

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Caracterización de un gen específico de esporulación capaz de complementar una mutación que determina fenotipo autolítico en ciclo mitótico de *Saccharomyces cerevisiae*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gloria Molero Martín-Portugués

Directores

César Nombela Cano
Miguel Sánchez Pérez

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II**

**CARACTERIZACION DE UN GEN ESPECIFICO DE ESPORULACION
CAPAZ DE COMPLEMENTAR UNA MUTACION QUE DETERMINA
FENOTIPO AUTOLITICO EN CICLO MITOTICO DE Saccharomyces
cerevisiae.**

**Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor en Farmacia**

Autor: Dña. Gloria Molero Martín-Portugués

**Directores: Prof. Dr. D. César Nombela Cano
Prof. Dr. D. Miguel Sánchez Pérez**

Madrid, 1992

CESAR NOMBELA CANO, CATEDRATICO-DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: que Dña Gloria Molero Martín Portugués ha realizado en este departamento el trabajo que presenta para optar al grado de Dr. en Farmacia con el Título: "**Caracterización de un gen específico de esporulación capaz de complementar una mutación que determina fenotipo autolítico en ciclo mitótico de *Saccharomyces cerevisiae***".

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid,
a treinta de Enero de mil novecientos noventa y dos.

Fdo: Prof. Dr. D. César Nombela Cano.

A mi familia

A Víctor

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo:

Al Dr. César Nombela Cano, por haberme permitido formarme en su departamento, y por sus orientaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Miguel Sánchez, por su constante interés y apoyo, no sólo durante la realización del trabajo experimental, sino también en la redacción de esta memoria, y a pesar de su manifiesto "daltonismo" al mirar los calendarios.

Al Dr. Enrico Cabib, por habernos proporcionado la cepa en la que se ha basado todo este trabajo.

Al Dr. Francisco del Rey, por haberme hecho llegar la búsqueda bibliográfica que tan útil me ha sido. Al Dr. Peter Carlson, por realizar el análisis del gen *SPO12* por medio del programa PC GENE.

Al doctorando Manuel Gutierrez y al Dr. Fernando Laborda, en cuyo departamento se llevó a cabo la Microscopía Electrónica de Barrido.

A la Dra. María Molina, por sus inestimables sugerencias en la realización de esta memoria.

A los Dres. Rafael Rotger y Concha Gil, por prestarme su colaboración siempre que lo he solicitado, sobre todo con las fotografías.

A la Dra. Lourdes Torres, por ser la primera en trabajar conmigo y enseñarme pacientemente.

A las Dras. Esperanza Herreros y Rosa Cenamor, por los buenos ratos pasados y por la ayuda que me han prestado.

A los Dres. Jesús de la Fuente y Alfonso Mendoza, por sus continuas clases de ordenador, por su ayuda a la realización de las gráficas; a pesar de lo que ellos ya saben...

A la "casi" Dra. Rosalía Díez, compañera de biblioteca, de "stress", en resumen, amiga sufridora, durante estos meses, por el "montón" de buenos consejos y avisos de lo que iba a tener que hacer.

A Maribel García, por ser mi maestra de secuencia y por lo bien que lo hemos pasado juntas durante estos años.

A Alberto Alvarez, por pasarme las muestras siempre que tenía un hueco y por el interés que ha mostrado por mis resultados.

A Amalia Vázquez, por su constante buen humor y por facilitar a todos nuestro trabajo de investigación.

A Benito de la Calle, por su simpatía y porque, aunque no lo diga, siempre está dispuesto a echar una mano.

A María Yuste, por la ayuda prestada durante estos últimos meses.

Al resto de mis compañeros de Levaduras: Toñi (aunque es "adoptada"), Esme, Humberto, Pablo y Víctor, por lo que nos hemos reído, sobre todo los viernes por la tarde.

También quiero recordar aquí al resto de mis compañeros del departamento, que siempre me han facilitado el trabajo, en especial:

A mis futuras compañeras de trabajo y de cuarto: Alejandra y Blanca.

A los chicos de Bacterias: Mada, Maite, Miguelín, Jose, Conchita y Susana, por aguantar mi cogote pacientemente durante estos meses.

A Javier Arroyo, el chico más previsor del departamento.

A los chicos de abajo: J. Plá, Fede, Rosita, Lucía, Carmen, Marimar y Concha.

A las chicas de Beecham, en especial a Mati, que colaboró conmigo durante unos meses.

A los que ya se fueron: Juanón, Reme, César, Juan Velázquez y Vicente.

Al personal laboral de este Departamento, por hacernos a todos el trabajo mucho más fácil, sobre todo a Julia, por avisarme cuando estaba libre el ordenador.

Por último, quisiera recordar aquí a Víctor, mi marido, y a mi familia, por su apoyo y cariño constantes.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la Formación del Personal Investigador.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

.A	:	Absorbancia, amperios
.aa	:	aminoácido
.ade	:	Adenina
.AE	:	Actividad específica
.Amp,Ap:		Ampicilina .
.AMPc	:	Adenosina -5'-monofosfato cíclico
.Arg	:	Arginina
.ARS	:	Secuencias de replicación autónoma en levaduras
.Asn	:	Asparagina
.Asp	:	Acido aspártico
.ATP	:	Adenosina-5'-trifosfato
.dATP	:	2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato
.ddATP	:	2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato
.BSA	:	Seroalbúmina bovina
.°C	:	Grados centígrados
.can	:	Canamicina
.CBI	:	"Codon bias index" o índice de utilización de codones sinónimos
.CDC,cdc:		Genes responsables de los procesos del ciclo de división celular, y mutaciones que bloquean pasos de dicho ciclo en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S.pombe</i> .
.Cels	:	Células
.CEN	:	Secuencias de DNA de levadura que contienen un centrómero
.Ci	:	Curios
.CIAP	:	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
.cpm	:	Cuentas por millon
.dCTP	:	2'-deoxicitosina-5'-trifosfato
.ddCTP	:	2',3'-dideoxicitosina-5'-trifosfato
.Da	:	Dalton
.DEAE	:	Dietil amino etil
.DEPC	:	Dietil pirocarbonato
.DMSO	:	Dimetil sulfóxido
.DNA	:	Acido desoxirribonucleico
.DNasa	:	Desoxirribonucleasa
.DO	:	Densidad óptica
.DTT	:	Ditiotreitol
.EDTA	:	Acido etilen-diamino-tetraacético
.EtBr	:	Bromuro de etidio
.Ext	:	Extractos celulares
.FA	:	Fosfatasa alcalina
.FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
.g	:	Gramo, unidad de gravedad (según contexto)
.Go,G1 y G2:		Fases del ciclo mitótico previas a la síntesis de DNA (G0/G1) y mitosis (G2).
.GlcNAc	:	N-acetilglucosamina
.GTP	:	Guanosina-5'-trifosfato

.dGTP	: 2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato
.ddGTP	: 2',3'-dideoxiguanosina-5'-trifosfato
.IP	: Ioduro de propidio
.IPTG	: Isopropil-tiogalactósido
.Kb	: Kilobases
.KDa	: Kilodaltons
.lacZ	: Gen de <i>E.coli</i> que codifica para el α -péptido de la β -galactosidasa
.LB	: Medio Luria Bertani, para <i>E.coli</i>
.Leu	: Leucina
.Leu-	: Estirpes de levadura auxótrofas para leucina
.LEU2	: Gen de levadura de la isopropil-malato- deshidrogenasa
.Lyt-	: Estirpes de <i>S.cerevisiae</i> con fenotipo lítico <i>lyt1-1</i> y <i>lyt2-1</i> : Mutaciones autolíticas termosensibles en <i>S.cerevisiae</i>
.M	: Molar, fase M del ciclo mitótico (mitosis)
.MAT α y a :	"loci" que controlan el tipo sexual en <i>S.cerevisiae</i>
.MCS	: Sitio para clonación múltiple o "polilinker"
.MD	: Mega-Dalton
.ME	: Medio de esporulación
.MES	: Acido2-(N-morfolino)-etanosulfónico
.Met	: Metionina
.MM	: Medio mínimo
.MOPS	: Acido morfolino-propano-sulfónico
.MPE	: Medio de preesporulación
.MR	: Medio de regeneración
.MSE	: Metanosulfonato de etilo
.N	: Normal, asparagina
.n	: Nano, haploide
.2n	: Diploide
.NADP	: Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato
.nm	: Nanómetro
.cNMP	: Nucleotidín-5'-monofosfato cíclico
.dNTP	: 2'-deoxinucleotidín-5'-trifosfato
.ddNTP	: 2',3'-dideoxinucleotidín-5'-trifosfato
.ORI	: Origen de replicación para <i>E.coli</i>
.ORF	: Marco abierto de lectura
.P	: Fosfato
.(α -32P):	Isótopo radiactivo de fósforo
.PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
.pb	: Pares de bases
.PBS	: Tampón salino pH:7,4
.PEG	: Polietilen glicol
.pH	: -logaritmo de la concentración de hidrogeniones
.PI	: Punto isoeléctrico, pH al cual la carga de la proteína es cero
.pK	: pH al cual está disociada la mitad del aminoácido
.PM	: Peso molecular
.PMT	: Fotomultiplicador

.PNP	:	Paranitrofenol
.PNPG	:	Paranitrofenil-β-D-glucósido
.PNPP	:	Paranitrofenil-fosfato disódico
.PS	:	Peso seco
.P/V	:	Relación peso/volumen
.PVP	:	Polivinil-pirrolidona
.rec-	:	Cepas deficientes en recombinación
.RNA	:	Acido ribonucleico
.mRNA	:	Acido ribonucleico mensajero
.rRNA	:	Acido ribonucleico ribosómico
.tRNA	:	Acido ribonucleico transferente
.RNasa	:	Ribonucleasa
.RUP	:	"primer" universal reverso
.S	:	Fase S del ciclo mitótico (síntesis de DNA)
.(α- ³⁵ S)	:	Isótopo radiactivo del azufre
.SDS	:	Dodecíl-sulfato sódico
.SN	:	Sobrenadante
.SOB	:	Medio de <i>E.COLI</i> empleado en experimentos de transformación
.SOC	:	Medio de <i>E.coli</i> , empleado para expresar la resistencia al antibiótico en experimentos de transformación
.SPB	:	"Spindle pole body" o centrosoma
.SPBS	:	"Spindle pole body satellite" o satélite del centrosoma
.SSC	:	Tampón citrato sódico y cloruro sódico pH:7
.STE	:	Tampón Tris-HCl y EDTA
.STET	:	Tampón Tris-HCl, EDTA y Triton X-100
.TB	:	Tampón Tris y Ac. Bórico.
.TBE	:	Tampón Tris, Ac. Bórico y EDTA.
.TBS	:	Tampón Tris-HCl pH:8 con NaCl.
.TBST	:	TBS con Tween 20
.TCA	:	Acido tricloroacético
.TE	:	Tampon Tris-EDTA
.TEMED	:	Tetrametil-etilen-diamina
.Tet	:	Tetraciclina
.TFB	:	Tampón para transformación de <i>E. coli</i>
.Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
.Trp	:	Triptófano
.TRP1	:	Gen de levadura de la n(5'-fosforribosil)- antranilato isomerasa
.dTTP	:	2'-deoxitimidina-5'-trifosfato
.ddTTP	:	2',3'-dídeoxitimidina-5'-trifosfato
.UA260	:	Unidades de absorbancia a 260 nm
.UDP	:	Uridindifosfato
.UE	:	Unidades enzimáticas
.UP	:	"primer" universal
.ura	:	Uracilo
.Ura-	:	Estirpes de levadura auxótrofas para uracilo
.URA3	:	Gen de levadura de la orotidin-monofosfato- descarboxilasa

.UV	:	Ultravioleta
.V	:	Voltio, valina (según contexto)
.V/V	:	Relación volumen a volumen
.Viabl	:	Células viables
.X-gal	:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β Dgalactopiranosido
.YED	:	Medio completo para levaduras
.YEPD	:	Medio rico para levaduras
λ	:	Bacteriófago Lambda
Δ	:	Delección
::	:	Interrupción
μ	:	Micro, Tasa específica de crecimiento (1/h)
μ_{max}	:	Tasa específica máxima
.2 μ	:	Fragmento del plásmido de 2 micras, que porta el origen de replicación para la levadura

ÍNDICE

	<u>Pág</u>
I.-INTRODUCCION	1
1.- CICLO BIOLÓGICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.1.- Ciclo mitótico de <i>S. cerevisiae</i>	2
1.1.1.- Síntesis de componentes celulares durante el ciclo mitótico.....	7
1.1.2.- Integración del ciclo celular. Fase G1.....	10
1.1.3.- Coordinación de sucesivos ciclos mitóticos.....	11
1.1.4.- Papel del AMPc.....	12
1.2.- Apareamiento.....	13
1.3.- Esporulación en <i>S. cerevisiae</i>	14
1.3.1.- Cambios morfológicos producidos durante la esporulación.....	14
1.3.2.- Cambios químicos y metabólicos.....	16
1.3.3.- Factores ambientales que controlan la esporulación.....	17
1.3.4.- Regulación del inicio de la esporulación.....	19
1.3.5.- Control de la capacidad de esporulación por la edad y tamaño celulares.....	21
1.3.6.- Número de esporas por asca. Esporulación Apomictica.....	21
1.4.- Regulación Mitosis-Meiosis.....	25
2.- OBJETIVOS	27
II.- MATERIALES Y METODOS	28
1.- MATERIALES	29
1.1.- Productos químicos y biológicos.....	29
1.2.- Equipo instrumental.....	29
1.3.- Material biológico.....	31
1.3.1.- Microorganismos.....	31
1.3.2.- Plásmidos.....	34
1.3.3.- Genoteca genómica de <i>S. cerevisiae</i>	35
1.4.- Medios de cultivo.....	35
1.4.1.- Medios y soluciones de antibióticos para <i>E. coli</i>	35
1.4.2.- Medios para <i>S. cerevisiae</i>	40
2.- METODOS	44
2.1.- Condiciones de crecimiento y conservación de cepas.....	44
2.1.1.- Cepas de <i>E. coli</i>	44
2.1.2.- Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	44
2.2.- Condiciones de cultivo en fermentador. Modos de trabajo.....	45
2.3.- Determinación del crecimiento.....	45
2.3.1.- Turbidimetría.....	45
2.3.2.- Recuento de células.....	45
2.4.- Recuento de viables.....	48
2.4.1.- Por crecimiento en placa.....	48
2.4.2.- Por citometría de flujo.....	48
2.5.- Técnicas de microscopía.....	48
2.5.1.- Microscopía de contraste de fases.....	48
2.5.2.- Microscopía electrónica de barrido.....	48
2.6.- Técnicas genéticas.....	49
2.6.1.- Obtención de diploides.....	49

2.6.2.- Esporulaci3n.....	49
2.6.3.- Disecci3n de ascas.....	49
2.7.- Preparaciones enzimáticas.....	50
2.7.1.- Obtenci3n de c3lulas y caldos de cultivo.....	50
2.7.2.- Preparaci3n de extractos celulares.....	50
2.7.3.- Soluciones tamp3n y diálisis.....	51
2.8.- Determinaciones analíticas.....	51
2.8.1.- Valoraci3n de glucosa.....	51
2.8.2.- Valoraci3n de fosfatasa alcalina.....	52
2.9.- Técnicas de Biología molecular.....	54
2.9.1.- Soluciones de uso general.....	54
2.9.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	56
2.9.3.- Aislamiento de DNA total de <i>S. cerevisiae</i>	57
2.9.4.- Aislamiento de DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	58
2.9.5.- Aislamiento de RNA total de levaduras.....	59
2.9.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	60
2.9.7.- Extracci3n de DNA a partir de geles de agarosa.....	61
2.9.8.- Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.....	62
2.9.9.- Determinaci3n del tamaño, pureza y concentraci3n del DNA.....	64
2.9.10.- Tratamientos enzimáticos del DNA.....	65
2.9.11.- Hibridaci3n de ácidos nucleicos.....	66
2.9.12.- Secuenciaci3n del DNA.....	70
2.9.13.- Transformaci3n de <i>E. coli</i>	72
2.9.14.- Transformaci3n de <i>S. cerevisiae</i>	74
2.9.15.- Análisis rápido de transformantes procedentes de una transformaci3n de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	75
2.10.- Técnicas de citometría de flujo.....	76
2.10.1.- Preparaci3n de c3lulas para distintos análisis por citometría de flujo.....	76
2.10.2.- Análisis por citometría de flujo.....	76
III.- RESULTADOS.....	78
1.- CARACTERIZACION DE LA MUTACION <i>lyt1-1</i>.....	79
1.1.- Características del mutante <i>S. cerevisiae</i> L2.....	79
1.2.- Manipulaciones genéticas iniciales.....	79
1.3.- Caracterizaci3n fenotípica de la mutaci3n <i>lyt1-1</i>	80
1.3.1.- Estudio de la expresi3n de la mutaci3n <i>lyt1-1</i> mediante cultivo en matraz.....	80
1.3.2.- Estudio de la expresi3n de la mutaci3n en medio s3lido.....	85
1.3.3.- Condiciones óptimas para la expresi3n del fenotipo <i>Lyt</i> ⁺	87
1.3.4.- Estudio de la expresi3n de la mutaci3n en fermentador.....	87
1.3.5.- Efecto de la mutaci3n <i>lyt1-1</i> sobre el apareamiento.....	89
1.3.6.- Efecto de la mutaci3n <i>lyt1-1</i> sobre la esporulaci3n.....	89
2.- AISLAMIENTO DE UN FRAGMENTO DE DNA DE <i>S. cerevisiae</i> QUE COMPLEMENTA LA MUTACION <i>lyt1-1</i>.....	89
2.1.- Construcci3n de cepas de <i>S. cerevisiae</i> adecuadas para la transformaci3n.....	89
2.2.- Transformaci3n de la cepa L2C34d con DNA de una genoteca gen3mica de <i>S. cerevisiae</i>	90
2.3.- Selecci3n del clon transformante no lítico T14.....	90
2.3.1.- Análisis de la liberaci3n de fosfatasa alcalina en medio s3lido.....	91
2.3.2.- Comprobaci3n de que la complementaci3n del fenotipo se debe a la presencia del plásmido.....	91

2.3.3.- Análisis de los plásmidos portados por los clones transformantes seleccionados.....	91
2.4.- Caracterización fenotípica de la estirpe transformante T14.....	92
2.4.1.- Crecimiento a 24 y 37° C.....	92
2.4.2.- Morfología celular al microscopio de contraste de fases.....	92
2.4.3.- Morfología celular en microscopía electrónica de barrido.....	92
2.4.4.- Estudio de la capacidad de esporulación de cepas diploides homocigóticas transformadas con el plásmido p14.....	92
2.4.5.- Estudio de la capacidad de apareamiento de cepas transformadas con el plásmido p14.....	92
3.- CARACTERIZACION DEL FRAGMENTO DE DNA QUE COMPLEMENTA LA MUTACION <i>lyt1-1</i>.....	93
3.1.- Determinación del tamaño y mapa de restricción del fragmento clonado...	93
3.2.- Comprobación de que el fragmento clonado no porta un gen supresor "ámbar".....	93
3.3.- Subclonación de diversos fragmentos de menor tamaño que el clonado y estudio de su capacidad de complementación.....	93
3.3.1.- Subclonación en vectores multicopia.....	95
3.3.2.- Subclonación del mínimo fragmento codificante en vector centromérico.....	95
3.4.- Estudio comparativo de la capacidad de complementación de diferentes mutaciones autolíticas.....	95
3.5.- Secuenciación del fragmento génico capaz de complementar el fenotipo...	95
3.6.- Análisis de la secuencia nucleotídica.....	97
3.7.- Demostración de que el gen <i>SPO12</i> es el responsable de la complementación del fenotipo autolítico.....	97
3.7.1.- Estudio de la complementación del fenotipo en matraz.....	97
3.7.2.- Estudio de la complementación del fenotipo en fermentador.....	102
3.8.- Demostración de que el gen <i>SPO12</i> es un supresor.....	102
3.8.1.- Interrupción del gen <i>SPO12</i> en cepas silvestres.....	102
3.8.2.- Análisis del crecimiento a 24 y 37° C de las cepas interrumpidas.	104
3.8.3.- Estudio de la capacidad de esporulación de cepas diploides interrumpidas.....	104
3.8.4.- Análisis de la segregación del fenotipo <i>Lyt⁻</i> en diploides heterocigóticos <i>lyt1-1/spo12::URA3</i>	104
3.9.- Análisis del producto del gen <i>SPO12</i> por medio del programa PC GENE....	107
3.10.- Estudio del uso de codones sinónimos en el gen <i>SPO12</i>	109
3.11.- Análisis por hibridación de RNA ("Northern Blot") de la expresión del gen <i>SPO12</i>	109
3.12.- Construcciones realizadas para la reducción y sustitución de la cola ácida de la proteína <i>SPO12</i> y su efecto en la complementación del fenotipo.....	112
4.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA MUTACION <i>lyt1-1</i> CON LA MUTACION <i>cdc14</i>.....	115
4.1.- Crecimiento a 24 y 37° C en presencia de sorbitol 0,9M. Análisis de viabilidad.....	116
4.2.- Construcción de diploides heterocigóticos <i>lyt1-1/cdc14</i>	116
5.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL FENOTIPO AUTOLITICO EN PRESENCIA DE HIDROXIUREA.....	117
IV.- DISCUSION.....	119
1.- CARACTERIZACION DE LA MUTACION <i>lyt1-1</i>.....	120

2.- CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN FRAGMENTO GENICO CAPAZ DE COMPLEMENTAR EL FENOTIPO AUTOLITICO.....	124
3.- ANALISIS DEL PRODUCTO DEL GEN <i>SPO12</i>.....	128
V.- CONCLUSIONES.....	131
VI.- BIBLIOGRAFIA.....	133

I.-INTRODUCCIÓN

1.- CICLO BIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

En el ciclo biológico de *S. cerevisiae* hay que destacar dos aspectos fundamentales. Por una parte, la proliferación celular (ciclo mitótico), mediante el cual una célula da lugar, por gemación, a dos genéticamente idénticas. En segundo lugar, los procesos de transición que permiten los cambios de ploidía $n \leftrightarrow 2n$ de la célula: el apareamiento y la esporulación (meiosis).

En la Figura 1 se muestran los cambios morfológicos que experimentan las células durante estos procesos. Dos células haploides (n) de distinto tipo sexual a y α se fusionan, mediante plasmogamia y cariogamia, para formar un cigoto diploide ($2n$). Este puede reanudar el ciclo mitótico por gemación, o bien, si el medio es pobre en fuentes de nitrógeno y carbono, experimentar meiosis y dar lugar a cuatro esporas haploides (Esposito y Klapholz, 1981 y Mitchell, 1988).

Este tipo de ciclo se denomina heterotálico y es propio de levaduras de uso común en investigación. En él, una única cepa haploide no puede dar lugar a células diploides, por lo que las fases haploide y diploide están bien definidas.

Esta situación no se produce en muchas cepas aisladas en la naturaleza o industriales, en las que la fase haploide es prácticamente inexistente. En estos casos, inmediatamente después de la germinación de una spora, ésta cambia de tipo sexual mediante una reorganización del DNA (Hicks y Herskowitz, 1976; Herskowitz y Oshima, 1981 y Strathern *et al.*, 1982) y se fusiona con la célula hija formando una célula diploide. Las células que tienen este tipo de ciclo se llaman homotálicas y poseen el alelo dominante del locus *HO/ho*, que con el concurso de los loci *HML* y *HMR* determinan el ciclo homotálico.

1.1.- CICLO MITÓTICO DE *S. cerevisiae*.

Durante la división mitótica de *S. cerevisiae* se produce una sucesión de hechos que conduce a la replicación celular. Al igual que en otros organismos eucariotas, en el ciclo de división celular de la levadura se han distinguido cuatro fases: G1, en la que se producen los fenómenos que preceden a la replicación del DNA cromosómico; S o fase de replicación del DNA y de emergencia de la yema; G2, en la que tienen lugar división nuclear y mitosis (Figura 2).

El inicio de la división celular viene señalado por la aparición de microtúbulos que salen del cuerpo polar del huso, centrosoma o SPB, el cual es el centro de organización de los microtúbulos, situado en la membrana nuclear. Estos microtúbulos apuntan hacia un lugar de la pared celular en el que se sitúa un anillo de quitina. En este punto, se produce la emergencia de la yema. Poco después, se detecta un conjunto de vesículas debajo de la pared celular (Matile *et al.*, 1969) y un anillo de microfilamentos en el citoplasma adyacente a la membrana

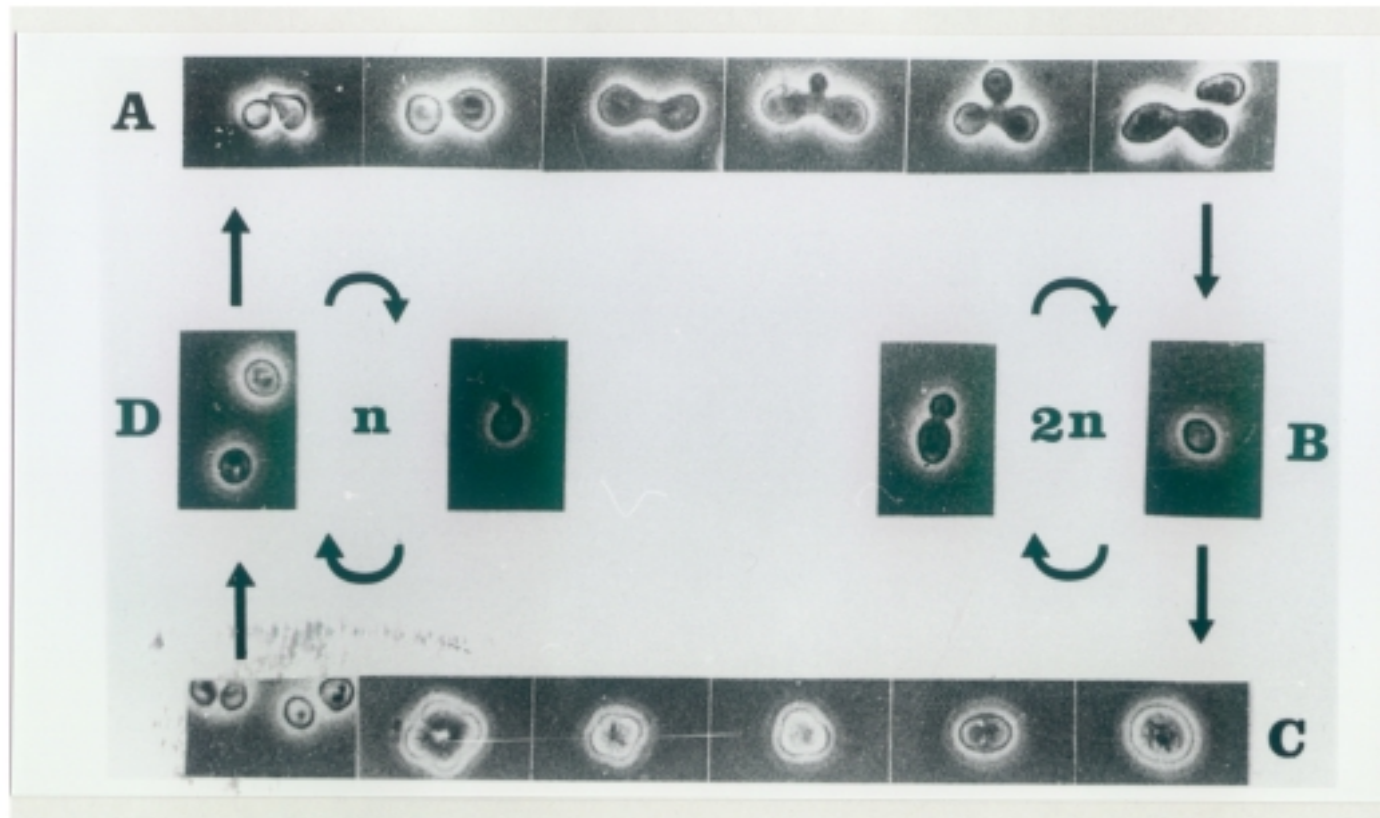


Figura 1.- Ciclo Biológico de *S. cerevisiae*.

Microfotografías (900 x) de contraste de fases de células representativas de los distintos estadios del ciclo.

- A) Apareamiento entre dos células haploides n de tipo sexual opuesto, y formación del cigoto $2n$.
- B) Reproducción vegetativa de la célula diploide $2n$ (ciclo mitótico).
- C) Esporulación de la célula diploide $2n$, formación de los cuatro productos meióticos (ascosporas) dentro del asca, y liberación de dichas ascosporas haploides.
- D) Reproducción vegetativa de la célula haploide n (ciclo mitótico).

celular, en el itismo de la yema (Byers y Goetsch, 1976a), cuya función está relacionada con la citoquinesis.

Antes de que se produzca la emergencia de la yema, el SPB produce una pequeña estructura satélite que crece hasta duplicarse, separándose posteriormente los dos polos del huso acromático. Entre ambos polos se desarrolla un haz de filamentos a la vez que el núcleo crece y migra hasta una localización central entre las células madre e hija. La membrana nuclear, al igual que en otros hongos, no se rompe, lo que ha impedido, junto con el pequeño tamaño de los cromosomas de la levadura, visualizar el momento preciso de la segregación de los cromosomas. No existe una metafase clara, pero se produce una división del núcleo. Los dos núcleos resultantes migran hacia polos opuestos de las células.

La citoquinesis o completa separación de los citoplasmas de las células madre e hija por la formación de las membranas celulares y la separación celular, siguen rápidamente a la división nuclear (Molano *et al.*, 1980).

El orden en que todos estos sucesos se producen, viene representado en la Figura 2, en la que se indica también la fase del ciclo celular en que tienen lugar. Las distancias entre los sucesos indicados son sólo aproximadamente proporcionales y en algunos casos no se conoce a ciencia cierta el orden concreto.

Como puede observarse en dicha figura, las células hijas tardan más que las parentales en desarrollar una nueva mitosis. Esto se debe a que las células hijas de *S. cerevisiae* nacen más pequeñas que las madres (división asimétrica) y deben alcanzar un tamaño mínimo antes de ser capaces de dividirse (Johnston *et al.*, 1977, 1979; Calvert y Dawes, 1984b).

El estudio de cada uno de los procesos que se suceden a lo largo del ciclo mitótico y su integración ha sido posible gracias a la existencia de mutantes *cdc* y de inhibidores específicos de algún proceso. De estos últimos podríamos destacar algunos de los agentes químicos más usados:

- Hidroxiurea, que inhibe la síntesis de DNA. Inhibe la enzima ribonucleótido reductasa (Timson, 1975) y previene la unión de pequeños fragmentos de DNA nuclear, mitocondrial y plasmídico (Slater, 1973). En *S. cerevisiae* su acción da lugar a un fenotipo terminal de células en dobles.

- Benomyl (metilbenzimidazol-2-il-carbamato), el cual afecta reversiblemente el ensamblaje de los microtúbulos (Quinlan *et al.*, 1980). Detiene el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* con un fenotipo de dobles con un huso acromático corto.

Los mutantes *cdc* son, por definición, cepas deficientes en algún punto del ciclo de división celular (Hartwell *et al.*, 1970). En general, los mutantes *cdc* son termosensibles, de tal manera que a 23°C crecen normalmente, mientras que a 37°C manifiestan la mutación y detienen su crecimiento en un punto determinado del ciclo mitótico. Así, de una población inicialmente heterogénea en cuanto a su fase del ciclo, se desarrolla una población homogénea

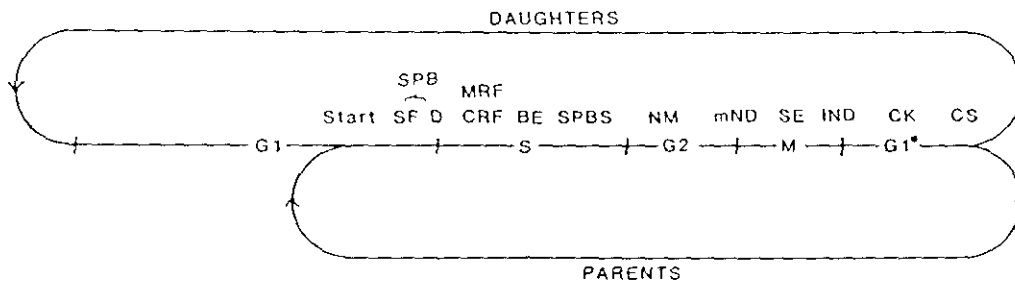


Figura 2.- Principales marcas de diagnóstico del ciclo celular de *S. cerevisiae*.

El diagrama indica el orden temporal de los distintos procesos, pero las distancias entre estos son sólo aproximadamente proporcionales. En algunos casos no se conoce el orden temporal concreto. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes:

BE: emergencia de la yema	CK: citoquinesis
CRF: formación del anillo de quitina	CS: separación de las células
MRF: formación del anillo de microfilamentos	INM: estadio tardío de la división nuclear
mND: estadio intermedio de la división nuclear	NM : migración de los núcleos
SE : alargamiento del huso	SPBD: duplicación del centrosoma
SPBS: separación de los centrosomas	
SPBSF: formación del satélite del centrosoma	

Se indica también la fase del ciclo en que tiene lugar cada proceso:

G1: intervalo entre la citoquinesis y la síntesis de DNA,

S: fase de síntesis de DNA,

G2: intervalo entre el final de la síntesis de DNA y la iniciación de la mitosis,

M: fase de mitosis.

Como puede observarse, la duración de la fase G1 es mayor en el caso de las células hijas que en el de las parentales.

(Tomada de Wheals, 1987).

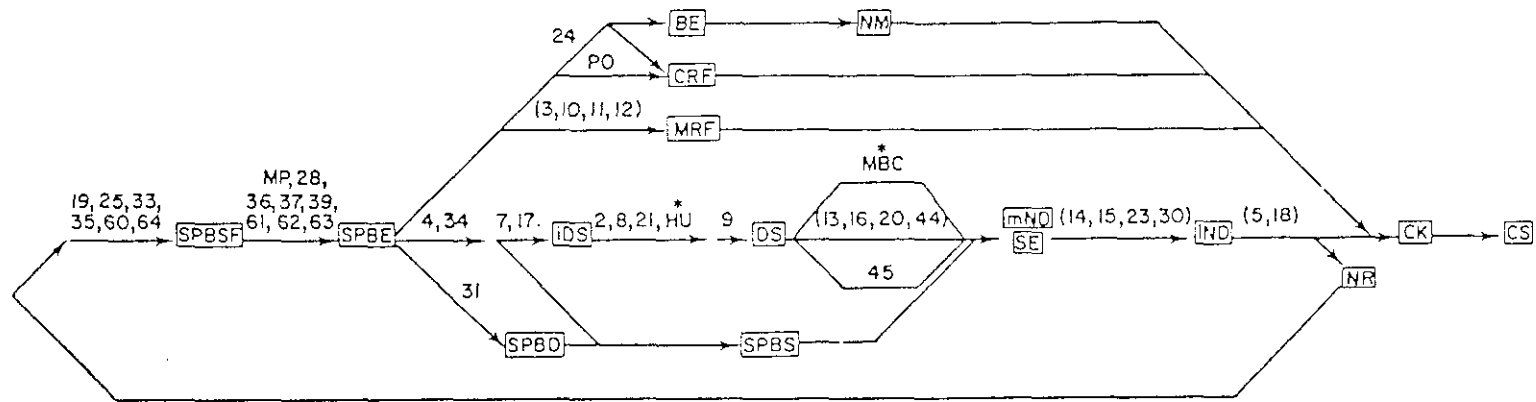


Figura 3.- Mapa de la secuencia funcional de las mutaciones *cdc* de *S. cerevisiae*.

Los números se refieren a las mutaciones *cdc*. Las marcas de diagnóstico están encuadradas. Los procesos dependientes se encuentran unidos por flechas, los independientes se sitúan en rutas paralelas y los interdependientes en la misma flecha.

Las posiciones de las marcas diagnóstico en la figura se ajustan a la escala temporal de un ciclo celular normal.

BE: emergencia de la yema
 CS: separación de las células
 HU: hidroxiiurea
 MRF: formación del anillo de microfilamentos
 mND: estadio intermedio de la división nuclear
 PO : polioxina D
 SPBE: crecimiento del centrosoma
 SPBSF: formación del satélite del centrosoma

CK: citoquinesis
 DS: síntesis de DNA
 MBC: benomil
 INM: estadio tardío de la división nuclear
 NM : migración de los núcleos
 SE : alargamiento del huso
 SPBS: separación de los centrosomas

CRF: formación del anillo de quitina
 iDS: inicio de la síntesis de DNA
 MP : feromona de apareamiento
 NR : reorganización nuclear
 SPBD: duplicación del centrosoma

Hemos señalado con un asterisco los puntos de actuación de la Hidroxiiurea y el Benomil.
 (Tomada de Wheals, 1987).

de células que exhibe el fenotipo terminal característico de la mutación (Hartwell, 1974; Pringle, 1978). Actualmente se conocen también mutantes criosensibles (Thomas y Botstein, 1986).

En estos mutantes *cdc* tenemos que distinguir los siguientes aspectos:

- defecto primario: proceso afectado por la mutación, en general desconocido;
- marca de diagnóstico: primer suceso afectado de forma detectable;
- fenotipo terminal: estado final de las células mutantes en las condiciones restrictivas;
- punto de ejecución: momento a partir del cual la mutación no se manifiesta al aplicar la temperatura no permisiva, y hasta que la célula no complete el ciclo iniciado y llegue de nuevo a ese punto, no detiene su crecimiento.

Se han descrito unos 70 genes con un fenotipo relacionado con el ciclo celular y se han mapeado más de 30 (Revisados por Pringle y Hartwell, 1981 y Wheals, 1987).

Estudiando los diferentes fenotipos terminales, marcas de diagnóstico y puntos de ejecución de los mutantes *cdc* y construyendo dobles mutantes, se ha podido deducir un mapa de secuencias funcionales que se muestra en la Figura 3. En ella se indican los puntos de ejecución de cada mutación y también de algunos agentes químicos y hormonales, como el factor α , del cual hablaré más adelante.

Es muy difícil discernir el punto preciso en que son requeridos los productos de los genes afectados, ya que la mayoría de las veces no se conoce este gen y sus efectos pueden manifestarse en un punto del ciclo lejano con respecto al afectado. Por otra parte, el defecto primario de una mutación *cdc* no tiene porqué ser una función específica de un determinado estadio del ciclo. Por ejemplo, el crecimiento de la masa celular es un factor limitante de la fase G1. Cualquier mutación que afecte al crecimiento celular puede detener el crecimiento de la célula en dicha fase, como en el caso de las mutaciones que afectan al gen *CDC19*, el cual codifica una piruvato quinasa termosensible (Kawasaki, 1979) o la mutación *tra3*, cuyo defecto primario parece estar en la regulación del metabolismo de los aminoácidos (Wolfner *et al.*, 1975).

1.1.1.- Síntesis de componentes celulares durante el ciclo mitótico.

A continuación describiré brevemente algunos de los procesos que tienen lugar a lo largo del ciclo mitótico de *S. cerevisiae*.

1.1.1.1.- Síntesis de DNA.

La síntesis de DNA se produce durante la fase S. Al contrario de lo que se pensaba, esta síntesis no comienza al mismo tiempo que se produce la emergencia de la yema,

sino que es anterior, incluso con tasas de crecimiento rápidas (Revisado por Wheals, 1987). Esto viene apoyado por la observación de que todas las células con yema, de un cultivo en crecimiento exponencial, son capaces de dividirse en presencia de hidroxurea (Slater, 1973; Hartwell, 1976); y se sabe que la replicación del DNA es un requisito indispensable para que se produzca la división celular.

La síntesis de DNA no depende de la duplicación del SPB, ni de su posterior separación, sino que puede producirse, no sólo en condiciones de bloqueo de la duplicación del SPB, sino también cuando la separación de SPBs está avanzada . Sí depende, sin embargo, de la emisión del satélite del SPB (Revisado por Pringle y Hartwell, 1981).

La síntesis de DNA plasmídico (2µm), en general, es simultánea a la nuclear. Sin embargo, la de DNA mitocondrial es continua a lo largo del ciclo (Revisado por Wheals, 1987), y continúa produciéndose durante un tiempo en células tratadas con feromonas (Petes y Fangman, 1973) y en mutantes *cdc* a la temperatura no permisiva, excepto en los afectados directamente en la síntesis de DNA (Newlon y Fangman, 1975).

1.1.1.2.- Crecimiento de la pared y síntesis de sus componentes.

En células sin yema, la incorporación de nuevos materiales se produce en toda la superficie celular. El comienzo de la gemación viene señalado por la aparición de unas vesículas por debajo de la pared celular (Matile *et al.*, 1969) y de una formación de microtúbulos que se extiende desde el SPB (Byers y Goetsch, 1974) hacia el punto de gemación.

A partir de ese momento, la incorporación de materiales nuevos se produce principalmente en la yema, de lo que se deduce que la pared de la célula madre está compuesta, en su mayoría por material viejo (Revisado por Pringle y Hartwell, 1981 y Wheals, 1987).

En cuanto a la síntesis de los componentes mayoritarios de la pared, glucano y manano, se ha visto que es continua a lo largo del ciclo (Revisado por Wheals, 1987). Sin embargo, hay indicios de un descenso en la tasa de síntesis en el momento de la división (Wiemken *et al.*, 1970; Hayashibe *et al.*, 1977).

En contraste, la síntesis de quitina es un proceso discontinuo. Se produce un aumento repentino poco antes de la emergencia de la yema (antes del depósito del anillo de quitina) (Hayashibe y Katohda, 1973) y otro al separarse ambas células (Molano *et al.*, 1980). También tiene lugar síntesis de quitina en células tratadas con feromonas (se deposita en la punta del "shmoo") (Schekman y Brawley, 1979) y a lo largo de todo el ciclo mitótico en pequeñas proporciones (Cabib y Bowers, 1975; Sloat *et al.*, 1981).

Durante el crecimiento de la yema aparece una estructura de microfilamentos en el cuello (Byers y Goetsch, 1976a), la cual parece ser crucial para la citoquinesis, ya que los mutantes que carecen de él, como son los *cdc3*, *11* y *12*, no son capaces de llevarla a cabo.

La fusión de las vesículas situadas en la zona del cuello produce una doble membrana que separa a las células madre e hija, proceso seguido inmediatamente por el depósito del material de la pared y el crecimiento del septo (Cabib *et al.*, 1982; Linnemans *et al.*, 1977).

Al separarse, las células quedan con una cicatriz compuesta por un anillo de quitina y un cuerpo central de manano y glucano. En células haploides que crecen activamente, las sucesivas gemaciones se producen en el mismo polo de la cicatriz de nacimiento, es decir, en posición axial. En cambio, en células diploides es más común la aparición de la nueva yema en el polo opuesto con respecto a la de nacimiento, es decir, en posición apical (Freifelder, 1960; Hicks *et al.*, 1977; Sloat *et al.*, 1981). Se han descubierto recientemente un grupo de genes, denominados *BUD*, los cuales están implicados en la elección del punto de gemación. Están sometidos a diferente regulación según sea la célula haploide o diploide, lo que da lugar al patrón de gemación propio de cada ploidía (Chant y Herskowitz, 1991; Chant *et al.*, 1991; Drubin, 1991; Powers *et al.*, 1991).

1.1.1.3.- Síntesis de RNA.

Los estudios realizados sugieren que la síntesis de las diferentes especies de RNA es un proceso continuo durante el ciclo mitótico (Elliott y McLaughlin, 1979b). Es claro también que la acumulación de RNA se produce en células tratadas con feromonas (Thorm y Duntze, 1970; Wilkinson y Pringle, 1974), con hidroxurea (Slater, 1973) o en diversos mutantes *cdc* a la temperatura restrictiva (Culotti y Hartwell, 1971; Hartwell, 1971a, 1973b). Sin embargo, no se sabe qué ocurre con la transcripción y la estabilidad de los transcritos de genes individuales.

Estudios realizados con genes de histonas sugieren que su mRNA sólo está presente durante la fase S (Hereford *et al.*, 1981), pero los datos de síntesis de proteínas sugieren que se trata de un caso especial.

1.1.1.4.- Síntesis de proteínas.

Según los estudios realizados, la mayoría de las proteínas se sintetizan y acumulan de forma continua a lo largo del ciclo mitótico (Revisado por Wheals, 1987). Sólo las histonas (Moll y Wintersberger, 1976) y algunas otras proteínas, casi todas relacionadas con la periodicidad de la síntesis de DNA a lo largo del ciclo mitótico (Lorincz *et al.*, 1982), parecen sintetizarse de forma discontinua. Sin embargo, los experimentos realizados se centran fundamentalmente en proteínas de alto nivel de expresión. No se descarta que algunas proteínas de bajo nivel de expresión también se sinteticen de forma discontinua a lo largo del ciclo mitótico.

Los estudios de Byers y Sowder (1980) realizados sobre productos de genes *CDC*, algunos de los cuales se supone que son de baja expresión y cuya síntesis podría ser periódica, no apoyan esta idea. Estos autores demostraron que la mayoría de los productos de los genes *CDC* están presentes en la célula en exceso suficiente como para completar varios

ciclos, excepto algunos, como por ejemplo, el del gen *CDC4*, cuya función es necesaria para la separación de los SPB.

Por otra parte, estudios realizados sobre las actividades de diversas enzimas, indican que éstas varían a lo largo del ciclo celular (Halvorson *et al.*, 1971; Mitchison, 1977; Yaspe y Halvorson, 1976; del Rey *et al.*, 1979b).

Por ello, y según se indicará más adelante, se aventura la hipótesis de la existencia de procesos de activación-desactivación de las proteínas a lo largo del ciclo celular (Revisado por Wheals, 1987).

1.1.2.- Integración del ciclo celular. Fase G1.

En el ciclo celular se producen dos tipos de procesos: discontinuos (por ejemplo, la síntesis de DNA) y continuos (por ejemplo, la síntesis de los componentes mayoritarios de la pared celular). Cada vez que se dobla la masa celular, se produce una serie de los procesos discontinuos. Surge, por tanto, la cuestión de cómo se integran ambos tipos de procesos (Fantès y Nurse, 1981).

En *S. cerevisiae* la integración se produce al comienzo del ciclo, en un punto denominado "start".

Se pueden aportar varias pruebas de la existencia del punto "start":

a) Todos los sucesos del ciclo celular dependen de un grupo de genes *CDC* (25, 28, 33, 35, 36, 37, 39, 60, 61, 62, 63, 64) que actúan aproximadamente en el mismo punto del ciclo celular. Al no conocerse otros mutantes que actúen antes que ellos, definen el primer punto del ciclo celular que se encuentra bajo control genético. Aunque se pensaba que la duplicación del SPB era el primer paso de la división celular, se ha comprobado que no es así, ya que existen mutantes del punto "start" que detienen su crecimiento con un único SPB.

b) Las células tratadas con feromonas, detienen su crecimiento de forma reversible, en el punto "start". El crecimiento continúa, pero no se produce división celular, aunque se observan diversos cambios bioquímicos (Sumrada y Cooper, 1978b).

c) Las células privadas de nutrientes, como por ejemplo, durante el comienzo de la fase estacionaria, detienen su crecimiento en el punto "start".

d) Una vez que las células han sido capaces de superar dicho punto, están abocadas a completar el ciclo mitótico, incluso en ausencia de crecimiento posterior (G.C. Johnston *et al.*, 1977a,b; G.C. Johnston, 1977).

e) Existe un tamaño crítico para poder superar el punto "start" (Revisado por Wheals, 1987).

El punto "start" es un sitio de control único en el que feromonas, tasa de crecimiento, disponibilidad de nutrientes y sucesos del ciclo celular previo ejercen un control sobre la reproducción celular (Revisado por Pringle y Hartwell, 1981). A partir de él, las células pueden seguir cuatro caminos diferentes según la naturaleza de la célula y su entorno:

- ciclo mitótico (Hartwell *et al.*, 1974);
- apareamiento (Reid y Hartwell, 1977);
- meiosis (Simchen, 1974), en células diploides que hayan completado el paso controlado por el gen *CDC4* (Hirschberg y Simchen, 1977);
- no proliferación o fase G0 (Hartwell, 1974).

G.C. Johnston *et al.* (1977a) llegaron a dos conclusiones importantes. En primer lugar, el crecimiento es el paso limitante de la proliferación celular. En segundo lugar, en ausencia de otros factores limitantes, el único requerimiento para atravesar el punto "start" es el crecimiento hasta una talla crítica.

Esto ha sido apoyado por muchos experimentos de los cuales destacaré los más significativos:

- Examinando la duración del ciclo mitótico en poblaciones celulares de distintos tamaños, se observó que las células más pequeñas pasan por una fase G1 más larga. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en el resto de las fases del ciclo (G.C. Johnston *et al.*, 1977a; Lord y Wheals, 1981, 1983).
- Alargando artificialmente el ciclo mitótico sin afectar al crecimiento, se producen células más grandes de lo normal. Se ha comprobado que estas células necesitan un período mucho más corto para dividirse de nuevo, lo que demuestra que la fase G1 es dispensable en estas condiciones (Singer y Johnston, 1981, 1983; G.C. Johnston y Singer, 1983).

Existen mutantes con un control alterado del tamaño celular, como son *whi1*, los cuales superan el punto "start" con un tamaño inferior al normal o *whi2*, los cuales no detienen su crecimiento en este punto cuando se les priva de nutrientes (Revisado por Wheals, 1987).

1.1.3.- Coordinación de sucesivos ciclos mitóticos.

Las células de levadura cuyo crecimiento ha sido detenido por una mutación *cdc* o un inhibidor de la división nuclear, no inician un nuevo proceso de síntesis de DNA o de emergencia de la yema. Sin embargo, aquellas células en las que se bloquean los procesos de citoquinesis, son capaces llevar a cabo nuevos ciclos de gemación, síntesis de DNA y división nuclear (Hartwell *et al.*, 1974). Estas observaciones sugieren que el comienzo de un nuevo ciclo depende de que se haya completado la división nuclear del ciclo anterior.

El SPB es la primera estructura que se modifica al entrar en la secuencia de sucesos de la división celular. Buscando una señal responsable de la finalización del punto "start", Pringle y Hartwell (1981) propusieron que ésta podría ser el aumento de la masa del SPB o de algún compuesto de éste. El SPB podría activar otros procesos que condujeran a la duplicación del DNA, gemación, etc, ya que, según estos autores, es potencialmente capaz de comunicarse con la superficie celular para iniciar la formación de los anillo de quitina y de microfilamentos, puesto que los microtúbulos emanan del SPB hacia la superficie celular. También es capaz de comunicarse con los cromosomas por medio de los microtúbulos o de algún punto de la membrana nuclear.

En *E. coli*, según el modelo elaborado por Donachie (1968), la fase "start" terminaría cuando alguna subunidad del SPB se hubiera acumulado en cantidad suficiente como para duplicar la masa del SPB, siendo este acúmulo proporcional a la cantidad total de proteína de la célula. Según este modelo, los productos de los genes *CDC28*, *36*, *37* y *39* podrían ser subunidades del SPB o proteínas necesarias para su ensamblaje.

1.1.4.- Papel del AMPc.

El AMPc es un factor de control muy importante del ciclo celular. En *S. cerevisiae* existe un sistema regulatorio basado en él (Thorner, 1982).

La concentración de AMPc endógena se mantiene mediante el equilibrio entre síntesis, por la adenilato ciclasa, y degradación, por la nucleótido cíclico fosfodiesterasa (Liao y Thorner, 1980, 1981).

Es hecho conocido que la adición de AMPc exógeno disminuye la detención del crecimiento en fase G1 (Liao y Thorner, 1980). También se sabe que el crecimiento en medios desrepretores de catabolitos, (los cuales deberían aumentar la concentración endógena de AMPc (Shuster, 1982a)), suprime las mutaciones *start cdc28*, *36* y *39*, y disminuye o elimina la detención del crecimiento en fase G1 producida por feromonas (Ruiz *et al.*, 1984). Por otra parte, el factor α inhibe la actividad de la adenilato ciclasa *in vitro*.

Estos resultados, junto con otros realizados sobre mutantes como *ste5* o *cdc36*, apuntan hacia un modelo en el que la concentración de AMPc *in vivo* es el determinante mayoritario del ciclo celular, aunque no el único.

Efectores externos e internos median su acción alterando las concentraciones de AMPc, las cuales afectan al grado de activación de proteín-quinisas dependientes de AMPc. Cada vez existen más pruebas de que la forma secuencial en que opera el ciclo celular podría deberse a un sistema de fosforilación en cascada, ya que la concentración de la mayoría de los productos de los genes *CDC* no varía mucho a lo largo del ciclo mitótico (Byers y Sowder, 1980).

Podría concluirse, de forma general, que altas concentraciones endógenas de AMPc hacen que el ciclo mitótico siga adelante, mientras que las bajas lo hacen detenerse, ya que regulan la actividad de las proteín-quinatas dependientes de AMPc, las cuales son muy importantes en el control del ciclo celular, tanto en levaduras como en células de mamíferos (Revisado por Wheals, 1987; Pardee, 1989; Nurse, 1990).

1.2.- APAREAMIENTO

Las células de *S. cerevisiae* de tipo sexual α segregan un dodecapéptido que es una feromona que actúa sobre células de tipo sexual a y detiene su crecimiento en fase G1. Sucede lo mismo, pero en menor grado, con el factor a (Revisado por Wheals, 1987).

La sincronización que producen las feromonas sobre las células de tipo sexual opuesto es un preludio de la fusión celular (Hartwell, 1973a). Una vez detenido el crecimiento, dos células de tipo sexual opuesto se aglutinan y se unen. Los núcleos se fusionan por el SPB (Byers y Goetsch, 1975; Delgado y Conde, 1984).

Deteniendo el crecimiento de células en distintas fases del ciclo mitótico por medio de mutantes *cdc* e induciendo el apareamiento, Reid y Hartwell (1977) averiguaron que sólo las células detenidas en el paso controlado por el gen *CDC28* (punto "start") son capaces de aparearse.

El tipo sexual de las células de *S. cerevisiae* viene determinado por los loci *MAT α* y *MAT a* , los cuales no sólo controlan el proceso de apareamiento, sino también el de esporulación, como se verá más adelante (Revisado por Herskowitz, 1988).

El proceso de apareamiento está siendo caracterizado genéticamente por medio de mutantes insensibles (mutantes *ste*) o extremadamente sensibles (mutantes *sst*) a la detención del crecimiento inducida por feromonas. Se han caracterizado varios genes, por ejemplo, *STE13*, el cual determina una dipeptidilaminopeptidasa involucrada en el procesamiento del factor α ; *STE2*, cuyo producto es el receptor del factor α ; *STE4* y *SST2*, los cuales controlan la actividad del receptor de feromonas; *STE8*, el cual regula la expresión del locus *MAT* (Revisado por Wheals, 1987).

1.3.- ESPORULACION EN *S. cerevisiae*.

Las células de *S. cerevisiae* pueden responder a la limitación de nutrientes saliendo del estado vegetativo y entrando en un estado de reposo (G₀). Para los diploides heterocigóticos para los loci *MATa* y α , una señal específica de falta de nutrientes puede desencadenar la meiosis, cuyo resultado sería la formación de 4 esporas haploides.

Las esporas son formas más resistentes que las células vegetativas a las condiciones ambientales adversas, por lo que el proceso meiótico es, en parte, un mecanismo para mejorar la supervivencia de las células en condiciones no óptimas para la proliferación.

De forma general, la transición del ciclo vegetativo a la meiosis es similar al proceso de diferenciación en el desarrollo de los organismos multicelulares. Después del cambio, las células están abocadas de forma irreversible a una ruta de expresión génica que conduce a un cambio en el desarrollo (Klar *et al.*, 1984).

1.3.1.- Cambios morfológicos producidos durante la esporulación.(Figura 4).

A las 4-6 horas de ser inoculadas las células en un medio de esporulación, las más grandes duplican su SPB. Esta duplicación coincide con la replicación del DNA, la cual es seguida rápidamente por la formación de los complejos sinápticos. Este estadio es la Paquitena de la Profase I meiótica y es común a la mayoría de los organismos con reproducción sexual.

A las 8-9 horas de incubación, los dos SPB se separan. Este estadio es la Metafase I de la profase meiótica. En ella no se observan los complejos sinápticos ni los cromosomas.

En la Anafase I se alarga el huso acromático y se duplican de nuevo los SPB. En la Metafase II, los SPB duplicados se separan y se observa un huso entre ellos. Se van formando las 4 paredes de las protoascosporas en el citoplasma de alrededor de cada uno de los SPB. La membrana nuclear permanece intacta mientras los dos pares de SPBs se van separando y migrando hacia cada ascospora en formación. Se desplazan también contenido citoplasmático y mitocondrias. El nucleolo, sin embargo, no se separa y queda en posición central.

Las paredes en formación van alargándose hasta cerrarse. Los SPBs se disocian de la pared y se forma un nucleolo en cada uno de los nuevos núcleos formados. Las ascosporas son alargadas en un principio, pero al madurar adquieren forma esférica y la pared se engrosa.

1.3.1.1.- Mitocondrias.

Las mitocondrias se agrupan durante la esporulación en un complejo altamente ramificado y reticulado (Stevens, 1978, 1981). Este complejo, en los primeros estadios de la esporulación, se sitúa principalmente cerca de la periferia de la célula. Durante las divisiones

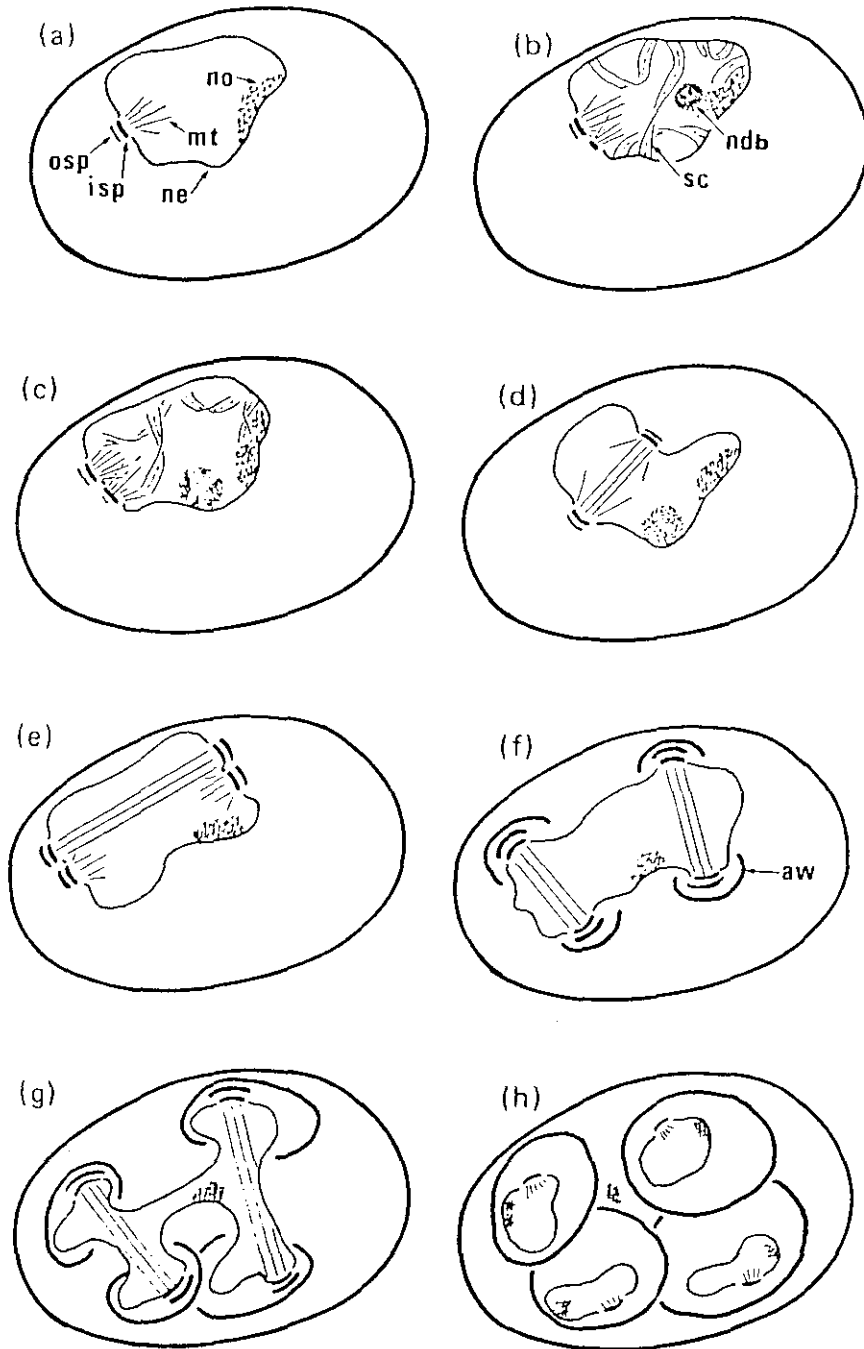


Figura 4.- Esquema de las diferentes etapas de la meiosis y la formación de las ascosporas en *S. cerevisiae*.

isp: placa interna del huso
 ndb: cuerpo nuclear denso
 no : nucleolo
 sc : complejos sinápticos

mt : microtúbulos
 ne : membrana nuclear
 osp: placa externa del huso

(Tomada de Miller, 1989).

nucleares rodea al núcleo, asegurándose así que parte del complejo mitocondrial queda incluido en las ascosporas.

Las funciones mitocondriales son esenciales en la esporulación, ya que *inhibidores de su función, como la eritromicina o la paromomicina, inhiben el proceso de esporulación*. Por otra parte, sólo unos pocos mutantes *mit* (deficientes en la respiración mitocondrial) son capaces de esporular (Pratje *et al.*, 1979; Hartig y Breitenbach, 1980).

Según Fritz (1955), la parte del complejo mitocondrial que no es incluida en las ascosporas (mitocondria epiplásmica) juega un papel importante en la maduración de la pared de la ascospora.

1.3.2.- Cambios químicos y metabólicos.

Al iniciarse el proceso de esporulación, se produce un rápido cambio en la operación de los ciclos del ácido tricarbóxico y del glioxilato, de tal manera que la mayoría del acetato captado es convertido en glutamato. A las pocas horas, la síntesis neta de glutamato cesa y se inicia la síntesis de trehalosa a través de productos intermedios derivados del ciclo del glioxilato (Esposito *et al.*, 1969). Para completar esta fase de la esporulación se requiere una secuencia de enzimas gluconeogénicas funcionales (Dickinson *et al.*, 1983), por lo que la mayoría de las mutaciones que afectan a las enzimas de la glicólisis (la mayoría son comunes a ambas rutas) afectan también a la capacidad de esporulación (Dickinson, 1988).

Durante el proceso de esporulación se produce un almacenamiento de carbohidratos, sobre todo de trehalosa, la cual puede aumentar hasta 100 veces con respecto a células vegetativas. Este aumento no es específico de la esporulación, porque células diploides lo acumulan también durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, es esencial para este proceso, ya que mutantes que no la almacenan son incapaces de esporular. También se acumula glucógeno, pero en menor grado y con cinética diferente (Revisado por Miller, 1989).

Durante la meiosis tiene lugar también un aumento de la síntesis de ácidos grasos, la cual no es absolutamente esencial, aunque se necesita para el desarrollo de la pared de las ascosporas (Esposito y Klapholz, 1981). *Aparentemente, el cambio bioquímico inicial que se produce al transferir la levadura al medio de esporulación va acompañado por una reducción de la actividad de la 2-oxoglutaratodeshidrogenasa. Las cepas mutantes spd, que presentan actividades reducidas de esta enzima, esporulan incluso en medios aptos para el crecimiento vegetativo. También necesita la levadura la actividad de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, la cual genera el NADPH requerido para la biosíntesis de ácidos grasos (Revisado por Dickinson, 1988).*

1.3.3.- Factores ambientales que controlan la esporulación.

1.3.3.1.- Medio de preesporulación.

Según la revisión hecha por Miller (1989), las células bien nutridas esporulan mejor que las que no lo están. La restricción de carbohidratos, nitrógeno o factores de crecimiento en el medio de preesporulación (MPE), disminuye el número de ascas.

La mayoría de los autores coincide en que las células incubadas en un MPE que contenga glucosa, deben crecerse hasta fase estacionaria antes de transferirse a un medio de esporulación (ME) con acetato con el fin de conseguir un alto número de ascas. Esto se debe a que la capacidad de esporulación depende en parte del desarrollo de propiedades oxidativas que se produce en las últimas fases de crecimiento en un medio con glucosa (Esposito *et al.*, 1969).

En cambio, usando un MPE que contenga otros carbohidratos como fuente de carbono, por ejemplo, glicerol o acetato, las células no requieren un período de adaptación respiratoria y producen un mayor rendimiento si son transferidas al ME en fase logarítmica.

1.3.3.2.- Medio de esporulación.

Las células de *S. cerevisiae* esporulan en condiciones nutricionales que no permiten la gemación (Hansen, 1899). Se ha comprobado que en agua las células esporulan en baja proporción y la mayoría de las ascas tienen sólo dos ascosporas (Revisado por Miller, 1989). Sin embargo, la adición al ME de la concentración adecuada de fuentes de carbono asimilables, aumenta enormemente la capacidad de esporulación. Estas concentraciones oscilan entre 0,01 y 0,1%. Concentraciones mayores disminuyen el rendimiento, efecto que se ha atribuido, según los autores, a la inhibición de la síntesis enzimática, a la represión de enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico y a la inhibición de las enzimas gluconeogénicas que producen estos azúcares asimilables (Miller, 1989). De los azúcares ensayados, la galactosa es la que menos inhibe la esporulación a concentraciones algo más altas, obteniéndose buenos rendimientos con un 1% (Miller, 1964).

Se han propuesto muchos MEs (Revisado por Miller, 1989). El más utilizado contiene acetato potásico al 1-2% en tampón o agua destilada. Si se busca el máximo número de ascas, deben añadirse un 0,1% de extracto de levadura y algún azúcar asimilable en la concentración adecuada.

1.3.3.3.- Oxígeno.

El oxígeno es necesario para que se lleve a cabo el proceso de esporulación, y existen numerosos experimentos que lo apoyan (Revisado por Miller, 1989):

- Inhibidores de las rutas oxidativas principales inhiben el proceso de esporulación.
- Mutantes deficientes en procesos de respiración son incapaces de esporular.
- Diversos inhibidores de la respiración mitocondrial (clorantfenicol, eritromicina, bromuro de etidio, oligomicina, paromomicina, diurón) impiden la esporulación.

Sin embargo, hay cepas capaces de esporular en condiciones anaerobias, por ejemplo, *Schizosaccharomyces japonicus* (Bulder, 1971).

1.3.3.4.- Temperatura.

Para *S. cerevisiae*, el rango de temperaturas óptimas para la esporulación oscila entre 3 y 35°C, existiendo variaciones dependiendo de la cepa (Revisado por Miller, 1989). La existencia de mutantes termosensibles para la esporulación (Esposito *et al.*, 1970), ha permitido un estudio más profundo del proceso de esporulación y de los genes implicados.

1.3.3.5.- Concentración de iones amonio.

Miller (1963b) demostró que el factor determinante para que el núcleo de la levadura sufriese división mitótica o meiótica era la presencia o ausencia de iones amonio. Freese *et al.* (1982) matizaron, que la inhibición de la esporulación a causa de estos iones se produce sólo si el suministro intracelular de carbón metabolizable y fósforo atómico no son limitantes.

Los estudios de Croes *et al.* (1978) y Opheim (1979) indican que los iones amonio inhiben el reciclaje de proteínas, proceso fundamental para la esporulación. Asimismo, un estudio de Dickinson y Williams (1986) demostró que la reducción de los niveles intracelulares de dichos iones produce un aumento de la gluconeogénesis, otro proceso también fundamental.

1.3.3.6.- Otros factores.

Existen otros muchos factores que influyen sobre el proceso de esporulación, como son: concentración de células, concentración de CO₂, pH, radiaciones, etc (Revisado por Miller, 1989).

Interesa destacar la influencia de radiaciones de ciertas longitudes de onda de los espectros UV, visible e ionizantes, las cuales inhiben el proceso de esporulación, siendo el período más sensible el de la síntesis premeiótica de DNA (Revisado por Miller, 1989). A estos efectos se debe la gran importancia que algunos genes *RAD* (reparadores de los efectos de las radiaciones sobre el DNA) tienen en el proceso de esporulación (Game *et al.*, 1980; Prakash, 1989).

1.3.4.- Regulación del inicio de la esporulación.

El inicio de la esporulación está controlado por dos mecanismos: el nutricional y el de tipo sexual.

A) Mecanismo de control nutricional.

El ambiente nutricional controla la iniciación de la meiosis actuando sobre factores internos, como pueden ser AMPc, GTP y otros desconocidos.

Los experimentos de Freese *et al.* (1982, 84) sugirieron que la disminución de las concentraciones intracelulares de GTP o S-adenosilmetionina (o compuestos relacionados) podría originar el proceso meiótico, ya que los niveles de dichos compuestos descienden en todas las condiciones de esporulación ensayadas. Estos mismos autores (1985) evidenciaron que en *Bacillus subtilis* el descenso específico de los niveles de GTP (o GDP) era suficiente por sí sólo para inducir la esporulación.

Existe también una clara relación entre AMPc y esporulación, como demostraron Matsumoto *et al.* (1983). Según ellos, el AMPc trabaja como un efector negativo en la iniciación de la meiosis mediante la activación de proteín-quinasas dependientes de AMPc. Los niveles de AMPc podrían ser importantes para que una célula diploide tome el camino de la esporulación o de la división mitótica. Estas conclusiones las sacaron de los estudios realizados con diversos mutantes afectados en la ruta del AMPc y meiosis, como por ejemplo *cyr1* (= *cdc35*) o *cdc25*. Tripp y Pinon (1986) concluyeron de datos genéticos que el gen *CDC25* (punto "start") controlaba la meiosis, en respuesta a estímulos nutricionales, modulando la ruta de síntesis del AMPc.

A pesar de que se requieren bajos niveles de AMPc para el inicio de la esporulación, se necesitan ciertos niveles mínimos de este compuesto en el momento de la formación de la pared de las ascosporas (Ishikawa *et al.*, 1986). Trabajos posteriores de Olempka-Beer y Freese (1987), podrían indicar que no se requiere una disminución de los niveles de AMPc para la esporulación de *S. cerevisiae*.

El control nutricional del proceso de esporulación involucra también a otros genes ya caracterizados, como son: *ARD1* (Whiteway y Szostak, 1985), *BCY1*, *CYR2*, *CYR3* (Matsumoto *et al.*, 1983), y *RAS2* (Toda *et al.*, 1985; Tatchell *et al.*, 1985).

Mutaciones en el gen de la adeniliclasa, *CYR1*, permiten la esporulación de células diploides en medio rico, apto para la proliferación celular. De igual manera, la superproducción de *CYR1* inhibe la esporulación incluso en condiciones de falta de nutrientes. El producto del gen *CYR1* es regulado de manera postranscripcional por las proteínas *RAS1* y *RAS2*, las cuales unen GTP y están asociadas a membranas (Malone, 1990). La disminución o ausencia de *RAS2*, confiere un fenotipo similar al de los mutantes *cyr1*, mientras que la superproducción inhibe la esporulación (Toda *et al.*, 1985; Tatchell *et al.*, 1985).

En cuanto a la transmisión de la señal del medio ambiente nutricional a *RAS2*, se conocen al menos dos componentes que actúan antes: *CDC25* e *IRA1*. El primero de ellos se necesita para formar el complejo activado RAS-GTP (Broek *et al.*, 1987), mientras que el segundo es requerido para dar lugar al complejo RAS-GDP, inactivo (Tanaka *et al.*, 1989).

B) Mecanismo de control de tipo sexual.

De este mecanismo de control son responsables los loci *MATa* y α , los cuales actúan antes de la síntesis premeiótica de DNA (Roth y Lusnak, 1970).

La esporulación como tal sólo tiene lugar en cepas diploides heterocigóticas para el locus *MAT*, sin embargo, algunos procesos relacionados con la esporulación pueden producirse en cepas homocigóticas (no esporogénicas o asporogénicas) (Hopper *et al.*, 1974; Vezinhet *et al.*, 1974), las cuales permiten estudiar los procesos específicamente regulados por ambos loci y, por tanto, específicos de la esporulación propiamente dicha.

Según los diferentes estudios realizados, los procesos específicos de la esporulación son: síntesis premeiótica de DNA, recombinación meiótica, división nuclear y descenso en los niveles de glucógeno. La degradación de RNA y proteínas sólo lo es parcialmente, ya que también tienen lugar en cepas asporogénicas, en las que aparecen incluso algunas ultraestructuras características del proceso de esporulación (Trew *et al.*, 1979).

Los loci *a* y α no necesitan encontrarse en el mismo núcleo para ejercer su función, ya que en experimentos realizados por Klar (1980) y Tsuboi (1981b) por medio de apareamientos de células diploides *a/a* y α/α con una célula *a* o α , respectivamente, se producía meiosis en el núcleo diploide sin que tuviera lugar fusión nuclear previa.

Los loci *MAT* regulan la entrada en meiosis por medio del gen *RME1*. En células *a/\alpha*, la actividad de los productos de los genes *a1* y *a2*, inhibe la síntesis del producto del gen *RME1*, el cual es un inhibidor de la meiosis. En cambio, en células haploides o asporogénicas se expresa este gen y se inhibe la meiosis (Revisado por Herskowitz, 1988).

El gen *RME1*, a su vez, regula de forma negativa al gen *IME1*, un inductor de la meiosis (Kassir *et al.*, 1988), el cual, a su vez, regula positivamente al gen *IME2* (Smith *et al.*, 1990). La sobreexpresión de cualquiera de los dos últimos genes permite el desencadenamiento de las funciones meióticas durante el ciclo mitótico.

Los mecanismos de control nutricional y de tipo sexual son inicialmente independientes, ya que los mutantes *rme1* requieren condiciones de escasez de nutrientes para entrar en meiosis (Kassir y Simchen, 1976). A su vez, los mutantes que interfieren con el control nutricional y que permiten la meiosis en un medio rico, requieren la expresión de los genes de los loci *MATa* y *MAT α* (Tatchell, 1986). El gen *IME1* es regulado por ambos mecanismos de

control y representa el primer punto conocido en el que convergen ambas rutas (Strich *et al.*, 1989). Además, es posible que haya otros genes involucrados.

1.3.5.- Control de la capacidad de esporulación por la edad y el tamaño celulares.

Calvert y Dawes (1984b) obtuvieron células de diferentes volúmenes y comprobaron que células de un tamaño mayor de $130 \mu\text{m}^3$ casi siempre esporulaban, en cambio, las de un tamaño menor de $26 \mu\text{m}^3$ nunca lo hacían, a pesar de que células más pequeñas son capaces de gemar. Realizaron también experimentos con mutantes *whi1*, los cuales normalmente no esporulan, y comprobaron que esta incapacidad se debe a su pequeño tamaño, ya que si se aumenta su tamaño creciéndolos en presencia de hidroxíurea, éstos mutantes forman gran cantidad de ascas en ME.

La edad celular también influye, ya que se ha comprobado que yemas tan grandes como las células madres esporulan con mucha menos frecuencia que las parentales (Haber y Halvorson, 1972a; Hartig y Breitenbach, 1977). Parece improbable que sea el número de cicatrices de gemación lo que indique la capacidad de esporulación, ya que, según demostraron Kopecká (1974) y Tsuboi (1981a y b), los esferoplastos pueden esporular.

1.3.6.- Número de esporas por asca. Esporulación Apomictica.

Gran número de factores hereditarios y ambientales influyen el número de esporas por asca. En *S. cerevisiae*, el número de esporas por asca varía de 1 a 4, siendo raros los casos de más esporas. La formación de ascas con más de 4 ascosporas puede ser estimulada por diversos factores nutricionales y químicos (Revisado por Miller, 1989). También pueden conseguirse este tipo de ascosporas por medio del apareamiento diploides a/a o α/α con cepas haploides α y a , respectivamente, las cuales dan lugar a 6 ascosporas por asca (Klar, 1980; Tsuboi, 1981b).

La aparición de dos esporas por asca es un hecho más corriente, ya que pueden inducirla numerosos factores, como por ejemplo, la falta de nutrientes, el aumento de la densidad celular en el ME, la temperatura o el bromuro de etidio. La edad celular también influye, ya que la mayoría de las ascas que se desarrollan a partir de células que todavía no han gemado contienen principalmente dos ascosporas (Revisado por Miller, 1989).

En un asca con dos ascosporas, cada una contiene un único núcleo haploide y, normalmente, pueden apreciarse dos núcleos más en el epiplasma. Las paredes de las esporas no se forman alrededor de dos núcleos al azar, sino que lo hacen de forma predominante alrededor de dos núcleos no hermanos, es decir de tipo sexual opuesto, lo que permite restablecer el estado diploide cuando las condiciones ambientales permitan la germinación (Revisado por Miller, 1989). Esta capacidad supone una adaptación del proceso meiótico al medio ambiente, ya que, cuando las células se ven limitadas en su capacidad de producción de

componentes de las esporas, adquieren una ventaja selectiva si se inicia la producción de dos ascosporas solamente (Davidow y Goetsch, 1978).

Existen muchos mutantes afectados en el número de esporas por asca, por ejemplo:

- Uno *et al.* (1985) estudiaron mutaciones que permitían la iniciación de la meiosis con formación de 4 núcleos haploides, de los cuales sólo dos eran rodeados de pared a la temperatura restrictiva. En este caso, la elección de los núcleos era al azar. Los resultados de los experimentos indicaron que la mutación estaba relacionada con la ruta del AMPc y que se formaban frecuentemente sólo dos ascosporas por asca debido a la falta de un nivel suficiente de este nucleótido en el momento de la formación de la pared de las esporas.

- Wagstaff *et al.* (1982) estudiaron otro tipo de mutantes que producían ascas con dos esporas a pesar de ser haploides, pero era porque eran disómicos para el cromosoma III, el cual porta los loci *MAT*.

Esporulación Apomítica.

Existe una serie de mutantes que producen ascas con dos esporas diploides debido a que sólo dividen su núcleo una vez durante la meiosis. Guilliermond descubrió este tipo de fenómenos en *S. cerevisiae* en 1903. En 1972, Grewal y Miller describieron tres cepas de *S. cerevisiae* con dicho fenotipo. Este tipo de fenómenos se incluyeron dentro de la APOMIXIS, término que se aplicó por primera vez en 1928 (Gäumann y Dodge) al desarrollo vegetativo de células sexuales de hongos sin que haya existido fusión de núcleos o fertilización.

Se ha demostrado la existencia de apomixis también en cepas de *Lipomyces starkeyi* y *L. Kononekoe* (Henninger y Emeis, 1974) y en *Schizosaccharomyces pombe* (Nakaseko *et al.*, 1984).

En un intento de conocer el mecanismo por el cual se produce la esporulación apomítica, los trabajos ultraestructurales de Moens (Moens *et al.*, 1977) y Marmiroli *et al.* (1981) demostraron que la única división nuclear de las ascas apomíticas se asemejaba en las primeras etapas a la meiosis I típica de la esporulación normal de *S. cerevisiae*. Sin embargo, después de un tiempo, en el huso acromático y en el núcleo aparecían las marcas características de la meiosis II. Moens (1977), combinando técnicas genéticas y estructurales, evidenció que se produce profase con sinapsis y recombinación, pero los cromosomas homólogos no se segregan durante la anafase de la meiosis I, entrando entonces en la meiosis II, segregándose centrómeros hermanos y produciéndose dos núcleos diploides. Klapholz y Esposito (1980) confirmaron estas observaciones en un análisis genético de la cepa 4117 (una de las descritas por Grewal y Miller en 1972), en la que encontraron niveles de recombinación comparables a los normales en la meiosis. Estos mismos autores identificaron dos alelos recesivos, no ligados, de la cepa 4117,

cada uno de los cuales era capaz de producir apomixis por sí sólo. Se trata de las mutaciones *spo12-1* y *spo13-1*.

Los estudios realizados por Bilinski y Miller (1980) con una cepa diploide homocigótica para la mutación *spo12-1* (cepa 19el, descrita por Grewal y Miller en 1972) demostraron que el aumento de: la concentración de la fuente de carbono asimilable en el MPE, el porcentaje de acetato, y los niveles de Zn en el ME, inducía la meiosis completa en la mayoría de las células de dicha cepa.

Marmioli y Bilinski (1985) estudiaron el efecto de inhibidores de los procesos mitocondriales de respiración y síntesis de proteínas en cepas apomícticas puestas en condiciones que permitieran apomixis y meiosis completa. Descubrieron que estos inhibidores afectaban en mayor medida al proceso de meiosis que a la apomixis. Esto indica que las mutaciones presentes en estas cepas (*spo12-1*, *spo13-1*) hacen que el proceso de esporulación sea independiente del paso sensible a inhibidores mitocondriales (eritromicina) de la profase I (Miller, 1964). Esta posibilidad está apoyada por la observación de que la meiosis completa de una cepa apomíctica puede alcanzarse por otro tratamiento: "heat shock" en el medio de preesporulación (Bilinski y Miller, 1985). Este efecto del tratamiento de choque es impedido por la adición de un inhibidor de la función mitocondrial al MPE.

Otros tratamientos capaces de restaurar la capacidad para la división nuclear meiótica son el crecimiento en MPE a 36°C y exposición durante las primeras horas de incubación en ME a temperaturas de 18 o 36°C o a cicloheximida. Esto indica que la inducción de la meiosis en cepas apomícticas parece requerir una limitación de la síntesis de proteínas durante las primeras etapas de la esporulación (Bilinski et al., 1983, 1987c).

Sora y Bianchi (1982) indujeron un aumento de la esporulación apomíctica adicionando al ME cafeína, la cual inhibe la segunda división meiótica.

Como se ha visto, la frecuencia de aparición de la apomixis en este tipo de cepas está muy influenciada por las condiciones ambientales. Se ha descrito la capacidad de elección por parte de un organismo entre reproducción sexual o asexual dependiendo del medio ambiente en que se encuentre, tanto en plantas (Heslop-Harrison, 1961) como en animales (Suomalainen et al., 1976; Hebert, 1978). Por tanto, la apomixis podría tratarse de un mecanismo de adaptación de la forma de reproducción de la levadura a las condiciones ambientales.

Mutaciones *spo12-1* y *spo13-1*

Son las mutaciones apomícticas más estudiadas.

La mutación *spo13-1* es una mutación "ocre" (Klapholz y Esposito, 1980). Durante la única división meiótica que se produce en los diploides homocigóticos para dicha mutación, tienen lugar los siguientes procesos de la meiosis I: síntesis premeiótica de DNA, apareamiento de cromosomas homólogos y recombinación meiótica. Falla, sin embargo, la segregación de los cromosomas. Se ha comprobado que para llevar a cabo la esporulación apomíctica no son

necesarios los procesos de apareamiento de cromosomas homólogos ni de recombinación meiótica (Malone y Esposito, 1981; Klapholz *et al.*, 1985), hecho que viene avalado por la observación de que la mutación *spo13-1* permite la esporulación de haploides que contengan ambos loci *MAT*, luego las cepas *spo13-1* no necesitan que se produzca el apareamiento de cromosomas para esporular. Sin embargo, esto no ocurre en mutantes *spo12-1* con las mismas características sexuales (Wagstaff *et al.*, 1982). Estos y otros experimentos indican que, aunque sus fenotipos terminales son iguales, se trata de mutaciones diferentes en su punto y mecanismo de aparición.

El gen *SPO13* ha sido aislado y secuenciado (Wang *et al.*, 1987; Buckingham *et al.*, 1990) y se le han asignado varios papeles posibles:

- a) desarrollo del huso acromático durante la meiosis I o de la unión a éste de los cromosomas homólogos sin duplicar;
- b) regulación de la duplicación del centrómero;
- c) regulación del inicio de la meiosis.

El gen *SPO12* también ha sido aislado y secuenciado (Malavasic y Elder, 1990), pero no se le ha asignado aún una posible función.

No se ha observado efecto de ninguno de estos dos genes sobre la división mitótica (Klapholz y Esposito, 1980) ni se ha detectado transcripción en fase vegetativa (Wang *et al.*, 1987; Malavasic y Elder, 1990). El gen *SPO13* alcanza un máximo de expresión a las 3-4 horas de incubación en ME (momento de la segregación de los cromosomas durante la meiosis I), y luego desciende. No se necesitan altos niveles de transcripción para la correcta realización de su función. Los transcritos se detectan también en cepas asporogénicas (a/a y α/α), aunque en niveles más bajos, y se induce su expresión por la falta de nutrientes (Wang *et al.*, 1987). El máximo del transcrito del gen *SPO12* aparece más tarde, a las 6 horas de incubación en ME (Malavasic y Elder, 1990).

El gen *SPO13* contiene una secuencia de 10 pares de bases encontrada en otros genes específicos de la meiosis:

TAGCCGCCGA

Esta secuencia es necesaria para la realización de su función y está situada a -90 pares de bases del ATG de iniciación. Mutaciones en esta secuencia dan lugar a una pérdida de la inducción específica de meiosis del gen *SPO13* y permiten su expresión durante el ciclo mitótico (Buckingham *et al.*, 1990).

1.4.- RELACION MITOSIS-MEIOSIS.

Un objetivo importante dentro del estudio del ciclo biológico de *S. cerevisiae* ha sido conocer cómo regula esta levadura los cambios que se producen cuando una célula que está en fase de crecimiento vegetativo inicia un proceso de meiosis. Para ello es necesario identificar cambios específicos del proceso.

Según Esposito, deben existir unos 200 genes *SPO* (genes requeridos para la esporulación) y se han identificado transcritos y proteínas específicos de dicho proceso (Revisado por Wang *et al.*, 1987). Asimismo, Percival-Smith y Segall (1984) identificaron 14 genes específicos de esporulación y Wright y colaboradores (Ajam *et al.*, 1981) también encontraron cambios cuali y cuantitativos únicos de células en este proceso. Weir-Thompson y Dawes (1984) estudiaron cambios producidos en las especies de mRNA de *S. cerevisiae* asociadas a meiosis y esporulación, encontrando que se producían muchos cambios específicos, aunque sólo 4 fueron debidos a nuevos transcritos. El resto se debía a numerosas alteraciones en la cantidad de diversas especies de mRNA. Según estos autores, el porcentaje de mRNAs específicos de esporulación que son sintetizados "de novo" o que muestran un aumento de su concentración es de un 4,3% del total de las especies detectadas.

La mayoría de los cambios producidos tienen lugar entre las 4-8 horas de incubación en ME, en el momento correspondiente a sucesos como división meiótica, comienzo de la formación de las esporas o degradación del glucógeno, los cuales se producen a partir de las 4 horas de incubación en ME. También se producen algunos pequeños cambios en las 2 primeras horas, período correspondiente a las síntesis de DNA, RNA y proteínas, comienzo de la recombinación, aumento de las actividades RNasa y proteinasa (Revisado por Weir-Thompson y Dawes, 1984). Muy pocos de estos procesos son exclusivos de la esporulación, luego no es sorprendente que los cambios que se producen en este período se deban en su mayoría a aumentos en las cantidades de algunas especies de mRNA ya presentes en la célula vegetativa.

Existen algunos ejemplos de genes específicos del proceso meiótico y de los que no se ha detectado expresión ni efecto alguno sobre el ciclo vegetativo:

- *SPO13* (Wang *et al.*, 1987; Buckingham *et al.*, 1990),
- *SPO12* y *SPO16* (Malavasic y Elder, 1990),
- *RED1* (Thompson y Roeder, 1989), etc.
- *SSG1* (Dr. Francisco del Rey, comunicación personal)

Como ya se ha dicho antes, se han identificado secuencias que se encuentran presentes únicamente en genes específicos de esporulación. Una de ellas ha sido descrita ya en el apartado anterior (Buckingham *et al.*, 1990). De forma sorprendente, una secuencia muy similar a ésta ha sido identificada como represora de la transcripción durante el ciclo mitótico. Esta secuencia, URS1 ("upstream repressor sequence"), está presente en varios genes de levadura y

se ha demostrado que reprime la transcripción de genes como *CAR1*, *SSA1*, *ENO1* durante el crecimiento vegetativo (Revisado por Buckingham *et al.*, 1990).

Sin embargo, como ya se ha visto antes, gran cantidad de genes involucrados en el ciclo mitótico de *S. cerevisiae* son necesarios durante el proceso de esporulación. Los estudios de Simchen (1974) realizados sobre la capacidad de esporulación de cepas diploides portadoras de diversas mutaciones *cdc*, tanto en homo como en heterocigosis, le permitieron dividir las mutaciones *cdc* en 4 categorías según su efecto sobre el proceso de esporulación:

a) Sin efecto: *cdc1*, 3, 6, 10, 11, 15 y 24.

b) Esporulación normal de diploides homocigóticos a la temperatura permisiva y pobre o ninguna a la temperatura restrictiva: *cdc2*, 4, 5, 9, 13 y 14.

c) Esporulación pobre a ambas temperaturas de diploides homocigóticos: *cdc7*, 8, 16, 17, 20, 23 y 28.

d) Esporulación pobre en homo y heterocigosis: *cdc7-4*.

Si nos fijamos en el esquema de la Figura 3, vemos que aquellos mutantes *cdc* del grupo a son aquellos que están involucrados en procesos que nada tienen que ver con la esporulación : emergencia de la yema y citoquinesis. Sin embargo, los relacionados con los procesos de síntesis y migración de DNA, división nuclear, etc, sí pueden afectar al proceso de esporulación. Por ejemplo, el gen *CDC21*, el cual codifica la timidilato sintetasa (Revisado por Pringle y Hartwell, 1981) es necesario para la síntesis de DNA en ambos procesos.

Existen otros muchos genes involucrados en ambos procesos, por ejemplo:

- *NDC1*: gen requerido para la separación de los cromosomas en el huso acromático (Thomas y Botstein, 1986).

- *TOP2*: gen de la topoisomerasa 2, requerida durante el ciclo mitótico para la separación de las cromátidas hermanas en el momento de la segregación cromosómica y en la esporulación para la resolución de los complejos de recombinación cromosómica formados en la meiosis I (Rose *et al.*, 1990).

No es, por tanto, extraño el encontrar mutaciones que afecten a ambos ciclos y genes cuya estructura y función sean similares pero cuyos productos actúen en ciclos diferentes.

2.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.

S. cerevisiae, al contrario que otros microorganismos, que se lisan al llegar a la fase estacionaria, mantiene su integridad incluso después de largos períodos en esta fase (Torres *et al.*, 1984). Esto indica que el control de los procesos autolíticos debe ser estricto en esta levadura. Por ello, el estudio de mutantes autolíticos termosensibles de *S. cerevisiae* es una línea muy importante a seguir para el conocimiento de los procesos morfogenéticos y los controles a los que están sometidos los sistemas autolíticos.

Dentro de este abordaje experimental, se encuentra el trabajo de Torres (1990) en el que ha sido caracterizada una mutación autolítica termosensible *lyt2-1* y se ha aislado y secuenciado un gen supresor de esta mutación, *SLT2*, que codifica una serín/treonín quinasa.

También dentro de esta misma estrategia experimental se encuadra este trabajo, cuyos objetivos son :

1.- Caracterización del fenotipo autolítico termosensible que determina la mutación *lyt1-1*, y de su efecto en el ciclo biológico de *S. cerevisiae*.

2.- Clonación y caracterización del gen o genes capaces de complementar dicho fenotipo.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES.

1.1.- PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

Los productos que se emplearon en este trabajo fueron suministrados por las siguientes firmas comerciales:

Los productos químicos procedían de Merck (Darmstadt. RFA), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri. USA), Fluka (Buchs, Suiza), Probus (Barcelona), BDH (Poole, Gran Bretaña) y Panreac (Barcelona). Los productos para medios de cultivo eran de Difco (Detroit, Michigan USA) y Oxoid (Basingstoke, Hampshire. Gran Bretaña). Los productos para electroforesis de ácidos nucleicos eran de Merck, Sigma Chemical Co., Boehringer Mannheim GmbH (Penzberg. RDA), Bio-Rad Laboratories (Richmond. USA), BRL Inc. (Gaithersburg, Maryland. USA) y Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala. Suecia). Los productos radiactivos procedían de Amersham International (Amersham. Gran Bretaña). Las membranas de nylon eran de Pall Biodyne A. Los deoxi y dideoxinucleótidos iban incluidos en el sistema de secuenciación de Pharmacia LKB Biotechnology, así como la enzima DNA polimerasa del bacteriófago T7 y los oligonucleótidos iniciadores ("primers").

La preparación enzimática Glusulasa era de Endo Laboratories Inc. (Wilmington, Delaware. USA). Los productos de biología molecular, tales como DNA del bacteriófago lambda digerido con Hind III, así como los patrones de pesos moleculares de plásmidos eran de Sigma Chemical Co., BRL Inc y New England Biolabs (Beverly, Massachusetts. USA). El DNA de esperma de salmón y el tRNA eran de Sigma Chemical Co. Las endonucleasas de restricción, se adquirían de New England Biolabs, BRL Inc. y Boehringer Mannheim GmbH.

La enzima RNasa era de Sigma Chemical Co. El sistema de Nick-translation fue suministrado por Amersham International. La enzima DNA ligasa del fago T4, era de BRL Inc y de Boehringer Mannheim GmbH, así como la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP). La lisozima era de Sigma Chemical Co. La glucosa-oxidasa era de Merck y la peroxidasa (Tipo II) era de Sigma Chemical Co. Las películas para autorradiografía eran de Kodak. El revelador y fijador fotográfico eran de Valca. La hidroxurea fue suministrada por Fluka.

1.2.- EQUIPO INSTRUMENTAL.

El equipo utilizado en la realización de este trabajo constó de los siguientes aparatos:

- Agitadores: Supermixer y Heidolph Reax 2000.
- Autoclaves: Selecta y Clinomatic.
- Balanza de precisión: Sauter D-7470.

- Baños termostatzados: Selecta Frigiterm; SBS y TFB.
- Baños de agitación: Selecta Unitronic 320 y New Brunswick Scientific G-76.
- Campana de flujo laminar: Cruma "Captair".
- Centrifugas: Beckman J2-21 y Medifuge (Heraeus); Selecta; MSE; Sigma 101M; Biofuge A (Heraeus) y Sorvall Microspin 24.
- Citómetros de flujo:
FACScan de Becton-Dickinson.
FACStar PLUS de Becton-Dickinson.
- Congeladores: Philips y Selecta (-20°C) y Herafreeze (Heraeus) (-80°C).
- Contador portátil Geiger: Mini-monitor GM tube.
- Contador de centelleo líquido: Philips PW 4700.
- Cubeta de electroforesis de ácidos nucleicos: Bio-Rad wide minisubcell, Bio-Rad subcell y BRL H6.
- Cubeta de secuenciación de DNA: Bio-Rad Sequi-gen sequencing cell 21x40.
- Equipo fotográfico: Polaroid MP4 Land Camera.
- Espectrofotómetros: Beckman 35 y Bausch-Lomb Spectronic 20.
- Estufas de cultivo a 24°C y 37°C: Heraeus electro- nic.
- Fermentador: Braun Biostat E, equipado con vasija de 10 l.
- Fuentes de alimentación: LKB 2197, Bio-Rad 250/215 y Bio-Rad 2000/200.
- Granatarios: Mettler Pc-400, Bosch P115 y Precisa 310 C-3010 D.
- Máquina productora de hielo: Scotsman AF-10.
- Metalizador: Polaron.
- Micromanipulador: Leitz acoplado a microscopio Wild de contraste de fases.
- Microscopios ópticos: Nikon Optiphot con contraste de fases, fluorescencia y equipo fotográfico HFX y Wild con contaste de fases.
- Microscopio electrónico de barrido: ISI SX25.
- Negatoscopio: Carril.
- Neveras a 4°C : Verdereca y Kelvinator.
- pHmetros: Meteor 996 y Crison micropH 2002.
- Secador de geles: BioRad 483 acoplado a una bomba de vacío Telstar MS-5.
- Selladora para plástico: Melitta Ibérica S.A.
- Sistema de filtración: Millipore.
- Sistema de purificación de agua: Millipore (Milli-Q y Milli-Ro4).
- Transiluminador de U.V.: Ultraviolets Products Co.
- Triturador homogeneizador: Stomacher Lab-Blender 400.

1.3.- MATERIAL BIOLÓGICO.

1.3.1.- Microorganismos.

Las Tablas I y II contienen todas las características genéticas y procedencia de las cepas utilizadas en este trabajo.

1.3.1.1. Cepas de *E. coli*.

Se utilizaron siempre cepas Rec-.

La cepa DH5 fue la receptora de la transformación con DNA recombinante cuando se requería alta frecuencia de transformación (Hanahan, 1985). La cepa DH5 α es igual a la anterior, pero es portadora de una delección en el operón *lac*.

La cepa JM109 por carecer también de parte del operón *lac*, se empleó al igual que la DH5 α en experimentos de transformación con vectores tales como pEMBL18 y 19 y pIC20H, portadores del gen de la β -galactosidasa. La cepa HB101, se ha utilizado como receptora de la transformación por el método de Mandel y Higa (1970).

1.3.1.2.- Cepas de *S. cerevisiae*.

Las cepas S288C y 373 son estirpes silvestres ampliamente empleadas. De la primera de ellas se ha establecido el mapa genético más completo que existe de esta especie (Mortimer y Contopoulou, 1989). Se utilizaron ambas como referencia en varios experimentos y fueron cruzadas con estirpes mutantes cuyo tipo sexual quería determinarse.

Las cepas 6657-9b y TD-28 fueron empleadas como donadoras de los marcadores *leu2-3-112* y *ura3 Δ 52*, respectivamente, por cruces con cepas que portaban el carácter *Lyt*⁺, y como control silvestre para el carácter autolítico.

La cepa DBY-746, poseedora del marcador *trp1-28a*, mutación "ámbar", sirvió para realizar la comprobación de que el gen que se había clonado no era un gen supresor "ámbar" (Fischhoff *et al.*, 1984; Calderon *et al.*, 1984).

La cepa L2, portadora de la mutación autolítica termosensible *lyt1-1*, fue utilizada inicialmente como donadora de dicho carácter, así como para realizar los estudios preliminares de caracterización de la mutación. De ella descienden las cepas utilizadas para la realización del presente trabajo, L2C34d, L2C28c y L2C24d, cuyas características se detallan en la Tabla I.

TABLA I

CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
S288C	<i>MATα, mal, gal2</i>	Dr.M.O.Halvorson Brandeis Univ. Waltham. Massachusetts
373	<i>MATα, ade2</i>	Dr. A. Jimenez, C.B.M. Madrid.
TD-28	<i>MATα, ura3Δ52, inos1-131, can^R</i>	Dr. F. del Rey, Fac. Ciencias, Univ. Salamanca.
6657-9b	<i>MATα, leu2-3,112, his4Δ34</i>	Idem.
DBY-746	<i>MATα, trp1-28a, leu2-3,112, ura3Δ52, his3Δ1</i>	Idem.
L2	<i>MATα, lyt1-1</i>	Dr. Cabib, N.I.H. Bethesda, Maryland.
L2C16b	<i>MATα, lyt1-1</i>	Derivado meiótico de L2.
L2C24d	<i>MATα, lyt1-1, ura3Δ52</i>	Idem.
L2C34d	<i>MATα, lyt1-1, leu2-3,112, his4Δ34</i>	Idem. Este trabajo.
D (C34dx8c)	<i>MATα/α, lyt1-1/lyt1-1</i>	Este trabajo.

DU (C24dx8c)	<i>MATa/α, lyt1-1/lyt1-1, ura3Δ52/ura3Δ52</i>	Este trabajo.
6C (L3c46c)	<i>MATa, lyt2-1, leu2-3,112, ura3Δ52, his4Δ34</i>	Dra. L. Torres, Fac. Farmacia, U.C.Madrid.

TABLA II

CEPAS DE *Escherichia coli*

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
DH5	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, (rk⁻, mk⁺), xif, F</i>	Hanahan, 1985
DH5α	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, (rk⁻, mk⁺), relA1, φ80^R, lacZΔM15, F</i>	Ramón, 1987
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA1, λ⁻, Δ(lac-pro A,B) [F'tra D36proA,B lac I^q ZΔM15]</i>	Yanish-Perron, 1985
HB101	<i>hsd_R, hsd_M, recA13, supE44, lacZ4, leuB6, proA2, thi1, Sm', ara 14, galK2, xyl 15, mtl1, F, λ⁻</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969

La cepa L3C46c, poseedora de la mutación *lyt2-1*, fue utilizada para los diferentes experimentos en los que necesitamos una mutación autolítica termosensible diferente de la nuestra como control.

1.3.2.- Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo son los que se describen a continuación.

- YEp13 (Broach *et al.*, 1979) (Figura 5).

Es un vector episómico de levadura que deriva del plásmido de *E. coli* pBR322 (portador de los genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina, y de un origen de replicación para esta bacteria) al cual se le ha añadido en el que se encuentra el replicón de la forma B del plásmido de 2μ de *S. cerevisiae* y un fragmento del plásmido pYE*leu10* (Ratzkin y Carbon, 1976) que incluye el gen *LEU2* de levadura. Es el vector al que va ligada la genoteca genómica de *S. cerevisiae* empleada en este trabajo.

- YEp352 (Hill *et al.*, 1986) (Figura 6).

Es un vector episómico de levadura. Procede del vector de *E. coli* pUC18 (Vieira y Messing, 1982; Yanish-Perron *et al.*, 1985). Posee el gen estructural de la β - galactosidasa *lacZ*, el gen de resistencia a ampicilina, y una zona con múltiples sitios de clonación (MCS). Además se le ha añadido el fragmento del plásmido de 2μ , que porta el replicón de la forma B, así como el gen *URA3*, de levadura.

- YCp50 (Jonston y Davis, 1984; Rose *et al.*; 1987) (Figura 7).

Es un vector centromérico de levadura que deriva del pBR322. Posee el gen *URA3* de levadura, un fragmento de DNA de *S. cerevisiae* que incluye la secuencia de replicación autónoma ARS1 y la región centromérica del cromosoma IV de *S. cerevisiae* *CEN4*.

- pEMBL18 y 19 (Dente *et al.*, 1983) (Figura 8).

Forman parte de una familia de vectores de *E. coli*, que provienen de la serie pUC, (por lo cual poseen el gen *lacZ*, el gen de resistencia a ampicilina y un MCS). Además poseen dos regiones, a ambos lados del MCS, complementarias de oligonucleótidos comerciales, UP y RUP, empleados como iniciadores de cadena. Se pueden utilizar para secuenciar fragmentos de DNA por el método de Sanger (1977).

-Bluescript KS y SK (Stratagene, Cultek) (Figura 9).

Son plásmidos bacterianos que, al igual que los vectores pUC, son portadores del gen de resistencia a ampicilina, el operón *lac* y una zona de cortes múltiples (MCS). Además, poseen dos regiones a ambos lados del MCS complementarias de oligonucleótidos comerciales, UP y RUP empleados como iniciadores de cadena. Se utilizaron para secuenciar fragmentos de DNA por el método de Sanger *et al.* (1977).

1.3.3.- Genoteca genómica de *S. cerevisiae*.

La genoteca genómica de *S. cerevisiae* utilizada en este trabajo (cedida por el Dr. F. del Rey), fue construida por Nasmith y Tatchell (1980) mediante digestión parcial del DNA total de *S. cerevisiae* AB320 ($\alpha/a ho$, *ade2-1*, *can1-100*, *leu1-12*, *lys2-1*, *met4-1*, *trp5-2*, *ura3-1*), con Sau3A y posterior ligación de los fragmentos obtenidos al único punto BamHI del vector YEp13.

1.4.- MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo se esterilizaban a 121°C durante 20 minutos, o bien por filtración. A los medios sólidos se les añadía Bacto-agar, a una concentración final de 20 g/l y a los semisólidos 7.5 g/l. El agua empleada en la fabricación de los medios era destilada.

1.4.1.- Medios y soluciones de antibióticos para *E. coli*.

LB (Luria-Bertani).

Medio rico para el crecimiento de la bacteria.

Composición:

. Bacto-triptona.....	10 g/l.
. Extracto de levadura....	5 g/l.
. NaCl.....	10 g/l.

El pH se ajustaba a 7,5 con NaOH 0.1 N

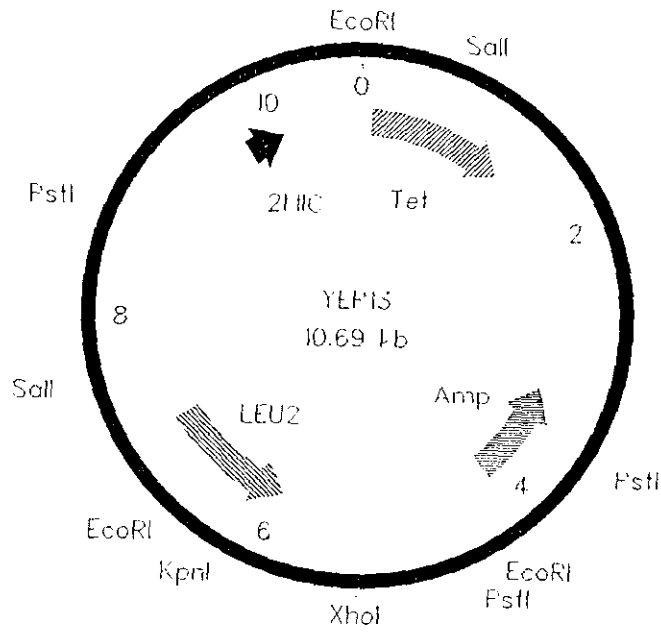


Figura 5.- Mapa físico del plásmido YEp 13.

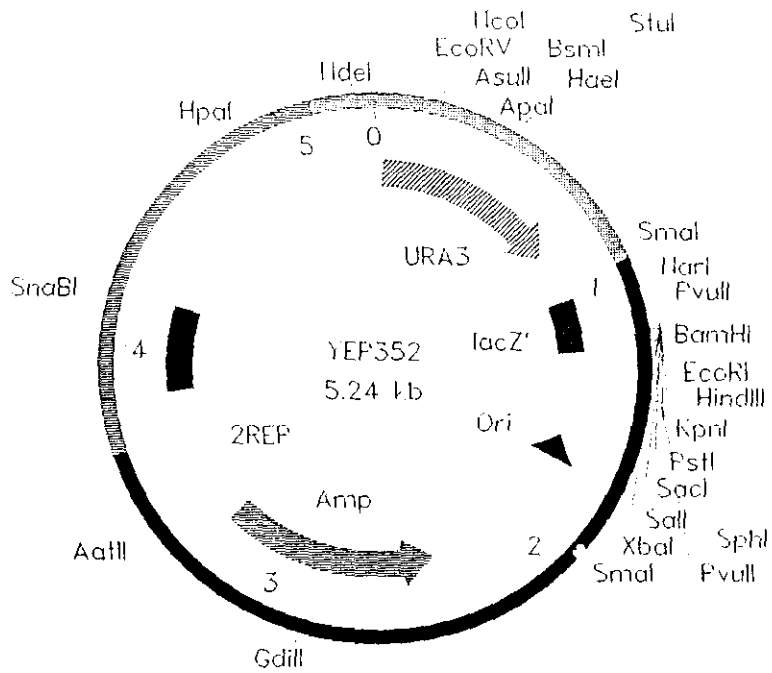


Figura 6.- Mapa físico del plásmido YEp 352.

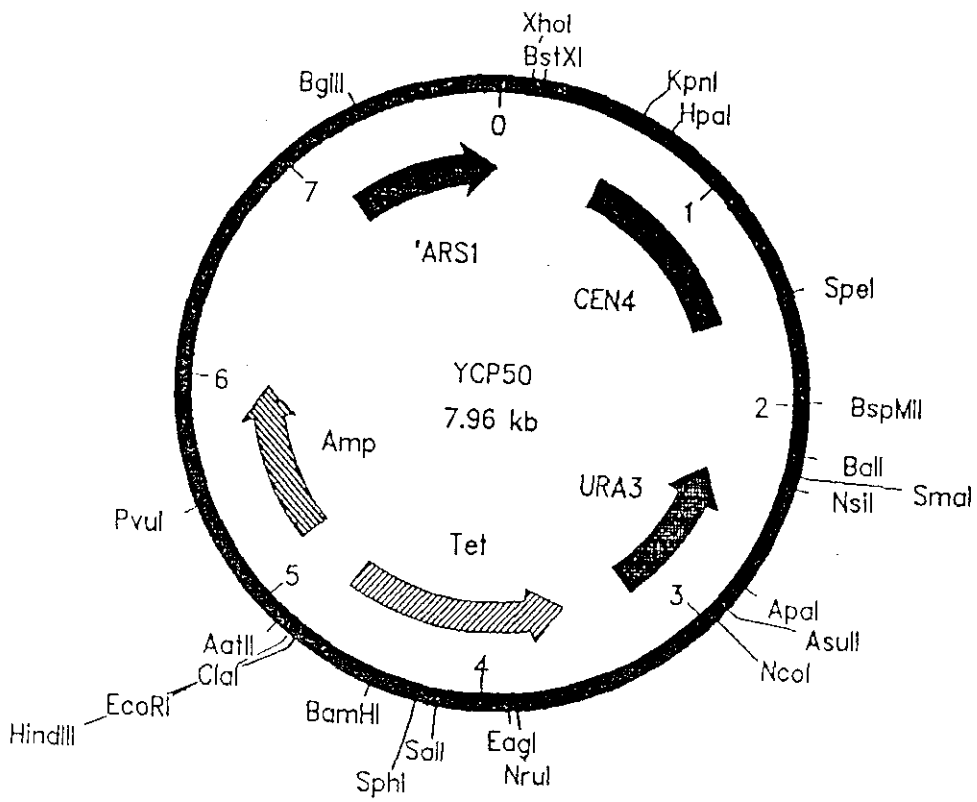


Figura 7.- Mapa físico del plásmido YCp 50.

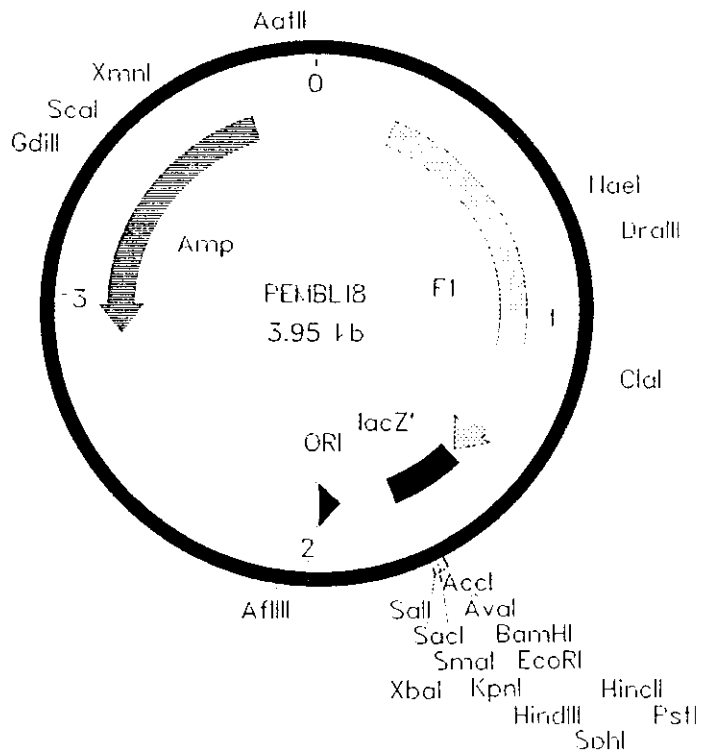


Figura 8.- Mapa físico del plásmido pEMBL 18.
El plásmido pEMBL 19 tiene el MCS en sentido contrario.

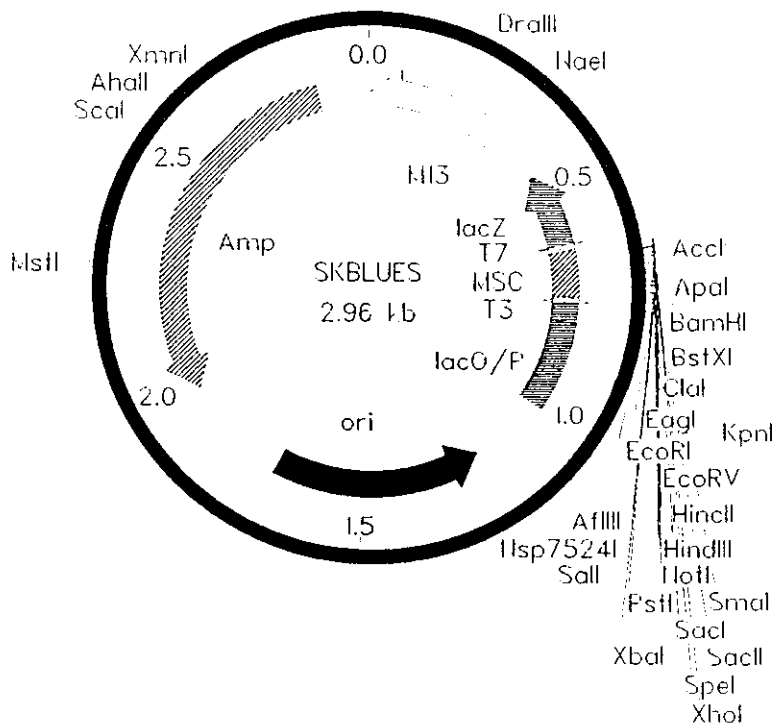


Figura 9.- Mapa físico del plásmido Bluescript SK.

SOB

Se empleaba para el crecimiento de la bacteria en experimentos de transformación por el método de Hanahan, (1985).

Composición:

. Bacto-triptona.....	20 g/l	
. Extracto de levadura....	5 g/l	
. NaCl.....	10 mM	
. KCl.....	2,5 mM	
. MgCl ₂	10 mM	(1)
. MgSO ₄	10 mM	(1)

(1) El medio se esterilizaba sin Mg²⁺.

Por separado se esterilizaban una solución de MgCl₂ 1 M, y una solución de MgSO₄ 1 M, para una concentración final de Mg²⁺ de 20 mM. El pH final era de 6,8 - 7,0.

SOC

Se empleaba para expresar la resistencia al antibiótico en experimentos de transformación por el método de Hanahan (1985). Es el medio SOB, al que se le añadía una solución estéril de glucosa 2 M, hasta una concentración final de 20 mM.

Soluciones de antibióticos.

Se preparaban soluciones concentradas de cada uno de los antibióticos, se esterilizaban por filtración, y se guardaban en alícuotas congeladas a -20°C. Cuando el medio llevaba agar, tras ser esterilizado, se añadían los antibióticos en el momento en que se había enfriado a 50°C.

La ampicilina se añadía al medio LB como marcador de selección de plásmidos, que portan el gen de selección de la β-lactamasa, a una concentración de 100 µg/ml. El cloranfenicol, disuelto en etanol al 100%, se añadía al medio a una concentración de 170 µg/ml con el fin de amplificar el plásmido dentro de la célula.

Otras soluciones.

Para seleccionar los clones portadores de inserto en todos aquellos vectores (plásmidos o fagos) portadores del gen de la β -galactosidasa, se añadieron al medio de cultivo 40 μ l de una solución en dimetilformamida de 40 mg/ml de X-Gal (como sustrato del enzima) y 40 μ l de una solución acuosa 1M de IPTG (como inductor no metabolizable).

1.4.2.- Medios para *S. cerevisiae*.

YED

Es un medio completo empleado de rutina para el cultivo de levadura.

Composición:

. Extracto de levadura....	10 g/l
. Glucosa.....	20 g/l

El pH se ajustaba a 7,0 con NaOH 0,1 N.

Estabilizador osmótico: Cuando se requería un medio estabilizado osmóticamente, se añadía a la composición normal una concentración final de 0,9 M de sorbitol o 10 mM de SO_4Mg .

YEPD

Es un medio rico que se utilizaba para la obtención de biomasa en las resiembras periódicas. Es el medio YED, al que se le añadían 20 g/l de peptona. El pH se ajustaba a 7,0 con NaOH 0,1 N.

MPE

Es un medio sólido muy rico que se utilizaba para el crecimiento de los diploides, que posteriormente eran inducidos a esporular en el medio de esporulación. El paso previo por el medio de preesporulación estimula notablemente la formación de ascas.

Composición:

. Extracto de levadura....	10 g/l
. Extracto de carne.....	30 g/l
. Glucosa.....	50 g/l

El pH se ajustaba a 7,0 con NaOH 0,1 N.

ME

Es un medio sólido, pobre en glucosa y nitrógeno, que utiliza acetato como fuente de energía, lo cual induce la esporulación de células diploides procedentes de un medio rico en glucosa.

Composición:

. Acetato potásico.....	9,8 g/l
. Extracto de levadura....	2,5 g/l
. Glucosa.....	1 g/l

El pH se ajustaba a 7,0 con NaOH 0,1N

MM

Es un medio sintético, que contiene todas las vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento de la levadura, pero que no permite el crecimiento a las cepas auxótrofas. Generalmente se empleaba como medio selectivo para el mantenimiento del plásmido en los clones transformantes de *S. cerevisiae*, y para comprobar auxotrofías por medio de réplicas.

Composición:

. Base nitrogenada sin aminoácidos	6,7 g/l
. Glucosa	20 g/l

El pH se ajustaba a 7,0, con NaOH 0,1 N

Según las necesidades, se le suplementaba con adenina, histidina, uracilo o triptófano, a la concentración final de 20 mg/l, y en el caso de leucina, a 30 mg/l.

MR

Medio de regeneración de protoplastos. Es un medio sólido con mayor concentración de agar de lo normal. Se empleaba en experimentos de transformación, según el método descrito por Hinnen *et al.* (1978). Dada su elevada concentración de sorbitol es un medio que evita la rotura de los esferoplastos o protoplastos, y gracias a que contiene todos los requerimientos nutricionales, excepto el marcador de selección del plásmido, permite aislar los clones transformantes que posean dicho marcador.

Composición:

. Sorbitol.....	182,4 g/l
. Glucosa.....	20 g/l
. Bacto agar granulado.....	30 g/l
. (1) Solución de aminoácidos (estéril).....	140 ml/l
. (2) YEPD líquido (estéril).	10 ml/l

(1) La solución de aminoácidos se esterilizaba por separado y se conservaba a 4°C. El aminoácido o base nitrogenada, utilizado como marcador de selección en una determinada transformación, era omitido. Las cantidades indicadas son estimulantes, pero no son suficientes para el crecimiento cuando la cepa receptora posee una auxotrofia adicional. En estos casos había que suplementar con 300 mg/l.

Esta solución era preparada a la concentración de 2 g/35 ml, según la siguiente composición (Sherman *et al.*, 1983):

Base nitrogenada sin aminoácidos 51,5 g/l

Adenina		
Uracilo		
L-Triptófano		
L-Histidina		147 mg/l
L-Arginina		
L-Metionina		
L-Tirosina		
L-Leucina		221 mg/l
L-Isoleucina		
L-Lisina		

Ac.L-Glutámico	
Ac.L-Aspártico	
L-Valina	736 mg/l
L-Treonina	
L-Serina	
L-Fenil alanina	368 mg/l

(2) Se ha comprobado que el medio YEPD líquido al 2/1.000 facilita la transformación cuando el marcador de selección es histidina. En nuestro caso se redujo al 1/1.000 para evitar el crecimiento de pequeñas colonias satélites que no corresponden a transformantes, y que pudieran conducir a resultados equívocos. Este medio también se esterilizaba aparte conservándose a 4°C.

Tanto el medio YEPD como la solución de aminoácidos, se añadían atemperados a 50°C al medio recién esterilizado, cuando éste se había enfriado a unos 50-60°C. Los esferoplastos se añadían al medio cuando éste se había atemperado a 45-50°C, y se dejaba solidificar en placas sobre una base de MM.

2.- METODOS.

2.1.- CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS.

2.1.1.- Cepas de *E. coli*.

Estas cepas se conservaron a -20°C en medio LB líquido con glicerol al 50%. El cultivo en medio líquido se realizaba a 37°C y 200-220 rpm durante el tiempo necesario. El cultivo en medio sólido generalmente era en placa y se incubaba a igual temperatura durante una noche.

2.1.2.- Cepas de *S. cerevisiae*.

Las estirpes utilizadas se conservaban a 4°C en tubos con medio sólido YEPD que contenía doble concentración de todos los nutrientes, o bien congeladas a -20°C, en alícuotas en medio YED líquido al que se añadía glicerol al 50%. Las estirpes transformadas, se solían conservar temporalmente en tubos con MM sólido suplementado con las bases nitrogenadas o aminoácidos necesarios. Se realizaban resiembras periódicas cada 4-6 meses.

2.1.2.1.- Crecimiento en placa.

El cultivo en medio sólido se llevaba a cabo usualmente en placa de YED o MM, y se incubaba a 24°C o 37°C durante el tiempo necesario.

2.1.2.2.- Crecimiento en matraz.

Para los cultivos en matraz, se utilizaban generalmente los medios YED y MM. La incubación era a 24°C o 37°C, con una agitación de 180 a 200 rpm. Los matraces tenían una capacidad 5 veces superior al volumen de medio.

2.1.2.3.- Crecimiento en fermentador.

Ver apartado 2.2 de Materiales y Métodos.

2.2.- CONDICIONES DE CULTIVO EN FERMENTADOR. MODOS DE TRABAJO.

Se utilizó el fermentador descrito en el apartado de materiales, con un volumen de trabajo de 10 litros. En todos los casos el fermentador se inoculaba con un preinóculo crecido en matraz a 24°C (temperatura permisiva para los mutantes autolíticos). La aireación y agitación se ajustaban dependiendo del ensayo y del fermentador. (generalmente a 2NL/min y 200-250 rpm en el de 10 litros). El medio utilizado era YED o MM.

Los modos de trabajo fueron los siguientes:

- **Cultivo discontinuo sin cambio térmico.** Todo el crecimiento se realizaba a la misma temperatura, bien 24°C o 37°C.

- **Cultivo discontinuo con cambio térmico.** La cepa a ensayar se crecía a 24°C hasta fase exponencial. Entonces, se procedía a subir rápidamente (5-10 min) la temperatura de trabajo a 37°C. Cuando se daban pulsos térmicos se procedía a bajar dicha temperatura una vez finalizado el pulso, también muy rápidamente (5 min).

2.3.- DETERMINACION DEL CRECIMIENTO.

2.3.1.- Turbidimetría.

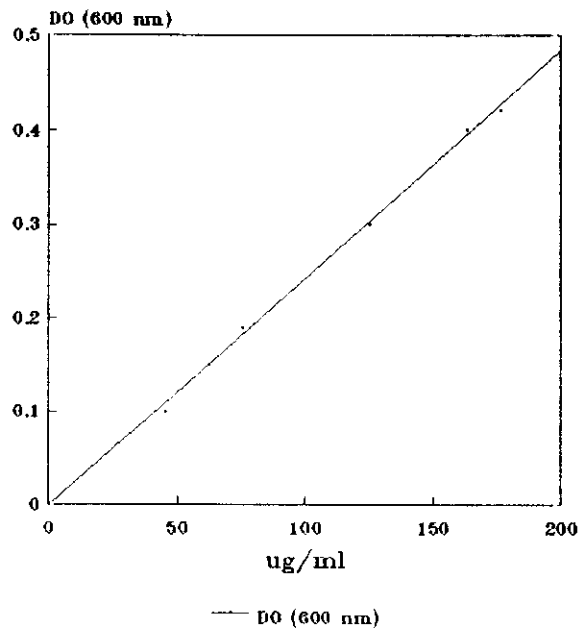
El crecimiento de los cultivos se determinaba mediante la medida de la turbidez del mismo, por lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm. Las muestras se diluían convenientemente hasta que su DO se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de DO y el número de células o peso seco.

En la Figura 10, se muestran las correspondencias existentes entre DO a 600 nm, peso seco y número de células de la cepa silvestre *S. cerevisiae* S288C.

2.3.2.- Recuento de células.

El recuento se realizó con una cámara Neubauer cuentaglóbulos, por observación microscópica directa en un microscopio de contraste de fases. Para que la muestra fuera estadísticamente significativa, el número de células contadas por cámara era siempre superior a 30.

S. cerevisiae S288C
Peso seco/DO



S. cerevisiae S288C
Peso seco/DO

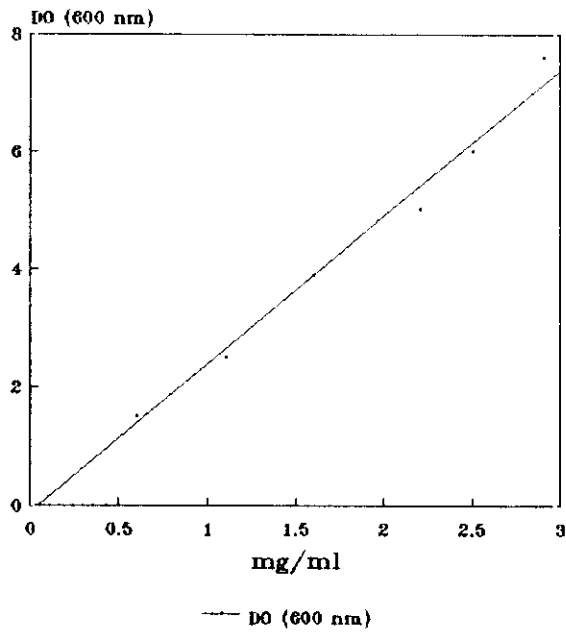


Figura 1A.- Relación entre DO a 600 nm y peso seco de las células, en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* S288C.

S. cerevisiae S288C
Num. cels. / DO

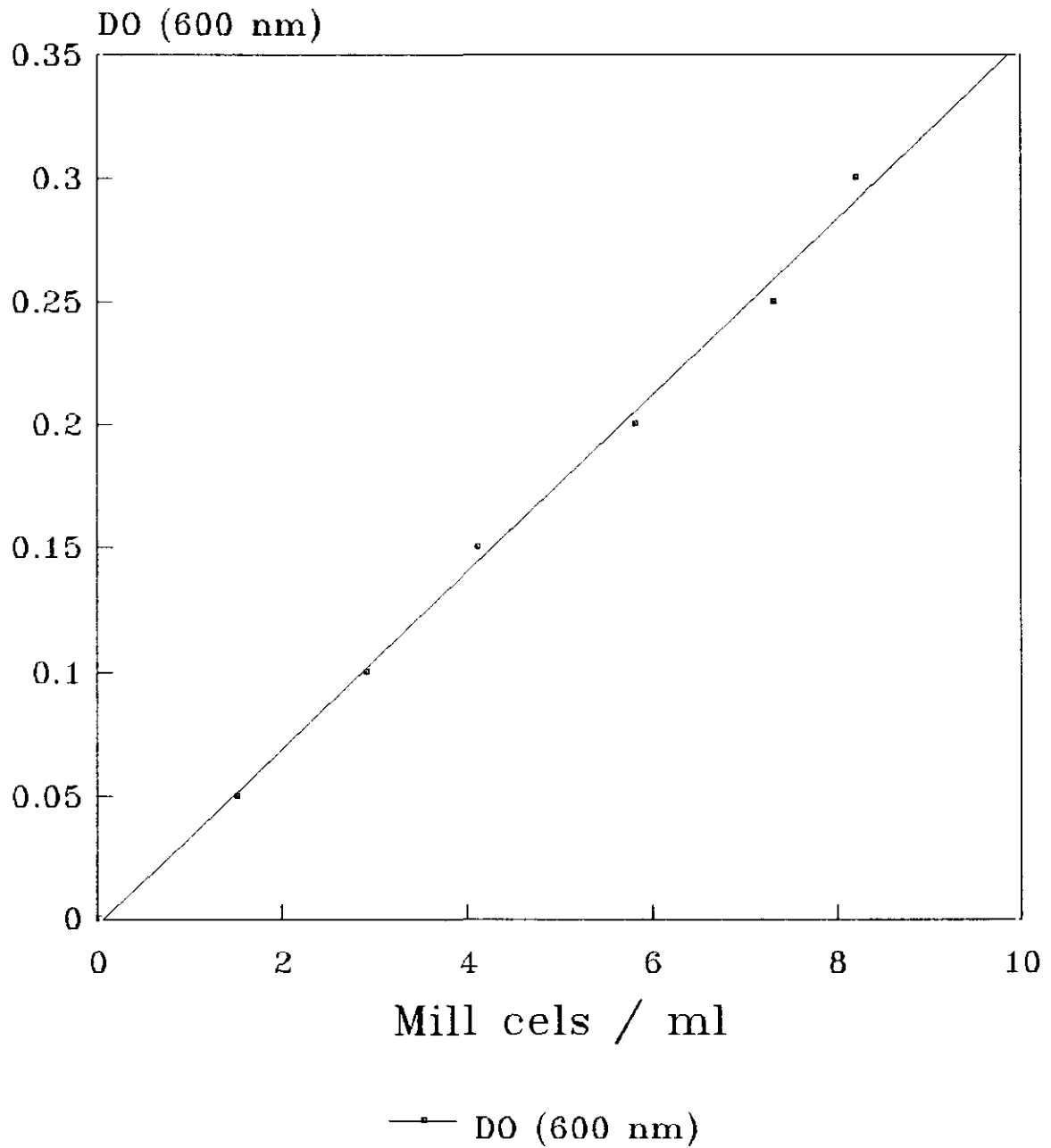


Figura 1B.- Relación entre DO a 600 nm y número de células, en cultivos en crecimiento exponencial de *Saccharomyces cerevisiae* S288C.

2.4.- RECUENTO DE VIABLES.

La medida de la densidad óptica no da una idea exacta de la proporción de células muertas que hay en una población microbiana. Por ello, se utilizaron los siguientes métodos.

2.4.1.- Por crecimiento en placa.

De cada muestra tomada del cultivo se contaba el número de células en cámara cuantaglobulos de Neubauer. Posteriormente se hacían diluciones pertinentes de las mismas para que crecieran entre 50 y 100 colonias por placa, suponiendo que todas las células contadas fueran viables. Tras la siembra de las muestras, las placas se incubaban dos días a 24°C, se contaban las colonias y se calculaba el porcentaje de células viables.

2.4.2.- Por citometría de flujo.

Ver apartado 2.10.- Técnicas de citometría de flujo.

2.5.- TECNICAS DE MICROSCOPIA.

2.5.1.- Microscopía de contraste de fases.

Las muestras de levaduras se observaban en montaje húmedo, en un microscopio Nikon Optiphot, empleando un objetivo de contraste de fases 40 X y un ocular 10 X. Las fotografías se tomaban utilizando películas Kodak Tri-x-pan y Fujicolor 400 super HG. Cuando usábamos el yoduro de propidio como fluorocromo indicador de muerte celular, se utilizaba la iluminación de fluorescencia.

2.5.2.- Microscopía electrónica de barrido.

A partir de un cultivo en medio YED o MM líquido a 24 o 37°C, se recogían las muestras sobre filtros de membrana, tomando con jeringa un volumen de 0,6 ml. de la suspensión, y conectándolo a un portafiltros Swinny Stainless (13 mm de diámetro) Millipore que contenía un filtro fluoropore de 0,2 µm. Las células se fijaban con glutaraldehído al 5%, preparado en cacodilato sódico 0,2 M, pH: 7,2 durante 60 min. (Williams y Veldkamp, 1974; Tiedt *et al.*, 1987). Se lavaban con el tampón y se deshidrataban en una serie de concentraciones crecientes de etanol: 25, 50, 70, 90 y 100%, durante 10 minutos cada vez. Seguidamente se sumergían en

acetona absoluta durante una noche, y se sometían al punto crítico de secado. Después eran montadas sobre un portamuestras de aluminio y metalizadas.

Las muestras eran observadas en microscopio electrónico de barrido con sistema fotográfico adaptado. La película era Kodak plus X, de 35 mm.

2.6.- TECNICAS GENETICAS.

2.6.1.- Obtención de diploides.

Se utilizó la técnica descrita por Fink (1971). Para ello, se mezclaban las células de cultivos recientes de dos cepas de tipo sexual opuesto, en una placa con medio YED. Las placas se incubaban a 24°C durante 5-7 horas. Tras este tiempo se podían observar zigotos por examen microscópico de una preparación en montaje húmedo. Entonces se procedía al aislamiento de estos mediante micromanipulación con aguja de vidrio, sobre láminas de medio sólido de preesporulación (MPE). Posteriormente, éstas eran incubadas en placas con agar agua (a fin de proporcionar la humedad necesaria) a 24°C durante 3-4 días, tiempo tras el cual las colonias de los diploides se hacían visibles.

2.6.2.-Esporulación.

Cuando se requería la esporulación de algún diploide, éste se sembraba primero en medio de preesporulación y se dejaba crecer durante 24 horas a 24 o 28°C, según las características de la cepa. Pasado este tiempo, se sembraba en medio de esporulación a la temperatura deseada y se incubaba durante un tiempo que oscilaba entre 5 y 14 días. La presencia de ascas se ponía de manifiesto por observación microscópica.

Hay que resaltar que el proceso de esporulación se realizaba en el medio sólido de la composición descrita en el apartado correspondiente de Materiales, ya que hemos comprobado que las cepas utilizadas por nosotros en este trabajo no son capaces de esporular en los medios líquidos descritos por Malavasic y Elder (1990).

2.6.3.- Disección de ascas.

La disección de ascas se realizaba con arreglo al método descrito por Jhonston y Mortimer (1959), modificado por Bevan y Costello (1964).

Las ascas se trataban con helicasa, la cual a la concentración de 2,5 mg/ml, digería la pared del asca en un tiempo comprendido entre 15 y 30 minutos. Este tratamiento provocaba la liberación de las cuatro ascosporas, que así podían ser separadas por micromani-

pulación y depositadas ordenadamente en láminas de medio sólido YEPD. Estas láminas eran posteriormente incubadas a 24°C sobre placas de agar agua durante 4 o 5 días, hasta que las colonias de los segregantes eran visibles.

2.7.- PREPARACIONES ENZIMATICAS.

2.7.1.- Obtención de células y caldos de cultivo.

Las células se separaban de los medios de cultivo por centrifugación a 2.000 xg durante 5 minutos a 4°C y se lavaban dos veces con agua destilada, tampón succinato 10 mM pH 5,3, tampón acetato 50 mM pH 5,3 o tampón PBS, según los casos, quedando así listas para su procesamiento.

Los sobrenadantes de estos cultivos fueron utilizados en los distintos ensayos enzimáticos, siendo sometidos a diálisis exhaustiva frente al tampón correspondiente, y/o concentración mediante PEG, ultrafiltración o liofilización hasta el volumen requerido, cuando fue necesario.

2.7.2.- Preparación de extractos celulares.

Los extractos libres de células se obtuvieron por ruptura mecánica con bolas de vidrio, utilizando un homogenizador Braun, modelo MSK (Melsungen, Alemania), en la mayoría de los casos. La suspensión obtenida por resuspensión de las células en un volumen de tampón igual a cuatro veces el peso húmedo de las mismas se introdujo en frascos de vidrio especiales junto con polvo de vidrio Ballotini (0,25 - 0,30 mm de diámetro. Braun) en proporción 1:1 (v:v) procediéndose a la ruptura durante 90 segundos a 4.000 oscilaciones por minuto, refrigerando con nieve carbónica. Para volúmenes muy pequeños el extracto se obtenía en tubos Eppendorf, utilizando un agitador "vortex".

Por observación directa al microscopio de contraste de fases se comprobó la ruptura de las células para asegurar que siempre fuera superior al 90%.

La fracción fácilmente sedimentable, paredes celulares y células no rotas, se separó por centrifugación de los extractos a 2.000 xg durante 10 minutos y a 4°C. Posteriormente el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 48.000 xg y a la misma temperatura durante 30 minutos.

Con anterioridad a cualquier determinación enzimática, los sobrenadantes de extractos celulares se dializaron frente al tampón correspondiente siendo de nuevo centrifugado a 48.000 xg a 4°C durante 30 minutos para eliminar los materiales que precipitan durante la diálisis, principalmente por desnaturalización. Estos sobrenadantes, resultantes de la última

centrifugación, fueron las muestras enzimáticas usadas normalmente. Cuando fue necesario, los extractos, una vez obtenidos, se conservaron a -20° C en congelador.

2.7.3.- Soluciones tampón y diálisis.

- .- Tampón acetato (ácido acético/acetato sódico) 50 mM, pH: 5,3.
- .- Tampón succinato (ácido succínico/hidróxido sódico) 10 mM, 25 mM, pH 5,3.
- .- Tampón Tris-ClH (Tris-hidroximetil aminometano/ácido clorhídrico) 50 mM, pH 7,4.
- .- Tampón Glicina-NaOH 0,1 M, pH:9,7.
- .- PBS (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄ por litro de agua; pH:7,4).

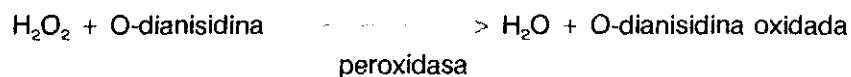
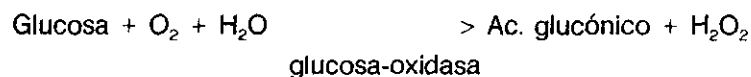
En la mayoría de los tampones se añadió azida sódica al 0,02%, como agente antimicrobiano.

La diálisis se realizó a 4° C en bolsas de diálisis (Visking Tubing), cuyo límite de exclusión es aproximadamente 10000 Dalton, frente al tampón correspondiente, renovando dicha solución cada 6-8 horas.

2.8.- DETERMINACIONES ANALITICAS.

2.8.1.- Valoración de glucosa.

Se siguió el método de Keston (1956), basado en la valoración colorimétrica de glucosa, mediante un reactivo de glucosa oxidasaperoxidasa acoplado a un cromógeno (ortodianisidina). La reacción de oxidación de la glucosa es la siguiente:



La oxidación de la O-dianisidina origina una sustancia de color rosa estable, por adición de HCl, que posibilita la determinación colorimétrica.

A 0,5 ml de la muestra obtenida por centrifugación del cultivo, se le añaden 2 ml de una mezcla de los reactivos A y B en la proporción 20:1 y se incubaba a 30°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales la reacción se detenía, mediante la adición de 2,5 ml de HCl 6 N. El color desarrollado se leía espectrofotométricamente a 540 nm. Los valores obtenidos se referían a una curva patrón, realizada paralelamente con glucosa (concentraciones entre 10 y 180 µg/ml).

Reactivos:

A) Solución formada por 5,25 mg de peroxidasa y 125 mg de glucosa-oxidasa (8 U/mg) por litro de tampón fosfato 0,1 M pH:7.

B) Solución de O-dianisidina al 0,6% en agua.

2.8.2.- Valoración de fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina es una enzima intracelular, que sólo se libera al medio cuando la célula se lisa, luego su valoración nos da idea del grado de lisis del cultivo. Esta enzima es capaz de hidrolizar el sustrato paranitrofenil fosfato disódico (PNPP), liberando paranitrofenol (PNP), el cual a pH alcalino es de color amarillo.

2.8.2.1.- Valoración cuantitativa (en medio líquido).

La solución enzimática a valorar podía provenir de sobrenadantes del cultivo de células a examinar o de los extractos de éstas. Las mezclas de reacción contenían 250 µl de una solución del sustrato PNPP 20mM en tampón glicina-sosa 0,1M pH:9,7. El tiempo de reacción era de 30 minutos a 37°C. La valoración del PNP se llevaba a cabo espectrofotométricamente, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Las lecturas obtenidas se referían a una curva patrón de PNP de concentraciones comprendidas entre 10 y 180 µg/ml. La unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nanomol de PNP por minuto en las condiciones de la reacción.

2.8.2.2.- Valoración cualitativa (en medio sólido).

En ocasiones era necesaria la búsqueda del fenotipo autolítico o la ausencia de éste entre una población de levaduras grande, para lo cual se utilizaban dos métodos:

A) El método de Cabib y Durán (1975).

La población de levaduras a estudiar se diluía a partir de cultivos en YED o MM líquidos crecidos a 24°C y se sembraban en placas de YED o MM de manera que crecieran entre 80 y 100 colonias por placa. Tras incubarlas a 24°C durante el tiempo necesario para que alcanzaran un diámetro de 3 a 5 mm, se hacían réplicas mediante terciopelos estériles o se incubaban las mismas placas a 37°C durante 24 o 48 horas. Al cabo de este tiempo, se depositaba sobre las colonias una sobrecapa de agar al 0,5% y PNPP 10 mM preparada de la siguiente manera: se fundían alícuotas que contenían 2,4 ml de agar al 1,2% en tampón glicina-sosa 0,1 M pH:9,7; se atemperaban a unos 40°C y se les añadían 3 ml del tampón glicina-sosa y 0,6 ml de una solución de PNPP 100 mM en el mismo tampón. Se mezclaba bien y se vertía la sobrecapa sobre las colonias. Tras unos 20 minutos a 37°C, el fenotipo autolítico se ponía de manifiesto mediante la aparición de un halo amarillo de PNP alrededor de las colonias de células lisadas, como consecuencia de la hidrólisis del PNPP por acción de la fosfatasa alcalina liberada. Las colonias no líticas carecían del halo. Había que tener en cuenta que, al cabo de 40 minutos aproximadamente, todo el medio se ponía amarillo por la hidrólisis del PNPP por acción de la luz.

B) Uso del reactivo 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato.

Este reactivo es un sustrato de fosfatasa que, al ser hidrolizado por dicha enzima, da lugar a una coloración azul. Se añade la solución acuosa de la sal disódica filtrada al medio de cultivo atemperado a 50°C, antes de que se solidifique el agar, a la concentración final de 40 µg/ml (Lourdes Torres, comunicación personal).

Las cepas a analizar (que pueden proceder de nevera o de un cultivo fresco a 24°C), se siembran en las placas con el reactivo y se incuban a 37°C durante 24-48 horas. Al cabo de este tiempo, las cepas autolíticas aparecen teñidas de color azul (Figura 23).

Este reactivo presenta las siguientes ventajas con respecto al PNPP:

- No se hidroliza por acción de la luz, por lo que sólo se tiñe la colonia de células muertas, pero no el medio de cultivo aunque se almacene la placa durante un tiempo.
- No hay que usar una sobrecapa, sino que la colonia se tiñe o no a medida que crece en la placa.

2.9.- TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Los métodos empleados en la manipulación de ácidos nucleicos se basaron fundamentalmente en los descritos en los manuales de Biología Molecular de Maniatis *et al.* (1982); Glover (1986) y Fink *et al.* (1983).

2.9.1.- Soluciones de uso general.

Las soluciones empleadas comúnmente en los métodos de biología molecular, se describen a continuación:

- Tampón TE

Tris-HCl pH:8	10 mM
EDTA	1 mM

Se empleaba para el mantenimiento de ácidos nucleicos.

- Etanol absoluto y Etanol al 70%.

El primero se empleaba (2 volúmenes), junto con acetato sódico para precipitar ácidos nucleicos. El segundo se utilizaba para (una vez realizada la precipitación), lavar el precipitado con objeto de eliminar sales.

- Isopropanol.

Se utilizaba (1 volumen) para precipitar ácidos nucleicos.

- Acetato sódico 3 M.

Solución 3 M, ajustada a pH:5,2 con ácido acético glacial. Se utilizaba como sal de precipitación de ácidos nucleicos, a concentración final de 0,3 M, junto con 2 volúmenes de *etanol absoluto*.

- Cloroformo.

Solución de cloroformo/alcohol isoamílico en la proporción 24:1, utilizada para desproteínizar ácidos nucleicos y para eliminar restos de fenol de la solución. El alcohol isoamílico ayuda a separar las dos fases y reduce la formación de espuma.

- Fenol.

Es una solución de fenol equilibrada a pH >7,6 en TE, que contiene 0,1% de hidroxiquino-
leína y 0,2% de β-mercaptoetanol. Se empleaba para eliminar proteínas de soluciones de ácidos
nucleicos, añadiendo 1 volumen, agitando fuertemente, y centrifugando. Finalmente la fase
acuosa se pasaba a un tubo nuevo; la operación se repetía hasta que no se observaban restos
de proteína en la interfase.

La manera más corriente de eliminar las proteínas de soluciones de ácidos
nucleicos, era extraer una vez con fenol, una vez con una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo y
finalmente una vez con cloroformo. La hidroxiquino-
leína es antioxidante, inhibidor de RNasas, y
agente quelante de iones metálicos; por otra parte su color amarillo ayuda a identificar la fase
acuosa.

- Éter.

A veces se empleaba, saturado de agua, para eliminar trazas de fenol o
cloroformo. Se eliminaba calentando a 68°C durante 10 minutos.

- DNA de esperma de salmón.

Se utilizaba en las soluciones de hibridación de ácidos nucleicos, para reducir
las fijaciones inespecíficas de las sondas a las membranas de nylon. Se preparaba disolviendo
el DNA fragmentado, hasta 10 mg/ml, en TE. Se rompía por sonicación en varios períodos de 30
segundos a 25 microns, con intervalos de 30 segundos en hielo. A continuación se despro-
teinizaba con fenol, cloroformo y éter. Finalmente se precipitaba con dos volúmenes de eta-
nol/NaCl 0,1 M a -80°C, durante 1 hora; se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en TE
a una concentración final de 10 mg/ml.

- tRNA transportador ("carrier").

La preparación era básicamente igual a la del DNA de esperma de salmón, pero
sin sonicar. Se diluía a la concentración final del 1%. Se empleaba en ocasiones para facilitar la
precipitación en muestras de ácidos nucleicos.

El agua empleada en la fabricación de las soluciones era ultrapura. Las
soluciones se esterilizaban en autoclave o por filtración.

2.9.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Dependiendo de la cantidad y grado de pureza requeridos en cada caso, se emplearon diversos métodos de purificación de DNA.

. Método A)

Se siguió básicamente el método descrito por Holmes y Quigley (1981) simplificado. Permite el aislamiento rápido de DNA plasmídico libre de contaminación cromosómica. Se empleaba para el aislamiento de plásmidos, a partir de colonias procedentes de placas de transformación.

Las colonias se recogían con asa y se sembraban en 2 ml de LB suplementado con ampicilina; tras incubación a 37°C en agitación durante una noche, la suspensión celular se recogía en un tubo Eppendorf, por centrifugación en microfuga a 12.000 rpm, durante 45 segundos se eliminaba el medio y se resuspendía en 350 µl de tampón STET (Tris- HCl 50 mM pH:8; EDTA 50 mM; sacarosa 8% y Triton X-100 5%); se añadían 350 µl de lisozima recién preparada (2 mg/ml en STET) mezclando bien, y se calentaba rápidamente en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos. Inmediatamente después se transfería a un baño de hielo durante 5 minutos, y se centrifugaba a 12.000 rpm., durante 10 minutos. Se tomaban 500 µl del sobrenadante y se pasaban a otro tubo, al que se añadían 500 µl de isopropanol, se mezclaba bien, y se mantenía a temperatura ambiente durante 10 minutos; posteriormente se centrifugaba como antes y se decantaba el sobrenadante. El precipitado se secaba y se redisolvió en 20-40 µl de TE.

Estas preparaciones se usaban para la electroforesis en gel de agarosa. Cuando interesaba ver bandas pequeñas, se incubaban las muestras con 0,05 µg/ml de RNasa a 37°C durante 10 minutos, antes de someterlas a la electroforesis.

. Método B)

También se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Maniatis et al. (1982) ligeramente modificado.

Una colonia, aislada en LB suplementado con ampicilina, se transfería a 3 ml de TB al que se había adicionado el mismo antibiótico y se incubaba a 37°C con agitación, durante una noche. Las células se recogían por centrifugación en microfuga a 12.000 rpm durante 1 minuto y, tras eliminar el medio, se resuspendían en 200 µl de una solución de lisozima al 0,5% en glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8, y EDTA 10 mM, y se dejaban lisar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadían 400 µl de una solución de NaOH 0,2 N y SDS al 1% (preparada en el momento a partir de NaOH 5 N y SDS al 10%) y la suspensión se mantenía a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadían 300 µl de una solución de acetato potásico 3 M, ácido fórmico 1,8 M; se mezclaba suavemente y se dejaba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaba en microfuga a 12.000

rpm durante 10 minutos a 4°C; y el sobrenadante se precipitaba por adición de 600 µl de isopropanol durante 20 minutos a -20°C. Tras centrifugar como antes, se decantaba el sobrenadante y el precipitado se resuspendía en 400 µl de acetato sódico 2,5 M; tras 40 minutos de agitación vigorosa se sometía a una nueva centrifugación durante 10 minutos y el sobrenadante se precipitaba por adición de 250 µl de isopropanol a -20°C durante 20 minutos. Tras una nueva centrifugación el precipitado se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se redisolvió en 50 µl de TE.

2.9.3.- Aislamiento de DNA total de *S. cerevisiae*.

Para obtener el DNA total de *S. cerevisiae* S288C que fue empleado en los experimentos de hibridación DNA-DNA, se siguió básicamente el método descrito por Sherman *et al.* (1983).

Un cultivo de la cepa en 50 ml de YED se incubaba a 30°C con agitación hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se recogían por centrifugación a 8.000 rpm en el rotor JA-14 de la centrífuga Beckman J2-21 durante 5 minutos, y se lavaban con agua, volviéndose a resuspender en 15 ml de EDTA 0,05 M, pH:9. A continuación se centrifugaba de nuevo, y el sedimento celular se resuspendía en 5 ml de EDTA 0,05 M pH:9, con el fin de obtener esferoplastos.

La suspensión se sometía a un pretratamiento, con 130 µl de β-mercaptoetanol durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con sorbitol 1 M, las células se resuspendían en 5 ml de sorbitol 1 M y EDTA 0,1 M pH: 7,5 y se procedía al tratamiento con 200 µl de zimoliasa 5.000 (5 mg/ml) a 37°C con agitación suave, hasta que se comprobaba la existencia de un 80-90% de protoplastos (observando la ruptura de la membrana en medio hipotónico). En ese momento los esferoplastos se recogían por centrifugación (rotor JA-20) a 5.000 rpm durante 5 minutos y se lavaban con sorbitol 1 M, para eliminar la enzima. Se resuspendían en 3,2 ml de TE pH:7,4, procediéndose a lisarlos con una mezcla de 0,3 ml de EDTA 0,5 M, pH:8,5; 0,16 ml Tris base 2 M y 0,16 ml de SDS al 10%, más 10 µl de DEPC.

Los tubos se mantenían destapados a 65°C durante 30 minutos (en campana de gases), al cabo de los cuales, se añadían 0,8 ml de acetato potásico 5 M, manteniéndose la suspensión en hielo durante 1 hora. Tras este tiempo se centrifugaba (rotor JA-20) a 2.000 rpm durante 30 minutos, y se transfería el sobrenadante a un tubo Corex de 30 ml, precipitando el DNA con 12 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente. El contenido del tubo se mezclaba invirtiéndolo y se centrifugaba (rotor JA-20) a 10.000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se secaba y se resuspendía en 3 ml de TE durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Una vez resuspendido, se centrifugaba y se recogía el sobrenadante, y se trataba con 150 µl de RNasa a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se precipitaba con 3 ml de isopropanol, inclinando el tubo lentamente, hasta la aparición de una banda de precipitación en la interfase. Las hebras de DNA se recogían con pipeta Pasteur y se redisolvían en 0,5 ml de TE.

2.9.4.- Aislamiento de DNA plasmídico de *S. cerevisiae*.

A) Minipreparación de plásmidos de levadura.

El método empleado es modificación del descrito por Lorincz (1984).

Células procedentes de una colonia de levadura de unos 3 mm de diámetro, se resuspendían en 400 µl del siguiente tampón: 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH:8, 1 mM EDTA y 0,1% SDS. Se añadían bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro hasta 2 mm por debajo del nivel de la suspensión y se rompían las células agitando durante períodos de 30 segundos alternando agitación en vortex e incubación en hielo, hasta que, por observación al microscopio de contraste de fases, se comprobaba la rotura de un 80-90% de las células. Después se extraía el homogenizado dos veces con fenol-cloroformo y una con cloroformo-isoamílico. Se precipitaba el DNA de la fase acuosa añadiendo acetato sódico a una concentración final de 0,25 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de 20 minutos a -20°C, se centrifugaba la mezcla, y el precipitado se lavaba con etanol al 70% y se secaba al vacío. El sedimento resultante se resuspendía en 50 µl de TE y se utilizaban 10 µl para transformar *E. coli*.

B) Preparaciones de plásmidos de levadura a pequeña y mediana escala.

Está basado en el método descrito por Nasmith y Reed (1980). Se usó para extraer DNA plasmídico a partir de clones transformantes de levadura. Cuando se aisló DNA procedente del plásmido YCp 50, las cantidades se incrementaron 50 veces por tratarse de un vector monocopia.

El clon transformante a analizar se crecía en 10 ml de MM líquido, con los suplementos de aminoácidos y bases nitrogenadas adecuados para el mantenimiento del plásmido, durante una noche a 24°C. Las células se recogían por centrifugación y se lavaban con 1 ml de sorbitol 1 M. Se resuspendían después en 0,2 ml de la mezcla: sorbitol 1 M, citrato sódico 0,1 M pH:7 y EDTA 0,06M. A esta suspensión se le añadía 1 mg/ml de zimoliasa 5000 y un 1% de β-mercaptoetanol, y se mantenía a 37°C con agitación suave hasta que se observaba la presencia de esferoplastos en una proporción superior a un 80%. Posteriormente se añadían 0,8 ml de una mezcla de SDS al 0,5% en Tris-HCl 100 mM, pH:9,7 y EDTA 50 mM (El pH final resultaba 8,5). Tras agitar invirtiendo el tubo varias veces, se incubaba a 70°C durante 20 minutos. Después se enfriaba a 0°C y se añadían 0,2 ml de acetato potásico 5 M y se mantenía en hielo durante 45 minutos. Se centrifugaba a 10000 rpm (en microfuga) y el sobrenadante se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 20 minutos a -20°C. El DNA se recogía por centrifugación a 10000 rpm y se resuspendía en 0,5 ml de Tris-HCl 100 mM, pH:8; EDTA 1 mM y NaCl 0,25 M; precipitándose de nuevo con 1 ml de etanol absoluto. Finalmente, tras centrifugar y secar, el precipitado se disolvía en 50 µl de TE.

Estas preparaciones contenían DNA cromosómico como contaminación, pero eran válidas para transformar *E. coli*.

2.9.5.- Aislamiento de RNA total de levaduras.

Para obtener el RNA total de cepas de *S. cerevisiae* que fue empleado en los experimentos de hibridación de DNA-RNA, se siguió básicamente el método descrito por Elder *et al.* (1983), con algunas modificaciones.

Con el fin de evitar la degradación del RNA por acción de RNasas, se empleó DEPC (dietilpirocarbonato). Al etanol se le añadía DEPC al 0,1% y las demás soluciones eran tratadas con DEPC al 0,1%, se incubaban luego cerradas a 37°C durante unas horas (para inactivar el DEPC y evitar que emitiera vapores tóxicos al esterilizarse y usarse las disoluciones) y se esterilizaban.

Un cultivo de la cepa en 100 ml de YED era incubado a 24, 30 o 37°C en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,3-0,4 (4×10^6 - 2×10^7 células por ml). Se centrifugaba a 4°C y se depositaba en hielo el precipitado. Se resuspendía en 1 ml de LET (Tris-HCl 0,1 M, pH:7,4; LiCl 0,1 M; EDTA 0,1 mM) y se centrifugaba para lavar las células. Se repetía el proceso 2 veces. Después de los lavados o antes de hacerlos, las células podían almacenarse a -70°C como precipitado seco.

Después de los lavados, se resuspendían las células en 100 µl de LET y se añadían ballotini (nuevas, silastenizadas y esterilizadas en horno) hasta el borde inferior del menisco. Se agitaba la mezcla vigorosamente en vortex durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos intercalados con 30 segundos en hielo. Se añadían 100 µl de fenol saturado con TNE (Tris-HCl 10 mM, pH:7,4; NaCl 0,14 M; EDTA 10 mM), se agitaba durante 30 segundos, y se podía empezar a trabajar a temperatura ambiente. Se adicionaban a la mezcla 20 µl de TNE x 10 con SDS al 1 %, 100 µl de cloroformo y 100 µl de agua a pH 7, se agitaba durante 10 segundos y se centrifugaba durante 2 minutos. Se recogía la fase acuosa y se repetía la extracción con fenol-cloroformo hasta eliminar la interfase. En caso de que la fase acuosa disminuyera de forma alarmante, se añadía TNE x 1.

Se precipitaba el RNA con 1/10 de Acetato sódico 3 M y 5 volúmenes de Etanol absoluto a -70°C durante 30 minutos-o/n. ¡No dejar nunca RNA en suspensión!

Después se centrifugaba 15 minutos a 4°C, se lavaba el precipitado con etanol al 80 %, se secaba al vacío y se resuspendía en 100 µl de agua. Se dejaba a temperatura ambiente durante 5 minutos y se colocaba rápidamente en hielo.

La electroforesis se realizaba en gel de agarosa ultrapura al 1 % en tampón TB. Las muestras debían calentarse a 60-65°C durante 10 minutos y luego pasarse a hielo antes de cargarse en el gel. El frente se dejaba correr hasta poco más de la mitad. Con el gel podía calcularse la concentración del RNA, teniendo en cuenta que, a igualdad de concentración, el RNA aparece 5 veces menos intenso que el DNA (con Bromuro de Etidio).

2.9.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se realizó esencialmente según las técnicas descritas por Davis *et al.* (1980).

Soluciones empleadas:

- Tampón de electrodos (TBE)x5:

Tris base 0,45 M
ácido bórico 0,45 M
EDTA 12,5 M, pH:8

- Tampón de muestra x10:

azul de bromofenol 0,1%
sacarosa (P/V) 50%
EDTA 50 mM
SDS 0,01%

- Bromuro de Etidio (EtBr). Se preparaba una solución concentrada (10 mg/ml). Se empleaba a la concentración de 0,5 µg/ml en el tampón TBE x1, con el que se preparaba la solución de agarosa.

- Agarosa (Tipo II): Se empleaban concentraciones entre 0,7- 1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA que se querían separar en cada caso.

Procedimiento:

La agarosa se disolvía en tampón TBE x 1 hirviendo unos segundos en horno microondas. Cuando el gel se había enfriado a unos 50°C, se añadía el EtBr. Se solidificaba en bandejas horizontales para electroforesis (de diversos tamaños según fuera necesario), dejando pocillos para la colocación de las muestras, mediante el uso de peines de teflón.

Las muestras (10-40 µl) se preparaban diluyendo, cuando era preciso, la suspensión de DNA en TE y añadiendo un 10% de tampón de muestra, que actuaba como indicador del frente de migración, y facilitaba la aplicación de las muestras en los pocillos. Las electroforesis se efectuaban con el gel sumergido en el tampón TBE x 1, de manera que el nivel de tampón estuviera 2-3 mm por encima del gel. La corriente constante aplicada, era de 10-150 mA según el tamaño del gel, y se mantenía hasta que la banda formada por el azul de bromofenol se aproximaba al extremo del gel.

Las bandas de DNA se visualizaban con un transiluminador de luz UV a 254 nm, y se fotografiaban con cámara Polaroid, película polaroid 667 y filtro rojo Kenko R1.

2.9.7.- Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

En muchas ocasiones fue necesario extraer fragmentos de restricción a partir de los geles de agarosa, a fin de subclonarlos en otros vectores. Para ello se hizo uso de la técnica de electroelución de DNA, siguiendo básicamente dos métodos:

A) Método descrito por Maniatis *et al.* (1982) con algunas modificaciones.

Se realizaba la electroforesis como se describe en el apartado anterior con las siguientes modificaciones: las muestras a electroeluir contenían mayor volumen y por lo tanto, para cargarlas en el gel se unían varios dientes del peine con cinta adhesiva. La agarosa empleada era del máximo grado de pureza, y la concentración de EtBr era de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel.

Se localizaba la banda a extraer colocando el gel sobre el transiluminador y, rápidamente, se cortaba el trozo de agarosa conteniendo la banda a eluir con un bisturí. Para la preparación de las bolsas de diálisis, éstas se hervían durante 10 minutos en 20 g/l de bicarbonato sódico y 2 ml/l EDTA 0,5 M. Posteriormente se lavaban con abundante agua bidestilada y se volvían a hervir 10 minutos en agua bidestilada. Tras ser enfriadas, se guardaban a 4°C sumergidas en EDTA 1 mM. Antes de ser usadas, se lavaban con agua estéril y se saturaban con una solución de BSA, a la concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Una bolsa de diálisis, así preparada, se llenaba con TBE x 0,5 y se introducía el trozo de agarosa procurando dejar la menor cantidad posible de tampón, evitando la formación de burbujas. En la cubeta de electroforesis se sumergía la bolsa, cubierta solo en sus 3/4 partes por tampón TBE x 0,5, y se aplicaba la corriente en sentido perpendicular a la banda, usualmente 97 mA durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se invertía la polaridad y se mantenía en sentido contrario durante 45 segundos. Posteriormente se extraía el líquido de la bolsa y ésta se lavaba con una pequeña cantidad de tampón, que también se recogía. Tras comprobar al transiluminador que la banda había desaparecido de la agarosa, y que la bolsa de diálisis tampoco emitía fluorescencia, se procedía a fenolizar y precipitar con etanol y acetato sódico 3 M el DNA electroeluido, que finalmente se resuspendía en un pequeño volumen de TE.

La recuperación de DNA por este método oscilaba entre el 20-80% del cargado en el gel.

B) Método descrito por Sambrook *et al.* (1989) con algunas modificaciones.

Se realizaba la electroforesis de manera similar a la técnica anterior, con muestras de mayor volumen, agarosa del máximo grado de pureza, y la concentración de EtBr de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel.

Se localizaba la banda a extraer colocando el gel sobre el transiluminador y, se realizaban dos cortes (por encima y por debajo de la banda a eluir) con un bisturí. Empleando

unas pinzas millipore se introducían en las hendiduras dos tiras de papel whatman DE 81 y se sometía el gel de nuevo a 100 voltios durante 10 minutos (el DNA queda retenido en el papel situado hacia el polo positivo del campo). A continuación se extraía el papel del gel y tras lavarlo dos veces con solución de lavado se extraía el DNA con solución de elución (dos incubaciones de 30 minutos).

El DNA extraído se precipitaba con el doble del volumen de etanol absoluto y tras lavar el precipitado con etanol al 70% se resuspendía en TE.

Soluciones empleadas:

- Solución de lavado: Tris-HCl pH:8,0, 50 mM
NaCl 0,15 mM
EDTA pH:8,0, 10 mM

- Solución de elución: Tris-HCl pH:8,0, 50 mM
NaCl 1 M
EDTA pH:8,0, 10 mM

C) "GeneClean kit".

En algunos casos, también se utilizó el "kit GeneClean" para extraer bandas de DNA de tamaño superior a 0,5 Kb. El procedimiento seguido se realizó de acuerdo con las directrices de la casa comercial (BIO 101, La Jolla, California).

2.9.8.- Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.

Se llevó a cabo antes de realizar la transferencia a membranas de nylon en los experimentos de hibridación de DNA-RNA.

Soluciones empleadas:

- Tampón de electrodos:

Tampón MOPS x10: 150 ml
formaldehido: 375 ml
agua bidestilada: 975 ml

El tampón MOPS x 10 está compuesto por ácido morfolinopropanosulfónico 0,2 M, acetato sódico 50 mM y EDTA 5mM.

-Tampón de muestra x10:

glicerol:	50 %
EDTA:	1 mM
azul de bromofenol:	0,4%
xileno cianol:	0,4%

-Solución de formaldehido al 37%.

Procedimiento

Preparación de las muestras: Tras centrifugar y lavar el RNA con etanol al 80%, las muestras (al menos 20 μg por pocillo) se resuspendían en 7-8 μl de agua, y se mantenían a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se pasaban a hielo, se añadían 15 μl de formamida desionizada, 3 μl de tampón MOPS x10 y 5 μl de formaldehido al 37%. A continuación, se calentaban a 60°C durante 10-15 minutos y se pasaban inmediatamente a hielo durante 2 minutos. Finalmente, se añadían 3-4 μl de tampón de muestra antes de cargar el gel.

Preparación del gel: la bandeja (15x15 cm) y el peine se esterilizaban con agua oxigenada al 30%. Se preparaba la solución de agarosa ultrapura al 1% en 109 ml de agua y se esterilizaba en autoclave durante 15 minutos; se enfriaba a 60°C y se añadían 15 ml de tampón MOPS x10 y 26 ml de formaldehido (en campana de gases).

El tampón de electrodos se ponía a ras del gel pero sin cubrirlo. Se cargaban las muestras y se esperaba a que entraran en el gel, tras lo cual ya se podía cubrir con tampón. Para la carrera (que se realizaba en campana de gases) se mantenía unas 13 horas una corriente de aproximadamente 30 voltios, hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el final del gel.

2.9.9.- Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA.

2.9.9.1.- Determinación del tamaño.

La determinación aproximada de los tamaños moleculares de plásmidos se efectuaba calibrando el gel de electroforesis con plásmidos de tamaño conocido. Inicialmente se emplearon los 8 plásmidos contenidos en la cepa *E. coli* V517, cuyos tamaños son: 35,8; 4,8; 3,7; 3,4; 2,6; 2,0; 1,8 y 1,4 MD (Macrina *et al.* 1978). Alternativamente se empleaban los plásmidos YEp13, YCp50, YIp5, YEp352, pIC-20H y pEMBL18 y 19, o los patrones de tamaños moleculares de plásmidos (12 plásmidos de 0,4 - 12 Kb (BRL)).

Para la determinación del tamaño molecular de DNA lineal se empleaban los fragmentos de restricción obtenidos por digestión del bacteriófago lambda con HindIII, cuyos tamaños moleculares son: 23,6; 9,4; 6,6; 4,3; 2,2 y 2,0 Kb. En muchas ocasiones fueron empleados como patrones de tamaños moleculares para DNA lineal, los vectores antes citados, convenientemente digeridos con enzimas de restricción.

Una vez determinada la migración de los patrones empleados, se obtenía la recta de regresión, (definida por los logaritmos de estos valores y los tamaños moleculares correspondientes). A partir de dicha recta se calculaban los tamaños moleculares de los DNAs objeto de estudio, en base a su migración respecto a los patrones antes citados.

2.9.9.2.- Determinación de la pureza.

El índice de pureza se estimaba midiendo la absorbancia (A) a 280 nm y a 260 nm, y determinando la relación $A_{260} \text{ nm}/A_{280} \text{ nm}$, que para el DNA es de 1,8 - 2,0, y para el RNA es de 2,0 - 2,2.

2.9.9.3.- Determinación de la concentración.

Generalmente, la concentración aproximada de DNA se determinaba en geles de agarosa, comparando la intensidad de la fluorescencia de la banda a estudiar con la intensidad de las bandas de los marcadores de tamaño molecular, cuyas concentraciones eran conocidas.

Cuando se requería mayor precisión, las concentraciones de soluciones de DNA y RNA, se determinaban midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución de aproximadamente 1/1.000 en cubeta de cuarzo de 1 ml, considerando que a densidad óptica de 1, la concentración era de 40 $\mu\text{g/ml}$ para RNA, de 30 $\mu\text{g/ml}$ para oligonucleótidos, y de 50 $\mu\text{g/ml}$ para DNA de doble cadena. Para los cálculos de molaridad de DNA se consideró que 1 pmol de DNA de N Kb equivale a $(0,66 \times N) \mu\text{g}$ de DNA.

2.9.10.- Tratamientos enzimáticos del DNA.

2.9.10.1.- Digestiones con endonucleasas de restricción.

La digestión de DNA con las distintas enzimas de restricción se efectuaba con los tampones recomendados por el fabricante (Boehringer).

Las condiciones de digestión eran las siguientes: en un volumen de 10-40 μ l, se digerían de 10 - 300 ng/ μ l de DNA con 1-10 unidades de enzima/ μ g de DNA a 37° C, durante 1-4 horas, cuando la digestión era total. Cuando se realizaba digestión parcial las condiciones se ajustaban de manera que la relación enzima/DNA, oscilara entre 0,05 unidades/ μ g de DNA y 0,5 unidades/ μ g de DNA y se incubaba la reacción durante 5-10 minutos.

En aquellas enzimas en que la firma comercial recomendaba otra temperatura se seguían las indicaciones del suministrador. Cuando las muestras se digerían con dos endonucleasas que actuaban en condiciones óptimas a diferentes concentraciones salinas, se empleaba en primer lugar la enzima que actuaba a la fuerza iónica más baja, y a continuación se suplementaba la mezcla de reacción con la cantidad de sales adecuada para la segunda enzima.

Cuando el DNA procedía de minipreparaciones se incluía RNasa (50 ng/ μ l) en la mezcla de reacción, 2 minutos antes de parar la reacción. En todos los casos la eficiencia de las digestiones se verificaba por electroforesis de las muestras en geles de agarosa.

Si sólo se pretendía analizar el DNA mediante electroforesis, la mezcla de reacción se cargaba directamente en el gel, después de haberle añadido el tampón de muestra. Si se iba a llevar a cabo algún tratamiento posterior, se inactivaba la enzima mediante desproteinización con fenol y fenol/cloroformo según el método habitual, descrito en el apartado 2.9.1. de Materiales y Métodos.

2.9.10.2.- Subclonación de DNA.

Los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción, eran generalmente introducidos en otros vectores o en los mismos de los que procedían. A veces los plásmidos eran recircularizados tras perder una determinada zona. Todas estas manipulaciones implicaban la electroelución de bandas de DNA a partir de los geles de agarosa, y en muchos casos la eliminación del grupo fosfato del extremo 5' del vector (para evitar su recircularización). Finalmente se procedía a la ligación de dichos fragmentos.

2.9.10.2.1.- Desfosforilación del extremo 5' del DNA.

Se llevaba a cabo por tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis *et al.* (1982).

Una vez digerido totalmente el DNA con una enzima de restricción, se extraía con fenol/cloroformo y se precipitaba en las condiciones acostumbradas. El precipitado se redisolvió en el mínimo volumen (por ejemplo 10 μ l) de Tris-HCl 10 mM pH:8, y se añadían 5 μ l de tampón de CIAP x 10 (Tris-HCl 0,5 M, pH:9; MgCl₂ 10 mM; ZnCl₂ 1 mM y espermidina 10 mM). Se añadían 0,5 μ l de CIAP y la cantidad necesaria de agua para conseguir un volumen final de 50 μ l. Tras incubarlo a 37°C durante 15 minutos, se añadían otros 0,5 μ l de CIAP y se incubaban otros 15 minutos; esta operación se repetía dos veces más. Finalmente, se añadían 40 μ l de agua, 10 μ l de tampón STE x 10 (Tris-HCl 100 mM, pH:8; NaCl 1 M y EDTA 10 mM) y 5 μ l de SDS al 10%. Tras calentarlo a 68°C durante 15 minutos, se desproteinizaba dos veces con fenolcloroformo y 2 veces más con cloroformo. Por último se precipitaba con etanol y acetato sódico en la forma acostumbrada.

En algunas ocasiones se simplificaba el método tratando 1 pmol de DNA con 2 unidades de enzima en un volumen de 50 μ l durante 30 minutos. La enzima se inactivaba a continuación por doble fenolización, tras lo cual el DNA se precipitaba como de costumbre.

2.9.10.2.2.- Ligación de DNA.

La reacción se realizaba en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción contenía el vector linearizado, el fragmento de DNA a insertar (en una concentración molar doble o triple que la del vector), el tampón de ligación a una concentración final de (Tris-HCl 50 mM, pH:7,6; MgCl₂ 10 mM; ATP 1 mM; DTT 1 mM y PEG 8.000 al 5%) y 1-2 unidades Weiss de T4 DNA ligasa. Las condiciones de la reacción eran: 12°C durante 16 horas y 1 unidad de enzima para extremos cohesivos, y 23-26°C durante 4-6 horas y 2 unidades de enzima para extremos romos.

La eficacia de la ligación se comprobaba por electroforesis en geles de agarosa. Los productos de la ligación se empleaban para transformar células competentes de *E. coli*, con objeto de amplificar el DNA obtenido.

2.9.11.- Hibridación de ácidos nucleicos.

2.9.11.1.- Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.

Fragmentos de DNA de *S.cerevisiae* empleados como sondas fueron marcados radiactivamente con (α -³²P) dCTP, por el procedimiento de "Nick-translation" o "Ramdon Primer", dependiendo de la cantidad de DNA disponible en el momento.

2.9.11.1.1.- Método de la incisión ambulante ("Nicktranslation").

Se siguió el método descrito por Rigby *et al.* (1977), empleando un "kit", suministrado por Amersham International. Se basa en la capacidad de formación de mellas en

una cadena de DNA, y la sustitución de los nucleótidos originales por otros. Entre dichos nucleótidos hay uno marcado radiactivamente con (α - ^{32}P).

En el "kit" se incluye un sistema enzimático formado por una endonucleasa y la DNA polimerasa I.

Se utilizaban 100-200 ng aproximadamente (10 μl) de DNA. La mezcla de reacción se preparaba manteniendo las siguientes proporciones en un volumen final de 50 μl :

10 μl - DNA

10 μl - (100 μM dATP, dGTP, dTTP en Tris-HCl pH:7.8, MgCl_2 y β -mercaptoetanol).

5 μl - (α - ^{32}P) dCTP (400 Ci/mmol)

5 μl - (2,5 U DNA polimerasa I y 50 pg de DNAsal en Tris-HCl pH:7,5, MgCl_2 , BSA y glicerol).

Se incubaba a 15°C durante 2 horas y la reacción se paraba pasando la mezcla por una minicolumna de sephadex G-50, que se centrifugaba en una centrífuga Sigma 101 M a 3.200 rpm durante 4 minutos. La mezcla se recogía en un tubo Eppendorf acoplado a la columna. A continuación se determinaba la actividad específica de la misma y diluía adecuadamente para realizar la hibridación.

Preparación de la minicolumna:

Se colocaba en el fondo de una jeringa de 1 ml de capacidad, 0,5 cm de lana de vidrio (previamente tratada con silano-repelente en campana de gases durante 30 minutos y secada en horno a 180°C, durante 2 horas); el sephadex G-50 se resuspendía en tampón (NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; SDS 0,1% y Tris-HCl 50 mM, pH:7,5) y se dejaba hinchar. Luego se esterilizaba en autoclave y se colocaba el gel en la columna, evitando la formación de burbujas de aire, se centrifugaba como antes y se repetía la centrifugación después de añadir 100 μl de tampón.

2.9.11.1.2.- Método del alargamiento del iniciador ("Primer extensión").

Se basó en la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1984), utilizando un "kit" suministrado por Amersham International. Consiste en el empleo de una mezcla de hexanucleótidos que, actuando como iniciadores ("primers") en varios sitios de una cadena de DNA desnaturalizado, permiten al fragmento "Klenow" sintetizar la cadena complementaria, introduciendo un oligonucleótido marcado radiactivamente.

Se empleaban unos 25 ng (5 μl) de DNA que, tras ser centrifugado durante unos segundos, se calentaba a 95-100°C durante 2 minutos en baño de agua hirviendo. Inmediatamente se ponía en hielo, donde se añadían: 10 μl de la solución (dATP; dGTP; dTTP; Tris-HCl pH:7.8; MgCl_2 y β -mercaptoetanol), 5 μl de la solución (mezcla de hexanucleótidos en agua y BSA), 5 μl de (α - ^{32}P) dCTP (3.000 Ci/mmol), 2 μl de la solución (1 unidad/ μl del fragmento "Klenow" de la DNA polimerasa I en fosfato potásico 50 mM, pH: 6,5; β -mercaptoetanol 10 mM y glicerol al

50%) y agua en cantidad suficiente para alcanzar 50 μ l finales de mezcla de reacción. Después de mezclar los componentes se centrifugaba brevemente y se incubaba a 20° C durante la noche. Posteriormente se completaba el volumen hasta 100 μ l con tampón SSPE x 5 (SSPE x 20: NaCl 3,6 M, Na₂PO₄ 0,2 M, pH:8,4 y EDTA 0,02 M) y se pasaba la mezcla por una minicolumna de sephadex G-50, según se describe en el apartado anterior.

Finalmente se desnaturalizaba el DNA calentando a 95-100° C, durante 2 minutos en baño de agua hirviendo y pasándolo inmediatamente a hielo.

2.9.11.2.- Hibridación DNA-RNA ("Northern Transfer"):

Se basó en el procedimiento descrito por Thomas (1980), siguiendo el procedimiento de Pall.

Consiste en la transferencia de RNA total o mensajero, separado electroforéticamente por tamaños, a filtros de nylon, para proceder a su hibridación con sondas radiactivas.

Soluciones:

- HCl 0,25 M
- Solución desnaturalizante: NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M.
- Solución neutralizante : acetato sódico 3 M, pH:5,5.
- SSC x 20 : NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M, pH:7.
- Solución Denhardt x 100; Ficoll al 2% (P/V); PVP al 2%(P/V) y BSA al 2% (P/V).
- Solución de prehibridación: solución Denhardt x 5; SSC x 5; Na₂PO₄ 50 mM pH: 6,5; SDS al 0,1%; DNA de esperma de salmón 250 μ g/ml y formamida al 50% (V/V).
- Solución de lavado n° 1: SSC x 2 y SDS 0,1% (P/V).
- Solución de lavado n° 2: SSC x 0,1 y SDS 0,1% (P/V).

Transferencia del RNA a la membrana.

La electroforesis de RNA se realizaba como se describe en el apartado 2.9.8 de Métodos.

Tras la electroforesis se hacía una fotografía del gel, luego se le cortaba por la parte superior de los pocillos y se medía. Seguidamente se apilaban servilletas de papel (de tamaño algo superior al del gel) hasta una altura de 10 cm. Sobre ellas se colocaban 2 papeles Whatman 3 MM (del tamaño del gel), humedecidos en SSC y una membrana de nylon (del tamaño del gel) y humedecida en SSC. Sobre esta membrana se colocaba el gel, evitando la formación de burbujas de aire. La transferencia era bidireccional, por lo tanto, sobre el gel se colocaba otra membrana de nylon, 2 papeles Whatman y servilletas, de la misma forma que antes pero en sentido inverso y sobre ello un peso uniformemente repartido de unos 0,5 Kg. Tras unas 16 horas, se extraían las membranas y se dejaban 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se secaban en horno a 80°C durante 2 horas. Una vez secas las membranas se mantenían en bolsas de plástico con desecador de silicagel y selladas. Para asegurarse de que la transferencia había sido correcta, se observaba el gel en transiluminador de luz UV.

Con el fin de tener una referencia de tamaños moleculares y para verificar que el RNA se había transferido, se teñía la tira de membrana que contenía el patrón, para lo cual se fijaba el RNA con una solución de ácido acético 1 M durante 10 minutos y a continuación se teñía con una solución de azul de metileno al 0,2%, ácido acético 0,4 M y acetato sódico 0,4 M durante 10 minutos y, finalmente, se lavaba con agua hasta que desaparecía el color azul del fondo.

Hibridación de la sonda radiactiva.

Con el fin de desnaturalizar el DNA no homólogo, se calentaba la solución de prehibridación a 95°C durante 10 minutos y se enfriaba en hielo. En una bolsa de plástico que contenía la membrana, se añadía dicha solución a razón de 4 ml/100 cm² de membrana. Se sellaba la bolsa evitando la formación de burbujas de aire, y se introducía en otra bolsa que se sellaba igualmente. Se incubaba en baño a 42°C durante 1 hora con agitación suave. Pasado este tiempo, se eliminaba la solución de prehibridación y se añadía la solución de hibridación (preparada recientemente), a razón de 2 ml/100 cm² de membrana. La solución de hibridación se preparaba añadiendo a la solución de prehibridación la sonda radiactiva, de modo que la concentración final no excediera 10⁶ cpm/ml.

El sellado de las dos bolsas se realizaba de igual manera que en la prehibridación. Se incubaba en baño a 42°C durante una noche con agitación suave. Tras esto, se sacaba la membrana de las bolsas y se introducía en un baño, con 250 ml/100 cm² de membrana, de solución de lavado nº 1. Se incubaba con fuerte agitación (200 rpm) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este lavado se repetía 3 veces. A continuación se aplicaba la solución de lavado nº 2, con la que se realizaban dos lavados de 15 minutos a 50°C. Por último la membrana se secaba y se exponía con película para autorradiografía a -80°C con pantallas amplificadoras.

2.9.12.- Secuenciación del DNA.

Para la secuenciación del DNA se siguió el procedimiento diseñado por Sanger *et al.*(1977), basado en el empleo de 2',3'-dideoxynucleótidos (ddNTP), análogos de los 2'-deoxynucleótidos trifosfato (dNTP), y en la parada de elongación que produce la incorporación de los primeros en una cadena de DNA en formación, por carecer del grupo 3'-OH, necesario para la unión al siguiente nucleótido mediante enlace fosfodiéster.

2.9.12.1.- Desnaturalización del DNA.

El DNA plasmídico era extraído de *E. coli* por el método de lisis alcalina descrito en el apartado 2.9.2 de Métodos y su concentración ajustada a aproximadamente 0,25 µg/µl en agua. Posteriormente, era sometido a desnaturalización alcalina con el fin de obtener DNA de cadena sencilla (DNA molde). Para ello se ponían en un tubo eppendorf 8µl de DNA y 2 µl de NaOH 2 N (recientemente preparada), se daba un pulso y se incubaba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se pasaba el tubo a un baño de hielo y se añadían 3µl de acetato sódico 3 M, pH:4,5; 7µl de agua y 60 µl de etanol absoluto fríos, se mezclaban rápidamente y se congelaba la mezcla a -80°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaba a 12000 rpm en microfuga a 4°C durante 10 minutos, se eliminaba el sobrenadante, se lavaba con etanol al 70% y se repetía la centrifugación en las mismas condiciones. Por último, se desecaba el DNA y se redisolvió en 10 µl de agua.

2.9.12.2.- Hibridación del iniciador con la cadena de DNA molde.

Los iniciadores comerciales UP yRUP (ambos heptadecámeros) fueron hibridados con la cadena de DNA molde de la siguiente manera: al DNA molde se le añadían 2 µl de tampón de hibridación (Tris-HCl 280 mM, pH:7,5; MgCl₂ 100 mM y NaCl 350 mM) y 2µl de solución del iniciador (0,1 unidades de absorción a 260 nm por ml de TE). Tras un pulso, se incubaba la mezcla a 37°C durante 20 minutos y a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos.

2.9.12.3.- Síntesis de DNA "in vitro".

Se llevó a cabo empleando el sistema de secuenciación suministrado por Pharmacia LKB Biotechnology, consistente en dos reacciones sucesivas: reacción de marcaje y reacción de terminación.

Previamente se diluía la T7 DNA polimerasa (suministrada en Tris-HCl 25 mM, pH: 7,5; NaCl 0,25 M; DTT 5 mM y glicerol al 50%) con tampón de dilución de la enzima (Tris-HCl, DTT, BSA y glicerol) hasta una concentración de 1,5 unidades por µl.

Reacción de marcaje.

A la mezcla de DNA molde e iniciador se le añadía (en la pared del tubo):

3 μ l de la mezcla de marcaje (dGTP 2 μ M, dCTP μ M y dTTP 2 μ M)
2 μ l de la T7 DNA polimerasa diluida
1 μ l de (α -³⁵S)dATP ,10 μ Ci, más de 600 mCi/mmol.

Se centrifugaba brevemente para mezclar y se incubaba a temperatura ambiente 5 minutos. (El añadir los componentes en la pared del tubo permitía iniciar todas las reacciones al mismo tiempo en el momento de la centrifugación).

Reacciones de terminación.

A cuatro tubos conteniendo cada uno 2,5 μ l de la mezcla correspondiente de terminación "A", "C", "T" o "G" (por ejemplo: la mezcla "A" contiene ddATP 15 μ M, en solución con dATP, dCTP, dGTP, y dTTP 150 μ M), y que se encuentran en un baño a 37°C, se les añadían en la pared del tubo 4,5 μ l de la reacción de marcaje correspondiente, se daba un pulso para mezclar y se incubaba a 37°C durante 5 minutos. Después se añadían 5 μ l de solución de parada a cada tubo (en la pared también), la cual contenía: formamida desionizada al 95%, EDTA 20 mM, pH:7,5, xileno cianol FF al 0,05% (P/V) y azul de bromofenol al 0,05% (P/V), se centrifugaba brevemente y se sometían las muestras a electroforesis.

2.9.12.4.- Electroforesis para secuenciación.

Preparación del gel.

Se usaron geles de poliacrilamida de 17 x 40 cm y 0,4 mm de espesor. Su composición era la siguiente:

acrilamida	5,7%
bisacrilamida	0,3%
urea	7 M
Tampón	TBE \times 1

Se disolvía la mezcla a 30°C durante 15 minutos con agitación suave, se filtraba por un filtro Millipore y se añadía agua ultrapura hasta completar un volumen final de 70 ml. Se desaireaba 15 minutos. A uno de los cristales se le aplicaba silano repelente y al otro "bind-silano" con el fin de que el gel quedara adherido a uno de ellos. Para sellar los dos cristales por la parte inferior, se tomaban 10 ml del gel y se le añadían 170 μ l de persulfato amónico al 10 % y 50 μ l de TEMED. Tardaba en polimerizar de 10 a 15 minutos. A los 60 ml restantes, se les añadían 336 μ l de persulfato amónico al 10 % y 22,4 μ l de TEMED. y la mezcla se vertía entre los dos cristales

evitando la formación de burbujas de aire. Finalmente, se colocaba el peine y se dejaba polimerizar durante la noche.

Electroforesis.

El tampón de electrodos era TBE x 1 (apartado 2.9.6 de Métodos). La electroforesis se realizaba a 1500-1700 V (unos 25 mA) manteniendo una temperatura de 45-50°C. Primero se precorría el persulfato durante 1 hora, tras lo cual se procedía a cargar las muestras que habían sido calentadas a 80°C durante 3 minutos para desnaturalizar el DNA. Se realizaban dos carreras consecutivas, de manera que el segundo grupo de muestras se cargaba cuando el xileno cianol de las muestras cargadas en primer lugar se encontraba a unos 6 cm del final del gel. La electroforesis concluía cuando el colorante azul de bromofenol del segundo grupo de muestras estaba a 1 cm del final del gel. El xileno cianol avanza al nivel de los fragmentos de 70 a 100 bases y el azul de bromofenol al de los de 20 a 25 bases.

2.9.13.- Transformación de *E. coli*.

La transformación de cepas de *E. coli* se llevaba a cabo por dos métodos distintos dependiendo del objetivo que se persiguiera en cada caso. Cuando solo se trataba de amplificar un plásmido, generalmente se empleaba el procedimiento descrito por Mandel y Higa (1970). Cuando interesaba obtener plásmidos, construidos en experimentos de subclonación, se utilizaba el método diseñado por Hanahan (1985).

2.9.13.1.- Método del CaCl₂ (Mandel y Higa).

Una colonia procedente de un cultivo reciente en placa de LB, se inoculaba en 10 ml del mismo medio y se incubaba a 37°C con agitación durante una noche.

0,5 ml de este cultivo eran transferidos a un matraz con 50 ml de LB y se incubaban a 37°C con fuerte agitación, hasta alcanzar una concentración de 7×10^7 células/ml (*E. coli* HB101 DO(550): 0,5). Seguidamente el cultivo se enfriaba en hielo durante 10 minutos. A partir de aquí todas las soluciones eran enfriadas a 0°C. Posteriormente se centrifugaba (en el rotor JA-20 de una centrífuga Beckman J.2-21) a 7.000 rpm, a 4°C durante 5 minutos y se resuspendían las células en 20 ml de CaCl₂ 0,05 M. Tras mantener la suspensión en hielo durante 15 minutos, se volvía a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendía en 3 ml de CaCl₂ 0,05 M. Entonces se repartía la suspensión en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf fríos. (Cuando interesaba conservar células competentes, éstas se congelaban a -80°C con un 15% (V/V) de glicerol y luego se descongelaban en baño de hielo).

Se añadía a cada tubo 100 µl de (CaCl₂ 10 mM; MgCl₂ 10 mM y Tris-HCl 10 mM, pH:7) y 0,1 - 1 µg de DNA plasmídico (en 100 µl como máximo), se mezclaba suavemente y se incubaba en hielo durante 25 minutos. A continuación se daba un choque térmico en baño a

42°C durante 2 minutos y se añadía 1 ml de LB. Tras incubación durante 1 hora a 37°C, se sembraba en placas de medio LB suplementado con ampicilina y se mantenía una noche a 37°C, hasta aparición de colonias.

Simultáneamente se hacían controles negativos (sólo células y tampones o solo tampones y por ejemplo pBR322), y controles positivos (células, tampones y por ejemplo pBR322). El porcentaje de transformación por este método es de 10^5 - 10^7 transformantes/ μ g de pBR322 en *E. coli* HB101.

2.9.13.2.- Método de RbCl (Hanahan).

Una colonia procedente de un cultivo reciente en placa de LB se inoculaba en 10 ml de SOB, contenidos en un matraz de capacidad 10 veces superior. Tras incubación a 37°C y 275 rpm hasta DO a 550 nm de 0,45 - 0,55 (aproximadamente $4-7 \times 10^7$ células/ml), se recogían las células en botellas de centrifuga y se mantenían en hielo de 10 a 15 minutos. A partir de aquí todos los procesos se realizaban en baño de hielo. Se centrifugaba a 4.000 rpm, en el rotor JA-20 de una centrifuga Beckman J.2-21, durante 15 minutos a 4°C, retirando el sobrenadante con pipeta, y se resuspendían las células en tampón TFB, a 1/3 del volumen de partida, mediante agitación fuerte. Tras mantenerlas en hielo durante 10-15 minutos, se recogían por centrifugación en las condiciones anteriores y se resuspendían en TFB a 1/12,5 del volumen de partida. Entonces se añadía DMSO, al 3,5% (V/V) del volumen actual y tras agitación enérgica se colocaba en hielo durante 10 minutos, se añadía DTT al 3,5% (V/V) del volumen actual y se volvía a agitar fuertemente y a colocar en hielo durante otros 10 minutos. Posteriormente, se adicionaba DMSO en igual proporción que la primera vez y se repetía la agitación y la incubación en hielo.

A partir de aquí se repartía la suspensión en alícuotas de 210 μ l en tubos Eppendorf fríos. Se añadía el DNA plasmídico (en cantidad inferior a 20 μ l) y, tras agitación, se mantenía en hielo de 20 a 40 minutos. A continuación se daba un choque térmico a 42°C, durante 90 segundos. Inmediatamente se colocaba en hielo durante 2 minutos. Finalmente se adicionaban 800 μ l de medio SOC (precalentado a 20°C) y se incubaba a 37°C y 225 rpm durante 1 hora. Por último, se sembraban placas de medio LB suplementado con ampicilina, y se mantenían a 37°C durante una noche.

Se realizaban los mismos controles que en el apartado anterior. El porcentaje de transformación por este método es de $2 - 7 \times 10^8$ transformantes/ μ g de pBR322 en cepas derivadas de *E. coli* DH1 y JM109.

Soluciones:

. Solución de K-MES 1 M: Solución de MES 1 M, ajustada a pH:6,3 con KOH y esterilizada por filtración.

. Tampón TFB: (K-MES 10 mM, pH: 6,3; RbCl 100 mM; MnCl₂ 45 mM; CaCl₂ 10 mM y Tricloruro de hexamina cobalto III 3 mM); el pH final es de 6,15 +/- 0,1. Las sales se añadían en estado sólido y la solución se esterilizaba por filtración.

. Solución de DTT 2,2 M en acetato potásico 40 mM, pH:6,2. Se esterilizaba por filtración.

. DMSO: Solución comercial de grado espectrofotométrico.

2.9.13.3.- Selección de clones transformantes de *E. coli* portadores de vectores con inserto.

En los plásmidos que poseen el gen *lacZ* y un MCS, esta última región ha sido diseñada por ordenador para que cualquiera de los puntos de corte que posee pueda sustituir al extremo amino terminal de un gen de β-galactosidasa funcional. Por lo tanto, colonias transformantes de cepas de *E. coli* portadoras de una mutación en el gen de la β-galactosidasa, como JM109 o DH5α, aparecen de color azul en placas de LB con el sustrato cromogénico sintético X-gal, siempre que el plásmido transformado no lleve un inserto en el MCS que interrumpa el marco abierto de lectura (ORF) del gen. Por el contrario, los clones transformados con plásmidos que porten un inserto que interrumpa el ORF, al no poder hidrolizar el sustrato X-gal, dan lugar a colonias blancas.

2.9.14.- Transformación de *S. cerevisiae*.

2.9.14.1.- Transformación de esferoplastos de *S. cerevisiae*.

Para transformar células de *S. cerevisiae* se siguió el protocolo original descrito por Hinnen *et al.* (1978). Por este método se obtienen esferoplastos mediante tratamiento con glucosilasa, que luego son transformados con DNA plasmídico.

A partir de un preinóculo en 20 ml de YED, incubado a 24°C en agitación durante una noche, se sembraban 150 ml de YED, de manera que la concentración inicial fuera de 4-5x10⁶ células/ml. Tras crecer las células a 24°C en agitación durante 3-4 horas, hasta 1-2x10⁷ células/ml (DO a 600 nm de 0,3), estas se recogían por centrifugación y se lavaban dos veces con 20 ml de sorbitol 1 M. Se centrifugaban de nuevo y se resuspendían finalmente en 15 ml del mismo estabilizador. Se pasaban a un matraz y se trataban con 200 μl de glucosilasa a 26-28°C durante 1 hora con agitación suave. Al cabo de este tiempo se observaba al microscopio la presencia de esferoplastos, comprobando su fragilidad osmótica, por adición de agua.

Los esferoplastos se sedimentaban por centrifugación a 3.000 rpm en el rotor JA-20 de una centrífuga Beckman J.2-21, durante 5 minutos y se lavaban con 15 ml de sorbitol

1 M para eliminar la glucosidasa. Tras resuspenderlos (evitando la agitación mecánica) en 10 ml de una mezcla de sorbitol 1 M/Tris-HCl 100 mM, pH:7,5; CaCl₂ 100 mM, en la proporción 9:1, se centrifugaban de nuevo en las mismas condiciones y posteriormente se resuspendían en 1 ml de la misma mezcla.

Esta preparación se repartía en dos alícuotas a razón de 500 µl, a una de las cuales se le adicionaban 5-10 µl de DNA plasmídico y la otra servía como control sin DNA; (la concentración de DNA era de 0,5 - 10 µg de DNA, en un volumen nunca superior a 10 µl). La mezcla se agitaba con suavidad y se dejaba en reposo, durante 15 minutos a temperatura ambiente. En esta mezcla, el sorbitol actúa como estabilizador osmótico, el Tris-HCl como tampón y el CaCl₂ evita el fenómeno de repulsión por cargas entre DNA y membrana. Pasados los 15 minutos se añadía a cada tubo 5 ml de una mezcla 9:1 de PEG 4.000 al 44%/Tris-HCl 100 mM, pH:7,5; CaCl₂ 100 mM, ayudándose de una pipeta para mezclar bien la suspensión. Se esperaban 10 minutos más y se centrifugaba a 3000 rpm durante 3 minutos. Los esferoplastos se resuspendían con cuidado en 3 ml de la mezcla de sorbitol/Tris-CaCl₂ y se vertían en un matraz con 125 ml de medio de regeneración (MR), atemperado a 45-50°C. El medio se repartía en placas, con MM de soporte, que se incubaban a 24°C durante 3-5 días hasta aparición de colonias lenticulares embebidas en el medio.

2.9.14.2.- Transformación de células intactas de *S. cerevisiae*.

Se siguió básicamente el método descrito por Ito *et al.* (1983).

Las células se cultivaban en 100 ml de YED hasta una DO a 600 nm de 1 (2x10⁷ cel/ml). Se recogían por centrifugación y se lavaban con 5 ml de TE y con 5 ml de acetato de litio 0,1 M en TE. Finalmente se resuspendían en 1 ml de acetato de litio 0,1 M en TE, y se incubaban a 30° C durante 1 hora con agitación suave.

Transcurrido este tiempo, las suspensiones de células se dividían en porciones de 100 µl en Eppendorf estériles, a las que se añadía el DNA transformante (1-10 µg, en TE hasta 15 µl), y 50 µg de DNA "carrier" (DNA de esperma de salmón o de timo de ternera 3 mg/ml), y se incubaba a 30°C 30 minutos. A continuación se adicionaba 0,7 ml de solución de PEG 4000 en acetato de litio 0,1 M en TE y se mantenía una hora a 30°C. Las células se sometían a un choque térmico a 42°C durante 5 minutos y se recogía centrifugando 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, el precipitado se lavaba dos veces con TE y se resuspendía en 500 µl de TE para sembrar por dilución en placa en el medio selectivo correspondiente.

2.9.15.- Análisis rápido de transformantes procedentes de una transformación de esferoplastos de *S. cerevisiae*.

Cuando la transformación de esferoplastos se realiza con una genoteca, el análisis de los transformantes es un proceso tedioso, ya que no pueden realizarse réplicas por estar las colonias incluidas en la masa de agar. Para evitar el picar colonia por colonia, las placas

de agar se introducían de 2 en 2 en bolsas de plástico estériles con 10 ml de agua estéril y se trituraban con ayuda del Estomacher hasta que no quedaban porciones grandes de la masa de agar o en las que quedaban no se observaban colonias. La mezcla obtenida se filtraba a través de una gasa estéril para eliminar los restos de agar. La suspensión de células resultante se centrifugaba a 5000 xg y se resuspendía en un volumen de agua estéril lo más pequeño posible (Raquel de la Guerra, comunicación personal, con ligeras modificaciones).

La selección de los transformantes capaces de crecer a 37°C se realizaba en placas del medio de cultivo adecuado para la conservación del plásmido. Las placas debían estar precalentadas a 37°C para facilitar la selección de los transformantes no líticos.

En cada placa debían sembrarse representantes de todas las colonias de transformantes obtenidas, para lo cual se contaba el número de células de la suspensión y se dividía por el número de clones transformantes obtenidos. Así se sabía el número de células de cada colonia de transformantes que se tenía en la suspensión por ml y se podía calcular el volumen que había que sembrar en cada placa para no dejar ningún clon fuera de la selección.

2.10.- TECNICAS DE CITOMETRIA DE FLUJO.

2.10.1.- Preparación de células para distintos análisis por citometría de flujo.

2.10.1.1.- Para determinación de viables.

- Recoger $2-5 \times 10^6$ células por centrifugación a 2000 xg 5 min.
- Lavar dos veces con PBS.
- Resuspender en 200µl de yoduro de propidio (IP) al 0,005%
- Mantener 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Analizar en el citómetro de flujo.

2.10.2.- Análisis por citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo se empleó un analizador del Centro de Citometría de Flujo de la UCM (CCF), marca Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA).

Este citómetro está equipado con un láser de 15 mW que emite luz a 488 nm. Se utilizó para los análisis de viabilidad.

El análisis de los datos, se realizó con los siguientes programas de Becton-Dickinson (San José, CA): FACStar PLUS Research Software, FACScan Research Software y LYSYS II. En todos los casos se recogieron 5.000 células por muestra.

2.10.2.1.- Análisis de viabilidad.

Para la detección de las células muertas se empleó ioduro de propidio (IP) que se une a los ácidos nucleicos de doble cadena y emite fluorescencia a 588 nm al ser excitado con luz de 488 nm. Mediante un espejo dicróico (DM/560) se separan las dos longitudes de onda. La señal correspondiente al IP es recogida por un fotomultiplicador (PMT) que transforma la señal lumínica en un pulso eléctrico y la envía al computador. El voltaje del PMT fue de 450 V y la ganancia logarítmica.

III.- RESULTADOS

1.- CARACTERIZACION DE LA MUTACION *lyt1-1*.

1.1.- CARACTERISTICAS DEL MUTANTE *S. cerevisiae* L2

El mutante *S. cerevisiae* L2 fue aislado en el laboratorio del Dr. Cabib por tratamiento mutagénico de la cepa silvestre *S. cerevisiae* S288C con MSE, y posterior selección de mutantes autolíticos, según el método descrito por Cabib y Durán (1975) (Apartado 2.8.2.2.A de Métodos).

Este mutante es capaz de crecer con normalidad a 24°C, casi hasta los niveles de la cepa silvestre. Sin embargo, a 37°C crece una o dos generaciones solamente, lisándose en el momento en que la yema tiene un tamaño similar al de la célula madre. La lisis se produce siempre en el mismo punto del ciclo mitótico.

Según se ha caracterizado anteriormente en nuestro laboratorio (Santamaría, 1979; Nombela y Santamaría, 1984), la mutación *lyt1-1* afecta a un sólo gen, designado como *LYT1*.

Paralelamente a la caracterización del gen *LYT1*, se ha caracterizado en nuestro laboratorio otro gen cuya mutación determina la aparición de un fenotipo autolítico termosensible, el gen *LYT2* (Santamaría, 1985). El mutante *S. cerevisiae* L3, portador de la mutación *lyt2-1*, crece también con normalidad a 24°C, sufriendo autólisis cuando se incubaba a la temperatura de 37°C, en el momento en que la yema es pequeña.

1.2.- MANIPULACIONES GENETICAS INICIALES

El mutante L2 fue cruzado con la cepa *S. cerevisiae* 373, cepa silvestre utilizada como patrón para muchos experimentos. Los objetivos eran los siguientes: observar la segregación de la mutación autolítica *lyt1-1* y limpiar el fondo genético de la cepa de otras posibles mutaciones (Santamaría, 1979).

Por la segregación de la mutación en las diferentes ascas (2:2), se comprobó que efectivamente se trataba de una mutación que afectaba a un sólo gen (Santamaría, 1979).

De entre todos los segregantes, se escogió el L2C16b, portador de la mutación autolítica y de tipo sexual *a*. Esta cepa fue cruzada posteriormente con *S. cerevisiae* TD28, auxótrofa para el uracilo y de tipo sexual opuesto. Se obtuvieron de este cruce varios segregantes autolíticos y auxótrofos para el uracilo, siendo los más usados en este trabajo L2C28c y L2C24d (Las características de las cepas se exponen en la Tabla I).

Por otra parte, el mutante L2C16b fue cruzado de nuevo con la cepa *S. cerevisiae* 373 y de los segregantes se escogió uno con tipo sexual α y auxótrofo para la adenina, L2C21b, el cual fue cruzado con la cepa *S. cerevisiae* 6657-9b con el fin de obtener un mutante auxótrofo para la leucina, ya que la genoteca que se iba a utilizar se encontraba ligada al vector YEp 13, el cual incluye el gen *LEU2*. Tras la esporulación de los diploides obtenidos, se disecaron 8 ascas completas. De las ascosporas obtenidas se seleccionó el segregante L2C34d como el más adecuado para estudios posteriores.

Como resultado de los cruces realizados, tuvimos la evidencia de que se trataba de una mutación recesiva, ya que los diploides heterocigóticos para la mutación *lyt1-1* eran capaces de crecer a 37°C con normalidad (Santamaría, 1979).

Asimismo, en estudios posteriores, se obtuvieron diploides heterocigóticos portadores de las mutaciones *lyt1-1* y *lyt2-1* que eran capaces de crecer a la temperatura no permisiva. Esto confirmaba los resultados obtenidos por Santamaría (1985), quien comprobó que *LYT1* y *LYT2* eran dos genes distintos, pertenecientes a distinto grupo de complementación.

1.3.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA MUTACION *lyt1-1*

La caracterización fenotípica se llevó a cabo con diversas cepas de *S. cerevisiae* portadoras de la mutación *lyt1-1*, principalmente con el segregante L2C34d.

1.3.1.- Estudio de la expresión de la mutación *lyt1-1* mediante cultivo en matraz.

1.3.1.1.- Crecimiento a 24 y 37°C.

Las células del mutante *lyt1-1* crecen normalmente a 24°C, aunque sin alcanzar los niveles de la cepa silvestre, como se muestra en la Figura 11 A y B. Sin embargo, a la temperatura no permisiva, en general, no son capaces de crecer más que hasta doblar la densidad óptica de partida.

1.3.1.2.- Morfología celular a 24 y 37°C en microscopía de contraste de fases.

El fenotipo *Lyt⁻* puede estudiarse observando la morfología celular después de incubación a 24 y 37°C (Figura 12 B y C) por microscopía de contraste de fases, ya que las células mutantes crecidas a 24°C permanecen refringentes incluso en fase estacionaria. Sin embargo, estas mismas células crecidas a 37°C durante 8 horas aparecen en su mayoría oscuras y por tanto muertas. Puede observarse que las células lisadas presentan una yema de tamaño similar al de la célula madre. Ocasionalmente se observa un alargamiento de una de las dos células.

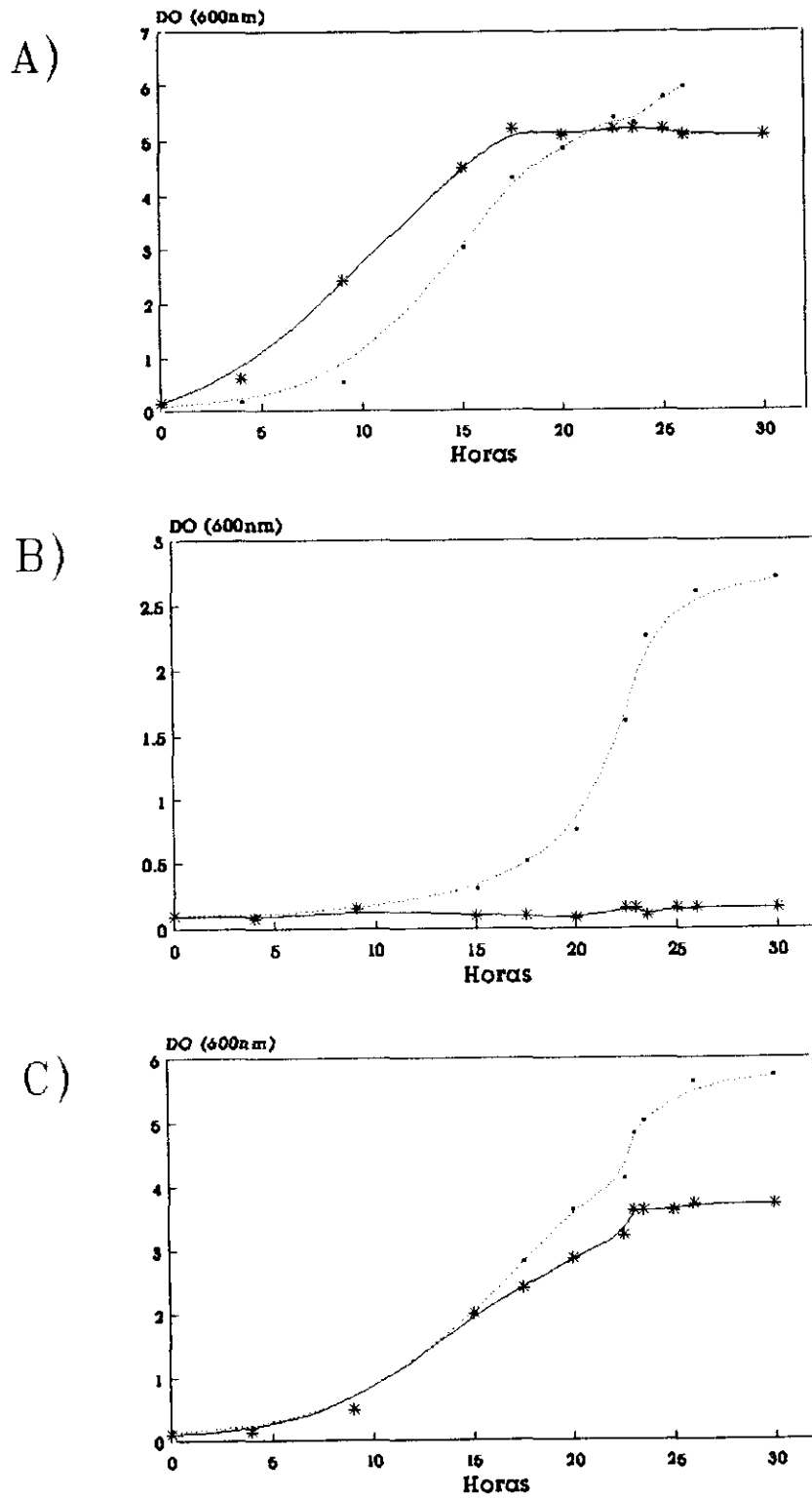


Figura 11.- Curvas de crecimiento en MM suplementado con los aminoácidos necesarios, a 24°C (••••) y 37°C (—*—) de las siguientes cepas de *S. cerevisiae*:

A) S288C (silvestre)

B) L2C34d (mutante *lyt1-1*)

C) T14 (L2C34d transformada con el plásmido p14).

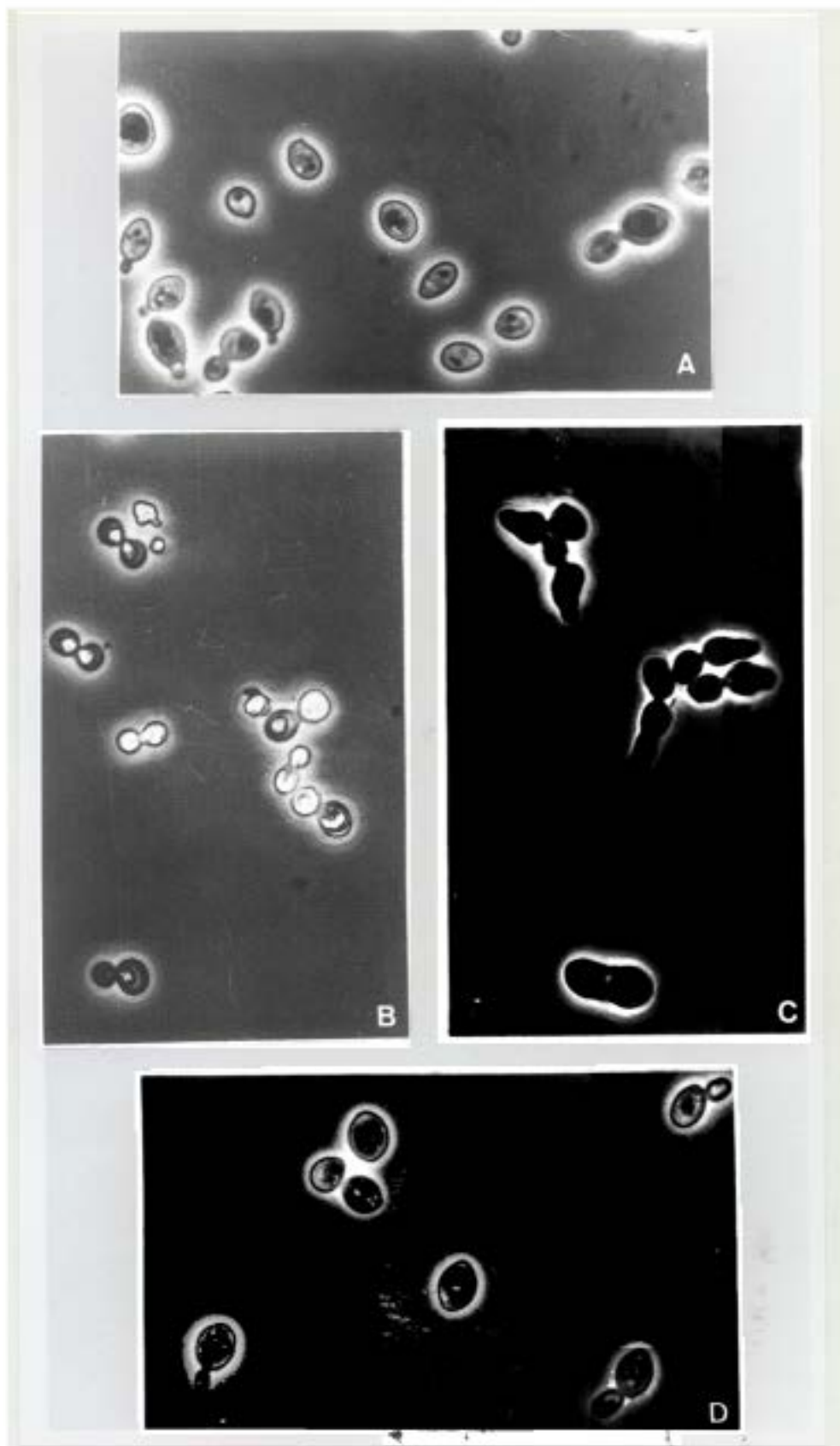


Figura 12.- Microscopía de contraste de fases (900x) de las siguientes cepas de *S. cerevisiae*:

A) S288C (silvestre)

B y C) L2C34d (mutante *lyp1-1*)

D) T14 (L2C34d transformada con el plásmido p14).

Las células fueron crecidas a 24°C y transferidas a medio nuevo, en el que se incubaron a 37°C durante 8-10 horas.

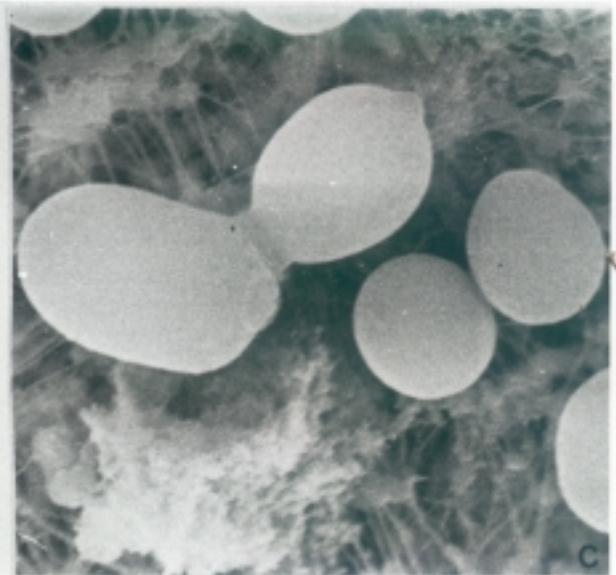
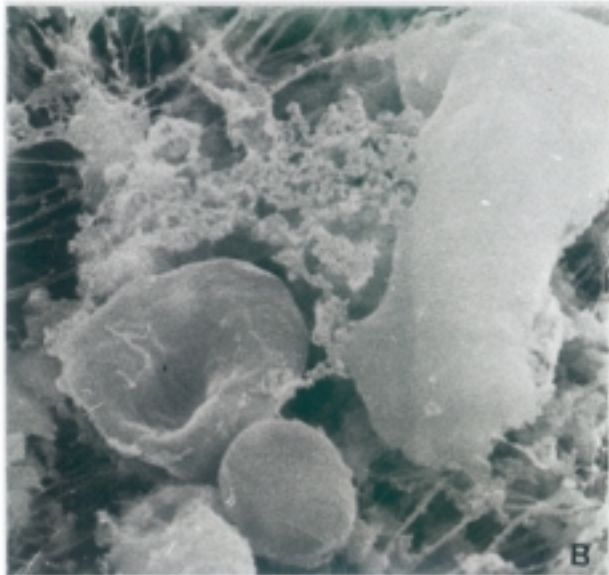
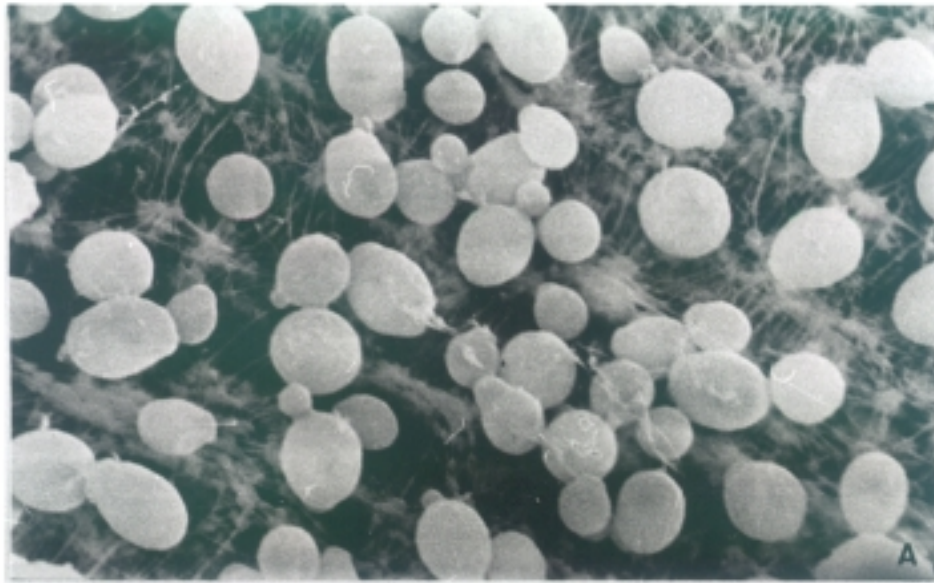


Figura 13.- Microscopía electrónica de barrido de las siguientes cepas de *S. cerevisiae*:

A) S288C, silvestre (3.500 x)

B) L2C34d, *lyt1-1* (6.500 x)

C) T14, L2C34d transformada con el plásmido p14 (6.500 x).

Las células fueron crecidas a 24 °C y luego transferidas a medio nuevo, en el que se incubaron a 37°C durante 8-10 horas.

1.3.1.3.- Morfología celular a 24 y 37°C en microscopía electrónica de barrido.

Las células de la cepa mutante *lyt1-1*, después de 12 horas de incubación a 24 y 37°C, fueron analizadas con el microscopio electrónico de barrido. Según se observa en la Figura 13, las células de la cepa silvestre presentan un aspecto normal (Figura 13 A). Sin embargo, las de la cepa mutante se encuentran deformadas y aplastadas en su mayoría (Figura 13 B).

1.3.1.4.- Viabilidad celular a 37°C.

Con el microscopio de contraste de fases podemos observar la muerte de las células de la cepa mutante crecidas a 37°C. Asimismo, podemos, midiendo la densidad óptica, comprobar que no se produce crecimiento. Sin embargo, ambas medidas no dan idea de la proporción real de células que se ven afectadas por la mutación a tiempos relativamente cortos de incubación a 37°C, puesto que muchas de las células con aspecto refringente al microscopio de contraste de fases han perdido ya la permeabilidad selectiva y están muertas (de la Fuente *et al.*, 1992).

Por ello, es imprescindible medir la viabilidad de las células incubadas a 37°C, para comprobar cuántas permanecen aún vivas. Lo hacemos por los dos métodos descritos en el apartado 2.4 de Métodos:

A) Mediante siembra por dilución en placa de las células procedentes de un cultivo a 37°C, recogidas a diferentes tiempos.

Por este método se observa un descenso de la viabilidad celular que comienza a detectarse a las cuatro horas de incubación a la temperatura no permisiva, decayendo, a partir de entonces, hasta un 30-40% a las 24 horas.

B) Mediante tinción de las células con Ioduro de Propidio y medida del porcentaje de células teñidas por citometría de flujo.

Como ya se dijo en el apartado 2.10.2 de Métodos, el ioduro de propidio es un fluorocromo que se une a ácidos nucleicos de doble cadena y emite fluorescencia roja cuando se le expone a luz de 480 nm de longitud de onda. Sólo es capaz de penetrar en la célula cuando ésta ha perdido la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, es decir, cuando está muerta.

Los resultados obtenidos por este método se muestran en la Figura 14, pudiéndose observar que están en clara correlación con los datos obtenidos por el método A (Figura 15). Sin embargo, presenta una serie de ventajas con respecto al anterior:

- es mucho más rápido: los datos de viabilidad pueden estar disponibles a los 5 minutos de la toma de muestra, lo que permite tomar decisiones rápidas en cuanto al experimento;

- es mucho más representativo, ya que el número mínimo de células examinadas por muestra es de 5000;

- es mucho más exacto, ya que se elimina el posible error humano en recuento celular, cálculos de dilución, recuento de colonias crecidas en las placas, etc.

1.3.1.5.- Crecimiento a 24 y 37°C en presencia de Sorbitol 0,9 M.

Al incubar las células simultáneamente en presencia y ausencia de sorbitol 0,9M como estabilizador osmótico, a 24 y 37°C, se pudo observar que el fenotipo autolítico se manifiesta de modo similar en medio estabilizado y en el que no lo está, como se muestra en la Figura 14.

1.3.1.6.- Liberación de fosfatasa alcalina al medio de cultivo.

Con objeto de cuantificar el grado de lisis celular, se llevó a cabo la valoración de fosfatasa alcalina liberada al medio de cultivo tras distintos períodos de incubación de las células a 37°C.

De forma sorprendente, no fuimos capaces de detectar fosfatasa alcalina en sobrenadantes de cultivos de las cepas mutantes a 37°C. Esto difería de nuestros resultados en medio sólido y de los obtenidos con otros mutantes autolíticos estudiados en nuestro departamento (Lourdes Torres, 1990). Sin embargo, al realizarse los estudios en fermentador, se descubrió que la fosfatasa alcalina aumentaba de forma notable a la temperatura no permisiva cuando se buscaba en extractos celulares en lugar de en sobrenadantes (Figura 15); luego existe aumento de la producción de la enzima a 37°C.

1.3.2.- Estudio de la expresión de la mutación en medio sólido.

Cuando se incubaban las cepas *Lyt⁻* en medio sólido, podía observarse un aumento escaso de la masa celular y si se tomaba una muestra y se analizaba con el microscopio de contraste de fases, se encontraban formas similares a las procedentes de un cultivo en medio líquido.

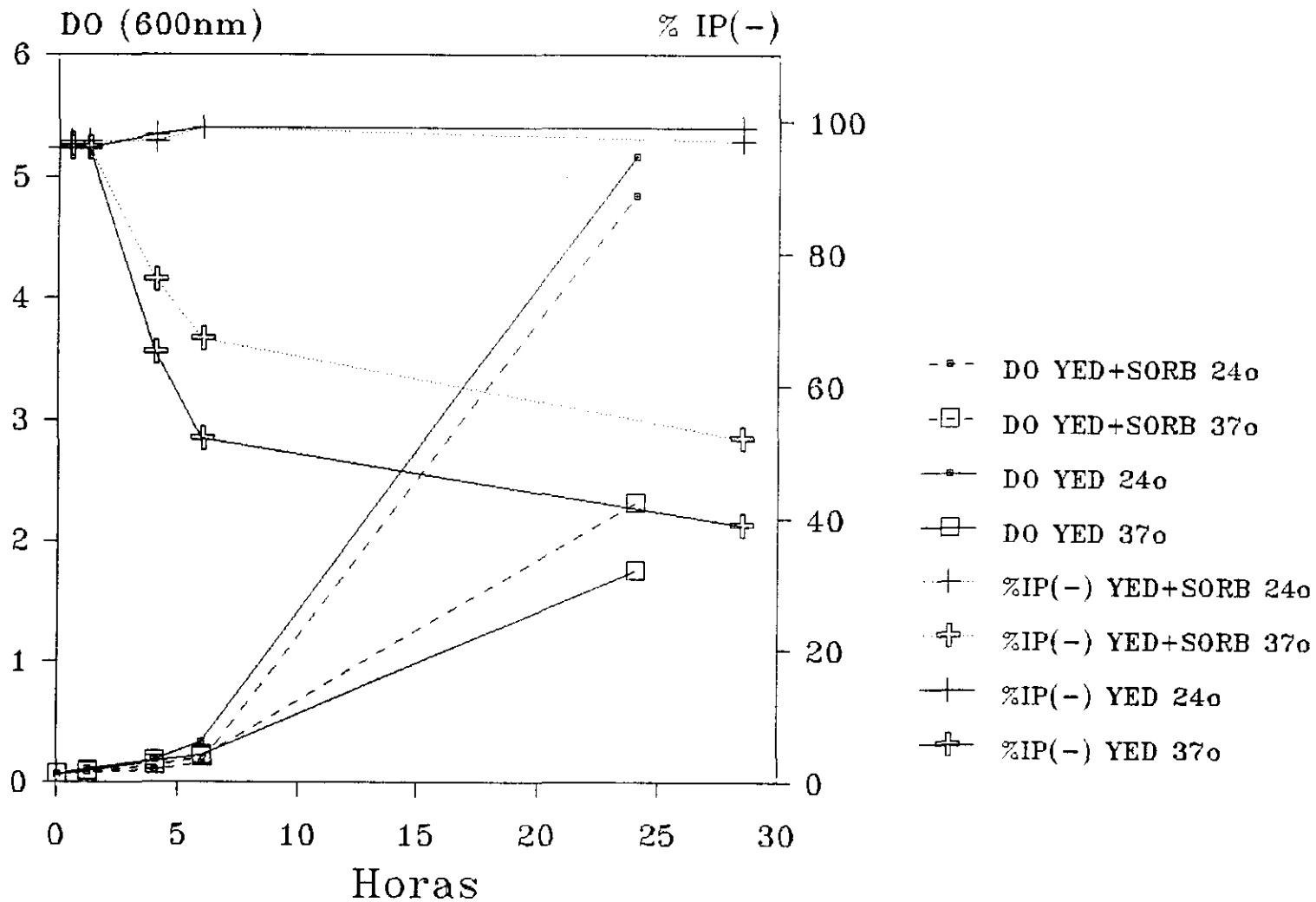


Figura 14.- Estudio del crecimiento del mutante *lyt1-1* a 24 y 37°C en presencia y ausencia de sorbitol 0,9 M. En la gráfica se representan densidades ópticas y viabilidad (% de células no teñidas con IP) en los diferentes tiempos de incubación. Como puede observarse, el fenotipo auto lítico se manifiesta tanto en presencia como en ausencia del estabilizador osmótico.

Por otra parte, también podía detectarse la liberación de la fosfatasa alcalina al medio de cultivo después de un tiempo de incubación a 37°C según los métodos descritos en el apartado 2.8.2.2 de Métodos.

A diferencia de lo ocurrido en medio líquido, la liberación de fosfatasa alcalina al medio de cultivo sólido, era detectable de una forma clara con los dos reactivos de fosfatasa usados, sin necesidad de obtener extractos celulares.

1.3.3.- Condiciones óptimas para la expresión del fenotipo *Lyt*⁻.

La máxima expresión del fenotipo autolítico requiere una serie de condiciones:

- De las diferentes densidades ópticas ensayadas para el inicio de la incubación a 37°C de las células procedentes de un cultivo o/n a 24°C, se comprobó que partiendo de aquellas superiores a 0,1 la expresión del fenotipo no era completa. Es decir, que se podía producir cierto crecimiento a 37°C, a pesar de que el grado de lisis fuera alto.

- Es conveniente precalentar el medio a 37°C antes del inóculo de las células.

- En el caso de querer utilizar densidades ópticas superiores a 0,1 al inocular un cultivo a 37°C con células procedentes de un cultivo a 24°C, éstas debían ser lavadas.

- La temperatura de incubación debe permanecer a 37°C durante todo el tiempo que se requiera la expresión del fenotipo, ya que el descenso de 1 o 2°C disminuye el porcentaje de lisis de forma apreciable.

1.3.4.- Estudio de la expresión de la mutación en fermentador.

Varias cepas *lyt1-1* fueron sometidas a diversas pruebas en un fermentador de 10 L. Según se puede observar en la Figura 15, las células se crecían a 24°C hasta alcanzar la fase logarítmica avanzada y se realizaba entonces el cambio a 37°C. Durante todo el proceso se medían una serie de parámetros como fosfatasa alcalina en sobrenadante y extractos celulares y número de células viables.

Como puede observarse, el aumento de fosfatasa alcalina se detecta al ser medida la enzima en extractos celulares, pero no en el medio de cultivo, como ya se ha comentado anteriormente. La viabilidad celular desciende de forma continua desde el cambio a la temperatura no permisiva, llegando a un 17 % de la población total 24 horas después. La densidad óptica continúa aumentando durante unas 12 a 14 horas después del cambio de temperatura, alcanzando aproximadamente el doble de la densidad óptica existente en el momento del cambio de temperatura.

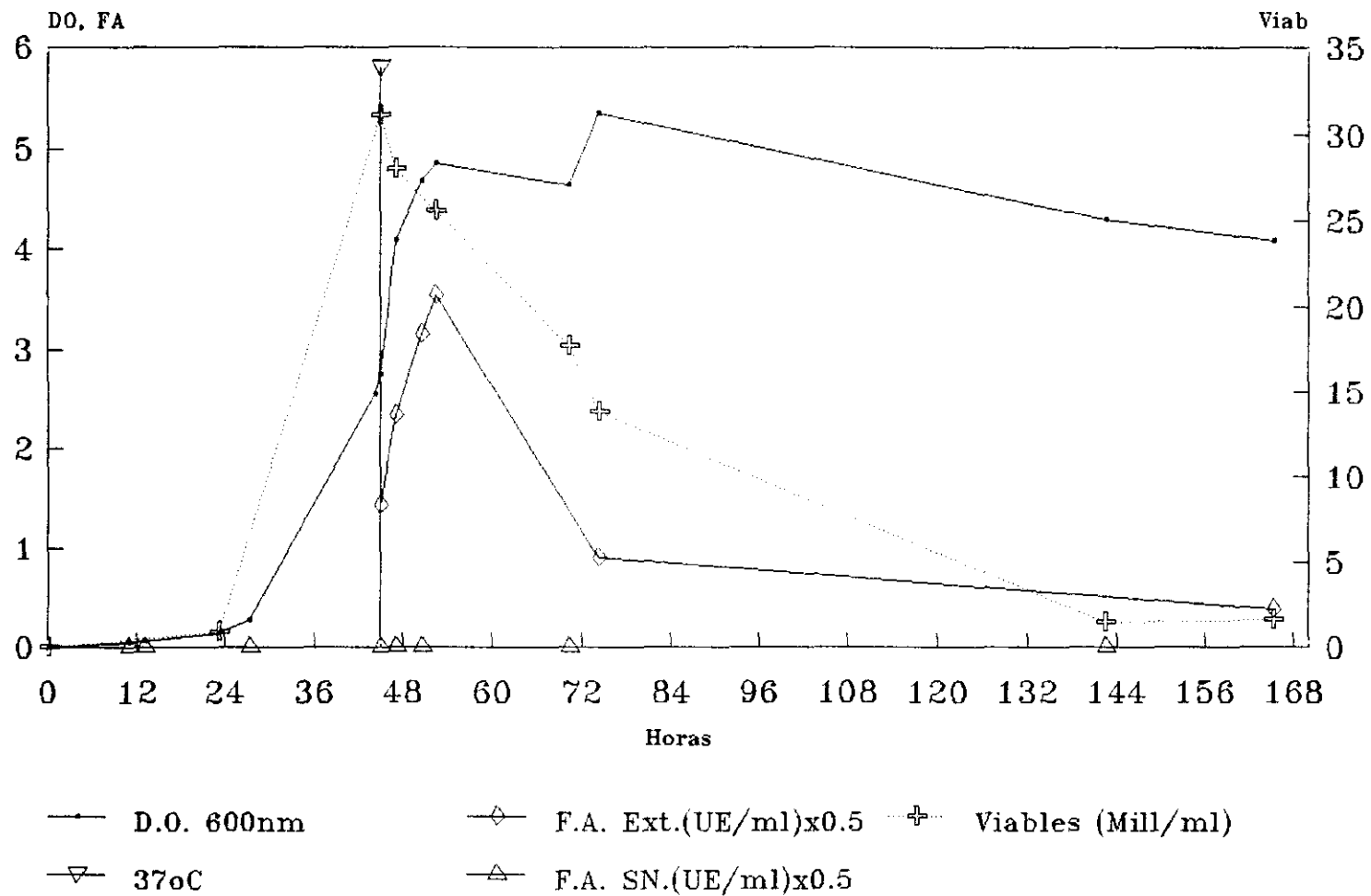


Figura 15.- Estudio de la expresión de la mutación *lyt1-1* en fermentador de 10 litros. La viabilidad fue medida por el método de dilución en placa.

Las condiciones de crecimiento de las cepas en fermentador difieren bastante de las de matraz, ya que la aireación es mayor y la temperatura se mantiene mucho más estable durante el experimento, factor de suma importancia para la correcta expresión del fenotipo. Además, el cambio a la temperatura no permisiva es mucho más rápido. Todo esto hace que el fenotipo autolítico se manifieste partiendo de densidades ópticas altas al iniciar la incubación a 37°C, y no se necesite renovar el medio de cultivo en este punto.

1.3.5.- Efecto de la mutación *lyt1-1* sobre el apareamiento.

Al haberse detectado en mutantes portadores de la mutación autolítica *lyt2-1* una ausencia de apareamiento a 37°C (Torres, 1990), decidimos comprobar el efecto de la temperatura no permisiva sobre la capacidad de apareamiento de las cepas mutantes *lyt1-1*. A 24°C estas cepas se aparean normalmente. Sin embargo, a 37°C, las células de las estirpes mutantes se lisan, aunque las pocas que sobreviven a las 5 horas de estar expuestas a 37°C son capaces de formar cigotos. De esto se deduce que la mutación no parece afectar a la capacidad de apareamiento, ya que la disminución de ésta se produce debido al descenso de la viabilidad celular a la temperatura no permisiva.

1.3.6.- Efecto de la mutación *lyt1-1* sobre la esporulación.

Como se describe en el apartado número 1.2., los diploides heterocigóticos para la mutación fueron capaces de esporular a 24°C y de dar lugar a ascosporas viables. Sin embargo, estos mismos diploides no fueron capaces de esporular a la temperatura no permisiva. Los diploides homocigóticos no esporularon ni siquiera a 24°C.

Por otra parte, se examinó la capacidad de esporulación de los diploides heterocigóticos *lyt1-1/lyt2-1*, los cuales no fueron capaces de esporular a 24°C. Consideraciones anteriormente mencionadas permiten deducir que ambas mutaciones no pertenecen al mismo grupo de complementación con respecto a la autólisis, pero no sabemos qué ocurre con respecto a la esporulación.

2.- AISLAMIENTO DE UN FRAGMENTO DE DNA DE *S. cerevisiae* QUE COMPLEMENTA LA MUTACION *lyt1-1*.

2.1.- CONSTRUCCION DE CEPAS DE *S. cerevisiae* ADECUADAS PARA LA TRANSFORMACION.

Con objeto de clonar un fragmento de DNA de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación *lyt1-1*, se hizo necesaria la construcción de una cepa de *S. cerevisiae* que poseyera a la vez la mutación *lyt1-1* y fuese auxótrofa para la leucina, ya que el vector que

íbamos a usar para la transformación llevaba el gen *LEU2*. Para ello, se realizó el cruce descrito en el apartado 1.2 de Resultados, seleccionándose de entre todos los segregantes la cepa *S. cerevisiae* L2C34d, portadora de las mutaciones *lyt1-1* y *leu2-3-112*. No fue necesario construir una cepa autolítica auxótrofa para el uracilo porque ya disponíamos de ella. Sin embargo, sí fue necesaria la obtención de una cepa diploide homocigótica para la mutación *lyt1-1* y portadora de una auxotrofia. Para conseguirla se cruzaron dos cepas haploides autolíticas auxótrofas para el uracilo: *S. cerevisiae* L2C28c y L2C24d.

2.2.- TRANSFORMACION DE LA CEPA L2C34d CON DNA DE UNA GENOTECA GENOMICA DE *S. cerevisiae*.

Se procedió a la transformación de esferoplastos de la cepa L2C34d con DNA cromosómico de una genoteca de la cepa *S. cerevisiae* AB 320, ligada al vector YEp 13 (Las características de la genoteca y del vector se describen en los apartados 1.3.2 y 1.3.3 de Materiales).

La concentración de DNA en la genoteca era de 0,2 µg/µl. Para la transformación se usaron 3 µg. El número de transformantes obtenidos fue de 15.000.

2.3.- SELECCION DEL CLON TRANSFORMANTE NO LITICO T14.

Para posibilitar el análisis de todos los clones transformantes obtenidos, se procedió según se describe en el apartado 2.9.15 de Métodos.

Las colonias de transformantes capaces de crecer en las placas de MM con histidina precalentadas a 37°C e incubadas a esta misma temperatura durante 4 o 5 días, fueron unos 10 por placa. Puesto que podía haber 3 o 4 representantes de cada clon transformante por placa, era de esperar que algunas portaran plásmidos idénticos. Se decidió estudiar la expresión del fenotipo autolítico en medio líquido en los clones procedentes de 2 placas, es decir, 20. Para ello, se inocularon en MM líquido con histidina y se crecieron durante una noche a 24°C. Después fueron lavadas con agua destilada estéril e inoculadas en YED líquido precalentado a 37°C a una concentración final inferior a 10⁶ células por ml, para la óptima expresión del fenotipo autolítico.

De todas las colonias analizadas, se seleccionaron las 5 que presentaban una mejor complementación del fenotipo autolítico, es decir, las que fueron capaces de crecer a la temperatura no permisiva y presentaron poca lisis al ser observadas con el microscopio de contraste de fases. Los clones seleccionados fueron objeto de un análisis más profundo.

2.3.1.- Análisis de la liberación de fosfatasa alcalina en medio sólido.

Se analizó la fosfatasa alcalina liberada por los 5 clones transformantes de forma cualitativa por el método de la sobrecapa de Cabib y Durán (1975) (apartado 2.8.2.2.A de Métodos), comprobándose que ninguno de los transformantes liberaba la enzima de forma detectable.

2.3.2.- Comprobación de que la complementación del fenotipo se debe a la presencia del plásmido.

Con el objeto de inducir la pérdida del plásmido en los transformantes por desaparición de la presión auxotrófica selectiva, éstos fueron crecidos en YED líquido a 24°C durante una noche. Después, se sembraron las células en placas de YED de manera que crecieran unas 300 colonias por placa. Se crecieron a 24°C hasta que las colonias alcanzaron un tamaño suficiente. Se hicieron réplicas a placas de MM y éstas se crecieron a 24°C durante unos días.

Al cabo de este tiempo, se escogieron 2 tipos de colonias por transformante: las capaces de crecer en MM y que por tanto conservaban el plásmido, y las que no crecían y que debían haber perdido el plásmido. Se estudió la expresión del fenotipo autolítico en ambos tipos, comprobándose que las células que habían perdido el plásmido expresaban el fenotipo autolítico y las que lo conservaban no. Esto indica que en el plásmido se encuentra la información genética necesaria para la complementación del fenotipo.

2.3.3.- Análisis de los plásmidos portados por los clones transformantes seleccionados.

En vista de que las pruebas realizadas fueron igualmente positivas para los 5 clones transformantes, nos decidimos al estudio de todos los plásmidos.

El DNA plasmídico extraído de los transformantes se analizó por restricción y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, comprobándose que nos encontrábamos ante 5 plásmidos diferentes.

Estos se usaron para transformar de nuevo protoplastos de la cepa *S. cerevisiae* L2C34d con el fin de comprobar si revertían de nuevo el fenotipo y si eran estables al paso repetido por la levadura. De los 5 plásmidos, hubo uno que no fue capaz de transformar la levadura y los otros tres no revirtieron el fenotipo autolítico de forma adecuada. Fueron los transformantes del plásmido designado como p14 los que presentaron una mayor complementación del fenotipo.

Se seleccionó, por tanto, el clon transformante T14 como el portador del plásmido capaz de complementar el fenotipo autolítico y fue estudiado más profundamente.

2.4.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA ESTIRPE TRANSFORMANTE T14.

2.4.1.- Crecimiento a 24 y 37° C.

Como se muestra en la figura 11 C, la cepa transformante T14 es capaz de crecer a 37° C, aunque sin alcanzar los niveles de la cepa silvestre.

2.4.2.- Morfología celular al microscopio de contraste de fases.

Las células de la cepa transformante, después de 8 horas de incubación a 37° C, presentan una morfología normal, permaneciendo refringentes, al igual que la cepa silvestre (Figura 12 D). Pueden observarse, sin embargo, algunas células lisadas y deformadas, pero la complementación del fenotipo es suficiente como para observar diferencias fenotípicas significativas entre las cepas transformante y mutante.

2.4.3.- Morfología celular en microscopía electrónica de barrido.

Como puede observarse en la Figura 13 C, las células de la cepa T14 no presentan el aspecto deforme de las células de la cepa autolítica después de 12 horas de incubación a 37° C, sino que tienen un aspecto similar al de la cepa silvestre.

2.4.4.- Estudio de la capacidad de esporulación de cepas diploides homocigóticas transformadas con el plásmido p14.

El plásmido p14 no es capaz de restaurar la capacidad de esporulación de mutantes homocigóticos para la mutación *lyt1-1*. Sin embargo, no se observa la rápida pérdida de viabilidad que se produce en los diploides homocigóticos a los 2-3 días de ser sembrados en el medio de esporulación. En los 3 primeros días de crecimiento en medio de esporulación se encuentran algunas ascas (en una proporción <0,5 %) que luego no son capaces de seguir adelante y mueren.

2.4.5.- Estudio de la capacidad de apareamiento de cepas transformadas con el plásmido p14.

Las cepas mutantes *lyt1-1* transformadas con el plásmido p14 se aparean normalmente a 37° C, ya que no se produce lisis debido a la presencia del plásmido.

3.- CARACTERIZACION DEL FRAGMENTO DE DNA QUE COMPLEMENTA LA MUTACION *lyt1-1*.

3.1.- DETERMINACION DEL TAMAÑO Y MAPA DE RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO CLONADO.

El plásmido p14 fue tratado con diversas enzimas de restricción y comparado con el vector YE ρ 13 tratado también con las mismas enzimas, y con patrones de peso molecular adecuados. Se pudo comprobar que el fragmento génico clonado tiene un tamaño de 5,5 Kb. El mapa de restricción resultante se expone en la Tabla III.

3.2.- COMPROBACION DE QUE EL FRAGMENTO CLONADO NO PORTA UN GEN SUPRESOR "ÁMBAR".

Se sabe que la cepa de *S. cerevisiae* AB320, empleada en la construcción de la genoteca, contiene en su genoma un gen que codifica un tRNA supresor "ámbar" (Fischhoff *et al.*, 1984 y Calderón *et al.*, 1984). Este tRNA mutado podría introducir un aminoácido en un codón sin sentido "ámbar", restaurando la proteína no funcional a 37°C causante de la mutación *lyt1-1*. Si esta mutación fuera "ámbar", sería complementada por el mismo.

Para comprobar que el fragmento clonado no lleva un gen de este tipo, se transformó la cepa *S. cerevisiae* DBY-746, poseedora de la mutación "ámbar" *trp1-28a*, con el plásmido p14. El resultado de las dos transformaciones realizadas fue la ausencia total de transformantes en el medio de regeneración sin triptófano y la presencia de un gran número de transformantes en el medio de regeneración con triptófano. De esto se deduce que el fragmento génico clonado no porta un gen supresor "ámbar".

3.3.- SUBCLONACION DE DIVERSOS FRAGMENTOS DE MENOR TAMAÑO QUE EL CLONADO Y ESTUDIO DE SU CAPACIDAD DE COMPLEMENTACION.

Ya que el inserto del p14 tenía un tamaño de 5,5 Kb, se pensó que este fragmento era demasiado grande como para contener sólo las secuencias génicas responsables de la complementación del fenotipo autolítico. Por ello, se procedió a la subclonación de fragmentos de menor tamaño procedentes de este inserto en el vector YE ρ 13 y en otros de características diferentes con el fin de encontrar el mínimo fragmento codificante capaz de complementar el fenotipo autolítico.

NOMBRE DEL PLASMIDO	VECTOR	MAPA DE RESTRICCION	COMPLEMENTACION DEL FENOTIPO (%IP- a las 22h)
p14	YEp 13		+ (8%)
p1 Pv	YEp 13		- (>50%)
p57 Pv	YEp 13		- (>50%)
p10 reor	YEp 13		+ (10%)
p14 B	YEp 13		- (>50%)
p352 Pv	YEp 352		+ (8%)
pCent Pv	YCp 50		- (>50%)

Tabla III.- Representación de las diferentes subclonaciones realizadas, así como de su efecto sobre la complementación del fenotipo, representado por el porcentaje de células teñidas con IP (vivas) a las 22 horas de incubación a 37°C.

3.3.1.- Subclonación en vectores multicopia.

El esquema de subclonaciones realizadas y su efecto en la complementación del fenotipo se encuentra en la Tabla III. Las construcciones realizadas con el plásmido YEp 352 se transformaron en la cepa autolítica L2C28c, auxótrofa para el uracilo, mientras que las realizadas en el vector YEp 13 se transformaron en la cepa L2C34d, auxótrofa para histidina y leucina. Sin embargo, esto no supone ningún problema, ya que los diferentes parámetros estudiados para la expresión del fenotipo se han ensayado en todas las cepas utilizadas para este trabajo, tanto haploides como diploides, sin encontrarse diferencias significativas de unas cepas a otras. Además, algunas subclonaciones que contienen fragmentos solapantes se realizaron en vectores con diferentes marcadores auxótrofos de selección y se transformaron en cepas diferentes, arrojando resultados comparables.

De los datos obtenidos se deduce que el mínimo fragmento codificante que pudimos subclonar fue el incluido en el plásmido YEp352 Pv, de 1,8 Kb.

3.3.2.- Subclonación del mínimo fragmento codificante en vector centromérico.

El fragmento Pvull-Pvull incluido en el plásmido YEp 352 Pv fue subclonado en el plásmido YCp 50, de bajo número de copias para la levadura. El estudio de su capacidad de complementación demostró que no era capaz de complementar el fenotipo autolítico (Tabla III).

3.4.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE COMPLEMENTACION DE DIFERENTES MUTACIONES AUTOLITICAS.

Al disponer en nuestro laboratorio de otro mutante autolítico de diferente grupo de complementación, *S. cerevisiae* L3 (aislado en el laboratorio del Dr. Cabib), nos decidimos a transformarlo con el plásmido p14, comprobándose que este fragmento no es capaz de complementar la mutación autolítica *lyt2-1* que porta este mutante. De forma simultánea se transformó el mutante L2C34d con el fragmento génico aislado por Lourdes Torres en nuestro laboratorio, capaz de complementar la mutación *lyt2-1*, viéndose que éste no complementa el fenotipo *Lyt1*.

3.5.- SECUENCIACION DEL FRAGMENTO GENICO CAPAZ DE COMPLEMENTAR EL FENOTIPO AUTOLITICO.

De forma simultánea a la realización de las diferentes subclonaciones, cuando tuvimos un fragmento pequeño capaz de complementar el fenotipo *Lyt⁻*, comenzamos a realizar la secuenciación del fragmento representado en la figura 16, de 1,74 Kb. Dicho fragmento se dividió en 3, subclonándose los 3 en el vector Bluescript SK⁺. Se utilizaron como iniciadores de la secuencia los oligonucleótidos comerciales UP y RUP.

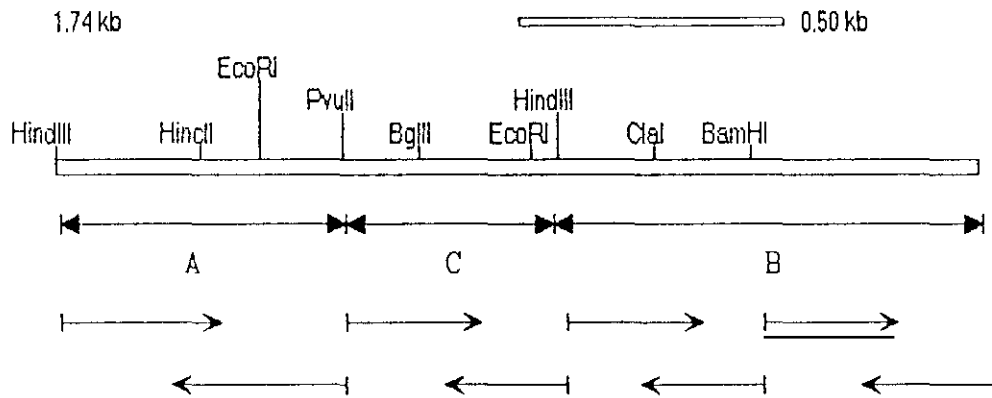


Figura 16.- Esquema de la estrategia seguida para la secuenciación del fragmento de 1,74 Kb. Las flechas representan la extensión aproximada y el sentido de las lecturas realizadas.

3.6.- ANALISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA

La secuencia obtenida, fue analizada con el programa Pustell, encontrándose dos marcos abiertos de lectura en cadenas opuestas, situados cola con cola y separados ambos por 103 pares de bases (Figura 17).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de ambos marcos abiertos de lectura con las existentes en un banco de proteínas, reveló que habíamos clonado los genes *SPO12* y *SPO16*, descritos por Malavasic y Elder (1990) (Figuras 18 y 19).

3.7.- DEMOSTRACION DE QUE EL GEN *SPO12* ES EL RESPONSABLE DE LA COMPLEMENTACION DEL FENOTIPO AUTOLITICO

Según describen estos autores, los genes que codifican ambas proteínas se encuentran en el genoma de *S. cerevisiae* en la misma disposición en la que las habíamos clonado. Esta posición no parece ser indispensable para el funcionamiento correcto de ambas (Malavasic y Elder, 1990). Sin embargo, creímos necesario comprobar si los dos genes son necesarios para la complementación del fenotipo o sólo uno de ellos y, en su caso, cuál de los dos.

Aunque de forma simultánea estábamos analizando el efecto de complementación del fenotipo de ambos genes por medio de subclonaciones, y parecía claro que era el gen *SPO12* el capaz de revertir el fenotipo autolítico (fragmento YEp 352 Pv), nos pareció interesante interrumpir los dos marcos abiertos de lectura por separado, pero colocados en la posición en que se encuentran en el genoma de *S. cerevisiae*, según el esquema representado en la Figura 20. Con ambas construcciones se transformaron diferentes cepas *lyt1-1*.

3.7.1.- Estudio de la complementación del fenotipo en matraz.

Con cepas transformadas con ambas construcciones, se realizaron estudios de crecimiento en matraz a 24 y 37°C, de viabilidad (con Ioduro de Propidio a las 22 horas) y se observaron las células con el microscopio de contraste de fases.

El plásmido en el que se encuentra interrumpido el gen *SPO12* no es capaz de complementar el fenotipo *Lyt⁻*, obteniéndose con sus transformantes unos porcentajes de células muertas (ioduro de propidio positivas) superiores a un 50 %. Sin embargo, cuando el gen interrumpido es *SPO16*, las cepas transformantes son capaces de crecer a 37°C, encontrándose unos porcentajes de muerte a las 22 horas de 8-15%.

El aspecto de las células de las diferentes cepas transformantes crecidas a la temperatura no permisiva (al microscopio de contraste de fases) estuvo en consonancia con los datos de viabilidad celular.

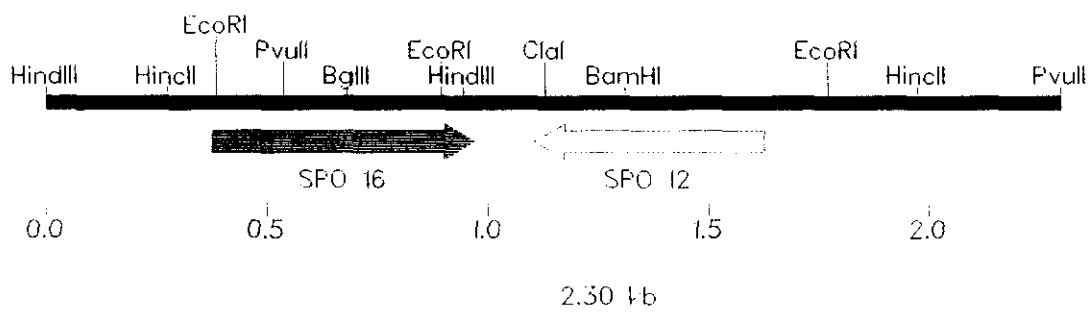


Figura 17.- Esquema de la situación de los marcos abiertos de lectura de los genes *SPO12* y *SPO16*.

	-110	-100	-90	-80	-70	-60													
	*	*	*	*	*	*													
TTC	AAA	CTA	GTT	TTT	AGG	AGG	TCA	GCC	AAA	CGT	TCA	TTC	AGA	TTA	GTT	ACT	ATC	TTG	GAA
	-50	-40	-30	-20	-10	1													
	*	*	*	*	*	*													
TAC	TTC	TAG	TAG	GAA	AAC	AAA	ATA	ACA	TAT	ACA	GTA	AGA	ACA	ATA	GAA	AAC	GTA	TTT	ATG
	10	20	30	40	50	60													
	*	*	*	*	*	*													
TCC	AAC	AAG	GCA	AGT	GAC	CAA	TCA	GCA	CGC	ACG	GCT	TCC	ATC	CTC	AAG	ACT	GAT	ATT	ACC
Ser	Asn	Lys	Ala	Ser	Asp	Gln	Ser	Ala	Arg	Thr	Ala	Ser	Ile	Leu	Lys	Thr	Asp	Ile	Thr
	70	80	90	100	110	120													
	*	*	*	*	*	*													
AGA	GAA	AAC	ACA	ATC	ACC	AGA	AGC	AGC	AGC	AGC	AAC	AAC	GAC	AAC	TAC	CAT	CAC	CAC	AAT
Arg	Glu	Asn	Thr	Ile	Thr	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Asn	Asp	Asn	Tyr	His	His	His	Asn
	130	140	150	160	170	180													
	*	*	*	*	*	*													
AAC	ATC	AAT	AAT	TAC	AAT	GAA	TCG	GCG	AAG	ACA	GGA	GAG	GAC	GCC	AAT	AAA	GAG	AAT	ATA
Asn	Ile	Asn	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ser	Ala	Lys	Thr	Gly	Glu	Asp	Ala	Asn	Lys	Glu	Asn	Ile
	190	200	210	220	230	240													
	*	*	*	*	*	*													
CCT	AAT	TTA	GAG	GAG	GAG	ATT	GCG	GCC	TTT	CGA	ATT	TTT	AGG	AAA	AAA	AGC	ACT	TCA	AAC
Pro	Asn	Leu	Glu	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Phe	Arg	Ile	Phe	Arg	Lys	Lys	Ser	Thr	Ser	Asn
	250	260	270	280	290	300													
	*	*	*	*	*	*													
TTG	AAG	TCG	TCA	CAC	ACC	ACT	AGC	AAT	TTG	GTA	AAA	AAG	ACA	ATG	TTC	AAA	AGG	GAT	CTT
Leu	Lys	Ser	Ser	His	Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Lys	Lys	Thr	Met	Phe	Lys	Arg	Asp	Leu
	310	320	330	340	350	360													
	*	*	*	*	*	*													
TTA	AAA	CAG	GAT	COG	AAG	AGG	AAA	CTC	CAA	CTA	CAA	CAA	AGA	TTT	GCA	TCA	COG	ACT	GAC
Leu	Lys	Gln	Asp	Pro	Lys	Arg	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Gln	Arg	Phe	Ala	Ser	Pro	Thr	Asp
	370	380	390	400	410	420													
	*	*	*	*	*	*													
AGG	CTG	GTA	TCA	CCA	TGC	TCA	TTG	AAA	TTG	AAT	GAG	CAC	AAA	GTT	AAG	ATG	TTC	GGA	AAG
Arg	Leu	Val	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Lys	Leu	Asn	Glu	His	Lys	Val	Lys	Met	Phe	Gly	Lys
	430	440	450	460	470	480													
	*	*	*	*	*	*													
AAA	AAG	AAA	GTC	AAT	CCT	ATG	AAA	CTG	AAC	TTT	AAA	GGC	AAC	CTT	GCT	GCC	GAT	TCA	GAG
Lys	Lys	Lys	Val	Asn	Pro	Met	Lys	Leu	Asn	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Asp	Ser	Glu
	490	500	510	520	530	540													
	*	*	*	*	*	*													
GAT	GTA	GAA	ATC	GAT	GAA	GAT	GAG	GAG	TAT	TTC	TAC	TAA	AAA	AAT	CTG	CCT	TTC	TAG	TCA
Asp	Val	Glu	Ile	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu	Tyr	Phe	Tyr	---							
	550	560	570	580	590	600													
	*	*	*	*	*	*													
TCC	AAA	AAT	AGC	CAA	ATG	CTA	CAC	TAA	ACC	AAT	AAG	CAA	ACG	AGT	ACA	TAA	AGA	ATA	AGT
610	620	630	640	650	660														
	*	*	*	*	*	*													
AAA	TAA	TAA	TTC	AAC	AAT	ACC	TGA	TTT	TTT	TTT	TCT	TAC	ATT	TTT	TTT	ATT	ATT	CAT	TAA
	670	680	690	700	710	720													
	*	*	*	*	*	*													
AAG	CAA	CCA	CCA	AGC	TTT	CCA	AAT	TAT	GAA	ACC	TTG	ATA	AAA	TGG	CTT	CAA	AAT	CTT	GAT

Figura 18.- Secuencia de aminoácidos del gen *SPO12*.

-370	-360	-350	-340	-330	-320
*	*	*	*	*	*
AGC TTT CTA GTA GAG TGA GCG ATG GGA AGC TCA GCC TCT GCT GCC ACT AAA ATT AAA AAA					
-310	-300	-290	-280	-270	-260
*	*	*	*	*	*
TTT AGC TGC TCA AAC AGA AGT GAT GTG CTC ATG GAT CGT ATA TTT ACC AGT ATG CTA CCT					
-250	-240	-230	-220	-210	-200
*	*	*	*	*	*
OCT TGA AAT CTT GCC CAA TAA CCT AAT GAC TTC CAT TGA ATA TAC AAT ATA GAA CAT TGT					
-190	-180	-170	-160	-150	-140
*	*	*	*	*	*
GAT GTA TTT ATT TAT TGG CAA AAA ATG TGA CGC GAA AAA CAA CAT TAG ATG AGT GAA AAA					
-130	-120	-110	-100	-90	-80
*	*	*	*	*	*
GAA AAG TCA CAT CTG ATA TAG CTT ACC CTG TTA ACG CGT GAA AAG TGG GCG GCT AAA ACC					
-70	-60	-50	-40	-30	-20
*	*	*	*	*	*
GAG AAA ATA CGA AAT AGT GTA AAG GTT CAA GAG AAT AAA CTT CTG GAA CAA CAT TTC TGG					
-10	1	10	20	30	40
*	*	*	*	*	*
AAT GGT TCA ATA GAA ATG TCT GAA TTC TTT TGG GAT GTA CAA AAA ATA CAA GAG ATT TCT					
	Met Ser Glu Phe Phe Trp Asp Val Gln Lys Ile Gln Glu Ile Ser				
50	60	70	80	90	100
*	*	*	*	*	*
AAT GTC GAA GAA CAT TCT GTG GTT AAG TGT GTT ACT GTG AAT ACG AGC AGG TTA ATT TCG					
Asn Val Glu Glu His Ser Val Val Lys Cys Val Thr Val Asn Thr Ser Arg Leu Ile Ser					
110	120	130	140	150	160
*	*	*	*	*	*
CAG CTT AAC GAG GAG CTA CAA GAC GAA GAA AGT GGC GTC AAT TTT ATT GTT ACA CAG CTG					
Gln Leu Asn Glu Glu Leu Gln Asp Glu Glu Ser Gly Val Asn Phe Ile Val Thr Gln Leu					
170	180	190	200	210	220
*	*	*	*	*	*
CAA TTA CTG ATA AAT AAT GTC TAT GAG AAA ATA CAG AAA AGC CCT GGA GTT CCC GCA CAT					
Gln Leu Leu Ile Asn Asn Val Tyr Glu Lys Ile Gln Lys Ser Pro Gly Val Pro Ala His					
230	240	250	260	270	280
*	*	*	*	*	*
CGT TCT CTG ATG ATA AAT TTG AAT TTC ACG CGC TTG AAA TTC TCA ATA GCT TAT TGG GAT					
Arg Ser Leu Met Ile Asn Leu Asn Phe Thr Arg Leu Lys Phe Ser Ile Ala Tyr Trp Asp					
290	300	310	320	330	340
*	*	*	*	*	*
ATC TTA TTG GAG AGG TCA CTA GAT CTA ATA AAT GGA CCA TCG AAA ACG GGT GCC CGC TAC					
Ile Leu Leu Glu Arg Ser Leu Asp Leu Ile Asn Gly Pro Ser Lys Thr Gly Ala Arg Tyr					
350	360	370	380	390	400
*	*	*	*	*	*
TTT ATT ACA GAG GTT ACA CCA GTA GAC AGA AGT CGA TAT GTT GAA AAC AAT CAA TAT TTT					
Phe Ile Thr Glu Val Thr Pro Val Asp Arg Ser Arg Tyr Val Glu Asn Asn Gln Tyr Phe					
410	420	430	440	450	460
*	*	*	*	*	*
CTA GCT TTT AAA GCT AAC CAG CGT TTG ACA CGG AAC AGC GTG GAT ATG GAC GAG TTT ATT					
Leu Ala Phe Lys Ala Asn Gln Arg Leu Thr Arg Asn Ser Val Asp Met Asp Glu Phe Ile					
470	480	490	500	510	520
*	*	*	*	*	*
GAT TTT GAA ATT CTA ATC AAG CAA ATA ATT TTC GAC CTC TTC AAA AAA AAC GGA ATT CCA					
Asp Phe Glu Ile Leu Ile Lys Gln Ile Ile Phe Asp Leu Phe Lys Lys Asn Gly Ile Pro					

530	540	550	560	570	580
*	*	*	*	*	*
GAT CAA GAT TTT	GAA GCC ATT TTA	TCA AGG TTT CAT AAT	TTG GAA AGC TTG	GTG GTT GCT	
Asp Gln Asp Phe	Glu Ala Ile Leu	Ser Arg Phe His Asn	Leu Glu Ser Leu	Val Val Ala	
590	600	610	620	630	640
*	*	*	*	*	*
TTT AAT GAA TAA	TAA AAA AAA TGT	AAG AAA AAA ATC	AGG TAT TGT	TGA ATT ATT	ATT
Phe Asn Glu ---					
650	660	670	680	690	700
*	*	*	*	*	*
TAC TTA TTC TTT	ATG TAC TCG TTT	GCT TAT TGG TTT	AGT GTA GCA TTT	GGC TAT TTT	TGG
710	720	730	740	750	760
*	*	*	*	*	*
ATG ACT AGA AAG	GCA GAT TTT TTT	AGT AGA AAT ACT	CCT CAT CTT	CAT CGA TTT	CTA CAT
770	780	790	800	810	820
*	*	*	*	*	*
CCT CTG AAT CCG	CAG CAA GGT	TGC CTT TAA AGT	TCA GTT TCA	TAG GAT TGA	CTT TCT TTT
830	840	850	860	870	880
*	*	*	*	*	*
TCT TTC CGA ACA	TCT TAA CTT TGT	GCT CAT TCA ATT	TCA ATG AGC	ATG GTG	ATA CCA GCC
890	900	910	920	930	940
*	*	*	*	*	*
TGT CAG TCG GTG	ATG CAA ATC TTT	GTT GTA GTT GGA	GTT TCC TCT	TCG GAT CCT	GTT TTA
950	960	970	980	990	1000
*	*	*	*	*	*
AAA GAT CCC TTT	TGA ACA TTG TCT	TTT TTA CCA AAT	TGC TAG TGG	TGT GTG	ACG ACT TCA
1010	1020	1030	1040	1050	1060
*	*	*	*	*	*
AGT TTG AAG TGC	TTT TTT TCC TAA	AAA TTC GAA AGG	CCG CAA TCT	CCT CCT	CTA AAT TAG
1070	1080	1090	1100	1110	1120
*	*	*	*	*	*
GTA TAT TCT CTT	TAT TGG CGT CCT	CTC CTG TCT TCG	CCG ATT CAT	TGT AAT TAT	TGA TGT
1130	1140	1150	1160	1170	1180
*	*	*	*	*	*
TAT TGT GGT GAT	GGT AGT TGT CGT	TGT TGC TGC TGC	TGC TTC TGG	TGA TTG	TGT TTT CTC
1190	1200	1210	1220	1230	1240
*	*	*	*	*	*
TGG TAA TAT CAG	TCT TGA GGA	TGG AAG CCG	TGC GTG CTG	ATT GGT	CAC TTG CCT TGT TGG
1250	1260	1270	1280	1290	1300
*	*	*	*	*	*
ACA TAA ATA CGT	TTT CTA TTG	TTC TTA CTG	TAT ATG TTA	TTT TGT	TTT CCT ACT AGA AGT
1310	1320	1330	1340	1350	1360
*	*	*	*	*	*
ATT CCA AGA TAG	TAA CTA ATC	TGA ATG AAC	GTT TGG	CTG ACC	TCC TAA AAA CTA GTT TGA

Figura 19.- Secuencia de aminoácidos del gen *SPO16*.

3.7.2.- Estudio de la complementación del fenotipo en fermentador.

Como se puede observar en la Figura 21 A, la cepa transformante portadora de un plásmido con ambos genes completos es capaz de seguir creciendo a 37°C, permaneciendo su viabilidad en torno a un 80 % durante todo el tiempo de incubación excepto una pequeña caída que se produce en las primeras horas. Esta puede deberse a que el medio de cultivo utilizado durante el crecimiento a 24°C fue YED, medio no adecuado para el mantenimiento del plásmido. Durante el tiempo de crecimiento a 24°C se pudo producir cierta pérdida del plásmido. En el momento del cambio a 37°C, todas aquellas células que hubieran perdido el plásmido se lisarían, produciendo la caída de la viabilidad observada. Sin embargo, la temperatura no permisiva actuaría como factor de presión para el mantenimiento del plásmido en las sucesivas mitosis de las células que lo conservaran, recuperándose gradualmente la viabilidad del cultivo hasta niveles del 80 %.

Sin embargo, y como se demuestra en el experimento representado en la Figura 21 B, la cepa portadora del plásmido en el que se ha interrumpido el marco abierto de lectura del gen *SPO12*, no es capaz de crecer a 37°C, sufriendo una caída de la viabilidad continua desde el momento del cambio de la temperatura, llegando a un 20 % de viables a las 6 horas.

De los resultados obtenidos en matraz y fermentador con los genes interrumpidos, junto con los procedentes de las diferentes subclonaciones, se desprende que el gen *SPO12* es capaz de complementar la mutación por sí sólo, sin que influya en absoluto la presencia o ausencia del gen *SPO16*.

3.8.- DEMOSTRACION DE QUE EL GEN *SPO12* ES UN SUPRESOR.

Al saber que el gen clonado sólo se expresaba en esporulación (Malavasic y Elder, 1990), que parecía no ser necesario para el crecimiento vegetativo de la célula (al menos a 30°C)(idem), que no era capaz de complementar el fenotipo al encontrarse en un plásmido centromérico, y que en multicopia complementa el fenotipo *Lyt⁻* en ciclo mitótico pero no en esporulación, sospechamos que se podía tratar de un gen supresor. Con el objeto de comprobarlo, realizamos los siguientes experimentos:

3.8.1.- Interrupción del gen *SPO12* en cepas silvestres de *S. cerevisiae*.

Para interrumpir el gen *SPO12* en cepas silvestres de *S. cerevisiae*, realizamos la construcción siguiente: el fragmento B utilizado para la secuenciación (Figura 16), fue tratado con la enzima de restricción BamHI (punto de corte único en el fragmento) y en él se introdujo el gen *URA3* cortado con esta misma enzima con el fin de interrumpir el marco de lectura de la proteína *SPO12*. Esta construcción se transformó en dos cepas silvestres de *S. cerevisiae*: DBY-746 y TD28.

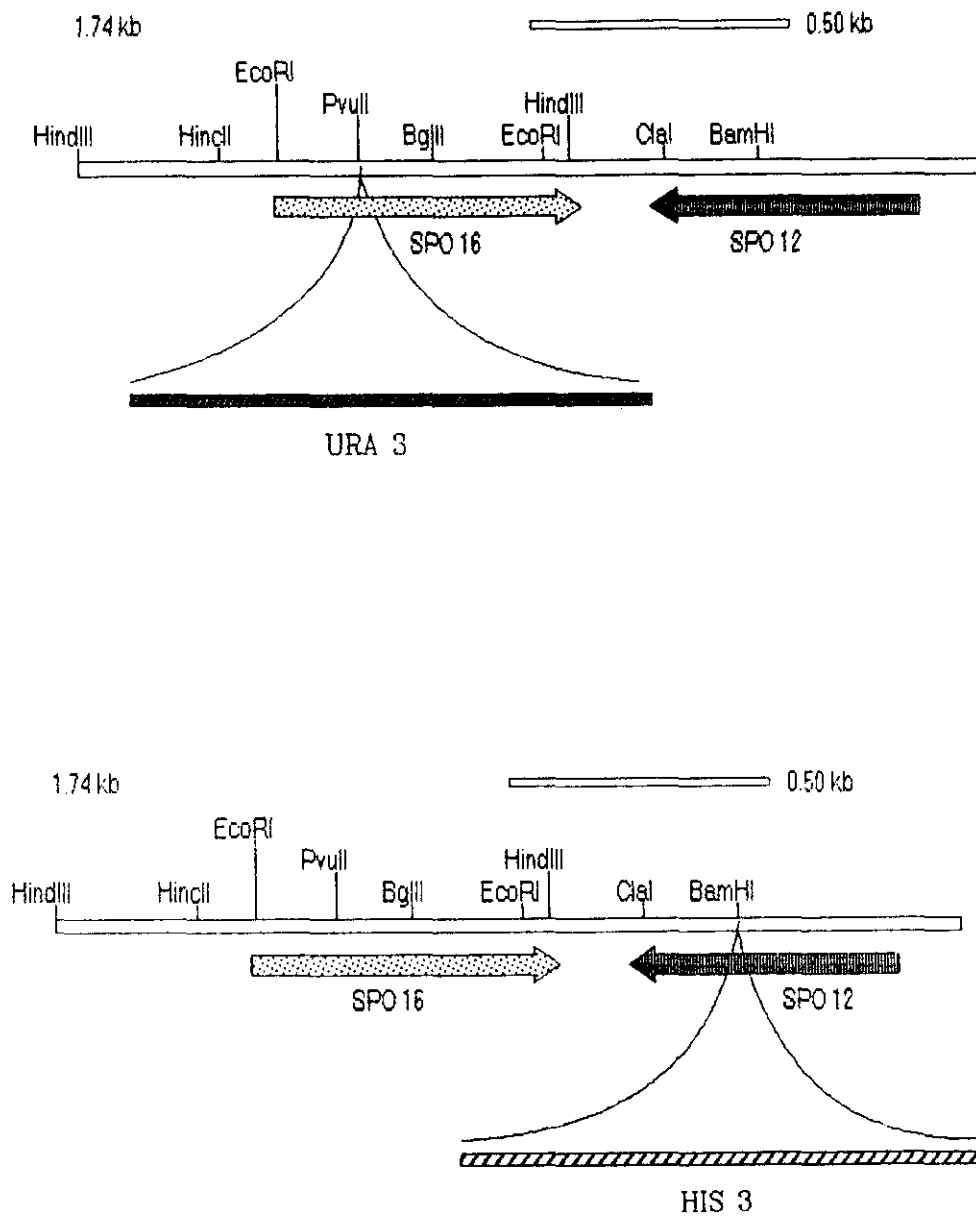
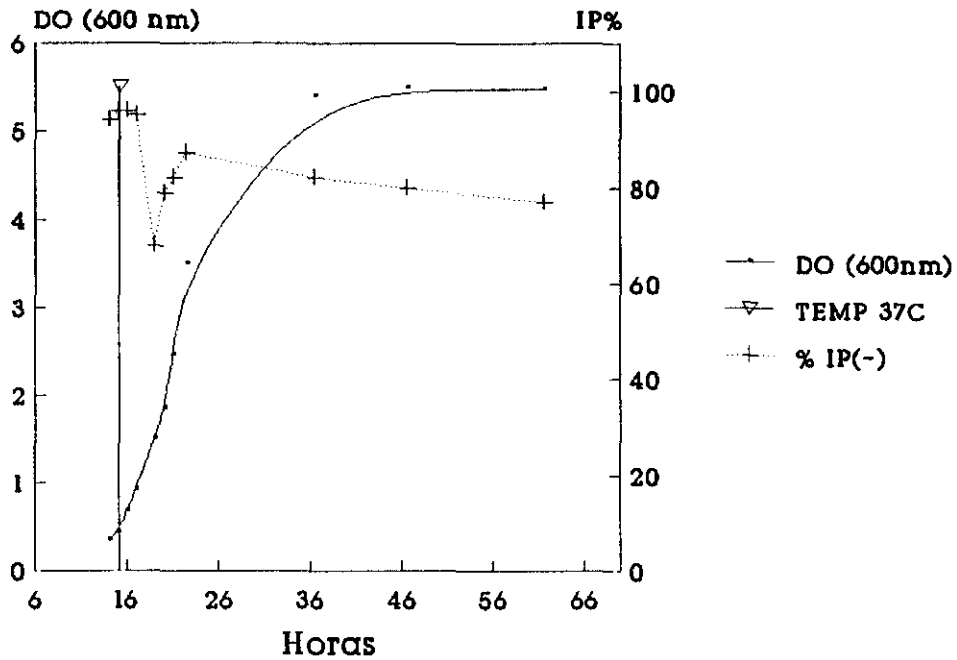


Figura 20.- Esquemas correspondientes a las interrupciones realizadas en los genes *SPO12* y *SPO16*.

A)

lytl-1 + YEpl3 con SPO12, SPO16



B)

lytl-1 + YEp 13 con spol2::HIS3, SPO16

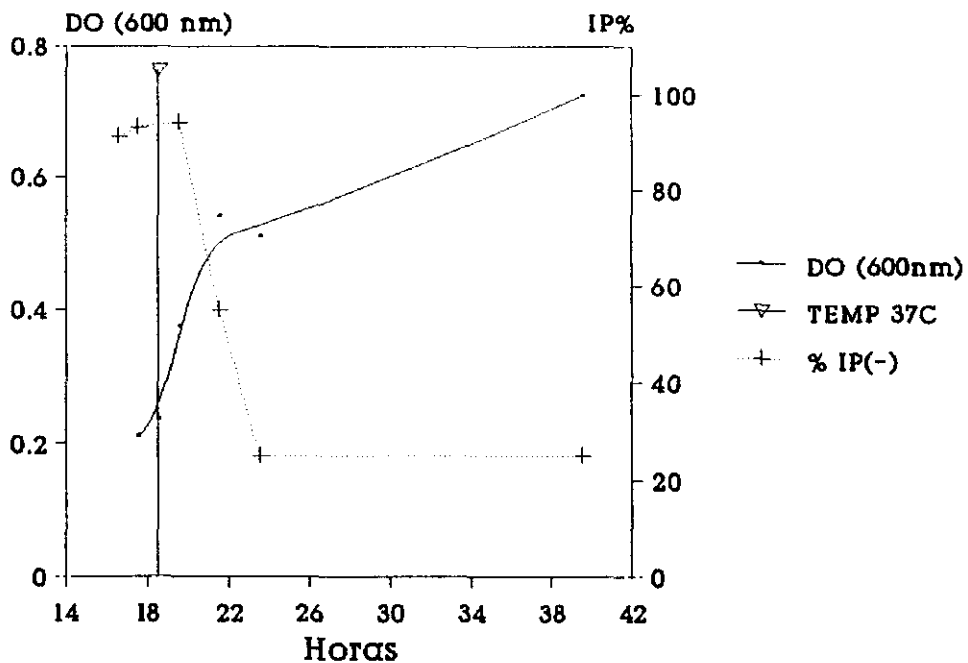


Figura 21.- Gráficas correspondientes a los estudios en fermentador realizados con las dos cepas señaladas.

La viabilidad se expresa como porcentaje de células no teñidas con IP.

Como puede observarse, la interrupción del gen *SPO12* provoca una drástica pérdida de viabilidad.

3.8.2.- Análisis del crecimiento a 24 y 37° C de las cepas interrumpidas.

Aunque Malavasic y Elder (1990) ya habían realizado la interrupción del gen *SPO12* en cepas silvestres las cuales no parecieron verse afectadas en su crecimiento vegetativo, no realizaron un estudio del efecto de esta interrupción sobre el crecimiento de las cepas a 37° C.

La incubación de las cepas interrumpidas anteriormente señaladas a 24° C y posteriormente a 37° C, confirmó los resultados de estos autores ya que ninguna de las cepas se vio afectada en su viabilidad ni capacidad de crecimiento. Por tanto, debe tratarse de un gen supresor, ya que no se reproduce el fenotipo autolítico al interrumpir el gen.

3.8.3.- Estudio de la capacidad de esporulación de cepas diploides interrumpidas.

Como disponíamos de dos cepas silvestres interrumpidas de tipo sexual opuesto, las cruzamos y aislamos diploides por micromanipulación. Los diploides obtenidos se sembraron en medio de esporulación. Pudimos comprobar los resultados de Malavasic y Elder, ya que esporularon a los 5 días produciendo ascas con dos ascosporas diploides, como puede observarse en la Figura 22. Vemos, por tanto, que tampoco se reproduce la incapacidad de esporular de las cepas diploides homocigóticas para el gen *LYT1*.

3.8.4.- Análisis de la segregación del fenotipo *Lyt*⁻ en diploides heterocigóticos *lyt1-1/spo12::URA3*.

Otra forma de comprobar que el gen *SPO12* es un gen supresor, es el estudio de la segregación del carácter autolítico en ascosporas procedentes de diploides heterocigóticos construidos cruzando dos cepas haploides, una mutante *lyt1-1* y una silvestre con el gen *SPO12* interrumpido.

Lo primero que pudimos comprobar es que los diploides heterocigóticos así construidos crecen a 37° C normalmente. Además, son capaces de esporular a 24° C con una eficiencia similar a la de una cepa silvestre, mientras que diploides homocigóticos para cualquiera de las dos mutaciones no lo hacen. Ambos resultados son signo de que se trata de dos mutaciones diferentes, ya que se complementan.

Los diploides heterocigóticos fueron inducidos a esporular y se aislaron por micromanipulación 18 ascas, en las que la viabilidad fue la siguiente:

- a- 1 asca en la que crecen las 4 ascosporas,
- b- 12 ascas en las que crecen 3 ascosporas,
- c- 5 en las que crecen sólo 2 ascosporas.

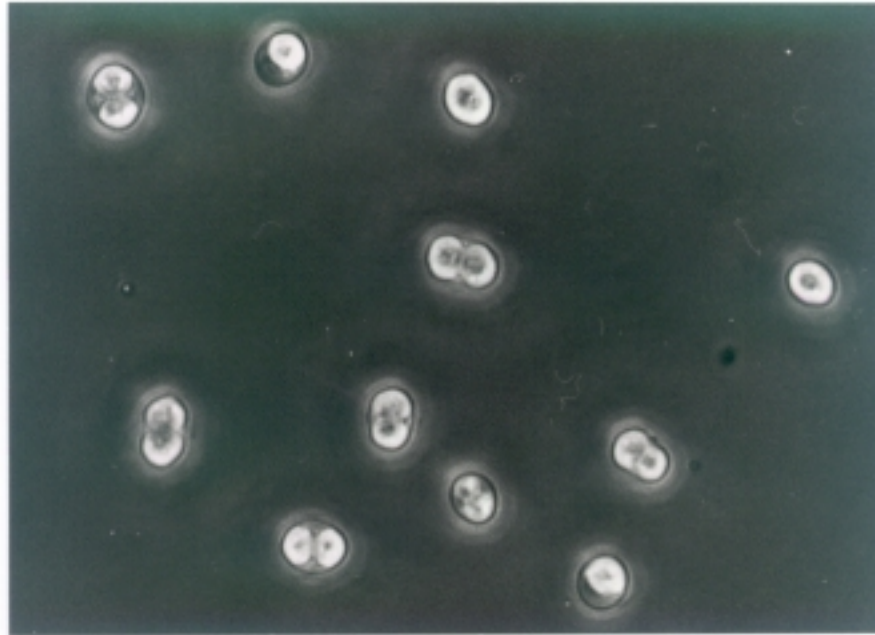


Figura 22.- Fotografías realizadas al microscopio de contraste de fases (900 x) de las ascas resultantes de la esporulación de los diploides con el gen *SPO12* doblemente interrumpido. Como puede observarse, las ascas contienen sólo dos ascosporas.

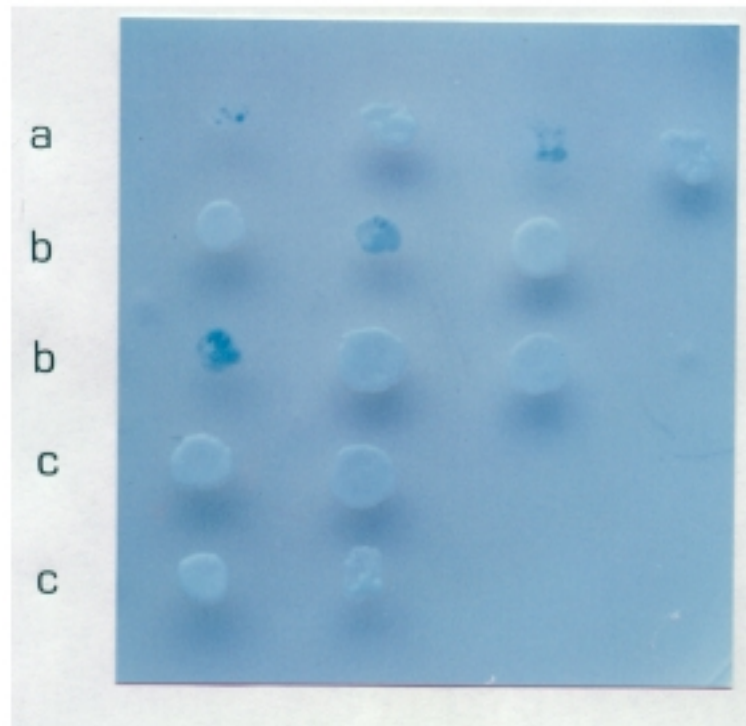


Figura 23.- Segregación del carácter autolítico en las ascas resultantes de la esporulación de cepas diploides *lyt1-1/spo12::URA3*. En la figura se encuentran representados los tres tipos de ascas obtenidos.

Las ascosporas portadoras del carácter autolítico aparecen azules por la hidrólisis de un sustrato de fosfatasa coloreado (Aptdo. 2.8.2.2. de Métodos).

El análisis del fenotipo autolítico arrojó el resultado siguiente:

- a- En el asca completa, 2 ascosporas eran autolíticas y 2 no.
- b- En las que crecieron 3 ascosporas, sólo 1 de ellas era lítica.
- c- En las que sólo crecieron 2, ninguna era autolítica.

Esto demuestra de forma definitiva que nos encontramos ante dos genes diferentes, ya que la segregación del carácter autolítico no es en ningún caso 4:0.

Puede además concluirse que la coincidencia de ambas mutaciones en la misma ascospora hace que ésta sea inviable.

En la Figura 23 están representados los tres tipos de ascas. Para poder distinguir las cepas *Lyt* de las que no lo son, se sembraron todas las ascosporas en medio YED al que se le había añadido un sustrato de fosfatasa alcalina, 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (Apartado 2.8.2.2.B de Métodos), que al ser hidrolizado por la fosfatasa alcalina liberada por las células al lisarse, tiñe la colonia de color azul, mientras que las cepas no líticas permanecen sin teñir.

3.9.- ANALISIS DEL PRODUCTO DEL GEN *SPO12* POR MEDIO DEL PROGRAMA PC GENE.

El producto del gen *SPO12* fue analizado por medio del programa PC GENE con varios objetivos:

3.9.1.- Búsqueda del punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico de la presunta proteína deducida de la secuencia nucleotídica es de 10,04.

3.9.2.- Perfil hidropático.

Como puede observarse en la Figura 24, la proteína *SPO12* es fundamentalmente hidrofóbica.

3.9.3.- Búsqueda de posibles puntos antigénicos.

Un posible método para tener un conocimiento más profundo de la función de la proteína *SPO12*, podría ser la obtención de anticuerpos específicos frente a ella y, por medio de ensayos de hibridación, intentar averiguar su situación dentro de la célula tanto en ciclo mitótico como en esporulación. Para el diseño de dichos anticuerpos necesitamos predecir los

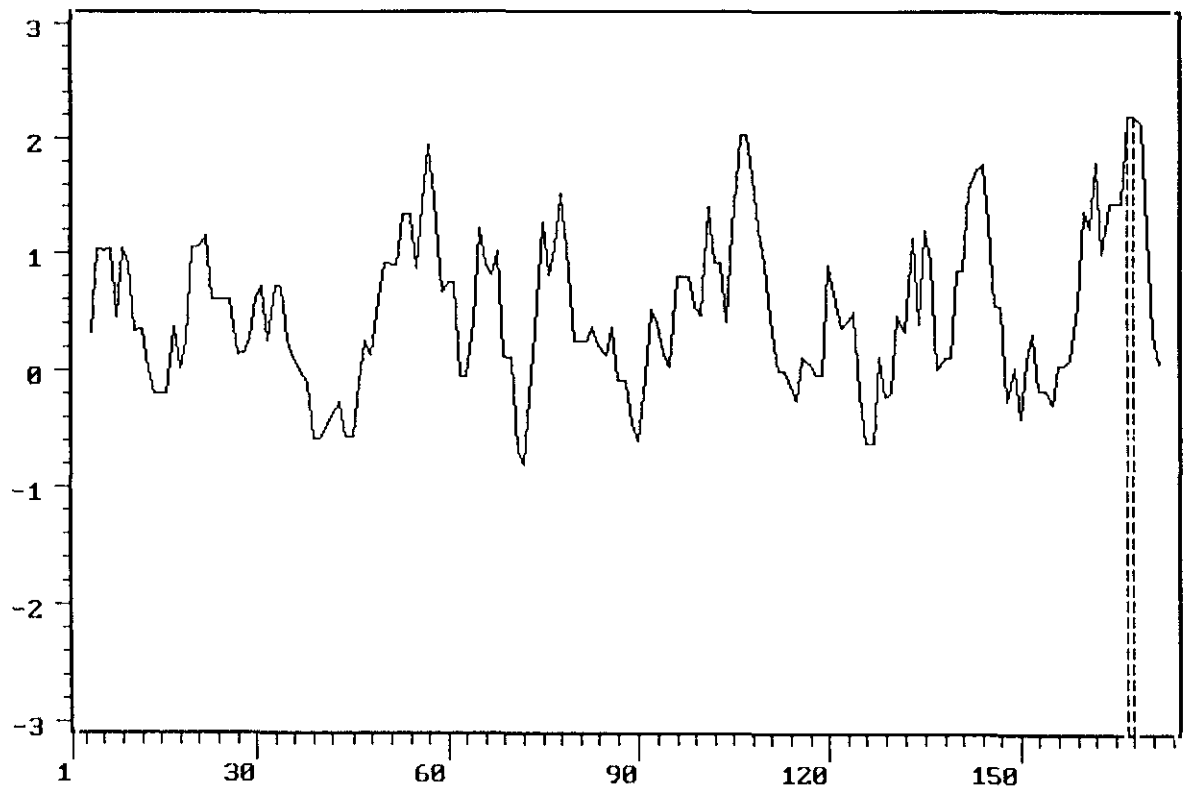


Figura 24.- Perfil hidropático del producto del gen *SPO12* deducido por medio del programa PC Gene.

El eje de ordenadas indica hidrofobicidad creciente, y el de abcisas el número de aminoácido de la proteína.

Como puede observarse, se trata de una proteína con un marcado carácter hidrófobo.

posibles determinantes antigénicos de la proteína. Según el ya mencionado programa PC GENE, los tres puntos antigénicos más probables son:

- 1) Del aa 164 al 170: Glu-Ile-Asp-Glu-Asp-Glu-Glu
- 2) Del aa 103 al 109: Lys-Gln-Asp-Pro-Lys-Arg-Lys
- 3) Del aa 54 al 59: Glu-Asp-Ala-Asn-Lys-Glu

El método de búsqueda de estos puntos es el de Hopp y Woods, siendo la longitud media recomendada es de 6 aas.

3.9.4.- Búsqueda de grupos funcionales.

Comparando la secuencia de aminoácidos de la proteína SPO12 con secuencias consenso de diversos grupos funcionales conocidos, no se ha encontrado ninguna homología que pueda indicarnos la posible función de dicha proteína.

3.10.- ESTUDIO DEL USO DE CODONES SINONIMOS EN EL GEN SPO12.

En la Tabla IV se exponen las frecuencias relativas de utilización de los diversos codones de los diferentes aminoácidos. Estas frecuencias se comparan en la Tabla V con las calculadas por Sharp y Cowe (1991) para proteínas de alta y baja expresión.

Como puede observarse, el producto del gen *SPO12* se corresponde más con las frecuencias señaladas para proteínas de baja expresión.

Estos mismos autores han calculado los CBI ("codon bias index" o índice de utilización de codones sinónimos) de muchos genes conocidos de *S. cerevisiae*, y entre ellos se encuentran los genes *SPO12* y *SPO16*, cuyos CBI son, respectivamente, -0,01 y -0,05.

3.11.- ANALISIS POR HIBRIDACION DE RNA ("NORTHERN BLOT") DE LA EXPRESION DEL GEN SPO12.

Malavasic y Elder (1990) ya habían comprobado por medio de Northern Blot que el gen *SPO12* no se expresa en fase vegetativa. Por otra parte, nosotros habíamos constatado que dicho gen actúa como un supresor al complementar la mutación *lyt1-1*, luego la complementación del fenotipo se debe a un efecto de dosis. Para asegurarnos de que los niveles de expresión del gen *SPO12* en las cepas mutantes transformadas con el gen en un plásmido multicopia son muy superiores a las del plásmido de bajo número de copias y que a esto se

		N	%	FR			N	%	FR	
Phe	<u>TTT</u>	4	2,3	1,14	Ala	<u>GCT</u>	2	1,1	0,80	
	<u>TTC</u>	3	1,7	0,86		<u>GCC</u>	3	1,7	1,20	
						<u>GCA</u>	3	1,7	1,20	
Leu	TTA	2	1,1	0,92		<u>GCG</u>	2	1,1	0,80	
	<u>TTG</u>	4	2,3	1,84	His	CAT	1	0,6	0,40	
	CTT	2	1,1	0,92		<u>CAC</u>	4	2,3	1,60	
	CTC	2	1,1	0,92	Gln	<u>CAA</u>	4	2,3	1,60	
	CTA	1	0,6	0,46		<u>CAG</u>	1	0,6	0,40	
	CTG	2	1,1	0,92	Asn	AAT	10	5,7	1,05	
Ile	<u>ATT</u>	3	1,7	1,12		<u>AAC</u>	9	5,2	0,95	
	<u>ATC</u>	4	2,3	1,50		Lys	AAA	13	7,5	1,18
	ATA	1	0,6	0,37	<u>AAG</u>		9	5,2	0,82	
Met	<u>ATG</u>	4	2,3	1,00	Asp	GAT	7	4,0	1,27	
Val	<u>GTT</u>	1	0,6	0,80		<u>GAC</u>	4	2,3	0,73	
	<u>GTC</u>	1	0,6	0,80	Glu	<u>GAA</u>	4	2,3	0,61	
	GTA	3	1,7	2,40		GAG	9	5,2	1,38	
	GTG	0	0,0	0,00	Gly	<u>GGT</u>	0	0,0	0,00	
Ser	<u>TCT</u>	0	0,0	0,00		<u>GGC</u>	1	0,6	1,34	
	<u>TCC</u>	2	1,1	0,67		GGA	2	1,1	2,67	
	TCA	7	4,0	2,34		GGG	0	0,0	0,00	
	TCG	2	1,1	0,67	Arg	<u>AGA</u>	3	1,7	2,00	
	AGT	1	0,6	0,34		AGG	4	2,3	2,67	
	AGC	6	3,4	2,00		CGT	0	0,0	0,00	
Pro	CTT	2	1,1	1,60		CGC	1	0,6	0,67	
	CCC	0	0,0	0,00	CGA	1	0,6	0,67		
	<u>CCA</u>	1	0,6	0,80	CGG	0	0,0	0,00		
	CCG	2	1,1	1,60	Cys	<u>TGT</u>	0	0,0	0,00	
Thr	<u>ACT</u>	4	2,3	1,45		TGC	1	0,6	2,00	
	<u>ACC</u>	3	1,7	1,09		Stop	TAG	0	-	-
	ACA	3	1,7	1,09			TAA	1	-	-
	ACG	1	0,6	0,36	TGA		0	-	-	
Tyr	TAT	1	0,6	0,50						
	<u>TAC</u>	3	1,7	1,50						
Trp	<u>TGG</u>	0	0,0	0,00						

Tabla IV.- Utilización de codones (N), porcentaje con respecto al total de codones y frecuencia relativa de utilización de codones sinónimos (FR) en el gen *SPO12*. Se han subrayado aquellos codones de uso preferente en levaduras.

		A	B	SPO12		A	B	SPO12	
Phe	<u>TTT</u>	0,22	1,09	1,14	Ala	<u>GCT</u>	3,07	1,00	0,80
	<u>TTC</u>	1,78	0,91	0,86		GCC	0,91	0,76	1,20
Leu	TTA	0,64	1,25	0,92		GCA	0,02	1,39	1,20
	<u>TTG</u>	5,11	1,21	1,84		GCG	0,00	0,84	0,80
	CTT	0,03	0,82	0,92	His	CAT	0,39	1,14	0,40
	CTA	0,19	0,80	0,46		<u>CAC</u>	1,61	0,80	1,60
	CTG	0,03	1,22	0,92	Gln	<u>CAA</u>	1,97	1,13	1,60
Ile	<u>ATT</u>	1,51	1,01	1,12		CAG	0,03	0,87	0,40
	<u>ATC</u>	1,49	0,79	1,50	Asn	AAT	0,12	1,16	1,05
	ATA	0,00	1,20	0,37		<u>AAC</u>	1,88	0,84	0,95
Met	ATG	-	-	1,00	Lys	AAA	0,20	1,09	1,18
Val	<u>GTT</u>	2,19	0,96	0,80		<u>AAG</u>	1,80	0,91	0,82
	<u>GTC</u>	1,78	0,76	0,80	Asp	GAT	0,77	1,13	1,27
	GTA	0,00	1,17	2,40		<u>GAC</u>	1,23	0,87	0,73
	GTG	0,03	1,10	0,00	Glu	<u>GAA</u>	1,96	1,14	0,61
Ser	<u>TCT</u>	3,41	1,24	0,00		GAG	0,04	0,86	1,38
	<u>TCC</u>	2,27	0,62	0,67	Gly	<u>GGT</u>	3,92	1,15	0,00
	TCA	0,08	1,34	2,34		GGC	0,06	1,03	1,34
	TCG	0,00	0,90	0,67		GGA	0,02	1,18	2,67
	AGT	0,10	1,00	0,34		GGG	0,00	0,64	0,00
	AGC	0,14	0,90	2,00	Arg	<u>AGA</u>	5,45	1,84	2,00
Pro	CCT	0,25	0,89	1,60		AGG	0,01	1,28	2,67
	CCC	0,02	0,85	0,00		CGT	0,53	0,80	0,00
	<u>CCA</u>	3,73	1,39	0,80		CGC	0,00	0,64	0,67
	CCG	0,00	0,87	1,60		CGA	0,00	0,87	0,67
Thr	<u>ACT</u>	1,91	0,99	1,45	CGG	0,00	0,56	0,00	
	<u>ACC</u>	2,05	0,78	1,09	Cys	<u>TGT</u>	1,86	1,07	0,00
	ACA	0,03	1,32	1,09		TGC	0,14	0,93	2,00
	ACG	0,00	0,90	0,36	Ter	TAG	0,00	0,43	-
Tyr	TAT	0,12	1,07	0,50		TAA	2,79	1,07	1,00
	<u>TAC</u>	1,88	0,93	1,50		TGA	0,21	1,50	-
Trp	TGG	-	-	0,00					

Tabla V.- Frecuencia relativa de uso de codones sinónimos para genes de alta (A) y baja (B) expresión en *S. cerevisiae*, así como del gen *SPO12*. Los tripletes subrayados corresponden a aquellos de uso mayoritario en esta levadura (Sharp y Cowe, 1991).

debían las diferencias de complementación, nos decidimos a realizar una hibridación por Northern Blot con RNA procedente de las cepas autolíticas transformadas con ambos tipos de plásmido. Las cepas se crecieron a 24°C y a 37°C durante 4 horas antes de recoger las células para detectar posibles diferencias de expresión en condiciones que requieren la complementación del fenotipo. Como controles del experimento, utilizamos las cepas silvestre y autolítica sin transformar, en las que no debería detectarse expresión del gen, al menos a 30°C (Malavasic y Elder, 1990).

Según puede observarse en la Figura 25, no se detecta ninguna transcripción del gen en los carriles correspondientes a las cepas silvestre y mutante. En los carriles de la cepa transformada con el plásmido centromérico pCent Pv (Tabla III) se detecta alguna expresión a 24°C y algo más a 37°C, sin embargo, el nivel de expresión es muy inferior al detectado en los carriles correspondientes a la cepa transformada con el gen *SPO12* incluido en un plásmido multicopia. Por otra parte, la expresión del gen es mucho mayor a después de 4 horas de crecimiento a 37°C, lo que podría indicar una mayor demanda del producto del gen al someter a la cepa a la temperatura no permisiva.

3.12.- CONSTRUCCIONES REALIZADAS PARA LA REDUCCION Y SUSTITUCION DE LA COLA ACIDA DE LA PROTEINA SPO12 Y SU EFECTO EN LA COMPLEMENTACION DEL FENOTIPO.

La proteína *SPO12* tiene en los últimos 15 aminoácidos de su extremo amino terminal una gran abundancia de restos Aspártico y Glutámico. Si esta cola ácida se cambia de polaridad, esta proteína no es capaz de realizar su función. Por otra parte, la reducción del tamaño de dicha cola no afecta a su funcionamiento, siempre y cuando no se altere la carga neta negativa de lo equivalente a los últimos 7 aminoácidos del extremo carboxilo (Malavasic y Elder, 1990).

Con el fin de comprobar si en nuestro caso pasaba lo mismo, analizamos la capacidad de complementación del fenotipo de las construcciones que se describen a continuación.

3.12.1.- Reducción del tamaño de la cola ácida y su efecto en la complementación.

El gen *SPO12* fue cortado por el punto ClaI, eliminándose así los últimos 7 aminoácidos del extremo carboxilo. Sin embargo, al clonar este fragmento en un vector apto para la transformación en levadura (YE_p 352, por ejemplo) el marco abierto de lectura se continuaba en el extremo 3' por el punto en el que se había clonado el fragmento. Por ello, se hizo necesario el diseño de un oligonucleótido de doble cadena que fuera capaz de terminar el marco abierto de lectura en cualquier fase. La secuencia diseñada por el Dr. Miguel Sánchez fue la siguiente:

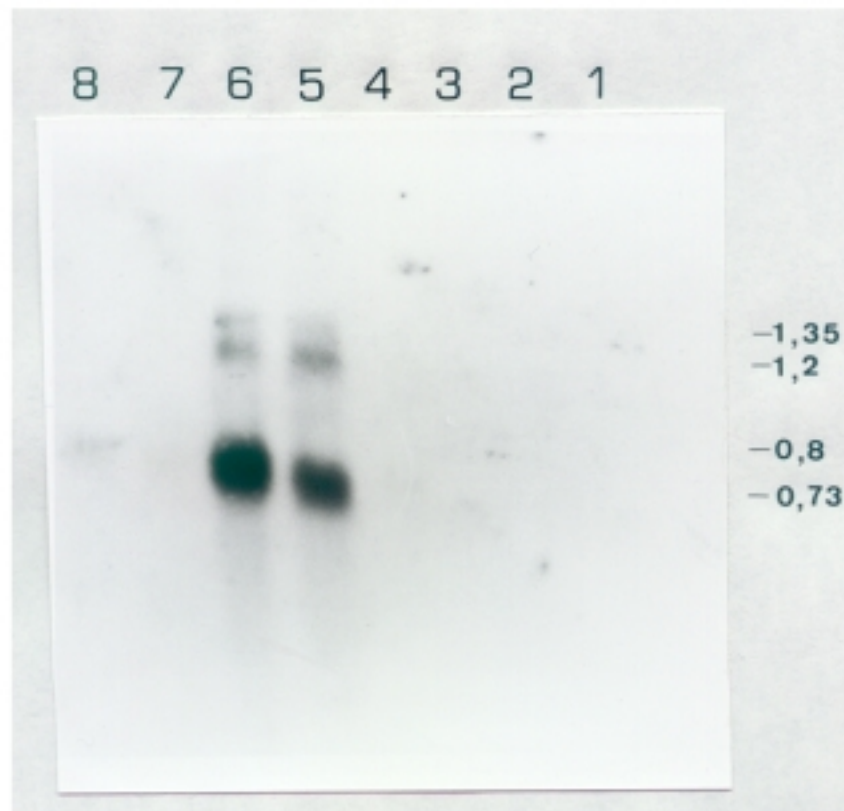


Figura 25.- Autorradiografía de la hibridación por "Northern Transfer" de una sonda correspondiente al gen *SPO12* con RNA total de las siguientes cepas de *S. cerevisiae*:

- S288C (silvestre) a 24°C (carril 1) y 37°C (carril 2)
- mutante *lyt1-1* a 24°C (carril 3) y 37°C (carril 4)
- mutante *lyt1-1* transformada con en plásmido p10 reor. (Tabla III) a 24°C (carril 5) y 37°C (carril 6)
- mutante *lyt1-1* transformada con el plásmido pCent Pv (Tabla III) a 24°C (carril 7) y 37°C (carril 8).

A la derecha de la autorradiografía se indican los tamaños (Kb) de las bandas que aparecen.

$\underline{\quad 1 \quad}$ $\underline{\quad 3 \quad}$ $\underline{\quad 2 \quad}$
 GCTTAATTTAAATTAAGC
 CGAATTAAATTTAATTCG

 Dra I o Aha III

Como se puede observar, posee un punto de corte en el centro que nos permite detectar su presencia en la construcción realizada. Los tripletes señalados son los de terminación en cualquiera de las fases de lectura en que se continúe la secuencia del gen; los números indican la base del oligonucleótido en la que comienza un triplete.

El fragmento de DNA que incluye el gen *SPO12* cortado con *Clal*, fue tratado con la enzima *Mung* para convertir los extremos cohesivos producidos por *Clal* en extremos romos, adecuados para ser ligados al oligonucleótido terminador diseñado. No se rellenaron los extremos salientes ("protruding") para eliminar el mayor número posible de aminoácidos del extremo carboxilo.

El extremo carboxilo de la proteína resultante fue el siguiente:

SPO12 :

GAG GAT GTA GAA ATC GAT GAA GAT GAG GAG TAT TTC TAC TAA
 Glu Asp Val Glu Ile Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Phe Tyr --
 ác ác n ác n ác ác ác ác ác n n n

Construcción 1:

GAG GAT GTA GAG CTT AAT TTA AAT TAA GC
 Glu Asp Val Glu Leu Asn Leu Asn --
 ác ác n ác n ác n ác

Debajo de cada aminoácido se detalla su polaridad:

ác: aminoácido ácido o polar no cargado, carga negativa

n: aminoácido no polar o aromático

bá: aminoácido polar básico, carga positiva

Esta construcción se transformó en distintas cepas mutantes *lyt1-1* y fue capaz de complementar el fenotipo autolítico igual que el gen completo, ya que la carga neta sigue siendo negativa.

3.12.2.- Sustitución de la "cola ácida" por una "cola básica".

Con la construcción realizada se pretendía el cambio de polaridad de la cola ácida. Para ello seguimos el procedimiento descrito por Malavasic y Elder (1990), que consistía en subclonar en las dos orientaciones posibles el fragmento ClaI-ClaI del p14 (Tabla III) en el punto de corte ClaI del pBR 322, el cual se encuentra en la mayoría de los vectores usados para levaduras. En una de las orientaciones, la secuencia resultante de la continuación del marco abierto de lectura en el pBR 322 del gen *SPO12* cortado en el punto ClaI da lugar a una cola básica:

SPO12 :

```
GAG GAT GTA GAA ATC GAT GAA GAT GAG GAG TAT TTC TAC TAA
Glu Asp Val Glu Ile Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Phe Tyr --
ác ác n ác n ác ác ác ác ác n n n
```

Construcción 2:

```
GAG GAT GTA GAA ATC GAT AAG CTT TAA
Glu Asp Val Glu Ile Asp Lys Leu --
ác ác n ác n ác bá n
```

La carga neta de lo equivalente a los últimos 7 aminoácidos es positiva (básica).

Al ser transformada esta construcción en diferentes cepas mutantes *lyt1-1*, es capaz de complementar el **fenotipo autolítico**, pero en grado diferente según el fondo genético de la cepa utilizada como receptor.

En cuanto a su efecto en el proceso de **esporulación**, la proteína codificada en esta construcción es semejante al de la proteína completa, es decir, se aumenta la viabilidad de la cepa en el ME y se forman algunas ascas (< 0,5 %) en los primeros días de incubación, pero no son capaces de seguir adelante y mueren.

4.- ANALISIS COMPARATIVO DE LA MUTACION *lyt1-1* CON LA MUTACION *cdc14*.

Según se vio en el Apartado 1.3.1.5 de Resultados, la lisis celular se produce también en presencia de Sorbitol 0,9 M como estabilizador osmótico, a diferencia de la mutación *lyt2-1* y otras muchas mutaciones autolíticas (Torres *et al.*, 1990; San Segundo, 1988). Esto indica que la mutación *lyt1-1* no afecta, al menos de forma exclusiva, a la pared de la levadura. Pensamos que podría tratarse de un tipo de mutante de ciclo celular, ya que la lisis se produce en un momento fijo del ciclo vegetativo de la levadura y decidimos compararlo con un mutante *cdc* similar, como el *cdc14*, el cual detiene su crecimiento al ser incubado a la temperatura no

permissiva, en el momento en que la yema es de un tamaño similar al de la célula madre. Además, está afectado también en el proceso de esporulación (Pringle y Hartwell, 1981).

4.1.- CRECIMIENTO A 24 Y 37°C EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE SORBITOL 0,9 M. ANALISIS DE VIABILIDAD.

El mutante *cdc14* crece normalmente a 24°C, tanto en presencia como en ausencia de Sorbitol 0.9 M, no tiñéndose con Ioduro de Propidio en un porcentaje apreciable. Sin embargo, cuando se incubaba a 37°C se observa lo siguiente:

- su densidad óptica aumenta hasta duplicarse con respecto a la de partida y luego se estabiliza, con y sin sorbitol 0.9 M;
- la morfología de las células al observarlas con el microscopio de contraste de fases es prácticamente igual a las de los mutantes *lyt1-1* deformados que se ven en la Figura 12 C a partir de las 2-4 horas de incubación a 37°C;
- las células procedentes del cultivo sin estabilizador osmótico, comienzan a teñirse con Ioduro de propidio a las 4 horas de incubación, en una proporción inferior a la de la cepa autolítica en el mismo período de incubación;
- las células incubadas a 37°C en presencia de sorbitol 0,9 M, a las 4 horas comienzan a presentar unos porcentajes de células teñidas con Ioduro de propidio (muertas) comparables a los de la cepa autolítica en las mismas condiciones.

Luego puede concluirse que ambos fenotipos son muy parecidos, y que se distinguen únicamente en el porcentaje de células Ioduro de propidio positivas cuando son crecidas a 37°C en medio no estabilizado osmóticamente.

4.2.- CONSTRUCCION DE DIPLOIDES HETEROZIGOTICOS *lyt1-1/cdc14*.

Los diploides obtenidos por cruzamiento de cepas haploides mutantes *lyt 1-1* y *cdc14*, fueron capaces de crecer a 37°C, sin embargo, aproximadamente un 30 % de la población incorporaba Ioduro de propidio a las 22 horas de incubación a esta temperatura. La lisis se producía en momentos muy diversos del ciclo mitótico. Esporularon a 24°C con una eficiencia comparable a la de la cepa silvestre. Estos resultados indican que se trata de genes diferentes, ya que ninguno de los dos en homocigosis es capaz de llevar a cabo la esporulación y en heterocigosis ésta sí ocurre. Además en heterocigosis no se reproduce el fenotipo parental durante el ciclo mitótico.

5.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL FENOTIPO AUTOLITICO EN PRESENCIA DE HIDROXIUREA.

La hidroxiiurea es un inhibidor de la síntesis de DNA cromosómico, plasmídico y mitocondrial (Timson, 1975; Slater, 1973). Con el fin de averiguar si el fenotipo autolítico se expresa antes o después de la síntesis de DNA, incubamos las células de dos cepas de *S. cerevisiae*: S288C (silvestre) y L2C24d (lítica) en presencia de hidroxiiurea.

La concentración de hidroxiiurea capaz de detener el crecimiento de dichas cepas se dedujo a partir de las recomendadas por Hartwell (1976) para cepas de *S. cerevisiae*. Según dicho autor, la concentración de hidroxiiurea que detiene el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* sin que se produzca una recuperación posterior de la capacidad de crecimiento oscila entre 0,2 y 0,3 M. Ensayamos nosotros dichas concentraciones junto con la de 0,5 M, resultando esta última la más adecuada para nuestras cepas.

En cuanto a la temperatura de incubación, decidimos realizar el experimento a 24 y 37°C simultáneamente para eliminar el efecto de la temperatura.

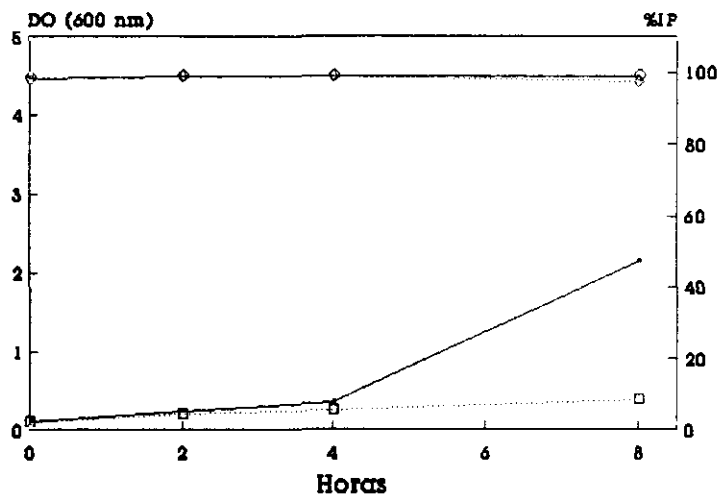
El preinóculo de las cepas provenía de una incubación en YED líquido a 24°C en fase estacionaria. A partir de él se inocularon matraces con YED líquido con y sin hidroxiiurea a una densidad óptica de partida de 0,1 (600 nm). Se tomaron muestras a diversos tiempos en las que se midieron: DO y viabilidad por medio de tinción con Ioduro de Propidio y posterior medida del porcentaje de células teñidas por citofluorimetría.

Los resultados de este experimento se representan en la Figura 26. Como puede observarse, la presencia de hidroxiiurea detiene el crecimiento de las células a una DO que es aproximadamente el doble de la de partida, tanto a 24 como a 37°C, lo que se debe, por una parte, a la replicación de las células que ya habían superado la fase del ciclo mitótico sensible a la hidroxiiurea y por otra, a que las células afectadas por dicho compuesto no son capaces de completar la replicación celular pero sí de emitir la yema, lo que puede producir un aumento de la densidad óptica.

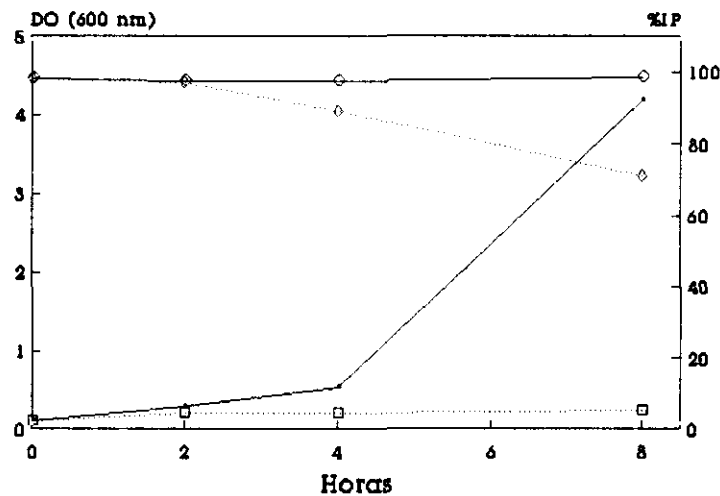
En cuanto a la viabilidad, se puede observar que la presencia de hidroxiiurea detiene la duplicación celular, pero no se produce lisis, lo que nos permite distinguir el efecto de dicho compuesto de la expresión del fenotipo autolítico.

En las curvas correspondientes a la incubación de la cepa *lyt1-1* a 37°C, puede apreciarse que la presencia de la hidroxiiurea disminuye de forma drástica el porcentaje de células teñidas con Ioduro de Propidio. Esto nos indica que la detención de la síntesis de DNA por parte de este compuesto evita la manifestación del fenotipo autolítico. Así podemos deducir que la lisis de las cepas *lyt1-1* se produce en una etapa del ciclo mitótico posterior a la replicación del DNA.

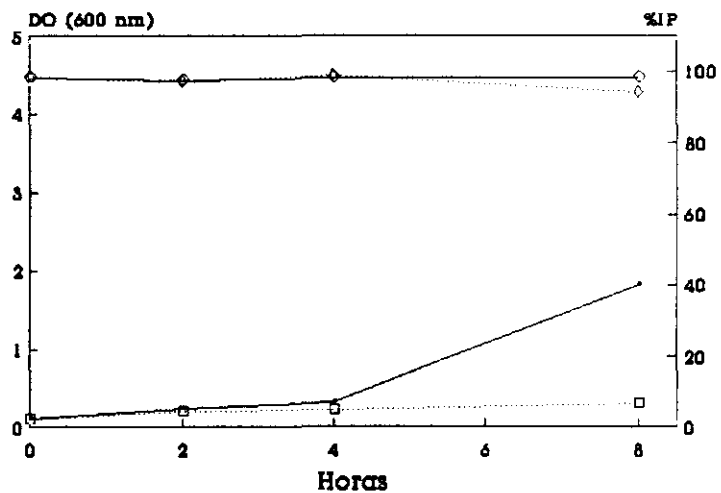
A1 24C



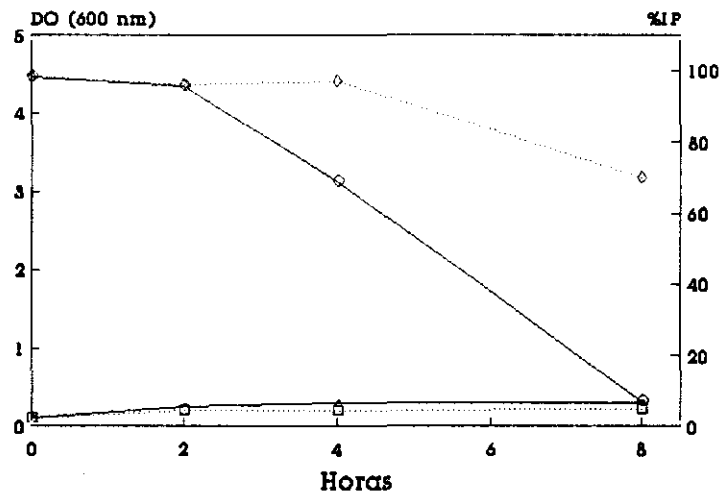
A1 37C



4d 24C



4d 37C



---○--- DO (600 nm)

---□--- DO (600 nm) HU 0,5M

---◇--- % IP (-)

---◇--- % IP (-) HU 0,5M

IV.- DISCUSIÓN

1.- CARACTERIZACION DE LA MUTACION *lyt1-1*.

Como punto de partida de este trabajo se usó el mutante de *S. cerevisiae* L2C34d, portador de la mutación *lyt1-1*, el cual, a la temperatura no permisiva de 37°C, se lisa, en el punto en que la yema alcanza un tamaño similar al de la célula madre.

Esta lisis se puede poner de manifiesto de diferentes maneras.

En primer lugar, podemos observar una estabilización de la densidad óptica en aproximadamente el doble de la existente en el momento del inicio de la incubación a 37°C (Figura 11), lo que nos indica una detención del crecimiento después de aproximadamente 1 generación.

Por otra parte, esta lisis puede ser observada con el microscopio de contraste de fases, en el que se manifiesta por una pérdida de refringencia de las células lisadas (Figura 12 B y C). Con el microscopio electrónico de barrido también podemos observar una deformación de las células mutantes que han sido incubadas a 37°C. Deformación que no se aprecia en las células de la cepa silvestre (Figura 13 A y B).

Sin embargo, ninguno de estos dos métodos nos permite seguir el porcentaje real de muerte celular a diferentes tiempos de incubación a 37°C, ya que muchas de las células que aparecen refringentes al microscopio de contraste de fases han perdido ya la permeabilidad selectiva y están muertas (de la Fuente *et al.*, 1992). Como ya se indicó en el apartado 1.3.1.4. de Resultados, la viabilidad celular se midió preferentemente por medio de tinción de las células con Ioduro de Propidio y posterior recuento del porcentaje de células teñidas (muertas) por citometría de flujo. Se eligió este método por la rapidez y por el gran número de células que se estudian en cada muestra (5000 como mínimo), lo cual permite una mayor exactitud en los cálculos del porcentaje de células viables. Las células mutantes *lyt1-1* presentan un 30-40 % de células teñidas (muertas) después de 4 horas de incubación a 37°C (Figura 14), porcentaje mucho mayor del que podría deducirse de la observación de las células con el microscopio de contraste de fases.

En el diploide heterocigótico para la mutación *lyt1-1* no se expresa el fenotipo autolítico: las células crecen a 37°C hasta niveles cercanos a los de la cepa silvestre y no se tiñen en un porcentaje significativo con Ioduro de Propidio.

Como ya se indicó anteriormente, el fenotipo autolítico sólo se expresa adecuadamente cuando la densidad óptica es baja al inicio de la incubación a 37°C (o con un lavado previo de las células procedentes del cultivo a 24°C), cuando los ensayos se realizan en matraz. También requiere un mantenimiento muy estricto de la temperatura de incubación. Sin embargo, esto no ocurre cuando el experimento se realiza en fermentador, en el que se puede inducir la expresión óptima del fenotipo autolítico incluso cuando el cambio a 37°C se realiza en

cultivos con densidades ópticas altas. Esto podría deberse a la gran diferencia de aireación (0,3 vol/min) y al mantenimiento estricto de la temperatura durante todo el tiempo de incubación en fermentador.

En *S. cerevisiae*, un método habitualmente utilizado para comprobar si un microorganismo está lisado, es medir la liberación al medio de cultivo de la fosfatasa alcalina, enzima intracelular, por medio de los sustratos coloreados descritos en el apartado 2.8.2.2. de Métodos. De forma sorprendente, no fuimos capaces de detectar dicha enzima en el sobrenadante del cultivo, pero sí en los extractos celulares (Figura 15), resultado que difiere de los obtenidos con otros mutantes autolíticos, por ejemplo, el mutante *lyt2-1* (Torres *et al.*, 1991). Se produce un aumento de la síntesis de dicha enzima, pero ésta no se libera al medio de cultivo en cantidad apreciable. Sin embargo, en medio sólido sí se detecta (Figura 23). Esta diferencia podría deberse a que en medio sólido realizamos la medida de la actividad fosfatasa después de 24-48 horas de incubación a 37°C, cuando ya se ha producido la lisis casi completa de las células. En estas condiciones, la enzima liberada al desestabilizarse la membrana plasmática puede ser almacenada en las colonias y las zonas adyacentes en cantidad suficiente como para permitir su detección. La ausencia de detección en el medio extracelular en cultivos líquidos también podría deberse a una degradación de dicha enzima en el medio de cultivo líquido, a medida que se va liberando. O a que quede retenida en espacio periplásmico y cuando se valora en el sobrenadante ya se han retirado las células mediante centrifugación.

Con el fin de comprobar si la mutación *lyt1-1* produce un fenotipo autolítico debido únicamente a una desorganización de la pared celular, incubamos la cepa mutante a la temperatura restrictiva en presencia de sorbitol 0,9 M. Si así fuese, el defecto debiera ser compensado en estas condiciones, como ocurre en muchos otros mutantes autolíticos (Torres *et al.*, 1991; San Segundo, 1988). Sin embargo, en este caso, se produce la lisis en presencia del estabilizador osmótico (Figura 14), indicando que la mutación no afecta, al menos de forma exclusiva, a la pared celular.

El resultado de este experimento, unido a la homogeneidad de la morfología de las células lisadas: todas con yema grande, nos hizo a pensar en la existencia de una relación entre el mutante *lyt1-1* y los denominados mutantes del ciclo celular, *cdc*, de *S. cerevisiae*.

Nos preguntamos si el mutante *lyt1-1* podría ser un mutante del ciclo celular y, en su caso, en qué momento del ciclo detiene su crecimiento con respecto a mutantes *cdc* conocidos. Por ello, lo primero que decidimos fue realizar cruces con diferentes mutantes *cdc* cuyo crecimiento se detuviera con una morfología similar a la del mutante *lyt1-1* y que estuvieran también afectados en el proceso de esporulación. Una vez comprobado si pertenecían o no al mismo grupo de complementación, intentaríamos obtener dobles mutantes para averiguar cuál de las dos mutaciones se expresaría antes en el ciclo mitótico de *S. cerevisiae*.

Si nos fijamos en el esquema de la Figura 3, vemos que los mutantes que, en principio, nos interesan, se encuentran en las zonas central e inferior. La mayoría de ellos se encuentran afectados también en el proceso de esporulación, ya que portan mutaciones en genes implicados en los mecanismos que conducen a la división nuclear.

Casi todos los afectados en las últimas etapas de la división nuclear y los afectados en la citoquinesis, detienen su crecimiento con una morfología similar a la de nuestro mutante, es decir, con la yema grande, pues el crecimiento de la yema no se detiene al hacerlo la división nuclear (Sumrada y Cooper, 1978b).

El primer mutante que usamos fue el *cdc14* (Pringle y Hartwell, 1981). Lo incubamos a 37°C con y sin sorbitol 0,9 M y medimos su viabilidad por medio de tinción con Ioduro de Propidio. No sólo era similar el aspecto de las células a 37°C, sino que también se teñía con dicho fluorocromo, aunque algo menos que el mutante *lyt1-1*. Por ello, ante la dificultad de distinguir ambos fenotipos, decidimos no intentar la obtención de dobles mutantes. Sin embargo, sí construimos diploides heterocigóticos *cdc14/lyt1-1*. Estos, al ser incubados a 37°C, se lisaban con morfologías que comprendían todas las etapas del ciclo mitótico, desde células no gemadas hasta células con yema grande, con una proporción de 30-40% de células lisadas a las 22 horas. Por tanto, ambos mutantes pertenecen a distinto grupo de complementación, puesto que los diploides heterocigóticos no reproducen el fenotipo parental. Por un lado, existe una pérdida de control sobre el punto en que tienen lugar los procesos de lisis celular, y además se lisan en proporciones menores a las de los mutantes autolíticos (porcentajes de células IP+ de 70-90% a las 22 horas). Y por otro, en heterocigosis es posible la esporulación a 24°C, proceso que no tiene lugar en diploides homocigóticos para cualquiera de las dos mutaciones.

Otra forma de abordar este estudio es el uso de agentes químicos capaces de detener el crecimiento de la levadura en una fase determinada del ciclo celular, con el fin de comprobar qué etapas del ciclo mitótico es necesario rebasar para que se manifieste el fenotipo autolítico en nuestro mutante.

El primero que elegimos fue la hidroxihurea, la cual inhibe la síntesis de DNA a todos los niveles: cromosómico, plasmídico y mitocondrial (Slater, 1973; Timson, 1975) (Figura 3). Como se muestra en la Figura 26, el fenotipo autolítico no se expresa en presencia de hidroxihurea 0.5 M, lo que indica que el defecto provocado por la mutación *lyt1-1* se encuentra en un punto posterior a la síntesis de DNA. Pretendemos realizar el mismo experimento con MBC (Benomil), el cual detiene el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* después de la replicación del DNA, cuando se están separando los cromosomas ya duplicados, en la fase de alargamiento del huso acromático (Quinlan *et al.*, 1980).

Por tanto, nos encontramos ante un mutante afectado en su crecimiento vegetativo, solamente a 37°C, en un punto posterior al inicio de la replicación del DNA.

El mutante *lyt1-1* no se encuentra afectado en el apareamiento, produciéndose éste con toda normalidad a 24°C. A 37°C, no se produce debido a la lisis celular, ya que las pocas células que tardan más en lisarse son capaces de aparearse.

La esporulación, en cambio, sí se encuentra afectada por la mutación, ya que los diploides homocigóticos son incapaces de esporular a 24°C, produciéndose una rápida pérdida de viabilidad de las células incubadas en el medio de esporulación. En heterocigosis, sin embargo, el proceso meiótico se produce normalmente a 24°C, pero no ocurre lo mismo a 37°C.

Por tanto, la mutación *lyt1-1* es termosensible y recesiva en cuanto al fenotipo autolítico en ciclo mitótico, pero no podemos decir lo mismo de la esporulación. Sin embargo, el hecho de que no se produzca esporulación a 37°C no es tan significativo, ya que el rango de temperaturas aptas para la esporulación de *S. cerevisiae* va de 3 a 35°C (Hansen, 1902) y el rango de óptimas va de 25-30°C (Fowell, 1969).

Como ya se ha señalado, durante el ciclo mitótico, estos mutantes, a 24°C, crecen hasta niveles similares a los de la cepa silvestre sin sufrir autólisis. Podríamos pensar, al igual que ocurre con otros mutantes termosensibles, que el producto del gen *LYT1* se sintetiza a ambas temperaturas, pero que a 37°C es inestable e incapaz de mantener el plegamiento correcto de los dominios proteicos necesario para la realización de su función. Esto es posible si el número de codones afectados por la mutación es reducido. Esta hipótesis concuerda con el método usado para obtener dichos mutantes (MSE) y el porcentaje de supervivencia obtenido después de la mutagénesis (Cabib y Durán, 1975).

Sin embargo, el producto del gen *LYT1* está lo suficientemente afectado como para no ser capaz de realizar su función en el proceso de esporulación ni siquiera a la temperatura permisiva. Esto podría indicar la existencia de al menos dos dominios funcionales en el producto del gen *LYT1* con implicación distinta en mitosis o meiosis, como ocurre con otros genes, por ejemplo:

- *CDC25* (Munder *et al.*, 1988),

- *RAD6* (Prakash, 1989).

También podría tratarse de un único dominio funcional con requerimientos diferentes en mitosis y meiosis.

2.- CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN FRAGMENTO GENICO CAPAZ DE COMPLEMENTAR EL FENOTIPO AUTOLITICO.

La cepa mutante L2C34d fue transformada con una genoteca genómica de *S. cerevisiae* AB320 (Nasmyth y Tatchell, 1980) ligada al vector YEp 13 (Broach *et al.*, 1979).

El método de selección de los transformantes se basó en su capacidad de crecimiento en medio sólido a 37°C. Sin embargo, la expresión del fenotipo autolítico en medio sólido no es tan completa como en medio líquido, por lo que después de la selección en medio sólido, realizamos una comprobación de la complementación por crecimiento en medio líquido a la temperatura no permisiva. Así redujimos el número de clones transformantes que presentaban una buena complementación del fenotipo, a 5.

Los vectores episómicos producen una frecuencia de transformación en *S. cerevisiae* de 10^3 - 10^4 transformantes/ μ g de DNA/ 10^7 células (Beggs, 1978; Stinchcomb *et al.*, 1979). Considerando el tamaño medio de los fragmentos clonados en esta genoteca, unas 5-6 Kb, en los insertos pueden estar incluidos 3 o 4 genes. Teniendo en cuenta que el genoma haploide de *S. cerevisiae* contiene unas $1,4 \times 10^4$ Kb (Lauer *et al.*, 1977) y que esto supone, aproximadamente, 10.000 genes, cabe esperar una frecuencia de recuperación del fenotipo silvestre para un determinado mutante (con un sólo gen afectado) de aproximadamente 1 transformante por cada 2.000 clones que hayan incorporado DNA (Botstein y Davis, 1982).

Según nuestros resultados, de los 15000 transformantes totales, deberían complementar el fenotipo unos 7. Nosotros obtenemos 5 clones diferentes, lo que se aproxima bastante al cálculo teórico.

Dentro de la selección de los clones transformantes, había que comprobar que la complementación del fenotipo se debía a la presencia del plásmido y no a una reversión de la cepa. Para ello, indujimos la pérdida de plásmido en los clones transformantes y comprobamos que aquellos que lo perdían reproducían el fenotipo autolítico, luego no se había producido una reversión en dichos clones.

De los 5 plásmidos diferentes capaces de complementar el fenotipo autolítico en la primera transformación, no todos fueron capaces de retransformar la levadura, luego se trataba de plásmidos poco estables que habían perdido algún fragmento imprescindible. De los que retransformaron, sólo uno, el p14, complementó de nuevo el fenotipo, por lo que fue el seleccionado para estudios posteriores.

Se sabe que la cepa AB320, utilizada para la construcción de la genoteca, contiene en su genoma un gen tRNA supresor "ámbar", el cual produce supresión directa (Fischhoff *et al.*, 1984; Calderón *et al.*, 1984). Si la mutación *lyt1-1* se debiera a la aparición de un codón de terminación "ámbar", este tRNA podría haber suprimido la mutación de forma inespecífica. Por este motivo, se procedió a la transformación de la cepa de *S. cerevisiae* DBY-746, auxótrofa para el triptófano debido a una mutación "ámbar". Dicha auxotrofia no fue

complementada por el p14, luego la mutación no se debe a un codón "ámbar", ni habíamos clonado dicho tRNA supresor.

El p14 complementa el fenotipo autolítico de manera que los transformantes crecen a 37°C (Figura 11 C). El porcentaje de células muertas no supera el 10-15% a las 22 horas de incubación a esta temperatura. Asimismo, si observamos las células transformantes con el microscopio de contraste de fases y con el electrónico de barrido, su aspecto es similar al de las células de la cepa silvestre (Figuras 12 D y 13 C, respectivamente).

Debido a esta complementación de la lisis, las cepas transformantes son capaces de aparearse normalmente a 37°C.

Sin embargo, el p14 no es capaz de complementar el defecto de esporulación. Su presencia aumenta la viabilidad de los diploides homocigóticos en el medio de esporulación, e incluso, llegan a formarse algunas ascas (<0,5%) en los primeros días de incubación, que posteriormente degeneran y mueren.

El inserto clonado en el p14 tiene un tamaño de 5,5 Kb, tamaño lo suficientemente grande como para contener más de un gen. Por ello, decidimos reducir su tamaño al mínimo necesario para la complementación del fenotipo autolítico.

Como se puede observar en la Tabla III, las diferentes subclonaciones realizadas nos condujeron a un tamaño de fragmento de 1,8 Kb, el mínimo capaz de complementar el fenotipo que pudimos subclonar.

De forma simultánea, procedimos a la secuenciación del fragmento representado en la Figura 16. Encontramos en él dos marcos abiertos de lectura situados en cadenas opuestas, cola con cola y separados por 103 pb (Figura 17).

La comparación de las secuencias nucleotídicas de ambos marcos abiertos con las existentes en un banco de proteínas arrojó como resultado que se trataba de los productos de los genes *SPO12* y *SPO16*, descritos por Malavasic y Elder (1990).

Según estos autores, dichos genes se encuentran en el genoma de *S. cerevisiae* dispuestos de la misma manera en que los clonamos. Se trata de genes específicos de los procesos de esporulación cuyos transcritos se detectan únicamente durante éste proceso.

Malavasic y Elder comprobaron que el extremo 3' de algunos de los transcritos del gen *SPO16* se extiende hasta parte, e incluso la totalidad, de la cadena no codificante del gen *SPO12*. Si bien esta transcripción no parece ser necesaria para el funcionamiento correcto de ninguno de estos dos genes, decidimos comprobar si era necesaria para la complementación del fenotipo y ver cuál de los dos productos génicos es el responsable de la complementación.

Para ello, realizamos las construcciones representadas en la Figura 20 y las subclonaciones descritas en la Tabla III, en las que eliminábamos casi la totalidad de la región codificante del gen *SPO16*. Según quedó demostrado por el análisis de los transformantes, el gen *SPO12* era el responsable de la complementación. Por tanto, la transcripción antes mencionada no parece ser necesaria para la complementación del fenotipo autolítico.

El gen *SPO12* interviene en la meiosis I de la esporulación, produciendo su mutación, *spo12-1*, la aparición de dos ascosporas diploides (Figura 22). Las cepas diploides homocigóticas para la mutación *spo12-1* se encuadran dentro del grupo de cepas apomíticas (Grewal y Miller, 1972; Klapholz y Esposito, 1980). El gen *SPO16* es necesario para que tenga lugar una esporulación eficiente.

Nos encontramos ante un gen específico de esporulación que complementa la expresión fenotípica de una mutación en lo que afecta al ciclo mitótico, pero no a la capacidad de esporular. Es más, los diploides homocigóticos *Lyt1* no presentan esporulación apomítica como los *Spo12*. Además, ni siquiera es capaz de complementar el fenotipo autolítico al ser clonado en un vector de bajo número de copias (Tabla III). Estos resultados nos hicieron sospechar que el gen que habíamos clonado era un gen supresor. No es sorprendente que la introducción en una célula mutante de fragmentos de DNA de levadura integrados en un vector episómico pueda dar lugar a la complementación del fenotipo por medio de la clonación de un gen que suprima la mutación por encontrarse en un alto número de copias en la levadura (McKay, 1983).

Ahora bien, sólo podíamos estar seguros de que se trataba de un supresor si realizábamos un análisis genético de la segregación de los dos genes. Para ello, debíamos interrumpir el gen *SPO12* en cepas silvestres de *S. cerevisiae*, analizar su comportamiento a 24 y 37°C y luego llevar a cabo en diploides heterocigóticos el estudio de segregación de los caracteres autolítico y lo correspondiente a la interrupción.

Dichos experimentos confirmaron nuestras sospechas, ya que las cepas interrumpidas crecían a 37°C sin niveles detectables de lisis, con lo que se confirmó la afirmación de Malavasic y Elder (1990): el gen *SPO12* no parece ser necesario para el crecimiento vegetativo de la levadura. Puede ahora asegurarse esto con mayor motivo, pues hemos llevado a cabo el estudio tanto a 24 como a 37°C.

Como comprobación de que el gen que habíamos interrumpido en las cepas silvestres era el correcto, indujimos la esporulación de diploides homocigóticos *spo12::URA3/ spo12::URA3*, los cuales dieron lugar a ascas con dos ascosporas diploides (Figura 22).

Además, la segregación del carácter autolítico en las ascosporas procedentes de diploides heterocigóticos *lyt1-1/ spo12::URA3* no fue en ningún caso 4:0 (Figura 23). Los estudios de segregación de los caracteres también nos han permitido concluir que la coincidencia de ambas mutaciones en una misma ascospora la hacen inviable. Cuando portan sólo una

de las dos son viables, al menos a 24°C y los diploides heterocigóticos, como ya se ha dicho, son viables a 24 y 37°C y esporulan normalmente.

Por tanto, queda demostrado que *LYT1* y *SPO12* son genes distintos y que habíamos clonado un gen supresor.

Puesto que nos encontrábamos ante un gen cuyo efecto supresor de la complementación del fenotipo parecía deberse al alto número de copias en que se encuentra en la célula, y que, según habían demostrado Malavasic y Elder, no se expresa durante el crecimiento vegetativo (al menos a 28°C), parecía necesario realizar un estudio del nivel de transcripción del gen *SPO12* para:

- averiguar si se transcribe en ciclo mitótico a 37°C,
- comprobar que la transcripción del gen es superior en las cepas portadoras del gen clonado en un vector multicopia, con respecto a las portadoras del mismo gen clonado en un vector centromérico, lo que justificaría la ausencia de complementación en estas últimas.

Además, decidimos realizar el ensayo de forma simultánea tanto a 24°C como después de 4 horas de incubación a 37°C para detectar posibles diferencias de expresión en condiciones que requieren la complementación del fenotipo.

Como puede observarse en la Figura 25, no se detecta transcripción del gen en las cepas silvestre y mutante a ninguna de las dos temperaturas ensayadas en ciclo mitótico, con lo que se confirman los resultados de Malavasic y Elder (1990). Comprobamos también que el nivel de transcripción del gen es muy superior en la cepa portadora del plásmido episómico que en la portadora del plásmido centromérico. Además, parece observarse un aumento de la transcripción del gen a 37°C con respecto a 24°C. Luego la complementación parece deberse a la sobreexpresión del gen *SPO12*, lo que deberá ser estudiado con más detalle por medio de la clonación de dicho gen en un plásmido que permita su expresión regulada.

Al examinar la Figura 25, se aprecian varios transcritos de diferente peso molecular. La banda inferior, más ancha, corresponde a transcritos del gen *SPO12* con diferentes extremos 5', que oscilan entre 730 y 800 pb, aproximadamente (Malavasic y Elder, 1990). Las bandas de tamaño superior corresponden a transcritos del gen *SPO16* que se extienden por su extremo 3' hasta parte (aproximadamente 1200 pb) o la totalidad (aproximadamente 1350 pb) de la cadena no codificante del gen *SPO12*. Estas bandas aparecen en nuestra hibridación debido a que los plásmidos que portan los transformantes contienen las secuencias de ambos genes.

Se ha descrito una secuencia de 10 pb, URS1 ("upstream repressor sequence"), que está presente en diversos genes que solamente se expresan en el proceso de esporulación, por ejemplo *SPO13*, *CAR1*, *SSA1*, *ENO1* (Revisado por Buckingham *et al.*, 1990), y que reprime la transcripción de estos genes durante el ciclo vegetativo. Sin embargo, en la secuencia nucleotídica de la zona 5' del gen *SPO12* que hemos secuenciado no la hemos encontrado (-120

pb). Tampoco la hemos encontrado en la secuencia publicada por Malavasic y Elder (1990), que se extiende algo más por este extremo (-280). En el gen *SPO13* se sitúa a -90 pb, pero puede que en el gen *SPO12* se encuentre más alejada o que en este gen actúe otro sistema de represión.

3.- ANALISIS DEL PRODUCTO DEL GEN SPO12.

La secuencia de aminoácidos deducida de la nucleotídica del gen *SPO12* fue analizada por medio del programa PC GENE. Así conocimos su punto isoelectrico: 10,04, extremadamente básico. Este pi facilitará la purificación de esta proteína cuando decidamos llevarla a cabo.

Uno de nuestros objetivos futuros es la obtención de anticuerpos monoclonales que nos permitan localizar dicha proteína en las células de cepas mutantes, transformantes y silvestres; tanto en el proceso de esporulación como durante el crecimiento vegetativo de la levadura. Por este motivo, también se buscaron posibles zonas antigénicas en la proteína *SPO12*; así como homologías con grupos funcionales conocidos, sin encontrarse nada significativo.

Por otro lado, la secuencia de aminoácidos de la proteína *SPO12* se comparó con las de otras proteínas incluidas en diversos bancos, encontrándose un porcentaje de homología del 21% en una región solapante de 84 aminoácidos con la proteína CDC25. Dicha región corresponde al dominio $\alpha 2$ de la proteína CDC25, el cual está implicado en la activación de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc (Munder *et al.*, 1988). Esto podría indicar una relación entre la proteína *SPO12* y la ruta del AMPc, lo que no es sorprendente, puesto que los niveles de dicho compuesto influyen tanto en mitosis como en meiosis y son reguladores importantes del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Parece lógico intentar, mediante subclonaciones y mutagénesis *in vitro*, eliminar o modificar esta zona para comprobar si la proteína resultante sigue siendo capaz de complementar la autólisis del mutante *lyt1-1*.

Otro estudio realizado con la secuencia nucleotídica del gen *SPO12*, es el cálculo de las frecuencias relativas de utilización de los diversos codones sinónimos de los diferentes aminoácidos (Tabla IV). Como puede deducirse de la comparación de dichas frecuencias con las calculadas por Sharp y Cowe (1991) para genes de alta y baja expresión en *S. cerevisiae* (Tabla V), las frecuencias del gen *SPO12* coinciden en su mayoría con las de genes de baja expresión. Por otra parte, estos mismos autores han calculado un CBI ("codon bias index" o índice de utilización de codones sinónimos) para dicho gen de -0,01. Ambos datos indican que el gen *SPO12* es de baja expresión, lo que coincide con los datos de transcripción obtenidos por Malavasic y Elder (1990) y por nosotros.

La proteína *SPO12* tiene en su extremo carboxilo gran cantidad de restos Asp y Glu, lo que confiere a esta región un carácter ácido y una carga neta negativa. Esta región debe ser funcionalmente importante si además tenemos en cuenta su extremadamente básico punto

isoeléctrico. Según comprobaron Malavasic y Elder (1990), la reducción de su tamaño, sin alterar la carga neta negativa, no afecta a la correcta realización de su función en meiosis. Sin embargo, su sustitución por otros aminoácidos cuya carga neta sea positiva sí lo hace. Basándose en esto, dichos autores la asemejan a proteínas que se unen a otras que, a su vez, se unen a DNA, como, por ejemplo, la proteína RAD6. Esta proteína es responsable de la poliubiquitinación *in vitro* de las histonas H2A y H2B (Jentsch *et al.*, 1987). Posee una cola ácida similar a la de SPO12 que es necesaria para su funcionamiento durante el proceso de esporulación, aunque no parece serlo para la reparación del DNA dañado por radiación UV (Prakash, 1989).

Hemos reducido la longitud de la cola ácida de la proteína SPO12 y hemos cambiado de signo su polaridad, sin que ninguna de estas dos modificaciones haya tenido repercusiones sobre la complementación del fenotipo autolítico ni sobre su efecto en esporulación. Por tanto, la complementación de la mutación *lyt1-1* no se produce por un mecanismo semejante a los usados por las proteínas RAD6 o SPO12 durante el proceso de esporulación.

Como ya se indicó en la introducción, la elección del punto de gemación por parte de una célula de *S. cerevisiae* no se produce de forma aleatoria, sino que las células geman de forma diferente dependiendo de su ploidía (Freifelder, 1960; Hicks *et al.*, 1977; Sloat *et al.*, 1981). Este proceso está controlado por un grupo de genes llamados genes *BUD*, algunos de los cuales están relacionados con los intercambios GDP-GTP (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Chant *et al.*, 1991; Drubin, 1991; Powers *et al.*, 1991). Los niveles de GTP, según se expuso previamente, son muy importantes en la regulación de procesos celulares, tanto en ciclo mitótico como en meiosis (Freese *et al.*, 1982, 84; Broek *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1989).

Observaciones preliminares a cerca del punto de gemación, nos han revelado que parece existir una alteración del patrón de gemación en las cepas portadoras de la mutación *lyt1-1*, que afecta de forma diferente a las cepas haploides y diploides (homocigóticas). Las cepas haploides *Lyt⁻* presentan gemación apical en la mayoría de las células incubadas a 37°C, lo que es característico de cepas diploides, pero sólo se detecta un inicio de la gemación en una de las dos del doblete.

Las cepas diploides, sin embargo, tienen el patrón de gemación alterado incluso a 24°C, produciéndose en un porcentaje alto gemación axial. A 37°C, sin embargo, no encontramos alteraciones aparentes, pero puede ser debido a que las células se lisan cuando aparecen en dobletes y, en general, sólo una de ellas inicia la gemación por segunda vez. Esto nos impide encontrar un fenotipo alterado, ya que, en células diploides, una de las dos células puede gemar en posición axial o apical sin que esto indique alteración del patrón de gemación.

Aunque se trata de resultados preliminares, éstos podrían apuntar hacia una relación entre una disfunción en la elección del punto de gemación y la lisis celular. A pesar de

que carecemos de datos suficientes, no podemos dejar de mencionar una posible relación entre el control debido al intercambio de nucleótidos fosforilados y la mutación *lyt1-1*.

Tampoco podemos ignorar la posibilidad de que el gen *SPO12* esté relacionado con las funciones mitocondriales, necesarias para el proceso de esporulación. Según experimentos de Marmiroli y Bilinski (1985), las mutaciones *spo12-1* y *spo13-1* hacen que el proceso de esporulación (apomíctica) sea independiente del paso sensible a inhibidores mitocondriales (eritromicina) de la Profase I (Miller, 1964). Esta posibilidad viene apoyada por la observación de que un tratamiento "heat shock" en el MPE (medio de preesporulación) (Bilinski y Miller, 1985) estimula meiosis completa en estas cepas apomícticas, efecto que es impedido por la adición de un inhibidor de la función mitocondrial al MPE.

V.- CONCLUSIONES

1.- La estirpe mutante termosensible *Saccharomyces cerevisiae* L2 presenta un fenotipo lítico a 37°C durante el ciclo mitótico. También tiene afectada la capacidad de esporulación, tanto a 24 como a 37°C. Las características fenotípicas mencionadas son consecuencia de una mutación única que ha permitido identificar el gen *LYT1*. La mutación *lyt1-1* es recesiva en cuanto a la manifestación fenotípica durante el ciclo mitótico, pero parece dominante en cuanto a la capacidad de esporular.

2.- La lisis se produce siempre en el mismo punto del ciclo mitótico, cuando las células madre e hija tienen aproximadamente el mismo tamaño, por lo que pensamos que el mutante *lyt1-1* puede ser de ciclo celular. Tratamientos con Hidroxiurea han permitido concluir que la lisis es posterior al inicio de la síntesis de DNA.

3.- Utilizando una genoteca genómica de *S. cerevisiae* ligada al vector YEp 13, clonamos un fragmento de 5,5 Kb que complementa el fenotipo autolítico en ciclo mitótico, pero no restaura la capacidad de esporular. El inserto clonado sólo es capaz de complementar cuando se encuentra en multicopia. El análisis de la secuencia nucleotídica del mínimo fragmento capaz de complementar, puso de manifiesto la existencia de dos marcos abiertos de lectura, correspondientes a los genes *SPO12* y *SPO16*. Experimentos de subclonación y de disrupción génica han permitido demostrar que el gen *SPO12* es el responsable de la complementación del fenotipo.

4.- La interrupción en una cepa silvestre del gen *SPO12* no afecta al ciclo mitótico, pero sí a la meiosis, provocando esporulación apomítica, lo que parece indicar que la mutación *lyt1-1* no mapea en el gen *SPO12*. Experimentos posteriores han permitido concluir que el gen *SPO12* complementa la mutación autolítica *lyt1-1* por un proceso de supresión extragénica, como se demuestra por los análisis de disrupción génica y de segregación del carácter autolítico.

5.- El producto del gen *SPO12* tiene un punto isoeléctrico extremadamente básico (10,04), y una cola ácida en su extremo carboxilo de unos 15 aminoácidos. Esta cola, que es necesaria para la realización de su función en esporulación, no lo es para la complementación del fenotipo autolítico. Aventuramos las hipótesis de que el gen *SPO12* esté relacionado con el intercambio de nucleótidos fosforilados o con las funciones mitocondriales, procesos ambos esenciales para la esporulación.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, J. (1977).** "The interrelationship of cell growth and division in haploid and diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*". *Exp. Cell Res.* **106**: 267.
- AJAM, N.; WRIGHT, J.F. y DAWES, I.W. (1981).** "The timing of sporulation specific protein changes during yeast sporulation". En "Current developments in yeast research" (G.G. Stewart y I. Russell, ed.). pp.271-275. Pergamon Press. Toronto.
- BEGGS, J.D. (1978).** "Transformation of yeast by a replicating-hybrid plasmid". *Nature* **275**: 104-109.
- BENDER, A. y PRINGLE, J.R. (1989).** "Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and the three newly identified genes including the *ras*-related gene *RSR1*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9976-9980.
- BEVAN, E.A. y COSTELLO, W.P. (1964).** "The preparation and use of an enzyme which breaks open yeast asci". *Microbiol. Genet. Bull.* **21**: 5.
- BILINSKI, C.A. y MILLER, J.J. (1980).** "Induction of normal ascosporeogenesis in two spored *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, acetate, and zinc". *J. Bacteriol.* **143**: 343.
- BILINSKI, C.A. y MILLER, J.J. (1985).** "Temperature regulation of nuclear division in apomictic yeast". *Can. J. Microbiol.* **30**: 793.
- BILINSKI, C.A.; MILLER, J.J. y GIRVITZ, S.C. (1983).** "Events associated with restoration by zinc of meiosis in apomictic *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **155**(3): 1178-1184.
- BILINSKI, C.A.; MARMIROLI, N. y MILLER, J.J. (1985c).** "Cell division age dependency of meiosis in an apomictic variant of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **3**(1): 1-4.
- BOTSTEIN, D. y DAVIS, R.W. (1982).** "Principles and practice of recombinant DNA research with yeast". En "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression". pp: 607-636. (J.N. Strathern, Jones, E.W. y Broach, J.R. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- BROACH, J.R.; STRATHERN, J.N. y HICKS, J.B. (1979).** "Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene". *Gene* **8**:121-133.
- BROEK, D.; TODA, T.; MICHAELI, T.; LEVI, L.; BIRCHMEIER, C.; ZOLLER, M.; POWERS, S. y WIGLER, M. (1987).** "The *S. cerevisiae CDC25* gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway". *Cell* **48**: 789-799.
- BUCKINGHAM, L.E.; WANG, H.-T.; ELDER, R.T.; McCARROLL, R.M.; SLATER, M.R. y ESPOSITO, R.E. (1990).** "Nucleotide sequence and promoter analysis of *SPO13*, a meiosis specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9406-9410.

- BULDER, C.J.E.A. (1971).** *Antonie van Leeuwenhoek* **37**: 353.
- BYERS, B. y GOETSCH, L. (1974).** "Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle". *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.* **38**: 123.
- BYERS, B. y GOETSCH, L. (1975).** "Behaviour of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **124**: 511.
- BYERS, B. y GOETSCH, L. (1976a).** "A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast". *J. Cell Biol.* **69**: 717.
- BYERS, B. y SOWDER, L. (1980).** "Gene expression in the yeast cell cycle". *J. Cell Biol.* **87**: 6a.
- CABIB, E. y BOWERS, B. (1975).** "Timing and function of chitin synthesis in yeast". *J. Bacteriol.* **124**: 1586.
- CABIB, E. y DURAN, A. (1975).** "Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at non permissive temperatures". *J. Bacteriol.* **124**: 1604-1606.
- CABIB, E.; ROBERTS, R. y BOWERS, B. (1982).** "Synthesis of the yeast cell wall and its regulation". *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 763-793.
- CALDERON, I.L.; CONTOPOULOU, C.R. y MORTIMER, R.K. (1984).** "Isolation of a DNA fragment that is expressed as an amber suppressor when present in high copy number in yeast". *Gene* **29**:69-76.
- CALVERT, G.R. y DAWES, I.W. (1984b).** "Cell size control of development in *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature* **312**: 61-63.
- CHANT, J. y HERSKOWITZ, I. (1991).** "Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway". *Cell* **65**: 1203-1212.
- CHANT, J.; CORRADO, K.; PRINGLE, J.R. y HERSKOWITZ, I. (1991).** "Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*". *Cell* **65**: 1213-1224.
- CROES, A.; STEIJNS, J.M.; DE VRIES, G.M. y VAN DER PUTTE, T.M. (1978).** "Inhibition of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* by ammonium ions: interference of ammonia with protein metabolism". *Planta* **141**: 205-209.
- CULOTTI, J. y HARTWELL, L.H. (1971).** "Genetic control of the cell division cycle in yeast. III. Seven genes controlling nuclear division". *Exp. Cell Res.* **67**: 389.
- DAVIS, R.W.; BOTSTEIN, D. y ROTH, J.R. (1980).** "A Manual for Genetic Engineering". *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- DE LA FUENTE, J.M.; ALVAREZ, A.; NOMBELA, C. y SANCHEZ, M. (1992).** "Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts". *Yeast*. (En prensa).
- DEL GIUDICE, L.; WOLF, K.; MANN, F. y PAGLIUCA, N. (1981).** "Synthesis of mitochondrial DNA during the cell cycle of the petite negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Mol. Gen. Genet.* **182**: 252-254.
- DEL REY, F.; SANTOS, T.; GARCIA-ACHA, I. y NOMBELA, C. (1979b).** "Synthesis of $\beta(1-3)$ -glucanases in *Saccharomyces cerevisiae* during the mitotic cell cycle, mating and sporulation". *J. Bacteriol.* **139**: 924-931.
- DELGADO, M.A. y CONDE, J. (1984).** "Benomyl prevents nuclear fusion in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **193**: 188-189.
- DENTE, L.; CESARENI, G. y CORTESE, R. (1983).** "pEMBL: a new family of single stranded plasmids". *Nucleic. Acid. Res.* **11**: 1645-1655.
- DICKINSON, J.R. (1988).** "The metabolism of sporulation in yeast". *Microbiol. Sci.* **5(4)**: 121-123.
- DICKINSON, J.R. y WILLIAMS, A.S. (1986).** "A genetic and biochemical analysis of the role of gluconeogenesis in sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2605-2610.
- DICKINSON, J.R.; DAWES, I.W.; BOYD, A.S. y BAXTER, R.L. (1983).** "¹³C NMR studies of acetate metabolism during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80(19)**: 5847-5851.
- DONACHIE, W.D. (1968).** "Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication". *Nature* **219**: 1077.
- DRUBIN, D.G. (1991).** "Development of cell polarity in budding yeast". *Cell* **65**: 1093-1096.
- ELDER, R.T.; LOH, E.Y. y DAVIS, R.W. (1983).** "RNA from the yeast transposable element Ty1 has both ends in the direct repeats, a structure similar to retrovirus RNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2432-2433.
- ELLIOT, S.G. y McLAUGHLIN, C.S. (1979b).** "Regulation of RNA synthesis in yeast. III. Synthesis during the cell cycle". *Mol. Gen. Genet.* **169**: 237.
- ESPOSITO, M.S.; ESPOSITO, R.E.; ARNAUD, R.E. y HALVORSON, H.O. (1969).** "Acetate utilization and macromolecular synthesis during sporulation in yeast". *J. Bacteriol.* **100**: 180-186.

- ESPOSITO, R.E. y KLAPHOLZ, S. (1981).** "Meiosis and ascospore development". En "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance". pp:211-287. (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- ESPOSITO, R.E.; FINK, N.; BERNSTEIN, P. y ESPOSITO, M.S. (1972).** "The genetic control of sporulation in *Saccharomyces*. II. Dominance and complementation of mutants of meiosis and spore formation". *Mol. Gen. Genet.* **114**: 241.
- FANTES, P.A. y NURSE, P.M. (1981).** En "The Cell Cycle", pp. 11-33 (P.C.L. Jhon, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- FEINBERG, A.P. y VOGELSTEIN, B. (1984).** "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum. Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- FINK, G.R. (1971).** "The biochemical genetic of yeast". En "Methods in Enzymology". vol. XVII, pp. 59-78. (Tarbor, H y Tarbor, C.W. eds.) Academic Press, New York, London.
- FINK, G.R.; SHERMAN, F. y HICKS, J.B. (1983).** "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- FISCHNOFF, D.A.; WATERSTON, R.H. y OLSON, M.V. (1984).** "The yeast cloning vector YEp 13 contains a tRNA *LEU3* gene that can mutate to an amber suppressor". *Gene* **27**:239-251.
- FOWELL, R.R. (1969).** "Sporulation and hybridization of yeasts". En "The Yeasts" (A.H. Rose y J.S. eds.), vol 1, pp: 303-383. Academic Press, London.
- FREESE, E.; FREESE, E.B.; ALLEN, E.R.; OLEMPKA-BEER, Z.; ORREGO, C.; VARMA, A. y WABIKO, H. (1985).** En "Molecular Biology of Microbial Differentiation", pp. 194-202 (J.A. Hoch y P. Setlow, eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- FREESE, E.B.; CHU, M.I. y FREESE, E. (1982).** "Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen or phosphate deprivation". *J. Bacteriol.* **149**: 840-851.
- FREESE, E.B.; OLEMPKA-BEER, Z.; HARTIG, A. y FREESE, E. (1984).** "Initiation of meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* by sulphur or guanine deprivation". *Dev. Biol.* **102**(2): 438-451.
- FREIFELDER, D. (1960).** "Bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **80**: 567-568.
- FRITZ, A. (1955).** "Untersuchungen an Hefemitochondrien". *Brauwissenschaft* **8**: 22.
- GAME, J.C.; LAMB, T.J.; BRAUN, R.J.; RESNICK, M. y ROTH, R.M. (1980).** "The role of the radiation (*rad*) genes in meiotic recombination in yeast". *Genetics* **94**: 51-58.

- GÄUMANN, E.A. y DODGE, C.W. (1928).** "Comparative morphology of the fungi". McGraw Hill, New York, London.
- GLOVER, D.M. (1986).** DNA cloning, vol. 1. A practical approach". IRL Press, Oxford, England.
- GREWAL, N.S. y MILLER, J.J. (1972).** "Formation of asci with two diploid spores by diploid cells of *Saccharomyces* Can. J. Microbiol. **18**: 1897-1905.
- HABER, J.E. y HALVORSON, H.O. (1972b).** "Regulation of sporulation in yeast". Current Topics in Developmental Biology **7**: 61-83.
- HALVORSON, H.O.; CARTER, B.L.A. y TAURO, P. (1971).** "Synthesis of enzymes during the cell cycle". Adv. Microb. Physiol. **6**: 47.
- HANAHAN, D. (1985).** "Techniques for transformation of *E. coli*". En "DNA Cloning". Vol I, pág. 120, (Glover, D.M. ed.). IRL Press, Oxford, England.
- HANSEN, E.C. (1889).** Centralblatt für Bakteriologie II **5**: 1.
- HANSEN, E.C. (1902).** Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg **5**: 68.
- HARTIG, A. y BREITENBACH, M. (1977).** FEMS Microbiology Letters **1**: 79.
- HARTIG, A. y BREITENBACH, M. (1980).** "Sporulation in mitochondrial OX13 mutants of *S. cerevisiae*. A correlation with the genetic map". Current Genetics **1**: 97.
- HARTWELL, L.H. (1970).** "Periodic density fluctuation during the yeast cell cycle and the selection of synchronous cultures". J. Bacteriol. **104**: 1280.
- HARTWELL, L.H. (1971a).** "Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. J. Mol. Biol. **59**: 183.
- HARTWELL, L.H. (1973a).** "Synchronization of haploid yeast cell cycles, a prelude to conjugation". Exp. Cell Res. **76**: 111.
- HARTWELL, L.H. (1973b).** "Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. **115**: 966.
- HARTWELL, L.H. (1974).** "*Saccharomyces cerevisiae* cell cycle". Bacteriol. Rev. **38**: 164.
- HARTWELL, L.H. (1976).** "Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle". J. Mol. Biol. **104**: 803-817.
- HARTWELL, L.H.; CULOTTI, J. PRINGLE, J.R. y REID, B.J. (1974).** "Genetic control of the cell division cycle in yeast". Science **183**: 46.

- HAYASHIBE, M. y KATOHDA, S. (1973).** "Initiation of budding and chitin-ring". J. Gen. Appl. Microbiol. **19**: 23.
- HAYASHIBE, M.; ABE, N. y MATSUI, M. (1977).** "Mode of increase in cell wall polysaccharides in synchronously growing *Saccharomyces cerevisiae*". Arch. Microbiol. **114**: 91.
- HEBERT, P.D.N. (1978).** Biological Reviews **53**: 387.
- HENNINGER, W. y EMEIS, C.C. (1974).** "The apomyctic life-cycle of the multispored strains of the yeast *Lipomyces*". Archives of Microbiology **101**: 365-378.
- HEREFORD, L.M.; OSLEY, M.A.; LUDWIG, J.R. y McLAUGHLIN, C.S. (1981).** "Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA". Cell **24**: 367.
- HERSKOWITZ, I. (1988).** "Life cycle of the budding yeast *S. cerevisiae*". Microbiol. Rev. **52**: 536-553.
- HERSKOWITZ, I. y OSHIMA, Y. (1981).** "Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: mating type and mating type interconversion", pp.181-209. En "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance" (J.N. Strathern, E.W. Jones y R. Broach, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- HESLOP-HARRISON, J. (1961).** En "Recent Advances in Botany", pp.891-895 (D.L. Bailey, ed.). University of Toronto Press, Toronto.
- HICKS, J.B.; STRATHERN, J.N. y HERSKOWITZ, I. (1977).** "Interconversion of yeast mating types.III. Action of the homotallism (HO) gene in cells homozygous for the mating type locus". Genetics **85**: 373-393.
- HILL, J.E.; MYERS, A.M.; KOERNER, T.J. y TZAGOLOFF, A. (1986).** "Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites". Yeast **2**: 163-167.
- HINNEN, A.; HICKS, J.B. y FINK, G.R. (1978).** "Transformation of yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 1929-1933.
- HIRSCHBERG, J. y SIMCHEN, G. (1977).** "Commitment to the mitotic cell cycle in yeast in relation to meiosis". Exp. Cell Res. **105**: 245.
- HOLMES, D.S. y QUIGLEY, M. (1981).** "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids". Anal. Biochem. **114**: 193-197.
- HOPPER, A.K.; MAGEE, P.T.; WELCH, S.K.; FRIEDMAN, M. y HALL, B.D. (1974).** "Macromolecule synthesis and breakdown in relation to sporulation and meiosis in yeast". J. Bacteriol. **119**: 619-628.

- ISHIKAWA, T.; UNO, I. y MATSUMOTO, K. (1986). "The role of cAMP in controlling cell division". *Bioessays* 4(2): 52-56.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K. y KIMURA, A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations". *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- JENTSCH, S.; McGRATH, J.P. y VARSHAVSKY, A. (1987). "The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme". *Nature (London)* 329: 131-134.
- JHONSTON, G.C. (1977). "Cell size and budding during starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 132: 738.
- JOHNSTON, G.C.; PRINGLE, J.R. y HARTWELL, L.H. (1977a). "Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Exp. Cell Res.* 105: 79.
- JOHNSTON, G.C.; SINGER, R.A. y McFARLANE, E.S. (1977b). "Growth and cell division during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Bacteriol.* 132:723.
- JOHNSTON, G.C.; EHRHARDT, C.W.; LORINCZ, A. y CARTER, L.A. (1979). "Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 137: 1-5.
- JHONSTON, G.C. y SINGER, R.A. (1983). "Growth and the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. I. Slowing S phase or nuclear division decreases the G1 cell period". *Exp. Cell Res.* 149:1-13.
- JOHNSTON, J.R. y MORTIMER, R.K. (1959). "Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads". *J. Bacteriol.* 78: 292.
- JOHNSTON, M. y DAVIS, R.W. (1984). "Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *S. cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* 4: 1440-1448.
- KASSIR, Y. y SIMCHEN, G. (1976). "Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region". *Genetics* 82: 187-206.
- KASSIR, Y.; GRANOT, D. y SIMCHEN, G. (1988). "*IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*". *Cell* 52(6): 853-862.
- KAWASAKI, G. (1979). "Karyotypic instability and carbon source effects in cell cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". Ph.D. Thesis. Univ. of Washington, Seattle.
- KESTON, A.S. (1956). "Specific colorimetric enzymatic reagents for glucose". Abstr. 129th Meet. A.C.S., p. 31c.
- KLAPHOLZ, S. y ESPOSITO, R.E. (1980). "Isolation of *spo12-1* and *spo13-1* from a natural variant of yeast that undergoes a single meiotic division". *Genetics* 96: 567-588.

- KLAPHOLZ, S. y ESPOSITO, R.E. (1980).** "Recombination and chromosome segregation during the single division meiosis in *spo12-1* and *spo13-1* diploids". *Genetics* **96**: 589-561.
- KLAPHOLZ, S.; WADDELL, C.S. y ESPOSITO, R.E. (1985).** "The role of the *SPO11* gene in meiotic recombination in yeast". *Genetics* **110**: 187-216.
- KLAR, A.J.S. (1980).** "Mating-type functions for meiosis and sporulation in yeast act through cytoplasm". *Genetics* **94**: 597-605.
- KLAR, A.J.S.; STRATHERN, J.N. y HICKS, J.B. (1984).** "Developmental pathways in yeast". En "Microbial Development", pp.151-196 (R. Losick y L. Shapiro, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- KOPECKA, M. (1974).** "Sporulation in protoplasts of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* **83**:171-178.
- LAUER, G.; ROBERTS, T.M. y KLOTZ, L.C. (1977).** "Determination of the nuclear DNA content of *Saccharomyces cerevisiae* and implications for the organization of DNA in yeast chromosomes". *J. Mol. Biol.* **114**: 507-526.
- LIAO, H. y THORNER, J. (1980).** "Yeast mating pheromone α -factor inhibits adenylate cyclase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1898.
- LIAO, H. y THORNER, J. (1981).** "Adenosine 3',5'-phosphate phosphodiesterase and pheromone response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **148**: 919-925.
- LINNEMANS, W.A.; BOER, P. y ELBERS, P.F. (1977).** "Localization of acid phosphatase in *S. cerevisiae*: a clue to cell wall formation". *J. Bacteriol.* **131**: 638.
- LORD, P.G. y WHEALS, A.H. (1981).** "Variability in individual cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Cell Sci.* **50**: 361-376.
- LORD, P.G. y WHEALS, A.H. (1983).** "Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate determining factor". *J. Cell Sci.* **59**: 183-201.
- LORINCZ, A. (1984).** "Quick preparation of plasmid DNA from yeast". *Focus* **6**: 11.
- LORINCZ, A.T.; MILLER, M.J.; XUONG, N. y GEIDUSCHEK, E.P. (1982).** *Mol. Cell. Biol.* **2**:117.
- LORINCZ, A.T. y REED, S.I. (1986).** "Sequence analysis of temperature-sensitive mutations in the *S. cerevisiae* gene *CDC28*". *Mol. Cell. Biol.* **6**: 4099-4103.
- MACRINA, F.L.; KOPECKO, D.J.; JONES, K.R.; AYERS, D.J. y McCONEN. (1978).** "A multiple plasmid containing *E. coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules". *Plasmid* **1**: 417-420.

- MALAVASIC, M.J. y ELDER, R.T. (1990).** "Complementary transcripts from two genes necessary for normal meiosis in the yeast *S. cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **10** (6):2809-2819.
- MALONE, R.E. (1990).** "Dual regulation of meiosis in yeast". *Cell* **61**: 375-378.
- MALONE, R.E. y ESPOSITO, R.E. (1981).** "Recombinationless meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **1**: 891-901.
- MANDEL, M. y HIGA, A. (1970).** "Calcium dependent bacteriophage DNA infectum". *J. Mol. Biol.* **53**:159-162.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982).** En "Molecular cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- MARMIROLI, N. y BILINSKI, C.A. (1985).** "Partial restoration of meiosis in an apomictic strain of *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for investigation of nucleomitochondrial interactions during sporulation". *Yeast* **1**: 39-47.
- MARMIROLI, N.; FERRARI, C; TEDESCHI, F.; PUGLISI, P.P. y BRUSCHI, C. (1981).** "Ultrastructural analysis of the life cycle of an apomictic (*Apo*) strain of *Saccharomyces cerevisiae*". I. Meiosis and ascospore development. *Biology of the Cell* **41**: 79.
- MATILE, P.; MOOR, H. y ROBINOW, C.F. (1969).** "Yeast Cytology". En "The Yeasts". Vol 1, pp: 219-302. (A.H. Rose y J.S. Harrison eds.). Academic Press. London, New York.
- MATSUMOTO, K.; UNO, I. y ISHIKAWA, T. (1983).** "Initiation of meiosis in yeast mutants defective in adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinase". *Cell* **32**(2): 417-423.
- McKAY, V.L. (1983).** "En Methods in Enzymology", vol. 101, pp: 325. (Wu, R. Grossman, L. y Moldave, K. eds.). Academic Press, London.
- MILLER, J.J. (1963).** "The metabolism of yeast sporulation. V. Stimulation and growth by nitrogen compound". *Can. J. Microbiol.* **9**: 259-277.
- MILLER, J.J. (1964).** "A comparison of the effects of several nutrients and inhibitors on yeast meiosis and mitosis". *Exp. Cell Res.* **33**: 46.
- MILLER, J.J. (1989).** "Sporulation in *S. cerevisiae*". En "The Yeasts", Vol. 3, 2^a Ed. pp: 489-550. (A.H. Rose y J.S. Harrison eds.). Academic Press, Ltd, London.
- MITCHELL, A.P. (1988).** "Two switches govern entry into meiosis in yeast". En "Meiotic inhibition: molecular control of meiosis". pp: 47-66. (F. Haseltine y N. First eds.). Alan R. Liss, Inc., New York.

- MITCHISON, J.M. (1977).** "Enzyme synthesis during the cell cycle". En "Cell differentiation in microorganisms, plants and animals" (L. Nover y K. Mothes), pp.337. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- MOENS, P.B.; MOWAT, M.; ESPOSITO, M.S. y ESPOSITO, R.E. (1977).** "Meiosis in a temperature-sensitive DNA-synthesis mutant and in an apomictic yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*). Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B. 277: 351.
- MOLANO, J.; BOWERS, B y CABIB, E. (1980).** "Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study". J. Cell Biol. 85: 199-212.
- MOLL, R. y WINTERSBERGER, E. (1976).** "Synthesis of the yeast histones in the cell cycle". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1863.
- MORTIMER, R.K.; SCHILD, D.; CONTOPOULOU, R. y AKANS, J. (1989).** "Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*". Edición 10. Yeast, vol. 5, n°5.
- MUNDER, T. MINK, M. y KÜNTZEL, H. (1988).** "Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene controlling mitosis and meiosis". Mol. Gen. Genet. 214: 271-277.
- MURRAY, A.W. y KIRSCHNER, M.W. (1991).** "Control del ciclo celular". Investigación y Ciencia 176: 26-33.
- NAKASEKO, Y.; NIWA, O. y YANAGIDA, M. (1984).** "A meiotic mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that produces mature asci containing two diploid spores". J. Bacteriol. 157(1): 334-336.
- NASMYTH, K.A. y REED, S.I. (1980).** "Isolation of genes by complementation in yeast: Molecular cloning of a cell-cycle gene". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2119-2123.
- NASMYTH, K.A. y TATCHELL, K. (1980).** "The structure of transposable yeast mating type loci". Cell 19: 753-764.
- NEWLON, C.S. y FANGMAN, W.L. (1975).** "Mitochondrial DNA synthesis in cell cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". Cell 5: 423.
- NOMBELA, C. y SANTAMARIA, C. (1984).** "Genetic of yeast cell wall autolysis". En "Microbial cell wall synthesis and autolysis". pp. 249-260. (Nombela, C. ed.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- NURSE, P. (1990).** "On fission". J. Gen. Microbiol. 136: 1921-1923.

- NURSE, P. (1990).** "Universal control mechanism regulating onset of M-phase". *Nature* **344**: 503-508.
- OLEMPKA-BEER, Z. y FREESE, E. (1987).** "Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* does not require a decrease in cyclic AMP". *Mol. Cell. Biol.* **7(6)**: 2141-2147.
- OPHEIM, D.J. (1979).** "Effect of ammonium ions on activity of hydrolytic enzymes during sporulation of yeast". *J. Bacteriol.* **138**: 1022-1025.
- PARDEE, A.B. (1989).** "G1 events and regulation of cell proliferation". *Science* **246**: 603-608.
- PERCIVAL-SMITH, A. y SEGALL, J. (1984).** "Isolation of DNA sequences preferentially expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **4**: 142-150.
- PETES, T.D. y FANGMAN, W.L. (1973).** "Preferential synthesis of yeast mitochondrial DNA in α factor-arrested cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**: 603.
- POWERS, S.; GONZALES, E.; CHRISTENSEN, T.; CUBERT, J. y BROEK, D. (1991).** "Functional cloning of *BUD5*, a *CDC25*-related gene from *Saccharomyces cerevisiae* that can suppress a dominant negative *RAS2* mutant". *Cell* **65**: 1225-1231.
- PRAKASH, L. (1989).** "The structure and function of *RAD6* and *RAD18* DNA repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*". *Genome* **31**: 597-600.
- PRATGE, E.; SCHULTZ, R.; SCHNIERER, S. y MICHAELIS, G. (1979).** "Sporulation and mitochondrial respiratory deficient *mit-* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **176**: 411.
- PRINGLE, J.R. (1978).** "The use of conditional lethal cell cycle mutants for temporal and functional sequence mapping of cell cycle events". *J. Cel. Physiol.* **95**: 393.
- PRINGLE, J.R. y HARTWELL, L.H. (1981).** "The *S. cerevisiae* cell cycle". En "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance". (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach eds.) pp: 97-142. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- QUINLAN, R.A.; POGSON, C.I. y GULL, K. (1980).** "The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Cell Sci.* **46**: 341.
- RATZKIN, B. y CARBON, J. (1976).** "Functional expression of cloned yeast DNA in *E. coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 487.
- REID, B.J. y HARTWELL, L.H. (1977).** "Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Cel. Biol.* **75**: 355.

- RIGBY, P.W.J.; DIECKMANN, M.I.; RHODES, C. y BERG, P. (1977). "Labelling DNA to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I". J. Mol. Biol. **113**: 237-251.
- ROSE, M.D.; NOVICK, P.; THOMAS, J.M.; BOTSTEIN, D. y FINK, G.R. (1987). "A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector". Gene **60**: 237-243.
- ROSE, D.; THOMAS, W. y HOLM, C. (1990). "Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II". Cell **60**: 1009-1017.
- RUIZ, T.; VILLANUEVA, J.R. y RODRIGUEZ, L. (1984). "Influence of carbon catabolite repression on the G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae* MATa cells by Ó-factor". J. Gen. Microbiol. **130**: 337-342.
- ROTH, R. y LUSNAK, K. (1970). "DNA synthesis during yeast sporulation: genetic control of an early developmental event". Science **168**: 493-494.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- SAN SEGUNDO, P. (1988). "Aislamiento y caracterización de mutantes líticos termosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*". Tesina de Licenciatura. Univ. de Salamanca.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. y COULSON, A.R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- SANTAMARIA, C. (1979). "Aislamiento y caracterización parcial de mutantes autolíticos de *S. cerevisiae* S288C". Tesina de Licenciatura. Univ. Complutense. Madrid.
- SANTAMARIA, C. (1985). "Aislamiento y caracterización de mutantes de *S. cerevisiae* alterados en los mecanismos de autólisis de la pared celular". Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- SCHEKMAN, R. y BRAWLEY, V. (1979). "Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 645.
- SHARP, P.M. y COWE, E. (1991). "Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*". Yeast **7**: 657-678.
- SHERMAN, F.; FINK, G.R. y HICKS, J.B. (1983). "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- SHUSTER, J.R. (1982a). "'Start' mutants of *Saccharomyces cerevisiae* are suppressed in carbon catabolite-derepressing medium". J. Bacteriol. **151**: 1059.

- SIMCHEN, G. (1974).** "Are mitotic functions required in meiosis?". *Genetics* **76**: 745-753.
- SINGER, R.A. y JHONSTON, G.C. (1981).** "Nature of the G1 phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3030-3033.
- SINGER, R.A. y JHONSTON, G.C. (1983).** "Growth and the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. II. Relief of cell-cycle constraints allows accelerate cell divisions". *Exp. Cell Res.* **149**: 15-26.
- SLATER, M.L. (1973).** "Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis on the yeast cell cycle". *J. Bacteriol.* **113**: 263-270.
- SLATER, M.L.; BOWERS, B. y CABIB, B. (1985).** "Formation of septum-like structures at locations remote from the budding sites in cytokinesis-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **162**: 763-767.
- SLOAT, B.F.; ADAMS, A y PRINGLE, J.R. (1981).** "Roles of the *CDC24* gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle". *J. Cell Biol.* **89**: 395.
- SMITH, H.E.; SU, S.S.; NEIGEBORN, L.; DRISCOLL, S.E. y MITCHELL, A.P. (1990).** "Role of *IME1* expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **10**(12): 6103-6113.
- SORA, S. y BIANCHI, M. (1982).** *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1299.
- SOUTHERN, E.M. (1975).** "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- SUMRADA, R. y COOPER, T.G. (1978b).** "Control of vacuole permeability and protein degradation by the cell cycle arrest signal in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **136**: 234.
- STEVENS, E.M. (1978).** En "Electron Microscopy", vol. 2, pp. 406-407 (J.M. Sturgess, ed.). Microscopical Society of Canada, Toronto.
- STEVENS, B.J. (1981).** En "Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*.I. Life Cycle and Inheritance" pp. 471-504 (J.N. Strathern, E.W. Jones y J.R. Broach, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- STINCHCOMB, D.T.; STRUHL, K. y DAVIS, R.W. (1979).** "Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator". *Nature* **282**: 39-43.
- STRATHERN, J.N.; KLAR, A.J.S.; HICKS, J.B.; ABRAHAM, J.A.; IVY, J.M.; NASMYTH, K.A. y MCGILL, C. (1982).** "Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double stranded cut in the *MAT* locus". *Cell* **31**: 183-192.

- STRICH, R.; SLATER, M.R. y ESPOSITO, R.E. (1989).** "Identification of negative regulatory genes that govern the expression of early meiotic genes in yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 10018-10022.
- SUMRADA, R. y COOPER, T.G. (1978b).** "Control of vacuole permeability and protein degradation by the cell cycle arrest signal in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. **136**: 234.
- SUOMALANEIN, E.; SAURA, A. y LOKKI, J. (1976).** "Evolution of parthenogenetic insects". Evolutionary Biology **9**: 209-257.
- TANAKA, K.; MATSUMOTO, K. y TOH-E, A. (1989).** "*IRA1*, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway". Mol. Cell. Biol. **9**(2): 757-768.
- TATCHELL, K. (1986).** "*RAS* genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. **166**: 364-367.
- TATCHELL, K.; ROBINSON, L.C. y BREITENBACH, M. (1985).** "*RAS2* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenetic growth and proper response to nutrient limitation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 3785-3789.
- THOMAS, P.S. (1980).** "Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 5201-5205.
- THOMAS, J.H. y BOTSTEIN, D. (1986).** "A gene required for the separation of chromosomes on the spindle apparatus in yeast". Cell **44**: 65-76.
- THOMPSON, E.A. y ROEDER, G.S. (1989).** "Expression and DNA sequence of *RED1*, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast". Mol. Gen. Genet. **218**: 293-301.
- THORM, E. y DUNTZE, W. (1970).** "Mating-type-dependent inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. **104**: 1388.
- THORNER, J. (1982).** "An essential role for cyclic AMP in growth control: the case for yeast". Cell **30**: 5.
- TIEDT, L.R.; JOOSTE, W.J. y HAMILTON-ATTWELL, V.L. (1987).** "Technique for preserving aerial fungus structure for scanning electron microscopy". Trans British Micology (88) **3**: 420-422.
- TIMSON, J. (1975).** Mutation Research **32**: 115.
- TODA, T.; UNO, I.; ISHIKAWA, T.; POWERS, S.; KATAOKA, T.; BROEK, D.; CAMERON, S.; BROACH, J.; MATSUMOTO, K. y WIGLER, M. (1985).** "In yeast, RAS proteins are controlling elements of the adenylate cyclase". Cell **40**:27-36.

- TORRES, L. (1990).** "Clonación molecular y secuencia nucleotídica de un gen de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación autolítica *lyt2-1* y que codifica una proteína-quinasa". Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- TORRES, L.; PEIRO, E.; SANTAMARIA, C. y NOMBELA, C. (1984).** Simposium de la FEMS: "Síntesis y autólisis de la pared celular". Abstracts: 96.
- TORRES, L.; MARTIN, H.; GARCIA-SAEZ, M.I.; ARROYO, J.; MOLINA, M.; SANCHEZ, M. y NOMBELA, C. (1991).** "A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants". *Mol. Microbiol.* **5**(11): 2845-2854.
- TREW, B.J.; FRIESEN, J.D. y MOENS, P.B. (1979).** "Two dimensional protein patterns during growth and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **138**: 60-69.
- TRIPP, M.L. y PINON, R. (1986).** "Control of the cAMP pathway by the cell cycle start function, *CDC25*, in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1143-1151.
- TSUBOI, M. (1981a).** "Sporulation of spheroplasts in *Saccharomyces cerevisiae*". *Plant and Cell Physiology* **21**: 59-63.
- TSUBOI, M. (1981b).** "Sporulation of products of protoplast fusion without regeneration in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **182**: 1-6.
- UNO, I.; MATSUMOTO, K.; HIRATA, A. y ISHIKAWA, T. (1985).** "Outer plaque assembly and spore encapsulation are defective during sporulation of adenylate cyclase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Cell. Biol.* **100**(6): 1854-1862.
- VEZINHET, F.; ROGER, M.; PELLECUER, M. y GALZY, P. (1974).** "Genetic control of some metabolic modifications during the sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen". *J. Gen. Microbiol.* **81**: 373-382.
- VIEIRA, J. y MESSING, J. (1982).** "The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers". *Gene* **19**: 259-268.
- WAGSTAFF, J.E.; KLAPHOLZ, S. y ESPOSITO, R.E. (1982).** "Meiosis in haploid yeast". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2986-2990.
- WANG, H.-T.; FRACKMAN, S.; KOWALYSIN, J.; ESPOSITO, R.E. y ELDER, R. (1987).** "Developmental regulation of *SPO13*, a gene required for separation of homologous chromosomes at meiosis I". *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1425-1435.
- WEIR-THOMPSON, E.M. y DAVIS, I.W. (1984).** "Developmental changes in translatable RNA species associated with meiosis and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **4**(4): 695-702.

- WHEALS, A.E. (1987).** "Biology of the cell cycle in yeasts". En "The Yeasts". Vol. 1, 2^a Ed. pp: 283-377. (A.H. Rose y J.S. Harrison eds.). Academic Press, Inc., London.
- WHITEWAY, M. y SZOSTAK, J.W. (1985).** "The *ARD1* gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways". *Cell* **43**: 483-492.
- WIEMKEN, A.; MATILE, P. y MOOR, H. (1970).** "Vacuolar dynamics in synchronously budding yeast". *Arch. Mikrobiol.* **70**: 89.
- WILKINSON, L.E. y PRINGLE, J.R. (1974).** "Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating type α by a factor produced by cells of mating type a". *Exp. Cel. Res.* **89**: 175.
- WILLIAMS, S.T. y VELDKAMP, C.J. (1974).** "Preparation of fungi for scanning electron microscopy". *Trans British Micology (63)* **2**: 409-412.
- WOLFNER, M.; YEP, D.; MESSENGUY, F. y FINK, G.R. (1975).** "Integration of amino acid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Mol. Biol.* **96**: 273.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. y MESSING, J. (1985).** "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* **33**: 109-119.
- YASHPHE, J. y HALVORSON, H.O. (1976).** " β -D-galactosidase activity in single yeast cells during cell cycle of *Saccharomyces lactis*". *Science* **191**: 1283.