

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March
presenta resúmenes, realizados por el propio autor,
de algunos estudios e investigaciones
llevados a cabo por los becarios de la Fundación
y aprobados por los Asesores Secretarios
de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes
se encuentra en la Biblioteca de la Fundación
(Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados
se presenta, en forma de fichas,
en los Cuadernos Bibliográficos
que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares,
que se reparte gratuitamente a investigadores,
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca de España, 1976.
Departamento de Biología.

Fundación Juan March



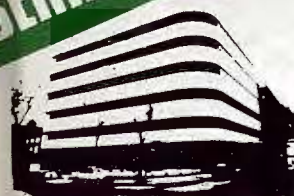
FJM-Uni 44-San
a Estudio de mutantes de saccharom
Sánchez Rodríguez, Lucas.
1031752



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Estudio de mutantes de *saccharomyces cerevisiae* alterados en la biosíntesis de proteínas

Lucas Sánchez Rodríguez

FJM
Uni-
44
San

44

Estudio de mutantes de *saccharomyces cerevisiae*/Lucas Sánchez Rodríguez

2015

Fundación Juan March
Serie Universitaria

44



Estudio de mutantes
de *saccharomyces cerevisiae*
alterados en la biosíntesis
de proteínas

Lucas Sánchez Rodríguez



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.*

Depósito Legal: M - 38520-1977

I.S.B.N. 84 - 7075 - 070 - 4

Ibérica, Tarragona, 34.- Madrid-7

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	2
Cepas de levadura	2
Medios de cultivo	2
Preparación de ribosomas, subunidades ribosómicas y fracciones del sobrenadante	3
Síntesis de proteínas en sistemas acelulares	4
Análisis del contenido de polisomas en esferoplastos	5
Biosíntesis de macromoléculas en los mutantes ts	5
Ensayo de las aminoacil-tRNA sintetasas	6
Análisis genéticos	6
RESULTADOS	7
Análisis bioquímico y genético de la resistencia a criptopleurina	7
Efecto de tubulosina y emetina en los mutantes resistentes a criptopleurina	7
Localización de la resistencia a tubulosina y a emetina	9
Análisis genético de la resistencia a tubulosina y a emetina	9
Análisis genético de las mutaciones de resistencia a criptopleurina	11
Análisis bioquímico y genético del mutante sensible a la temperatura JP-322	13
DISCUSION	22
Análisis bioquímico y genético de la resistencia a criptopleurina	22
Análisis bioquímico y genético del mutante sensible a la temperatura JP-322	25
BIBLIOGRAFIA	28
FIGURAS	30

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. David Vázquez por haberme permitido realizar este trabajo en su Departamento, al Dr. Antonio Jiménez por la dirección del mismo, a Doña Asunción Martín por su ayuda técnica y a todos aquellos que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo.

INTRODUCCION

Los estudios genéticos han supuesto un considerable aporte al conocimiento del ribosoma bacteriano y su función en biosíntesis de proteínas. El aislamiento de mutantes que presentan alterado algún componente del proceso de biosíntesis de proteínas puede conseguirse esencialmente de dos maneras distintas: (a) resistencia a inhibidores de la síntesis de proteínas, (b) sensibilidad a la temperatura.

En E. coli se han obtenido una serie de mutantes resistentes a diversos inhibidores de biosíntesis de proteínas, como se han descrito inicialmente con estreptomycin (1), espectinomycin (2), kasugamicina (3), otros antibióticos aminoglucósidos (4), eritromicina (5) y ácido fusídico (6). Los estudios realizados con estos y otros mutantes en relación con la estructura del ribosoma bacteriano han sido resumidos recientemente (7).

En E. coli las lesiones sensibles a la temperatura se han estudiado en menor grado principalmente debido a que el análisis de resistencia a inhibidores de la síntesis de proteínas es mucho más fácil y productivo. Hay que destacar, sin embargo, los trabajos de Tocchini-Valentini y Matoccia (8), Kuwano y cols. (9) y Lupker y cols. (10) que han obtenido y caracterizado mutantes de E. coli afectados en los factores de elongación EF-G, EF-Ts y EF-Tu, respectivamente.

Disponemos de mucha menos información en relación con los mutantes resistentes a inhibidores de biosíntesis de proteínas en células eucarióticas. Por su fácil crecimiento y los conocimientos genéticos y bioquímicos, han sido las levaduras los or-

ganismos de elección, a pesar de que la mayoría de ellas son impermeables a los antibióticos activos en el ribosoma 80S (11). No obstante, se han descrito mutantes de Saccharomyces cerevisiae resistentes a cicloheximida (12), tricodermina (13,14), anisomicina (14) y alcaloides derivados de la planta Tilofora (15) y de las Amarilidáceas (16). En cambio, el estudio de mutantes de levadura sensibles a la temperatura (ts) aparece muy prometedor para el conocimiento del proceso de biosíntesis de macromoléculas y su regulación génica en células eucarióticas. De entre los mutantes ts alterados en la biosíntesis de proteínas, se han descrito tres mutaciones independientes que confieren sensibilidad a la temperatura a la isoleucil-tRNA sintetasa (17) y metionil-tRNA sintetasa (18) y al paso de iniciación de la biosíntesis de proteínas (19).

Siguiendo estas líneas de investigación, hemos estudiado un grupo de mutantes de la levadura Saccharomyces cerevisiae resistentes a criptopleurina y un mutante sensible a la temperatura de dicha levadura alterado en la biosíntesis de proteínas.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de levadura

Las características genéticas de las cepas de levadura S. cerevisiae empleadas en el desarrollo de este trabajo vienen dadas en la Tabla 1.

Medios de cultivo

Los medios que se emplean han sido descritos por Hartwell (20). En los casos en que ello fué requerido, los medios se gelificaron añadiendo agar a una concentración final del 2%.

TABLA 1. Características fenotípicas de las cepas de levadura Saccharomyces cerevisiae empleadas en este trabajo

Cepas de la levadura	Fenotipo
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	
Y ₁₆₆	α , his 4, trp 5, MA 1
CRY ₆	α , his 4, trp 5, MA 1, crp ^r
TR1	α , his 4, trp 5, MA 1, tcd ^r
SR ₁₇	α , his 4, trp 5, MA 1, cyh ^r
A364A	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1
CRY ₂	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1, crp ^r
CRY ₃	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1, crp ^r
CRY ₄	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1, crp ^r
CRY ₅	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1, crp ^r
CRY ₇	a, ade 1, ade 2, ura 1, his 7, lys 2, tyr 1, crp ^r
373/19	a, ade 2

Preparación de ribosomas, subunidades ribosómicas y fracciones del sobrenadante

Los ribosomas lavados con alta sal y las fracciones del sobrenadante se han obtenido de células congeladas almacenadas a -30°C como describieron Battaner y Vázquez (21). Para la obtención de subunidades hemos seguido un método que hemos puesto a punto: el crecimiento de las células, el tratamiento con NaN₃, la rotura de las células y la extracción de los ribosomas se han realizado como se ha descrito previamente (14), con la sal-

vedad que para la extracción hemos empleado solución tampón 1 que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 12,5 mM $MgCl_2$, 80 mM KCl y 10 mM de 2-mercaptoetanol. La fracción S-30 se colocó sobre un colchón de sacarosa al 40% en buffer 1 y se centrifugó a 150.000 x g en el rotor 60Ti durante 5 horas. El sedimento de ribosomas se resuspendió en solución tampón 1, se clarificó y la solución de ribosomas se guardó en nitrógeno líquido. Para separar las subunidades ribosómicas, la solución de ribosomas se diluyó hasta una concentración de 120 A_{260} /ml con buffer 2 conteniendo 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl y 10 mM de 2-mercaptoetanol. 1 ml de esa solución de ribosomas se colocó sobre un gradiente exponencial de sacarosa al 5%-30% en solución tampón 2 y la centrifugación se realizó a 26000 rpm en el rotor SW27 durante 6 horas. Los gradientes fueron analizados en un fraccionador de gradientes. Se recogieron las fracciones conteniendo las subunidades y se les subió la concentración de $MgCl_2$ hasta 50 mM, centrifugándose en el rotor 60Ti a 150.000 x g durante toda la noche. El sedimento de las subunidades fué resuspendido en solución tampón 1, clarificadas y almacenadas en nitrógeno líquido.

Síntesis de proteínas en sistemas acelulares

La síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliurídílico se ha realizado como se ha descrito anteriormente (14). La mezcla de reacción contiene: 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 12,5 mM $MgCl_2$, 80 mM KCl, 4 mM creatin fosfato, 40 μ gr creatin-fosfoquinasa/ml, 250 μ gr de tRNA de levadura/ml, 10 mM 2-mercaptoetanol 1 mM ATP, 0,05 mM GTP, 13,1 μ M (^{14}C)fenilalanina (30,76 mC/mmol),

300 ugr/ml de ácido poliuridílico, 12 A₂₆₀/ml de ribosomas y la concentración óptima de la fracción del sobrenadante. La reacción se paró por adición de 1 ml de TCA 10% frío. Las muestras se calentaron a 90°C durante 10 minutos, se enfriaron a 0°C y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C.

Cuando se emplearon subunidades ribosómicas, en lugar de ribosomas 80S, se añadieron 5 A₂₆₀ de subunidades 40S/ml y 10 A₂₆₀ de subunidades 60S/ml.

Análisis del contenido de polisomas en esferoplastos

Se ha seguido el método descrito por Hartwell y McLaughlin (22). En los mutantes defectivos en los factores del sobrenadante, o en los enzimas de terminación o en las aminoacil-tRNA sintetetasas se estabilizarán los polisomas a la temperatura restrictiva. Mutantes defectivos en iniciación de síntesis de proteínas degradarían los polisomas en unos minutos. Del mismo modo mutantes defectivos en la síntesis de mRNA degradarían los polisomas, pero la vida media de éstos será de unos 20 minutos, con lo cual se diferenciarían claramente de mutantes de iniciación de la cadena peptídica (22).

Biosíntesis de macromoléculas en los mutantes ts

La síntesis de macromoléculas in vivo se ha estudiado siguiendo el método descrito por Hartwell (20). La síntesis de proteínas se ha medido por incorporación de (³H)leucina (concentración final = 0,30 mM; actividad específica final = 1,31 mC/mmol)

y la síntesis de ácidos nucleicos por incorporación de (^{14}C)adenina (concentración final = 0,11 mM; actividad específica final = 0,35 mC/mmol).

Ensayo de las aminoacil-tRNA sintetetasas

Se ha seguido el método descrito anteriormente (17). Se ha empleado como fuente de las aminoacil-tRNA sintetetasas la fracción del sobrenadante precipitada entre el 30% y el 70% con sulfato amónico (14).

Análisis genéticos

Los estudios genéticos se llevaron a cabo mediante los análisis de esporas al azar y disección de tetradas (23). Los diploides se formaron por mezclas, en placas con medio YEP, de cepas haploides de carácter sexual opuesto, incubándolas durante 24 horas a la temperatura indicada en cada caso concreto. Los diploides fueron aislados por selección de complementación en placas de medio mínimo. Los diploides aislados se incubaron en placas durante dos días a la temperatura indicada en cada caso concreto. Al final de este tiempo se transfirieron a un medio de esporulación y se incubaron durante 5 días a la temperatura indicada en cada caso concreto.

En el análisis de esporas al azar, una porción del cultivo esporulado se incubó con glusulasa a una dilución final de 1/40 (v/v) durante 10 minutos a la temperatura adecuada. Pasado ese tiempo, se agitó fuertemente la suspensión celular durante 5 minutos para disgregar las tetradas. Se hizo una dilución 10^{-5} y se plaquearon fracciones de 0,2 ml de esa dilución en placas con

medio YEP y se incubaron a la temperatura adecuada.

En el análisis de tetradas, después del tratamiento con glusulasa, se diseccionaron las tetradas por medio de un micro manipulador. Solamente se han estudiado tetradas completas.

La caracterización del fenotipo de resistencia o sensibilidad de las esporas haploides a los inhibidores en extractos acelulares de síntesis de proteínas, se desarrolló como sigue: se obtuvieron esferoplastos a partir de 80 ml de cultivo de cada espora (aproximadamente 3×10^7 células/ml) y después de la recuperación de los mismos, se incubaron con NaN_3 1 mM durante 20 minutos. Posteriormente se recogieron los esferoplastos y se lisaron. El lisado se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se colocó sobre un gradiente discontinuo de 3 ml de sacarosa al 40% en buffer 1 y 3 ml de sacarosa al 20% en buffer 1 y se centrifugaron a $150.000 \times g$ durante 12 horas en el rotor 65 de la ultracentrífuga Spinco. El sedimento de ribosomas se resuspendió en un volumen pequeño (aproximadamente 30 μl) de buffer 2 y se clarificó por centrifugación, guardándose los ribosomas en nitrógeno líquido.

RESULTADOS

Análisis bioquímico y genético de la resistencia a criptopleurina

Efecto de tubulosina y emetina en los mutantes resistentes a criptopleurina.- Criptopleurina, tubulosina y emetina han sido descritos como inhibidores de la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos por inhibir la translocación enzimática de la ca

dena peptídica del sitio ribosómico aceptor al sitio ribosómico donador (22,23). Nosotros disponíamos de un mutante (cepa CRY6) que presentaba resistencia a criptopleurina y se caracterizaba por tener sus ribosomas alterados (15). Consideramos de gran interés determinar si el mutante CRY6 presentaba resistencia cruzada a tubulosina y a emetina. Para ello estudiamos el efecto de tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de la cepa sensible Y166 y de la cepa mutante CRY6. Los resultados de dichos análisis se muestran en la Figura 1. Puede observarse que la síntesis de polifenilalanina llevada a cabo por los ribosomas de la cepa mutante CRY6 es menos inhibida que la llevada a cabo por los ribosomas de la cepa silvestre Y166. Este resultado pone de manifiesto la resistencia cruzada del mutante CRY6 a los inhibidores tubulosina y emetina.

Disponíamos de otros cinco mutantes resistentes a criptopleurina, aislados espontáneamente a partir de la cepa A364A. Dichos mutantes son alélicos del mutante CRY6 (ver apartado "análisis genético de las mutaciones de resistencia a criptopleurina"). Quisimos ver si esos mutantes presentaban también resistencia cruzada a la tubulosina y a la emetina. Los resultados de la Figura 2 ponen de manifiesto que si bien los cinco mutantes CRY2, CRY3, CRY4, CRY5 y CRY7 presentan igual resistencia a criptopleurina, poseen, sin embargo, una resistencia diferente a tubulosina y a emetina. Así podemos establecer dos grupos de mutantes de acuerdo a su grado de resistencia frente a tubulosina: a) mutantes de alta resistencia a tubulosina, equiparable a la resistencia del mutante CRY6, que serían las cepas mutantes CRY2, CRY5 y CRY7; b) mutantes de

débil resistencia a tubulosina, que serían las cepas CRY3 y CRY4.

Localización de la resistencia a tubulosina y a emetina.-

Hemos visto que los mutantes de resistencia a criptopleurina presentan resistencia cruzada a tubulosina y a emetina. Sabemos que la mutación de resistencia a criptopleurina en esos mutantes se expresa en la subunidad ribosómica menor 40S (15). Nuestro deseo era determinar si la resistencia a tubulosina y a emetina se localizaba a nivel de esa subunidad ribosómica. Para ello estudiamos el efecto de tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con subunidades ribosómicas obtenidas de las cepas silvestre y mutantes. Hemos elegido las cepas mutantes CRY6 y CRY4 como representantes de los dos grupos de mutantes con un nivel alto y bajo, respectivamente, de resistencia a tubulosina (ver apartado "Efecto de tubulosina y emetina en los mutantes resistentes a criptopleurina"). Los resultados del análisis con las subunidades ribosómicas se muestran en la Tabla 2. Puede observarse que la resistencia a criptopleurina, tubulosina y emetina va asociada a la presencia en el sistema de la subunidad ribosómica menor (40S) de las cepas mutantes, y es independiente del origen de la subunidad ribosómica mayor (60S). La débil resistencia a tubulosina en el caso de la cepa mutante CRY4 se debe a la poca resistencia que ya de por sí presentan los ribosomas de dicha cepa al alcaloide tubulosina (ver apartado "Efecto de tubulosina y emetina en los mutantes resistentes a criptopleurina").

Análisis genético de la resistencia a tubulosina y a emetina

El mutante CRY6, que es resistente a criptopleurina, presenta resistencia cruzada a tubulosina y a emetina. Ahora bien, no excluyen la posibilidad de que la resistencia a tubulosina y a emetina se deba a una mutación distinta de la que confiere resistencia a criptopleurina. Para estudiar tal posibilidad, analizamos el efecto de tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas obtenidos de las progenies de las esporas del análisis de tetradas del diploide heterocigótico CRY6 x A224A, siguiendo el método descrito en el apartado "Análisis genéticos". Analizamos 22 tetradas completas (resultados no mostrados) y en todas las tetradas las dos esporas que eran resistentes a criptopleurina pre

TABLA 2. Localización de la resistencia a tubulosina y a emetina

Subunidades		Síntesis de polifenilalanina (% control)		
60S	40S	criptopleurina $5,2 \times 10^{-6}$ M	tubulosina $1,08 \times 10^{-4}$ M	emetina 2×10^{-4} M
Y166	Y166	47	13	56
CRY4	CRY4	75	24	100
Y166	CRY4	74	20	90
CRY4	Y166	40	13	56
		criptopleurina 10^{-5} M	tubulosina 2×10^{-5} M	emetina 5×10^{-4} M
Y166	Y166	36	50	53
CRY6	CRY6	55	92	86
Y166	CRY6	55	88	48
CRY6	Y166	32	47	83

Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

Control = Síntesis en ausencia del inhibidor

sentaban resistencia a tubulosina y a emetina, y las dos esporas que eran sensibles a criptopleurina eran sensibles a tubulosina y a emetina. Estos resultados definitivamente sugieren que la mutación de resistencia a criptopleurina es la determinante de la resistencia a tubulosina y a emetina.

Análisis genético de las mutaciones de resistencia a cripto-
pleurina.- Los mutantes resistentes a criptopleurina deben su resistencia a una mutación en un solo gen nuclear, gen cry 1 (15). Hemos formado los diploides CRY2 x Y166, CRY3 x Y166, CRY4 x Y166, CRY5 x Y166, CRY6 x Y166 y CRY7 x Y166. Todos estos diploides fueuron sensibles a criptopleurina, a una concentración final de 5 μ gr/ml (concentración a la que crecen perfectamente las cepas haploides mutantes), lo que sugería que las mutaciones de resistencia a criptopleurina serían recesivas. Además, preparamos los diploides CRY2 x CRY6, CRY3 x CRY6, CRY4 x CRY6, CRY5 x CRY6 y CRY7 x CRY6, los cuales son resistentes a criptopleurina a una concentraución final de 5 μ gr/ml. Estos resultados nos permiten concluir que las mutaciones de resistencia a criptopleurina CRY2, CRY3, CRY4, CRY5, CRY6 y CRY7 son alélicas.

Los análisis bioquímicos pusieron de manifiesto la existencia de dos grupos de mutantes resistentes a criptopleurina, atendiendo a su nivel de resistencia a tubulosina (ver apartado "Efecuto de tubulosina y emetina en los mutantes resistentes a criptopleuurina"). Estos resultados, unidos a los análisis genéticos que ponen de manifiesto que todos los mutantes son alélicos, sugieren que la mutación de resistencia a criptopleurina en los distintos mutantes, si bien se localiza en el mismo gen, afectarán a distintas regio-

nes de ese cistrón.

Hemos deseado determinar la relación de dominancia y recesividad de ambos tipos de mutación de resistencia a criptopleurina: mutación de alta resistencia a tubulosina (representada por la cepa CRY6) y mutación de baja resistencia a tubulosina (representada por la cepa CRY4). Para ello estudiamos el efecto de tubulosina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico llevada a cabo con ribosomas de las cepas CRY4, CRY6 y del diploide CRY4 x CRY6. Los resultados se muestran en la Figura 3. Se puede observar que si bien los tres tipos de ribosomas presentan igual resistencia a criptopleurina, presentan en cambio, una resistencia diferente a tubulosina; concretamente, los ribosomas del diploide CRY4 x CRY6 presentan una resistencia intermedia de la de los ribosomas de las cepas CRY4 y CRY6. Por otra parte los ribosomas del diploide CRY4 x CRY6 presentan una resistencia a tubulosina similar a si en la mezcla de reacción hay alrededor del 50% de ribosomas de la cepa CRY4 y 50% de ribosomas de la cepa CRY6 (ver Figura 4). Así pues, la resistencia intermedia a tubulosina por parte de los ribosomas del diploide CRY4 x CRY6 puede explicarse por la existencia en el citoplasma del diploide CRY4 x CRY6 de dos tipos de ribosomas: ribosomas CRY4 (débilmente resistentes a tubulosina) y ribosomas CRY6 (altamente resistentes a tubulosina). Esto determinaría que ambas mutaciones, CRY6 y CRY4, son codominantes, expresándose ambos alelos mutantes.

Hemos visto que en el diploide heterocigótico CRY4 x CRY6 se expresan ambos alelos mutantes. ¿Qué ocurre en el diploide entre una cepa resistente y una sensible a criptopleurina?; ¿se expresan el alelo silvestre (sensible) y el alelo mutante (resistente)?

Hemos observado que los diploides CRY2 x Y166, CRY3 x Y166, CRY4 x Y166, CRY5 x Y166, CRY6 x Y166 y CRY7 x Y166, si bien son sensibles a criptopleurina, a bajas concentraciones de este inhibidor (pero concentraciones que son suficientes para inhibir totalmente el crecimiento de Y166) esos diploides crecen después de 72 horas. Por otro lado, hemos observado que los ribosomas del diploide CRY6 x Y166 presentan una resistencia a criptopleurina intermedia entre la de los ribosomas del diploide Y166 x Y168 (ambas cepas son sensibles) y el diploide CRY6 x CRY6 (ver Figura 5). Estos resultados serían explicables suponiendo que los alelos silvestre y mutante de resistencia a criptopleurina fuesen codominantes, expresándose ambos, por lo que el citoplasma del diploide CRY6 x Y166 contendría ribosomas sensibles y ribosomas resistentes a criptopleurina.

Análisis bioquímico y genético del mutante sensible a la temperatura JP322

El estudio de mutantes ts de la levadura parece muy prometedor para el conocimiento del proceso de la biosíntesis de proteínas y su regulación génica en la célula eucariótica. Por ello hemos emprendido el aislamiento de mutantes sensibles a la temperatura de la levadura Saccharomyces cerevisiae, con el objeto de estudiar aquellos mutantes que presentan alteraciones ts en la biosíntesis de proteínas.

Se dispone de una serie de procedimientos selectivos para el enriquecimiento de mutantes con una amplia variedad de fenotipos. El más familiar es el uso de la penicilina para el enriquecimiento de mutantes en bacterias (24). En S. cerevisiae, el tratamien

to con nistatina ha sido ampliamente usado como un método general para matar células en crecimiento, bajo condiciones donde las células mutantes deseadas no crecían (25).

El suicidio con tritio (la muerte de las células causada por la desintegración del tritio incorporado en sus componentes macromoleculares) es un procedimiento general de enriquecimiento, que ha sido utilizado para seleccionar mutantes sensibles a la temperatura y mutantes auxótrofos en E. coli (8) y para seleccionar mutantes auxótrofos de Aspergillus flavus (26). La ventaja del suicidio con tritio sobre otras técnicas de enriquecimiento de mutantes se basa en el hecho de que el procedimiento de selección puede ser bastante específico por el uso de diferentes precursores tritiados. En bacterias, por ejemplo, el marcaje con aminoácidos tritiados a alta temperatura constituye un procedimiento de selección más específico en favor de mutantes sensibles a la temperatura, defectivos en síntesis de proteínas (8), mientras que la incorporación de uridina tritiada selecciona más específicamente mutantes que tienen alteraciones sensibles a la temperatura en el metabolismo del RNA (27).

La técnica del suicidio con tritio consiste, básicamente, en someter un cultivo mutagenizado bajo condiciones donde las células no mutadas incorporen dosis letales de radioactividad. Mediante el uso de esta técnica emprendimos el aislamiento de mutantes sensibles a la temperatura (ts), obtenidos a partir de las cepas S288C y A224A de la levadura Saccharomyces cerevisiae, siguiendo el procedimiento descrito por Littlewood y Davies (28). Hemos aislado 400 mutantes ts, que hemos clasificado en distintas categorías atendiendo a su comportamiento fisiológico a la temperatura

ra no permisiva de 37°C (29). Estas categorías son:

a) Mutantes ts en los cuales la síntesis de proteínas y de RNA se bloquea a la vez e inmediatamente, a 37°C.

b) Mutantes ts en los cuales, a 37°C, la síntesis de RNA está inhibida preferentemente a la síntesis de proteínas.

c) Mutantes ts en los cuales, a 37°C, la síntesis de proteínas está inhibida preferentemente a la síntesis de RNA.

Entre los mutantes ts en los cuales, a 37°C, la síntesis de RNA se inhibe preferentemente a la síntesis de proteínas se podría englobar, a su vez, otros dos tipos de mutantes:

1) Mutantes ts en los cuales al inhibirse la síntesis de RNA, a 37°C, se inhibe rápidamente (20' a 30') la síntesis de proteínas. Estos mutantes ts podían deber su termosensibilidad a una alteración en la síntesis de mRNA, o a una alteración en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma.

2) Mutantes ts en los cuales al inhibirse la síntesis de RNA, a 37°C, la síntesis de proteínas se inhibe después de un período más largo (2-3 horas). Estos mutantes podrán deber su termosensibilidad a una alteración en el rRNA, o a una alteración en el procesamiento y maduración de dicho rRNA, que diese por resultado acumulación de partículas ribonucleoprotéicas precursoras de los ribosomas. Dicho tipo de mutantes ts serían de gran interés en el conocimiento de la biogénesis del ribosoma.

Nuestro objetivo primordial se centró en el estudio de mutantes ts que debieran su termosensibilidad a una alteración en el proceso de la biosíntesis de proteínas y, concretamente, al aná-

lisis del mutante ts JP322, obtenido de la cepa A224A. Este mutante ts se caracteriza porque su termosensibilidad se localiza en la síntesis de proteínas y más concretamente en su fracción del sobrenadante (29). El análisis genético determinó que la termosensibilidad se debía a dos o más mutaciones sensibles a la temperatura (29).

Hemos intentado separar y caracterizar las posibles mutaciones sensibles a la temperatura del mutante ts JP322. Para ello llevamos a cabo el análisis genético que se muestra en la Tabla 3. Todas las tetradas del cruce 5-III x 373/19 y 5-IV x 373/19 segregaron dos esporas sensibles y otras dos esporas no sensibles a la temperatura. Este resultado sugería que tanto la espora 5-III como la espora 5-IV debían su termosensibilidad a una mutación en un solo gen nuclear. Sin embargo, el diploide 5-III x 5-IV es sensible a la temperatura, esto es, las esporas ts 5-III y 5-IV no complementan y además las 19 tetradas analizadas de dicho cruce 5-III x 5-IV segregaron todas ellas 4 esporas sensibles a la temperatura. Estos resultados sugieren que el mutante ts original JP322 tiene más de dos mutaciones ts y las esporas 5-III y 5-IV, o bien llevan una sola mutación cada una de ellas y es común para ambas esporas; o bien alguna, o ambas esporas, llevan más de una mutación estando estrechamente ligadas entre sí, por lo que se necesitaría el análisis de más tetradas para separar esas mutaciones estrechamente ligadas, siendo una de esas mutaciones estrechamente ligadas común para las esporas ts⁻5-III y 5-IV.

Hemos estudiado la capacidad de las esporas ts⁻5-III y 5-IV para sintetizar proteínas y ácidos nucleicos a las temperaturas permisiva (26°C) y restrictiva (37°C), encontrando que ambas es-

poras ts^-5-III y $5-IV$ paran su síntesis de proteínas inmediata y totalmente a $37^\circ C$ inhibiéndose 20 minutos después la síntesis de RNA, debido al fuerte control estricto que existe en la levadura (Figura 6). Estos resultados sugieren que la termosensibilidad de las esporas $5-III$ y $5-IV$ se localiza en el proceso de la síntesis de proteínas.

TABLA 3. Análisis genético de los mutantes sensibles a la temperatura

Diploide	Segregación de tetradas				
	$ts^- : ts^+$				
	0:4	1:3	2:2	3:1	4:0
5-I x TR1	0	3	12	0	0
5-II x TR1	0	0	0	0	14
5-III x 373/19	0	0	17	0	0
5-IV x 373/19	0	0	15	0	0
5-III x 5-IV	14	0	0	0	0

Las cepas 5-I, 5-II, 5-III y 5-IV proceden de las cuatro ascoporas de una tetrada resultante de la esporulación del diploide JP322 (ts^-) x SR17 (ts^+). El fenotipo es: 5-I (ts^-), 5-II (ts^+), 5-III (ts^-) y 5-IV (ts^-).

Hemos analizado, también, el perfil de polisomas de la cepa silvestre A224A y de las esporas ts^-5-III y $5-IV$, encontrando que los perfiles de polisomas obtenidos de la cepa silvestre y de las esporas mutantes $5-III$ y $5-IV$ permanecen inalterados (resultados no mostrados), si bien en el caso de las esporas ts la síntesis de proteínas está bloqueada (Figura 6) y sin embargo existen po-

lisomas, lo que sugiere que la inhibición de la síntesis de proteínas en las esporas ts⁻5-III y 5-IV se deberá a una alteración en la etapa de polimerización de la cadena peptídica. Descartamos la posibilidad de que la termosensibilidad de las esporas ts⁻5-III y 5-IV se deba a una alteración en la etapa de iniciación de la cadena peptídica, porque en este caso habría desaparecido el perfil de polisomas. Excluimos, también, que la termosensibilidad se localiza en la etapa de terminación de la cadena peptídica, porque en este caso, si bien se mantendría el perfil de polisomas de las esporas ts⁻5-III y 5-IV, a 37°C, habría un aumento considerable de los polisomas de mayor coeficiente de sedimentación, que no encontramos.

En la Figura 7 se estudian las cinéticas de inactivación de las fracciones del sobrenadante de las esporas 5-III y 5-IV y de la cepa silvestre A224A por preincubación a 37°C durante distintos tiempos (Figura 6A) o por preincubación a distintas temperaturas durante un tiempo definido (Figura 6B). Puede observarse que la fracción del sobrenadante de la espora 5-III se inactiva más rápidamente que la de la cepa silvestre A224A. La fracción del sobrenadante de la espora 5-IV se inactiva prácticamente igual que la de la cepa silvestre.

En la Figura 6C se presentan los resultados del estudio de la formación de (¹⁴C)fenilalanil-tRNA llevada a cabo por las fracciones del sobrenadante de la cepa silvestre A224A y de la espora ts⁻5-III, previa preincubación a 37°C durante distintos tiempos. Puede observarse que fracciones del sobrenadante se inactivan del mismo modo, lo que descarta que la termosensibilidad de la espora 5-III se deba a poseer una fenilalanil-tRNA sinte-

tasa alterada.

Hemos estudiado la termosensibilidad de las aminoacil-tRNA sintetetasas de las esporas ts^- 5-III y 5-IV pertenecientes a la tetrada nº 5 del cruce JP322 x SR17, que segregó dos esporas ts^+ 5-I y 5-II y dos esporas ts^- 5-III y 5-IV. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se puede ver que de todas las aminoacil-tRNA sintetetasas analizadas, sólo la prolil-tRNA sintetasa de las esporas ts^- 5-III y 5-IV y la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III son más sensibles a la temperatura que las aminoacil-tRNA sintetetasas de la cepa silvestre A224A. Análisis posteriores no mostrados pusieron de manifiesto que la prolil-tRNA sintetasa de la cepa silvestre A224A y de las esporas ts^- 5-III y 5-IV se inactivan prácticamente igual por preincubación a 37°C.

En la Figura 8 se muestran los resultados del estudio de la inactivación por preincubación a 37°C, a distintos tiempos, de las valil-tRNA sintetetasas de la cepa silvestre A224A y de las esporas ts^- 5-III y 5-IV. Se puede observar que la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III se inactiva mucho más rápidamente que la de la espora ts^- 5-IV y la de la cepa silvestre A224A.

Hemos estudiado la inactivación de la valil-tRNA sintetasa de las esporas ts^- pertenecientes a una tetrada del cruce 5-III x 373/19 que segregó dos esporas ts^+ 1-I y 1-III y dos esporas ts^- 1-II y 1-IV. Los resultados se muestran en la Figura 9. Puede observarse que si bien la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III se inactiva mucho más rápidamente que la valil-tRNA sintetasa de la cepa silvestre A224A, la valil-tRNA sintetasa de las

TABLE 4. Formación de aminoacil-tRNAs. Inactivación por preincubación a 37°C de las fracciones del sobrenadante de la cepa silvestre A224A, de la esporsas 5-III y de la esporsas 5-IV

Aminoacil-tRNA sintetasa	% Control (b)											
	cepa A224A						esporsas 5-III					
	(a) 5'	10'	15'	30'	5'	10'	15'	30'	5'	10'	15'	30'
Treonina	98	85			96	73			112	98		
Alanina	100	95			122	60			96	84		
Lisina	100	97			100	100			100	100		
Tirosina	89	65			75	66			79	60		
Glicina	63	54			64	40			80	65		
Metionina	88	81			83	72			89	91		
Triptófano			65	38			56	34			41	
Arginina			99	100			100	93			99	113
Leucina			91	90			92	85			97	100
Isoleucina			96	128			141	115			111	133
Histidina			96				88	81			86	92
Prolina	50	23			13	3			41	13		
Valina			110	104			103	59			103	112

(a) Tiempo (minutos) de preincubación a 37°C.

(b) % Control = Formación de aminoacil-tRNA sin preincubación

esporas ts^- 1-II y 1-IV derivadas del cruce entre la espora ts^- 5-III y la cepa haploide ts^+ 373/19, no muestra sensibilidad a la temperatura, inactivándose de una manera similar a la valil-tRNA sintetasa de la cepa silvestre A224A.

Puesto que la tetrada 1 del cruce 5-III x 373/19 segregó dos esporas ts^+ 1-I y 1-III y dos esporas ts^- 1-II y 1-IV, y la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III era sensible a la temperatura, era de esperar que la valil-tRNA sintetasa de las esporas ts^- 1-II y 1-IV del cruce 5-III x 373/19, mostrasen una termosensibilidad en su valil-tRNA sintetasa equivalente a la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III. Sin embargo, tal hecho no es así como se demuestra en la Figura 9. Este resultado nos hizo pensar si la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III era debido a las características genéticas de dicha espora más que a poseer una mutación termosensible que afectase a su valil-tRNA sintetasa y que hubiera recibido de la cepa progenitora ts^- JP322 a través del cruce JP322 x SR17.

En la Figura 10 estudiamos la inactivación, por preincubación a 37°C, de las valil-tRNA sintetasas de la cepa silvestre A224A, de la cepa ts^- JP322 (mutante original), de la espora ts^- 5-III (del cruce JP312 x SR17) y de la cepa ts^+ SR17. Puede observarse que solamente la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III es termosensible, mientras que las valil-tRNA sintetasas de la cepa silvestre A224A, de la cepa ts^+ SR17 y del mutante ts^- original JP322 no presentan sensibilidad a la temperatura. Estos resultados sugieren que la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III no se debe a una alteración en la cepa origi-

nal ts⁻ JP322 de la cual la recibiría a través del cruce JP322 x SR17.

DISCUSION

Análisis bioquímico y genético de la resistencia a criptopleurina

Criptopleurina, tubulosina y emetina han sido descritos como inhibidores de la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos por inhibir la translocación enzimática de la cadena peptídica del sitio ribosómico aceptor al sitio ribosómico donador (22,23). Disponíamos de una serie de mutantes resistentes a criptopleurina y consideramos interesante determinar la posible resistencia cruzada de esos mutantes a tubulosina y a emetina.

Los análisis bioquímicos pusieron de manifiesto que los mutantes resistentes a criptopleurina presentan resistencia cruzada a tubulosina y a emetina (Figura 1) aunque, si bien todos los mutantes presentan el mismo grado de resistencia a criptopleurina, presentan, en cambio, un grado diferente de resistencia a tubulosina, de modo que podemos dividir a los mutantes resistentes a criptopleurina en dos grupos: (a) mutantes de alta resistencia a tubulosina como son CRY2, CRY5, CRY6 y CRY7, y (b) mutantes de baja resistencia a tubulosina como CRY3 y CRY4.

Los análisis bioquímicos pusieron también de manifiesto que la resistencia a tubulosina y a emetina se localiza en la subunidad ribosómica menor (40S) (Tabla 2) que es la subunidad ribosó-mica donde se expresa la resistencia a criptopleurina (15).

Aunque los mutantes resistentes a criptopleurina presentan resistencia cruzada a tubulosina y a emetina, expresándose ambas

resistencias en la subunidad ribosómica 40S, y aunque se había determinado que la mutación de resistencia a criptopleurina se debía a una mutación en un solo gen nuclear, gen *cry 1* (15), podía ocurrir que la resistencia cruzada a tubulosina y a emetina se debiese a otra mutación distinta de la que determina resistencia a criptopleurina. Para ver tal posibilidad estudiamos el efecto de tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de la progenie de las esporas del cruce CRY6 x A224A y encontramos, en las 22 tetradas analizadas, que las dos esporas resistentes a criptopleurina eran resistentes a tubulosina y a emetina, y las dos esporas sensibles a criptopleurina eran sensibles a tubulosina y a emetina lo que sugiere que el fenotipo de resistencia a tubulosina y a emetina se debe a la mutación que confiere resistencia a criptopleurina.

Los análisis genéticos determinaron que todos los mutantes resistentes a criptopleurina son alélicos (ver apartado "Análisis genético de las mutaciones de resistencia a criptopleurina"). Sin embargo, hemos dividido a esos mutantes en dos grupos atendiendo a su grado de resistencia a tubulosina, lo que sugiere que esos mutantes habrían surgido de dos mutaciones distintas dentro del mismo gen, el gen *cry 1*, de modo que cada una de esas mutaciones definiría un grupo de mutantes.

Hemos estudiado las relaciones de dominancia o recesividad entre las mutaciones de alta y baja resistencia a tubulosina (ver apartado "Análisis genético de las mutaciones de resistencia a criptopleurina") y hemos encontrado que ambos alelos mutantes se expresan en una célula diploide, de modo que dicho diploide contendría

ribosomas de alta resistencia a tubulosina y ribosomas de baja resistencia a tubulosina.

¿Qué ocurre cuando en una célula diploide hay un alelo sensible y un alelo resistente a criptopleurina?. Hemos visto que esos diploides no crecen a altas concentraciones de criptopleurina y sin embargo crecen lentamente a concentraciones del inhibidor bajas, pero suficientes para inhibir el crecimiento de las cepas sensibles a criptopleurina. Además, hemos visto que los ribosomas de un diploide entre una cepa resistente y una sensible a criptopleurina presentan una resistencia a criptopleurina que es intermedia entre la de los ribosomas de un diploide entre dos cepas resistentes a criptopleurina y un diploide entre dos cepas sensibles a criptopleurina (Figura 5). Estos resultados in vivo e in vitro pueden explicarse suponiendo que un diploide entre una cepa resistente y una sensible a criptopleurina presenta dos tipos de ribosomas: ribosomas resistentes y ribosomas sensibles a criptopleurina. Esto determinaría que en ese diploide se expresarían el alelo sensible y el alelo resistente a criptopleurina con lo que los polímeros de dicho diploide estarían formados por ribosomas sensibles y resistentes a criptopleurina. El hecho de que ese diploide no crezca a alta concentración de criptopleurina y crezca lentamente a baja concentración de ese inhibidor, podría explicarse en términos de la ecuación:



A altas concentraciones de criptopleurina el equilibrio se desplazaría hacia la derecha; los ribosomas sensibles serían bloqueados y éstos bloquearían a los ribosomas resistentes que están leyendo el mensajero detrás de ellos. El resultado final es la

inhibición total de la síntesis de proteínas y por lo mismo la inhibición del crecimiento.

A bajas concentraciones de criptopleurina el equilibrio estaría desplazado hacia la izquierda; los ribosomas sensibles leerían el mensajero lentamente y el resultado final sería un descenso de la velocidad de síntesis de proteínas pero no su inhibición total, de ahí el lento crecimiento a bajas concentraciones del inhibidor.

Análisis bioquímico y genético del mutante sensible a la temperatura JP322

Mediante la técnica del suicidio con tritio hemos aislado 400 mutantes sensibles a la temperatura (ts) a partir de las cepas S288C y A224A de la levadura Saccharomyces cerevisiae (29). Nuestro objetivo primordial se centró en el análisis de mutantes ts con una alteración en el proceso de biosíntesis de proteínas y, concretamente, en el estudio del mutante ts JP322, aislado de la cepa A224A, que se caracteriza porque su termosensibilidad se localiza en la fracción del sobrenadante (29). El análisis genético del mutante ts⁻JP322 determinó que la termosensibilidad se debía a dos o más mutaciones sensibles a la temperatura (29). Hemos intentado separar y caracterizar las posibles mutaciones del mutante JP322. Para ello, hemos realizado el análisis genético (Tabla 3) de una tetrada del cruce JP322 x SR17 que segregó 3 esporas ts⁻ (5-I, 5-III y 5-IV) y una espora ts⁺ (5-II). Cada una de estas esporas fue cruzada con una cepa haploide no sensible a la temperatura (ver Tabla 3) y analizamos la segregación de los cuatro cruces: 5-I x TR1, 5-II x TR1, 5-III x 373/19 y 5-IV x 373/19. Sólo en el caso de los cruces 5-III x 373/19 y 5-IV x 373/19

todas las tetradas segregaron dos esporas ts^- y dos esporas ts^+ . Este resultado sugería que la espora 5-III llevaba una mutación ts^- , al igual que la espora 5-IV. Sin embargo, ambas esporas no complementaban y en el cruce 5-III x 5-IV todas las tetradas segregaron 4 esporas ts^- . Este resultado nos indujo a pensar que, o bien, las esporas 5-III y 5-IV tenían la misma y única mutación ts^- en común; o bien alguna espora (o ambas) llevaban más de una mutación pero estrechamente ligadas entre sí y alguna de esas mutaciones fuese común para las esporas 5-III y 5-IV.

Los análisis bioquímicos de las esporas 5-III y 5-IV pusieron de manifiesto que la termosensibilidad de ambas se localizaba en la síntesis de proteínas (Figura 6). La síntesis de proteínas in vitro mediante los extractos acelulares de las esporas 5-III y 5-IV pusieron de manifiesto que la fracción del sobrenadante de la espora 5-III es sensible a la temperatura (Figura 7) y que esa termosensibilidad no se debe a tener alterada la fenilalanil-tRNA sintetasa (Figura 7). La fracción del sobrenadante de la espora 5-IV no presenta termosensibilidad (Figura 7).

El análisis de las aminoacil-tRNA sintetasas (Tabla 4) puso de manifiesto que la espora 5-III tenía su valil-tRNA sintetasa alterada, siendo sensible a la temperatura, mientras que en la esp^ora 5-IV, todas las aminoacil-tRNA sintetasas probadas son normales (Tabla 4). Aunque los resultados presentados en la Tabla 4 sugieren que la proil-tRNA sintetasa puede estar alterada, estudios posteriores más detallados (no mostrados) determinaron que dicha sintetasa no está alterada.

Hemos estudiado la valil-tRNA sintetasa de las esporas ts^-

1-II y 1-IV pertenecientes a una tetrada del cruce 5-III x 373/19 que segregó dos esporas ts^+ 1-I y 1-III y dos esporas ts^- 1-II y 1-IV (Figura 9). La valil-tRNA sintetasa de esas esporas ts^- 1-II y 1-IV no son sensibles a la temperatura (Figura 9). Este resultado nos indujo a pensar si la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la espora 5-III fuera debido a características propias de dicha espora más que a poseer una mutación termosensible que afectase a su valil-tRNA sintetasa y que hubiera recibido de la cepa mutante original ts^- JP322, a través del cruce JP322 x SR17. Para ello estudiamos la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la cepa silvestre A224A, cepa ts^- JP322 (mutante original), espora ts^- 5-III (del cruce JP322 x SR17) y cepa ts^+ SR17, encontrando que la única valil-tRNA sintetasa termosensible es la de la espora ts^- 5-III (Figura 10), lo que sugiere que la termosensibilidad de la valil-tRNA sintetasa de la espora ts^- 5-III no se debe a una mutación ts^- en la cepa original JP322 (mutante original) de la cual la recibiría a través del cruce JP322 x SR17.

La termosensibilidad de la espora ts^- 5-IV no radica ni en su fracción del sobrenadante (Figura 7) ni en las aminoacil-tRNA sintetasas analizadas (Tabla 4).

Por todo lo anteriormente indicado concluimos que es necesario un estudio bioquímico y genético más profundo para determinar la naturaleza bioquímica y genética de la termosensibilidad del mutante ts^- JP322.

BIBLIOGRAFIA

1. Nomura, M. (1970) *Bacteriol.Rev.* 34, 228-277.
2. Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M. y Mizushima, S. (1969) *Science* 165, 85-86.
3. Sparling, P.F. (1970) *Science* 167, 56-58.
4. Apirion, D. y Schlessinger, D. (1968) *J.Bacteriol.* 96, 768-776
5. Tanaka, K., Teraoka, H., Tamaki, M., Otaka, E. y Osawa, S. (1968) *Science* 162, 576-578.
6. Bernardi, A., Loeder, P. (1970) *J.Biol.Chem.* 245, 4263-4268.
7. De Wilde, M., Cabezón, T., Herzog, A. y Bollen, A. (1977) *Biochimie* 59, 125-140.
8. Tocchini-Valentini, G.P. y Matoccia, E. (1968) *Proc.Nat.Acad. Sci.* 61, 146-151.
9. Kuwano, M., Ono, M., Yamamoto, M., Endo, H., Kamiya, T. y Horí, K. (1973) *Nature New Biol.* 244, 107-109.
10. Lupker, J.H., Verschoor, G.J., De Roij, F.W.M., Rorosch, A. y Bosch, L. (1974) *Proc.Nat.Acad.Sci.* 71, 460-463.
11. Jiménez, A., Littlewood, B. y Davies, J. (1972) In "Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes", pp. 292-306 (E. Muñoz, F.García-Ferrándiz y D. Vázquez, eds.), Elsevier (Amsterdam).
12. Mortimer, R.K. y Hawthorne, D.C. (1966) *Genetics* 53, 165-173.
13. Schindler, D., Grant, P. y Davies, J. (1974) *Nature* 248, 535-536.
14. Jiménez, A., Sánchez, L. y Vázquez, D. (1975) *Biochim.Biophys. Acta* 383, 427-434.
15. Grant, P., Sánchez, L. y Jiménez, A. (1974) *J.Bacteriol.* 120, 1308-1314.

16. Jiménez, A., Sánchez, L. y Vázquez, D. (1975) FEBS Letters 60, 66-70.
17. Hartwell, L. y McLaughlin, C. (1968) Proc.Nat.Acad.Sci. 59, 422-428.
18. McLaughlin, C. y Hartwell, C. (1969) Genetics 61, 557-566.
19. Hartwell, L. (1970) Ann.Rev.Genetics 4, 373-396.
20. Hartwell, L. (1967) J.Bacteriol. 93, 1662-1670.
21. Battaner, E. y Vázquez, D. (1971) Biochim.Biophys.Acta 254, 316-330.
22. Barbacid, M., Fresno, M. y Vázquez, D. (1975) J.Antibiotics 28, 453-462.
23. Carrasco, L., Jiménez, A. y Vázquez, D. (1976) Eur.J.Biochem. 64, 1-5.
24. Davies, B.E. (1948) J.Ame.Chem.Soc. 70, 4267.
25. Snow, R. (1966) Nature 211, 206-207.
26. Donkersloot, J.A. y Mateles, R.J. (1968) J.Bacteriol. 96, 1551-1556.
27. Reid, P. (1971) Biochim.Biophys.Res.Commun. 44, 737-744.
28. Littlewood, B. y Davies, J. (1973) Mutation Research 17, 315-318.
29. Sánchez, L. (1976) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias.

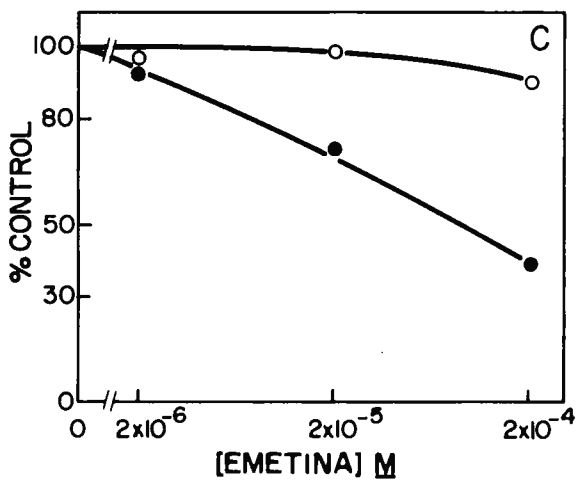
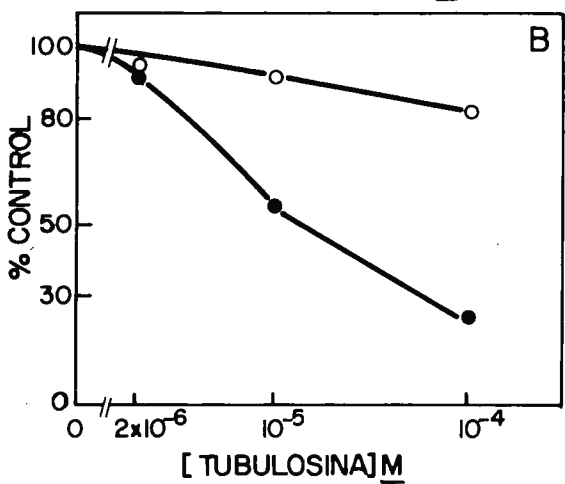
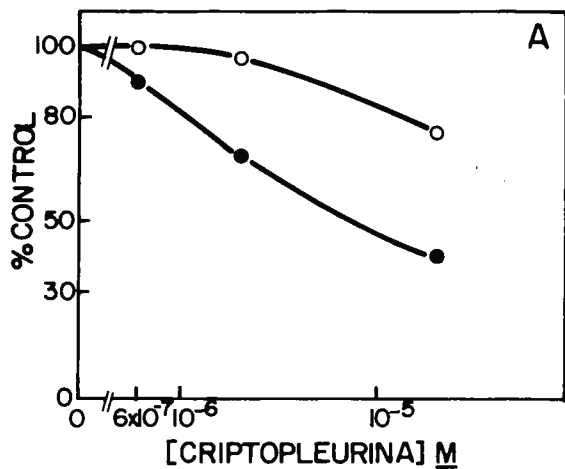


Figura 1.- Efecto de criptopleurina, tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de las cepas silvestre Y166 (●—●) y mutante CRY6 (○—○). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

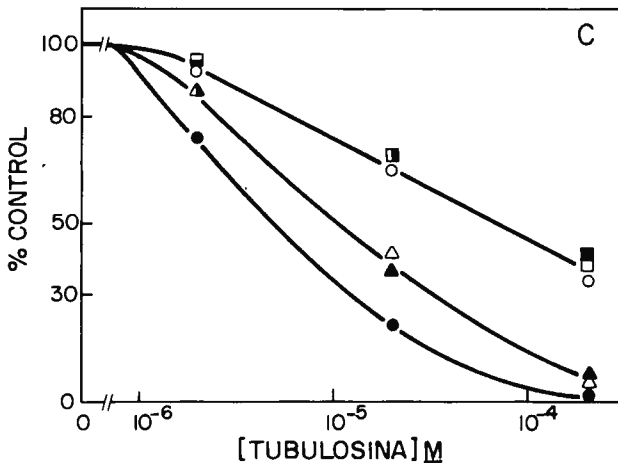
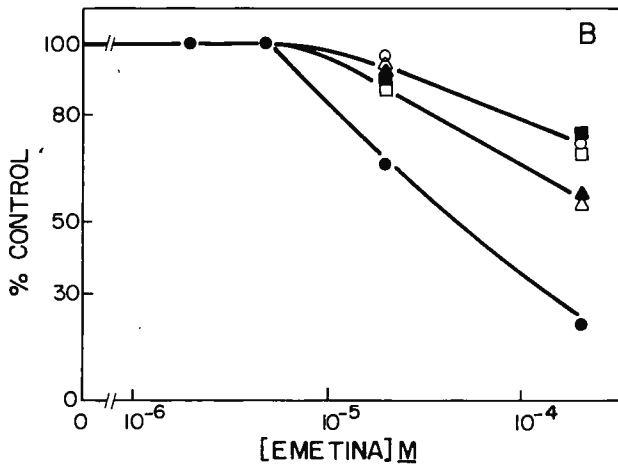
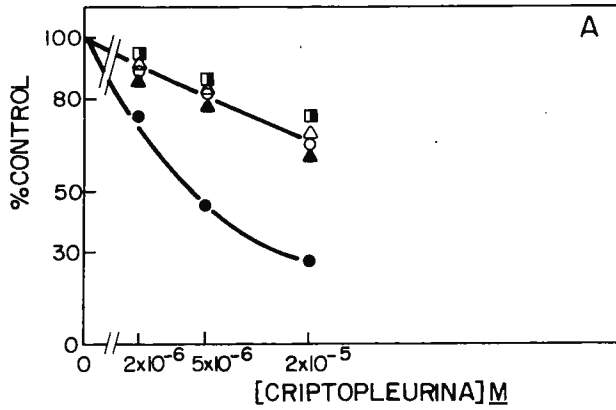


Figura 2.- Efecto de criptopleurina, tubulosina y emetina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de las cepas silvestre A364A (●—●) y las cepas mutantes CRY2 (○—○), CRY3 (▲—▲), CRY4 (△—△), CRY5 (■—■) y CRY7 (□—□). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

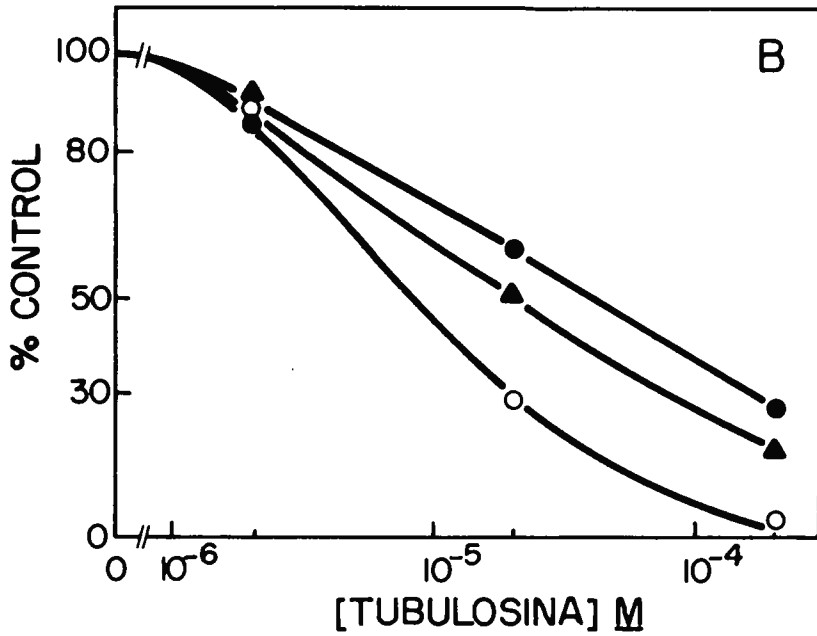
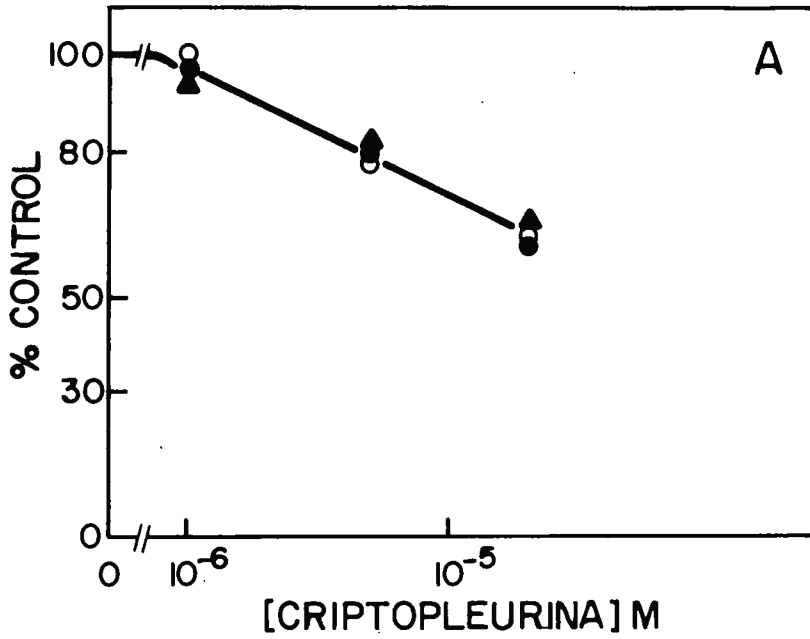


Figura 3.- Efecto de criptopleurina y tubulosina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico, llevada a cabo por ribosomas de las cepas haploides CRY6 (●—●) y CRY4 (○—○) y de la cepa diploide CRY6 x CRY4 (▲—▲). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

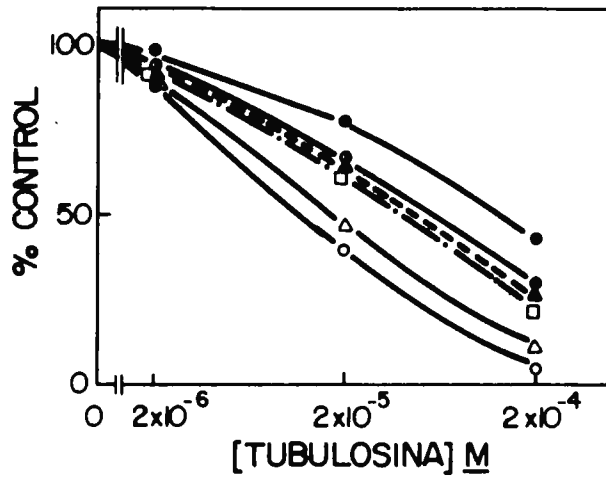


Figura 4.- Efecto de tubulosina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de la cepa diploide CRY6 x CRY4 y con mezclas de ribosomas de las cepas haploides CRY6 y CRY4. Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

(●—●) Ribosomas de CRY6

(○—○) Ribosomas de CRY4

(▲—▲) Ribosomas de CRY6 x CRY4

(○—○) 75% de ribosomas CRY6 y 25 de ribosomas CRY4

(□—□) 50% de ribosomas CRY6 y 50% de ribosomas CRY4

(△—△) 25% de ribosomas CRY6 y 75% de ribosomas CRY4

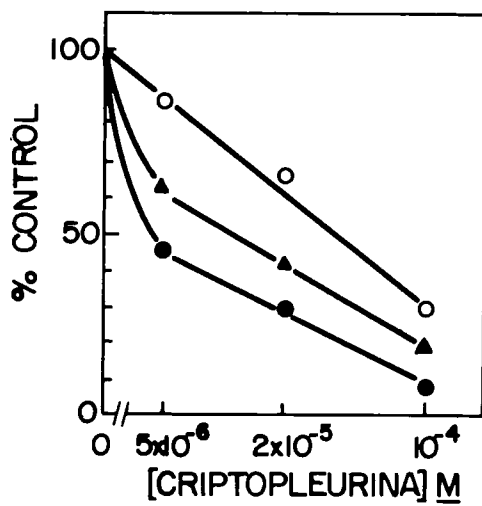


Figura 5.- Efecto de criptopleurina en la síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico con ribosomas de las cepas diploides Y166 x Y168 (●—●), CRY6 x Y168 (▲—▲) y CRY6 x CRY6 (○—○). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

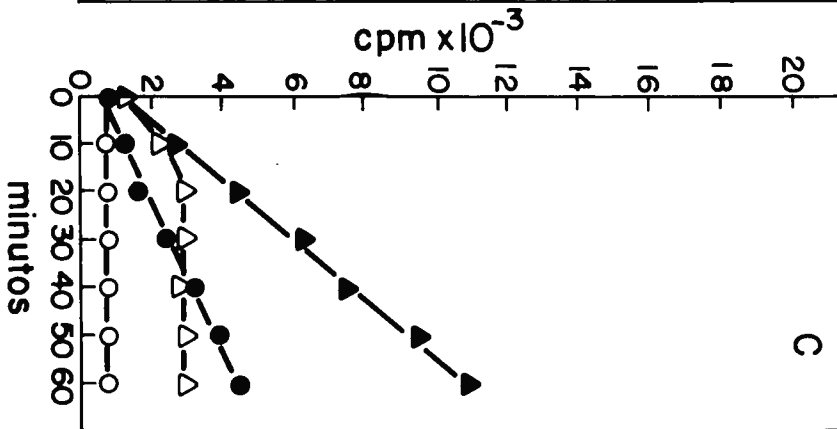
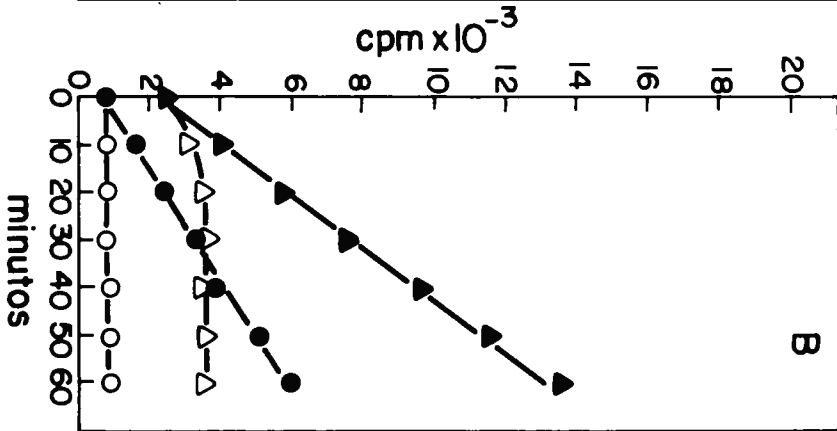
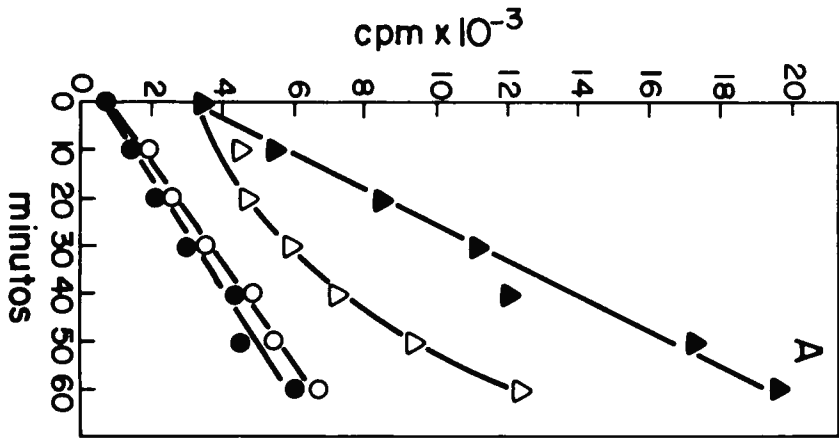


Figura 6.- Incorporación in vivo de (^{14}C)adenina y (^3H)leucina por las cepas silvestre A224A (A) y mutantes ts^- 5-III (B) y 5-IV (C) a 26°C y 37°C. Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

- (●—●) Incorporación de (^3H)leucina a 26°C
- (○—○) Incorporación de (^3H)leucina a 37°C
- (▲—▲) Incorporación de (^{14}C)adenina a 26°C
- (△—△) Incorporación de (^{14}C)adenina a 37°C

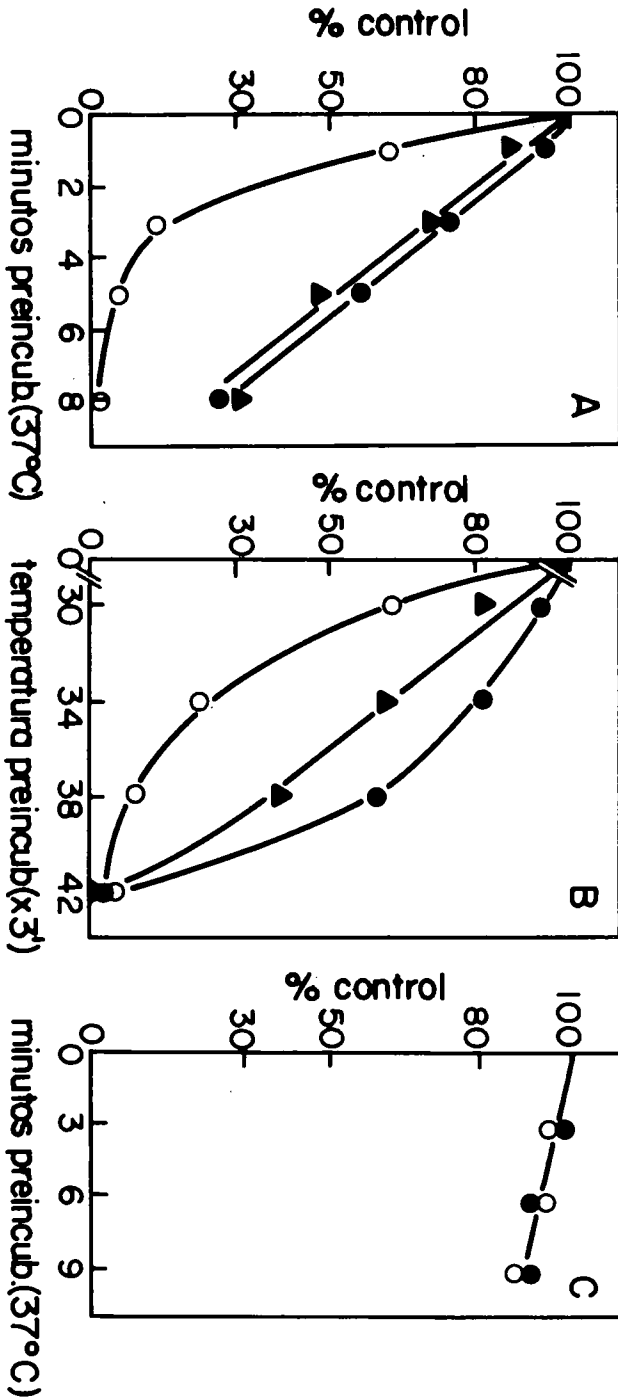


Figura 7.- Inactivación de las fracciones del sobrenadante de las cepas silvestre A224A (●—●) y mutantes ts^- 5-III (○—○) y 5-IV (▲—▲). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

- (A) Síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico
- (B) Síntesis de polifenilalanina dirigida por ácido poliuridílico
- (C) Formación de (^{14}C)fenilalanil-tRNA

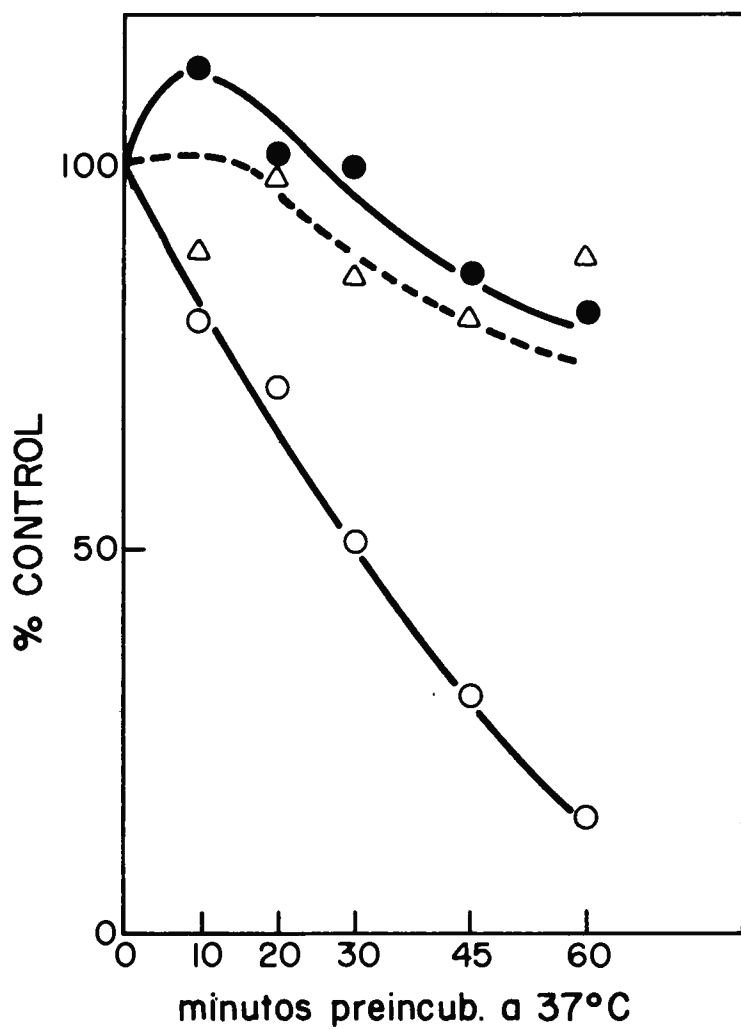


Figura 8.- Formación de (^3H)valil-tRNA. Inactivación, por preincubación a 37°C, de las fracciones del sobrenadante de las cepas silvestre A224A (●—●), espora ts^- 5-III (○—○) y espora ts^- 5-IV (Δ---Δ). Las condiciones se describen en Materiales y Méto-

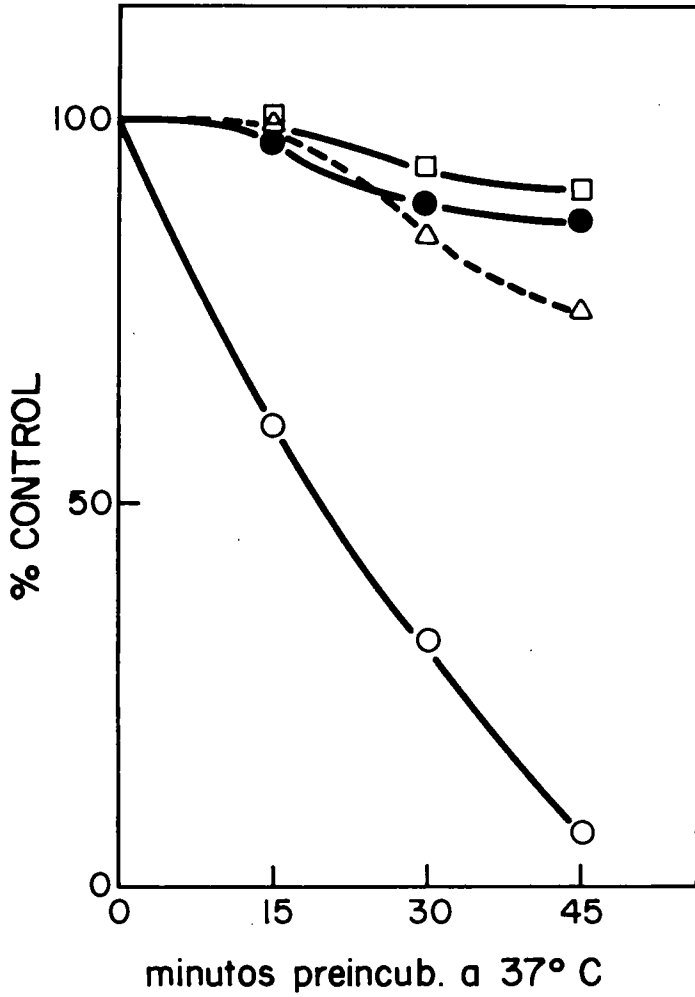


Figura 9.- Formación de (^3H)valil-tRNA. Inactivación, por preincubación a 37°C , de las fracciones del sobrenadante de las cepas silvestre A224A ($\bullet\text{---}\bullet$), espora ts^- 5-III ($\text{O}\text{---}\text{O}$), espora ts^- 1-II ($\Delta\text{---}\Delta$) (del cruce 5-III x 373/19) y de la espora ts^- 1-IV ($\square\text{---}\square$) (del cruce 5-III x 373/19). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.

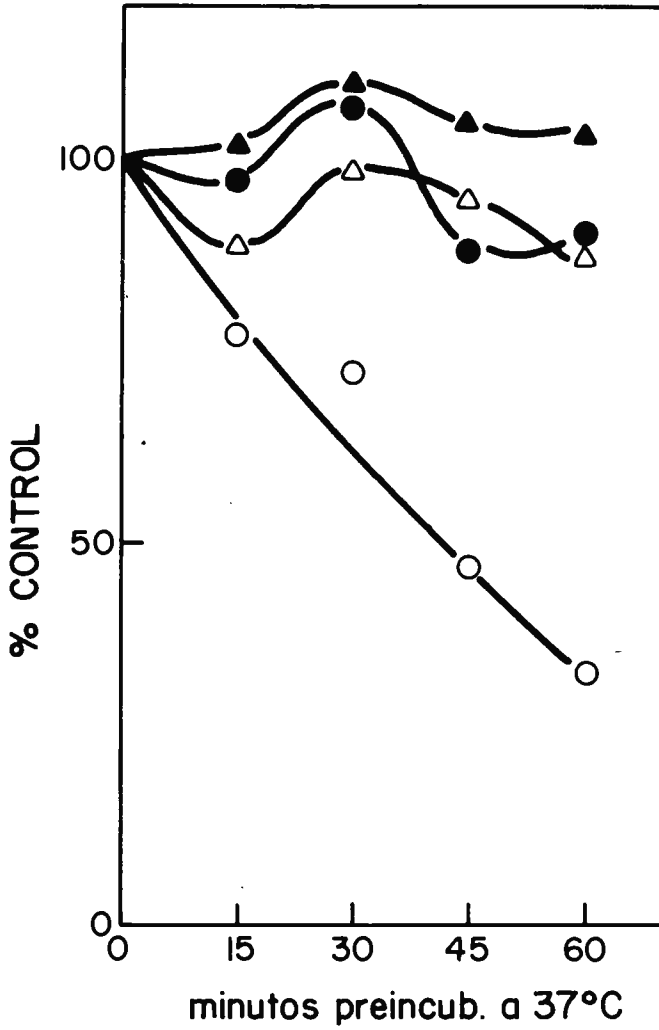


Figura 10.÷ Formación de (^3H)valil-tRNA. Inactivación de las fracciones del sobrenadante de las cepas silvestre A224A (●—●), de la cepa ts^+ SR17 (Δ — Δ), de la cepa ts^- original JP322 ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) y de la espora ts^- 5-III (○—○). Las condiciones se describen en Materiales y Métodos.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso* / A. Fierro
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua*/A. Mulet
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla*/F. Velasco
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados*/J.M. Santiuste
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura*/José Luis Vicent López
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos*/José Alemán Vega
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos*/José Plá Carrera
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935-1973)* / F. Torres Monreal
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular*/J.M. Drake Moyano
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra*/Carlos del Valle Rodriguez
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos*/Carlos Solís Santos
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.*/ Gumersindo Ruíz Bravo
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta—Adrenérgicos.*/ José Salvador Serrano Molina
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial.*/Miguel Durán—Lóriga
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información.*/ Antonio Pascual Acosta
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* /Vicente Zugasti Arbizu
(Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias.*/ Julio A. Alonso
(Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastian Franco.
(Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
- 34.— *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus.* / Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).

