

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 (Castelló, 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.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria 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.

Fundación Juan March



FJM-Uni 203-Lop
Clonación de genes de *Saccharomyces c*
López Calderón, Isabel.
1031762



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Isabel López Calderón

Clonación de genes de
Saccharomyces cerevisiae
implicados en la reparación
y la recombinación

FJM
Uni-
203
Lop
203

203 Clonación de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la reparación y la recombinación/Isabel López Calderón

Fundación Juan March

Serie Universitaria

203



Isabel López Calderón

Clonación de genes de
Saccharomyces cerevisiae
implicados en la reparación
y la recombinación



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de Extranjero, 1980, individual.
Departamento de BIOLOGIA Y CIENCIAS AGRARIAS.
Centro de trabajo: Department of Biophysics and
Medical Physics,
University of California,
Berkeley, California (USA)*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M-20.926-1983

I.S.B.N.: 84-7075-278-2

Impresión: Ediciones Peninsular, Tomelloso, 37. Madrid-26.

Fundación Juan March (Madrid)

Quisiera expresar mi agradecimiento al Prof. R.K. Mortimer y al resto de los compañeros de Berkeley por la estupenda acogida que me dispensaron y por su inestimable ayuda durante estos dos años.

Asimismo, quisiera agradecer a la Fundación Juan March su apoyo al proyecto y el interés demostrado en todo momento por el mismo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMEN	7
INTRODUCCION	9
<u>La reparación de ADN dañado</u>	9
<u>Los sistemas de reparación de S. cerevisiae</u>	10
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS Y DISCUSION	15
<u>Aislamiento de plásmidos que complementan mutaciones rad</u>	15
<u>Cuantificación de la complementación de las mutaciones rad por los respectivos plásmidos en las cepas transformadas</u>	17
1) Sensibilidad a rayos X	17
2) Esporulación y viabilidad de esporas	24
<u>Mapas de restricción</u>	24
<u>Transformación de las cepas Rad⁻ con los plásmidos aislados</u>	25
<u>Integración de los plásmidos en el genomio</u>	27
Integración orientada hacia el locus <u>RAD55</u>	27
Integración mediante el vector [YIp5]	28
A) Estudio de las cepas INT50	29
B) Estudio de las cepas INT51	30
C) Estudio de las cepas INT54	30
<u>Aislamiento de un gen que codifica un supresor.</u>	34
Las mutaciones <u>rad50-1</u> y <u>trp1-289</u> son de tipo ámbar	35
El plásmido aislado suprime sólo mutaciones ámbar	35
Posibles orígenes del supresor	38
Hipótesis A	38
Hipótesis B	39
Hipótesis C	39
Deleción del fragmento <u>BamHI-BamII</u>	40
Subclonación de fragmentos de [YEp13-SUP- Δ Bam] en [YRp7]	40
Integración en el genomio	43
Localización en el genomio del gen SUP	44
Posibles causas de la alta frecuencia del [YEp13-SUP]	45
BIBLIOGRAFIA	47

RESUMEN

Este trabajo ha consistido básicamente en la clonación de algunos de los genes de la levadura Saccharomyces cerevisiae implicados en la reparación de daños del ADN. Así, se han aislado y caracterizado plásmidos que complementan a las mutaciones rad50-1, rad51-1, rad54-3 y rad55-3. Mediante estudios genéticos se ha determinado la presencia de los genes RAD51, RAD54 y RAD55 en los plásmidos respectivos. Sin embargo, dos tipos distintos de plásmidos, ninguno de los cuales contiene el gen RAD50, complementan a la mutación rad50-1: uno de ellos contiene un gen capaz de suplir metabólicamente a RAD50; el otro contiene un gen, SUP, que determina un supresor de mutaciones de tipo ámbar. Se ha comprobado que este supresor es tan débil que sólo se manifiesta cuando las células contienen múltiples copias de SUP.

INTRODUCCION

La reparación de ADN dañado

De todos es conocido que la información genética que permite que una célula funcione está contenida en su ADN. Este ADN está sometido continuamente a alteraciones deletéreas producidas espontáneamente o inducidas por agentes químicos y radiaciones. Para contrarrestar estos efectos y asegurar el mantenimiento de su identidad genética, todos los organismos disponen de sistemas de reparación. Así y todo, los daños causados al ADN, aunque atenuados por la reparación, son responsables de la mayoría de las mutaciones y de parte de las muertes celulares.

Ultimamente, el estudio de los sistemas de reparación ha suscitado un interés especial, sobre todo cuando se ha hecho evidente que la mayoría de los daños reparables pueden resultar mutagénicos y/o carcinogénicos. Esta correspondencia ha sido apoyada por el descubrimiento de que deficiencias en la reparación de fotoproductos del ADN tienen correlación con la alta incidencia de cáncer inducido por luz solar en la enfermedad hereditaria conocida como Xeroderma pigmentosum (Cleaver y Bootsma, 1975). Otras enfermedades hereditarias, cuya característica común es una predisposición al desarrollo de cáncer, tales como ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, retinoblastoma y progeria, también parecen estar relacionadas con la reparación defectuosa del ADN (Cleaver, 1980; Friedberg et al.; 1979; Setlow, 1978).

En bacterias se conoce con bastante detalle la enzimología de los distintos procesos reparadores gracias a los estudios realizados con mutantes y a la caracterización in vitro de las enzimas implicadas en estos procesos (Hanawalt et al., 1979; Lehman y Karran, 1981; Lindahl, 1982). En células

de mamíferos el estudio de estos fenómenos está mucho más retrasado debido, entre otras cosas, a la mayor complejidad estructural y funcional de la célula eucariótica. Sin embargo, los modelos, metodología e interpretaciones de los estudios hechos en bacterias están siendo aplicados al estudio de los sistemas eucarióticos con bastante éxito. Aprovechando esta circunstancia nos planteamos la posibilidad de estudiar los sistemas de reparación en un eucarionte de fácil manipulación como es la levadura Saccharomyces cerevisiae, pensando que los resultados obtenidos con este organismo serían de interés y podrían extrapolarse a organismos superiores.

Los sistemas de reparación de S. cerevisiae

La existencia en S. cerevisiae de sistemas de reparación de lesiones potencialmente letales ha sido puesta en evidencia mediante el aislamiento de numerosos mutantes que son más sensibles que el tipo silvestre a varios mutágenos tales como luz ultravioleta, rayos X o metano-sulfonato de metilo (para revisiones recientes, consultar Haynes y Kunz, 1981; Lawrence, 1982; Lemontt, 1980). Por complementación se ha determinado que estos mutantes definen más de 50 genes distintos, de los cuales sólo uno parece estar implicado en la fotorreactivación de dímeros de pirimidina (Resnick, 1969). El hecho de que todos los demás participen en la reparación oscura de todo tipo de daños es indicativo de la gran complejidad que estos procesos deben tener.

Estudios realizados con mutantes dobles (Brendel y Haynes, 1973; Game and Mortimer, 1974) han puesto de manifiesto que estos genes pueden ser clasificados en tres grupos que se cree representan a otras tantas vías de reparación.

1. Reparación por escisión

Llevada a cabo por los genes del grupo de RAD1. Consiste en la eliminación del daño producido antes de que el ADN sea replicado. Para ello se realizan incisiones a ambos

lados de la zona defectuosa y, tomando como modelo la otra cadena de ADN, se reproduce la secuencia original.

2. Reparación posreplicativa tendente a error

Controlada por los genes del grupo de RAD6, actúa cuando la zona dañada es replicada antes de poder ser reparada. El ADN nuevo contiene huecos que se presume son el resultado de la no replicación de las zonas dañadas. Posteriormente estos huecos son rellenados tomando como modelo la cadena complementaria. Con frecuencia este tipo de reparación genera mutaciones.

3. Reparación por recombinación

Está controlada por los genes del grupo de RAD52 y parece ser la vía por la que se reparan roturas de cadena simple y doble.

Este último grupo parece estar implicado en otros importantes procesos celulares según se deduce del hecho de que mutantes en estos genes presentan fenotipos complejos que incluyen anormalidades en mitosis, meiosis, recombinación, conversión génica e incluso en la transmisión normal de los cromosomas en la mitosis. Sin embargo, se conoce muy poco de la función de estos genes a nivel molecular.

Nuestro trabajo ha consistido en el aislamiento de algunos de los genes implicados en la reparación por recombinación, concretamente RAD50, RAD51, RAD54 y RAD55 seguida de una caracterización tanto in vivo como in vitro de los plásmidos que los llevan. Los resultados obtenidos pueden constituir la base para posteriores estudios en los que se podrá determinar los correspondientes productos génicos y la función concreta que estas proteínas desempeñan en la célula. Adicionalmente, se ha llegado a aislar y estudiar en profundidad un gen que codifica un supresor de mutaciones ámbar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levaduras: Todas las cepas de S. cerevisiae utilizadas aparecen con sus respectivos genotipos en la Tabla I; para su construcción se utilizaron las técnicas genéticas descritas en Sherman et al. (1977).

Estirpes de E. coli: HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969), proporcionada por A.J. Clark; JA300 (Tschumper y Carbon, 1980), proporcionada por J. Carbon; DB6507 (un derivado pyrF de HB101), proporcionada por D. Botstein; RR1 (Nasmyth y Reed, 1980), proporcionada por K. Nasmyth.

Plásmidos: YEp13 (Broach et al., 1979) es un derivado del plásmido pBR322 de E. coli que contiene el gen LEU2 de S. cerevisiae y un fragmento del círculo de 2 μ de S. cerevisiae que contiene el origen de replicación. El plásmido pBR322 confiere resistencia a ampicilina y a tetraciclina.

YRp7 (Tschumper y Carbon, 1980) es también un derivado de pBR322 que contiene el gen TRP1 y el origen de replicación ARS1 de S. cerevisiae; fué proporcionado por D. Botstein.

YIp5 (Struhl et al., 1979) está formado por pBR322 y el gen URA3 de S. cerevisiae. Este plásmido no se puede replicar autonomamente en una célula de levadura pero puede transformarla por integración en el genomio. Fué proporcionada por D. Botstein.

Medios de cultivos y métodos genéticos: Los de levaduras están descritos en Sherman et al. (1977). Las pruebas de auxotrofía se llevaron a cabo en medios completos a los que les faltaba el requerimiento en cuestión.

Los medios para E. coli y los correspondientes métodos genéticos están descritos en Davis et al. (1980); donde se indica, se añadió ampicilina y/o tetraciclina a una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$ y 15 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Tabla I. Cepas de S. cerevisiae utilizadas

Cepa	Genotipo	Origen
XS131-5A	<u>MATa rad50-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289</u> <u>his3-Δ1 lys1-1</u>	D. Schild
XS133-3B	<u>MATa rad51-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289</u> <u>his3-Δ1</u>	D. Schild
XL4-22C	<u>MATa rad54-3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289</u>	** Este trabajo
XL5-3C	<u>MATa rad55-3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289</u> <u>his3-Δ1 his5</u>	Este trabajo
XL39-5A	<u>MATa rad55-3 leu2 ura3 (ura4) met8 trp1-289</u> <u>aro1D his3 (his5)</u>	Este trabajo
DBY947	<u>MATa ura3-52 ade2-101</u>	D. Botstein
XS132-1A	<u>MATa ura3-52 rad50-1 his3 leu2 trp1-289</u>	D. Schild
X3127-2A	<u>MATa lys7 leu2 leu1 trp1 pet17 ura3 thr1</u> <u>arg4 his5 ade5.gall</u>	***YGSC
X4034-22C	<u>MATa ade1 gall leu2 trp1 ura3 cdc14 leu1</u> <u>his6 met14 asp5 pet17</u>	YGSC
X4035-7A	<u>MATa ade1 trp1 ura3 leu1 arg4 his6 met14</u> <u>pet8 aro7 gall2</u>	YGSC
XS134-4B	<u>MATa ura3-52 rad51-1 leu2 his3 trp1</u>	D. Schild
X4004-3A	<u>MATa ura3 lys5 trp1 met2</u>	YGSC
3971-5B	* <u>MATa trp1a met8a ade5-7a aro1Da ilv1o can1o</u> <u>lys1-1o ura3 ura4o leu2u gall10 SUC mal</u>	YGSC
XL16-4B	<u>MATa rad50-1 leu2 trp1 lys1 ilv1 aro1D ura3</u> <u>(ura4) (his3)</u>	Este trabajo
XL53	<u>MATa/MATa [rad50-1 leu2 trp1 lys1 ilv1 ura3</u> <u>aro1D (ura4) (his3)]</u>	Este trabajo
AB320	<u>MATa/MATa [HO trp5-2 ura3-1 (ural-1) met4-1</u> <u>ade2-1 leu2-1 lys2-1 can1-100]</u>	B. Hall
MT193/3b	<u>MATa SUQ5 ade2-1 his5-2 lys1-1 trp5-48</u> <u>can1-100 ura3-1 leu1 [PSI]</u>	B. Cox
XL80-3A	<u>MATa rad50-1 leu2-1 trp1-289 ura3-52</u> <u>his3-Δ1 ade2-102 gal2 gall10</u>	Este trabajo
P49	<u>MATa lys2 gal2</u>	YGSC
DC04	<u>MATa leu2 ade1 cir^o</u>	YGSC
1453-3A	<u>MATa leu2 his4 suc MAL2 MEL1 CUP</u>	YGSC

* a = ámbar, o = ocre, u = ópalo

** Para la construcción de las cepas se siguieron los métodos descritos por Sherman et al. (1977)

*** YGSC = Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA., EE.UU.

Enzimas: Las enzimas de restricción y la ligasa de T4 fueron suministradas por New England Biolabs y Bethesda Research Laboratories; se utilizaron según se indica en los respectivos prospectos.

Extracción y purificación de plásmidos: Para extraer plásmidos de levaduras se utilizó el método descrito por Nasmyth y Reed (1980).

Para extraer plásmidos de E. coli se utilizaron dos métodos distintos: el de Holmes y Quigley (1981) para preparaciones rápidas; el de Birnboim y Doly (1979), cuando se deseaban grandes cantidades de plásmidos. Tras la extracción el ADN plasmídico fue purificado mediante un gradiente de densidad en CsCl-bromuro de etidio, según se describe en Davis et al. (1980).

Transformación: La transformación de levaduras se llevó a cabo según se describe en Hinnen et al. (1978) con pequeñas modificaciones.

Las estirpes de E. coli fueron transformadas según se describe en Davis et al. (1980).

Tratamiento con rayos X: La fuente de rayos X y el tratamiento usual están descritos en Game y Mortimer (1974); la dosis usada fue de 237,5 rad/seg y la dosis estandard fue de 57 Krad.

Electroforesis: Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa (1%) según el método descrito en Davis et al. (1980); el tampón usado fue Tris-borato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de plásmidos que complementan mutaciones *rad*

Los plásmidos utilizados proceden de un conjunto de estirpes de *E. coli*, cada una de las cuales contiene el vector [YEp13] (Broach *et al.*, 1979) con distintas inserciones de ADN de *S. cerevisiae*. Estas estirpes nos fueron cedidas por el Dr. K. Nasmyth; su obtención está descrita en Nasmyth y Tatchell (1980) y se resume en la Figura 1.

ADN plasmídico fue extraído de la colección de estirpes de *E. coli* según el método de Birnbaum y Doly (1979) y purificado mediante sedimentación en gradiente de CsCl-bromuro de etidio (Davis *et al.*, 1980). Estos plásmidos fueron utilizados para transformar, según el método de Hinnen *et al.* (1980), las cepas de *S. cerevisiae* XS131-5A, XS133-3B, XL4-22C y XL5-3C, cuyos genotipos se describen en la Tabla I. Se seleccionaron aquellos transformantes que eran Leu⁺ y, a continuación, se probó la sensibilidad a rayos X de estas colonias Leu⁺. En los casos de las cepas portadoras de rad50-1, rad51-1 y rad54-3, alrededor del 0,1% de las colonias Leu⁺ resultaron ser además Rad⁺ (Tabla II); en el caso de la cepa rad55-3 esta proporción fue del 1%. Si se considera que el genomio de *S. cerevisiae*, con sus 123.500 Kb (Lauer *et al.*, 1977) tiene capacidad suficiente para unos 10.000 genes y que cada plásmido contiene una media de de 5 a 7 Kb de ADN de levadura, podría esperarse que un determinado gen apareciera con una frecuencia del 0,05%. No hemos encontrado ninguna explicación sencilla para justificar la alta frecuencia encontrada en el caso de rad55.

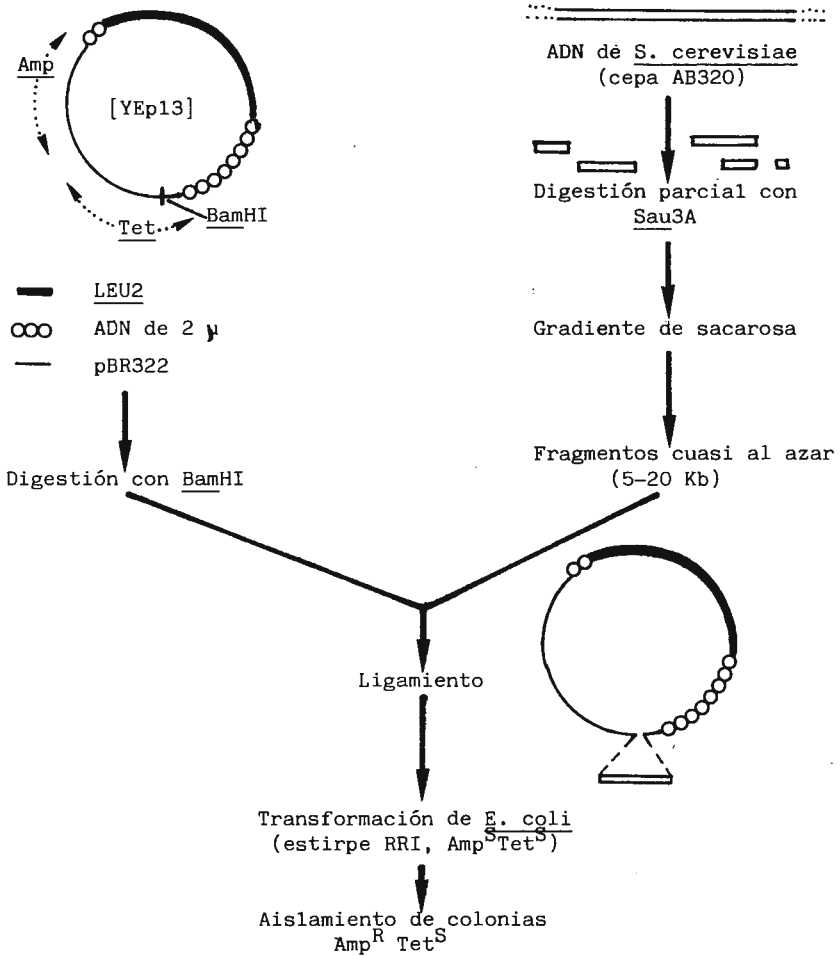


Figura 1: Obtención de la colección de estirpes de E. coli portadoras de plásmidos que contienen fragmentos del genomio de S. cerevisiae.

Tabla II. Proporción de Rad⁺/Rad⁻ encontrada entre los transformantes Leu⁺.

<u>cepa recipiente</u>	<u>Leu⁺ Rad⁺/ Leu⁺</u>	<u>Frecuencia</u>
XS131-5A	2/1.850	1/1.000
XS133-3B	6/3.300	1,8/1.000
XL4-22C	2/4.200	0,5/1.000
XL5-3C	14/1.400	10/1.000

Cuantificación de la complementación de las mutaciones rad por los respectivos plásmidos en las cepas transformadas

Con estos experimentos se pretendió determinar hasta qué punto los plásmidos eran capaces de restaurar los distintos fenotipos silvestres en las cepas que los llevaban. Concretamente, se estudiaron cuantitativamente la sensibilidad a rayos X y la esporulación y viabilidad de esporas.

1. Sensibilidad a rayos X

Se construyó una serie de cepas haploides y diploides homocigóticas Rad⁻ que llevaban o carecían de los plásmidos correspondientes. Estas cepas fueron irradiadas con distintas dosis de rayos X; las curvas de supervivencia resultantes se compararon con las de cepas similares pero Rad⁺(Figuras 2, 3 y 4).

En todos los casos se observó que la presencia de los plásmidos mejora la resistencia a rayos X de las cepas que los llevan, si bien el grado de mejora depende de cada plásmido en particular. El hecho de que en ningún caso el grado de resistencia supere al del tipo silvestre puede interpretarse como que, una vez alcanzado un cierto nivel de reparación de lesiones, un exceso de producto de los genes RAD no es capaz de mejorar ese nivel.

Figura 2. Curva de supervivencia a rayos X de distintas cepas haploides (cuadros superiores) y diploides (cuadros inferiores); derecha, cepas con o sin el plásmido [YEp13-RAD50-210B]; izquierda, cepas con o sin el plásmido [YEp13-RAD51-23]; (X) cepas silvestres Rad⁺; (O) cepas Rad⁻ sin plásmido; (●) cepas Rad⁻ con plásmido; (--) supervivencia de las cepas con plásmido calculada suponiendo que en el momento de la irradiación, todas las células tenían plásmido.

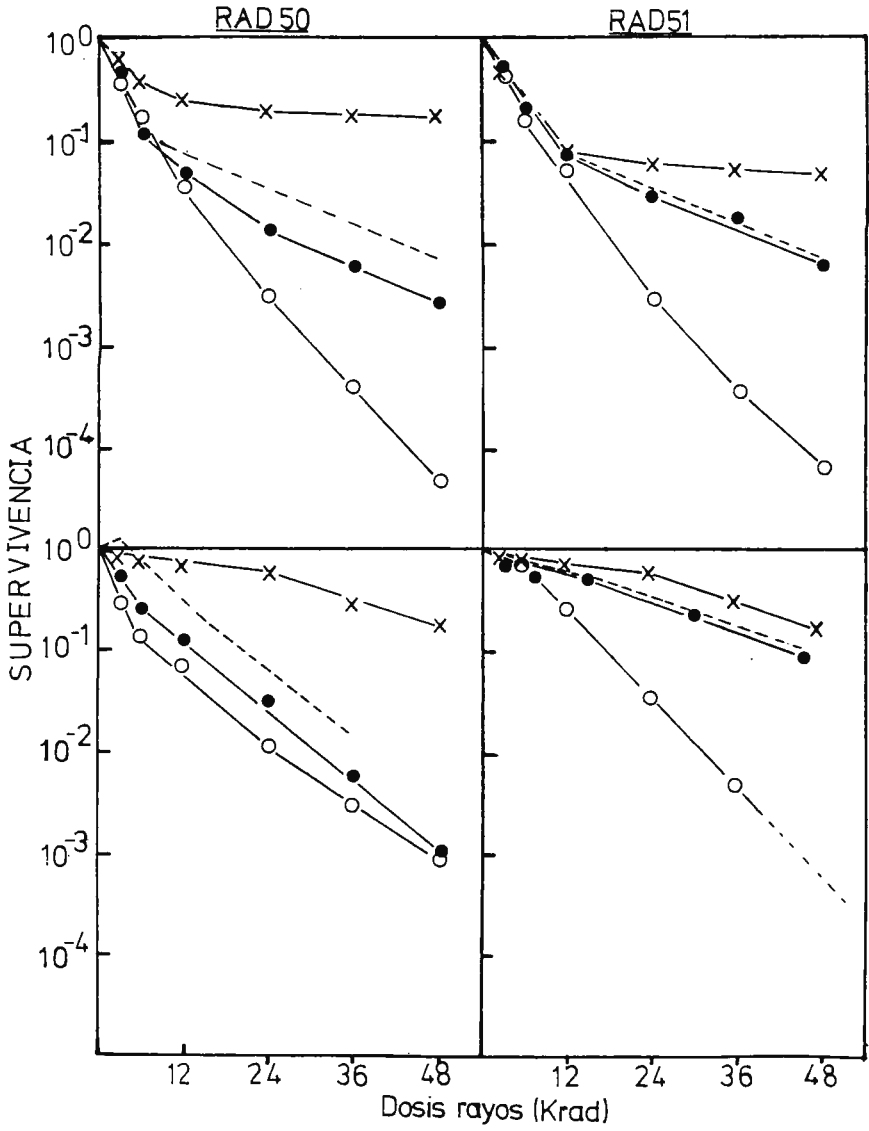


Figura 3. Curva de supervivencia a rayos X de cepas con o sin el plásmido [YEpl3-RAD54-216A]. Dado que la mutación rad54-3 es termosensible, los experimentos se llevaron a cabo a 23°C (izquierda) y a 36°C (derecha). Símbolos igual que en la Fig. 2.

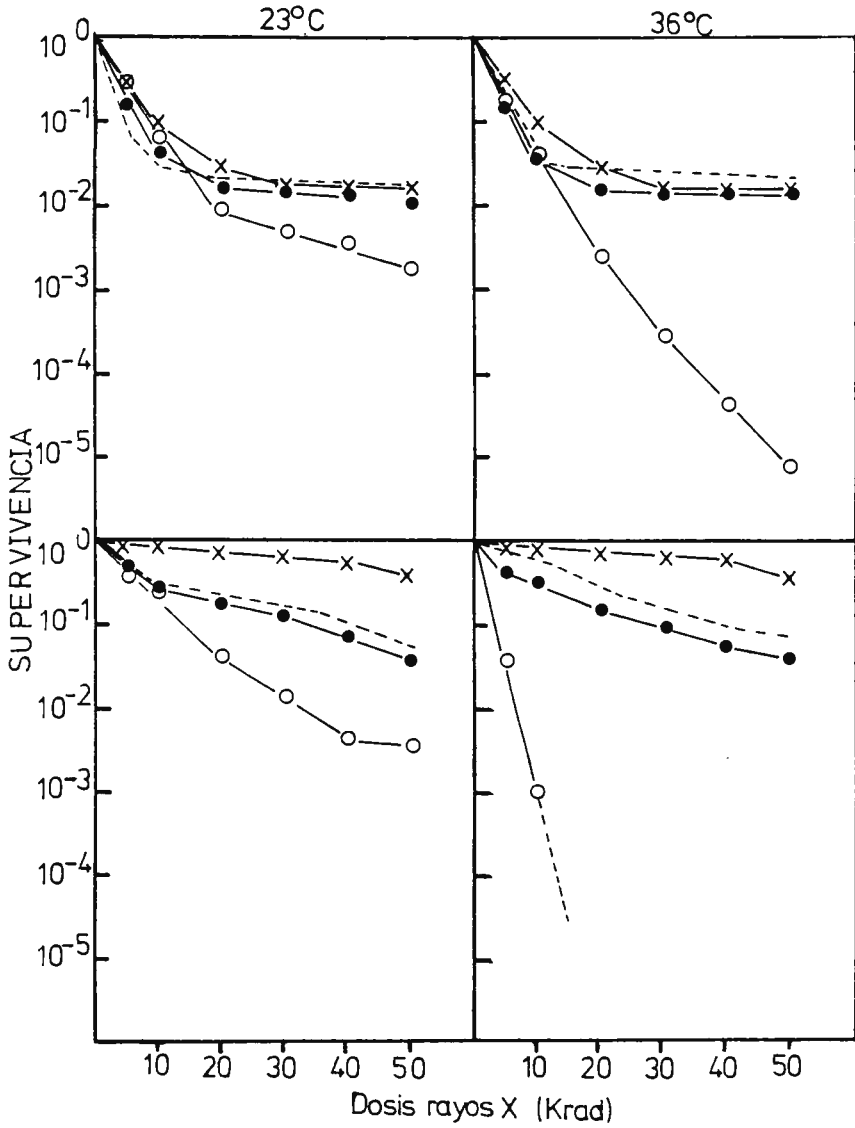
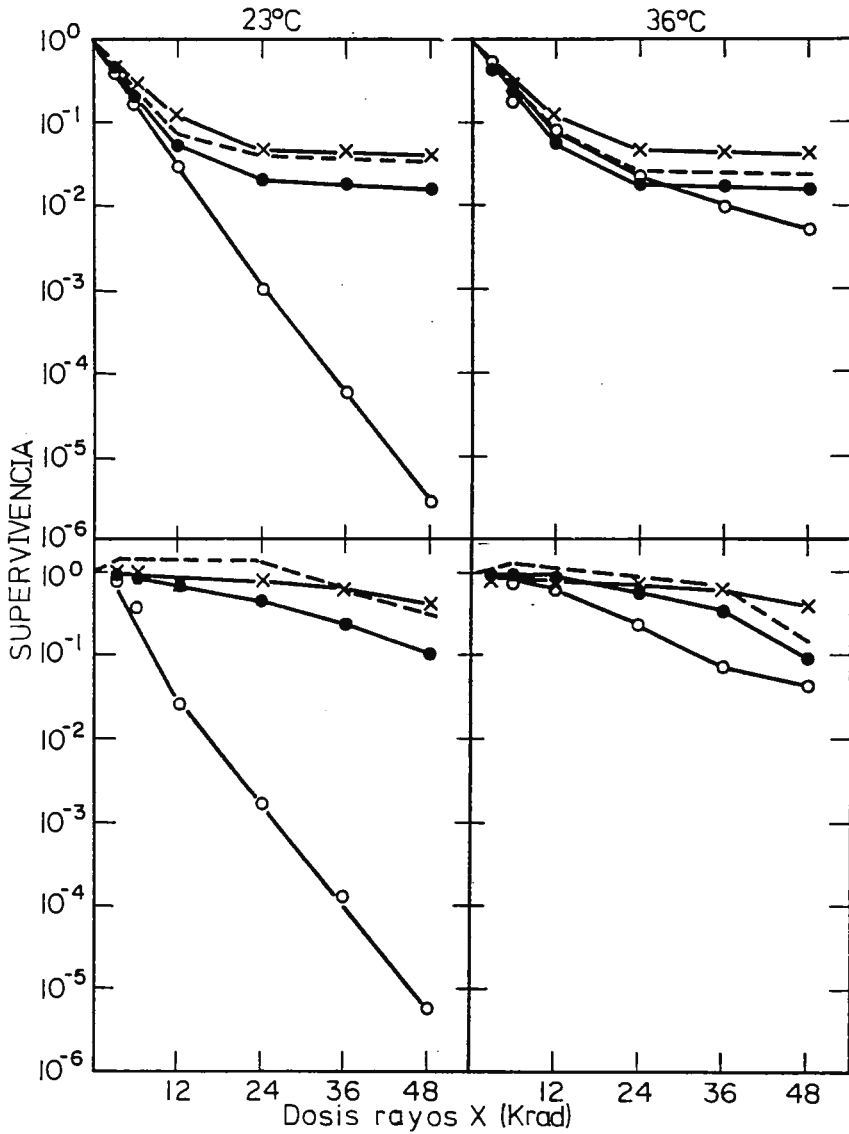


Figura 4. Curva de supervivencia a rayos X de cepas con o sin el plásmido [YEp13-RAD55-13C]. Dado que la mutación rad55-3 es criosensible, los experimentos se llevaron a cabo a 36°C (derecha) y a 23°C (izquierda). Símbolos igual que en la Fig.2.



2. Esporulaci3n y viabilidad de esporas

Una característica fenotípica de algunos diploides Rad^- es la mala esporulaci3n y/o la baja viabilidad de las esporas resultantes (Strike, 1978). Con el fin de determinar si la presencia de los plásmidos afecta o no a estos fenotipos, se construyeron y esporularon cepas diploides de las siguientes clases:

rad [RAD]/ rad, diploide homocig3tica Rad^- con plásmido
rad / rad, diploide homocig3tica Rad^- sin plásmido
rad [RAD]/ RAD, diploide heterocig3tica con plásmido
rad / RAD, diploide heterocig3tica sin plásmido

Los resultados expuestos en la Tabla III indican que la presencia de plásmido no mejora los defectos en la esporulaci3n. Este efecto puede ser explicado, al menos parcialmente, por el hecho de que durante la meiosis, se pierden los plásmidos con una frecuencia tal que sólo del 20 al 60% de las esporas resultantes los conservan, es decir son Leu^+

Tabla III. Efecto de la presencia de los plásmidos en la esporulaci3n y en la viabilidad de las esporas.

	<u>rad50</u>		<u>rad51</u>		<u>rad54</u>		<u>rad55</u>	
	% ESP.	% VIAB.	% ESP.	% VIAB.	% ESP.	% VIAB.	% ESP.	% VIAB.
<u>rad/rad</u>	35	0	17	39	37	95	0,3	-
<u>rad</u> [<u>RAD</u>]/ <u>rad</u>	22	0	17	87	28	57	0,9	-
<u>rad/RAD</u>	20	71	43	75	8,5	60	8,6	-
<u>rad</u> [<u>RAD</u>]/ <u>RAD</u>	17	64	47	70	13	84	12	-

Mapas de restricci3n

La cepa de E. coli HB101 (hsdR hsdM recA13 supE44 lacZ4 leuB6 proA2 thi-1 (B1) Sm ; Boyer y Roulland-Dussoix, 1969) fué transformada (Davis et al., 1980) con ADN de las cepas transformantes de S. cerevisiae, según el método de

Nasmyth y Reed (1980). Las colonias transformantes de bacterias se seleccionaron por ser Amp^R Leu⁺. Se extrajo y purificó ADN plasmídico de estos transformantes. Estos plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI y los fragmentos resultantes separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Según se indica en la Tabla IV, se identificaron diversos plásmidos capaces de complementar a las mutaciones rad51-1 o a rad55-3 mientras que aquellos que complementaban a rad50-1 o a rad54-3 resultaron pertenecer a clases únicas. Entre ellos se eligieron para estudios posteriores aquellos que tenían las inserciones mas pequeñas, uno por gen RAD clonado. La Figura 5 muestra los mapas de restricción detallados de cada uno de estos plásmidos.

Tabla IV. Clases de plásmidos aislados, según se deduce de la digestión con EcoRI.

Mutación complementada	nº de plásmidos analizados	nº de inserciones diferentes	Tamaño(Kb) inserción
<u>rad50-1</u>	2	1	5,5
<u>rad51-1</u>	6	6	4,3-20,8
<u>rad54-3</u>	2	1	6,2
<u>rad55-3</u>	11	3(8,2,1)	4,7-5,3

Transformación de las cepas Rad⁻ con los plásmidos aislados

Se deseaba probar si alguno de los plásmidos aislados era capaz de complementar otras mutaciones rad además de aquella para la que había sido seleccionado. Así, las cepas XS131-5A, XS133-3B, XL4-22C y XL5-3C (Tabla I) fueron transformadas con cada uno de los plásmidos. Se probó la sensibilidad a rayos X de unos 20 transformantes Leu⁺ por experimento resultando que sólo cuando el plásmido utilizado contenía el gen que estaba mutado en la cepa recipiente

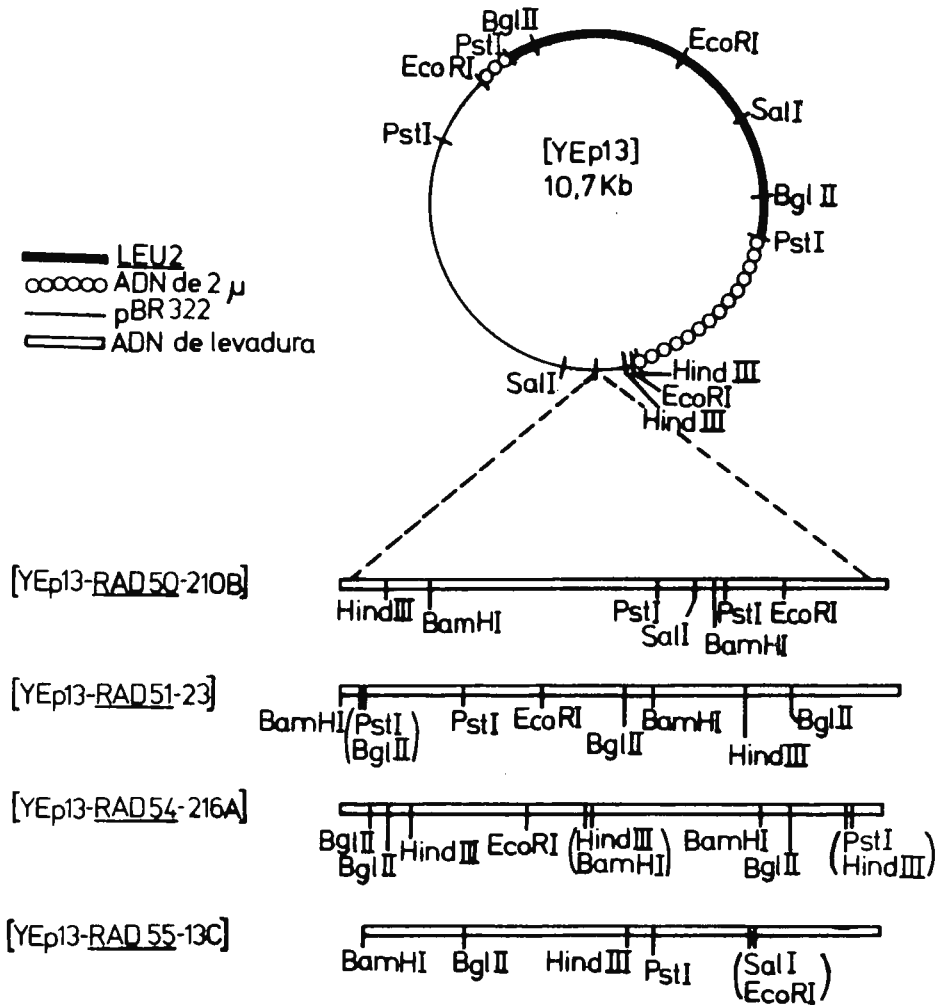


Figura 5. Mapas de restricción de los plásmidos aislados.

los transformantes eran Rad⁺. En los demás experimentos, los transformantes seguían siendo Rad⁻. Estos resultados indican que aunque todos estos genes están implicados en una misma vía reparadora, un exceso de producto de uno de ellos no es capaz de paliar el defecto de otro.

Integración de los plásmidos en el genomio

Un plásmido puede complementar a una mutación bien porque lleve el alelo silvestre del mismo gen o bien porque lleve un gen capaz de suprimir génica- o metabólicamente a esa mutación. De hecho y en el curso de estas investigaciones se ha clonado un gen supresor de ámbar según se describirá más adelante. Así pues, se consideró esencial comprobar la identidad de los genes clonados mediante integración en el genomio. La integración en un cierto locus cromosómico es considerada como demostración suficiente de homología entre el gen clonado y dicho locus.

Integración orientada hacia el locus RAD55

Según se observa en la Figura 5, el plásmido [YEp13-RAD55-13C] tiene un único lugar reconocible por la enzima BamHI. Según describen Orr-Weaver *et al.* (1981), los extremos libres son altamente recombinogénicos; por tanto, si se utiliza para transformar plásmido cortado con una enzima de restricción, la probabilidad de integración en una región homóloga a la que ha sido cortada en el plásmido será muy alta.

Unos 25 µg del plásmido [YEp13-RAD55-13C] fueron digeridos con BamHI e inmediatamente utilizados para transformar la cepa XL5-3C (Tabla I). Entre 35 transformantes Leu⁺ se encontraron 3 (llamados INT55-11, -12 y -30) en los que el plásmido parecía integrado ya que no se observaba pérdida espontánea de los fenotipos Leu⁺ y Rad⁺. Se cruzó la cepa INT55-11 por la cepa XL30-5A (Tabla I). El análisis de unas

60 tétradas descendientes de este cruzamiento reveló que la integración había tenido lugar en el locus RAD55: los marcadores leu2 y rad55 segregaron 2+:2-, todas las tétradas eran de tipo parental para estos marcadores y su distancia a ARO1 fue estimada en 40 cM, aproximadamente la misma que existe normalmente entre RAD55 y ARO1 (Mortimer y Schild, 1980). De todo esto se concluye que el plásmido [YEp13-RAD55-13C] contiene, efectivamente, el gen RAD55.

Integración mediante el vector [YIp5]

Aprovechando la circunstancia de que los plásmidos [YEp13-RAD50-210B] , [YEp13-RAD51-23] y [YEp13-RAD54-214A] contienen dos lugares de corte para BamHI flanqueando fragmentos de 3 Kb, 3,4 Kb y 1,5 Kb respectivamente, se pensó en subclonar dichos fragmentos en el vector integrativo [YIp5] (Scherer y Davis, 1979). Este vector contiene el gen URA3 y es capaz de replicarse autónomamente en E. coli pero no en levadura de modo que las colonias Ura+ seleccionadas tienen el plásmido integrado.

Antes de proceder con la integración se estudió si los fragmentos BamHI-BamHI tenían o no actividad Rad+ subclonándolos en el vector [YRp7], plásmido replicativo que lleva el gen TRP1 (Tschumper y Carbon, 1980). Así, dichos fragmentos fueron escindidos de los plásmidos originales y ligados mediante ligasa de T4 al único sitio de corte para BamHI que posee [YRp7]. Con la mezcla de ligamiento se transformó a la estirpe de E. coli JA300 (Tschumper y Carbon, 1980). De entre los transformantes Trp+ Amp^R Tet^S se seleccionó uno por gen clonado, a cuyos plásmidos se llamó [YRp7-RAD..-BB]. Se extrajo y purificó ADN plásmídico de estas estirpes, ADN que se utilizó para transformar las respectivas cepas de levaduras. En los tres casos estudiados, los transformantes Trp+ seguían siendo Rad- lo que indica que en los plásmidos seleccionados en primer lugar, la actividad Rad+ está total- o parcialmente fuera de los fragmentos BamHI-BamHI.

Seguidamente se subclonaron los mismos fragmentos y de igual forma en [YIp5] con las siguientes diferencias: la estirpe de E. coli utilizada fué DB6507 (un derivado pyrF de HB101) y los transformantes se seleccionaron por ser Ura⁺ Amp^R. Los plásmidos así obtenidos fueron denominados [YIp5-RAD.-BB] y los integrantes obtenidos al transformar con estos plásmidos la cepa DBY947 (Tabla I), INT50-...,INT51-e INT54-..., respectivamente.

A) Estudio de las cepas INT50.

Se estudiaron 32 cepas INT50 distintas, todas las cuales eran Ura⁺ Rad⁺. Cruzamientos por la cepa XS132-1A revelaron que ambos marcadores segregaban de forma independiente lo que indica que la integración no tuvo lugar en el locus RAD50 y, como consecuencia, que no existe homología entre el fragmento subclonado y el gen RAD50.

Tres hipótesis podrían explicar estos resultados:

- 1) Dado que la mutación rad50-1 es de tipo ámbar (ver más adelante), el plásmido [YEpl3-RAD50-210B] podría ser portador de un gen supresor de ámbar. Sin embargo, se ha llegado a demostrar por cruzamientos de una cepa que lleva este plásmido por la cepa 3971-5B, portadora de muchas mutaciones de tipo ámbar (Tabla I), que este no es el caso.
- 2) El plásmido [YEpl3-RAD50-210B] podría contener un gen que es capaz de complementar funcionalmente a una mutación rad50, pero sólo cuando el número de copias de este gen en una célula es alta.
- 3) La inserción del plásmido [YEpl3-RAD50-210B] podría estar compuesta por un mínimo de dos piezas Sau3A que han sido ligadas en el proceso de construcción de los plásmidos (Figura 1), pero que normalmente están en diferentes lugares del genoma; el fragmento BamHI-BamHI subclonado llevaría la parte que no es homóloga ni contigua al gen RAD50.

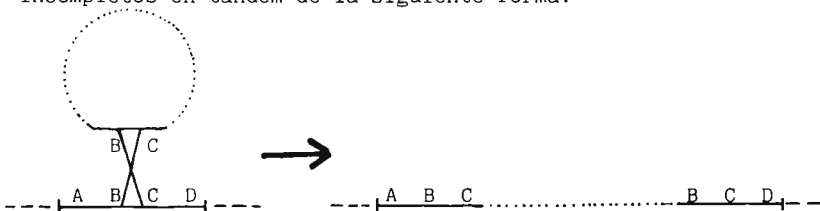
Ninguna de estas dos últimas hipótesis ha podido ser confirmada por los resultados de los experimentos realizados. Sí que se ha podido determinar mediante cruzamientos de la cepa INT50-A por las cepas X3127-2A, X4034-22C y X4035-7A (Tabla I), que el gen que lleva en fragmento BamHI-BamHI está normalmente localizado en el cromosoma XV, entre el centrómero y el gen PET17.

B) Estudio de las cepas INT51

Se obtuvieron 7 integrantes INT51-..., todos los cuales resultaron ser Ura⁺ Rad⁺. Uno de ellos, INT51-B, fué cruzado por XS134-4B y por 3971-5B (Tabla I). El análisis de las esporas resultantes de estos cruzamientos reveló que la integración había tenido lugar en el locus de RAD51: los marcadores URA3 y RAD51 segregaron sólo ditipos parentales y los marcadores URA3 e ILV1 resultaron estar ligados y a la misma distancia a la que están normalmente RAD51 e ILV1 (Mortimer y Schild, 1980). Por tanto se concluye que el plásmido que complementa a la mutación rad51-1 contiene realmente al gen RAD51.

C) Estudios de las cepas INT54

En el caso de las cepas INT54, dos de ellas (INT-A e INT54-D) eran Ura⁺ Rad⁺ pero las otras dos obtenidas (INT54-B e INT54-C) resultaron ser Ura⁺ Rad⁻. Teniendo en cuenta que el fragmento BamHI-BamHI subclonado no tiene actividad Rad⁺ según se dijo antes, la aparición de transformantes Rad⁻ podría indicar que dicho fragmento es totalmente interno al gen RAD54. Efectivamente, la integración en un gen de un plásmido que lleva un fragmento interno de ese gen dá lugar a dos genes incompletos en tandem de la siguiente forma:



Esta hipótesis implica que la integración debe haber tenido lugar en el gen RAD54 y para probarlo se cruzó INT54-C por X4004-3A (Tabla I). Todas las tétradas derivadas de este cruzamiento resultaron ser ditipos parentales para los marcadores rad54 y ura3; además se estimó una distancia entre el lugar de integración y el gen LYS5 de 4,5 cM. Todo esto confirma que la integración había ocurrido en otro locus, posiblemente en URA3.

El hecho de que una célula pueda sobrevivir teniendo el gen RAD54 interrumpido por una secuencia exógena sugiere que este gen no es esencial para la vida. Lo que sí debe resultar afectada por esta interrupción es la resistencia a rayos X; para probarlo se construyó la curva de supervivencia a rayos X de la cepa INT54-B. Este experimento fué llevado a cabo a 23°C y a 36°C dado que la mutación rad54-3 es termosensible (Game y Mortimer, 1974). Como control se utilizó la cepa silvestre DBY947 (Tabla I), cepa de la que procede INT54-B.

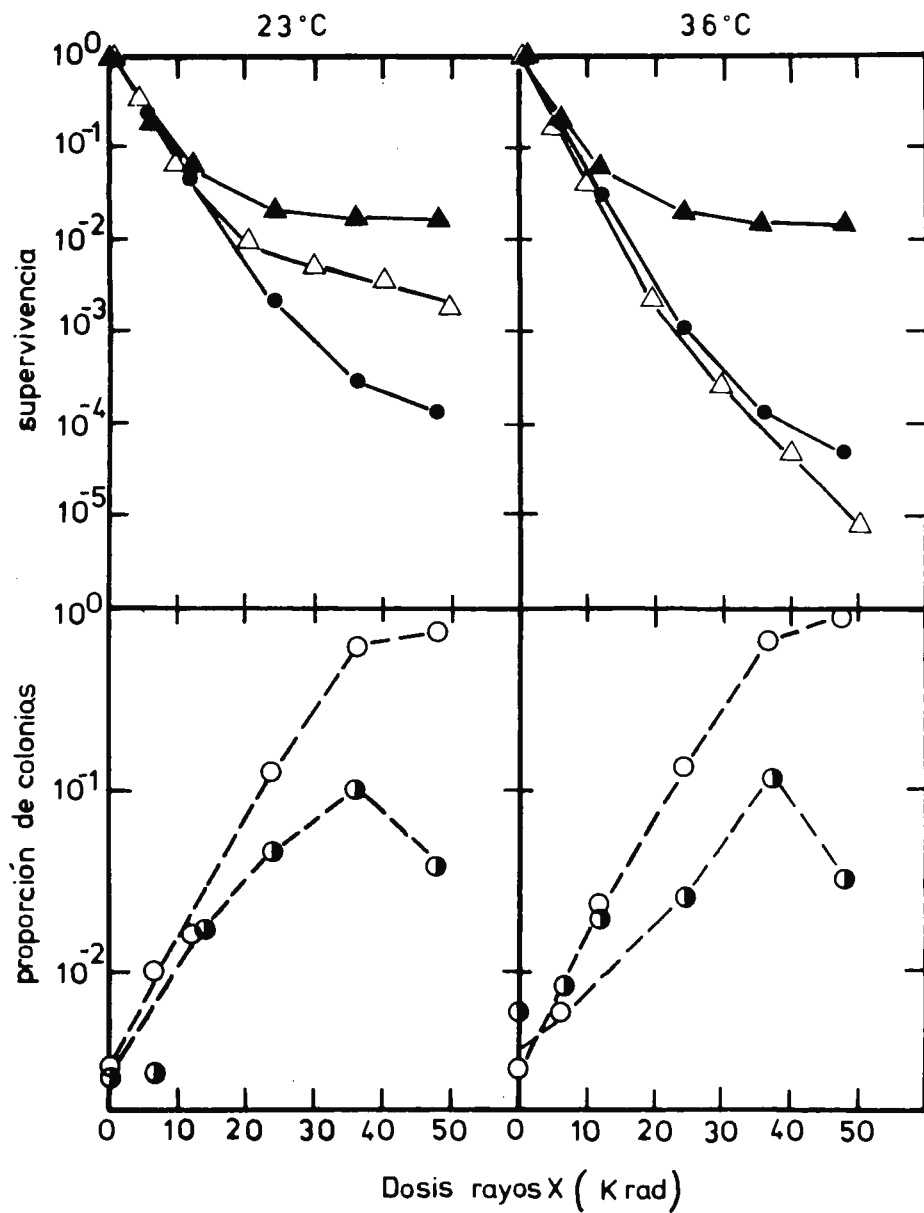
Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 6. Según se deduce de la parte superior de esta figura, a 36°C la sensibilidad de INT54-B y la de la cepa que lleva la mutación rad54-3 son idénticas a dosis bajas de rayos X. La diferencia encontrada a dosis más altas es indicativa de que la población de células tratada no es homogénea. Esta población estaría compuesta por:

- un subgrupo , mayoritario en un principio, muy sensible a rayos X
- un subgrupo más resistente a rayos X que comenzaría siendo minoritario pero que, a dosis altas, constituiría la casi totalidad de los supervivientes.

El origen más plausible de esta subpoblación resistente sería una reversión de la integración del plásmido, lo que llevaría a la célula a reconstruir su gen RAD54 y,

Figura 6. Cuadrantes superiores: Curvas de supervivencia a rayos X de cepas con distintos genotipos: (X) tipo silvestre Rad⁺; (●) INT54-C, Rad⁺; (Δ) rad54-3, Rad⁻, termosensible.

Cuadrantes inferiores: Proporción en la población superviviente a las distintas dosis de rayos X de: (O) Colonias totalmente Ura⁻ Rad⁺; (⊙) colonias sectoreadas Ura⁻ Rad⁺/Ura⁺ Rad⁻.



simultáneamente, a perder el gen URA3, volviendo a ser auxótrofa para el uracilo. Para probar esta hipótesis se trasplantaron las colonias supervivientes a las distintas dosis de rayos X, a medio que no contenía uracilo. Los resultados (Figura 6, parte inferior) muestran que, efectivamente, la proporción de Ura⁻ aumenta con la dosis hasta alcanzar casi un 90% del total. Es más: se encontró que además de las colonias totalmente Ura⁺ o Ura⁻, aparecían colonias con sectores Ura⁺ y sectores Ura⁻. La proporción de este tipo de colonias en la población general sigue una curva en campana lo que puede ser explicado como consecuencia de que el proceso de pérdida del plásmido está inducido por los rayos X. Estos resultados son muy interesantes ya que, hasta ahora, no se había descrito este tipo de inducción.

Aislamiento de un gen que codifica un supresor

Cuando se estaba probando el genotipo de las colonias Leu⁺, originadas por transformación de las cepas XS131-5A, X5133-3B, XL4-22C y XL5-3C con la mezcla de plásmidos, se encontró que una proporción relativamente alta de ellas (112/10.700) eran además Trp⁺. Es más, en el caso de la cepa XS131-5A (rad50-1) la mayoría de los transformantes Rad⁺ resultaron ser además Trp⁺. La pérdida simultánea de los fenotipos Leu⁺ Rad⁺ Trp⁺ puso de manifiesto que los tres se debían a un mismo plásmido.

Dado que los genes RAD50 y TRP1 se encuentran en el cromosoma IV pero muy distantes entre sí, 160 cM (Mortimer y Schild, 1980) y que una reunión casual de estos genes en el proceso de fabricación de los plásmidos híbridos (Figura 1) debería conllevar una frecuencia más baja de lo normal, y no más alta como es el caso, se descartó la posibilidad de que los plásmidos en cuestión fueran portadores de ambos genes. Así pues se propuso como hipótesis de trabajo que estos plásmidos contenían un gen que determina un supresor.

Se consideró interesante probar la presencia de un supresor en la población de plásmidos híbridos dado que son muchos los investigadores que trabajan con esta mezcla concreta y podrían, si utilizan mutaciones de fin de mensaje, reaislarlo creyendo que es el gen que desean clonar.

Las mutaciones rad50-1 y trp1-289 son de tipo ámbar

Para que la hipótesis del supresor fuera plausible, las mutaciones rad50-1 y trp1-289 deberían ser de tipo fin de mensaje. Para probar si esto es así, se buscaron revertientes espontáneos e inducidos de estas mutaciones sembrando una suspensión de células XS131-5A en medio completo sin triptófano; dos de estas placas fueron irradiadas con 3.375 erg/mm^2 de luz ultravioleta. Tras una semana de incubación a 30°C aparecieron un total de 102 colonias Trp^+ , 14 espontáneas y 88 inducidas. De ellas, 85 (13 espontáneas y 72 inducidas) resultaron ser Rad^+ . Esta alta frecuencia de correversión ya es indicativa de supresión pero para demostrar este punto mas convincentemente 3 de estos revertientes se cruzaron por la cepa 3971-5B (Tabla I) portadora de muchas mutaciones del tipo fin de mensaje. El análisis de 12 tétradas derivadas de cada uno de estos cruzamientos mostró: una segregación de 3+:1- para los marcadores rad50 y todos los de tipo ámbar, una segregación de 2+:2- para los marcadores trp1 y todos los demás marcadores. De estos resultados se deduce que tanto la mutación rad50-1 como trp1-289 son de tipo ámbar y que los tres revertientes probados llevan supresores de ámbar.

El plásmido aislado suprime sólo mutaciones ámbar

Con el fin de probar si el plásmido [YEpl3-SUP] era capaz de suprimir otras mutaciones, se cruzó la cepa transformada XS131-5A- [YEpl3-SUP] por la cepa 3971-5B (Tabla I). El análisis de 30 tétradas derivadas de este cruzamiento (Tabla V) indicó que la presencia del plásmido afecta sólo a la segregación de las mutaciones ámbar.

Tabla V. Segregación de los marcadores presentes en el cruceamiento XS131-5A-[YE_p13-SUP] por 3971-5B.

Tipo de mutación	Segregación	
	entre esporas Leu ⁻ (sin plásmido)	entre esporas Leu ⁺ (con plásmido)
Ambar:		
<u>met8</u>	20+:18-	59+: 1-
<u>rad50-1</u>	18+:20-	60+: 0-
<u>aro1D</u>	19+:19-	57+: 3-
<u>ade5-7</u>	17+:21-	32+:28-
<u>trp1(-1+/o-289)</u>	0+:38-	20+:40-
Ocre:		
<u>lys1</u>	0+:33-	0+:60-
<u>ilv1</u>	22+:17-	35+:31-
<u>can1</u>	20+:18-	26+:29-

El hecho de que el plásmido suprime sólo parcialmente la mutación ámbar ade5-7 indica que su eficiencia no es máxima. Para poder cuantificar la eficiencia de la mutación rad50-1 se construyó la curva de supervivencia a rayos X de las siguientes cepas:

XL16-4B-[YE_p13-SUP], haploide rad50-1 con plásmido
 XL16-4B, haploide rad50-1 sin plásmido
 XL53-[YE_p13-SUP], diploide homocigótico con plásmido
 XL53, diploide homocigótico sin plásmido

Según se deduce de la Figura 7, aunque la resistencia de las cepas que llevan plásmido es superior a las que no los llevan, no se alcanza en ningún caso la del tipo silvestre lo que indica que la supresión no es completa.

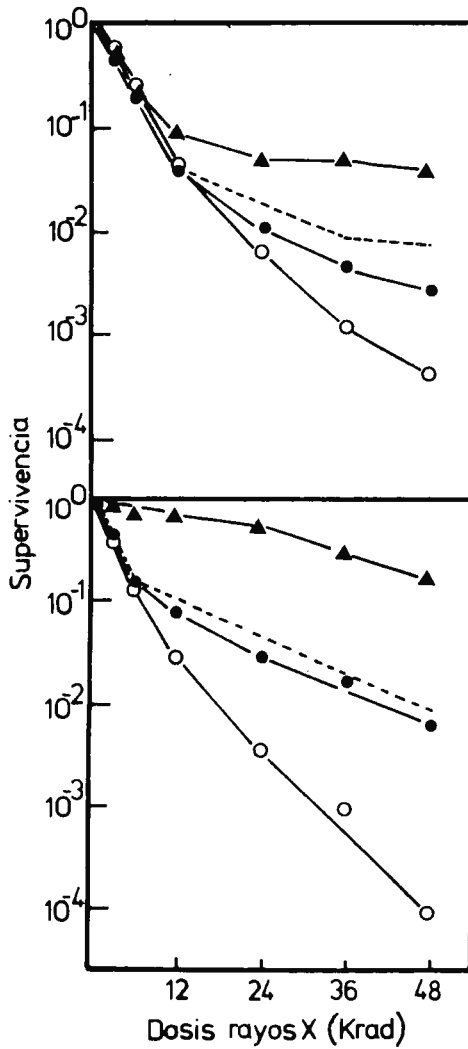


Figura 7. Curva de supervivencia a rayos X de cepas con o sin el plásmido [YEpl3-SUP]. Símbolos igual que en la Fig. 1.

Posibles orígenes del supresor

Se consideraron las siguientes hipótesis acerca del origen del supresor:

- A) El supresor estaba presente en la cepa AB320, utilizada como fuente del ADN de levadura en la fabricación de los plásmidos (Nasmyth y Tatchell, 1980).
- B) El plásmido [YE_{p13}-SUP] contiene el factor citoplásmico PSI.
- C) Considerando que el fragmento LEU2 del vector [YE_{p13}] contiene un gen que determina un ARNt (Dobson et al., 1981; Andreadis et al., en prensa), el plásmido [YE_{p13}-SUP] podría tener una mutación en ese gen de modo que el ARNt es ahora capaz de suprimir mutaciones ámbar.

Estas hipótesis fueron probadas de la siguiente forma:

Hipótesis A:

Lo más probable es que el supresor estuviera presente en la cepa AB320 (Nasmyth y Reed, 1980). Sin embargo, entre la descendencia del cruzamiento entre derivados haploides de AB320 por la cepa 3971-5B, no se detectó la presencia de ningún supresor (Tabla VI).

Tabla VI. Segregación de algunos de los marcadores presentes en el cruzamiento de derivados de AB320 por 3971-5B.

Fenotipo	Segregación		Observada
	Esperada		
	no SUP	SUP	
Aro ⁺ Aro ⁻	2:2	3,3:1	33:28
Ade ⁺ :Ade ⁻	1:3	1:1,6	12:50
Met ⁺ :Met ⁻	1:3	1:1,6	17:45
Trp ⁺ :Trp ⁻	1:3	1:1,6	13:49
Lys ⁺ :Lys ⁻	1:3	1:3	15:46

No se puede descartar la posibilidad de que AB320 contenga un supresor débil que sólo se ponga de manifiesto cuando en la célula coexisten varias copias del gen correspondiente, tal y como ocurre cuando forma parte de un plásmido.

Hipótesis B:

Otra posible explicación sería que el plásmido contenga al factor PSI del que se sabe que potencia la expresión de supesores débiles (Cox, 1965). por tanto se esperaría que todas las cepas en las que se detectaban transformantes Trp⁺ contengan un supresor débil. Esto no parece ser cierto según se desprende de los resultados del cruzamiento de la cepa XS131-5A (Tabla I) por la cepa MT193/3b (Tabla I): el análisis de 12 tétradas derivadas de este cruzamiento muestra que la presencia de PSI no afecta a la segregación normal de trp1-289 o de rad50-1 ya que en todas las tétradas estos marcadores segregaron 2+:2-.

Hipótesis C:

El plásmido [YEpl3-SUP] podría contener un gen para un ARNt mitocondrial, el cual podría actuar como supresor cuando interviene en el sistema citoplásmico de síntesis de proteínas. Esta explicación resulta, sin embargo, poco probable dado que las reglas de tambaleo en el reconocimiento codón:anticodón que prevalecen en la mitocondria no permitirían que un ARNt mitocondrial funcionara como un supresor de mutaciones ámbar exclusivamente (Bonitz et al., 1980).

En este punto, sólo dos posibles hipótesis seguían siendo válidas: el plásmido podría llevar el gen supresor bien en el fragmento LEU2 (Hipótesis D) o en la inserción de ADN de levadura; en este último caso, se trataría de un supresor débil presente en AB320 y sólo activo cuando su número de copias es alto (Hipótesis A).

Para dilucidar entre estas dos hipótesis se comenzó contruyendo un mapa de restricción de [YEp13-SUP] (Figura 8). Una primera evidencia en contra de la hipótesis D vino del análisis de restricción con la enzima XbaI. Según Andreadis et al. (en prensa), la secuencia de nucleótidos de una cierta región del ARNt contenido en el fragmento LEU2 es la siguiente: TCAAGA ; siendo GTT el anticodón. Esta secuencia podría haber mutado a AGTTCT ; siendo GTT el anticodón. Esta secuencia podría haber mutado a TCTAGA lo que la daría capacidad para suprimir mutaciones ámbar y, al mismo tiempo, habría creado un punto susceptible de ser cortado por XbaI (TCTAGA AGATCT). Sin embargo y según se observa en la Figura 8, el fragmento LEU2 no contiene ningún punto de corte para XbaI.

Para obtener pruebas más sólidas acerca del origen del gen SUP se procedió a subclonar distintos fragmentos de [YEp13-SUP] en diferentes vectores. Los nuevos plásmidos obtenidos se esquematizan en la Figura 8.

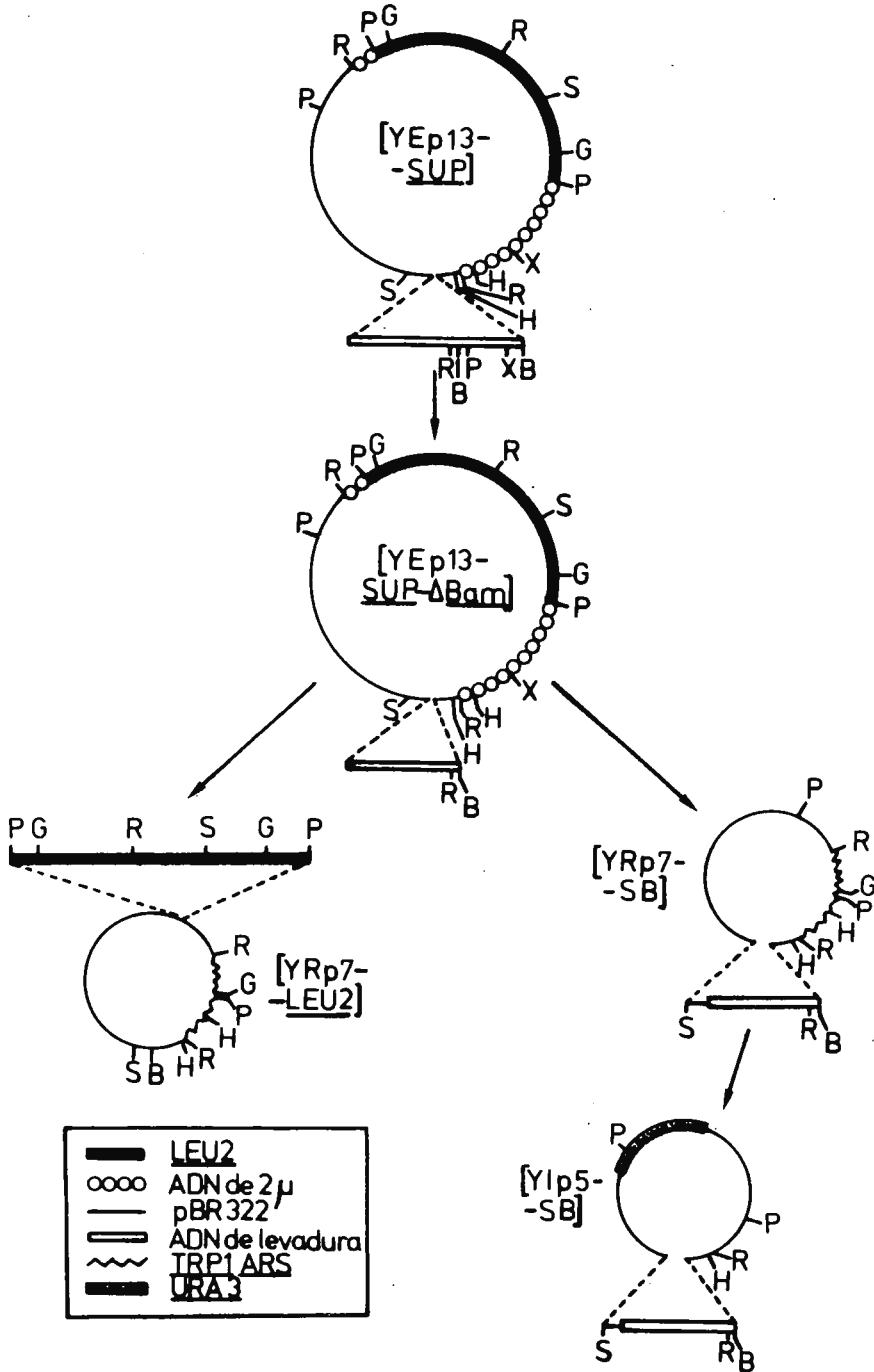
Delección del fragmento BamHI-BamHI

Según se observa en la Figura 8, el plásmido [YEp13-SUP] contiene dos sitios de corte para BamHI situados a unos 0,9 Kb. Con el fin de investigar si la actividad SUP dependía total- o parcialmente de este fragmento BamHI-BamHI, se eliminó realizando una digestión total con esta enzima del plásmido y una recircularización con ligasa de T4 posteriormente. Así se obtuvo el plásmido [YEp13-SUP-Δ Bam] (Figura 8) que fué utilizado para transformar a la cepa XL80-3A, derivada del cruzamiento de XS131-5A por 3971-5B. Todos los transformantes obtenidos resultaron ser Leu⁺ Trp⁺ Rad⁺ lo que indica que el fragmento BamHI-BamHI es irrelevante para la función SUP.

Subclonación de fragmentos de [YEp13-SUP- Δ Bam] en [YRp7]

Mediante digestión con las distintas enzimas de restricción y posterior ligamiento, se construyeron los siguientes plásmidos híbridos:

Figura 8. Mapas de restricción del plásmido [YEp13-SUP] y de sus derivados. Las enzimas de restricción utilizadas fueron: B, BamHI; G, BglIII; H, HindIII; P, PstI; R, EcoRI; S, SalI; X, XbaI.



- 1) [YRp7-SUP-LEU2] (Figura 8) formado por el fragmento LEU2 de [YEp13-SUP- Δ Bam] introducido en uno de los sitios de corte para PstI del vector [YRp7] descrito anteriormente.
- 2) [YRp7-SUP-SB] (Figura 8), un plásmido en el que el fragmento SalI-BamHI de [YRp7] ha sido sustituido por el de [YEp13-SUP- Δ Bam] .

Ambos plásmidos fueron utilizados para transformar la cepa XL80-3A (Tabla I) en Trp⁺ .Tras probar la resistencia a rayos X y el crecimiento en medio sin leucina de unos 25 transformantes por experimento, se encontró que: todas las cepas que llevan el plásmido [YRp7-SUP-SB] eran Trp⁺ Rad⁺ Leu⁻ , mientras que las que llevan el plásmido [YRp7-SUP-LEU2] eran Trp⁺ Rad⁻ Leu⁺ , lo que indica que el gen SUP se encuentra en el fragmento SalI-BamHI, es decir en la inserción de ADN de levadura y nó en el fragmento LEU2 del plásmido original [YEp13-SUP] .

Integración en el genomio

Quedaba por demostrar si el supresor es tan débil que no se pondría de manifiesto en una célula que lleva una sola copia del gen SUP por genomio, como serían los casos de AB320 ó de una cepa en la que el plásmido estuviera integrado.

Para conseguir una cepa con el gen SUP integrado se introdujo el ya citado fragmento SalI-BamHI en el vector integrativo [YIp5] antes mencionado, obteniéndose el plásmido [YIp5-SUP-SB] (Figura 8). Se transformó la cepa XL80-3A (Tabla I) con este plásmido y se seleccionaron las colonias Ura⁺ . Todos los integrantes obtenidos, denominados INTS⁺ SUP-SB-1 a -14, resultaron ser Trp⁻ Rad⁻ lo que indica que, una vez integrado, este fragmento no tiene actividad supresora. Consecuentemente se confirma la hipótesis de que el gen SUP sólo es activo en células que contienen varias copias del mismo.

Localización en el genomio el gen SUP

Con el fin de determinar en qué lugar había ocurrido la integración, se cruzaron 12 cepas INTSUP-SB- por la cepa P49 (Tabla I). Del análisis de unas 10 tétradas por cruzamiento se dedujo que, en todos los casos, el marcador ura3 segregaba 4+:0- lo que indica que la integración ha tenido lugar en el locus URA3 y, por consiguiente que estos integrantes no eran útiles para localizar el gen SUP.

Otra forma de conseguir la integración es la descrita por Falco y Botstein (en prensa). Según este método cuando un plásmido que contiene parte del círculo de 2μ es introducido en una cepa cir^0 (que no contiene círculos de 2μ), el plásmido se pierde con mucha frecuencia a menos que espontáneamente se integre en el genomio. Así, un transformante que mantenga establemente el fenotipo determinado por el plásmido será porque lo tenga integrado. Sin embargo, en cepas diploides heterocigóticas, el cromosoma en el que se ha integrado el círculo de 2μ se vuelve genéticamente inestable, según se demuestra por la expresión fenotípica de marcadores recesivos localizados en el cromosoma homólogo.

Así, la cepa DCO4 (Tabla I) fué transformada con el plásmido [YEpl3-SUP- Δ Bam]. Se seleccionaron dos transformantes estables Leu^+ (INT-YEpl3-SUP-1 y -2) que fueron cruzados por la cepa 1453-3A (Tabla I). Los diploides resultantes fueron suspendidos en agua y sembrados en medio completo. En ambos casos y a pesar de que entre el 5 y el 10% de las colonias probadas eran Leu^- , no se observó pérdida simultánea de los alelos LEU2 e HIS4 lo que indica que la integración no había tenido lugar en el locus LEU2.

Las cepas INT-YEpl3-SUP-1 y -2 fueron seguidamente cruzadas por 3971-5B (Tabla I). Se analizaron 11 colonias diploides Leu^- de las que 4 resultaron ser también $Trp^- Tyr^-$

lo que sugiere que la integración tuvo lugar en el cromosoma IV donde se encuentran TRP1 y ARO1 (Mortimer y Schild, 1980). La baja frecuencia de pérdida simultánea puede interpretarse como que SUP se encuentra distal a TRP1 y ARO1 o en el brazo cromosómico opuesto.

Posibles causas de la alta frecuencia de [YEp13-SUP]

Se pensó que la alta frecuencia (alrededor del 1%) con que este plásmido se encuentra entre los plásmidos híbridos podría ser debido a selección a favor de [YEp13-SUP] durante la multiplicación en la estirpe RRI de E. coli (Nasmyth y Tatchell, 1980). Para ello nos basábamos en: 1) La mutación endoI de la que es portadora la estirpe RRI es de tipo ámbar (Wright, 1971), y 2) es posible la supresión de mutaciones ámbar tanto en organismos eucarióticos por ARNt procarióticos (Struhl et al., 1979), como en organismos procarióticos por ARNt eucarióticos (Capechi et al., 1975; Gesteland et al., 1976). Por tanto, se podría pensar que células RRI que fueran portadoras de un supresor de ámbar podrían crecer mejor que las que no lo tienen. Sin embargo este no parece ser el caso como se demuestra por el hecho de que células de RRI transformadas respectivamente con [YEp13-RAD54-216A], [YEp13-RAD50-210B] y [YEp13-SUP] no mostraron diferencias en la tasa de crecimiento, ni en medio nutritivo, ni en medio nutritivo suplementado con ampicilina (Figura 9). No hemos encontrado ninguna otra explicación para esta alta frecuencia.

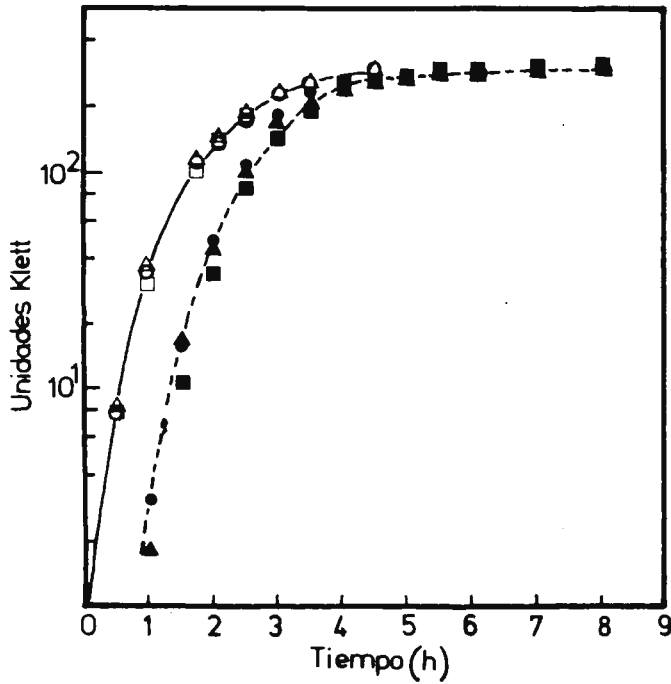


Figura 9. Curva de crecimiento en medio nutritivo (símbolos llenos) y en medio nutritivo con 60 μg de ampicilina/ml (símbolos vacíos) de cepas RRI de *E. coli* conteniendo los plásmidos: (●,○) [YE_p13-RAD50-210B]; (■,□) [YE_p13-RAD54-216A]; (▲,△) [YE_p13-SUP].

BIBLIOGRAFIA

- Andreadis, A., Hsu, Y.-P., Kohlhaw, G.B., Hermodson, M. y Schimmel, P.R. (en prensa) Cell.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.
- Bonitz, S.G., Berlani, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E. y Tzagaloff, A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3167-3170.
- Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix (1969) J. Mol. Biol. 41: 459-472.
- Brendel, M. y Haynes, R.H. (1973) Molec. Gen. Genet. 125: 197-216.
- Broach, J.R., Strathern, J.N. y Hicks, J.B. (1979) Gene 8: 121-133.
- Capechi, M.R., Hughes, S.H. y Wahl, G.M. (1975) Cell 6: 269-277.
- Cleaver, J.E. (1980) J. Environm.Pathol. Toxicol. 3: 19-38.
- Cleaver, J.E. y Bootsma, D. (1975) Genetics 9: 19-38.
- Cox, B.S. (1965) Heredity 20: 505-521.
- Davis, R.W., Botstein, D. y Roth, J.R. (1980) Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Dobson, M.J., Kingsman, S.M. y Kingsman, A.J. (1981) Gene 16: 133-139.
- Falco, S.C. y Botstein, D. (en prensa) Cell.
- Friedberg, E.C., Ehmann, U.K. y Williams, J.I. (1979) Adv. Radiat. Biol. 8: 86-124.
- Game, J. C. y Mortimer, R.K. (1974) Mutat. Res. 24: 281-292.
- Gesteland, R.F., Wolfner, M., Grisafi, P., Fink, G., Botstein, D. y Roth, J.R. (1976) Cell 7: 381-390.
- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. y Smith, C.A. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 783-836.

- Haynes, R.H. y Kunz, B.A. (1981) En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Strathern, J.N., Jones, E.W. y Broach, J.R. (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 371-414.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1929-1933.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981) *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Lauer, G.D., Roberts, T.M. y Klotz, L.C. (1977) *J. Mol. Biol.* 114: 507-526.
- Lawrence, C.W. (1982) *Adv. Genet.* 21: 173-254.
- Lehman, A.R. y Karran, P. (1981) *Int. Rev. Cytol.* 72: 101-146.
- Lemontt, J.F. (1980) En: *DNA Repair and Mutagenesis in Eukaryotes*. deSerres, F.J., Generoso, W.M. y Schelby, M.D. (Eds.) Plenum Press, N.Y., pp. 85-120.
- Lindahl, T. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51: 61-88.
- Mortimer, R.K. y Schild, D. (1980) *Microbiol. Rev.* 44: 519-571.
- Nasmyth, K.A. y Reed, S.I. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2119-2123.
- Nasmyth, K.A. y Tatchell, K. (1980) *Cell* 19: 753-764.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. y Rothstein, R.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 6354-6358.
- Resnick, M.A. (1969) *Photochem. Photobiol.* 9: 307-312.
- Scherer, S. y Davis, R.W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4951-4955.
- Setlow, R.B. (1978) *Nature* 271: 713-717.
- Sherman, F., Fink, G.R. y Lawrence, C.W. (1977) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Strike, T. (1978) Tesis Doctoral. Universidad de California en Davis.

Struhl, K., Davis, R.W. and Fink, G.R. (1979) Nature 279: 78-79.

Tschumper, G. y Carbon, J. (1980) Gene 10: 157-166.

Wright, M. (1971) J. Bact. 107: 87-94.



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 2 | Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua. | 28 | Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real. |
| 4 | Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados. | 29 | Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias. |
| 5 | Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura. | 30 | Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas. |
| 7 | Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental. | 39 | Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. |
| 8 | Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos. | 44 | Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae. |
| 11 | Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular. | 45 | Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual. |
| 19 | Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética. | 47 | García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH Intracelular. |
| 20 | Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos. | 48 | García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina. |
| 22 | Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información. | 49 | Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados. |
| 25 | I Semana de Biología:
Neurobiología. | 50 | Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados. |
| 26 | I Semana de Biología:
Genética. | 51 | Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora. |
| 27 | I Semana de Biología:
Genética. | | |

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el $4He$ líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.ª:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótroica.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.ª T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).
- 156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa quinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.
- 157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.
- 158 Alvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.
- 161 Tomás Ferré, J. M.ª:
Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:
Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.

- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.ª J., y Bibiloni Rotger, M.ª A.:
Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:
Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.
- 166 Moreno Castillo, I.:
Ciclo anual del zooplancton costero de Gijón.
- 168 Durán García, S.:
Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo (s) de regulación.
- 169 Martínez Pardo, R.:
Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.
- 171 García Jiménez, J.:
Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.
- 173 Fernández Aláez, C.:
Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.
- 174 Furio Egea, J.:
Citokinas en agrios. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.
- 180 Moreno Rodríguez, J. M.:
Estudios ecológicos en jarales (cistion laurifolii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.
- 182 Pons Vallés, M.:
Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables.
- 183 Herrero Ruiz de Loizaga, V. J.:
Estudio de reacciones químicas por haces moleculares. Aplicación a la reacción $C_2H_5Br + KBr + C_2H_6$.
- 193 Martín García, V. S.:
Utilización sintética en química orgánica de metales pesados como catalizadores. Oxidación asimétrica.
- 195 Badía Sancho, A.:
Receptores presinápticos en el conducto deferente de rata.
- 196 Estévez Toranzo, A.:
Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo.
- 197 Lizarbe Iracheta, M.ª A.:
Caracterización molecular de las estructuras de colágeno.

