creation. Chapter 4: On T.H. Morgan's Deviation and the secret of life. Simon and Schuster. New York. 1979, pp.201-222.
2. Mullins NC. The Development of a Scientific Speciality: The phage group and the origins of Molecular Biology. *Minerva* 10:51-82. citado por Thuillier, P. (1975). ¿Cómo nació la Biología Molecular?. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 1981.
3. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acid A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171:737-738.
4. Watson JD, Crick FHC. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1953. 171:964-967.
5. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins, *J Mol Biol*. 3:318-356.
6. Peter FE, Lipson C. Thinking about Science: Max Delbruck and the origins of molecular biology, W. W. Norton & Company. New York. 1988.
7. Crick FHC. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 12:138-163. A brilliant anticipatory view of the problem of

protein synthesis. The adaptor hypothesis is presented in this article.

8. Schrödinger E. What is life? The Physical Aspect of the Living Cell. Cambridge University Press. 1944.
9. Dyson F. Origins in life. Cambridge University Press. 1985.
10. Berg P. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 1981;213:296-303.
11. Smith DH. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science*. 1979;203:455-462.
12. Nathans D. Restriction endonucleases, simian virus 40 and the new genetics. *Science*. 1979;206:903-909.
13. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phages genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci*. 1972;69:2904-2909.
14. Cohen SN, Chang A, Boyer M, Helling R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Nat Acad Sci* 1973 70 3240 3244
15. Temin H. The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science*. 1976,192:1075-1080.
16. Baltimore D. Viruses, polymerases and cancer. *Science*. 1976;192:632-636.
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating. *Proc Nat Acad Sci*. 1977;74:5463-5467.
18. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Nat Acad Sci*. 1977;74:560-564.
19. Gilbert W, Villa-Komaroff I. Useful proteins from recombination bacteria. *Sci Amer* 1980;242:(4):68-82.
20. Antébi E, Fishlock D. Biotechnology: Strategies for life. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts. 1986.