

Dep.  
Genética 3/8

20/8

23 de Jul

de 19 96

185 168  
Sevilla,

El Jefe del Departamento de Tesis,

*Alvarado*

R.13878

DIRECTOR DE  
1 C. A. Celular

**CONTROL GENETICO DE LAS  
DELECCIONES ENTRE SECUENCIAS  
REPETIDAS DIRECTAS EN  
*Saccharomyces cerevisiae***



Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Celular por el licenciado

**Félix Prado Velasco**

Sevilla, 27 de Junio de 1996

Vº Bº.El Director

Fdo: Andrés Aguilera López  
Profesor Titular de Genética

T0348



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral CONTROL GENETICO DE LAS RELACIONES ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS DIRECTAS EN *Saccharomyces cerevisiae* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 5 de octubre de 1996.

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I. 1. MECANISMOS Y ENZIMOLOGÍA DE LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA</b>	<b>2</b>
I. 1. 1. Modelo de reparación de DSBs	2
I. 1. 2 . Enzimología de la recombinación	5
I. 1. 2 . 1. Enzimología de la recombinación en bacterias	5
I. 1.3. Enzimología de la recombinación en levaduras	7
<b>I. 2. RECOMBINACIÓN INTRAMOLECULAR ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS</b>	<b>8</b>
I. 2. 1. Recombinación entre repeticiones invertidas	9
2. 2. Recombinación entre repeticiones directas	10
I. 2. 3. Posibles mecanismos de formación de deleciones entre repeticiones directas	12
<b>I. 3. CONTROL GENÉTICO DE LA RECOMBINACIÓN ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS</b>	<b>14</b>
I. 3. 1. Mutaciones que aumentan la inestabilidad de secuencias repetidas	15
I. 3. 2. Recombinación entre repeticiones directas en mutantes <i>hpr1</i>	16
I. 3. 2. 1. Papel de <i>HPR1</i> en transcripción	18
<b>I. 4. CONTROL DE LA RECOMBINACIÓN POR LA TRANSCRIPCIÓN</b>	<b>18</b>
I. 4. 1. Transcripción en levaduras	19
I. 4. 2. Papel de la cromatina en la regulación transcripcional	20
I. 4. 3. Relación entre recombinación y transcripción	21
<b>I. 5. RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO</b>	<b>23</b>
<b>I. 6. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>25</b>
<b>II. 1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO</b>	<b>25</b>
<b>II. 2. ESTIRPES</b>	<b>26</b>
<b>II. 3. PLASMIDOS</b>	<b>28</b>
<b>II. 4. ANALISIS GENETICO EN LEVADURAS</b>	<b>33</b>
<b>II. 5. MUTAGENESIS EN LEVADURAS</b>	<b>33</b>
<b>II. 6. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A RADIACION U.V.</b>	<b>34</b>
<b>II. 7. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A MMS</b>	<b>34</b>
<b>II. 8. DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACION</b>	<b>34</b>
<b>II. 9. ENSAYO DE ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA</b>	<b>35</b>
<b>II. 9. TRANSFORMACIONES</b>	<b>35</b>

II. 9. 1. Transformación de <i>E. coli</i>	35
II. 9. 2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	36
II. 10. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS	36
II. 10. 1. Extracción de DNA de <i>E. coli</i>	36
II. 10. 1. 1. Extracción a pequeña escala (minipreps)	36
II. 10. 1. 2. Extracción a gran escala	36
II. 10. 2. Extracción de DNA de levaduras	37
II. 10. 2. 1. Extracción por rotura mecánica	37
II. 10. 2. 2. Extracción por lisis enzimática	37
II. 10. 3. Extracción de RNA de levaduras	38
II. 12. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS	38
II. 12. 1. Geles de agarosa	38
II. 12. 2. Geles de acrilamida	39
II. 13. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES GELES	39
II. 13. 1. Geles de agarosa	39
2. 13. 2. Geles de acrilamida	40
II. 14. TRATAMIENTO ENZIMATICO DEL DNA	40
II. 14. 1. Restricción de fragmentos de DNA	40
II. 14. 2. Obtención de extremos romos	40
II. 14. 3. Desfosforilación de extremos 5' de DNA	41
II. 14. 4. Ligación de DNA	41
2. 14. 5. Construcción de deleciones unidireccionales seriadas	41
2. 14. 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
II. 15. MARCAJE DE ACIDOS NUCLEICOS	42
II. 15. 1. Marcaje de DNA a partir de hexanucleótidos	42
II. 15. 3. Marcaje de DNA con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por PCR	2
II. 15. 3. Marcaje de DNA con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por PCR	42
II. 15. 4. Marcaje de RNA con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP por transcripción <i>in vitro</i> (ribosondas)	42
II. 16. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS	43
II. 16. 1. Transferencia de DNA	43
II. 16. 2. Transferencia de RNA	44
II. 17. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS	44
II. 17. 1. Hibridación con sonda marcada con digoxigenina	44
II. 17. 2. Hibridación con sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	45
II. 18. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA CROMATINA	45
II. 18. 1. Obtención de protoplastos	45
II. 18. 2. Preparación de DNA tratado con DNasa I o	

nucleasa micrococcal (MNasa)	46
II. 18. 4. Mapeo de sitios de resistencia a MNasa y de hipersensibilidad a DNasa I	47
II. 19. MAPEO DE LOS SITIOS DE INICIACION Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIANTE PROTECCION A RNasa A	47
II. 20. CONSTRUCCION DE LA GENOTECA DE pRS314-LB	48
II. 21. INTEGRACION EN EL CROMOSOMA Y COMPROBACION MOLECULAR DE LOS SISTEMAS DE RECOMBINACION L, LU y SU	48
II. 22. COMPROBACION MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA LINEAL Y CIRCULAR DE pTEL-LU	48
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
III. 1. ESTUDIO DE LA RECOMBINACION ESPONTANEA ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS	50
III. 1. 1. Análisis de la recombinación espontánea entre repeticiones directas e invertidas localizadas en plásmidos centroméricos	50
III. 1. 2. Análisis genético de la recombinación espontánea entre repeticiones localizadas en cromosomas	56
III. 1. 3. Análisis genético de la recombinación espontánea entre repeticiones localizadas en minicromosomas	57
III. 1. 4. Búsqueda de mutantes defectivos en recombinación entre secuencias repetidas	58
III. 2. ESTUDIO DE LA RECOMBINACION INDUCIDA POR UN CORTE DE DOBLE CADENA (DSB)	60
III. 2. 1. Análisis genético de la recombinación en los sistemas de repeticiones directas e invertidas en estirpes silvestres	60
III. 2. 2. Análisis genético de las mutaciones <i>rad1</i> , <i>rad10</i> y <i>rad52</i> en la formación de deleciones entre secuencias repetidas	62
III. 3. ANALISIS DE LAS DELECCIONES INDUCIDAS POR RECOMBINACION ESPECIFICA DE SITIO	69
III. 3. 1. Aislamiento y caracterización de fragmentos de DNA iniciadores de la recombinación	69
III. 3. 2. Análisis de la recombinación inducida por el sitio <i>FRT</i>	72
III. 4. RECOMBINACION INDUCIDA POR LA MUTACION <i>hpr1</i> : ASOCIACION CON LA TRANSCRIPCION	78
III. 4. 1. Análisis genético de las deleciones estimuladas por la mutación <i>hpr1</i>	78
III. 4. 1. 1. El fenotipo de hiper-recombinación de <i>hpr1Δ</i> no es	

general a todos los sistemas de repeticiones	78
III. 4. 1. 2. El fenotipo de hiper-recombinación de <i>hpr1</i> no depende de la secuencia <i>per se</i> o del tamaño del fragmento de DNA situado entre las repeticiones	80
III. 4. 1. 3. Los sistemas LNA y LNB con fenotipos de recombinación diferentes poseen grados de superenrollamiento distintos	83
III. 4. 1. 4. Análisis de la transcripción en los sistemas de repeticiones	84
III. 4. 1. 5. Dependencia de los fenotipos de hiper-recombinación y de regulación de la transcripción de <i>hpr1</i> de la transcripción de determinadas regiones de la secuencia intermedia	89
III. 4. 1. 6. El fenotipo hiper-recombinante de <i>hpr1</i> no depende de la presencia de promotores de genes regulados por Hpr1p	90
III. 4. 2. Análisis estructural de la cromatina en estirpes <i>hpr1</i>	92
III. 4. 2. 1. Sensibilidad a nucleasa micrococcal (MNasa) de la cromatina en estirpes <i>hpr1Δ</i>	92
III. 4. 2. 2. Análisis de la estructura de los promotores dependientes de <i>hpr1 GAL1</i> y MMTV	93
<b>IV. DISCUSION</b>	101
IV. 1. FORMACIÓN DE DELECCIONES ENTRE REPETICIONES DIRECTAS	101
IV. 1. 1. Mecanismos de formación de las deleciones	101
IV. 1. 2. La endonucleasa Rad1/Rad10 es necesaria para a invasión de cadena sencilla y el SSA	106
IV. 1. 3. Importancia del intercambio recíproco, la invasión de cadena sencilla y el realineamiento de cadena sencilla en la formación total de deleciones	108
IV. 2. DELECCIONES ESTIMULADAS POR LA MUTACION <i>hpr1</i>	109
IV. 2. 1. Las deleciones estimuladas por <i>hpr1</i> dependen de la elongación de determinadas regiones de la secuencia intermedia	109
IV. II. 2. El papel de Hpr1p en deleciones no está mediado por la activación de la transcripción	111
IV. 2. 3. La mutación <i>hpr1</i> no afecta a la estructura de la cromatina ni al grado de superhelicidad de plásmidos	111
IV. 2. 4. Iniciación de las deleciones estimuladas por <i>hpr1</i>	112
<b>V. CONCLUSIONES</b>	115



# **I. INTRODUCCION**

## I. INTRODUCCION

Los genomios de todos los organismos están constituidos por un número variable de secuencias repetidas, que pueden llegar a suponer el 50% del DNA total. Los fragmentos de DNA repetido pueden interactuar entre si de muy diversas formas dando lugar a reordenaciones genómicas, mediante procesos que en un sentido amplio denominamos recombinación. Aunque estas modificaciones pueden tener aspectos positivos desde el punto de vista evolutivo al generar diversidad, son en general deletéreas.

Es importante dividir las secuencias repetidas en cortas (<10 pb) y largas (>100 pb) en función del tamaño de la repetición, ya que cada grupo está sujeto a modificaciones producidas por mecanismos claramente diferentes. Las repeticiones cortas (bien invertidas o bien directas formando el DNA repetitivo simple, muy abundante en el genomio de eucariotas superiores) son el sustrato de reordenaciones asociadas principalmente a errores de la maquinaria de replicación/replicación del DNA, y son numerosas las enfermedades asociadas a inestabilidad de este tipo de DNA, como el síndrome X-frágil (Fu *et al.* 1991), el síndrome de Huntington (The Huntington's disease collaborative research group 1993) o diversas formas de cáncer colorectal (Ionov *et al.* 1993; Thibodeau *et al.* 1993). Las secuencias repetidas largas son el sustrato de la recombinación homóloga, cuyo estudio ha constituido el objetivo principal de esta tesis.

La recombinación homóloga tiene lugar entre secuencias homólogas localizadas tanto en cromosomas homólogos (recombinación alélica) como en regiones y cromosomas no homólogos (recombinación ectópica). Se produce tanto en mitosis, donde está implicada fundamentalmente en la reparación de daños producidos en el DNA (Friedberg *et al.* 1991), como en meiosis, donde es esencial para la división reduccional de los cromosomas homólogos, así como para la generación de diversidad genética (Roeder 1990). La importancia de la recombinación se manifiesta en numerosos procesos celulares, que van desde los diferentes mecanismos de intercambio de DNA en procariotas (Dunderdale y West 1994) o el cambio de sexo en levaduras (Klar *et al.* 1984) a la producción de inmunoglobulinas en eucariotas superiores (Schwedler *et al.* 1990) o el mantenimiento de la homogeneidad de las secuencias de familias génicas (Baltimore 1981; Egel 1981). La recombinación homóloga puede ser una fuente de inestabilidad muy importante, generando deleciones, inversiones, translocaciones y otras aberraciones cromosómicas. Enfermedades como el síndrome de Werner (Fukuchi *et al.* 1989), la Ataxia telangectaxia (Meyn 1993) y ciertos tipos de

neoplasia, tales como leucemias, linfomas y sarcomas (Lanfrancone *et al.* 1994) confirman la importancia del control genético de la recombinación en eucariotas superiores.

En esta introducción abordaremos los aspectos más generales de la recombinación homóloga en levaduras, con algunos datos complementarios de bacterias, antes de profundizar en el conocimiento actual sobre la recombinación entre secuencias repetidas y los factores implicados en el control genético de la estabilidad de las secuencias repetidas. En este punto, nos centraremos en el papel concreto que la transcripción juega en el control de la recombinación y cuáles son los datos que sugieren una participación de la estructura de la cromatina en dicha relación. Finalmente nos referiremos a algunos aspectos generales de la recombinación específica de sitio necesarios para el desarrollo de esta tesis.



## **I. 1. Mecanismos y enzimología de la recombinación homóloga**

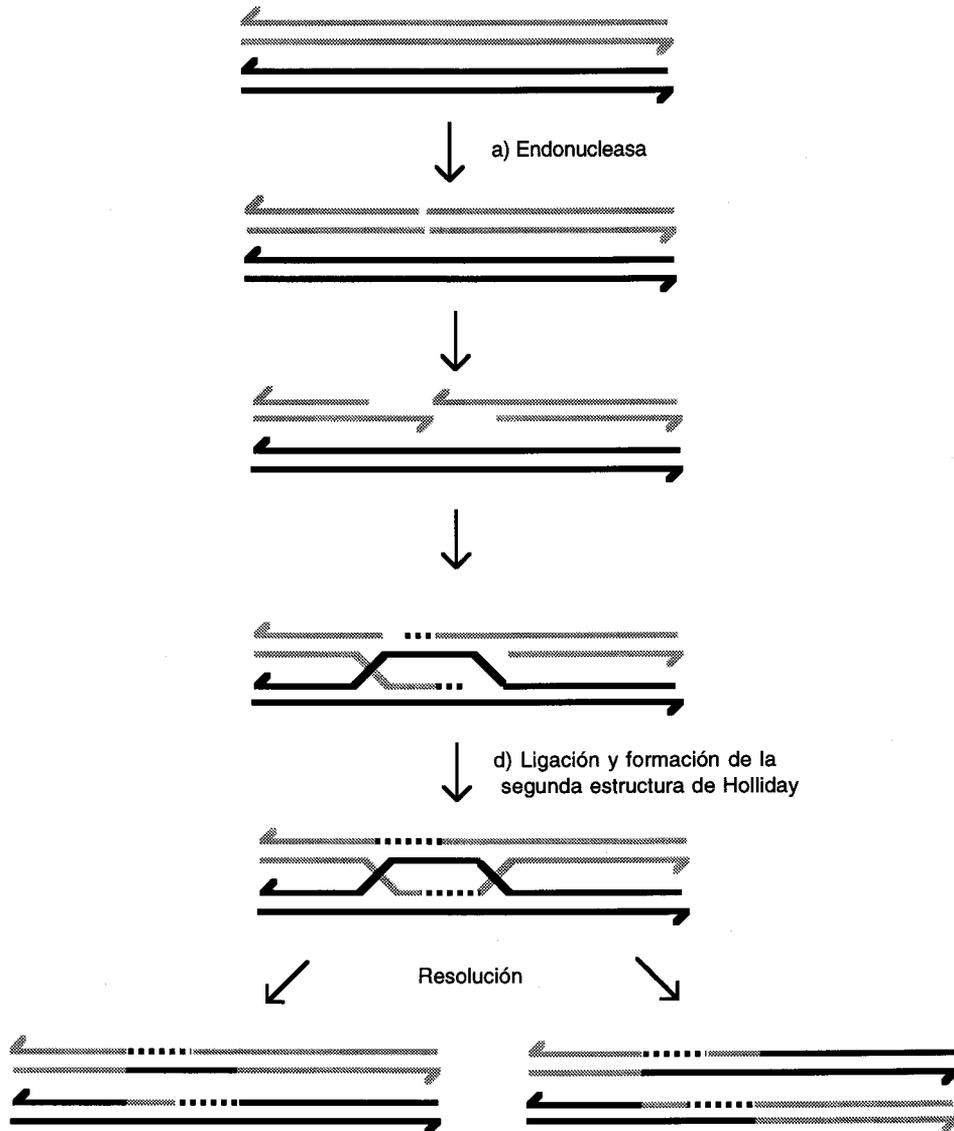
Dos son los sucesos de recombinación homóloga más importantes que se producen en la célula: la conversión génica y el entrecruzamiento. La conversión génica es la transferencia no recíproca de información desde una molécula a otra, mientras que el sobrecruzamiento es el intercambio recíproco de información entre dos moléculas de DNA (Hansting y Rosemberg 1992). Tanto en recombinación mitótica como meiótica la conversión génica y el entrecruzamiento están fuertemente asociados, lo que sugiere que son dos productos de un mismo suceso de recombinación (Esposito y Wagstaff 1981; Fogel *et al.* 1981; Orr-Weaver y Szostak 1983). Esta asociación ha sido introducida en todos los modelos de recombinación.

Los principales modelos de recombinación derivan del estudio de la recombinación genética en hongos y levaduras. Los elementos básicos fueron definidos por Holliday en el modelo que lleva su nombre (Holliday 1964): intercambio de cadenas entre secuencias homólogas, formación y reparación de heterodúplexes y migración y resolución de la estructura cruciforme o de Holliday.

### **I. 1. 1. Modelo de reparación de DSBs**

El modelo más aceptado actualmente es el de reparación de cortes de doble cadena (Szostak *et al.* 1983), adaptado por Sun *et al.* (1991) (FIGURA 1). Según este modelo el suceso de recombinación se inicia con un corte de doble cadena (DSB) en una de las moléculas homólogas (a); los extremos son degradados en sentido 5'→3' por una exonucleasa, lo que genera colas de DNA de una sola cadena con el extremo 3' libre (b); la invasión de la molécula homóloga por uno de

los extremos 3' genera una estructura cruciforme y dos regiones de heterodúplice asimétrico, y los extremos 3' de ambas cadenas sirven de cebadores para la síntesis de DNA usando las cadenas de la molécula homóloga como molde (d); las cadenas se cierran con la formación de una segunda estructura cruciforme (e); las estructuras cruciformes son finalmente resueltas dando lugar a intercambio no recíproco (f) o recíproco (g) entre las moléculas parentales dependiendo del tipo de resolución.



**FIGURA 1.** Modelo de reparación de cortes de doble cadena

Desde el punto de vista genético, este modelo predice que la molécula receptora de la información es la molécula donde se produce el DSB que inicia el suceso de recombinación. Esta es una característica importante respecto de los modelos que proponen que la recombinación se inicia por un corte de cadena sencilla, en los que la molécula donde se produce el corte es la donadora de la información. A nivel bioquímico, tres son las principales diferencias con otros modelos de recombinación: 1) la iniciación por un DSB, 2) la degradación exonucleolítica de los extremos 5' generados por el DSB, y 3) la formación de dos estructuras de Holliday.

La mayoría de los estudios sugieren que la recombinación mitótica y meiótica se inicia por un DSB: 1) En bacterias, levaduras y células animales la mayoría de los genes necesarios para la reparación de daños en el DNA producidos por agentes que causan DSBs (rayos X, rayos gamma o el agente radio mimético metil metano sulfonato (MMS)) están implicados en recombinación (Friedberg *et al.* 1991; Kowalckzykowski *et al.* 1994; Jeggo *et al.* 1995); 2) la reparación de DSBs producidos *in vivo* por nucleasas específicas de secuencia (endonucleasa *HO*, nucleasa mitocondrial *I-SceI*), así como la reparación de DNA linearizado *in vitro* por enzimas de restricción e introducido por transformación en la levadura se producen principalmente por recombinación con secuencias homólogas intactas (Rudin y Haber 1988; Orr-Weaver *et al.* 1981); 3) existe una fuerte correlación entre los puntos calientes de recombinación meiótica definidos genéticamente y la aparición de DSBs (Sun *et al.* 1989; Nicolas *et al.* 1989; Cao *et al.* 1990). En este sentido es interesante la observación de que la expresión del sistema cre-loxP del fago f1, que produce cortes de cadena sencilla en el DNA, estimula la recombinación. Sin embargo, en este caso la molécula receptora de la información es la cortada, lo que sugiere que el corte de cadena sencilla es procesado a un DSB (Strathern *et al.* 1991).

En células eucariotas no se conocen secuencias iniciadoras específicas de la recombinación homóloga en mitosis, a excepción de algunos ejemplos de recombinación específica, como la diana *HO* en el cambio de sexo en levadura (Klar *et al.* 1984). A diferencia de mitosis, en meiosis parece haber sitios preferidos para iniciar la recombinación. Esta conclusión viene apoyada por resultados genéticos y bioquímicos. Por un lado, estudios genéticos en levaduras, hongos y *D. melanogaster* han mostrado la existencia de gradientes de polaridad en la conversión génica a lo largo de los genes, que sugieren puntos concretos de iniciación, de forma que mientras más cerca está el marcador del suceso de iniciación mayor es la probabilidad de que sea convertido (Whitehouse 1982). Por otro lado, se ha realizado en levaduras un extensivo análisis bioquímico para mapear la acumulación de DSBs en mutantes *rad50S*, que son incapaces de

procesar los DSBs y los bloquean, lo que permite visualizarlos en electroforesis de campo pulsante. Mientras que en células vegetativas sólo aparece el patrón esperado de cromosomas, en meiosis se han observado bandas discretas indicativas de sitios de acumulación de DSBs (Zenvirth *et al.* 1992; Game 1993).

Tras el DSB, el modelo propone la degradación exonucleolítica de los extremos 5', lo que genera dos extremos 3' que pueden iniciar el intercambio de cadenas. Esta predicción ha sido confirmada en meiosis por Sun *et al.* (1991) en el sitio de iniciación de la conversión génica del gen de levaduras *ARG4* y en mitosis por Haber *et al.* en la recombinación inducida por DSB con la endonucleasa *HO*, tanto en el locus *MAT* como en construcciones de repeticiones artificiales (White y Haber 1990; Sugawara y Haber 1992).

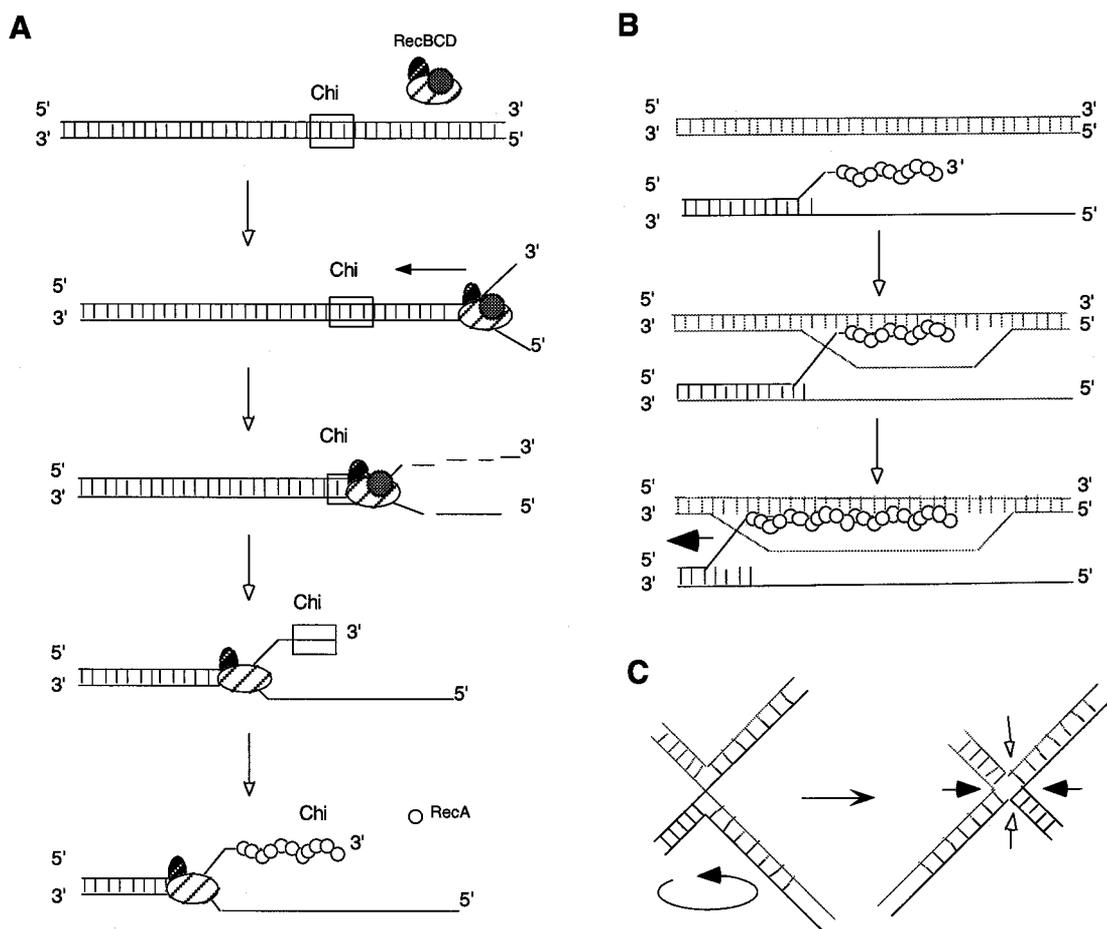
Por último, se han identificado en levaduras dobles uniones de Holliday en puntos calientes de recombinación meiótica asociados a DSBs (Schwacha y Kleckner 1995).

## **I. 1. 2 . Enzimología de la recombinación**

La enzimología de la recombinación se ha definido fundamentalmente en bacterias, por lo que repasaremos brevemente las funciones más importantes implicadas en el proceso, antes de centrarnos en las funciones conocidas de la recombinación en levaduras.

### **I. 1. 2 . 1. Enzimología de la recombinación en bacterias.**

Numerosos procesos asociados con recombinación en bacterias (conjugación, transformación, reparación de DSBs) comienzan con una molécula lineal de doble cadena que es procesada para generar DNA de cadena sencilla. Este procesamiento es catalizado por el complejo RecBCD (complejo con actividades helicasa y nucleasa de cadena sencilla y doble), que se une al extremo de cadena doble y avanza separando las cadenas gracias a la actividad helicasa. Durante este proceso la actividad endonucleasa del complejo genera cortes en la dos cadenas, con una mayor frecuencia en la cadena del extremo 3'. Cuando el complejo encuentra la secuencia iniciadora Chi (5'GCTGGTGG3') en la orientación adecuada se para momentaneamente, lo que favorece el corte a un lado de Chi. Esta interacción con Chi provoca la pérdida de la actividad endonucleasa específica de la cadena 3', probablemente por inactivación o pérdida de la subunidad RecD. Tras la pausa el complejo RecBC continúa desenrollando las dos cadenas lo que genera un extremo 3' recombinogénico (FIGURA 2A) (Eggleston y West 1996).



**FIGURA 2.**

**A.-** Modelo de iniciación de la recombinación catalizado por RecBCD.

**B.-** Intercambio de cadenas catalizado por RecA y formación y migración de la estructura de Holliday. El sentido de la migración se indica con una flecha. Tanto el intercambio de cadenas como la migración de la estructura de Holliday generan heterodúplice (cada cadena procede de un parental).

**C.-** Resolución de la estructura de Holliday. Las flechas representan los posibles puntos de corte y posterior ligación.

Las cadenas sencillas con extremos 3' son el sustrato necesario para el emparejamiento de secuencias homólogas y el intercambio de cadenas. Este proceso central en la recombinación es realizado en bacterias por RecA, que se une a DNA de cadena sencilla (ssDNA) y forma filamentos nucleoproteicos helicoidales en dirección 5'→3, lo que asegura que el extremo 3' quede cubierto y tenga mayor capacidad de invasión. Este complejo presináptico RecA-ssDNA-3' cataliza la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas (Kowalczykowski *et al.* 1994) (FIGURA 2B). RecA es esencial en recombinación y reparación en *E. coli*, hasta tal punto que los procesos de recombinación se definen en función de su dependencia de RecA. El intercambio y emparejamiento de cadenas homólogas genera regiones de heterodúplice, donde cada cadena procede de un parental diferente, y estructuras cruciformes que unen los dos dúplices parentales.

La estructura de Holliday puede migrar a lo largo del DNA gracias a la homología de las moléculas (FIGURA 2B). La migración es catalizada tanto por el complejo RuvAB como por la proteína RecG (Eggleston y West 1996). La migración y resolución de la estructura de Holliday son elementos esenciales en los modelos de recombinación para poder explicar la asociación entre conversión génica e intercambio recíproco. La resolución consiste en un corte simétrico y posterior unión con los extremos opuestos de la estructura cruciforme (FIGURA 2C). En *E. coli* la resolución es catalizada por la proteína RuvC (Connoli *et al.* 1991), requiere la presencia de homología y ocurre preferentemente en secuencias 5'AT TT G/C3', lo que sugiere que la estructura debe migrar hasta esos puntos, donde la eficiencia del corte es máxima (Shah *et al.* 1994). Los datos genéticos sugieren la existencia de al menos otra resolvasa en *E. coli*, dado que en el mutante *ruvC* aún se dan niveles considerables de recombinación.

### I. 1.3. Enzimología de la recombinación en levaduras.

En levaduras la proteína que define los procesos de recombinación por su importancia tanto en mitosis como en meiosis es Rad52p, aunque funcionalmente no tiene ninguna relación con RecA. De hecho, poco se conoce sobre su función en recombinación. No tiene homología con ninguna otra proteína conocida, y sólo se sabe que interactúa físicamente con Rad51p (Ogawa *et al.* 1993). Sin embargo, en mutantes *rad52* las células son incapaces de hacer meiosis, de acuerdo con el fenotipo esperado para una proteína de recombinación, y en mitosis los niveles de recombinación pueden llegar a ser hasta 1000 veces inferiores a los niveles silvestres (Petes *et al.* 1991).

En levaduras no se han identificado aún las proteínas responsables del DSB. El complejo de reparación por escisión Rad1/Rad10 es necesario en aquellos sucesos que se inician en regiones de DNA heterólogo; tras el DSB y la degradación exonucleolítica de los extremos 5', la cola 3' de DNA heterólogo que no puede participar en el heterodúplice formado entre secuencias homólogas es eliminada por la endonucleasa Rad1/Rad10 (Fishman Lovell y Haber 1992).

Poco se conoce acerca de las proteínas implicadas en la búsqueda de homología y el intercambio de cadenas. La proteína Rad51p es homóloga a RecA de *E. coli* y forma filamentos nucleoproteicos sobre DNA de doble cadena (Ogawa *et al.* 1993). Además se ha observado que posee actividad de intercambio de cadenas *in vitro* (Sung 1994). La proteína Dmc1p, específica de meiosis, es homóloga a RecA y Rad51p (Bishop *et al.* 1992). Tanto Rad51p como Dmc1p son necesarios en recombinación meiótica y se han inmunolocalizado en las mismas regiones que los complejos sinaptonémicos tempranos de la división reduccional, lo que sugiere que actúan en la primeras fases de la recombinación (Bishop 1994).

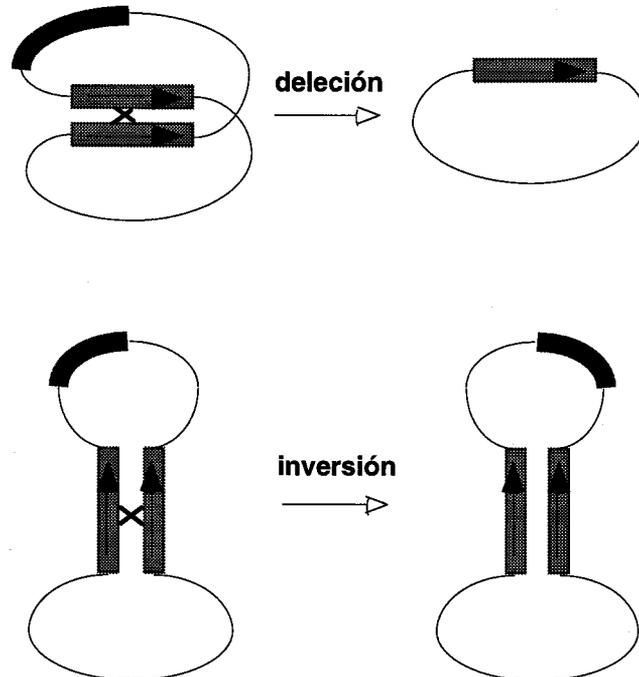
Otros genes que presentan homología a RecA son Rad55p y Rad57p (Kans 1991, Lovett 1994). A diferencia de RecA en bacterias, el análisis genético ha mostrado que estos genes no son esenciales para la recombinación, lo que sugiere que existen funciones redundantes implicadas en el emparejamiento de homólogos e intercambio de cadenas.

No se han identificado aún las funciones implicadas en la resolución de la estructura de Holliday. La proteína Endo X3, codificada por el gen nuclear *CCE1* corta estructuras cruciformes *in vitro*, pero parece ser necesaria sólo en recombinación mitocondrial (Esposito *et al.* 1994). La proteína Rad1p también es capaz de cortar estructuras de Holliday *in vitro* (Bardwell *et al.* 1994), pero los mutantes *rad1* no están afectados en recombinación entre cromosomas homólogos. Un candidato interesante para la resolución en levaduras es la proteína Msh4p. *MSH4* es homólogo al gen de reparación de emparejamientos erróneos *MutS* de *E. coli*, se expresa sólo en meiosis y no participa en reparación. Los mutantes *msh4Δ* presentan niveles silvestres de conversión génica y de segregación post-meiótica, pero la mitad de entrecruzamientos que la estirpes silvestres. Además se ha inmunolocalizado en el complejo sinaptinémico maduro en los estadios finales de la primera profase meiótica, y en una densidad que correlaciona con el número de quiasmas esperado por célula (Ross-Macdonald y Roeder 1994).

## **I. 2. Recombinación intramolecular entre secuencias repetidas**

El estudio de la recombinación intramolecular entre secuencias repetidas es importante no sólo por las implicaciones que este tipo de sucesos tienen en la biología de la célula sino por ser un sustrato idóneo para el análisis de la recombinación homóloga. Las secuencias repetidas se dividen en invertidas y directas. En ambos casos la recombinación puede dar lugar a conversión génica (el suceso se puede seguir si las repeticiones son dos marcadores heteroalélicos de un gen de prototrofia). Sin embargo, la recombinación recíproca genera diferentes productos en cada caso (FIGURA 3). En un sistema de repeticiones invertidas produce una inversión de la secuencia intermedia (se puede seguir con marcadores de restricción adecuados), mientras que en un sistema de repeticiones directas produce una delección de una de las repeticiones y de la secuencia intermedia (que se puede seguir por la pérdida de un marcador situado entre las repeticiones). El segundo producto de la recombinación recíproca entre las secuencias directas (la circularización de las secuencias delecionadas) no se puede observar, por lo que existe la posibilidad de que el recombinante se produzca por otros mecanismos que sólo den lugar a la delección. Estos posibles

mecanismos son no conservativos, porque sólo permanece uno de los productos recombinantes, a diferencia de la conversión génica o la recombinación recíproca donde las dos moléculas que interactúan permanecen tras la recombinación, por lo que son considerados procesos conservativos.



**FIGURA 3.** Recombinación recíproca entre repeticiones directas y repeticiones invertidas. El intercambio recíproco entre repeticiones directas produce una delección de la secuencia intermedia y de una de las repeticiones, mientras que entre repeticiones invertidas produce una inversión de la secuencia intermedia.

### I. 2. 1. Recombinación entre repeticiones invertidas.

Hay numerosas razones para creer que la recombinación entre repeticiones invertidas se produce por los mismos mecanismos que la recombinación alélica. Ambos procesos requieren funciones comunes (Wagstaff *et al.* 1985) y ambos son fuertemente dependientes de la proteína de reparación Rad52p (Malone y Esposito 1980; Jackson y Fink 1981; Willis y Klein 1987). Los trabajos iniciales con repeticiones invertidas mostraban que tanto en mitosis como en meiosis la conversión génica se daba preferentemente sin estar asociada a recombinación recíproca (Jackson y Fink 1981; Klein y Petes 1981; Klein 1984), aunque los sucesos de recombinación recíproca analizados si estaban asociados a conversión génica (Willis y Klein 1987), de acuerdo con los modelos de recombinación. La falta de asociación entre conversión génica y recombinación recíproca puede deberse a que el tamaño de la región de homología usado sea insuficiente para permitir la isomerización de la estructura de Holliday. En este sentido, se ha observado que la recombinación recíproca es más sensible al

tamaño de la homología que la conversión génica (Jinks-Robertson *et al.* 1993), y que existe una mayor asociación de la recombinación recíproca con los sucesos de conversión que cubren fragmentos largos de DNA (Ahn y Livingston 1986; Aguilera y Klein 1989). En estudios posteriores con repeticiones de mayor tamaño se ha observado una clara asociación entre conversión génica y recombinación recíproca, y viceversa, de acuerdo con lo que predicen los modelos (Aguilera y Klein 1989; Petes *et al.* 1991; Dornfeld y Livingston 1992).

Estudios genéticos recientes han mostrado que los niveles de conversión génica/recombinación recíproca en mutantes *rad51*, *rad54*, *rad55* y *rad57* son 2-10 veces inferiores a los niveles silvestres dependiendo del sistema de repeticiones invertidas usado. En todos los casos la mutación *rad52* es epistática sobre el resto de mutaciones *rad*, con frecuencias de recombinación 100 veces inferiores a la estirpes silvestre. Estos datos sugieren la existencia de funciones redundantes o rutas separadas dentro del mecanismo general de conversión génica/recombinación recíproca dependiente de *RAD52* (Aguilera 1995, Rattray y Symington 1995, Liefshitz *et al.* 1995).

### **I. 2. 2. Recombinación entre repeticiones directas.**

La conversión génica entre repeticiones directas presenta las mismas características que entre repeticiones invertidas o entre cromosomas homólogos (Malone y Esposito 1980; Jackson y Fink 1981; Willis y Klein 1987; Aguilera y Klein 1989; Petes *et al.* 1991; Dornfeld y Livingston 1992; Aguilera 1995, Rattray y Symington 1995, Liefshitz *et al.* 1995).

El análisis de la recombinación recíproca entre repeticiones directas es más complejo, ya que sólo es posible observar uno de los productos recombinantes: la deleción. Por tanto, existe la posibilidad de que las deleciones entre repeticiones directas se produzcan por mecanismos adicionales no conservativos. Si las deleciones ocurrieran mayoritariamente por un mecanismo de recombinación recíproca asociada a conversión génica, deberían tener las mismas características que la recombinación entre repeticiones invertidas. Sin embargo, hay una serie de resultados que indican lo contrario:

1.- El producto recíproco de una deleción, que es un plásmido episómico, se detecta a una frecuencia inferior al 5% del total de las deleciones observadas en dos sistemas intracromosómicos analizados (Schiestl *et al.* 1988; Santos-Rosa y Aguilera 1994).

2.- La frecuencia con la que ocurren las deleciones es independiente de la longitud de homología entre las secuencias repetidas (Yuan y Keil 1990; Jink-Robertson *et al.* 1993) a diferencia de la recombinación recíproca entre cromosomas homólogos (Petes *et al.* 1991), o entre repeticiones invertidas, donde

disminuye fuertemente y de forma lineal a medida que se reduce el tamaño de homología (Jinks-Robertson *et al.* 1993). En *E. coli* se ha visto un comportamiento similar con las deleciones dependientes e independientes de *RecA*; los sucesos independientes de *RecA* presentan poca dependencia de la longitud de la homología, mientras que los dependientes de *RecA* son más frecuentes cuanto mayor es la repetición (Bi y Liu 1994). Además se ha observado que las deleciones independientes de *RecA* disminuyen a medida que aumenta la distancia entre las repeticiones, llegando a alcanzar niveles 100 veces inferiores al pasar de 0 (repeticiones adyacentes) a 7 kb (Bi y Liu 1994; Lovett *et al.* 1994). En levaduras no hay datos al respecto en estudios de recombinación espontánea. En recombinación inducida por corte con *HO* en una de las repeticiones se ha observado que a medida que aumenta la distancia entre las repeticiones aumenta la conversión génica y disminuyen las deleciones (Fishman-Lovell *et al.* 1992). Por tanto las deleciones son independientes del tamaño de la secuencia homóloga y dependientes de la distancia entre las repeticiones, viéndose favorecidas por secuencias repetidas próximas.

3.- Los requerimientos genéticos de ambos procesos son claramente diferentes. Las deleciones no son estrictamente dependientes de *RAD52*, mientras que sí lo son la conversión génica (Jackson y Fink 1981) y la recombinación recíproca (Aguilera y Klein 1989; Petes *et al.* 1991); mutaciones en los genes de reparación *rad51*, *rad54*, *rad55* y *rad57* estimulan las deleciones, mientras que disminuyen la recombinación recíproca entre repeticiones invertidas (Aguilera 1995, Liefshitz *et al.* 1995; Liefshitz *et al.* 1995); mutaciones en los genes de reparación por excisión *RAD1* y *RAD10* y en los genes de reparación de emparejamientos erróneos *MSH2* y *MSH3* disminuyen los niveles de deleciones, sin afectar a la conversión génica (Schiestl y Prakash 1988; 1990; Saparbaev *et al.* 1996); mutaciones en los genes de las topoisomerasas Top1p, Top2p y Top3p, estimulan las deleciones y no afectan a otros tipos de recombinación (Aguilera y Klein 1994).

La existencia de más de una ruta de recombinación responsable de las deleciones es apoyada por estudios genéticos que muestran que el efecto del doble mutante *rad1 rad52* en deleciones es sinérgico respecto al efecto de las mutaciones simples (Schiestl y Prakash 1988; 1990; Thomas y Rothstein 1989; Petes *et al.* 1991). El análisis epistático de las mutaciones nulas *msh2Δ* y *msh3Δ* con *rad1* y *rad52* muestra que estos dos genes participan en la ruta dependiente de *RAD1* (Saparbaev *et al.* 1996).

El análisis de la recombinación entre repeticiones directas inducida por DSBs producidos con las endonucleasas *HO* y *I-SceI* ha contribuido enormemente a conocer los mecanismos responsables de las deleciones. Hay una serie de

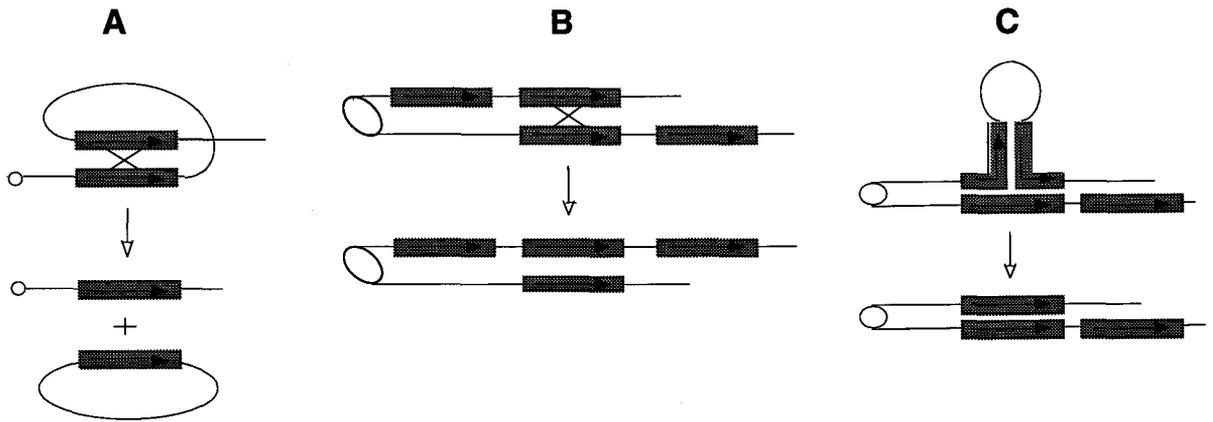
resultados que no se pueden explicar con un modelo de conversión génica/recombinación recíproca: 1) un DSB en la región de DNA situada entre las dos repeticiones directas estimula fuertemente las deleciones (Rudin y Haber 1988); 2) las deleciones inducidas por un DSB en una de las repeticiones con la endonucleasa *HO* aparecen antes que las conversiones génicas en repeticiones directas contiguas, y después en repeticiones directas separadas por 4.4 kb (Fishman-Lovell *et al.* 1992); y 3) las deleciones en la región del DNA ribosómico (rDNA) iniciadas por un DSB inducido por *HO* son independientes de *RAD52* (Ozemberger y Roeder 1991).

De acuerdo con los datos de recombinación espontánea, las deleciones inducidas por DSB son parcialmente dependientes de *RAD52* (Rudin y Haber 1988; Sugawara y Haber 1992; Mezard y Nicolas 1994), y de *RAD1* y *RAD10* (Ivanov y Haber 1995), e independientes de *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* (Ivanov *et al.* 1996).

### **I. 2. 3. Posibles mecanismos de formación de deleciones entre repeticiones directas**

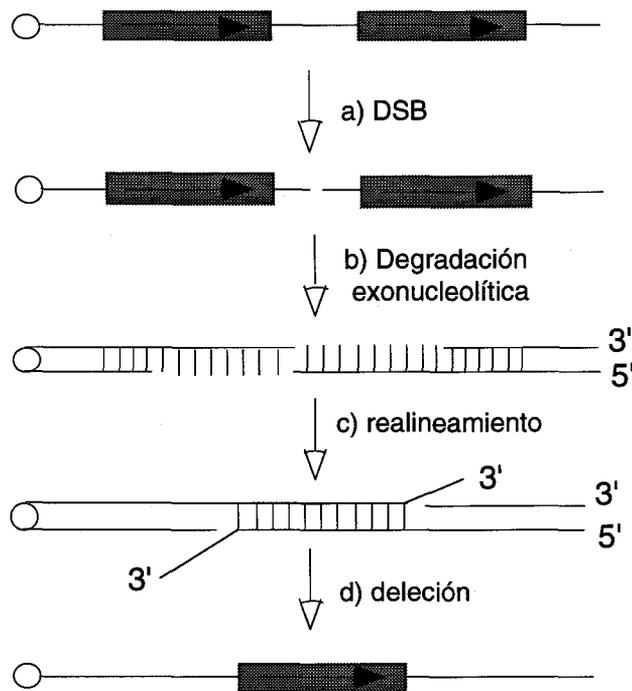
Todos los resultados mostrados sobre la formación de deleciones, tanto espontáneas como inducidas por un DSB, sugieren que pueden darse por diferentes mecanismos de recombinación. Se han propuesto tres posibles mecanismos. En primer lugar, las deleciones pueden generarse por recombinación recíproca asociada a conversión génica, probablemente según el modelo de reparación de DSBs (FIGURA 4A). Esta ruta de recombinación es fuertemente dependiente de *RAD52* en levaduras. Las deleciones se pueden originar también por intercambio desigual entre cromátidas hermanas, que produce una deleción en una cromátida y una duplicación en la cromátida hermana (FIGURA 4B), y por conversión génica desigual entre cromátidas hermanas, que produce una deleción en una cromátida y mantiene el sistema de repeticiones en la cromátida hermana (Figuras 4C) (Maloney y Fogel 1987; Rothstein *et al.* 1987). No obstante, estos son sucesos de recombinación que ocurren por el mismo mecanismo molecular de conversión génica y recombinación recíproca descrito previamente, y que probablemente sólo se diferencian en la forma en que se emparejan las secuencias repetidas.

Este mecanismo se inicia con un DSB (a), que puede darse tanto en la secuencia intermedia como en una de las repeticiones, y degradación exonucleolítica en sentido 5'→3', lo que genera colas de cadena sencilla con el extremo 3' libre (b), que pueden realinearse (c); tras la degradación de las colas de



**FIGURA 4.** Mecanismos de formación de deleciones por intercambio recíproco entre secuencias repetidas directas. Intercambio recíproco intramolecular (A); intercambio desigual entre cromátidas hermanas (B); conversión génica desigual entre cromátidas hermanas (C). Las secuencias repetidas se representan como cajas sombreadas.

Las deleciones se pueden producir además por el mecanismo no conservativo de realineamiento de cadenas sencillas (Lin *et al.* 1984; Ozemberger y Roeder 1991; Fishman-Lovell *et al.* 1992) (FIGURA 5).



**FIGURA 5.** Modelo de formación de deleciones por realineamiento de cadenas sencillas.

cadena sencilla que no hibridan y posterior ligación se produciría la delección de la secuencia intermedia y de una de las repeticiones (d). No se sabe si este mecanismo es o no dependiente de *RAD52*.

También se ha sugerido que las delecciones entre repeticiones largas pueden producirse por mecanismos asociados a la replicación, como el deslizamiento de la polimerasa de DNA responsable fundamentalmente de la estabilidad del DNA repetitivo simple (Streisinger *et al.* 1966; Kunkel 1973), según el cual la polimerasa de DNA "resbala" de una repetición a la otra durante el proceso de replicación, lo que genera una delección de una de las repeticiones. Este tipo de mecanismo es independiente de *RAD52*. Por otro lado, se ha sugerido que las delecciones independientes de *RecA* en *E. coli* se producen por desplazamiento e intercambio desigual de las cadenas complementarias que se generan en la horquilla de replicación. Este tipo de intercambio no requeriría *RecA*, ya que no hay invasión de cadenas, y sería sensible a la distancia entre las repeticiones al aumentar la probabilidad de que las cadenas estén fuera del mismo replicón (Lovett *et al.* 1993; Biu y Liu 1994).

### **I. 3. Control genético de la recombinación entre secuencias repetidas**

La recombinación ectópica en mitosis entre repeticiones introducidas artificialmente ocurre a la misma frecuencia que la recombinación alélica (Lichten y Haber 1989). En meiosis, aunque algo inferior que los correspondientes sucesos alélicos, es también muy elevada (Jinks-Robertson y Petes 1986; Lichten *et al.* 1987). Estos estudios han planteado la paradoja de cómo las células mantienen la integridad del genomio con niveles tan altos de recombinación ectópica, sobre todo en eucariotas superiores donde el DNA repetido es muy abundante.

El análisis de la recombinación entre secuencias naturales muestra que la recombinación ectópica es baja. Así, la recombinación entre elementos Ty dispersos por el genomio, que constituyen el 1-2% del DNA total de la levadura, es claramente inferior a la recombinación alélica, y además los sucesos de recombinación son fundamentalmente conversiones génicas no asociados a recombinación recíproca (Melamed *et al.* 1992). El estudio de la dependencia de diferentes genes *RAD* en la recombinación intracromosómica (tanto conversión génica como delecciones entre repeticiones directas) entre los elementos naturales Ty y secuencias repetidas introducidas artificialmente no muestra ningún comportamiento diferencial entre los sistemas, lo que sugiere que ambos sucesos de recombinación se producen por los mismos mecanismos en los dos tipos de repeticiones. En ambos casos mutaciones en los genes *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* disminuyen parcialmente la conversión génica e estimulan las delecciones

entre repeticiones directas (Liefshitz *et al.* 1995). Otro ejemplo de regulación de la recombinación de secuencias naturales es el cambio de sexo en levaduras. Este proceso se produce por reparación de un DSB introducido por la endonucleasa *HO* en el locus *MAT* mediante conversión génica. La molécula donadora de la información es una copia transcripcionalmente silenciada situada en otro loci (*HMR* o *HML*) (Strathern *et al.* 1982). A diferencia de otros sucesos de conversión génica, donde la recombinación recíproca está asociada a la conversión génica en un porcentaje que puede llegar al 50% (Aguilera y Klein 1989; Petes *et al.* 1991; Dornfeld y Livinstong 1992), la conversión génica en el cambio de sexo en levaduras se produce sin apenas asociación a la recombinación recíproca (Haber 1983; Klar *et al.* 1984).

Como se ha indicado anteriormente, la recombinación recíproca es más sensible al tamaño de la repetición que la conversión génica (Jinks-Robertson *et al.* 1993), lo que explicaría en parte la menor tasa de recombinación recíproca en secuencias naturales como el RNA transferente (tRNA) o las secuencias  $\delta$  de los elementos Ty. Por otro lado, la célula parece haber desarrollado mecanismos activos para mantener estable el DNA repetido natural.

### **I. 3. 1. Mutaciones que aumentan la inestabilidad de secuencias repetidas**

Una de las formas de conocer los factores implicados en la recombinación y estabilidad de secuencias repetidas es mediante el análisis de mutaciones que producen una mayor frecuencia de recombinación entre secuencias repetidas. La hiper-recombinación puede resultar de un incremento en el sustrato de recombinación (por ejemplo, un mayor número de DSBs), o de la eliminación de posibles mecanismos de control negativo de la recombinación entre secuencias repetidas.

La búsqueda de mutantes hiper-recombinantes ha mostrado que mutaciones en genes de replicación y reparación acumulan lesiones que son recombinogénicas, y por tanto afectan a todo tipo de recombinación mitótica, ya sea entre cromosomas homólogos o entre secuencias repetidas. En *E. coli*, mutaciones en el gen de la ligasa (*Lig*), de la polimerasa de DNA (*PoIA*), de la helicasa II de DNA (*UvrD*), de los genes de reparación de emparejamientos erróneos (*MutH*, *MutL* y *MutS*) son hiper-recombinantes tanto en recombinación entre repeticiones directas como invertidas (Zieg *et al.* 1978; Schofield *et al.* 1992; Konrad 1977; Feinstein y Low 1986). En *S. cerevisiae* se ha observado que mutaciones en los genes estructurales de las polimerasa I y II de DNA (*POL1* y *POL2*), en el gen de la ligasa (*CDC9*), en las helicasas de DNA codificadas por los genes *RAD3* y *HPR5/SRS2*, y en otros genes de ciclo celular de función aún

desconocida (*CDC5*, *CDC6*, *CDC13*, etc) producen hiper-recombinación tanto en repeticiones directas como en repeticiones invertidas y cromosomas homólogos (Hartwell y Smith 1985; Aguilera y Klein 1994).

Existe un segundo grupo de genes en levadura cuyas mutaciones estimulan de forma específica las deleciones entre repeticiones directas, con incrementos que pueden llegar a ser de hasta 1000 veces respecto a los niveles silvestres. Entre estos genes destacan los genes de las topoisomeras I, II y III (*TOP1*, *TOP2* y *TOP3*, respectivamente), el gen regulador de la transcripción *SIR2*, implicado en silenciamiento del locus *MAT*, los genes *RRM3* y *HPR1* (ver más adelante), los genes de reparación *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* (Aguilera 1995, Rattray y Symington 1995, Liefshitz *et al.* 1995) y los genes de regulación de la transcripción *SPT4* y *SPT5* (Malagón y Aguilera 1996). El efecto de las mutaciones en estos genes es específico de los sistemas de repeticiones usados. Así, *top1* y *top2* afectan sólo a las repeticiones del rDNA (Christman *et al.* 1988), *top3* a repeticiones  $\delta$  (Wallis *et al.* 1989), *rrm3* a rDNA y al conjunto natural de repeticiones del gen *CUP1* (Keil y McWilliams 1993) y *sir2* sólo a rDNA en meiosis (Gottlieb y Esposito 1989).

Tanto por el fuerte incremento en la frecuencia de deleciones (>1000 veces sobre los niveles silvestres) como por su especificidad (sólo afecta a las deleciones entre repeticiones directas), la mutación *hpr1* es idónea para conocer los mecanismos de recombinación responsables de la estabilidad de las repeticiones directas en el DNA.

### **I. 3. 2. Recombinación entre repeticiones directas en mutantes *hpr1***

La mutación hiper-recombinante *hpr1* es particularmente útil para el análisis de las deleciones entre repeticiones directas. La mutación nula *hpr1 $\Delta$*  produce un incremento de hasta 2000 veces en la frecuencia de deleciones, medidas en diferentes sistemas cromosómicos de repeticiones directas (Aguilera y Klein 1989; 1990; Santos-Rosa y Aguilera 1994; Fan y Klein 1994). Sin embargo, no afecta a la recombinación entre las repeticiones directas del rDNA (Aguilera y Klein 1990), a la recombinación desigual entre cromátidas hermanas, a la recombinación plásmido-cromosoma, a la recombinación recíproca y a la conversión génica (Aguilera y Klein 1989; Santos-Rosa y Aguilera 1994). Por otro lado, la hiper-recombinación no se debe a un defecto en reparación, ya que la estirpe mutante presenta niveles silvestres de sensibilidad a MMS y a radiación ultravioleta, o replicación, pues los mutantes hiper-recombinantes de replicación suelen ser condicionales o presentar sensibilidad a MMS (Aguilera y Klein 1990).

La proteína Hpr1p presenta homología (48.8% de homología; 24.8 de identidad) en el extremo carboxi-terminal con Top1p, aunque no contiene la

tirosina activa de Top1p ni homología con la topoisomerasa de humanos, por lo que es improbable que sea una topoisomerasa. Sin embargo, dado que los dobles mutantes *hpr1 top1*, *hpr1 top2* y *hpr1 top3* crecen bastante mal, y que las topoisomerasas presentan también fenotipos de hiper-recombinación en diferentes sistemas de repeticiones directas (apartado I. 3. 1), no se descarta que la proteína Hpr1p pueda estar relacionada funcionalmente con las topoisomerasas (Aguilera y Klein 1990).

Las deleciones estimuladas por la mutación *hpr1*, al igual que las deleciones producidas en estirpes silvestres, son parcialmente dependientes de *RAD52* y parcialmente dependientes de *RAD1*, siendo el efecto de recombinación del doble mutante *rad52 rad1* sinérgico sobre el de los mutantes simples (Santos-Rosa y Aguilera 1994). La dependencia parcial de *RAD52* y *RAD1* y la especificidad del fenotipo de recombinación sugieren que las deleciones estimuladas por *hpr1* se producen por los mismos mecanismos de recombinación que generan las deleciones en estirpes silvestres. De acuerdo con esta idea, Santos-Rosa y Aguilera han detectado el producto recíproco de la deleción (plásmido episómico) en menos del 2% de las deleciones (Santos-Rosa y Aguilera 1994), de acuerdo con los datos obtenidos en estirpes silvestres (Schiestl *et al.* 1989; Santos-Rosa y Aguilera 1994).

El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* parece producirse por un fuerte incremento en el número de lesiones o daños en el DNA, de forma que cuando se producen en regiones flanqueadas por repeticiones directas se reparan eficientemente por mecanismos no conservativos que producen una deleción. Cuando el daño se produce en otra posición sólo es posible la reparación por recombinación con un cromosoma homólogo. Al ser menos eficiente este segundo mecanismo se produciría un incremento en la pérdida de cromosomas. Se ha observado que *hpr1* produce un incremento en la frecuencia de pérdida de cromosomas de 100 veces respecto a los niveles silvestres. Dado que el nivel de recombinación en un sistema de 14 kb es del 2%, este resultado sugiere que el efecto de *hpr1* debe ser específico de secuencias o regiones del DNA. En caso contrario el número de lesiones acumuladas sería tan elevado que produciría letalidad (Santos-Rosa y Aguilera 1994).

### **I. 3. 2. 1. Papel de *HPR1* en transcripción**

La proteína Hpr1p es necesaria para la activación de numerosos genes no relacionados (*GAL1*, *HO*, *ADH1* y *SUC2*), por lo que se considera un regulador positivo de la transcripción (Fan y Klein 1994; Zhu *et al.* 1995). Se ha observado una supresión parcial del fenotipo de activación de *hpr1* por la mutación *sin2*, que afecta a una proteína tipo HMG1p relacionada con la cromatina. Este dato, junto

con una mayor sensibilidad a metilación por Dam de dos promotores de genes dependientes de *HPR1*, han llevado a Zhu *et al.* (1995) a sugerir que los fenotipos de transcripción y recombinación de *hpr1* estén mediados por un efecto general de la proteína Hpr1p en la estructura de la cromatina.

Con objeto de comprender el efecto de *HPR1* en recombinación, dos grupos independientes han buscado mutantes supresores de *hpr1*. Santos-Rosa y Aguilera (1995) han buscado supresores del fenotipo de hiper-recombinación, mientras que Fan y Klein (1994) han buscado supresores del fenotipo de falta de crecimiento a 37°C. En ambos casos los supresores son componentes del holoenzima de la polimerasa II (Fan *et al.* 1996; Piruat y Aguilera en prensa) o reguladores de la transcripción (Santos-Rosa *et al.* 1996; Piruat *et al.* datos sin publicar).

Los supresores del fenotipo de termosensibilidad de *hpr1* (*soh*) son mutaciones en el factor de transcripción general TFIIIB (*soh4*) y en *RPB2* (*soh2*), que codifica la segunda subunidad más grande de polIII. Ambos suprimen parcialmente el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* (Fan *et al.* 1996). Entre los supresores del fenotipo de hiper-recombinación (*hrs*) destacan *hrs1* y *hrs2*, que suprimen totalmente la recombinación estimulada por *hpr1*. La mutación *hrs1* mapea en el gen *HRS1/PGD1*, que es un factor de transcripción general (Santos-Rosa *et al.* 1996; Piruat *et al.* datos sin publicar). La mutación *hrs2* mapea en el gen *SRB2*, que codifica una de las proteínas del complejo mediador del holoenzima (Koleske *et al.* 1992; Piruat y Aguilera en prensa). Además de suprimir totalmente las deleciones estimuladas por *hpr1*, *srb2-101* (*hrs2-1*) es sensible a MMS, lo que conecta los fenotipos de transcripción, recombinación y reparación (Piruat y Aguilera en prensa).

#### **I. 4. Control de la recombinación por la transcripción**

Uno de los aspectos más interesantes del control de la recombinación en general y entre secuencias repetidas en concreto, es su conexión con la transcripción, por lo que hemos decidido introducir este factor como un punto independiente. Antes de analizar la relación entre ambos procesos consideraremos los aspectos más generales de la transcripción en levaduras y el papel que juega en la regulación transcripcional la estructura de la cromatina.

##### **I. 4. 1. Transcripción en levaduras**

La transcripción de los genes eucariotas es llevada a cabo por la polimerasa II de RNA (polIII), en un proceso altamente regulado en el que intervienen numerosos factores que interactúan entre sí y con secuencias en el DNA. Para la

transcripción basal se necesitan, además de las diferentes subunidades de polII, los factores generales de la transcripción TFIID (que contiene la proteína de unión a la secuencia TATA (TBP) y las proteínas asociadas a TBP (TAFs)), TFIIA, TFIIB, TFIIE y TFIIH (Zawell y Reimberg 1995). La regulación de la transcripción requiere la participación de activadores y represores, que reconocen secuencias específicas situadas normalmente en la región 5' de los genes y que interactúan con diferentes componentes de la maquinaria basal, como las TAFs o algunas proteínas del llamado mediador de la regulación transcripcional (*SRB/SSN*) (Koleske y Young 1995; Song *et al.* 1996), que actúan como dianas de los reguladores transcripcionales. Esta interacción está mediada en numerosos casos por proteínas que reciben el nombre de cofactores, tanto positivos como negativos, y que actúan como puente entre los reguladores transcripcionales y la maquinaria basal (Zawell y Reimberg 1995). Los factores de transcripción estimularían la iniciación catalizando los diferentes pasos en el proceso de ensamblaje del complejo de transcripción.

Los diferentes componentes de la maquinaria basal de transcripción forman parte de un macrocomplejo que recibe el nombre de holoenzima (Koleske y Young 1994; 1995), y que en levaduras está constituido por la polII, los factores TFIIA, TFIIB y TFIIH, el llamado mediador de la regulación transcripcional, formado por las proteínas *Srb/Ssn* (Koleske y Young 1994), un subcomplejo del mediador formado por los reguladores transcripcionales Sin4p, Gal11p, Rgr1p y una proteína de 50 kDa (Li *et al.* 1995), y el complejo de transcripción SWI/SNF (Wilson *et al.* 1996).

Una vez que el holoenzima se une al promotor, requiere la acción de TFIIH y TFIIE para que comience la elongación, probablemente catalizando algún cambio estructural en el complejo ternario de iniciación DNA-polII. En el proceso de elongación parece tener un papel importante la fosforilación del extremo carboxi-terminal de la subunidad más grande de la polII (CTD) (Zawell y Reimberg 1995). Durante el proceso de elongación y fundamentalmente en las zonas próximas al promotor, el complejo de elongación hace una pausa en sitios concretos. En diferentes genes se ha observado que el CTD del complejo de transcripción antes y en el sitio de pausa está en la forma no fosforilada, y tras la pausa en la forma fosforilada (O'Brien *et al.* 1994). Para completar la transcripción la polimerasa tiene que leer esos sitios de pausa, en un proceso que cataliza el factor de elongación TFIIIS, y que requiere corte del extremo 3' de la cadena de RNA que se está sintetizando (Kassavatis y Geiduschek 1993).

#### **I. 4. 2. Papel de la cromatina en la regulación transcripcional**

El sustrato natural de la transcripción no es el DNA desnudo sino la cromatina. La organización en nucleosomas del DNA supone un obstáculo para la

unión tanto de los reguladores como de la maquinaria basal de transcripción, que la célula tiene que eliminar durante el proceso de activación transcripcional (Wolffe 1994). Además de esta función de represión de la transcripción, se ha propuesto recientemente un papel activo de los nucleosomas en el proceso de activación, permitiendo una correcta interacción de los factores de transcripción entre sí y con el DNA (Candau *et al.* 1996; Chavez y Beato datos sin publicar).

El complejo SWI/SNF, necesario para la activación de numerosos genes no relacionados fisiológicamente, estimula *in vitro* la unión de factores de transcripción y de TBP a sus dianas en el DNA, a la vez que produce una remodelación de la estructura de la cromatina (Cute *et al.* 1994; Kwon *et al.* 1994; Imbalzano *et al.* 1994), por lo que se cree que es necesario en activación para eliminar el aspecto represor de la cromatina y favorecer la unión de los diferentes factores de transcripción (Winston y Carlson 1992). Por otro lado están los genes *SIN/SPT*, que cuando mutados eliminan la falta de activación de los mutantes *swi/snf*. Algunos de estos genes codifican histonas o proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina, lo que sugiere que las mutaciones en estos genes eliminan la necesidad de reclutar el complejo SWI/SNF suprimiendo el estado represivo de la cromatina (Winston y Carlson 1992).

De acuerdo con esta visión dinámica de la cromatina en la regulación transcripcional, se ha observado que el proceso de activación de la transcripción está asociado a cambios estructurales de las regiones reguladoras que se detectan por una modificación en el perfil de sensibilidad a nucleasas, principalmente a nucleasa micrococcal (MNasa) y a DNasaI. Estas modificaciones dependen de la unión de los activadores a las regiones promotoras, que junto con factores de remodelación del DNA favorecerían la unión de nuevos factores y de la maquinaria de transcripción general (Beato *et al.* 1996).

El promotor de MMTV es uno de los sistemas mejor caracterizados en el análisis del efecto de la estructura de la cromatina sobre la regulación transcripcional en células animales. Se activa ante la presencia de hormonas esteroides, estando mediada la respuesta por el receptor de hormona (GR). La activación requiere además el factor nuclear I (NFI) (Beato *et al.* 1996). Recientemente se ha caracterizado en *S. cerevisiae* y presenta el mismo comportamiento funcional y estructural que en células animales (Chavez *et al.* 1995). Tras la administración con la hormona hay un cambio en la región de DNA que cubre el nucleosoma B (que engloba los sitios de unión a hormona y a NF-I) que se manifiesta por la aparición de sitios de hipersensibilidad a DNasaI dependientes de hormona (Zaret y Yamamoto 1984). Otro promotor ampliamente usado en estudios de estructura en levadura es el del gen *GAL1*. El gen *GAL1* se activa en presencia de galactosa como fuente de carbono, y se reprime en

presencia de glucosa. La activación del promotor va acompañada de ligeros cambios en el patrón de sensibilidad a MNasa (Fedor y Komberg 1989).

#### I. 4. 3. Relación entre recombinación y transcripción

La estimulación de la recombinación por transcripción es un fenómeno descrito tanto en procariotas como eucariotas. Los primeros datos que reflejan esta conexión provienen del aislamiento en levaduras del fragmento *HOT1* como una secuencia estimuladora de la recombinación (entre 25 y 100 veces) (Keil y Roeder 1984). *HOT1* contiene el promotor y un potenciador de la transcripción dependiente de la polimerasa I de RNA de los genes ribosómicos (Voelker-Meiman *et al.* 1987). La estimulación de la recombinación depende de la transcripción a partir del promotor de *HOT1* y de la elongación a lo largo del sistema de recombinación (Stewart y Roeder 1989). También se ha demostrado que la estimulación de la transcripción desde el promotor *GAL1-10* en un sistema de repeticiones directas incrementa de forma específica las deleciones entre las repeticiones (15 veces), sin afectar a conversión génica (Thomas y Rothstein 1989a). Las deleciones estimuladas en este sistema son dependientes de *RAD1* y *RAD52* (Thomas y Rothstein 1989b). En células animales la transcripción también estimula la recombinación intracromosómica entre repeticiones directas e invertidas (Nickoloff 1992), y la recombinación específica que genera las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en las células B (Lutzker *et al.* 1988). En *E. coli*, la transcripción estimula la producción de deleciones por recombinación no homóloga en plásmidos derivados de pBR322 (Vilette *et al.* 1995), así como diversos procesos de recombinación específica (Dul y Drexler 1988).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la recombinación estimulada por transcripción. En primer lugar, la maquinaria de transcripción puede tener un papel directo en la estimulación de la recombinación reclutando las proteínas de recombinación. Así, se ha observado que la unión de los factores de transcripción Bas1p, Bas2p y Rap1p a sus dianas en el DNA es necesaria para la recombinación (White *et al.* 1991). En este sentido es interesante indicar que la proteína de recombinación hRad51p es un componente estructural del holoenzima de células humanas, así como las proteínas Ku y DNA-PKcs, implicadas en reparación de cortes de doble cadena y recombinación específica V(D)J (Maldonado *et al.* 1996). Este acoplamiento entre diferentes maquinarias ha sido ya descrito entre transcripción y reparación por excisión, donde se ha observado que las proteínas de reparación Rad3p, Rad25p (Drapkin *et al.* 1994), Rad1p y Rad10p (Maldonado *et al.* 1996) son componentes estructurales del holoenzima.

La estimulación de la recombinación puede ser también consecuencia de un efecto indirecto de la transcripción sobre la estructura de la cromatina. En

principio, la apertura de las cadenas en el proceso de elongación podría favorecer el emparejamiento de las secuencias homólogas (Ikeda y Matsumoto 1979). Otra alternativa es que los dominios de superenrollamiento generados durante la transcripción regulen otros procesos metabólicos del DNA como la expresión génica o la recombinación (Dröge 1994), bien acercando las secuencias homólogas o bien generando un grado de superenrollamiento adecuado para que actúe la maquinaria de recombinación. En levaduras se ha observado que la falta simultánea de las topoisomerasas Top1p y Top2p incrementa las deleciones por recombinación recíproca de las repeticiones del rDNA y que estas secuencias se mantienen como círculos autónomos (Kim y Wang 1989). Por último, la transcripción de las secuencias homólogas podría aumentar la accesibilidad de la maquinaria de recombinación, en concreto de las endonucleasas que inician el proceso. De acuerdo con esta hipótesis se ha observado que las secuencias donadoras en el proceso de conversión génica del locus *MAT* son cortadas por la endonucleasa *HO* cuando son transcritas activamente (Nasmyth *et al.* 1980; Klar *et al.* 1984).

Esta última hipótesis supone un papel represor de la cromatina en el proceso de recombinación similar al que se ha descrito en transcripción, y sugiere un atractivo modelo según el cual la transcripción estimularía la recombinación eliminando el aspecto represor de la cromatina. De acuerdo con este modelo se ha observado que mutaciones en los genes *SPT4* y *SPT6*, que codifican los componentes de un complejo que controla negativamente la transcripción probablemente estabilizando una estructura represora de la cromatina (Carlson y Winston 1992), estimulan la recombinación tanto en repeticiones invertidas como directas (Malagón y Aguilera 1996). Además, se ha observado que el intercambio de cadenas catalizado por RecA *in vitro* se inhibe por la cromatina (Ramdas *et al.* 1991), y que la transcripción del fragmento de DNA nucleosomizado activa el emparejamiento e intercambio de cadenas en un proceso que requiere síntesis de RNA y homología (Kotani y Kmiec 1994).

Otros resultados que conectan transcripción y recombinación a través de la estructura de la cromatina son la descripción de sitios de hipersensibilidad a DNasaI y a MNasa asociados a los puntos calientes de recombinación meiótica de levaduras *HIS4* y *ARG4* (Ohta *et al.* 1994; Wu y Lichten 1994; Fan y Petes 1996), y de hipersensibilidad a DNasaI en el punto caliente de recombinación del gen E beta (Shenkar *et al.* 1991).

## I. 5. Recombinación específica de sitio

A diferencia de la recombinación homóloga, que ocurre a lo largo de cualquier par de secuencias homólogas por una maquinaria general de recombinación, la recombinación específica de sitio ocurre sólo en secuencias y por recombinasas específicas de cada sistema.

El sistema de recombinación específica de sitio mejor conocido en eucariotas, y el que nos interesa para el desarrollo de esta tesis, es el sistema de inversión del círculo de 2  $\mu$  de *S. cerevisiae*. El círculo de 2  $\mu$  es un plásmido con dos repeticiones invertidas de aproximadamente 600 pb. Un intercambio recíproco catalizado por la recombinasa flipasa (producto del gen *FLP*) entre dos sitios específicos (*FRT*) dentro de las repeticiones invertidas, produce una inversión de la secuencia intermedia que parece estar implicada en la amplificación del número de copias del plásmido (Broach y Wolkert 1991 CSH; Futcher 1986). La diana *FRT* consiste en un segmento central de 8 pb (espaciador) flanqueado por dos repeticiones directas de 13 pb, a cada una de las cuales se une la flipasa cooperativamente. Tras la unión la enzima corta en *trans* una de las cadenas de la molécula opuesta cerca del espaciador, formándose un enlace covalente entre la flipasa y el extremo 3'. El extremo 5' libre ataca el enlace DNA-flipasa de la molécula opuesta, lo rompe y la enzima termina el proceso ligando los extremos y formando una cadena recombinante. El proceso recíproco en la otra cadena genera una estructura de Holliday que se resuelve finalmente por la flipasa (Stark *et al.* 1992). Estudios de recombinación inter e intramolecular con las repeticiones invertidas del círculo de 2  $\mu$  han mostrado que la naturaleza de los productos de la reacción depende exclusivamente de la orientación relativa y de la localización de los sitios *FRT* que interactúan (Broach y Wolkert 1991 CSH).

## I. 6. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar los mecanismos y factores implicados en la recombinación homóloga y la estabilidad de secuencias repetidas. Para ello nos hemos centrado en la recombinación entre repeticiones situadas tanto en orientación directa como invertida, por la importancia que tienen en el mantenimiento de la integridad del genomio y por las facilidades que ofrecen para el análisis de los diferentes factores que pueden afectar a la recombinación homóloga (Klein 1995).

Los aspectos concretos que hemos intentado resolver son: 1) qué mecanismos son responsables de las deleciones entre repeticiones directas y qué funciones están implicadas; 2) cómo se inician las deleciones a nivel espontáneo y qué papel tiene la iniciación en la determinación de las rutas que catalizan las deleciones; y 3) cuál es el papel de la transcripción en la regulación de la

recombinación, y si la estructura de la cromatina media de alguna forma en esta relación.

El estudio de los mecanismos responsables de las deleciones lo hemos abordado mediante el análisis genético de la recombinación entre repeticiones directas e invertidas a nivel espontáneo, tanto en estirpes silvestres como mutantes en diferentes genes *RAD*. Para ello hemos construido una serie de sistemas plasmídicos basados en la misma repetición, que se diferencian únicamente en la orientación de las repeticiones (directa o invertida) y en el tamaño y origen de la secuencia intermedia. Para complementar el análisis de la recombinación a nivel espontáneo hemos buscado mutantes deficientes en recombinación.

Para comprender el papel de la iniciación hemos analizado los mismos sistemas de repeticiones directas e invertidas induciendo la recombinación con DSBs en diferentes posiciones de los sistemas de repeticiones y con un sistema de recombinación específica de sitio que hemos encontrado en una búsqueda de secuencias iniciadoras de la recombinación.

El estudio de papel de la transcripción en recombinación y su relación con la estructura de la cromatina lo hemos abordado en el mutante hiper-recombinante *hpr1*.

## **II. MATERIALES Y METODOS**

## II. MATERIALES Y METODOS

### II. 1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

**Medio rico YEPD:** 1% de extracto de levadura; 2% de bacto-peptona; 2% de glucosa; suplementado con 20 mg/l de adenina.

**Medios mínimos SD y SG:** 0.17% de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 0.5% de sulfato amónico; 2% de glucosa (SD) ó 2% de galactosa (SG). La galactosa se filtró y añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

**Medio completo SC:** Consiste en el medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina, lisina y metionina y las bases adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman *et al.* (1986). En todos los medios utilizados en esta tesis se ha detallado la ausencia de cada requerimiento; p.ej. SC-Leu indica que el medio mínimo está suplementado con los aminoácidos y bases indicados previamente, menos leucina.

**Medio de esporulación (SPO):** 1% de acetato potásico; 0.1% de extracto de levadura; 0.005% de glucosa. Este medio se suplementó con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina, lisina y metionina y las bases adenina y uracilo a la mitad de la concentración descrita para el medio SC por Sherman *et al.* (1986).

**Medios suplementados con MMS:** Consisten en los medios SC o YEPD suplementados con 0.015-0.02% de metil-metano sulfonato (MMS). El MMS se añadió al medio autoclavado y enfriado hasta 60°C.

**Medios sin fosfato:** Se prepararon siguiendo el protocolo inicial de Rubin (1973) con las modificaciones descritas por Han *et al.* (1988). El extracto de levadura y la peptona en el caso de YEPD, y el YNB y el sulfato amónico en el caso de SC, se disolvieron en 300 ml de H<sub>2</sub>O. El fosfato inorgánico se precipitó añadiendo 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M y 10 ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado. El precipitado se eliminó por filtración y la solución se diluyó 3 veces, se le ajustó el pH y se le añadió el azúcar y los requerimientos.

**Medio SC+Can:** Consiste en el medio SC suplementado con L-sulfato de canavanina a la concentración de 100 mg/l ó 65 mg/l según fuese para estirpes diploides o haploides, respectivamente. La canavanina se añadió al medio autoclavado.

**Medio SC+FOA:** 0.17% de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 0.1% de L- prolina; 2% de glucosa; 500 mg/l de ácido 5-fluoro-uracílico (FOA). El medio se suplementó con los aminoácidos y bases indicados para

el medio SC, con el uracilo a una concentración de 10 mg/l. El FOA se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

**Medio LB:** 0.5% de extracto de levadura; 1% de bacto-triptona; 1% de NaCl.

Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos basados en pBR322 se añadió al medio ampicilina sódica a una concentración final de 65-100 mg/l (medio LB-amp).

**Medio SOB:** 0.5% de extracto de levadura; 2% de bacto-triptona; 0.005% de NaCl; KCl 250 mM ; MgSO<sub>4</sub> 20 mM. El MgSO<sub>4</sub> se añadió justo antes de usar el medio.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 2% de agar a los medios líquidos antes de autoclavarlos.

Todas las estirpes de levadura se incubaron a 30°C salvo que se indique otra temperatura. Para los cultivos líquidos se emplearon agitadores horizontales u orbitales. Las cepas de bacterias se incubaron a 37°C salvo que se indique otra temperatura. En el caso de cultivos líquidos se empleó agitación horizontal.

## II. 2. ESTIRPES

Las estirpes de levaduras utilizadas en esta tesis se detallan en la TABLA 1. La única estirpe de bacteria empleada fué DH5 $\alpha$  de *E. coli*.

**TABLA 1. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en esta tesis.**

Nombre	Genotipo	Procedencia
W303-1A	MATa <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	R. Rothstein
W303-1B	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	R. Rothstein
AWI-1B	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3 ade2 his3</i>	A. Aguilera
315-9C	MATa <i>leu2<math>\Delta</math>68 trp1 ura3-52 ade2-101 his3<math>\Delta</math>200</i>	H. Klein
X260-3A	MATa <i>ura3-52 rad52-1</i>	G. Fink
AWX-1C	MAT $\alpha$ <i>trp1 leu2 ade2 ura3 rad52-1</i>	Este estudio
FX315-5B	MAT $\alpha$ <i>ura3-52 trp1 leu2<math>\Delta</math>68 his3<math>\Delta</math>200 rad52-1</i>	Este estudio
FX315-2D	MAT $\alpha$ <i>ura3-52 trp1 leu2<math>\Delta</math>68 his3<math>\Delta</math>200 rad52-1</i>	Este estudio
FX315-4D	MATa <i>ura3-52 trp1 leu2<math>\Delta</math>68 his3<math>\Delta</math>200 rad52-1</i>	Este estudio
356-11A	MATa <i>leu2-3, 112 trp1 ura3-52 rad1-1</i>	H. Klein
AWF-2D	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 ura3-52 rad1-1</i>	Este estudio
AFW8-1A	MATa <i>ade2 ura3 leu2 trp1 his3 rad51<math>\Delta</math></i>	A. Aguilera
UWA-4A	MATa <i>leu2-3, 112 his3 ade2 trp1 rad10<math>\Delta</math>::URA3</i>	Este estudio
UWA-3C	MATa <i>leu2-3, 112 his3 ade2 trp1 rad10<math>\Delta</math>::URA3</i>	Este estudio
VW-YH5	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>200 lys2-801 ade2-101 ura3-52 rad10<math>\Delta</math>::URA3</i>	YGSC <sup>a</sup>

DBYW-1A	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5'</i>	Este estudio
DBYW-3C	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5'</i>	Este estudio
DBYW-1D	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5' hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	Este estudio
DBYW-3D	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5' hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	Este estudio
DBYW-4C	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5' hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	Este estudio
DBYFX-1A	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5' rad52-1</i>	Este estudio
DBYFX-2D	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5' rad52-1</i>	Este estudio
DBYFX-1B	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 his3 leu2<math>\Delta</math>3::URA3::leu2<math>\Delta</math>5'</i>	Este estudio
U678-4C	MAT $\alpha$ <i>hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i> Isogénica a W303-1A	H. Klein
AYW3-4D	MAT $\alpha$ <i>ade2-1 leu2-3, 112 ura3 trp1 his3 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	A. Aguilera
AYW3-5D	MAT $\alpha$ <i>ade2-1 leu2-3, 112 ura3 trp1 his3 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	A. Aguilera
AAW19-4B	MAT $\alpha$ <i>ade2 leu2-3, 112 ura3 trp1 his3 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>4::TRP1</i>	A. Aguilera
FWY-3B	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 leu2-3,112</i>	Este estudio
FWY-4B	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 leu2-3,112 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3</i>	Este estudio
FWY-6B	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 leu2-3,112 rad52-1</i>	Este estudio
FWY-6A	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 leu2-3,112 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 rad52-1</i>	Este estudio
FWY-3A	MAT $\alpha$ <i>ade2 ura3 trp1 leu2-3,112 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 rad52-1</i>	Este estudio
W303-L	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3-1 ade2-1 HIS3::L</i>	Este estudio
W303-LU	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3-1 ade2-1 HIS3::LU</i>	Este estudio
W303-SU	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 trp1 can1-100 ura3-1 ade2-1 HIS3::SU</i>	Este estudio
AAW19-L	MAT $\alpha$ <i>ade2 leu2-3, 112 ura3 trp1 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>4::TRP1 HIS3::L</i>	Este estudio
AAW19-LU	MAT $\alpha$ <i>ade2 leu2-3, 112 ura3 trp1 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>4::TRP1 HIS3::LU</i>	Este estudio
AAW19-SU	MAT $\alpha$ <i>ade2 leu2-3, 112 ura3 trp1 can1-100 hpr1<math>\Delta</math>4::TRP1 HIS3::SU</i>	Este estudio
FXL-6A	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 ura3 trp1 HIS3::L</i>	Este estudio
FXL-6D	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 trp1 ade2-1 HIS3::L</i>	Este estudio
FXL-1C	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 trp1 ade2-1 HIS3::L rad52-1</i>	Este estudio
FXL-5B	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 trp1 ade2-1 HIS3::L rad52-1</i>	Este estudio
FXL-1A	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L</i>	Este estudio
FXL-5C	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L</i>	Este estudio
FXL-4A	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 ade2-1 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L</i>	Este estudio
FXL-7B	MAT $\alpha$ <i>leu2-<math>\Delta</math>68 ura3 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L</i>	Este estudio
FXLU-1A	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 trp1 ade2 HIS3::LU</i>	Este estudio
FXLU-10B	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 trp1 HIS3::LU</i>	Este estudio
FXLU-2B	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 ura3 trp1 HIS3::LU rad52-1</i>	Este estudio
FXLU-13C	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 ura3 trp1 HIS3::LU rad52-1</i>	Este estudio
FXLU-2A	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 ade2 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L U</i>	Este estudio
FXLU-4C	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 ade2 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L U</i>	Este estudio
FXLU-1D	MAT $\alpha$ <i>leu2<math>\Delta</math>68 ura3 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::L U</i>	Este estudio
FXLU-10A	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 ade2-1 rad52-1 hpr1<math>\Delta</math>3::HIS3 HIS3::LU</i>	Este estudio

FXSU-3B	MAT $\alpha$ <i>leu</i> $\Delta$ 68 <i>ura3 trp1 ade2-1 HIS3::SU</i>	Este estudio
FXSU-10C	MAT $\alpha$ <i>leu2-3, 112 ura3 trp1 ade2-1 HIS3::SU</i>	Este estudio
FXSU-4C	MAT $\alpha$ <i>leu</i> $\Delta$ 68 <i>ura3 trp1 ade2-1 HIS3::SU rad52-1</i>	Este estudio
FXSU-11A	MAT $\alpha$ <i>leu</i> $\Delta$ 68 <i>ura3 trp1 ade2-1 HIS3::SU rad52-1</i>	Este estudio
FXSU-7A	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 hpr1</i> $\Delta$ 3:: <i>HIS3 HIS3::SU</i>	Este estudio
FXSU-2C	MAT $\alpha$ <i>leu2</i> $\Delta$ 68 <i>ura3 ade2 hpr1</i> $\Delta$ 3:: <i>HIS3 HIS3::SU</i>	Este estudio
FXSU-3D	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 ade2-1 rad52-1 hpr1</i> $\Delta$ 3:: <i>HIS3 HIS3::LU</i>	Este estudio
FXSU-4D	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 ura3 rad52-1 hpr1</i> $\Delta$ 3:: <i>HIS3 HIS3::LU</i>	Este estudio

---

<sup>a</sup>Yeast Genetic Stock Center (Berkeley, CA)

## II. 3. PLASMIDOS

**pRS314:** Plásmido centromérico basado en el vector pBluescript SK+. Consta de un fragmento de 518 pb que contiene el centrómero *CEN6* y el origen de replicación *ARSH4* de *S. cerevisiae*, del fragmento *Sall-XhoI* de 2.2 kb portador del gen *LEU2* y de la región de clonación múltiple (MCS) de pBluescript KS+ (Sikorski y Hieter 1989).

**pRS316:** Igual que pRS314 pero con el gen *URA3* en vez de *LEU2* (Sikorski y Hieter, 1989).

**pRS416:** Igual que pRS316 pero con la región MCS en la orientación contraria (Sikorski y Hieter 1989).

**pRS426:** Plásmido episómico basado en el vector pBluescript SK+. Consta de un fragmento de 518 pb que contiene el centrómero *CEN6* y el origen de replicación *ARSH4* de *S. cerevisiae*, el fragmento *Sall-XhoI* de 2.2 kb portador del gen *URA3* y de la región MCS de pBluescript KS+ (Christianson *et al.* 1992).

**pRS425:** Igual que pRS426 pero con el marcador *LEU2* en lugar de *URA3* (Christianson *et al.* 1992).

**pG1:** Plásmido episómico con el marcador *TRP1* (Schena *et al.* 1991).

**pGN795:** Plásmido episómico con el gen del receptor de glucocorticoides clonado en el sitio de clonación múltiple de pG1 (Yoshinaga *et al.* 1992).

**pAAH5:** Plásmido replicativo con el marcador *LEU2* (Ammerer 1994).

**pAA-CTF2:** Plásmido replicativo con el gen *CTF2*, que codifica el factor nuclear NF1, clonado en pAAH5 (Altmann *et al.* 1994).

**pPZ:** Plásmido centromérico con el marcador *TRP1* y el promotor de *PHO5* fusionado a *lacZ* (Cedido gentilmente por Hörtz).

**pRS303:** Plásmido integrativo basado en el vector pBluescript SK+. Consta del fragmento *Sall-XhoI* de 2.2 kb portador del gen *LEU2* y de la región MCS de pBluescript KS+ (Sikorski y Hieter 1989).

**YCp70:** Plásmido centromérico reaislado de una genoteca de DNA genómico construída por Spencer y Hieter en la diana *Sau3A* de pBS32. Es idéntico a pBS32 y contiene secuencias de pBR322, *CEN4*, *ARS1* y el marcador *LEU2* (Aguilera y Klein 1990).

**pBS32:** Idéntico a YCp70 (Aguilera y Klein 1990)

**YCpA13:** Plásmido centromérico original aislado de una genoteca de DNA genómico construída por Spencer y Hieter en la diana *Sau3A* de pBS32. Contiene un inserto de 11 Kb con el gen *HPR1* (Aguilera y Klein 1990).

**YIP5:** Plásmido integrativo constituido por un fragmento de 1.1 kb que contiene el gen *URA3* clonado en el sitio *Aval* de pBR322 (Struhl *et al.* 1979).

**pTZ18U:** Plásmido basado en el vector pUC18. Contiene el promotor del bacteriófago T7 y la región MCS de pUC18 en fase con el gen *lacZ'* de *E. coli* (Mead *et al.* 1986).

**pBluescriptII SK-:** Plásmido derivado de pUC19. (Stratagene).

**pJHH170:** Plásmido que contiene un fragmento *XhoI* que comienza en el ATG del gen *PFK1* de *S. cerevisiae* y acaba 300 pb detrás del codon de terminación de la traducción (Cedido gentilmente por J. H. Jürgen).

**pYA301:** Plásmido pBR322 con el fragmento *BamHI-EcoRI*, que contiene el gen *ACT1*, insertado en las dianas *BamHI-EcoRI* (Gallwitz and Sures 1980).

**pFV17:** Plásmido basado en el vector episómico YEp51-FLP. Contiene el gen *LEU2* como marcador y el gen *FLP* bajo control del promotor *GAL1* (Volkert and Broach 1986).

**p236:** Plásmido integrativo que contiene los genes *URA3* y *SUP11*, así como secuencias teloméricas de *S. cerevisiae* (Cedido gentilmente por P. Hiether).

**p425 TEF:** Plásmido episómico basado en pRS425 que contiene el origen de replicación del círculo de 2  $\mu$ , el gen *LEU2* y la región MCS de pBluescript KS<sup>+</sup> situada entre el promotor del gen *TEF* y el terminador del gen *CYC1* (Mumberg *et al.* 1995).

**p426 GAL:** Plásmido episómico pRS426 con el origen de replicación del círculo de 2  $\mu$ , el gen *URA3* y la región MCS de pBluescript KS<sup>+</sup> situada entre el promotor del gen *GAL1* y el terminador del gen *CYC1* (Mumberg *et al.* 1994).

**p416GAL1lacZ:** Plásmido centromérico basado en pRS416 que contiene el gen *URA3* y *lacZ* insertado en la región MCS de pBluescript KS<sup>+</sup> situada entre el promotor del gen *GAL1* y el terminador del gen *CYC1* (Mumberg *et al.* 1995).

**pRS416MMTVLTR:** Plásmido pRS416 con el fragmento de 1.33 kb que contiene la repetición terminal larga (LTR) de MMTV desde -1226 a +111 (Plásmido cedido gentilmente por René Gross).

**pRS314-1L3:** Plásmido pRS314 con el fragmento *Clal-SalI* de 1.4 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *Clal-XhoI* (este estudio).

**pRS314-1L3N:** Plásmido pRS314-1L3 cortado en *Clal*, hechos romos los extremos (se genera la diana *Nrul*) y religado (este estudio).

**pRS314-L:** Plásmido pRS314-1L3N con el fragmento *EcoRV-BglII* de 1.9 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *SmaI-BamHI* (este estudio).

**pRS314-1LU2:** Plásmido pRS314-1L3N con el fragmento *Clal-SmaI* de 2.5 kb del vector YIP5 insertado en las dianas *Clal-SmaI* (este estudio).

**pRS314-LU:** Plásmido pRS314-1LU2 con el fragmento *BglII-EcoRV* de 1.9 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *BamHI* (de la región MCS)-*SmaI* (este estudio).

**pRS314-SU:** Plásmido pRS314-1LU2 con el fragmento *BglII-EcoRV* de 1.9 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *BamHI* (del gen *tet*)-*SmaI* (este estudio).

**pTEL1-2:** Plásmido pRS316 con el fragmento *BamHI-XbaI* de 2.55 kb del vector YCpA13 insertado en las dianas *BamHI-XbaI* (este estudio).

**pTEL2-1:** Plásmido pTEL1-2 con el fragmento *HindIII-BamHI* de 2.5 kb del vector p236, que contiene secuencias teloméricas, insertado en las dianas *HindIII-BamHI* (este estudio).

**pTEL-LU:** Plásmido pRS314-LU con el fragmento *XhoI-SalI* de 2.6 kb de pTEL2-1 insertado en la diana *XhoI* (este estudio).

**pRS314-1L3B:** Plásmido pRS314-1L3N con el adaptador portador de la diana *BglII* (dCAGATCTG) insertado en la diana *Nrul* (este estudio).

**pRS314-LB:** Plásmido pRS314-1L3B con el fragmento *EcoRV-BglII* de 1.9 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *SmaI-BamHI* (este estudio).

**pRS314-LY:** Plásmido pRS314-LB con el vector YIP5 abierto en el sitio *BamHI* insertado en la diana *BglII* (este estudio).

**pRS314-LA:** Plásmido pRS314-LB con el fragmento *BamHI-BamHI* de 3.6 kb, que contiene el gen *ADE2*, insertado en la diana *BglII* (este estudio).

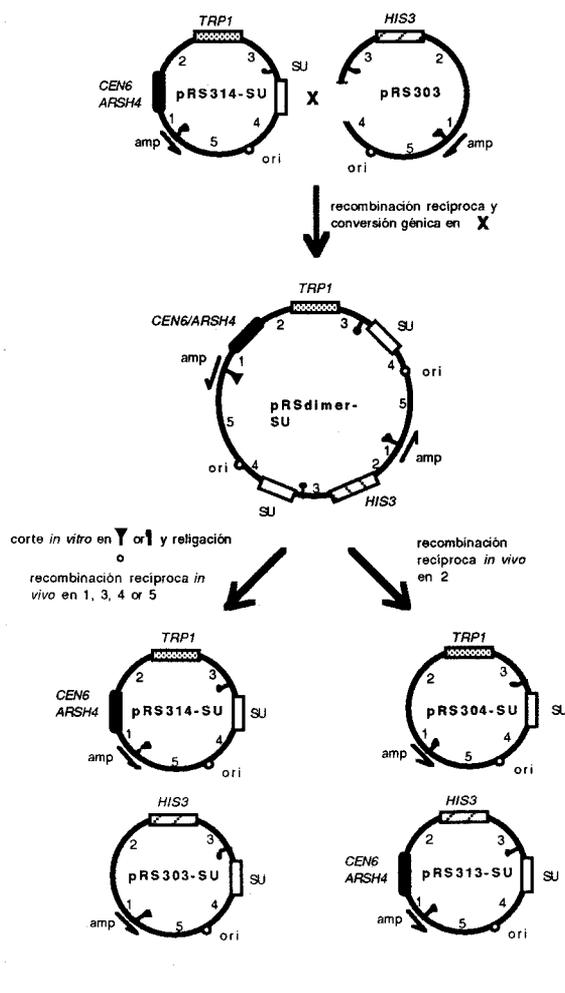
**pRS314-LY $\Delta$ P:** Plásmido pRS314-LY con el fragmento *PstI-PstI* de 4.15 kb deleciónado (este estudio).

**pRS314-LPA:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *BamHI-SspI* de 568 pb de pBR322 insertado en la diana *Nrul*. Previamente se hizo romo el extremo de *BamHI*. La diana *Clal* (producto de la ligación *SspI/Nrul*) queda próxima al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-LPB:** Plásmido idéntico a pRS314-LPA pero con la diana *SspI* distal al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-LY $\Delta$ NS:** Plásmido pRS314-LY con el fragmento *SphI-NsiI* de 1.92 kb deleciónado (este estudio).

**pRS303-SU:** Plásmido pRS303 con el sistema de repeticiones SU de pRS314-SU insertado en la región MCS mediante la técnica de clonación *in vivo* descrita en la FIGURA 6 (este estudio).



**FIGURA 6.** Diagrama con la estrategia de clonación realizada para los plásmidos pRS303-L, pRS303-LU y pRS303-SU. La estirpe de levaduras W303-1A se transformó con el plásmido centromérico pRS314-SU (que contiene el sistema SU en la región MCS representado como una caja abierta) y con el plásmido integrativo pRS303 abierto en las dianas *XhoI* y *XbaI*. El plásmido pRS303 se repara con la información del plásmido pRS314-SU, formándose por recombinación recíproca un dímero con los dos plásmidos que lleva duplicado el sistema SU (pRSdimer-SU). Este plásmido se puede resolver tanto *in vivo* como *in vitro*. Por recombinación recíproca *in vivo* en la región 2 se forman el plásmido integrativo pRS304-SU y el plásmido centromérico pRS313-SU. Por recombinación *in vivo* en las regiones 1, 3, 4 ó 5 o por corte con *Scal* o *NaeI* y posterior ligación se forman el plásmido inicial pRS314-SU y el plásmido integrativo pRS303-SU. Cuando la resolución del cointegrado se produce *in vivo* por recombinación recíproca, sólo se recuperan los derivados centroméricos, ya que los replicativos no pueden propagarse en la levadura. Por tanto, los plásmidos pRS303-L, pRS303-LU y pRS303-SU por corte y religación. El triángulo negro representa la diana *Scal* y el círculo negro la diana *NaeI*. Esta estrategia permite la clonación de secuencias desde un plásmido de propagación autónoma (centromérico o replicativo) a un plásmido integrativo mediante recombinación *in vivo*, independientemente de las dianas de restricción que flanquean el inserto y de que éste presente o no un fenotipo detectable en la levadura.

**pRS303-L:** Igual que el plásmido pRS303-SU pero con el sistema L del plásmido pRS314-L (ver FIGURA 6) (este estudio).

**pRS303-LU:** Igual que el plásmido pRS303-SU pero con el sistema LU del plásmido pRS314-LU (ver FIGURA 6) (este estudio).

**YCp70-LU:** Plásmido YCp70 con el sistema de repeticiones de pRS314-LU insertado en la región de *LEU2* mediante la técnica de clonación *in vivo* descrita por

Ito *et al.* (1983). Para su construcción se cotransformó la estirpe AAW19-4B con los vectores pRS314-LU cortado con *SacI* fuera del sistema de repeticiones, y YCp70 cortado con *BstEII* en el gen *LEU2*, y se seleccionó el marcador *URA3* situado entre las repeticiones del sistema LU. En principio, los transformantes Ura<sup>+</sup> pueden producirse reparando el corte en la diana *SacI* del plásmido pRS314-LU por recombinación no homóloga (el gen *URA3* está entre las repeticiones *leu2* del sistema) o reparando el corte en las dianas *BstEII* del gen *LEU2* del plásmido YCp70 por conversión génica con el sistema de repeticiones *leu2* de pRS314-LU. Este último caso genera el plásmido YCp70-LU (este estudio).

**pRS314-LS:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *SmaI-SspI* de 2.81 kb de pBR322 insertado en la diana *NruI*. La diana *SmaI* queda próxima al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-LR:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *SmaI-SspI* de 2.73 kb de pBR322 insertado en la diana *NruI*. La diana *SmaI* queda distal al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-LQ:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *BamHI-SspI* de 4.975 kb de pBR322 insertado en la diana *NruI*. Previamente se hizo como el extremo de *BamHI*. La diana *SspI* queda próxima al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-NA:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *BamHI-SmaI* de 2.16 kb de pBR322 insertado en la diana *NruI*. Previamente se hizo como el extremo de *BamHI*. La diana *SmaI* queda distal al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-NB:** Plásmido idéntico a pRS314-LNA pero con la diana *SmaI* próxima al fragmento *EcoRV-BglII* del gen *LEU2* (este estudio).

**pBS-CYCT:** Plásmido pBluescriptII SK- con el fragmento *KpnI-PstI* de 300 pb de p425 TEF insertado en las dianas *EcoRV-PstI*. Previamente se hizo como el extremo *KpnI* (este estudio).

**pRS314-LNAT:** Plásmido pRS314-LNA con el fragmento *HindIII-HindIII* de 0.3 kb del vector pBS-CYCT, que contiene el terminador del gen *CYC1*, insertado mediante restricción parcial en la diana *HindIII* situada entre las dos repeticiones de *leu2Δ* (este estudio).

**pBS-FLP:** Plásmido pBluescriptII SK- con el fragmento *PstI-SspI* de 2.4 kb del vector pFV17 insertado en las dianas *PstI-EcoRV* (este estudio).

**pRS316-FLP:** Plásmido pRS316 con el fragmento *BamHI-XhoI* de 2.4 kb del vector pBS-FLP, que contiene el gen *FLP1* bajo control del promotor del gen *GAL10*, insertado en las dianas *BamHI-XhoI* del vector pRS316 (este estudio).

**pTZSXH:** Plásmido pTZ18U con el fragmento *XbaI-HindIII* de *SEC1*, que contiene parte de la repetición invertida del círculo de 2  $\mu$ , insertado en la diana *XbaI-HindIII* (este estudio).

**pRS314-LPHO5:** Plásmido pRS314-LB con el fragmento *BamHI* de 550 pb del vector pPZ, que contiene el promotor del gen *PHO5*, insertado en la diana *BglII* del vector pRS314-LB (este estudio).

**pRS314-LGAL1-1:** Plásmido pRS314-L con el fragmento *SacI-SmaI* de 479 pb del vector p426 GAL1, que contiene el promotor del gen *GAL1*, insertado en la diana *NruI*. Previamente se hizo romo el extremo de *SacI*. El promotor del gen *GAL1* tiene el mismo sentido que el del promotor del gen *LEU2* (este estudio).

**pRS314-LGAL1-5:** Plásmido idéntico a pRS314-LGAL1-1 pero con el promotor del gen *GAL1* con el sentido contrario al del promotor del gen *LEU2* (este estudio).

**pBKGAL1:** Plásmido pBluescriptII SK- con el fragmento *EcoRI* de 2.023 kb de la región 5' del gen *GAL1* insertado en la diana *EcoRI*. El inserto *EcoRI* se obtuvo amplificando mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una región de DNA genómico que cubría ese fragmento. El producto de la reacción se aisló en un gel de agarosa y cortó con *EcoRI*. Los oligos que se usaron para la reacción de PCR fueron: 5' TGG TCA AGA CCT CTA ACC TGG C 3' (upper primer) y 5' TCG GCA GTA AAG CTC GCT GTA G 3' (lower primer).

**pBSRS:** Plásmido pBluescriptII SK- con el fragmento *SspI-EcoRI* de 1.46 kb del gen *LEU2* insertado en las dianas *EcoRV-EcoRI* (este estudio).

## II. 4. ANALISIS GENETICO EN LEVADURAS

Las estirpes de levadura se generaron mediante cruces genéticos. Los diploides se esporularon en medio sólido SPO durante 2 ó 3 días a 30°C. Para el análisis de tétradas se resuspendió biomasa en una solución de 2 mg/ml zimoliasa 20-T Sorbitol 1M durante 3 minutos y posteriormente se diseccionaron las esporas en YEPD sólido e incubaron a 30°C.

El análisis fenotípico de los productos meióticos se realizó mediante réplicas a placas de medio SC carentes de los requerimientos oportunos. El sexo se determinó analizando la capacidad de las esporas de formar diploides con una estirpe de sexo **a** y otra de sexo  $\alpha$ .

## II. 5. MUTAGENESIS EN LEVADURAS

Se realizó según Calderón y Cerdá-Olmedo (1983). Las células transformadas con el sistema de recombinación plasmídico correspondiente se

cultivaron en medio líquido SC-Trp a 30°C con agitación hasta fase exponencial tardía ( $D.O_{660nm}:0.9-1$ ). Se recogieron por centrifugación, lavaron con H<sub>2</sub>O y resuspendieron en tampón Tris-maleato 0.1 M pH 7.5 a una concentración de 10<sup>8</sup> células/ml. Tras incubar las células durante 10 minutos a 37°C se añadieron a la suspensión 20 mg/l de N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NG) y se incubaron de nuevo a 37°C durante 15 minutos. Tras tres lavados con tampón Tris-maleato se cultivaron en medio líquido SC-Trp durante ocho horas a 30°C para permitir la segregación de las mutaciones. Finalmente, las células se sembraron en medio sólido SC-Trp a una densidad de 100-300 colonias por placa. La viabilidad de las células tras el tratamiento con NG fue del 20-35%.

## **II. 6. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A RADIACION U.V.**

Las células se cultivaron en YEPD líquido hasta una  $D.O_{660nm}: 0.6$ . Tras las diluciones oportunas se sembraron en YEPD sólido unas 100-200 colonias por caja. Estas cajas se irradiaron durante 0, 10, 20, 30 y 45 minutos con una lámpara de ultravioleta de 1.5 W/m<sup>2</sup> y se cubrieron inmediatamente con papel de aluminio para evitar la reparación por la enzima fotoreactivante. Tras tres días de incubación a 30°C se determinó el número de colonias por caja.

## **II. 7. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A MMS**

Se realizó según Prakash y Prakash (1977). Las células se cultivaron en YEPD líquido hasta una  $D.O_{660nm}:0.65$ , se recogieron por centrifugación, se lavaron con H<sub>2</sub>O y se resuspendieron en un volumen de tampón fosfato 0.05 M pH 7.0. Tras incubar 5 minutos a 30°C, se añadió metil-metano sulfonato (MMS) a una concentración final del 0.5%. Se tomaron muestras a los 0, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos y se sembraron en YEPD sólido entre 100-200 colonias por caja.

## **II. 8. DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACION**

Se realizó según Aguilera y Klein (1988). Se aislaron colonias independientes en YEPD o en los oportunos medios mínimos según se tratara de sistemas cromosómicos o plasmídicos. Cada test de fluctuación se realizó con 6 colonias independientes. Estas se resuspendieron en H<sub>2</sub>O, sembrándose las diluciones oportunas en los medios adecuados para seleccionar los recombinantes y para calcular las células viables totales. La frecuencia se calculó dividiendo la mediana de los valores de los recombinantes entre la media del número total de células.

Para determinar las frecuencias de recombinación de los sistemas basados en el plásmido centromérico pRS314 tras transformar con los plásmidos sin cortar o cortados en secuencias únicas se seleccionaron los transformantes en SC-Trp y se hicieron réplicas a placas de SC-Leu. De esta forma se determinó el porcentaje de colonias derivadas de un suceso de recombinación durante el proceso de transformación, antes de la primera división mitótica.

## II. 9. ENSAYO DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

Se realizó siguiendo el protocolo de células permeabilizadas (Methods in Yeast Genetics., CSH., Kaiser *et al.*). A partir de un pre-inóculo en fase exponencial se inocularon 15 ml de medio selectivo para el plásmido correspondiente a una D.O.<sub>660nm</sub> inicial de 0.1-0.2. Este cultivo se incubó a 30°C durante 8 horas, tras las cuales las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H<sub>2</sub>O. En el caso del ensayo realizado con el promotor de MMTV fusionado a *lacZ* se indujo la activación añadiendo al medio Deazilcortivazol (DAC) a una concentración 10<sup>-6</sup> M (para el control de no activación sin DAC se usó un volumen equivalente de etanol).

Tras lavar con H<sub>2</sub>O las células se resuspendieron en 1 ml de tampón Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM). El ensayo se realizó añadiendo a  $\nu$  ml de la suspensión con las células tampón Z hasta un volumen final de ensayo de 1 ml, 30  $\mu$ l de cloroformo y 20  $\mu$ l de SDS 0.1%. Las células se rompieron agitando en Vortex a velocidad máxima durante 10 segundos. El lisado se preincubó durante 5 minutos a 30°C, tras los que se añadió el sustrato de la reacción, 0.2 ml de o-nitrosfenil- $\beta$ -D-galactosidasa (ONPG; 4 mg/ml de tampón Z) . Las reacciones se pararon al adquirir color amarillo (tras  $t$  minutos) añadiendo 0.5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Los restos celulares se precipitaron por centrifugación y se determinó la D.O.<sub>420nm</sub> del sobrenadante. Por otro lado se determinó la D.O.<sub>600nm</sub> de una dilución  $d$  de la suspensión inicial de células en tampón Z. Las unidades de actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinaron aplicando la fórmula:  $D.O._{420nm} \times 10^3 / D.O._{600nm} \times d \times t \times \nu$

## II. 9. TRANSFORMACIONES

### II. 9. 1. Transformación de *E. coli*.

Se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue *et al.* (1990). Para obtener células competentes se partió de un cultivo de 250 ml de medio SOB de la estirpe DH5 $\alpha$  crecido a 22°C hasta D.O.<sub>660nm</sub>:0.5. Las células competentes se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -70°C. Las transformaciones se realizaron añadiendo 50-100 ng de DNA plasmídico a 100  $\mu$ l

de células competentes recién descongeladas e incubandolas en hielo durante 30 minutos, tras los cuales se dió un choque térmico a 42°C durante 35 s. Para regenerar las células se incubaron en medio LB o SOB durante 45 minutos a 37°C con agitación.

## **II. 9. 2. Transformación de *S. cerevisiae*.**

Se realizó siguiendo el método de Ito *et al.* (1983) con las modificaciones de Schiesl y Gietz (1989). Se partió de un cultivo a D.O.<sub>660nm</sub>: 0.5. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron primero con H<sub>2</sub>O y luego con una solución de LiAc-TE 1X (preparada en el momento a partir de TE 10X: Tris-HCl 0.1 M-EDTA 0.01 M pH7.5 y LiAc 10X: LiAc 1M pH 7.5), para resuspenderse finalmente en solución LiAc-TE 1X a una concentración de 2x10<sup>9</sup> células/ml. La transformación se realizó añadiendo 5 µl de DNA de esperma de salmón 10 mg/ml (previamente sonicado, fenolizado y desnaturalizado) y 50-100 ng de DNA plasmídico a 50 µl de células competentes. A esta mezcla se le añadieron 0.3 ml de PEG 40 % en LiAc-TE (preparada en el momento a partir de PEG 4000 50 % en H<sub>2</sub>O, TE 10X y LiAc 10X). Tras incubación 30 minutos a 30°C con agitación se dió un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Finalmente las células se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O y sembraron en medio selectivo.

## **II. 10. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS**

### **II. 10. 1. Extracción de DNA de *E. coli***

**II. 10. 1. 1. Extracción a pequeña escala (minipreps).** Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bolivar y Backman (1979). Se partió de 1.5 ml de cultivo de la bacteria portadora del plásmido. Las células se recogieron por centrifugación y resuspendieron en 100 µl de Solución I ( Glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) con 2 mg/ml de lisozima. Tras 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de Solución II ( NaOH 0.2 M, SDS 1 %) y la mezcla se incubó durante 5 minutos en hielo para la lisis. Seguidamente se añadieron 150 µl de Solución III (KAc 3 M, ácido acético glacial 11.5 %) y se mantuvo la mezcla durante 5 minutos en hielo para permitir la precipitación de los restos celulares. Tras centrifugar se mezcló el sobrenadante con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). El DNA se precipitó a partir de la fase acuosa con NaCl 0.3 M y dos volúmenes de etanol 96%.

**II. 10. 1. 2. Extracción a gran escala.** Se realizó por centrifugación en gradiente de CsCl siguiendo el protocolo descrito por Clewell y Helinski (1970). Se partió de un cultivo de 400 ml de la bacteria portadora del plásmido. A D.O.<sub>660nm</sub>:0.7-0.8 se añadieron 200 µg/ml de cloranfenicol y se incubó durante 16

horas. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con 20 ml Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 7.4 y se resuspendieron en 2 ml de solución A (Sacarosa 25%, EDTA 50 mM pH 8.0, Tris 50 mM pH 8.0). Se añadieron 0.2 ml de lisozima 10 mg/ml y 0.2 ml de ribonucleasa 1 mg/ml y se incubaron 5 minutos en hielo, tras los cuales se añadieron 0.4 ml EDTA 0.5 M pH 8.0 y se incubaron de nuevo en hielo durante 10 minutos. Se añadieron 4 ml de solución de rotura (Tritón X100 0.3 %, Tris 50 mM pH 7.4, EDTA 50 mM pH 8.0) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. La mezcla se centrifugó y se recogió el sobrenadante (solución de lisado). El DNA plasmídico se purificó por centrifugación en gradiente de CsCl, para lo que se mezclaron 4 g CsCl, 4.1 ml solución de lisado, 0.2 ml EDTA 0.5 M pH 8.0 y 0.2 ml EtBr 10 mg/ml. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se pasó a tubos VTi65, que se centrifugaron a 50.000 r.p.m. durante 12-16 horas a 20°C en una ultracentrífuga. La banda correspondiente al DNA plasmídico se extrajo con una jeringa. El EtBr se eliminó añadiendo un volumen de alcohol isoamílico, mezclando, centrifugando y tomando la fase inferior. El proceso se repitió hasta que la solución quedó totalmente transparente. El DNA se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol 96%.

## **II. 10. 2. Extracción de DNA de levaduras**

**II. 10. 2. 1. Extracción por rotura mecánica.** Se siguió el protocolo descrito por Hoffman y Winston (1987). Se partió de un cultivo en fase estacionaria temprana. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en solución de rotura (Tritón X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Se añadió un volumen de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro y se agitó fuertemente en Vortex durante 2 minutos. Se mezcló con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se centrifugó y se extrajo el DNA de la fase acuosa precipitando con NaAc 3M y etanol 96%.

**II. 10. 2. 2. Extracción por lisis enzimática.** Se siguió el protocolo descrito por Sherman *et al.* (1986). Se partió de 5 ml de un cultivo en fase estacionaria temprana. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con H<sub>2</sub>O y se resuspendieron en 0.32 ml de solución A (Sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M pH 8.0). Se añadieron 3.2 µl de β-mercaptoetanol (dilución 1/10) y 10 µl de zimoliasa 20-T 15 mg/ml, y se incubó durante 60 minutos a 37°C. La mezcla se centrifugó 20 s y el precipitado se resuspendió en 0.37 ml de solución B (Sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M pH 8.0). Se añadieron 16 µl de SDS 10 % y 1 µl de dietil pirocarbonato (DEPC) y se incubó durante 30 minutos a 65°C. Los restos celulares se precipitaron en hielo durante al menos 1 hora con 85 µl de solución III (2. 10. 1. 1). El DNA se extrajo por precipitación del sobrenadante y se trató en pasos posteriores con ribonucleasa y con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) para eliminar el RNA y las proteínas.

Para la extracción de DNA de protoplastos (ver apartado II. 18. 1 para obtención de protoplastos) se siguió una modificación de este protocolo (Philippsen *et al.* 1991). Los protoplastos se recogieron por centrifugación y resuspendieron en 5 ml Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM por gramo de peso húmedo. Se añadieron 0.1 volúmenes de SDS 10% y se incubó durante 30 minutos a 65°C, tras los cuales se añadieron 0.33 volúmenes de Sol. III (2. 10. 1. 1) y se incubó al menos una hora en hielo. Se centrifugó y el DNA (sobrenadante) se precipitó con 0.75 volúmenes de isopropanol, se resuspendió en 400 µl de Tris 1mM-EDTA 10mM, se trató con 15 µg de ribonucleasa durante 30 minutos y dos veces con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1). El DNA de la fase acuosa se precipitó, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O o TE 1X.

### **II. 10. 3. Extracción de RNA de levaduras.**

Se utilizó el método de extracción con fenol ácido (Current Protocols In Molecular Biology., Ausubel *et al.*). Se partió de 10 ml de un cultivo en fase exponencial. Todo el protocolo se llevó a cabo en hielo y sólo se usaron soluciones tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC) y posteriormente autoclavadas, así como puntas y tubos eppendorf manipulados siempre con guantes. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con H<sub>2</sub>O y o bien se congelaron -70°C para su posterior procesamiento o directamente se inició el protocolo de extracción. Para ello se resuspendieron en 400 µl de solución TES (Tris-HCl 10 mM pH7.5, EDTA 10mM pH 8.0, SDS 0.5 %), se añadieron 400 µl de fenol ácido (fenol saturado con H<sub>2</sub>O) y se agitó fuertemente durante 10 s en Vortex. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 65°C. Tras 5 minutos en hielo se centrifugó y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf. Tras una nueva extracción con fenol ácido y otra con cloroformo el RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3M pH 5.3 y 2 volúmenes de etanol 96 %, se lavó con etanol 70% y se resuspendió el RNA en H<sub>2</sub>O.

## **II. 12. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS**

### **II. 12. 1. Geles de agarosa.**

Los fragmentos de DNA de diferente tamaño o conformación topológica se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE 1X (TAE 50X: Tris-acetato 2 M, EDTA 0.05 M; pH 8.0) o en tampón TBE 0.5X (TBE 5X: Tris-borato 0.45 M, EDTA 0.01 M; pH 8.0). El porcentaje de agarosa varió entre 0.7 y 1.5% dependiendo del tamaño de los fragmentos que se querían resolver.

La separación de los distintos topoisómeros de un plásmido se realizó en geles de agarosa 0.7 % en tampón TPE 1X (Tris-acetato 0.09 M, EDTA 0.002 M) y 4-

12 µg/ml de cloroquina dependiendo del grado de resolución deseado. La electroforesis se llevó a cabo con 20 µg de DNA en tampón TPE 1X con cloroquina a la misma concentración que en el gel (48 horas a 30 voltios en geles de 15x18 cm<sup>2</sup>).

El RNA de levaduras (las muestras se prepararon con 10 µg de RNA, 1.25 µl de tampón MOPS 0.664 M, 2.25 µl de formaldehído 12.3 M y 6.25 µl de formamida desionizada) se desnaturalizó durante 15 minutos a 65°C y se separó en geles de agarosa 1% en tampón MOPS 0.04 M, formaldehído 0.664 M. El RNA se sometió a un campo eléctrico de 5 V/cm y se usó MOPS 0.04 M como tampón de electroforesis.

Para la visualización de los ácidos nucleicos los geles se tiñeron con bromuro de etidio (EtBr) 0.5 µg/ml, según Sharp *et al.* (1973).

## II. 12. 2. Geles de acrilamida.

La separación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño (0.1-1kb) se realizó en geles no desnaturalizantes (acrilamida:bis acrilamida (29:1) 5-12 % en tampón TBE 0.5X). La separación de los híbridos RNA-RNA se realizó en geles desnaturalizantes (acrilamida:bis acrilamida (19:1) 4-6% con urea 50% en tampón TBE 0.5X). La polimerización de los geles se llevó a cabo añadiendo persulfato amónico (APS) al 0.025% y TEMED al 0.001%.

## II. 13. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES GELES

### II. 13. 1. Geles de agarosa

*GeneClean<sup>r</sup>*. La banda del gel de agarosa con el fragmento de DNA correspondiente se incubó a 55°C con 3 volúmenes de solución NaI 45% (w/v) (saturada con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) hasta que se fundió el gel. Se añadieron 5 µl de solución "glassmilk" (Papel Whatman GF/F machacado (1g/ml H<sub>2</sub>O)) y se mantuvo en hielo 5 minutos para favorecer la unión del DNA. La mezcla se centrifugó y el precipitado se lavó tres veces con tampón New (Tris-HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.2 M, EDTA 2 mM pH 8.0, etanol 53%), se resuspendió en H<sub>2</sub>O y se incubó 3 minutos a 55°C, tras los que se precipitó el DNA presente en el sobrenadante.

*Extracción con PEG*. Se cortó una banda de gel justo delante del fragmento que se quería aislar. Este hueco se llenó con PEG 8000 15 % en TAE 1X y se prosiguió con la electroforesis. Cuando el fragmento de interés entró en el hueco se recogió la solución, se trató con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) para eliminar los restos de agarosa, se centrifugó y se precipitó finalmente el DNA del sobrenadante.

*Extracción con fenol.* La banda del gel de agarosa con el fragmento de interés se machacó y se mezcló con un volumen de fenol. Se mantuvo durante 15 minutos en N<sub>2</sub> líquido, se separó la fase acuosa por centrifugación y se precipitó el DNA.

## **2. 13. 2. Geles de acrilamida.**

La banda del gel de acrilamida con el fragmento de DNA correspondiente se troceó e incubó en 150 µl de tampón de elución (NH<sub>4</sub>Ac 0.5 M, EDTA 1mM pH.8.0) durante 12 horas a 37°C. La agarosa se eliminó centrifugando la solución a través de una columna de Sephadex G50 sobre fibra de vidrio siliconizada. Tras repetirse el paso de centrifugación con un nuevo volumen de elución el DNA presente en el eluido se precipitó con 0.1 volúmenes de NH<sub>4</sub>Ac 2.5 M y 2.5 volúmenes de etanol 96%.

## **II. 14. TRATAMIENTO ENZIMATICO DEL DNA**

### **II. 14. 1. Restricción de fragmentos de DNA.**

El DNA plasmídico se cortó con las enzimas de restricción adecuadas durante 2-3 horas en un volumen de 20-30 µl a las temperaturas y con los tampones indicados por las correspondientes casas comerciales. El DNA genómico se cortó durante 8-10 horas en las mismas condiciones. Las dobles digestiones se realizaron en sucesivos pasos de restricción y precipitación o en un único paso de restricción usando tampón general (Tris-acetato 10 mM pH 7.5, Mg-acetato 100 mM, K-acetato 500 mM).

### **II. 14. 2. Obtención de extremos romos.**

Los extremos cohesivos se hicieron romos con la polimerasa de DNA del bacteriófago T4. La reacción se llevó a cabo mezclando en un volumen final de 20-50 µl los 4 dNTP a una concentración final 100 µM, 1-2 unidades de la polimerasa de DNA de T4 y 0.2-2 mg de DNA. La solución se incubó durante 15 minutos a 12°C. En algunos casos los extremos cohesivos con la cadena 5' saliente se hicieron romos con el fragmento klenow de la polimerasa I de DNA. Para ello se añadieron en la mezcla de reacción los 4 dNTP a una concentración final de 25 µM, 1-5 unidades del fragmento klenow de la polimerasa I y 0.2-2 µg de DNA. La reacción se incubó durante 30 minutos a 30°C. En todos los casos las reacciones se pararon con EDTA 0.01 M pH8.0 y un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico 24:24:1.

Para la construcción de deleciones seriadas (II. 14. 5) los extremos de cadena sencilla generados con la *Exonucleasa* III se hicieron romos digiriendo el DNA con nucleasa S1 (7.5 U/ $\mu$ g DNA) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

### II. 14. 3. Desfosforilación de extremos 5' de DNA.

Para desfosforilar los extremos 5' se incubaron 5-10  $\mu$ g de DNA con fosfatasa alcalina de intestino de vaca (CIP). Cuando el extremo saliente era el 5' se añadió una unidad de CIP por cada 100 pmoles de extremos 5'-P y la reacción se incubó 1 hora a 37°C. Cuando el extremo saliente era el 3' o era un extremo romo se añadió una unidad de CIP por cada 2 pmoles de extremos 5'-P y la reacción se incubó 30 minutos a 37°C, tras los cuales se añadió otra alícuota de CIP y se incubó durante otros 30 minutos a 55°C. Las reacciones se pararon añadiendo EDTA 0.01 M pH8.0 y un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1).

### II. 14. 4. Ligación de DNA.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la ligasa de DNA del bacteriófago T4. La ligación de extremos cohesivos se realizó incubando durante 8-12 horas a 14°C. Para la ligación de extremos romos se incubó bien a 4°C o bien a 12°C añadiendo a la mezcla de reacción PEG a una concentración final del 5 %.

### 2. 14. 5. Construcción de deleciones unidireccionales seriadas.

Las deleciones seriadas de DNA de corte de doble cadena se realizaron con *Exonucleasa* III de *E. coli* mediante el sistema "Double-stranded Nested Deletion Kit" de Pharmacia LKB Biotechnology siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial. El plásmido pRS314-LY se digirió con las enzimas de restricción *Nsi*I y *Sma*I. La digestión con *Exonucleasa* III (50 U/ $\mu$ g DNA) se realizó a 30°C tomando muestras cada 2 minutos. Las muestras se trataron con nucleasa S1 (7.5 U/ $\mu$ g DNA) para eliminar el DNA de cadena sencilla y generar extremos romos. El tamaño de las deleciones se determinó en un gel de agarosa 0.7%. El DNA con el tamaño adecuado se ligó y se usó para transformar *E. coli*.

### 2. 14. 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un volumen final de 100  $\mu$ l se amplificaron 0.5 ng de DNA genómico ó 20 ng de DNA plasmídico con 100 ng de cada oligonucleótido y dNTP a una concentración 0.2 mM. Para fragmentos inferiores a 2 kb se usó tanto la Taq polimerasa Stoeffel (Perkin-Elmer) como la Goldstar (USB), mientras que para fragmentos mayores de 2 kb se usó la Taq polimerasa Goldstar.

## II. 15. MARCAJE DE ACIDOS NUCLEICOS

### II. 15. 1. Marcaje de DNA a partir de hexanucleótidos

*Con digoxigenina.* El DNA se marcó con digoxigenina (nucleósido DIG-11dUTP) (Boheringer Mannheim, S.A.) de acuerdo con las directrices de la casa comercial derivadas del método de Feimberg y Vogelstein (1984). La reacción de marcaje se realizó con 0.2-2  $\mu$ g de DNA previamente desnaturalizado, hexanucleótidos no marcados 1 mM, una mezcla de: dATP 1mM, dGTP 1 mM, dCTP 1 mM, dTTP 0.65 mM y DIG-dUTP 0.35 mM, y 2 unidades del fragmento klenow de la polimerasa I de DNA. La reacción se incubó a 37°C durante 12-16 horas y se paró con EDTA 0.02 M pH 8.0. El DNA se precipitó con 0.4 M LiAc y 3 volúmenes de etanol 96 %.

*Con  $\alpha^{32}P$ -dCTP.* Se siguió el protocolo básico descrito en el punto anterior. En este caso la reacción de marcaje se realizó incubando a 37°C durante una hora una mezcla de reacción que contenía 100-200 ng de DNA previamente desnaturalizado, la mezcla de hexanucleótidos descrita en el punto anterior, una mezcla de dGTP, dATP y dTTP 0.05 mM, 0.025 mCi  $\alpha^{32}P$ -dCTP y 2 unidades del fragmento klenow. Para eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados en la reacción de polimerización se pasó el volumen de reacción por una columna de Sephadex G50-TE ( 5 g Sephadex G50 en 75 ml Tris-EDTA 10 mM-1 mM).

### II. 15. 3. Marcaje de DNA con $\alpha^{32}P$ -dCTP por PCR.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado II. 14. 6. con dGTP, dATP y dTTP 0.2 mM, dCTP 2  $\mu$ M y 100  $\mu$ Ci de  $\alpha^{32}P$ -dCTP. La sonda marcada radiactivamente se limpió de nucleótidos no incorporados pasando la reacción por una columna de sephadex G50-TE. La incorporación de  $\alpha^{32}P$ -dCTP se determinó en un contador de centelleo.

### II. 15. 4. Marcaje de RNA con $\alpha^{32}P$ -CTP por transcripción *in vitro* (ribosondas).

Las ribosondas se prepararon por transcripción *in vitro* a partir de los promotores de los bacteriófagos de T3 y de T7 situados en el vector pBSRS. Para la transcripción dependiente de la RNA polimerasa de T3 se cortó el vector en la diana *Hind*III y para la transcripción dependiente de la RNA polimerasa de T7 se cortó en la diana *Eco*RI. El DNA cortado se fenolizó dos veces, se precipitó y se lavó con etanol 70%, resuspendiéndose finalmente en H<sub>2</sub>O. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se añadieron 0.6  $\mu$ g de DNA, 10 U de RNA polimerasa (Boehringer), ATP, GTP y UTP 0.5 mM, CTP 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ Ci de  $\alpha^{32}P$ -CTP, Ditioetritol (DTT) 1 mM, 30 U de RNA

guard (Pharmacia) y Tampón de transcripción 10X (Boehringer). A continuación se añadieron 10 U de DNasa I RNase-free (Boehringer) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con EDTA 50 mM pH 8.0 y 77  $\mu$ l de TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7.0, EDTA 1 mM pH 8.0, NaCl 0.1 M). Los nucleótidos no incorporados se eliminaron pasando la reacción por una columna de Sephadex G50-TEN (5 g G50 en 75 ml TEN). La incorporación de  $\alpha^{32}$ P-dCTP se determinó en un contador de centelleo. La ribosonda se precipitó con 2  $\mu$ l tRNA de levaduras 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, 10  $\mu$ l NaAc 3 M pH 7.6 y 200  $\mu$ l etanol 96%. Tras centrifugar el precipitado se resuspendió en 30  $\mu$ l de tampón de carga desnaturizante (Formamida desionizada 97%, SDS 0.1%, Tris-HCl 10 mM pH 7.0, 10  $\mu$ l azul de bromofenol). La ribosonda se desnaturizó incubándola durante 5 minutos a 85°C y se corrió posteriormente en un gel desnaturizante de acrilamida al 6%. La banda del gel de acrilamida con la ribosonda se visualizó por impresión de una autoradiografía. Para extraer la ribosonda se troceó la banda del gel y se incubó a 37°C durante 12-16 horas en 380  $\mu$ l de tampón de elución (380  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{Ac}$  2 M, SDS 0.1%) con agitación fuerte. Los restos de agarosa se eliminaron por centrifugación y el RNA en el sobrenadante se precipitó con 3  $\mu$ l de tRNA 10  $\mu$ g/ $\mu$ l y 0.9 ml de etanol 96%. Tras centrifugar y lavar el precipitado con etanol 70% se resuspendió la ribosonda en 40  $\mu$ l de tampón de hibridación (Formamida desionizada 80%, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM pH 8.0, PIPES 40 mM pH 6.7) y se cuantificó la eficiencia del proceso de elución determinando la incorporación de  $\alpha^{32}$ P-dCTP en un contador de centelleo.

## II. 16. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS

### II. 16. 1. Transferencia de DNA

Se emplearon membranas Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham International (sin cargar) o membranas Quiabrane nylon-plus cargadas positivamente. Tras la electroforesis el gel de agarosa se incubó en una solución de HCl 0.25 M durante 10 minutos a temperatura (T) ambiente. Este paso se eliminó cuando los fragmentos de DNA eran de tamaño inferior a 1 kb. A continuación el protocolo varió dependiendo del tipo de membrana.

*Membranas no cargadas positivamente.* El gel se incubó en solución de desnaturización ( NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante 30 minutos a T ambiente, se lavó con H<sub>2</sub>O y se incubó durante dos intervalos de 15 minutos minutos en solución de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.2, EDTA 1 mM) a T ambiente. Todas las incubaciones se hicieron con agitación. La transferencia de DNA se realizó por capilaridad en tampón SSC 20X (NaCl 3 M, Na-citrato 0.4 M; pH 7.0 con NaOH) durante 12-16 horas a T ambiente (Southern 1975). El filtro de nylon se lavó

con SSC 2X y el DNA se fijó a la membrana irradiándola con radiación ultravioleta ( $70000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) por ambos lados.

*Membranas cargadas positivamente.* El gel se incubó con NaOH 0.4 M durante 30 minutos a T ambiente con agitación suave. La transferencia y fijación del DNA se realizó por capilaridad en solución NaOH 0.4 M durante 12-16 horas a T ambiente. El filtro se lavó con SSPE 2X (SSPE 20X: NaCl 3 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M, EDTA 0.02 M; pH 7.4 con NaOH).

## **II. 16. 2. Transferencia de RNA**

Se emplearon membranas Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham International. Tras la electroforesis el gel de agarosa se incubó por tres intervalos de 5 minutos en  $\text{H}_2\text{O}$  a  $65^\circ\text{C}$  para eliminar el formaldehído. A continuación el gel se incubó durante 20 minutos en solución A (NaOH 50 mM, NaCl 10 mM), durante 20 minutos en solución B (Tris-HCl 10 mM pH 7.5) y durante 30 minutos en solución SSC 20X. La transferencia de DNA se realizó por capilaridad en tampón SSC 20X durante 12-16 horas a T ambiente. El filtro de nylon se lavó con SSC 2X y el DNA se fijó a la membrana irradiándola con radiación ultravioleta ( $70000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) por ambos lados.

## **II. 17. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS**

### **II. 17. 1. Hibridación con sonda marcada con digoxigenina**

*Hibridación de DNA.* Los filtros se pre-hibridaron durante 2-6 horas a  $42^\circ\text{C}$  en solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5X, reactivo de bloqueo de Boehringer 2%, N-lauroylsarcosina 0.1%, SDS 0.02%) con  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Después se hibridaron durante 12-16 horas a  $42^\circ\text{C}$  añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, se hicieron dos lavados de 5 minutos a T ambiente con SSC 2X, SDS 0.1% y dos lavados de 15 minutos a  $65^\circ\text{C}$  con SSC 0.1X, SDS 0.1%.

La detección de las bandas se realizó siguiendo el método de quimioluminiscencia de Boehringer Mannheim. Los filtros se lavaron con solución de lavado (Tween-20 0.3% (w/v) en tampón 1: Acido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M; pH 7.5) durante 5 minutos, se incubaron en tampón 2 (Reactivo de bloqueo de Boehringer 1% en tampón 1) durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina AP-FAB (anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina) diluido 1:500 veces en tampón 2 durante 30 minutos. El conjugado no ligado se eliminó haciendo tres lavados de 15 minutos con solución de lavado. Tras equilibrar los filtros con tampón 3 (NaCl 2.5 M,  $\text{MgCl}_2$  1 M, Tris-HCl 1 M pH 9.5), se incubaron durante 5 minutos con 0.1mg/ml de AMPPD en tampón 3. Los filtros se envolvieron

en plástico para evitar que se secan e incubaron 15 minutos a 37°C. Para la exposición se emplearon películas de autorradiografía Kodak X-OMAT K100.

*Hibridación de RNA.* Se siguió el mismo protocolo que para la hibridación de DNA, pero prehibridando e hibridando a 50°C en una solución de hibridación diferente (Formamida desionizada 50%, SDS 7%, 5XSSC, reactivo de bloqueo de Boehringer 2%, N-lauroylsarcosina 0.1%, NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.0).

## II. 17. 2. Hibridación con sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP

*Hibridación de DNA.* Los filtros se pre-hibridaron durante 2-6 horas a 42°C en solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 0.5%, NaPO<sub>4</sub> 25 mM pH 6.5) con 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado y se hibridaron durante 12-16 horas a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada y 1.25% de Dextran-sulfato. Tras la hibridación, se hicieron dos lavados de 5 minutos con SSC 2X, SDS 0.5% a T ambiente, dos lavados de 5 minutos con SSC 2X, SDS 0.1% a T ambiente, un lavado de 30 minutos con SSC 2X, SDS 0.1% a 50°C y un lavado de 30 minutos con SSC 2X, SDS 0.1% a 65°C. Finalmente los filtros se envolvieron en plástico y se expusieron a películas de autorradiografía.

*Hibridación de RNA.* Se siguió el mismo protocolo que para la hibridación de DNA pero con una solución de hibridación diferente (Formamida desionizada 50%, SSPE 5X, Denhardt's 1X, SDS 1%) y diferentes condiciones de lavado: un lavado de 5 minutos con SSPE 2X, SDS 1% a T ambiente, un lavado durante 30 minutos con SSPE 2X, SDS 1% a 65°C y un lavado durante 30 minutos con SSPE 0.2X, SDS 0.1% a 65°C.

La rehibridación de filtros se llevó a cabo eliminando la sonda anterior mediante 2 incubaciones de 20 minutos en SDS 0.1%, SSPE 0.1X hirviendo.

## II. 18. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA CROMATINA

### II. 18. 1. Obtención de protoplastos

Los protoplastos se obtuvieron siguiendo una modificación del protocolo descrito por Fedor y Kornberg (1989). Se partió de un cultivo de 500 ml D.O.<sub>660nm</sub>:0.7-0.9 (aprox. 10<sup>9</sup> células). Para el análisis del promotor de MMTV dicho cultivo se incubó con deacetylcortivazol 1µM (DAC) durante 120 minutos o con un volumen similar de etanol (tanto el etanol como el DAC se añadieron a la concentración de 1µM a todos los tampones usados durante la preparación de protoplastos y los lavados). Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 50 ml de H<sub>2</sub>O y se determinó el peso húmedo del precipitado (entre 1 y 4g). A continuación se resuspendieron en 2 volúmenes de solución de



pre-incubación (2.5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol, 277.6  $\mu$ l EDTA 0.5 M pH. 8.0 hasta 50 ml  $H_2O$ ), se incubaron 30 minutos a 30°C con agitación suave, se resuspendieron en 50 ml de sorbitol 1M, se centrifugaron y se resuspendieron en 5 ml de sorbitol/ $\beta$ -mercaptoetanol (17.5  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol en 50 ml sorbitol 1 M) por gramo de peso húmedo. Se añadieron 0.4 mg/ml de zimoliasa 100-T (Seikagaku Co., Tokyo, Japón) y se incubó a 30°C durante 1 hora con agitación suave. La eficiencia de la digestión se determinó midiendo la D.O.<sub>600 nm</sub> de una muestra resuspendida en  $H_2O$  antes y después del tratamiento con zimoliasa (debe ser el 10-30% del valor inicial).

Tras la lisis con zimoliasa se cogieron los protoplastos y se lavaron cuidadosamente primero con 50 ml de solución de lavado I (Sorbitol 1M, Tris-HCl 20 mM pH. 8.0, EDTA 1mM, NaCl 150 mM) y después con 50 ml de solución I, PMSF (Fenilmetilsulfonil fluorido) 1 mM. Finalmente se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de solución II (Tris-HCl 20 mM pH. 8.0, EDTA 1mM, NaCl 150 mM), PMSF 1 mM, Tritón X-100 0.2% por gramo de peso húmedo (lisado).

## **II. 18. 2. Preparación de DNA tratado con DNasa I o nucleasa micrococcal (MNasa).**

Los lisados obtenidos en el apartado 2. 18. 1. se digirieron inmediatamente en un volumen final de 3 ml bien con DNasa I (Boehringer, Inc.) o bien con MNasa a diferentes concentraciones. La digestión con DNasal se realizó en tampón de digestión de DNasa I (Tris-HCl 0.015 M pH. 7.5, NaCl 0.075 M,  $MgCl_2$  3 mM,  $CaCl_2$  0.5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.007%) durante 2 minutos a 37°C con concentraciones de DNasal desde 0 a 270 U con diferencias de 30 U cada par de puntos. La digestión con MNasa se realizó en tampón de digestión de MNasa (Tris-HCl 0.015 M pH. 8.0, NaCl 0.05 M,  $CaCl_2$  1.4 mM, EGTA 0.2 mM, EDTA 0.2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.0035%) durante 20 minutos a 37°C con concentraciones de MNasa desde 6.25 a 800 mU, duplicándose la concentración en cada muestra. Las reacciones se pararon primero con 40  $\mu$ l Tris-HCl 1M, 60  $\mu$ l EDTA 0.5 M y 150  $\mu$ l SDS 10% durante 30 minutos a 37°C, y después con 150  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml durante otros 30 minutos. Para los controles con DNA desnudo se el mismo protocolo de digestión pero reduciendo todos los volúmenes 10 veces y con un intervalo de concentraciones de MNasa entre 0.003 y 1.6 mU.

Después de la digestión con proteinasa K el lisado se incubó durante 30 minutos a 65°C (la mezcla ya contiene SDS) y se continuó a partir de este punto con el protocolo descrito en el apartado II. 10. 2. 2 para protoplastos (A las digestiones de DNA desnudo se les añadió 0.1 volúmenes de SDS 10%). Las muestras se resuspendieron en un volumen final de 50  $\mu$ l de  $H_2O$ . La calidad de las digestiones con DNasal o con MNasa se determinó corriendo una alícuota en un gel de agarosa 0.7% en TAE 1X.

## II. 18. 4. Mapeo de sitios de resistencia a MNasa y de hipersensibilidad a DNasa I

Las muestras de DNA genómico tratadas con DNasa I o con MNasa con los grados de digestión adecuados se cortaron con *ScaI* (MMTV-*lacZ*), con *EcoRI* (*GAL1* endógeno) o con *Clal* (*GAL1-lacZ*), se precipitaron, se lavaron con etanol 70% y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O. Las diferentes bandas se resolvieron en un gel de agarosa 1.5 % en TBE 0.5X, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con las sondas correspondientes para cada sistema marcadas  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por PCR. Las sondas fueron: un fragmento de 200 pb justo corriente abajo de de la diana *ScaI* de la región reguladora amplificado a partir del plásmido pRS416MMTVLTR con los oligos 5'ACT ATT TTT ACT CAA ATT CAG AAG TTA GA3' (5') y 5'GGG ACC TTA CAT CTA CAG ACC AAC3' (3') (MMTV-*lacZ*); un fragmento de 196 pb justo corriente abajo de la diana *EcoRI* de la región reguladora amplificado a partir del plásmido pBKGAL1 con los oligos 5'ATT CGA CAG GTT ATC AGC AAC3' (5') y 5'TTA AAC TTC TTT GCG TCC ATC3' (3') (*GAL1* endógeno); un fragmento de 202 pb pb justo corriente arriba de la diana *Clal* de *lacZ* amplificado a partir del plásmido p416GAL1lacZ con los oligos 5'TCGTTGCTGCATAAACCG3' (5') y 5'TCGATAATTTACCGCCG3' (3'). Como controles internos se usó DNA sin tratar con nucleasas (DNasal o MNasa) y digerido con *SacI* o *DraI* (MMTV-*lacZ*), *DraI* (*GAL1* endógeno) y *SacI* o *XbaI* (*GAL1-lacZ*).

## II. 19. MAPEO DE LOS SITIOS DE INICIACION Y TERMINACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIANTE PROTECCION A RNasa A

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Forester *et al.* (1987) con las modificaciones descritas por Almoguera *et al.* (1995). Todas las soluciones empleadas se trataron con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1% durante 12 horas y se autoclavaron posteriormente. Las puntas y tubos eppendorf se usaron directamente de las bolsas y se emplearon guantes durante todo el protocolo.

Para mapear los extremos del RNA se hibridaron en tampón de hibridación (II. 15. 4) 30  $\mu\text{g}$  de RNA (II. 10. 3) con  $5 \times 10^5$  cuentas por millón (c.p.m.) de ribosonda (II. 15. 4) en un volumen final de 60  $\mu\text{l}$  durante 12-16 horas a 48°C. Para ello las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 85°C e inmediatamente se pasaron a un baño a 48°C.

Los híbridos de RNA-RNA se trataron con RNasa A para eliminar el RNA de cadena sencilla. Para ello se incubaron las muestras con 600  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 5 mM pH 8.0, NaCl 0.3 M, 1.15 mg Rnasa

A; preparado en el momento) durante 30 ó 60 minutos a 30°C. Las reacciones de digestión se pararon con 20 µl SDS 10% y 3 µl proteinasa K 10 mg/ml durante 15 minutos a 37°C. Las muestras se fenolizaron, se precipitaron con 3 µl de tRNA de levadura 10 µg/µl y etanol 96%, se centrifugaron, se lavaron con etanol 70% y se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga desnaturante (II. 15. 4.).

Para determinar la orientación y extremos de los transcritos se corrieron las muestras en un gel de acrilamida desnaturante al 4% (II. 12. 2). Tras la electroforesis el gel se secó y se puso a exponer una autorradiografía.

## **II. 20. CONSTRUCCION DE LA GENOTECA DE pRS314-LB**

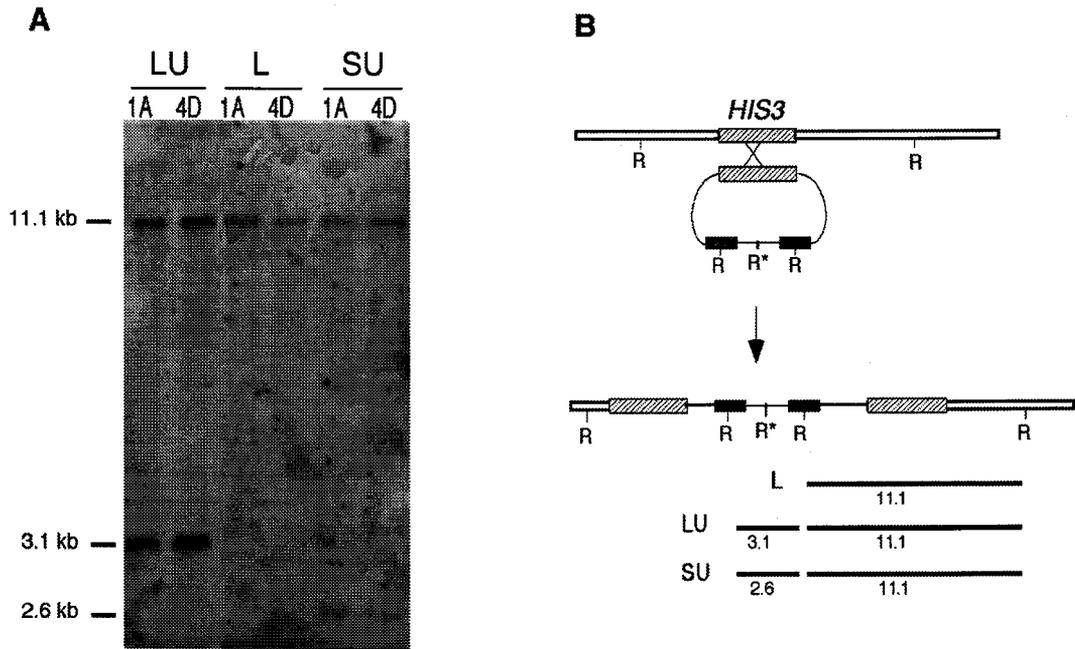
Para obtener el inserto se digirió con *Sau3A* DNA genómico de la estirpe W303-1A, los fragmentos se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa 1% y el DNA entre 100-500 pb se extrajo por el protocolo de fenol (II. 13. 1). Para obtener el vector se construyó el plásmido pRS314-LB, se cortó con *BglII* entre las repeticiones de *leu2Δ* y se desfosforilaron los extremos con CIP. Tanto el DNA del vector como del inserto se limpiaron pasándolos por una columna de Sephadex G50. La ligación se hizo a 14°C. Se transformó *E. coli* con la ligación, se recogieron las células de las transformaciones y se extrajo el DNA mediante CsCl. El porcentaje de inserto se determinó analizando 70 transformantes independientes.

## **II. 21. INTEGRACION EN EL CROMOSOMA Y COMPROBACION MOLECULAR DE LOS SISTEMAS DE RECOMBINACION L, LU y SU**

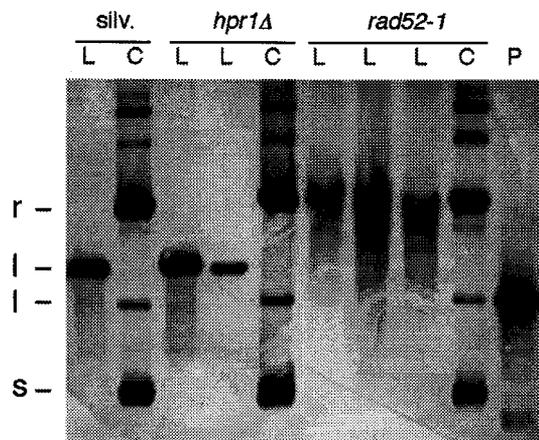
Para integrar los sistemas L, LU y SU en el locus *HIS3* del cromosoma XV transformamos las estirpes W303-1A y AAW19-4D con los plásmidos pRS303-L, pRS303-LU y pRS303-SU, respectivamente, linearizados con *BglII*, que corta dentro de *HIS3*. Los transformantes se seleccionaron en SC-His, y se comprobaron mediante Southern 2-3 candidatos por estirpe y sistema (FIGURA 7).

## **II. 22. COMPROBACION MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA LINEAL Y CIRCULAR DE pTEL-LU**

Tras transformar las estirpes 315-9C, AYW3-4D y FX315-5B con el plásmido pTEL-LU circular o linearizado con *BglII*, que corta en las secuencias teloméricas, se comprobó la estructura de los plásmidos en los transformantes mediante Southern (FIGURA 8).



**FIGURA 7. (A)** Comprobación molecular por Southern de la integración de los sistemas L, LU y SU en el locus *HIS3* de las estirpes W303-1A (silvestre) y AAW19-4D (*hpr1Δ*). El DNA total de los transformantes se digirió con *EcoRI* y se hibridó con pBR322. **(B)** Representación gráfica de la integración de los sistemas con los puntos de corte de *EcoRI* (R) y los tamaños de las bandas esperadas (kb). La integración de los plásmidos da lugar a la duplicación del marcador *HIS3*. R\* sólo corta entre las repeticiones del sistema L. Los rectángulos representan DNA de levaduras y la línea continua fina DNA de pBR322. Las líneas continuas gruesas situadas en la parte inferior del mapa representan los fragmentos obtenidos en el Southern en cada sistema y los tamaños están indicados en kb.



**FIGURA 8.** Comprobación molecular por Southern del plásmido pTEL-LU circular (C) y lineal (L) en las estirpes silvestre (315-9C), *hpr1Δ* (AYW3-4D) y *rad52-1* (FX315-5B). El DNA total de los transformantes sin digerir se separó por electroforesis y se hibridó con pBR322 marcado con digoxigenina. Como control se usó el plásmido pTEL-LU extraído por mini-preps (P); la estructura de cada banda se indica en cada caso: r, molécula circular relajada; s, molécula circular superenrollada negativamente; l, molécula lineal. La molécula lineal (l) del minicromosoma (L) es de mayor tamaño que la deriva del plásmido circular (C). Probablemente es consecuencia de la incorporación de secuencias teloméricas en la célula. Este proceso puede estar afectado por la mutación *rad52*, que genera un barrido de bandas considerablemente mayor (ver carril correspondiente a *rad52*)

### **III. RESULTADOS**

### III. RESULTADOS

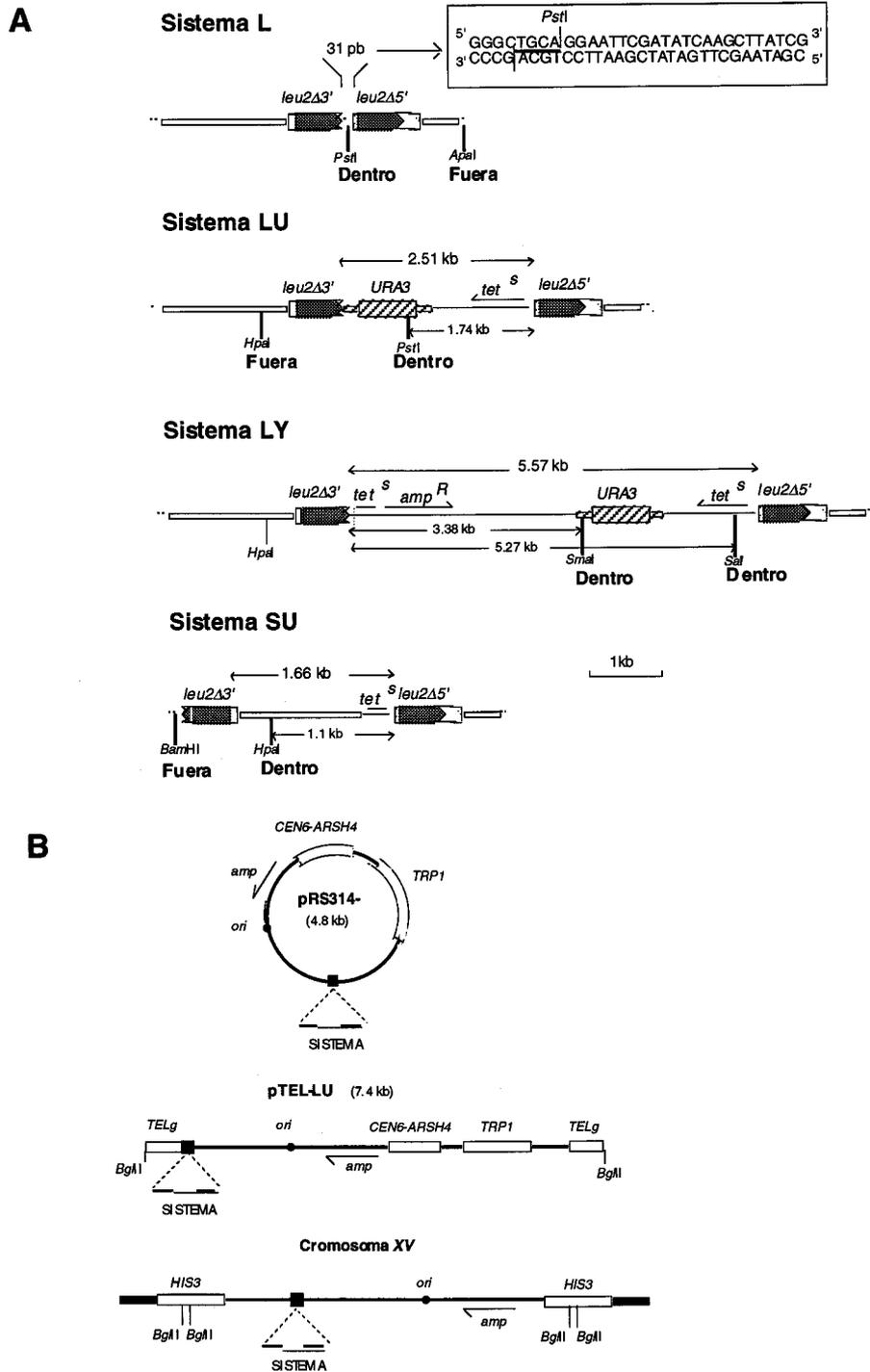
#### III. 1. ESTUDIO DE LA RECOMBINACION ESPONTANEA ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS

El estudio comparativo de la recombinación en sistemas de repeticiones directas e invertidas ha tenido como objetivo definir los mecanismos responsables de las deleciones. Para ello hemos analizado los sucesos de recombinación que ocurren de forma espontánea en la célula tanto en estirpes silvestres como mutadas en diferentes genes *RAD*.

##### III. 1. 1. Análisis de la recombinación espontánea entre repeticiones directas e invertidas localizadas en plásmidos centroméricos.

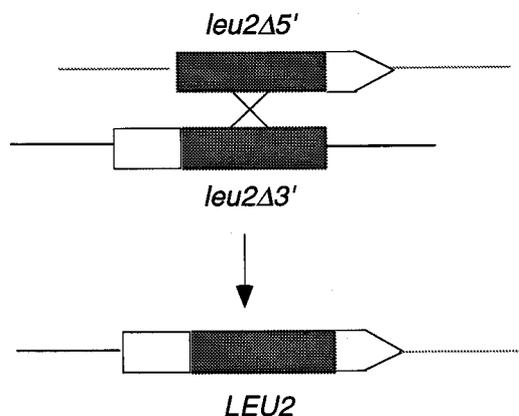
*Análisis genético.* Con objeto de comprender los mecanismos y funciones implicados en la recombinación entre secuencias repetidas, en particular entre repeticiones directas, hemos construido una serie de sistemas de repeticiones basados en el plásmido centromérico pRS314 (FIGURA 9B). Todos los sistemas presentan la misma secuencia repetida (598 pb de la región codificante del gen *LEU2*) tanto en orientación directa como invertida, y difieren únicamente en el tamaño y origen de la secuencia intermedia. Los sistemas L, LU y LY son sistemas de repeticiones directas separados por fragmentos de 31 pb (L), 2.51 kb (LU) y 5.57 kb (LY) (FIGURA 9A). La secuencia intermedia es diferente en cada sistema. En el sistema L es un pequeño fragmento del polilinker KS+, en el sistema LU es un fragmento de 1.4 kb de pBR322 más el gen *URA3*, y en el sistema LY es el vector pBR322 completo más el gen *URA3*. Las inversiones se han estudiado en el sistema de repeticiones invertidas SU, que presenta la misma repetición de 598 pb separada por una secuencia de 1.66 kb. Esta secuencia es DNA de levadura más un pequeño fragmento del gen *tet* de pBR322 ( FIGURA 9).

Todos los sistema de recombinación estan formados por dos copias truncadas del gen *LEU2*; una de ellas presenta una deleción del extremo 3' (*leu2Δ3'*) y la otra una deleción del extremo 5' (*leu2Δ5'*). Por recombinación homóloga entre las repeticiones se genera una copia correcta del gen *LEU2*, lo que permite seleccionar positivamente los recombinantes en medio SC-Leu (FIGURA 10). En el caso de repeticiones directas el suceso de recombinación va acompañado de la pérdida de la secuencia intermedia y una de las repeticiones, mientras que en el caso de recombinación entre secuencias invertidas se produce



**FIGURA 9. (A)** Sistemas de repeticiones construidos para este estudio. Los rectángulos indican DNA de levadura, mientras que la línea negra indica DNA de pBR322. Las repeticiones de 598 pb (*leu2Δ3'* y *leu2Δ5'*) corresponden a la zona sombreada de la caja que representa el marcador *Leu2*. Las dianas de restricción indicadas son las usadas en los experimentos de recombinación inducida por DSB. **(B)** Moléculas de DNA en las que están situados los sistemas de la FIGURA 1A. El plásmido pTEL-LU se representa linealizado tras el corte con *Bgl*I. Entre paréntesis se indica el tamaño de los vectores sin sistema.

una inversión de la secuencia intermedia, sin pérdida de material genético (FIGURA 3). Además, en el caso del sistema LU la delección da lugar a la pérdida del marcador *URA3* situado entre las repeticiones, por lo que los recombinantes *Leu<sup>+</sup>* son a la vez *Ura<sup>-</sup>*.



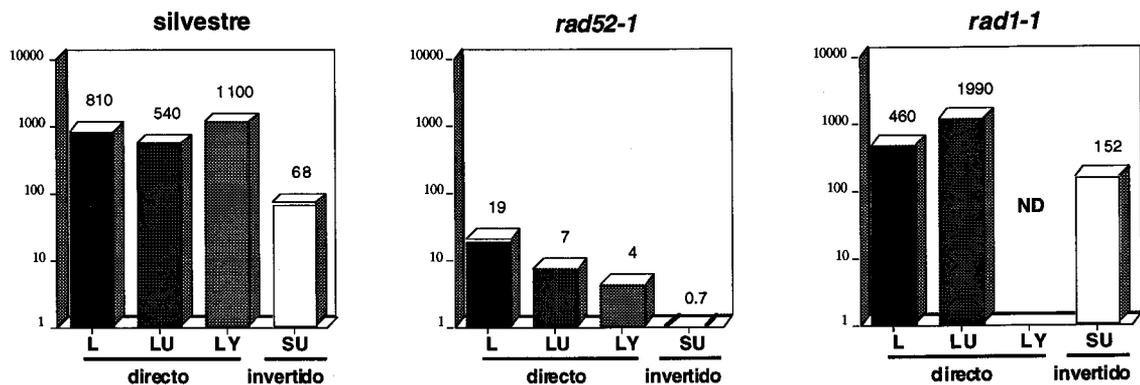
**FIGURA 10.** Formación de una copia silvestre del gen *LEU2* por recombinación entre los marcadores *leu2Δ5'* y *leu2Δ3'*. Dependiendo de que las repeticiones sean directas o invertidas el suceso irá acompañado de un delección o de una inversión, respectivamente (ver FIGURA 3).

Hemos partido de dos premisas:

1.- Las inversiones entre repeticiones invertidas se producen únicamente por intercambio recíproco intramolecular, mientras que las delecciones entre repeticiones directas pueden, en principio, producirse por otros sucesos de recombinación, tales como intercambio desigual entre cromátidas hermanas (SCE), conversión génica desigual o recombinación no conservativa (ver INTRODUCCION). Las delecciones o las inversiones no pueden generarse por conversión génica, al tener cada copia del sistema una delección diferente del gen *LEU2*. Por tanto, si las delecciones espontáneas se produjeran exclusivamente por intercambio recíproco, la frecuencia de recombinantes *Leu<sup>+</sup>* en los sistemas de repeticiones directas LU y LY debería ser igual a la frecuencia de recombinantes *Leu<sup>+</sup>* en el sistema de repeticiones invertidas SU.

2.- La separación de sólo 31 pb entre las repeticiones en el sistema L debe imponer limitaciones estéricas al emparejamiento de las secuencias homólogas en comparación con los sistemas LU y LY, donde las secuencias intermedias son cuatro y nueve veces el tamaño de la repetición, respectivamente. Según este criterio, las distancias muy cortas entre las repeticiones pueden limitar la frecuencia de recombinación. Por tanto, cabría esperar que la frecuencia de delecciones en L fuera inferior a la de LU y LY.

En la FIGURA 11 se muestra que la frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  es similar en los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY, y significativamente superior (10 veces) a la frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  en el sistema de repeticiones invertidas SU. Estos resultados sugieren que las deleciones entre repeticiones directas se producen por mecanismos adicionales a la recombinación recíproca responsable de las inversiones entre repeticiones invertidas. Por otro lado, la falta de efecto de la distancia entre las repeticiones directas en los niveles de recombinación espontánea sugiere que no hay limitaciones estéricas en el emparejamiento de las secuencias homólogas.



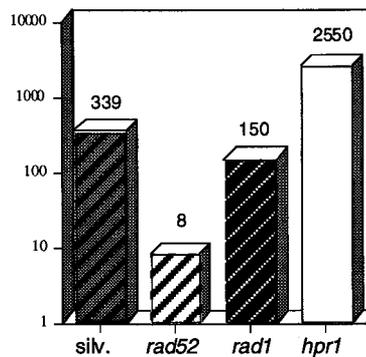
**FIGURA 11.** Frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  ( $\times 10^6$ ) en los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY y en el sistema de repeticiones invertidas SU situados en el plásmido centromérico pRS314 en diferentes estirpes *rad*. Los valores corresponden a la mediana de 2-5 tests de fluctuación de las estirpes W303-1A (silvestre), FX315-5B (*rad52-1*) y 356-11A (*rad1-1*). Resultados similares se obtuvieron en las estirpes W303-1B (silvestre) y FX315-2D (*rad52-1*) (Para más detalles ver APENDICE). ND indica no determinado. Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo para los diferentes plásmidos (SC-Trp). Los recombinantes se determinaron en SC- $Leu^+$  y las células totales en SC-Trp.

Con objeto de definir las posibles rutas de recombinación responsables de las deleciones entre repeticiones directas hemos analizado el efecto de mutaciones en los genes *RAD1* y *RAD52*, previamente implicados en recombinación intramolecular (Klein 1988, Schiestl and Prakash 1988, Aguilera and Klein 1989). Hemos usado los alelos *rad1-1* y *rad52-1* por conveniencia y porque el efecto de estas mutaciones descrito en recombinación es tan fuerte como el de las mutaciones nulas (Jackson and Fink 1981, Klein 1988, Schiestl and Prakash 1988, Aguilera and Klein 1989).

En la FIGURA 11 se muestra que mientras la mutación *rad1-1* no tiene efecto sobre la frecuencia de recombinantes  $Leu^+$ , la mutación *rad52-1* reduce fuertemente los niveles de recombinación tanto en los sistemas de repeticiones directas como invertidas (50-200 veces). Los niveles de deleciones entre

repeticiones directas son aún significativos en estirpes *rad52-1* ( $10^{-5}$ ), y se mantienen un orden de magnitud por encima de los niveles de inversiones en el sistema de repeticiones SU (FIGURA 11).

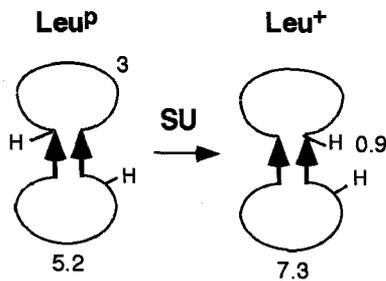
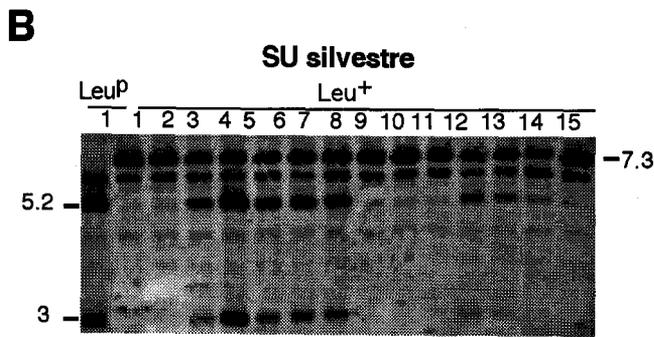
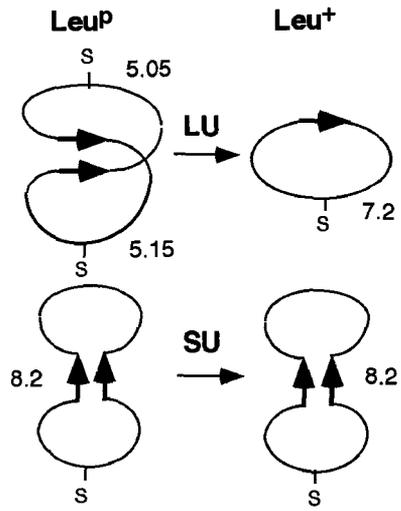
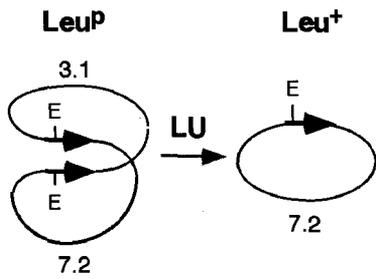
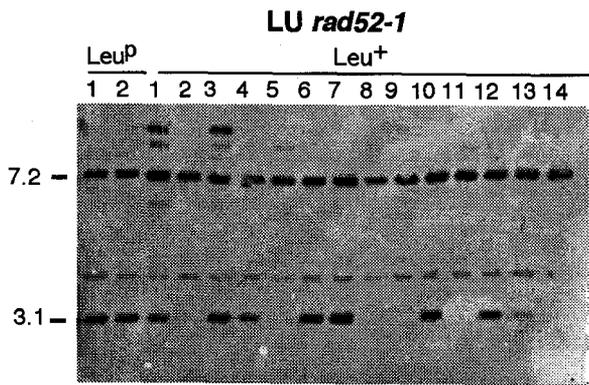
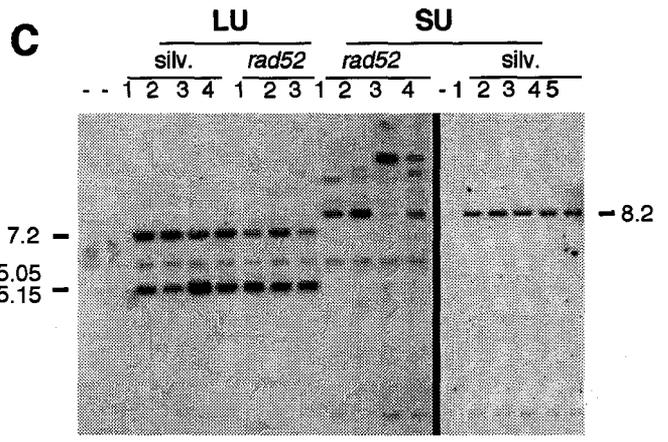
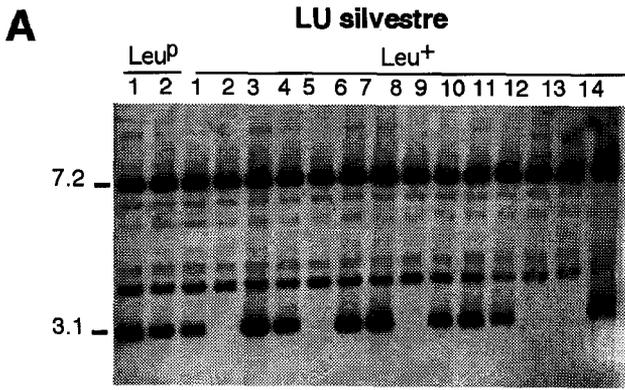
El comportamiento en recombinación de los sistemas no es consecuencia de las características específicas del plásmido pRS314. Las deleciones del sistema LU en el plásmido YCp70 (vector YCp70-LU) se producen a la misma frecuencia que en el plásmido pRS314 (comparar FIGURAS 11 y 12).



**FIGURA 12.** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) del sistema de repeticiones directas LU localizado en el plásmido centromérico YCp70 (plásmido YCp70-LU). Cada valor corresponde a un test de fluctuación realizado en las estirpes W303-1A (silvestre), FX315-4D (*rad52-1*), 356-11A (*rad1-1*) y AYW3-4D (*hpr1Δ*). Resultados similares se obtuvieron en las estirpes W303-1B (silvestre), FX315-5D (*rad52-1*) y AYW3-5D (*hpr1Δ*) (para más detalles ver APENDICE). Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo (SC-Ura). Los recombinantes se determinaron en SC-Leu, y las células totales en SC-Ura. Al igual que en el plásmido pRS314-LU, las deleciones en el plásmido YCp70-LU son fuertemente dependientes de *RAD52* e independientes de *RAD1*.

*Análisis molecular de los sucesos de recombinación.* Hemos estudiado mediante Southern los productos recombinantes de los sucesos seleccionados en las estirpes silvestre y *rad52-1*. En la estirpe silvestre los 14 recombinantes Leu<sup>+</sup> del sistema de repeticiones directas LU y los 15 del sistema de repeticiones invertidas SU presentan el patrón esperado de una deleción o de una inversión, respectivamente (FIGURA 13A y 13B). Además se han comprobado los patrones de otros 7 recombinantes Leu<sup>+</sup> del sistema LU y 7 Leu<sup>+</sup> del sistema SU mediante análisis de restricción de los plásmidos recombinantes purificados de levadura y propagados en *E. coli*. Los 14 plásmidos tenían el patrón esperado (dato no mostrado).

El análisis genético de los recombinantes Leu<sup>+</sup> del sistema LU muestra que el 70% son Ura<sup>+</sup>, lo que sugiere la presencia de dos plásmidos, uno con el sistema recombinante y otro con el sistema parental. Este resultado se ha confirmado mediante análisis por Southern, donde se observa que tanto en el sistema LU (8 de los 14) como en el sistema SU (7 de los 15) además del plásmido con el



**FIGURA 13.** Comprobación molecular por Southern de las deleciones e inversiones en los sistemas LU y SU en estirpes silvestre y *rad52-1*. **(A)** Análisis con *EcoRI* de las deleciones del sistema LU en estirpes silvestre y *rad52-1*, **(B)** con *HindIII* de las inversiones del sistema SU en una estirpe silvestre, y **(C)** con *Scal* de las deleciones del sistema LU y de las inversiones del sistema SU en estirpes silvestre y *rad52-1*. Se usaron las estirpes W303-1A (silvestre) y FX315-4D (*rad52-1*). El DNA total de los transformantes parentales ( $Leu^P$ ) y recombinantes ( $Leu^+$ ) se digirió con la enzima correspondiente y se hibridó con pBR322 marcado con digoxigenina. Se analizaron 1 ó 2  $Leu^P$  y 14-15  $Leu^+$  en (A) y (B) y sólo se analizaron  $Leu^+$  (3 ó 4 por sistema y estirpe) en (C). Como control negativo se usó DNA de las estirpes sin transformar (-). Debajo de cada Southern se representan graficamente los sistemas parentales ( $Leu^P$ ) y recombinantes ( $Leu^+$ ) de los sistemas LU y SU con los puntos de corte de las dianas analizadas. Los dibujos no están a escala. Los fragmentos esperados para el sistema LU parental ( $Leu^P$ ) son de 7.2 y 3.1 kb tras cortar con *EcoRI*, y de 5.15 y 5.05 kb tras cortar con *Scal*; tras la deleción el fragmento esperado para el sistema LU recombinante ( $Leu^+$ ) es de 7.2 kb tanto con *EcoRI* como con *Scal*. Los fragmentos esperados para el sistema SU parental ( $Leu^P$ ) son de 5.2 y 3 kb tras cortar con *HindIII*, y de 8.2 kb tras cortar con *Scal*; tras la inversión los fragmentos esperados son de 7.3 y 0.9 kb con *HindIII* (el fragmento de 0.9 kb no hibrida con pBR322) y de 8.2 kb con *Scal*.

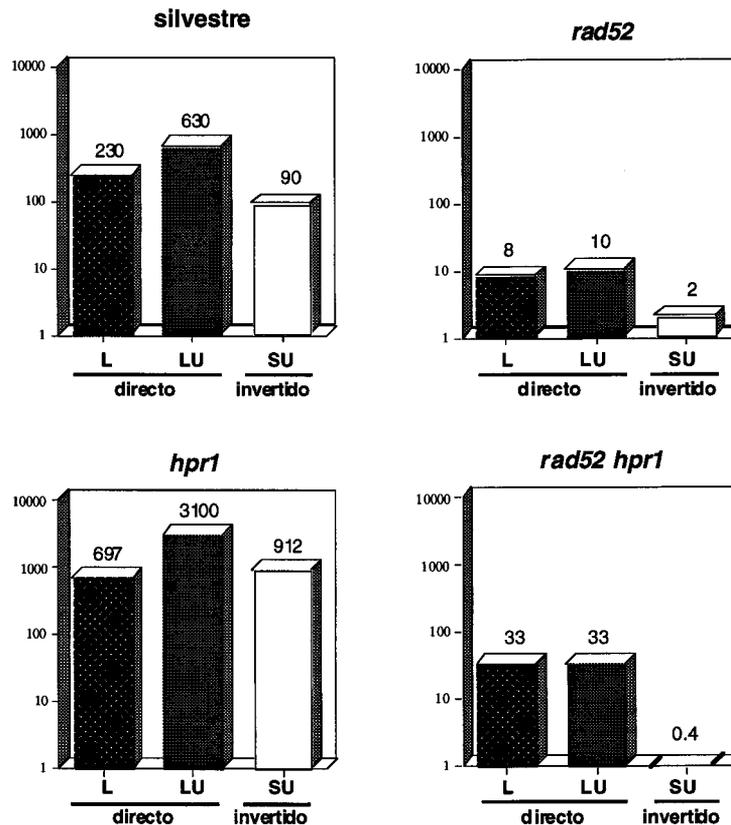
sistema recombinante aparece el plásmido con el sistema parental (FIGURA 13A y 13B). La presencia de dos plásmidos puede deberse a segregación mitótica incorrecta de plásmidos CEN (Murray and Szostak 1983).

En estirpes *rad52-1* los 14 recombinantes  $Leu^+$  analizados del sistema LU presentan tanto el patrón esperado para una deleción como la presencia de dos plásmidos en una alta proporción (65%  $Leu^+Ura^+$ ) (8 de los 14 analizados por Southern) (FIGURA 13A), lo que sugiere que hay una ruta independiente de *RAD52* capaz de producir deleciones. Sin embargo, los recombinantes  $Leu^+$  del sistema SU presentan un patrón aberrante y no repetitivo (FIGURA 13C), lo que concuerda con el hecho de que las inversiones se producen únicamente por recombinación recíproca, mecanismo dependiente de *RAD52*.

### III. 1. 2. Análisis genético de la recombinación espontánea entre repeticiones localizadas en cromosomas.

Con objeto de averiguar si la localización cromosómica de los sistemas de repeticiones puede modificar las características de recombinación observadas en los plásmidos centroméricos, hemos integrado los sistemas de repeticiones directas L y LU y el sistema de repeticiones invertidas SU en el locus *HIS3* del cromosoma XV (FIGURA 7B).

El análisis de los recombinantes  $Leu^+$  en los sistemas cromosómicos muestra que no hay diferencias significativas con los sistemas plasmídicos (FIGURA 14). Las deleciones ocurren 5-7 veces con más frecuencia que las inversiones, y tanto las deleciones como las inversiones siguen dependiendo fuertemente de Rad52p.

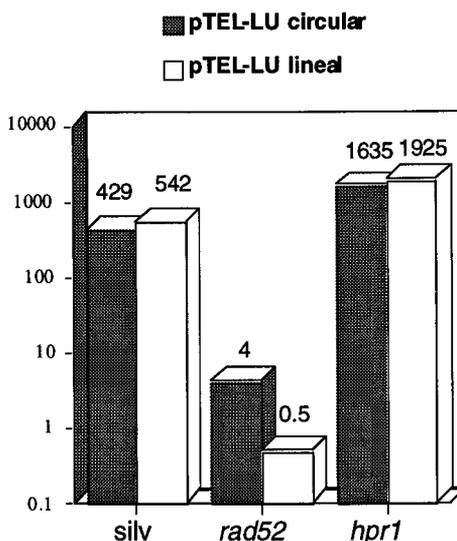


**FIGURA 14.** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) de los sistemas de repeticiones directas L y LU y de repeticiones invertidas SU integrados en el locus *HIS3* del cromosoma XV en las estirpes silvestre, *rad52*, *hpr1* y *rad52 hpr1*. El valor indicado para cada genotipo corresponde a la mediana de varios test de fluctuación realizados sobre varias estirpes (para más detalles ver APENDICE). Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en YEPD. Los recombinantes se determinaron en SC-Leu y las células totales en YEPD.

### III. 1. 3. Análisis genético de la recombinación espontánea entre repeticiones localizadas en minicromosomas.

Existe la posibilidad de que los sucesos de recombinación que estamos estudiando dependan de factores estructurales tales como el superenrollamiento. Con objeto de determinar si la frecuencia de deleciones varía dependiendo de que el sistema de repeticiones se encuentre localizado en un plásmido circular o en una molécula linealizada hemos puesto el sistema de repeticiones LU en un minicromosoma. Para ello se han añadido secuencias teloméricas al vector pRS314-LU, dando lugar al plásmido pTEL-LU. El plásmido pTEL-LU cortado con *Bgl*II genera un minicromosoma (FIGURA 9B). La estructura lineal o circular de los plásmidos en los diferentes transformantes se ha comprobado mediante Southern (MATERIALES Y METODOS; FIGURA 8).

La frecuencia de deleciones entre repeticiones directas es la misma independientemente de que el sistema LU se encuentre en un plásmido circular o en una molécula lineal. Además, en ambos casos los sucesos dependen fuertemente de Rad52 (FIGURA 15).



**FIGURA 15.** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) del sistema de repeticiones directas LU localizado en el minicromosoma pTEL-LU. Cada valor corresponde a un test de fluctuación realizado en las estirpes W303-1A (silvestre), FX315-5B (*rad52-1*) y AYW3-4D (*hpr1Δ*). Resultados similares se obtuvieron en las estirpes 315-9C (silvestre) y AYW3-5D (*hpr1Δ*) (Para más detalles ver APENDICE). Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en la leyenda de la FIGURA 5.

### III. 1. 4. Búsqueda de mutantes defectivos en recombinación entre secuencias repetidas

Con objeto de definir genéticamente nuevas funciones necesarias tanto para la recombinación homóloga en general como para los mecanismos específicos responsables de las deleciones e inversiones, hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes deficientes en recombinación intramolecular. Para ello hemos transformado la estirpe silvestre 315-9C con los plásmidos centroméricos pRS314-LU y pRS314-SU independientemente, con la esperanza de aislar mutaciones específicas de cada sistema.

Tras mutagenizar con nitrosoguanidina y permitir la segregación de las mutaciones, se han buscado aquellos transformantes con niveles de recombinación inferiores a los de la estirpe parental. Los niveles de recombinación se han seguido mediante réplica de los transformantes a medio selectivo SC-Leu. En este medio los recombinantes forman colonias sobre la huella de la réplica (papilas). Se han escrutado 11787 colonias transformadas con el sistema SU y 9277 colonias transformadas con el sistema LU, obteniéndose 3 y 7 candidatos iniciales, respectivamente. Los 10 mutantes fueron curados y retransformados con los plásmidos pRS314-LU y -SU, para eliminar la posibilidad de que el fenotipo observado se debiera a una alteración del sistema de recombinación tras la mutagénesis. Tras determinar los niveles de recombinación mediante tests de fluctuación y comprobar por análisis genético qué mutantes eran monogénicos,

nos quedamos finalmente con 5 mutantes con niveles de recombinación al menos 10 veces inferiores a los de la estirpe silvestre (2 con el sistema SU y 3 con el sistema LU) (TABLA 2).

**TABLA 2. Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) de los sistemas de repeticiones LU y SU en cinco nuevas estirpes *rad52*.**

Genotipo <sup>a</sup>	LU <sup>b</sup>	SU
Silvestre	430 (x1)	61 (x1)
<i>rad52-11</i>	12 (x0.03)	2 (x0.03)
<i>rad52-12</i>	ND <sup>c</sup>	4 (x0.07)
<i>rad52-13</i>	11 (x0.03)	ND
<i>rad52-14</i>	30 (x0.07)	ND
<i>rad52-15</i>	69 (x0.16)	ND

<sup>a</sup>La estirpe silvestre usada fue la parental 315-9C a partir de la cual se obtuvieron los mutantes.

<sup>b</sup>Cada valor corresponde a un test de fluctuación independiente. Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo para los diferentes plásmidos (SC-Trp). Los recombinantes se determinaron en SC-Leu y las células totales en SC-Trp. Entre paréntesis se indica la reducción en los niveles de recombinación respecto al nivel silvestre

<sup>c</sup>ND indica no determinado

Dada la relación entre recombinación y reparación, hemos analizado la capacidad de reparar cortes de doble cadena de los mutantes. Todos son sensibles a MMS al 0.02% en medio YEPD sólido, por lo que hemos comprobado mediante cruces genéticos si son mutaciones en genes conocidos de recombinación (Friedberg 1988). Las 5 mutaciones eran alelos de *RAD52*. Por tanto, esta mutagénesis sugiere que hay pocos genes en levadura que al ser mutados produzcan una reducción importante en los niveles de recombinación intramolecular espontánea. Además, confirma la importancia de la función Rad52 en nuestros sistemas de recombinación.



### III. 2. ESTUDIO DE LA RECOMBINACION INDUCIDA POR UN CORTE DE DOBLE CADENA (DSB)

Con objeto de entender el posible papel de la iniciación en las diferencias de recombinación entre repeticiones directas e invertidas, hemos analizado los sucesos de recombinación iniciados por DSB tanto en estirpes silvestres como en estirpes mutantes en los genes *RAD1*, *RAD10* y *RAD52*.

#### III. 2. 1. Análisis genético de la recombinación en los sistemas de repeticiones directas e invertidas en estirpes silvestres

Para estudiar el efecto de un DSB en la recombinación de los sistemas de repeticiones, hemos determinado la capacidad de las estirpes silvestres de reparar un DSB hecho *in vitro* con diferentes enzimas de restricción en secuencias únicas de los sistemas L, LU, LY y SU. Para ello hemos transformado en medio selectivo (SC-Trp) con los plásmidos cortados. En cada caso se ha determinado la frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup>, que representan los sucesos reparados mediante una delección. El corte se ha realizado bien en la secuencia intermedia (DENTRO) o fuera del sistema de repeticiones (FUERA) (FIGURA 9A). Como control hemos analizado primero las características de recombinación tras la transformación de los plásmidos sin cortar.

*Análisis de los plásmidos sin cortar.* La frecuencia de delecciones en los sistemas L, LU y LY es de  $8-10 \times 10^{-2}$  (8-10%) tras la transformación (TABLA 3), frente a una frecuencia 100 veces menor ( $8.1-11 \times 10^{-4}$ ) obtenida anteriormente (apartado III. 1. 1) una vez que el plásmido se ha propagado de forma estable durante varias generaciones (ver FIGURA 11). Esta diferencia de dos órdenes de magnitud se da también para el sistema de repeticiones invertidas SU ( $3 \times 10^{-3}$  frente a  $6.8 \times 10^{-4}$ ). En cualquier caso, se mantiene la diferencia de 10 veces entre la frecuencia de delecciones e inversiones (TABLA 3). Los niveles más elevados de recombinación obtenidos al transformar sugieren que el DNA en el momento de entrar en la célula es más recombinogénico, probablemente porque se encuentra libre de proteínas o porque, inevitablemente, una proporción presente mellas como consecuencia del proceso de extracción. Por el contrario, el DNA propagado de forma estable en la célula está intacto y con una estructura cromatínica adecuada. De acuerdo con esta interpretación hemos obtenido una gran variación en las frecuencias de recombinantes Leu<sup>+</sup> en experimentos de transformación independientes, en función del método de extracción de plásmidos usado y por tanto de la integridad del DNA obtenido (centrifugación por gradiente en CsCl,

"mini-preps", DNA purificado de geles de agarosa). Larionov *et al.* (1994) han llegado recientemente a las mismas conclusiones.

**TABLA 3. Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> producidos durante la transformación de estirpes silvestres con los plásmidos pRS314-L, pRS314-LU, pRS314-LY y pRS314-SU sin cortar y con un corte (DSB) dentro y fuera de las repeticiones.**

Corte <sup>a</sup>	Sistema <sup>a</sup>	Transf./μg DNA <sup>b</sup>	Leu <sup>+</sup> :Leu <sup>p</sup> <sup>c</sup>	Leu <sup>+</sup> /μg DNA
Sin cortar	L	72245	67:810 (8)	5519
	LU	48420	153:1403 (10)	4761
	LY	11165	4:40 (9)	1015
	SU	76080	8:2527 (0.3)	240
DENTRO	L ( <i>Pst</i> I)	43040	494:40 (92)	39816
	LU ( <i>Pst</i> I)	19200	546:86 (86)	16587
	LY ( <i>Sma</i> I)	41220	798:13 (98)	40559
	LY ( <i>Sal</i> I)	18815	471:18 (96)	18122
	SU ( <i>Hpa</i> I)	6260	13:230 (5)	335
FUERA	L ( <i>Apa</i> I)	2860	5:163 (3)	85
	LU ( <i>Hpa</i> I)	1734	19:144 (12)	202
	SU ( <i>Bam</i> HI)	6525	13:345 (4)	237

<sup>a</sup>Las estirpes usadas fueron AWI-1B, W303-1A y 315-9C. DENTRO indica un DSB entre las dos repeticiones; FUERA indica un DSB fuera tanto de la secuencia intermedia como de las repeticiones. La enzima de restricción usada en cada caso se indica entre paréntesis. La posición de los sitios de corte está indicada en la FIGURA 4.

<sup>b</sup>Los valores indicados corresponden a 3-5 transformaciones independientes realizadas en las estirpes AWI-1B, W303-1A y 315-9C.

<sup>c</sup>Cada valor corresponde a la suma de las relaciones de Leu<sup>+</sup>:Leu<sup>p</sup> de 3-5 transformaciones independientes. La variación estándar fue del 20%. Entre paréntesis se indica el porcentaje de recombinantes Leu<sup>+</sup>.

*Análisis de los plásmidos cortados.* Los sistemas de repeticiones directas con un DSB en la secuencia intermedia (DENTRO) presentan la misma frecuencia de transformación que los plásmidos sin cortar. Sin embargo, más del 90% de los transformantes han sufrido una delección (86-96% recombinantes Leu<sup>+</sup>) frente al 8-10% en los plásmidos sin cortar (TABLA 3). Esta fuerte estimulación de las delecciones por un DSB entre las secuencias repetidas directas resulta evidente al comparar el número de recombinantes Leu<sup>+</sup>/μg DNA entre los plásmidos cortados y sin cortar (TABLA 3). Este resultado es independiente tanto del tamaño de la secuencia intermedia como de la distancia entre el corte y las repeticiones.

Cuando el corte único se hace en la secuencia intermedia del sistema de repeticiones invertidas SU (DENTRO) la frecuencia de transformación es más de 10 veces inferior a la frecuencia de transformación con el plásmido sin cortar. En este caso la frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> es de tan sólo el 5% (TABLA 3).

Los plásmidos cortados fuera de las repeticiones (FUERA), tanto con sistemas de repeticiones directas como invertidas, muestran un comportamiento en recombinación similar al del sistema invertido SU cortado entre las repeticiones. Las frecuencias de transformación son más de 10 veces inferiores a la de los respectivos plásmidos sin cortar y las frecuencias de recombinación del 3-12% (TABLA 3).

Estos resultados sugieren claramente que un corte realizado en un fragmento de DNA localizado entre dos secuencias repetidas directas es reparado de una forma muy eficiente mediante la producción de deleciones (la frecuencia de transformación es similar para los plásmidos cortados y sin cortar y más del 90% de los transformantes han sufrido una deleción generando un recombinante Leu<sup>+</sup>). Por el contrario, los cortes realizados en fragmentos de DNA que no están flanqueados por repeticiones directas (DENTRO en el sistema de repeticiones invertidas y FUERA en los sistemas tanto de repeticiones directas como invertidas) son reparados de forma muy ineficiente y por mecanismos que no producen una molécula recombinante viable. Estos datos sugieren una explicación al hecho de que las deleciones ocurran a una frecuencia superior a las inversiones, tanto las que se producen de forma espontánea (FIGURA 11) como las que se producen durante la transformación con plásmidos sin cortar (TABLA 3). Mientras que las inversiones se generan sólo por sucesos de intercambio recíproco, que tienen que iniciarse en secuencias homólogas, las deleciones pueden producirse además por mecanismos no conservativos que se inicien tanto en las repeticiones (homólogas) como en la secuencia intermedia (no homóloga).

### **III. 2. 2. Análisis genético de las mutaciones *rad1*, *rad10* y *rad52* en la formación de deleciones entre secuencias repetidas**

El estudio de la recombinación inducida por DSB sugiere que existen mecanismos de recombinación específicos de deleciones que se inician en la secuencia intermedia. Con objeto de conocer qué funciones son necesarias en este proceso, hemos analizado la eficiencia de transformación y las frecuencias de recombinación de los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY sin cortar o con un DSB en la secuencia intermedia (DENTRO) en estirpes *rad1-1*, *rad10Δ*, *rad52-1* y *rad52-1 rad1-1* (TABLA 4).

**TABLA 4. Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> producidos durante la transformación de las estirpes *rad1*, *rad10*, *rad52* y *rad1 rad52* con los plásmidos pRS314-L, pRS314-LU y pRS314-LY sin cortar y con un corte (DSB) dentro y fuera de las repeticiones.**

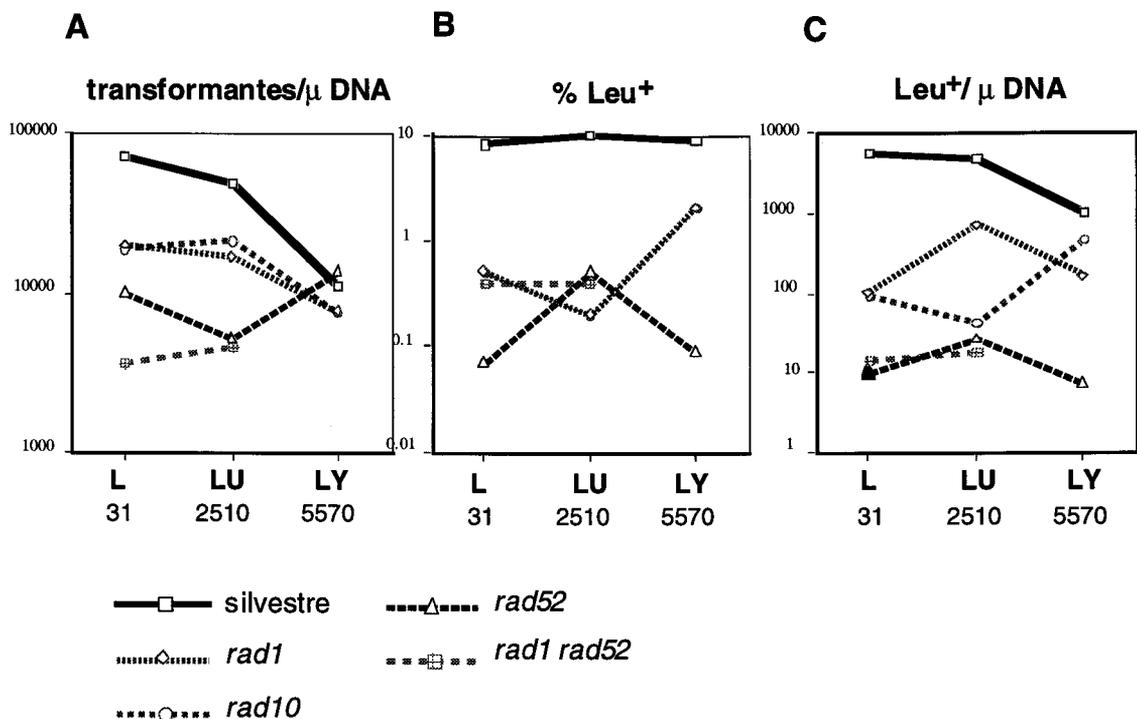
<i>rad1-1<sup>a</sup></i>					
Corte <sup>b</sup>	Sistema	Transf./μg DNA <sup>c</sup>	Leu+:Leu <sup>pd</sup>	Leu+/μg DNA	
Sin cortar	L	19640	7:1322 (0.5)	98	
	LU	16920	1:562 (0.2)	677	
	LY	7744	3:121 (2)	155	
DENTRO	L ( <i>Pst</i> I)	56315	1237:78 (94)	52936	
	LU ( <i>Pst</i> I)	16120	181:238 (43)	6931	
	LY ( <i>Sma</i> I)	4768	56:156 (26)	1240	
	LY ( <i>Sal</i> I)	2016	92:123 (43)	867	
<i>rad10Δ<sup>a</sup></i>					
Corte <sup>b</sup>	Sistema	Transf./μg DNA <sup>c</sup>	Leu+:Leu <sup>pd</sup>	Leu+/μg DNA	
Sin cortar	L	18760	3:582 (0.5)	94	
	LU	21160	1:528 (0.2)	42	
	LY	7520	1:42 (2)	451	
DENTRO	L ( <i>Pst</i> I)	20960	255:8 (97)	20331	
	LU ( <i>Pst</i> I)	4720	208:298 (41)	1935	
	LY ( <i>Sma</i> I)	1748	100:99 (50)	874	
	LY ( <i>Sal</i> I)	616	129:83 (61)	370	
<i>rad52-1<sup>a</sup></i>					
Corte <sup>b</sup>	Sistema	Transf./μg DNA <sup>c</sup>	Leu+:Leu <sup>pd</sup>	Leu+/μg DNA	
Sin cortar	L	10040	0:1462 (<0.07)	<10	
	LU	5160	2:379 (0.5)	<26	
	LY	13648	0:1028 (<0.09)	<7	
DENTRO	L ( <i>Pst</i> I)	3680	546:108 (83)	3128	
	LU ( <i>Pst</i> I)	3720	300:74 (80)	3125	
	LY ( <i>Sma</i> I)	1460	371:35 (91)	1314	
	LY ( <i>Sal</i> I)	688	76:247 (23)	179	
<i>rad1-1 rad52-1<sup>a</sup></i>					
Corte <sup>b</sup>	Sistema	Transf./μg DNA <sup>c</sup>	Leu+:Leu <sup>pd</sup>	Leu+/μg DNA	
Sin cortar	L	3586	0:246 (<0.4)	<14	
	LU	4526	0:259 (<0.4)	<18	
DENTRO	L ( <i>Pst</i> I)	2453	160:41 (80)	1962	
	LU ( <i>Pst</i> I)	1690	4:65 (6)	101	

<sup>ab</sup>Las estirpes usadas fueron: *rad1-1*, AWF-2D y 356-11A; *rad10Δ*, UWA-4A y UWA-3C; *rad52-1*, FX315-4D, FX315-5B y AWF-6B; *rad1-1 rad52-1*, AWF-4B y AWF-5B. DENTRO indica un DSB entre las dos repeticiones. La enzima de restricción usada en cada caso se indica entre paréntesis. La posición de los sitios de corte está indicada en la FIGURA 4.

<sup>c</sup>Los valores indicados corresponden a la media de 3 transformaciones independientes.

<sup>d</sup>Cada valor corresponde a la suma de las relaciones de  $\text{Leu}^+:\text{Leu}^P$  de 3-5 transformaciones independientes. La variación estándar fue del 20%. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

**Análisis de los plásmidos sin cortar.** El análisis genético de los plásmidos sin cortar muestra que las mutaciones *rad1*, *rad10* y *rad52* afectan tanto a la eficiencia de la transformación (2-4 veces en el caso de *rad1-1* y *rad10Δ*, 4-10 veces en el caso de *rad52-1*, y 10-20 veces en el caso del doble mutante *rad1-1 rad52Δ*) (FIGURA 16A) como a la frecuencia de recombinación (20-40 veces en el caso de *rad1-1* y *rad10Δ*, 100 veces en el caso de *rad52-1* y 100 veces en el caso del doble mutante *rad1-1 rad52Δ*) (FIGURA 16B) (comparar TABLAS 3 y 4). Esta reducción es similar en los tres plásmidos.



**FIGURA 16.** Representación gráfica de los valores obtenidos con los plásmidos sin cortar de la TABLA 4. (A) Eficiencia de transformación (transformantes/ $\mu$ g DNA), (B) frecuencia de recombinación (%  $\text{Leu}^+$ ), y (C) eficiencia de reparación por delección ( $\text{Leu}^+/\mu$ g DNA) de los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY en diferentes estirpes *rad* en función de la distancia entre las repeticiones. Los números bajo los sistemas indican el tamaño de la secuencia intermedia (pb).

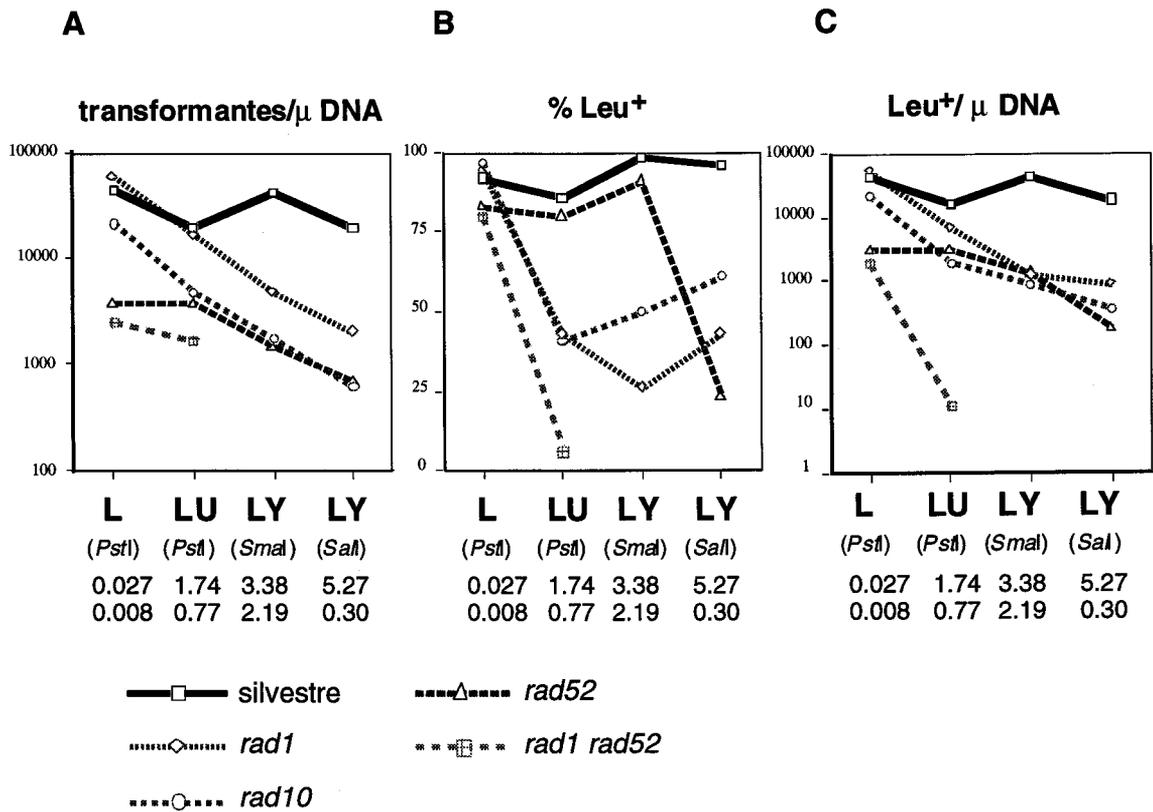
Estos resultados corroboran la fuerte dependencia de nuestros sistemas de la función Rad52 descrita previamente en el estudio de recombinación espontánea. Además demuestran que las funciones Rad1 y Rad10 son también

necesarias para la formación de deleciones en nuestros sistemas, como ya se ha descrito para Rad1 en otras repeticiones (Klein 1988, Schiestl and Prakash 1990).

*Análisis de los plásmidos cortados.* El comportamiento en las frecuencias de transformación y de recombinación en los mutantes *rad1* y *rad10* es idéntico. Esto es consistente con los datos bioquímicos que indican que las proteínas Rad1p y Rad10p funcionan como un complejo *in vitro* (Bardwell *et al.* 1992). En estirpes *rad1-1* y *rad10Δ* se observa una reducción en la eficiencia de transformación con DNA cortado en la secuencia intermedia que depende de la distancia entre el corte y las repeticiones. Así, la frecuencia de transformación del sistema L cortado a 8 y 27 bases del extremo 3' de cada repetición es la misma en estirpes *rad1-1*, *rad10Δ* y silvestre (TABLA 4 y FIGURA 17A). Sin embargo, en las estirpes *rad1* y *rad10* la frecuencia de transformación con los sistemas LU y LY disminuye en relación directa con la distancia, llegando a ser 25 veces inferior al nivel silvestre a una distancia de 3.38 kb (LY-*SaI*) (TABLA 4 y FIGURA 17A).

El análisis de las frecuencias de recombinación en estirpes *rad1-1* y *rad10Δ* muestra que más del 90% de los transformantes obtenidos con el sistema L cortado a 8 y 27 bases de los extremos 3' de las repeticiones son deleciones *Leu*<sup>+</sup> (L-*Pst*I) (TABLA 4). Sin embargo, la frecuencia de deleciones en ambas estirpes se reduce al 26-60 % cuando el corte está a 0.77 y 1.74 kb (LU-*Pst*I), 3.38 y 2.19 kb (LY-*Sma*I) ó 5.27 y 0.3 kb (LY-*Sa*II) de las repeticiones (TABLA 4 y FIGURA 17B). Estos datos son consistentes con los datos de transformabilidad. Por tanto, en estirpes *rad1* y *rad10* los cortes muy próximos a una de las repeticiones son eficientemente reparados mediante una deleción. No ocurre así cuando el corte está alejado de las repeticiones flanqueantes. Este efecto se manifiesta claramente al representar el número de recombinantes *Leu*<sup>+</sup>/μg DNA, parámetro que expresa la capacidad de los diferentes mutantes de reparar un corte mediante una deleción (FIGURA 17C).

La eficiencia de transformación también sufre una fuerte reducción en estirpes *rad52-1* (10-30 veces por debajo del valor silvestre), pero apenas hay diferencias como consecuencia de la distancia entre el corte y las repeticiones (TABLA 4 y FIGURA 17A). El 84-90% de estos transformantes presenta una deleción cuando el corte es aproximadamente simétrico respecto a las repeticiones (L-*Pst*I; LU-*Pst*I; LY-*Sma*I). Sin embargo, la frecuencia de deleciones se reduce al 26% cuando el corte es asimétrico respecto a las repeticiones (LY-*Sa*II; 0.3 y 5.27 kb) (TABLA 4 y FIGURA 17B). Estos resultados indican que las deleciones entre repeticiones directas se pueden dar por sucesos tanto dependientes como independientes de *RAD52*, siendo los primeros predominantes cuando el corte es asimétrico respecto a las repeticiones.



**FIGURA 17.** Representación gráfica de los valores obtenidos con los plásmidos cortados entre las repeticiones directas de la TABLA 4. (A) Eficiencia de transformación (transformantes/ $\mu$ g DNA), (B) frecuencia de recombinación (% Leu<sup>+</sup>), y (C) eficiencia de reparación por deleción (Leu<sup>+</sup>/ $\mu$ g DNA) de los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY en diferentes estirpes *rad* en función de la distancia entre las repeticiones. Entre paréntesis se indica la enzima de restricción usada en cada caso. Los valores debajo de cada enzima de restricción indican la distancia del corte a las repeticiones (kb).

El análisis del doble mutante *rad1-1 rad52-1* muestra que *rad52* es epistático sobre *rad1* cuando el corte se hace muy próximo a una de las repeticiones (sistema L-*PstI*) y que hay un efecto sinérgico de ambas mutaciones cuando el corte se hace alejado de las repeticiones. El sistema L presenta las mismas frecuencias de transformación y recombinación en el doble mutante que en *rad52* (20 veces menos transformantes que el silvestre y un 80% de deleciones). Este resultado es coherente con los datos obtenidos en los mutantes simples, dado que *rad1-1* no tiene efecto en este sistema (TABLA 4), y confirma que cuando el corte se produce a menos de 8 pares de bases de la repetición más cercana la proteína Rad1p no es necesaria para la formación de la deleción. La frecuencia de deleciones inducidas por DSB en el sistema LU en el doble mutante *rad1 rad52* es del 6% frente al 43% y 80% en los mutantes simples *rad1* y *rad52*, respectivamente (TABLA 4 y FIGURA 17B). Este efecto sinérgico sugiere

claramente la existencia de dos rutas de recombinación diferentes capaces de iniciar en la secuencia intermedia y específicas de deleciones.

*Análisis genético y molecular de las deleciones en estirpes silvestre, rad1 y rad52.* Los sucesos de recombinación de los sistemas LU y LY sin cortar y cortados (DSB) se analizaron genéticamente en las estirpes silvestre, *rad1-1* y *rad52-1* (TABLA 5). En todos los casos más del 95% de los recombinantes Leu<sup>+</sup> eran Ura<sup>-</sup>, indicando que eran deleciones reales. Por tanto, estos recombinantes no albergan dos tipos de plásmidos, uno recombinante y otro parental, como se observa en las deleciones espontáneas (ver apartado III. 1. 1).

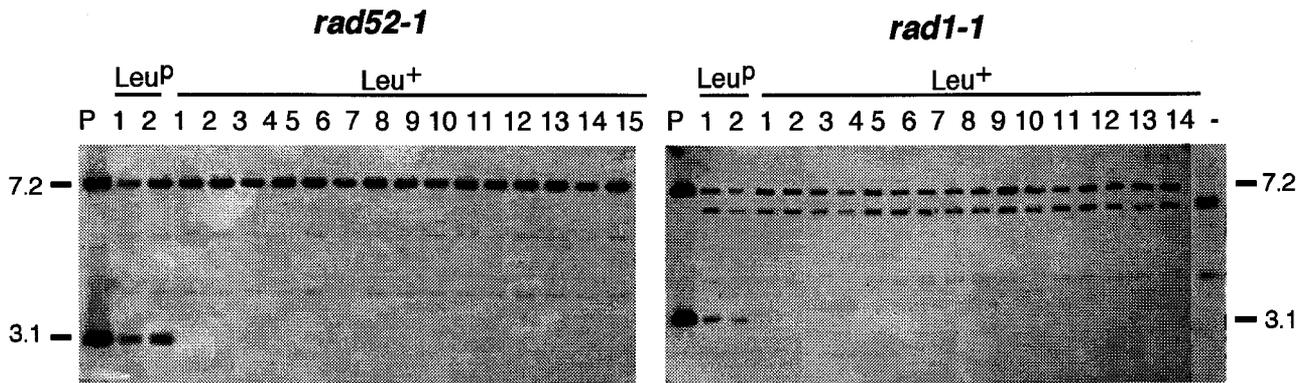
Las deleciones del sistema LU se han analizado además a nivel molecular mediante Southern (FIGURA 18). Los 14 recombinantes Leu<sup>+</sup> analizados en *rad1-1* y los 15 analizados en *rad52-1* presentan el patrón esperado para una deleción.

**TABLA 5. Análisis genético de los recombinantes Leu<sup>+</sup> inducidos por corte de doble cadena**

Corte	Genotipo <sup>a</sup>	Sistema	Ura <sup>-</sup> :Ura <sup>+</sup> <sup>b</sup>	%Ura <sup>-</sup>
Sin corte	Silvestre	LU	75:1	99
	<i>rad1-1</i>	LU	31:2	94
Con corte	Silvestre	LU- <i>Pst</i> I	525:21	96
		LY- <i>Sma</i> I	568:0	100
		LY- <i>Sa</i> II	471:0	100
	<i>rad1-1</i>	LU- <i>Pst</i> I	131:10	93
		LY- <i>Sma</i> I	52:1	98
		LY- <i>Sa</i> II	63:0	100
	<i>rad52-1</i>	LU- <i>Pst</i> I	84:0	100

<sup>a</sup>Las estirpes usadas fueron: silvestre, AWI-1B Y W303-1A; *rad1-1*, AWF-2D y 356-11A; *rad52-1*, FX315-4D.

<sup>b</sup>Cada valor corresponde a la suma de las relaciones de Ura<sup>-</sup>:Ura<sup>+</sup> de los recombinantes Leu<sup>+</sup> de 3-5 transformaciones independientes.



**FIGURA 18.** Análisis de Southern de las deleciones estimuladas por corte con *Pst*I en la secuencia intermedia del sistema LU en las estirpes *rad52-1* (FX315-4D) y *rad1-1* (AWF-2D). Se analizaron un total de 17 transformantes (2 parentales y 15 recombinantes) de la estirpe *rad52* y de 16 transformantes (2 parentales y 14 recombinantes) de la estirpe *rad1*. El DNA total de los transformantes parentales ( $Leu^P$ ) y recombinantes ( $Leu^+$ ) se digirió con *Eco*RI y se hibridó con pBR322 marcado con digoxigenina. Como controles se usó plásmido extraído por CsCl (P) y DNA de la estirpe sin transformar (-). Los números en los márgenes corresponden al tamaño de las bandas en kb. Tras la digestión con *Eco*RI los tamaños de los fragmentos esperados son 7.2 y 3.1 kb para el plásmido parental, y 7.2 kb para el plásmido recombinante (Para más detalles ver la gráfica de la deleción del sistema LU en la FIGURA 7A).

### III. 3. ANALISIS DE LAS DELECCIONES INDUCIDAS POR RECOMBINACION ESPECIFICA DE SITIO

Para comprender los mecanismos de recombinación mitótica entre secuencias repetidas es necesario conocer como se inician. En este sentido hemos intentado identificar iniciadores naturales de la recombinación que nos permitan definir la naturaleza molecular del suceso de iniciación y su relación con los diferentes rutas de recombinación.

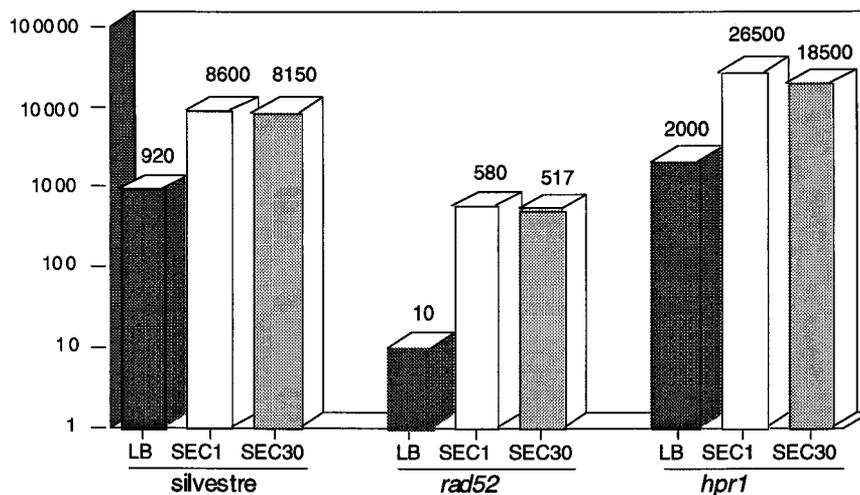
#### III. 3. 1. Aislamiento y caracterización de fragmentos de DNA iniciadores de la recombinación.

Para la búsqueda de secuencias iniciadoras de la recombinación hemos construido una genoteca de DNA de levadura basada en el sistema de recombinación pRS314-LB (igual que el plásmido pRS314-L pero con una diana *Bgl*II entre las repeticiones) (ver MATERIALES Y METODOS). El tamaño medio de los fragmentos clonados entre las repeticiones directas es de 100-500 pb. Hemos buscado secuencias del genomio de levaduras que estimulen las delecciones entre las dos repeticiones directas.

El escrutinio se ha realizado transformando una estirpe de levadura con la genoteca y seleccionando para el marcador *TRP1* del plásmido. Los niveles de recombinación se han seguido mediante réplica de los transformantes a medio SC-Leu. Hemos seleccionado aquellos transformantes que presentan niveles de recombinantes Leu<sup>+</sup> superiores a los del sistema LB. Como la frecuencia de recombinación del sistema LB en estirpes silvestres ( $5 \times 10^{-4}$ ) es demasiado alta para buscar clones hiper-recombinantes por el método de réplica descrito previamente, hemos realizado el escrutinio en una estirpe *rad52-1* (AWX-1C), donde la frecuencia de recombinación es más de 20 veces inferior. En este fondo genético hemos seleccionado aquellas secuencias que estimulan las delecciones producidas por mecanismos independientes de *RAD52*, que sabemos que pueden llegar a ser mayoritarios en la producción de delecciones (ver INTRODUCCION).

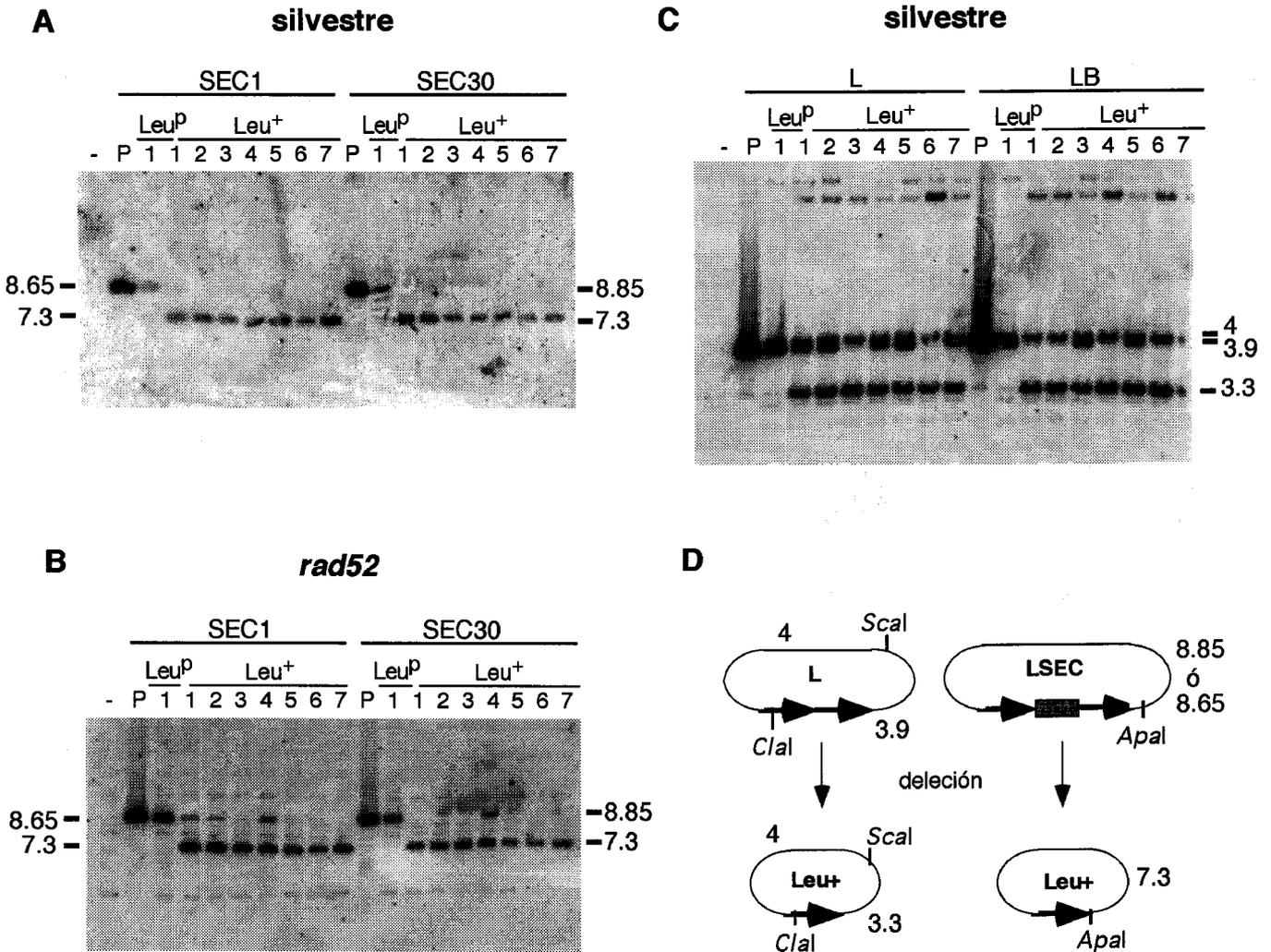
Se han escrutado un total de 11700 transformantes (equivalente a unos 7000 si consideramos el porcentaje de vector con inserto de la genoteca), que constituyen un total de 1400 kb de DNA escrutado (aproximadamente 1/10 del genomio haploide de la levadura). Hemos eliminado los falsos positivos producidos por la fluctuación y nos hemos quedado finalmente con dos transformantes, SEC1 y SEC30. Tras extraer los plásmidos de la levadura y propagarlos por *E. coli* hemos comprobado que ambos plásmidos mantienen su capacidad hiper-recombinadora al volver a transformar las levaduras.

En la FIGURA 19 se muestran las frecuencias de recombinantes  $Leu^+$  de estirpes silvestre, *rad52-1* y *hpr1Δ* transformadas con los plásmidos SEC1 y SEC30. Ambas secuencias producen un incremento en la frecuencia de deleciones de 50 veces en la estirpe *rad52-1* y de 10 veces en la estirpe silvestre. Por tanto, estas secuencias estimulan las deleciones entre repeticiones directas tanto dependientes como independientes de *RAD52*, lo que sugiere que el tipo de sucesos que inician puede ser resuelto por diferentes mecanismos de recombinación. La mutación *hpr1Δ* no tiene efecto en ninguno de los plásmidos.



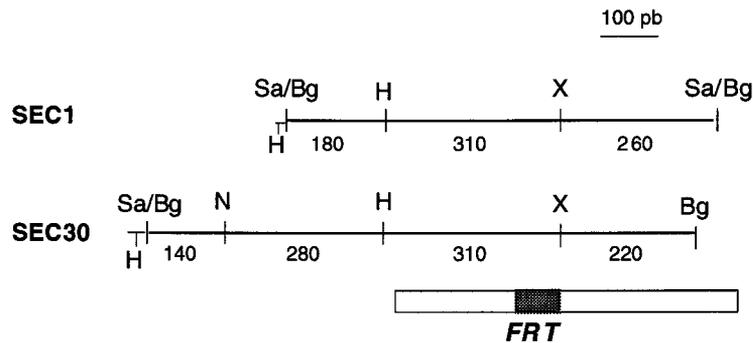
**FIGURA 19.** Frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  ( $\times 10^6$ ) de los sistemas de repeticiones directas LB, SEC1 y SEC30 en estirpes silvestre (AWI-1B), *rad52-1* (AWX-1C) y *hpr1Δ* (AYW3-4D). Los valores indicados corresponden a la media de 2 tests de fluctuación. Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en la FIGURA 5.

Por análisis de Southern hemos comprobado que los sucesos de recombinación estimulados por SEC1 y SEC30 son deleciones correctas, tanto en estirpes silvestres (FIGURA 20A) como *rad52* (FIGURA 20B). A diferencia de las deleciones de los sistemas L (FIGURA 20C) y LU (III. 1. 1. 1), donde más del 65% de los recombinantes presentan tanto el plásmido parental como el recombinante, las deleciones estimuladas por SEC1 y SEC30 presentan únicamente el plásmido recombinante.



**FIGURA 20.** Comprobación molecular por Southern de las deleciones en los sistemas L y LSEC en estirpes silvestre y *rad52-1*. (A) Análisis con *Apal* de las deleciones de los sistemas SEC1 y SEC30 en estirpes silvestre y (B) *rad52-1*, y (C) y con *Clal* más *Scal* de las deleciones de los sistemas L y LB en una estirpe silvestre. Se usaron las estirpes W303-1A (silvestre) y AWX-1C (*rad52-1*). El DNA total de los transformantes parentales (Leu<sup>P</sup>) y recombinantes (Leu<sup>+</sup>) se digirió con la enzima correspondiente y se hibridó con pBR322 marcado con digoxigenina. Se analizaron 1 Leu<sup>P</sup> y 7 Leu<sup>+</sup> por sistema y estirpe. Como control negativo se usó DNA de las estirpes sin transformar (-). (D) Representación gráfica de los sistemas parentales (Leu<sup>P</sup>) y recombinantes (Leu<sup>+</sup>) de los sistemas L y SEC con las dianas analizadas. El dibujo no está a escala. Los fragmentos esperados para los sistemas SEC parentales (Leu<sup>P</sup>) tras cortar con *Apal* son de 8.65 (SEC1) y 8.85 kb (SEC30). Los fragmentos esperados para el sistema L (y para el LB) parental (Leu<sup>P</sup>) tras cortar con *Clal* más *Scal* son de 4 y 3.9 kb. Tras la deleción todos los sistemas generan el mismo plásmido recombinante (Leu<sup>+</sup>). Los fragmentos esperados para Leu<sup>+</sup> son de 7.3 kb con *Apal* y de 4 y 3.3 kb con *Clal* más *Scal*.

El tamaño de las secuencias clonadas es de aproximadamente 750 (SEC1) y 950 pb (SEC30). Mediante análisis de restricción y estudio del crecimiento en medio con MMS hemos descartado que alguno de los clones fuese *RAD52*. Ambos plásmidos contienen una misma secuencia solapante de aproximadamente 600 pb (FIGURA 15). Mediante clonación del fragmento *XbaI-HindIII* de SEC1 en pTZSXH y posterior secuenciación hemos comprobado que la secuencia SEC es parte de una de las secuencias invertidas del círculo de 2  $\mu$  que participan en la recombinación específica de sitio que tiene lugar en este plásmido y que contienen la diana específica de la flipasa, la secuencia *FRT*.



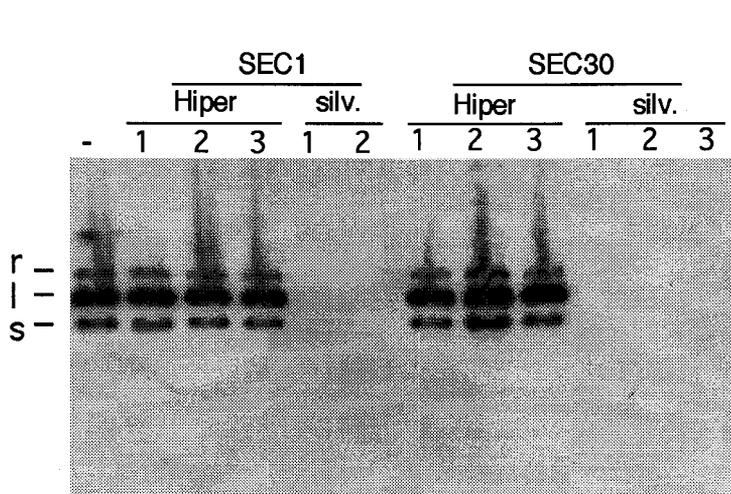
**FIGURA 21.** Mapa de restricción de los clones SEC1 y SEC30. Los números indican el tamaño en pb de los diferentes fragmentos de restricción (determinado en geles de acrilamida). La diana *FRT* se representa como una caja sombreada dentro de la caja abierta que representa la repetición invertida del círculo de 2  $\mu$ . Las dianas de restricción que se muestran son: Sa, *Sau3A*; Bg, *BglII*; H, *HindIII*; X, *XbaI*; N, *NdeI*.

### III. 3. 2. Análisis de la recombinación inducida por el sitio *FRT*

*El fenotipo de hiper-recombinación depende de la presencia del círculo de 2  $\mu$ .* Antes de conocer la identidad de la secuencia iniciadora de la recombinación de los clones SEC hemos observado que algunos de los transformantes de la estirpe AWC-1C (*rad52-1*) pierden espontáneamente el fenotipo de hiper-recombinación, ya que segregan colonias con niveles de recombinación similares a los del control pRS314-LB. Hemos comprobado por análisis de restricción que esta pérdida del fenotipo de hiper-recombinación no se debe a una deleción interna en la secuencia SEC. Por otro lado, esta pérdida del fenotipo de hiper-recombinación no se debe a ninguna modificación epigenética del plásmido, ya que al retransformar las estirpes silvestre y *rad52-1* con plásmidos derivados de estirpes que habían perdido el fenotipo de hiper-recombinación se recupera dicho fenotipo.

Una vez conocida la identidad de las secuencias clonadas hemos comprobado si el fenotipo de hiper-recombinación de los clones SEC depende de

la presencia del círculo de 2  $\mu$ . En ese caso aquellos transformantes que han perdido el fenotipo de hiper-recombinación resultarían de la pérdida del círculo de 2  $\mu$ . Para ello hemos analizado por Southern la presencia del círculo de 2  $\mu$  en varios transformantes SEC de la estirpe AWX-1C, con y sin el fenotipo de hiper-recombinación (FIGURA 22). Los seis transformantes hiper-recombinantes son *cir*<sup>+</sup> (presentan círculo de 2  $\mu$ ), mientras que los cinco que han perdido el fenotipo de hiper-recombinación son *cir*<sup>o</sup> (han perdido el círculo de 2  $\mu$ ). Este resultado explica que al retransformar una estirpe *cir*<sup>+</sup> con un plásmido procedente de una estirpe *cir*<sup>o</sup>, donde no se expresa el fenotipo hiper-recombinante, se recuperen los niveles altos de recombinación asociados a las secuencias SEC.

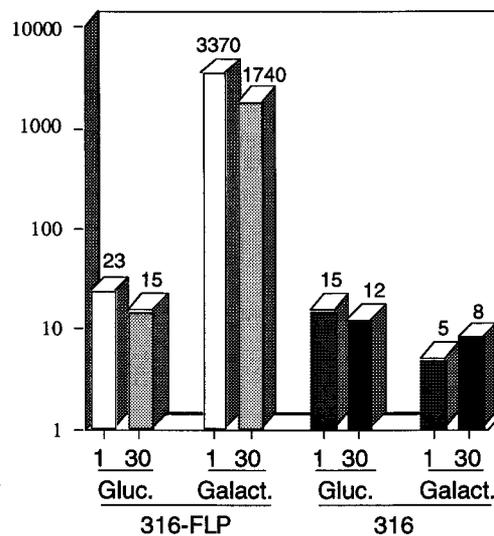


**FIGURA 22.** Comprobación molecular mediante Southern de la asociación entre el fenotipo de hiper-recombinación de los sistemas SEC1 y SEC30 y la presencia del círculo de 2  $\mu$  en diferentes transformantes de la estirpe AWX-1C (*rad52-1*). El DNA total de 6 transformantes SEC con fenotipo hiper-recombinante (Hiper) y 5 transformantes SEC con fenotipo no hiper-recombinante (silv.) se separó por electroforesis sin digerir previamente y se hibridó con un fragmento interno del círculo de 2  $\mu$  *Pst*I-*Hind*III obtenido a partir de YEp13 y marcado con digoxigenina. Como control positivo (*cir*<sup>+</sup>) se usó DNA de la estirpe AWX-1C sin transformar (-). r indica plásmido relajado; l indica plásmido lineal; s indica plásmido superenrollado negativamente.

*El fenotipo de hiper-recombinación depende exclusivamente de la expresión de la flipasa (FLP).* La recombinación específica del círculo de 2  $\mu$  es un proceso conservativo en el que una recombinasa codificada por el gen *FLP*, la flipasa, produce primero un corte en posiciones específicas de dos dianas de la molécula circular (sitios *FRT*) y luego une los extremos en un intercambio recíproco que no requiere síntesis o degradación de DNA y que produce una inversión de la secuencia situada entre las repeticiones *FRT* (Broach y Volkert, 1991). Dado que la

estimulación de la recombinación por la secuencia SEC, que contiene el sitio *FRT*, depende de la presencia del círculo del 2  $\mu$ , hemos decidido comprobar si esta dependencia viene determinada exclusivamente por la función flipasa. Para ello hemos clonado el gen *FLP* bajo control del promotor *GAL1* en el plásmido centromérico pRS316 y hemos estudiado el comportamiento en recombinación de los clones SEC en estirpes *cir*<sup>o</sup> en condiciones de inducción y represión del promotor *GAL1*. En la FIGURA 23 se muestra que el fenotipo de hiper-recombinación de los sistemas SEC depende de la función flipasa, observándose niveles de recombinación en condiciones de inducción del gen *FLP* superiores en dos órdenes de magnitud a los niveles en condiciones de represión.

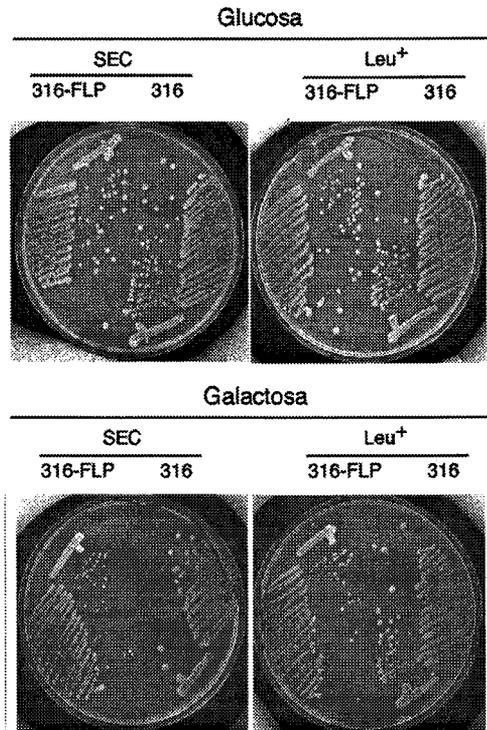
Todos estos datos sugieren que el incremento en la frecuencia de deleciones estimulado por la secuencia SEC se produce por un corte específico producido por la flipasa en el sitio *FRT*. Este corte es entonces reparado por recombinación no conservativa tanto dependiente como independiente de *RAD52*.



**FIGURA 23.** Frecuencia de recombinantes *Leu*<sup>+</sup> ( $\times 10^6$ ) de los sistemas de repeticiones directas SEC1 y SEC30 en presencia y ausencia de la flipasa. Transformantes SEC de la estirpe AWX-1C (*rad52-1*) con niveles silvestres de recombinación (sin círculo de 2  $\mu$ ) se transformaron con el plásmido pRS316-FLP (316-FLP), que lleva el gen *FLP1* bajo control del promotor de *GAL1*, o con el plásmido pRS316 (316) como control. La expresión de la flipasa se controló creciendo los transformantes en medio mínimo selectivo con galactosa o con glucosa como fuente de carbono, respectivamente. Cada valor corresponde a un test de fluctuación. Los tests de fluctuación se realizan como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo para los diferentes plásmidos, con glucosa o galactosa (SC-Trp-Ura y SG-Trp-Ura). Los recombinantes se determinaron en SC-Leu y las células totales en SC-Trp.

Como se observa en la FIGURA 24 la estirpe *rad52-1* transformada con los plásmidos pRS316-FLP y pRS314-SEC crece considerablemente peor en medio con galactosa que con glucosa. Una posible explicación es que la alta frecuencia

de cortes producidos por la flipasa en el sistema SEC afecte a la viabilidad de las células en condiciones de expresión del gen *FLP*. Eso explicaría la alta frecuencia de segregantes *cir<sup>o</sup>* entre los transformantes *rad52-1* en medio selectivo SC-Leu. La sobreexpresión de la flipasa afecta negativamente al crecimiento de la estirpe *rad52*. Este efecto es mayor si las células llevan el plásmido con la diana *FRT* (FIGURA 24).



**FIGURA 24.** Crecimiento de la estirpe AWX-1C (*rad52*) llevando el plásmido pRS314-SEC o el plásmido recombinante pRS314-Leu<sup>+</sup> en condiciones de represión (glucosa) y expresión (galactosa) de la flipasa

El efecto de la alta expresión de la flipasa sobre el crecimiento de la estirpe *rad52-1* se observa de forma indirecta en la frecuencia de curación del plásmido pRS316-FLP. Para ello hemos aislado colonias de los diferentes transformantes dobles (pRS316 o pRS316-FLP y SEC o delección Leu<sup>+</sup>) en medio rico con glucosa o con galactosa. La frecuencia de pérdida de los plásmidos se ha determinado por réplica a medios SC-Trp (SEC y delección Leu<sup>+</sup>) y SC-Ura (pRS316 y pRS316-FLP). El porcentaje de colonias que mantienen el plásmido pRS316-FLP en condiciones de inducción de la flipasa (galactosa) es tan sólo del 5%, frente a un 70% en condiciones de represión (glucosa) (TABLA 6).

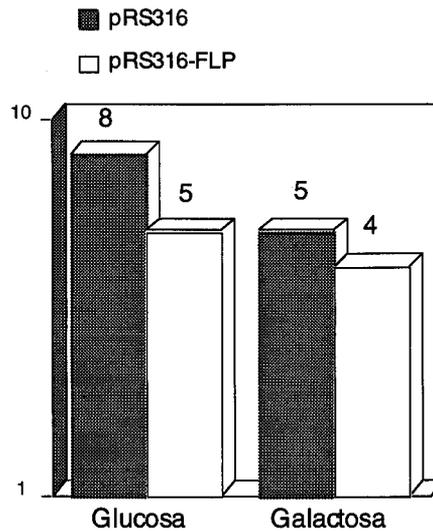
**TABLA 6. Frecuencia de pérdida de los plásmidos pRS316 o pRS316-FLP y pRS314-SEC o pRS314-Leu<sup>+</sup> en la estirpe *rad52-1* en condiciones de inducción (galactosa) y represión (glucosa) de *GAL1-FLP*.**

de los transformantes:	% de pérdida de:			
	SEC o Leu <sup>+</sup>		FLP o 316	
	GLUCOSA	GALACTOSA	GLUCOSA	GALACTOSA
	trp <sup>+</sup> :trp <sup>-b</sup>	trp <sup>+</sup> :trp <sup>-</sup>	ura <sup>+</sup> :ura <sup>-</sup>	ura <sup>+</sup> :ura <sup>-</sup>
FLP + SEC1	65:38 (63)	53:46 (54)	69:31 (69)	8:99 (8)
FLP + SEC30	37:35 (51)	47:28 (63)	51:22 (70)	1:72 (2)
FLP + Leu <sup>+</sup>	92:40 (70)	70:10 (88)	84:49 (63)	6:76 (79)
FLP + Leu <sup>+</sup>	52:29 (64)	110:17 (87)	58:25 (70)	1:144 (1)
316 + SEC1	45:29 (61)	123:15 (89)	49:22 (69)	81:53 (61)
316 + SEC30	58:27 (68)	113:24 (83)	59:29 (67)	115:24 (83)
316 + Leu <sup>+</sup>	72:25 (74)	90:41 (69)	46:51 (48)	74:57 (57)
316 + Leu <sup>+</sup>	36:27 (57)	106:4 (96)	44:29 (60)	72:36 (67)

<sup>a</sup>La estirpe *rad52-1* usada es la AWX-1C

<sup>b</sup>Los valores indicados corresponden a la media de 2 experimentos independientes. Los transformantes se incubaron en medio líquido rico no selectivo (YED) y tras diluir se extendieron en YED sólido. Mediante réplica a SC-Trp (plásmidos pRS314-SEC y pRS314-Leu<sup>+</sup>) y SC-Ura (plásmidos pRS316 y pRS316-FLP) se determinó el porcentaje de pérdida (entre paréntesis) de los diferentes plásmidos. FLP y 316 indican plásmidos pRS316-FLP y pRS316, respectivamente; SEC1 (SEC30) y Leu<sup>+</sup> indican pRS314-SEC1 (pRS314-SEC30) y pRS314-Leu<sup>+</sup>, respectivamente.

El mal crecimiento de los transformantes Leu<sup>+</sup> en galactosa, que carecen de la secuencia SEC, sugiere que la alta expresión de la flipasa produce cortes no específicos en el DNA que son reparados con dificultad en la estirpe *rad52-1*. Con objeto de determinar qué proporción del fenotipo de hiper-recombinación de los clones SEC depende de este efecto inespecífico producido por la alta expresión de la flipasa, hemos determinado los niveles de recombinación del sistema de repeticiones directas pRS314-LU, que no presenta la secuencia SEC como secuencia intermedia, en condiciones de inducción y represión de *GAL1-FLP* (FIGURA 25)



**FIGURA 25.** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) del sistema de repeticiones directas LU en presencia y ausencia de la flipasa. La estirpe AWX-1C (*rad52-1*) con el plásmido pRS314-LU se transformó con el plásmido pRS316-FLP (316-FLP), que lleva el gen *FLP1* bajo control del promotor de *GAL1*, o con el plásmido pRS316 (316) como control. La expresión de la flipasa se controló creciendo los transformantes en medio mínimo selectivo con galactosa o con glucosa como fuente de carbono, respectivamente. Cada valor corresponde a un test de fluctuación. Los tests de fluctuación se realizaon como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo para los diferentes plásmidos, con glucosa o galactosa (SC-Trp-Ura y SG-Trp-Ura). Los recombinantes se determinaron en SC-Leu y las células totales en SC-Trp.

### III. 4. RECOMBINACION INDUCIDA POR LA MUTACION *hpr1*: ASOCIACION CON LA TRANSCRIPCION

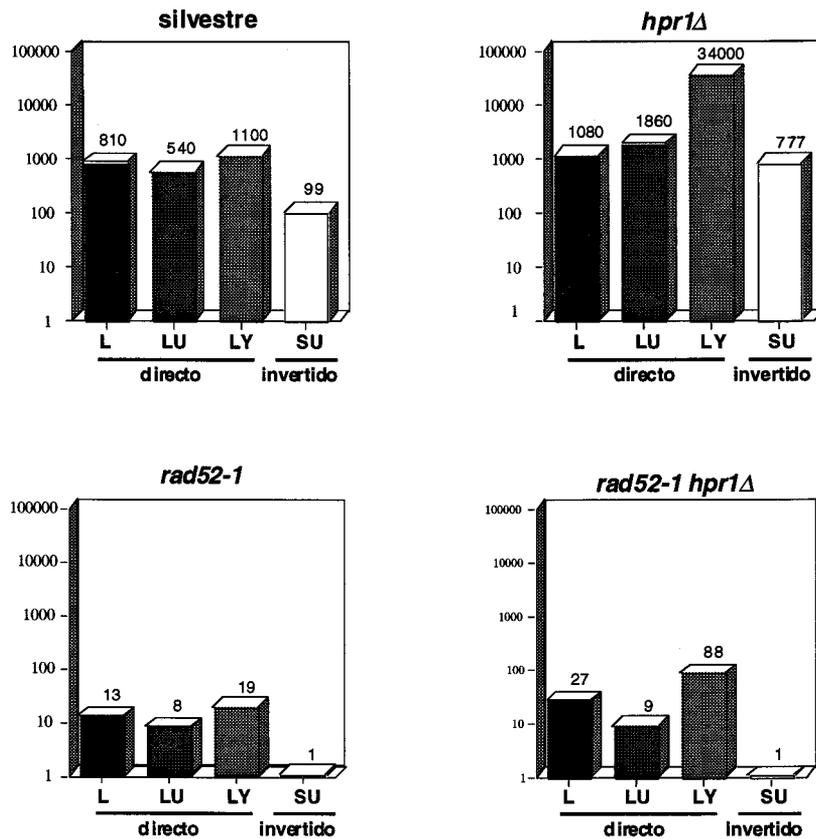
#### III. 4. 1. Análisis genético de las deleciones estimuladas por la mutación *hpr1*

El análisis de la recombinación espontánea e inducida entre repeticiones directas nos ha permitido definir algunas de las funciones y genes implicados así como posibles mecanismos responsables de las deleciones. Con objeto de entender el mecanismo de formación de deleciones entre secuencias repetidas hemos analizado a nivel genético y molecular la formación de deleciones inducidas por la mutación de hiper-recombinación *hpr1Δ*. Estudios genéticos recientes sugieren que el incremento en la frecuencia de recombinación en estirpes *hpr1* se debe a un incremento en la frecuencia de iniciación de los sucesos de recombinación (Aguilera y Klein 1990; Santos-Rosa y Aguilera 1994).

#### III. 4. 1. 1. El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* no es general a todos los sistemas de repeticiones

Hemos analizado el efecto de la mutación *hpr1Δ* en los tres sistemas de repeticiones directas L, LU y LY y en el sistema de repeticiones invertidas SU, basados todos en la misma repetición de 598 pb (FIGURA 9). Como se observa en la FIGURA 26 los sistemas de repeticiones L y LU sólo presentan un incremento de 3 veces en los niveles de deleciones en estirpes *hpr1Δ* respecto a la estirpe silvestre. Por el contrario el sistema LY recombina en estirpes *hpr1* a una frecuencia 30 veces superior a la observada en estirpes silvestres. Estos resultados indican claramente que el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* no es general, sino específico del sistema de repeticiones.

El fenotipo de recombinación de los sistemas L y LU en células *hpr1* es por tanto claramente distinto al descrito previamente en otros sistemas de repeticiones directas (Aguilera y Klein 1989a, 1989b, 1990, Santos-Rosa y Aguilera, 1994, 1995), así como al del sistema LY y al de un sistema cromosómico usado como control interno donde los niveles de deleciones en la estirpe *hpr1* son 20 veces superiores a los niveles silvestres (FIGURA 27) (Chan y Botstein, 1993). Además, al igual que en estirpes silvestres, este comportamiento es independiente de que el sistema de recombinación se encuentre en un plásmido diferente de pRS314 (FIGURA 12), en un minicromosoma (FIGURA 14) o en un cromosoma (FIGURA 15). Para simplificar, llamaremos sistemas hiper-recombinantes a aquellos con un incremento en recombinación en estirpes *hpr1* superior a 20 veces, y no hiper-recombinantes a aquellos con un incremento de 2-5 veces.

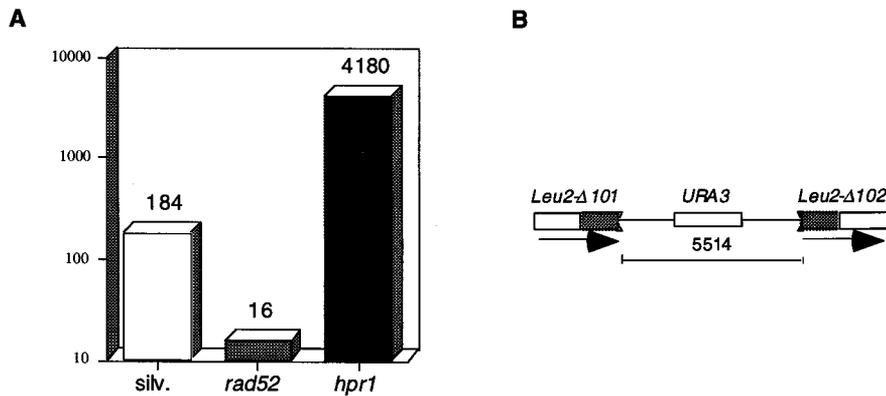


**FIGURA 26.** Frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  ( $\times 10^6$ ) en los sistemas de repeticiones directas L, LU y LY y en el sistema de repeticiones invertidas SU situados en el plásmido centromérico pRS314 en estirpes silvestre, *hpr1*Δ, *rad52-1* y *hpr1*Δ *rad52-1*. Los valores corresponden a la mediana de 2-5 tests de fluctuación en las estirpes W303-1A (silvestre), AYW3-4D (*hpr1*Δ), FWY-6B (*rad52-1*) y FWY-6A (*hpr1*Δ *rad52-1*). Resultados similares se obtuvieron en las estirpes W303-1B y AWI-1B (silvestre), AYW3-5D (*hpr1*Δ), y FWY-3A (*hpr1*Δ *rad52-1*) (para más detalles ver APENDICE). ND indica no determinado. Los tests de fluctuación se han realizado como se indica en la FIGURA 5.

La frecuencia de inversiones en el sistema SU en células *hpr1* es 8 veces superior a la frecuencia en células silvestres (FIGURA 26). Este resultado es importante ya que indica que el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* no es exclusivo de repeticiones directas.

Al igual que ocurre en los sucesos que se producen espontáneamente, las deleciones inducidas por la mutación *hpr1* en nuestros sistemas son fuertemente dependientes de la función Rad52. La estirpe *hpr1 rad52* presenta niveles de deleciones 400 veces por debajo de la estirpe *hpr1* (FIGURA 26, sistema LY). No obstante también se observan deleciones estimuladas por la mutación *hpr1*Δ que ocurren por un mecanismo independiente de *RAD52* (FIGURA 13;  $19 \times 10^{-6}$  frente a  $88 \times 10^{-6}$ ). Por el contrario, las inversiones estimuladas por *hpr1* dependen totalmente de *RAD52*. Estos datos sugieren que las deleciones estimuladas por la

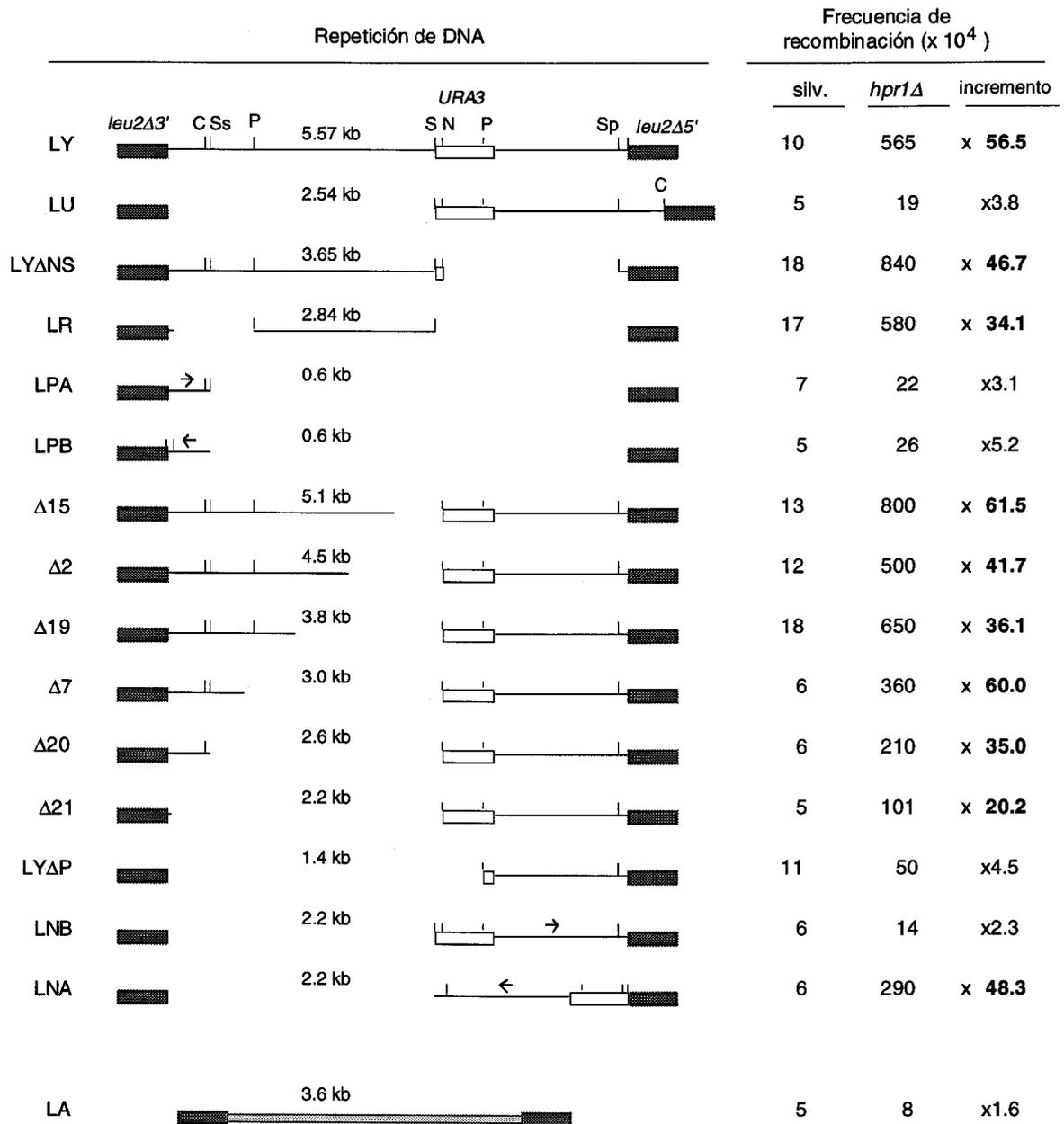
mutación *hpr1* se producen por mecanismos de recombinación, posiblemente similares a los que producen las deleciones en estirpes silvestres.



**FIGURA 27. (A)** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> (x10<sup>6</sup>) en el sistema cromosómico de repeticiones directas *leu2-Δ101::URA3::leu2-Δ102* descrito por Chan y Botstein (1993). Los valores corresponden a la mediana de varias estirpes (Para más detalles ver apéndice TABLA 19). Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en la leyenda de la FIGURA 8. **(B)** Representación gráfica del sistema cromosómico *leu2-Δ101::URA3::leu2-Δ102*. *leu2-Δ101* es una deleción del extremo 3' y *leu2-Δ102* es una deleción del extremo 5', por lo que la recombinación entre las repeticiones directas no puede generar Leu<sup>+</sup> por conversión génica. Al igual que en los sistemas LU y LY la recombinación entre las repeticiones (cajas sombreadas) produce una deleción de una de las repeticiones y de la secuencia intermedia, lo que genera una copia silvestre del marcador *LEU2* y la pérdida del marcador *URA3* (caja blanca). Por tanto, los recombinantes se pueden seleccionar como Leu<sup>+</sup> y como Ura<sup>-</sup>.

### III. 4. 1. 2. El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* no depende de la secuencia *per se* o del tamaño del fragmento de DNA situado entre las repeticiones.

Como se observa en la FIGURA 28, la única diferencia entre los sistemas de repeticiones directas LY (hiper-recombinante en células *hpr1*) y LU (no hiper-recombinante) es un fragmento de 3.03 kb de pBR322 presente en la secuencia intermedia de LY y ausente en LU. Por tanto, es posible que este fragmento de DNA contenga algún elemento en *cis* responsable de los sucesos de recombinación inducidos por *hpr1*. En principio, este elemento podría ser un sitio de iniciación de los sucesos estimulados en fondo *hpr1*. Para comprobar esta hipótesis hemos construido una serie de sistemas de repeticiones directas que llevan diferentes deleciones de la secuencia intermedia de LY. De esta forma pretendemos definir el fragmento mínimo capaz de producir el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1*. El análisis de recombinación de estos sistemas se muestra en la FIGURA 28.



**FIGURA 28.** Frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  ( $\times 10^4$ ) en estirpes silvestre (AWI-1B) y *hpr1* $\Delta$  (AYW3-4D) y representación gráfica a escala de todos los sistemas de repeticiones directas usados en este estudio. Los valores indicados corresponden a la mediana de 3-4 tests de fluctuación. Los resultados se han corroborado en la estirpe AYW3-5D (*hpr1* $\Delta$ ). En todos los sistemas la frecuencia de recombinación en esta estirpe es 10 veces superior a la observada en la estirpe AYW3-4D (esta diferencia puede al fondo genético). Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en la FIGURA 5. Todos los sistemas están basados en las mismas repeticiones de *leu2* (cajas sombreadas). La caja blanca representa el gen *URA3*. Las líneas representan DNA de pBR322. Los tamaños en kb indican la longitud de la secuencia intermedia. En cada sistema se indican las enzimas de restricción más relevantes. C, *Clal*; Ss, *SspI*; P, *PstI*; S, *SmaI*; N, *NsiI*; Sp, *SphI*.

En primer lugar hemos confirmado que el fragmento de 3.03 kb específico de LY es por sí sólo (sistema LY $\Delta$ NS) capaz de dar lugar al fenotipo de hiper-recombinación del sistema LY (46 frente a 57 veces). De hecho, hemos restringido la región responsable del fenotipo hiper-recombinante de *hpr1* a 2.84 kb (comparar sistemas LR y LP).

En contra de lo esperado, el análisis de un total de 12 sistemas de repeticiones con deleciones seriadas de la región de 3.4 kb del sistema LY entre el marcador *URA3* y la repetición *leu2 $\Delta$ 3'* (serie  $\Delta$ ) muestra que las 3.4 kb pueden ser eliminadas totalmente sin perderse el fenotipo de hiper-recombinación. Las frecuencias de los 12 sistemas  $\Delta$  (sólo se muestran 6) oscilan entre 20.2 y 61.5 veces por encima del valor silvestre. Los datos de las deleciones seriadas (serie  $\Delta$ ) se podrían explicar si existe un segundo elemento en *cis* situado en la región de 2.2 kb presente en todos los sistemas de la serie  $\Delta$  capaz de inducir recombinación en células *hpr1*. De hecho, la deleción de 0.8 kb del marcador *URA3* es esencial para el fenotipo de hiper-recombinación (comparar sistemas  $\Delta$ 21 y LY $\Delta$ P). Sin embargo, las 2.2 kb que se mantienen en todas las deleciones seriadas están presentes en el sistema LU, por lo que este debería ser hiper-recombinante.

Una posible explicación de la falta de fenotipo hiper-recombinante en el sistema LU puede ser la existencia en su secuencia intermedia de un elemento en *cis* con un efecto dominante negativo sobre el iniciador contenido en la región de 2.2 kb. Un candidato es el fragmento *SmaI-NsiI* de 54 pb situado en el extremo 3' del marcador *URA3*. De hecho el sistema LNB, que es igual al sistema  $\Delta$ 21 más esos 54 pb, no es hiper-recombinante en células *hpr1* (x20.2 en  $\Delta$ 21 frente a x2.3 en LNB). Sin embargo, el sistema LNA, idéntico a LNB pero con la secuencia intermedia en dirección opuesta, es hiper-recombinante (x48.3). Por tanto el fenotipo de hiper-recombinación no se puede explicar por la presencia de secuencias específicas, dado que ambos sistemas son exactamente iguales a nivel de secuencia.

Otro factor que podemos excluir como responsable del fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* es la distancia entre las repeticiones directas. Por un lado, la longitud de la secuencia intermedia varía en las repeticiones hiper-recombinantes entre 2.2 y 5.57 kb, y en las repeticiones no hiper-recombinantes entre 0.6 y 2.54 kb. Así, el sistema LA, que lleva un fragmento de 3.6 kb de DNA de levadura con el marcador *ADE2*, muestra un fenotipo no hiper-recombinante (FIGURA 28). Por otro lado, los sistemas LNA, LNB y  $\Delta$ 21, que presentan la misma longitud en la secuencia intermedia, muestran fenotipos diferentes de recombinación.

### III. 4. 1. 3. Los sistemas LNA y LNB con fenotipos de recombinación diferentes poseen grados de superenrollamiento distintos.

Estudios previos han mostrado que Hpr1p presenta homología en la región carboxi-terminal con Top1p (Aguilera y Klein 1990). Este dato, junto con el mal crecimiento observado en los dobles mutantes *hpr1* con *top1*, *top2* o *top3*, nos ha llevado a estudiar los niveles de superenrollamiento de los plásmidos con los sistemas LNA y LNB en estirpes silvestre y *hpr1* $\Delta$ . Hemos escogido el sistema hiper-recombinante LNA y el sistema no hiper-recombinante LNB porque la única diferencia estructural que presentan es la orientación de la secuencia intermedia (FIGURA 28).

En la FIGURA 29 se observa que tanto en estirpes silvestres como *hpr1* el plásmido con el sistema LNA presenta una mayor densidad de DNA superenrollado negativamente que el plásmido con el sistema LNB. Esta diferencia en superenrollamiento no parece depender de *HPR1*. Por tanto, el grado de superhelicidad debe ser consecuencia de características funcionales o estructurales específicas de cada plásmido, no relacionadas con la secuencia primaria del DNA.

Ya que el grado de superhelicidad de los plásmidos depende de la transcripción y que *HPR1* está implicado en activación de la transcripción (Zhu *et al.* 1995) hemos analizado la transcripción en los sistemas usados en este estudio.



**FIGURA 29.** Estudio del grado de superhelicidad de los plásmidos pRS314-LNA y pRS314-LNB en las estirpes AWI-1B (silvestre) y AYW3-4D (*hpr1* $\Delta$ ). Resultados similares se han obtenido en las estirpes W303-1A (silvestre) y AYW3-5D (*hpr1* $\Delta$ ) (dato no mostrado). Los topoisómeros se resolvieron en geles de agarosa con 4 mg/l de cloroquina.

### III. 4. 1. 4. Análisis de la transcripción en los sistemas de repeticiones.

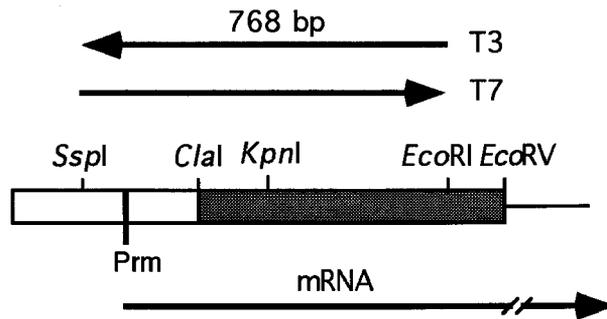
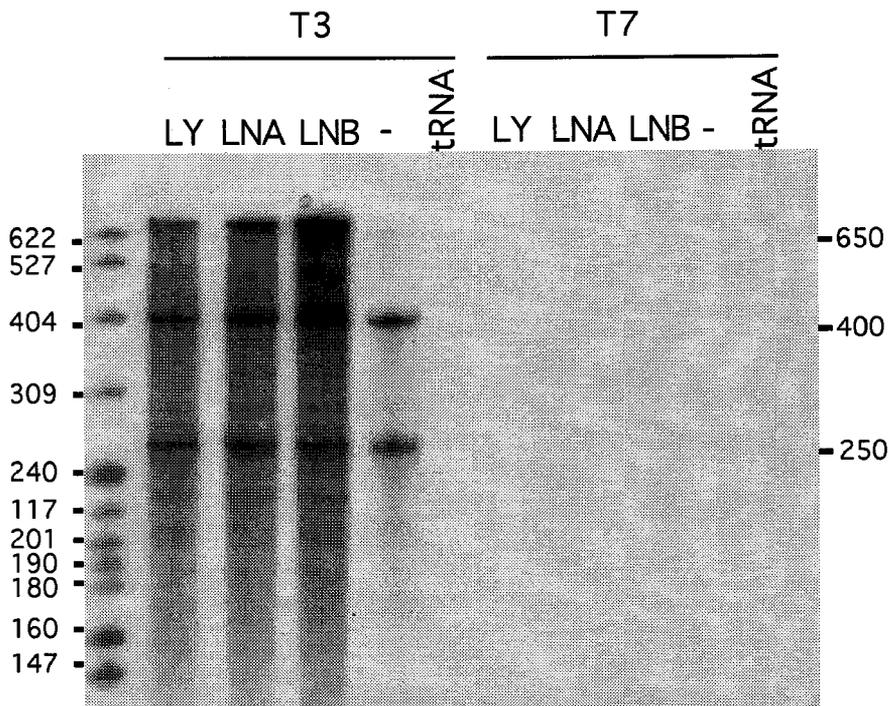
Con objeto de determinar una posible relación entre la transcripción y los sucesos de recombinación estimulados por *hpr1* hemos mapeado y cuantificado mediante Northern los transcritos producidos en 9 sistemas de repeticiones diferentes (5 no hiper-recombinantes y 4 hiper-recombinantes) y en un plásmido recombinante Leu<sup>+</sup> como control. (Es importante indicar que todos los plásmidos recombinantes Leu<sup>+</sup> son idénticos, dado que la delección elimina la secuencia intermedia.)

Para identificar los diferentes transcritos hemos usado sondas de pBR322, de *URA3* y de *LEU2*. Con la excepción de los transcritos específicos de *URA3*, todos los demás hibridan con una sonda de *LEU2* que cubre exactamente la repetición (fragmento *EcoRV-ClaI* de 598 pb) (FIGURAS 31 y 32). Esto sugiere que los transcritos inician en el promotor de *leu2Δ3'*, fuera de las repeticiones. Para confirmarlo hemos determinado mediante un ensayo de protección a RNasa A el sitio de iniciación y la orientación de los transcritos de los sistemas LY, NA y NB (FIGURA 30). Como ribosonda hemos empleado fragmentos de RNA específicos de la región 5' del marcador *leu2Δ3'*. Todos los transcritos analizados por Northern inician en el promotor del marcador *leu2Δ3'*.

En las FIGURAS 31 y 32 se muestra el análisis de Northern de los sistemas no hiper-recombinantes y hiper-recombinantes en las estirpes silvestre y *hpr1*.

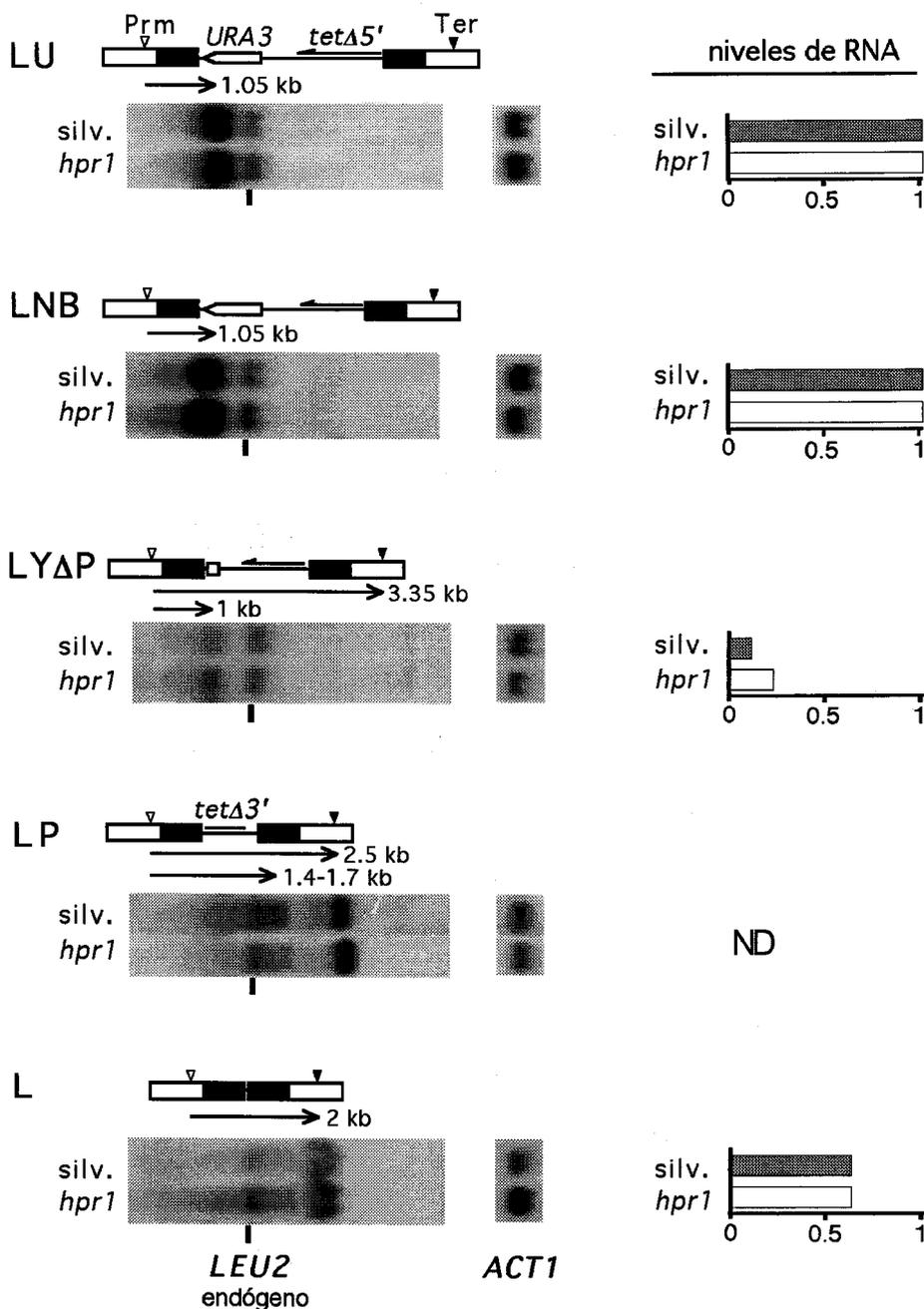
El análisis de los sistemas de repeticiones que no presentan fenotipo hiper-recombinante se muestra en la FIGURA 31. Podemos observar que los principales transcritos acaban justo después de entrar en la secuencia intermedia (en el terminador de *URA3* en LU y NB y en un terminador débil situado en la región 5' de *URA3* en LYΔP) o en el terminador de *LEU2* situado en *leu2Δ5'*, tras cubrir las dos repeticiones y la secuencia intermedia (sólo en el caso del sistema LP se observa un débil transcrito adicional que acaba entre la secuencia intermedia y la repetición de *leu2Δ5'*). Además, los niveles de todos los transcritos de cada sistema de repeticiones son los mismos en estirpes silvestre y *hpr1*.

El análisis de los sistemas con fenotipo hiper-recombinante se muestra en la FIGURA 32. Podemos observar que todos los transcritos terminan en la secuencia intermedia en regiones bacterianas o de levaduras que no son terminadores naturales de la transcripción en levaduras. El hecho de que una proporción de los transcritos sea capaz de atravesar algunas de estas regiones implica que son terminadores débiles. También se observa que los niveles de todos los transcritos de cada sistema de repeticiones en la estirpe *hpr1* son 2-3 veces inferiores a los niveles de los mismos transcritos en la estirpe silvestre.



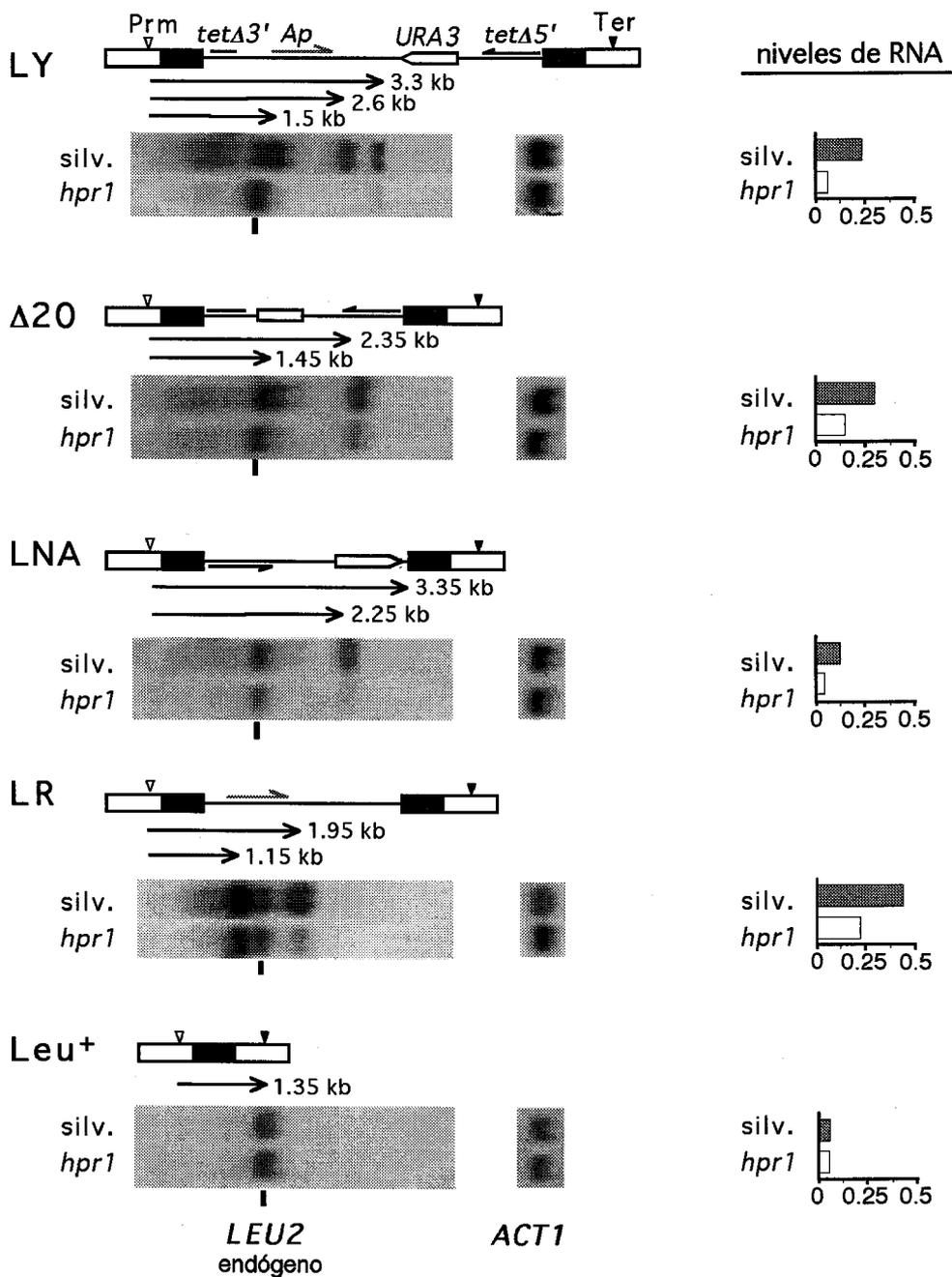
**FIGURA 30.** Determinación de la orientación y el sitio de iniciación de los mRNA de los sistemas LY, LNA y LNB mediante ensayo de protección a RNAsa A. Debajo se muestra un esquema de la repetición *leu2Δ3'* de los sistemas de repeticiones y las sondas usadas en el ensayo. La caja sombreada representa la secuencia homóloga. Para las sondas de RNA se empleó un fragmento de 768 pb *SspI-EcoRI* del gen *LEU2* transcrito en los dos sentidos a partir de los promotores T3 o T7 en el plásmido pBSRS. Las bandas de 400 y 250 pb corresponden al mRNA del marcador *leu2-k* endógeno, que presenta una delección de 6 pb en la diana *KpnI*, a 0.4 kb de *EcoRI*. Esta mutación genera un emparejamiento erróneo en el híbrido mRNA-sonda RNA accesible a la RNAsa A. El sitio de iniciación de la transcripción de *LEU2* (P) está a 652 pb de *EcoRI* (Andreadis *et al.* 1984), y corresponde con la banda observada en los transformantes LY, LNA y LNB. En el control sin transformar (-) no aparece la banda de 650 pb al proceder todo el transcrito del marcador *leu2-k* endógeno. La estirpe usada fue AWI-1B (silvestre). Como control negativo se usó tRNA de levaduras.

FIGURA 31: SISTEMAS NO HIPER-RECOMBINANTES



**FIGURA 31. (A)** Análisis de Northern y representación gráfica de los sistemas de repeticiones directas no hiper-recombinantes en estirpes silvestre (AW1-1B) y *hpr1Δ* (AYW3-4D). Resultados similares se han obtenido en las estirpes W303-1A (silvestre) y AYW3-5D (*hpr1Δ*). Las sondas empleadas fueron el fragmento de DNA *Clal-EcoRV* de 598 pb de *LEU2*, que coincide con la repetición, y un fragmento interno *Clal* de 581 pb del gen *ACT1*. El mismo filtro se hibridó primero con la sonda de *LEU2*, y tras eliminar esta señal se rehibridó con la sonda de *ACT1*. Los sistemas no están representados a escala (ver FIGURA 20 para representación a escala). El tamaño y localización de los transcritos procedentes del promotor de *leu2Δ3'* se ha representado con una flecha de forma que el extremo 3' de cada transcrito coincida con la posición de la banda correspondiente en el gel. Las cajas sombreadas representan las repeticiones de DNA. Prm y Ter indican promotor y terminador de *LEU2*, respectivamente. **(B)** Cantidad relativa de los transcritos de cada sistema. Cada valor representa la suma de todos los transcritos procedentes del promotor de *Leu2Δ3'* (representados como flechas en los esquemas). Todos los valores están normalizados con los valores de los mRNAs de los marcadores endógenos *leu2-k* y *ACT1*. Como valor 1 se tomó el del transcrito de 1.05 kb del sistema LU. ND indica no determinado. (Para los valores de cada uno de los transcritos de cada sistema ver APENDICE).

FIGURA 31: SISTEMAS HIPER-RECOMBINANTES



**FIGURA 32. (A)** Análisis de Northern y representación gráfica de los sistemas de repeticiones directas hiper-recombinantes y de un recombinante Leu<sup>+</sup> en estirpes silvestre (AWI-1B) y *hpr1Δ* (AYW3-4D). **(B)** Cantidad relativa de los transcritos de cada sistema. Para detalles ver FIGURA 31.

El estudio global de todos los sistemas, tanto hiper-recombinantes como no hiper-recombinantes, muestra que no hay transcritos específicos de la estirpe silvestre o de la estirpe *hpr1*. Para cada sistema los transcritos que se observan son los mismos en ambos fondos genéticos, empezando todos en el promotor de *leu2Δ3'* y acabando en diferentes terminadores, dependiendo de la estructura de cada sistema. También se observa que el nivel total de transcritos es claramente mayor en aquellos sistemas donde acaban en terminadores naturales de levaduras (de *URA3* y de *LEU2*) (LU, NB, L) que en los sistemas donde acaban en secuencias de bacteria o levaduras que no funcionan naturalmente como terminadores de transcripción (LYΔP, LY, Δ20, NA, LR). Este comportamiento probablemente refleje diferencias de estabilidad de mensajero asociadas a la terminación. Sin embargo, es interesante notar que en muchos sistemas el nivel total de transcritos es muy superior al observado en el sistema recombinante *Leu<sup>+</sup>*, donde el transcrito acaba en su terminador natural. Este dato sugiere que las regiones intermedias puedan estar regulando de alguna forma la actividad del promotor *leu2Δ3'*.

Todas las observaciones referidas se ilustran perfectamente en el sistema no hiper-recombinante LNB (FIGURA 31) y en el hiper-recombinante LNA (FIGURA 32), que sólo difieren en la orientación de la secuencia intermedia. (1) En el sistema LNB el transcrito termina justo después de la primera repetición, en el terminador de *URA3*. Por el contrario, en el sistema LNA el terminador de *URA3* está en el lado opuesto junto a la repetición *leu2Δ5'*. Como consecuencia, los transcritos entran en la región intermedia y terminan mayoritariamente en el terminador situado en la región 5' de *URA3* (Thomas and Rothstein 1989). Una pequeña proporción de los transcritos pasa este terminador débil, terminando en el terminador de *URA3*. (2) Mientras que en el sistema LNB los transcritos son igualmente abundantes en estirpes silvestre y *hpr1*, en el sistema LNA todos los transcritos son 3 veces menos abundantes en la estirpe *hpr1*. (3) El nivel total de transcrito en el sistema LNA es 8 (estirpes silvestres) y 25 (*hpr1*) veces menos abundante que en el sistema LNB.

Nuestros resultados excluyen la posibilidad de que la caída en los niveles de transcrito observada en los sistemas hiper-recombinantes en estirpes *hpr1*, así como el fenotipo de hiper-recombinación, sean consecuencia de diferencias en la terminación de la transcripción asociadas a la mutación *hpr1*. En las FIGURAS 31 y 32 se observa que que la transcripción termina en la misma región 5' del gen *URA3* en el sistema hiper-recombinante LNA y en el sistema no hiper-recombinante LYΔP.

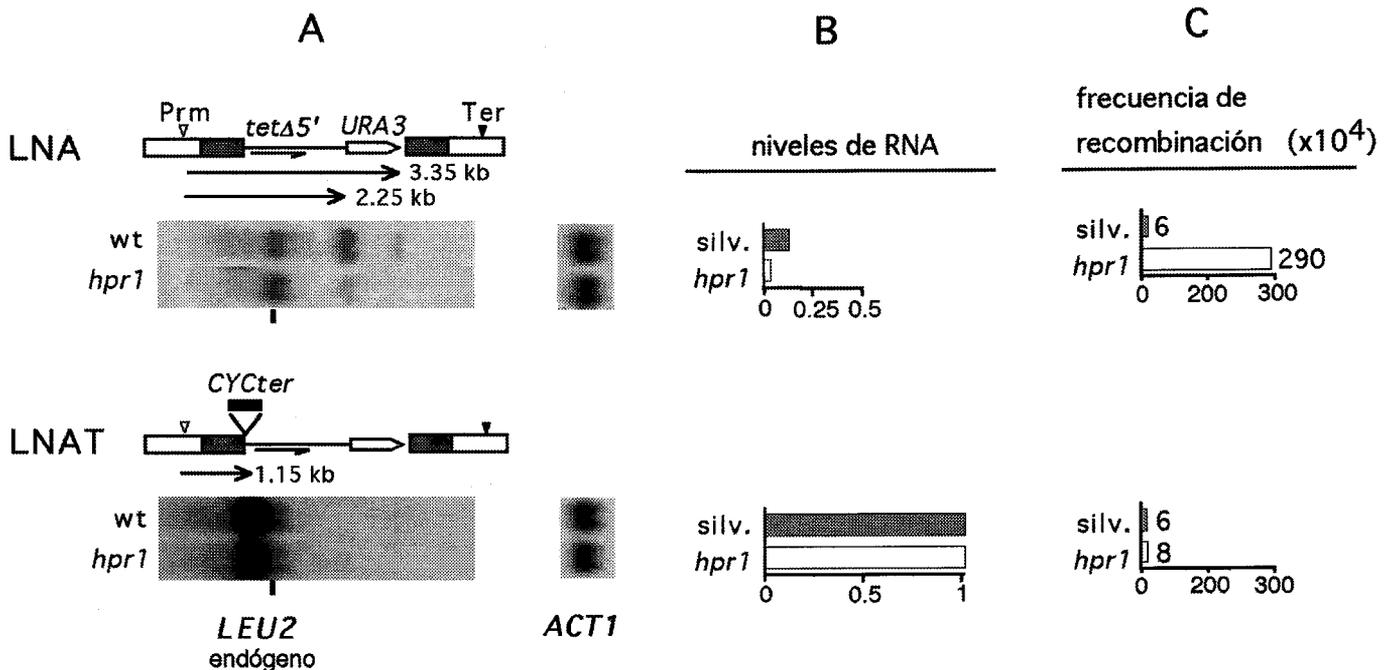
Por tanto, podemos concluir que los sucesos de recombinación inducidos por *hpr1* están asociados a la presencia de transcritos que entran en la secuencia intermedia y cuyos niveles dependen de *HPR1*. Sin embargo, nuestros resultados también muestran que la elongación a través de la secuencia intermedia no es suficiente para producir el fenotipo de hiper-recombinación en estirpes *hpr1*, como se observa en los sistemas L, LP y LY $\Delta$ P (FIGURA 31). El análisis de todos los Northern muestra que en los sistemas hiper-recombinantes la transcripción elonga en el sentido de los genes bacterianos *Amp* (LR y LY) o *Tet* (LNA), o en sentido contrario a la transcripción del gen de levaduras *URA3* ( $\Delta$ 20), mientras que esto nunca ocurre en los sistemas no hiper-recombinantes. Estos resultados sugieren que la recombinación inducida por *hpr1* requiere que la transcripción progrese a través de determinadas secuencias de DNA.

### **III. 4. 1. 5. Dependencia de los fenotipos de hiper-recombinación y de regulación de la transcripción de *hpr1* de la transcripción de determinadas regiones de la secuencia intermedia.**

El análisis de los transcritos de los diferentes sistemas de recombinación sugiere que los fenotipos de hiper-recombinación y de disminución de los niveles de expresión de *hpr1* dependen de que los transcritos progresen a través de determinadas secuencias en la región intermedia. Con objeto de comprobar esta hipótesis hemos puesto un terminador fuerte de la transcripción (*CYC1ter*) justo después de la primera repetición de *leu2* del sistema hiper-recombinante LNA, generando el sistema LNAT (FIGURA 33). Mediante análisis de Northern hemos comprobado que el patrón de transcripción del sistema LNAT es diferente del patrón del sistema LNA. La presencia del terminador termina eficientemente la transcripción justo después de la primera repetición, dando lugar a un transcrito de 1.15 kb (frente a los transcritos de 2.25 y 3.2 kb del sistema LNA).

Como se observa en la FIGURA 33 y de acuerdo con nuestra hipótesis, (1) el nuevo transcrito es ahora igualmente abundante en estirpes silvestre y *hpr1*; (2) el nivel total de transcritos en el sistema LNAT es 8 (estirpe silvestre) y 25 veces (estirpe *hpr1*) superior al nivel total de transcritos en el sistema LNA; y (3) se elimina completamente el fenotipo de hiper-recombinación dependiente de *hpr1* del sistema LNA (FIGURA 33).

Por tanto, el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* depende de la transcripción de la región intermedia, y está asociado a una disminución de los niveles de esos transcritos.



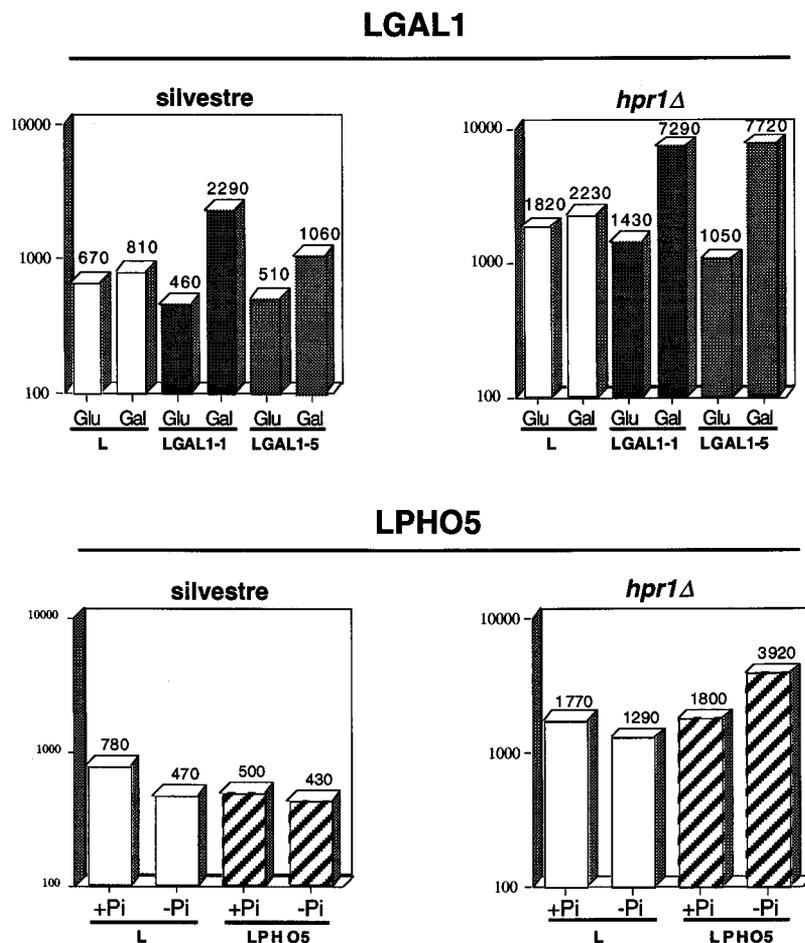
**FIGURA 33. (A)** Análisis de Northern y representación gráfica de los sistemas de repeticiones LNA y LNAT en estirpes silvestre (AWI-1B) y *hpr1* $\Delta$  (AYW3-4D). **(B)** Cantidad relativa de los transcritos de cada sistema. Para más detalles de (A) y (B) ver la leyenda de la FIGURA 31. **(C)** Frecuencia de recombinantes Leu<sup>+</sup> ( $\times 10^4$ ) de los sistemas LNA y LNAT. Los valores corresponden a la mediana de 3 tests de fluctuación. Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en la FIGURA 5.

### III. 4. 1. 6. El fenotipo hiper-recombinante de *hpr1* no depende de la presencia de promotores de genes regulados por Hpr1p.

Recientemente se ha descrito que Hpr1p es un regulador positivo de la transcripción, necesario para la activación de una serie de genes no relacionados (Fan y Klein 1994; Zhu *et al.* 1995). Por otro lado, mutaciones en genes que suprimen completamente el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* mapean en genes de dos factores de transcripción, *HRS1/PGD1* y *SRB2* (Santos-Rosa *et al.* 1996; Piruat y Aguilera, en prensa). Ambas observaciones sugieren una conexión entre los fenotipos de transcripción y recombinación de *hpr1*. Si Hpr1p es un activador de la transcripción esperaríamos que actuase en las secuencias promotoras. Si existiera una conexión directa entre el posible papel de Hpr1p en activación de la transcripción y el fenotipo de hiper-recombinación de algunos sistemas de repeticiones directas, cabría la posibilidad de que las regiones reguladas por *HPR1* actuaran de iniciadores de la recombinación. Hemos decidido comprobar directamente esta hipótesis clonando entre las dos repeticiones del sistema pRS314-L las regiones promotoras de dos genes regulados por Hpr1p: *GAL1* (Fan y Klein 1995; Zhu *et al.* 1996) y *PHO5* (apartado III. 2. 2. 2.). Si los fenotipos de falta de activación de la transcripción y de hiper-recombinación son

causados por la misma función de Hpr1p sobre la región promotora, estos sistemas deben ser hiper-recombinantes en condiciones de activación de la transcripción (galactosa y -Pi, respectivamente) y silvestres en condiciones de represión de la transcripción (glucosa y +Pi, respectivamente) en estirpes *hpr1*.

Como se observa en la FIGURA 26 ninguno de los tres sistemas (LPHO5 y LGAL1 con el promotor en las dos orientaciones: LGAL1-1 y LGAL1-5) muestra un fuerte fenotipo de hiper-recombinación en fondo *hpr1*. En los tres sistemas analizados hay un ligero incremento en estirpes *hpr1Δ* de 2.0-3.6 veces en condiciones de represión respecto a los niveles silvestres que pasa a ser de 7.3 (promotor de *GAL1*) ó 9.1 veces (promotor de *PHO5*) en condiciones de activación de la transcripción. Por tanto, la recombinación inducida por *hpr1* no está mediada por secuencias promotoras de genes regulados por Hpr1p.



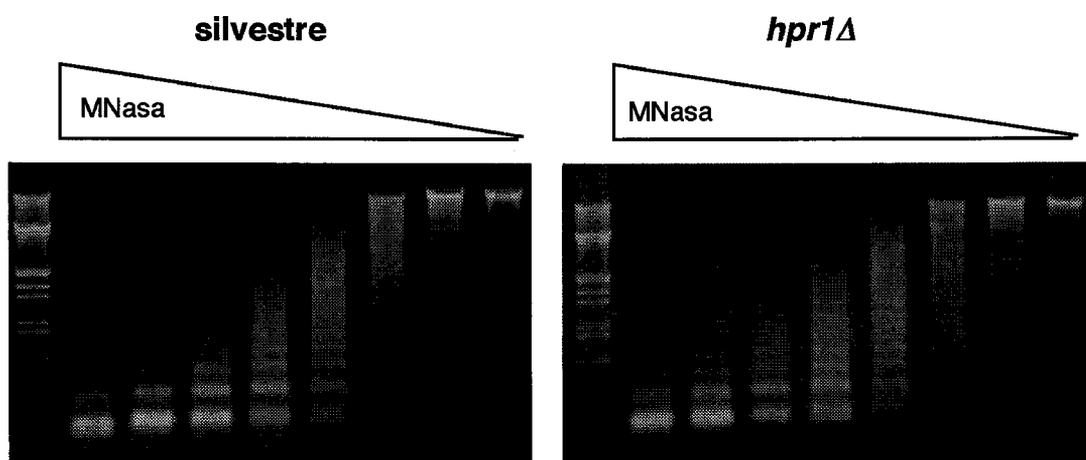
**FIGURA 34.** Frecuencia de recombinantes  $Leu^+$  ( $\times 10^6$ ) en los sistemas de repeticiones directas L, LGAL1 y LGAL5 (A) y en los sistemas L y LPHO5 (B) en las estirpes isogénicas W303-1A (silvestre) y U678-4C (*hpr1Δ*). Resultados similares de los sistema L, LGAL1 y LGAL5 se obtuvieron en las estirpes W303-1B y FWY-3B (silvestre) y AYW3-4D y FWY-4B (*hpr1Δ*) (Para más detalles ver apéndice TABLA 26). Los valores indicados corresponden a la mediana de 3-4 tests de fluctuación. Los tests de fluctuación se realizaron como se indica en MATERIALES Y METODOS, a partir de colonias crecidas en medio mínimo selectivo con glucosa 2% (Glu) o con galactosa 2% (Gal) en el caso de los sistemas LGAL1-1 y LGAL1-5, y de medio mínimo selectivo con Fosfato 7.5 M (+Pi) ó 0.5 M (-Pi) en el caso del sistema LPHO5. Para el sistema L se siguieron las mismas condiciones en cada caso.

### III. 4. 2. Análisis estructural de la cromatina en estirpes *hpr1*

Zhu y *et al.* (1995) han descrito recientemente cambios en el patrón de sensibilidad a metilación asociados a la mutación *hpr1* en genes cuya transcripción depende de Hpr1p, sugiriendo que tanto el fenotipo de transcripción como el de recombinación puedan ser consecuencia de un efecto general de Hpr1p sobre la cromatina. Con objeto de estudiar este posible papel hemos analizado el efecto de *hpr1* $\Delta$  por un lado en la estructura general de la cromatina, y por otro en la estructura de los promotores de *GAL1* y del virus del tumor de mama de ratón (MMTV).

#### III. 4. 2. 1. Sensibilidad a nucleasa micrococcal (MNasa) de la cromatina en estirpes *hpr1* $\Delta$

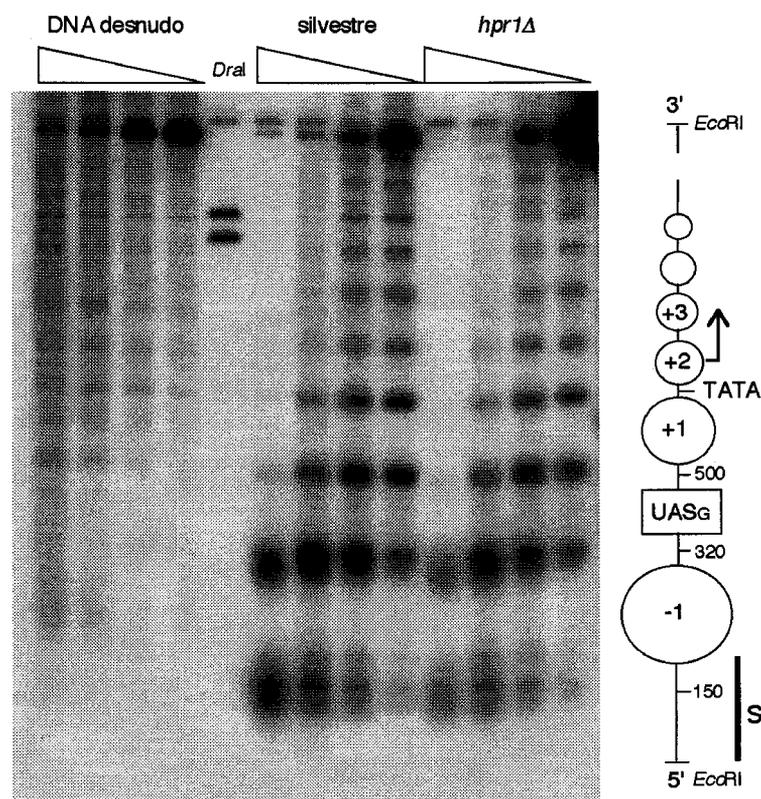
Hemos analizado, en primer lugar, la estructura general de la cromatina en estirpes silvestre y *hpr1* $\Delta$  con MNasa, que corta el DNA preferentemente en las regiones internucleosómicas. Si los fenotipos de *hpr1* $\Delta$  son consecuencia de un papel de la proteína Hpr1p sobre la estructura general de la cromatina esperaríamos observar una desestabilización de la organización nucleosómica del DNA. En la FIGURA 35 se muestra que la digestión con MNasa de la cromatina en estirpes silvestre y *hpr1* $\Delta$  da lugar a un patrón de nucleosomas bien definido, sugiriendo que los fenotipos de recombinación y transcripción no son consecuencia de un efecto general sobre la estructura de la cromatina, con las limitaciones propias de la técnica usada.



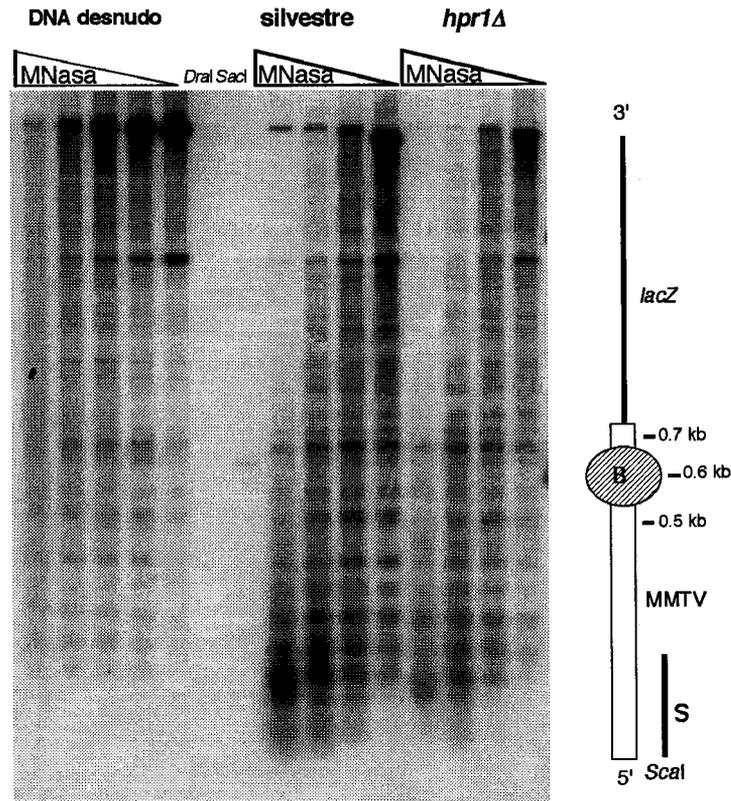
**FIGURA 35.** Análisis con nucleasa micrococcal (MNasa) de la estructura general de la cromatina en estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1* $\Delta$  (AYW3-4D). El DNA se digirió *in vivo* incubando protoplastos de cada una de las estirpes con concentraciones decrecientes de MNasa, se extrajo y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en agarosa 1%. La MNasa corta preferentemente el DNA internucleosómico, por lo que se obtiene un patrón de bandas discretas que corresponden a fragmentos múltiples del tamaño mínimo protegido por un nucleosoma.



*Análisis del posicionamiento de los nucleosomas en las regiones reguladoras de GAL1 y de MMTV en estirpes hpr1.* Para comprobar si *hpr1* modifica el posicionamiento de los nucleosomas hemos analizado la sensibilidad de las regiones reguladoras del promotor *GAL1* endógeno del cromosoma y del promotor MMTV en una fusión MMTV-*lacZ* en condiciones de represión de la transcripción. En las FIGURAS 37 y 38 se observa que en ambos casos el perfil de bandas en estirpes silvestre y *hpr1Δ* es similar. Por tanto, la mutación *hpr1* no modifica el posicionamiento de los nucleosomas en los promotores *GAL1* endógeno y MMTV exógeno.



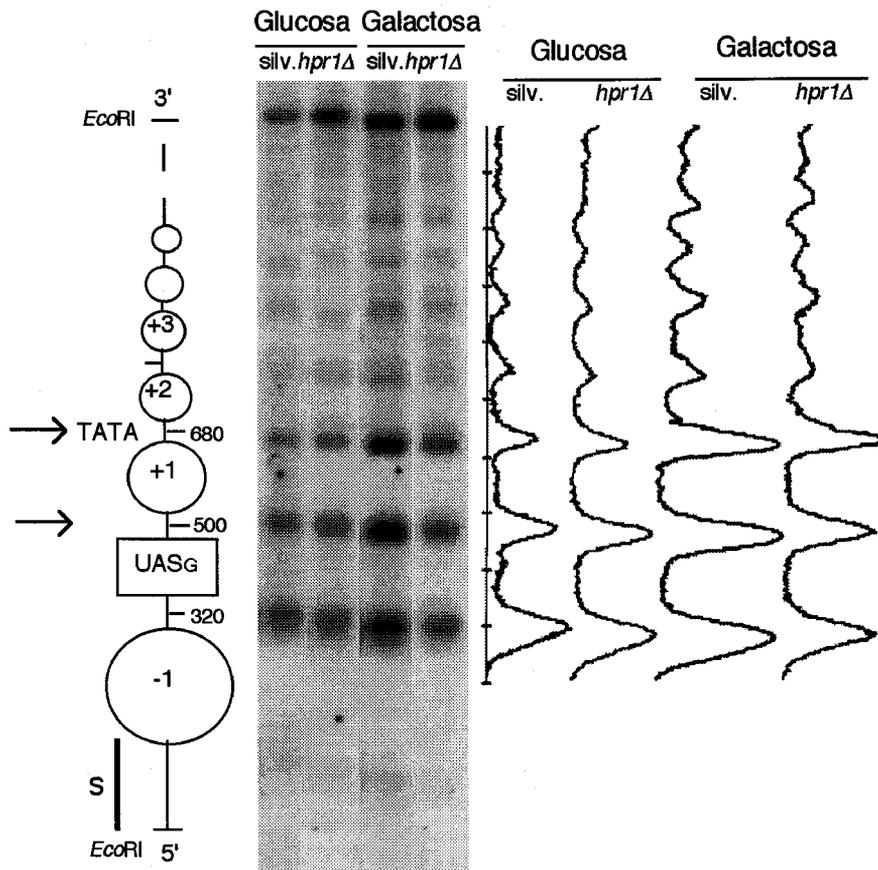
**FIGURA 37.** Análisis con MNasa de la región reguladora del gen *GAL1* endógeno en estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1Δ* (AYW3-4D). El DNA se digirió *in vivo* incubando protoplastos de cada una de las estirpes con concentraciones decrecientes de MNasa, se extrajo, se cortó con *EcoRI* y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en agarosa 1%. Para determinar la especificidad de secuencia de la MNasa se trató DNA desnudo extraído de la estirpe W303-1A con concentraciones decrecientes de MNasa. Como control negativo (-MNasa) se usó DNA desnudo digerido con *DnaI* y *EcoRI*. Como sonda se utilizó un fragmento de DNA de 196 pb justo corriente abajo del sitio de corte de *EcoRI* marcado por PCR con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (S). A la derecha del Southern se representa gráficamente el posicionamiento de los nucleosomas así como los elementos de la transcripción más relevantes. La región UAS<sub>G</sub> contiene las secuencias de unión del activador transcripcional Gal4p. La flecha en el nucleosoma +2 representa el sitio de iniciación de la transcripción. Los números indican la distancia en pb desde cada sitio de corte de la MNasa a la diana *EcoRI*.



**FIGURA 38.** Análisis con MNasa de la región reguladora de MMTV en estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1Δ* (AYW3-4D) transformadas con el plásmido pRS416MMTVLTR, que contiene la fusión MMTV-*lacZ*. El DNA de los transformantes se digirió *in vivo* incubando protoplastos de cada una de las estirpes con concentraciones decrecientes de MNasa, se extrajo, se cortó con *Scal* y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en agarosa 1%. Para determinar la especificidad de secuencia de la MNasa se trató DNA desnudo extraído de la estirpe W303-1A con concentraciones decrecientes de MNasa. Como control negativo -MNasa se usó DNA desnudo digerido con *DraI* o *SacI* más *Scal*. Como sonda se utilizó un fragmento de DNA de 200 pb justo corriente abajo del sitio de corte de *Scal* marcado por PCR con  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (S). A la derecha del Southern se representa gráficamente la región analizada así como la posición del nucleosoma B, que engloba los sitios de unión de GR y de NFI. Los números indican la distancia en pb de los sitios de corte de la MNasa que flanquean el nucleosoma B a la diana *Scal*.

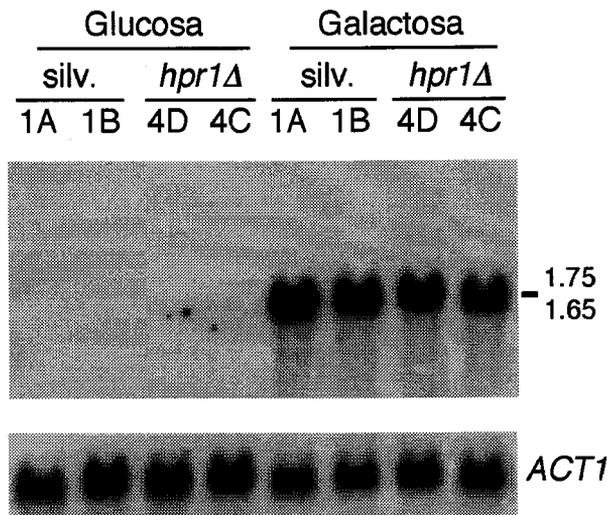
*Análisis de los cambios estructurales asociados a la activación de la transcripción en estirpes hpr1Δ.* Hemos analizado si la mutación *hpr1* afecta a las modificaciones estructurales de las regiones reguladoras asociadas a la activación de la transcripción.

1.- En el caso del promotor de *GAL1*, la activación va acompañada de ligeros cambios en el patrón de sensibilidad a MNasa (Fedor y Kornberg 1989). Estos estudios han sido realizados en fusiones *GAL1* en plásmidos. Hemos analizado el perfil de sensibilidad a MNasa del promotor de *GAL1* en el cromosoma en condiciones de activación y de represión en estirpes silvestre y *hpr1Δ* (FIGURA 39).



**FIGURA 39.** Análisis con MNasa de la región reguladora del gen *GAL1* endógeno en estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1Δ* (AYW3-4D) en condiciones de represión (crecimiento en glucosa) y activación de la transcripción (crecimiento en galactosa). Para detalles ver leyenda de FIGURA 37. A la izquierda se indican los sitios de hipersensibilidad a MNasa de la cromatina asociados a la activación de la transcripción (flechas). A la derecha se representa el perfil de intensidades.

La activación de la transcripción da lugar a dos sitios de hipersensibilidad en las regiones internucleosómicas que flanquean el nucleosoma +1. Como se observa en la FIGURA 39 esos cambios son independientes de la mutación *hpr1Δ*. Previamente se ha descrito que la activación de la transcripción del gen *GAL1* genera una desestabilización de la organización nucleosómica de la región transcrita (Cavalli y Thoma, 1993). Es interesante observar que esa pérdida parcial del posicionamiento nucleosómico también se da en estirpes *hpr1Δ*, sugiriendo que el gen está siendo transcrito (FIGURA 39). Este hecho lo hemos confirmado mediante Northern (FIGURA 40), donde se observa que Hpr1p no es necesario para la activación del promotor *GAL1* endógeno.



**FIGURA 40.** Análisis de Northern de la expresión del gen *GAL1* endógeno en estirpes silvestre y *hpr1Δ* en condiciones de represión (glucosa) y de activación (galactosa) de la transcripción. Las estirpes empleadas han sido W303-1A y AWI-1B (silvestres) y AYW3-4D y U678-4C (*hpr1Δ*). Como sonda se utilizó un fragmento interno de *GAL1* *Aval-PvuII* de 750 pb obtenido del plásmido pBKGAL1. El tamaño de los transcritos de *GAL1* se indica en kb. La cantidad de RNA está normalizada respecto al mRNA del gen *ACT1* endógeno. Para ello se rehibridó el filtro con un fragmento *ClaI* de 581 pb del gen *ACT1*.

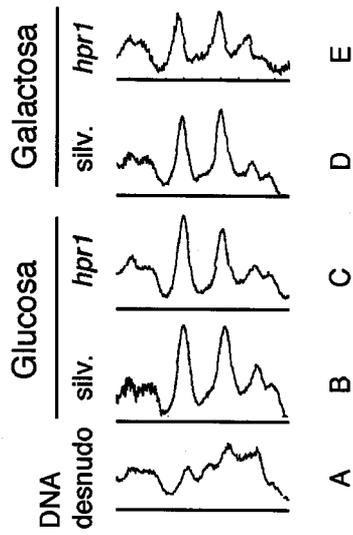
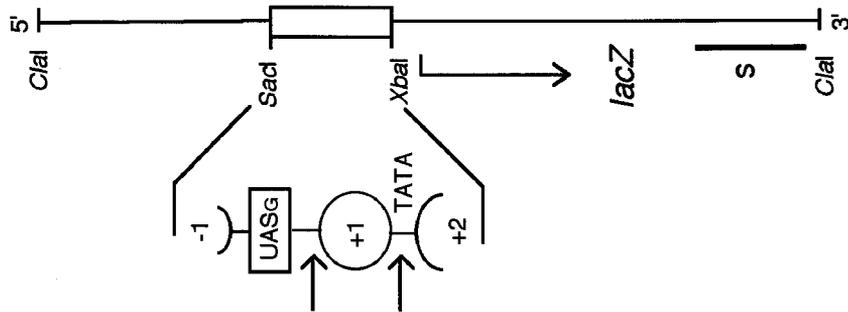
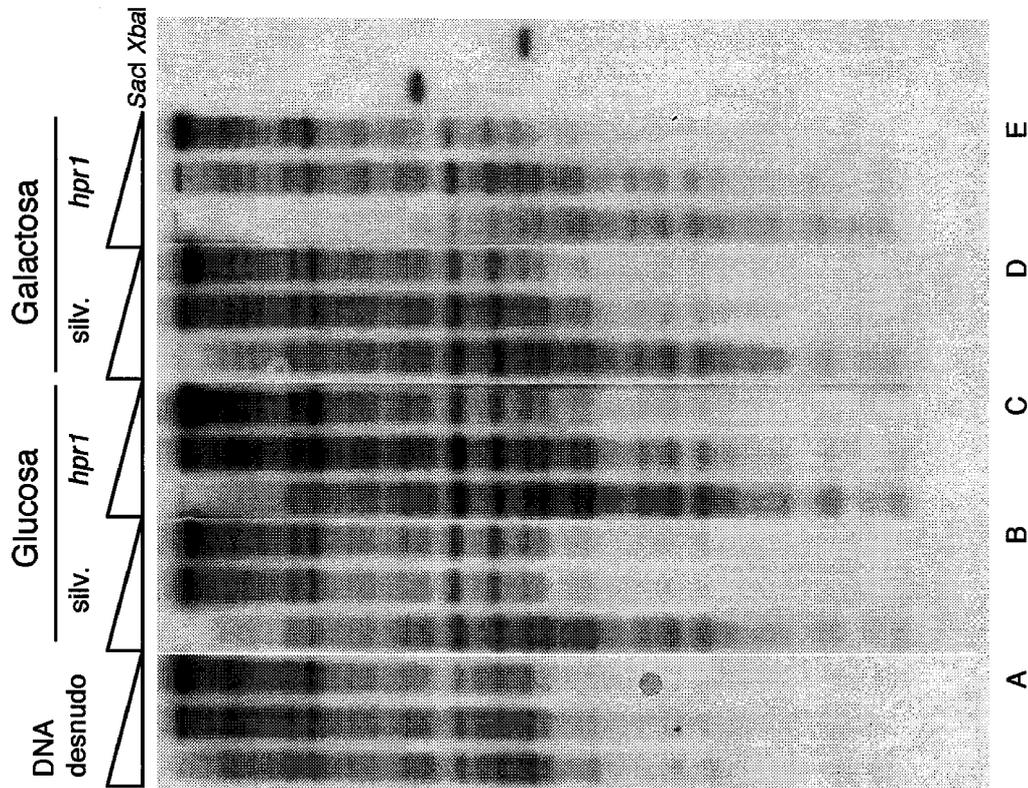
Dado que la dependencia de *HPR1* del promotor *GAL1* en fusiones *GAL1/10-lacZ* ha sido ampliamente confirmada por diferentes grupos (Fan y Klein, 1994; Zhu *et al.*, 1995; Santos-Rosa y Aguilera, 1995), hemos analizado la sensibilidad a MNasa del promotor de *GAL1* en una fusión *GAL1-lacZ*, cuya transcripción es dependiente de *hpr1* (dato no mostrado). En la FIGURA 41 se muestra el análisis de sensibilidad a MNasa. Tanto en estirpes silvestres como *hpr1* el nucleosoma +1 de *GAL1* clonado en la fusión está claramente posicionado (comparar perfiles B, C, D y E con el perfil A de DNA desnudo), lo que confirma que *hpr1* no altera la estructura de la cromatina de las regiones reguladoras. Tras la inducción de la transcripción hay un ligero aumento de la sensibilidad a MNasa en la región internucleosómica 3' que flanquea el nucleosoma +1 y que contiene la caja TATA en comparación con la región internucleosómica 5' (comparar perfiles B y C con D y E). Este cambio es el mismo que el descrito en el gen endógeno (ver FIGURA 39) (no es posible determinar si ha habido aumento en la sensibilidad de la región internucleosómica 5' al no poderla comparar con la banda correspondiente a la región internucleosómica que flanquea el nucleosoma -1 en posición 3'). Este cambio en la sensibilidad a MNasa asociado a la activación de la transcripción se da tanto en estirpes silvestre como *hpr1*. Por tanto, *hpr1* no afecta

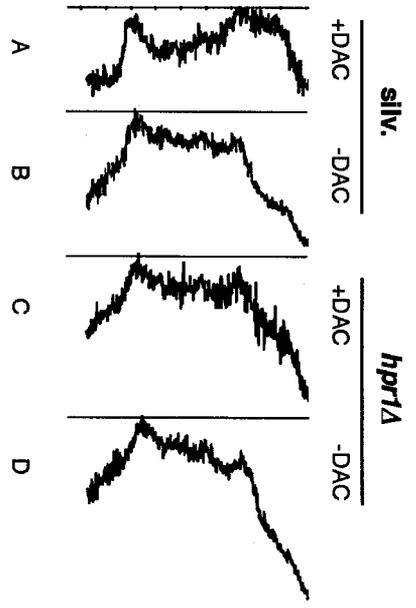
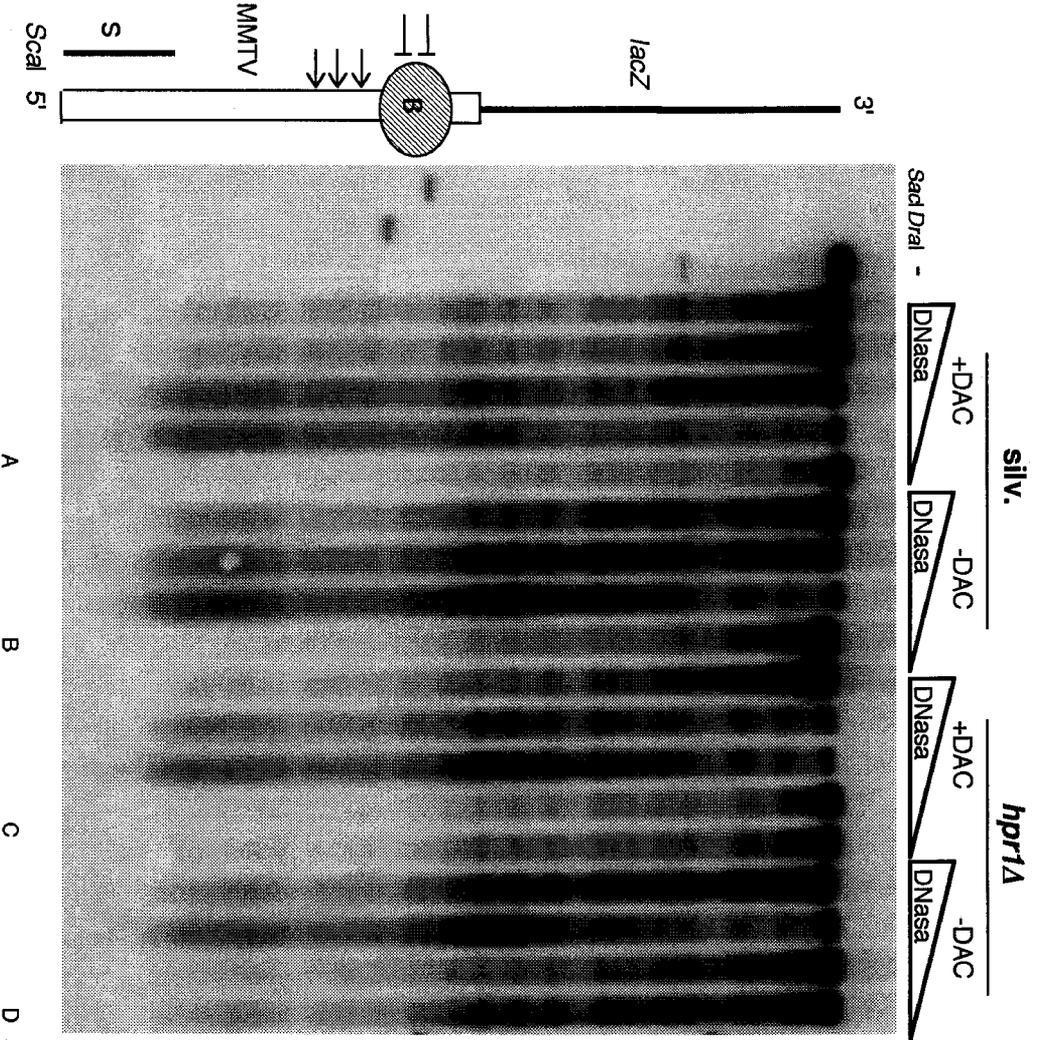
a los cambios de sensibilidad a MNasa asociados con la activación de la transcripción.

2.- En el caso de MMTV la activación hormonal produce un cambio en el patrón de sensibilidad a DNasal y no afecta al patrón de sensibilidad a MNasa (Chavez *et al.*, 1995). Tras la administración de la hormona el DNA internucleosómico que está corriente arriba del nucleosoma B se hace hipersensible a DNasal, y aumenta la protección en la región correspondiente al nucleosoma B, que comprende los sitios de unión del receptor y de NFI (FIGURA 42). Este cambio estructural dependiente de hormona desaparece en fondo *hpr1Δ*.

**FIGURA 41.** Análisis con MNasa de la región reguladora del gen *GAL1* en la fusión *GAL1-lacZ* en el plásmido pRS416*GAL1lacZ* en estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1Δ* (AYW3-4D) en condiciones de represión (crecimiento en glucosa) y activación de la transcripción (crecimiento en galactosa). Para detalles ver leyenda de FIGURA 37. Como marcadores internos de tamaño se usó DNA de la estirpe W303-1A con *Clal* más *SacI* o más *XbaI*. A la izquierda se representa gráficamente la región analizada de la fusión *GAL1-lacZ*. La caja abierta representa el fragmento *SacI-XbaI* del promotor de *GAL1* fusionado a *lacZ* (línea continua); La flecha en *lacZ* indica el sentido de la transcripción. A la izquierda de la caja abierta se representan los nucleosomas y elementos de la transcripción más relevantes de *GAL1* presentes en la construcción. Las flechas indican los sitios de hipersensibilidad asociados a la activación de la transcripción descritos en el gen endógeno (ver FIGURA 39), que corresponden con los bordes del nucleosoma +1 claramente posicionado en esta construcción. La localización en plásmido y las regiones de DNA bacteriano que flanquean la región de *GAL1* hacen que el posicionamiento sea más difuso en el resto de la construcción. A la derecha se muestra el perfil de intensidades de la zona analizada, donde los dos picos corresponden con los bordes del nucleosoma B.

**FIGURA 42.** Análisis de los sitios de hipersensibilidad a DNasal de la región reguladora del promotor de MMTV en las estirpes silvestre (W303-1A) y *hpr1Δ* (AYW3-4D) en condiciones de inducción (+DAC) y represión (-DAC) de la transcripción. Para el análisis se transformaron las estirpes con los plásmidos pRS416MMTVLTR (contiene la fusión MMTV-*lacZ*), pGN795 (codifica GR) y pAA-CTF2 (codifica NFI). Para detalles ver leyenda de FIGURA 38; el tratamiento fue igual pero la cromatina se digirió con concentraciones decrecientes de DNasal. A la izquierda se indican las regiones de hipersensibilidad (flechas) y de protección a DNasal (líneas perpendiculares) de la cromatina de la estirpe silvestre asociadas a la activación de la transcripción (+DAC). A la derecha del Southern se representa el perfil de intensidades de la zona de interés.





## **IV. DISCUSSION**

## IV. DISCUSION

Con objeto de comprender qué funciones y mecanismos están implicados en la formación de deleciones, hemos construido una serie de sistemas de repeticiones directas que sólo difieren en el tamaño y origen de la secuencia intermedia. Como control hemos construido el mismo sistema con las repeticiones en orientación invertida. Todos los sistemas están basados en la misma secuencia repetida, un fragmento interno de 0.6 kb del gen *LEU2*. Por recombinación entre las secuencias repetidas se forma una copia silvestre del gen *LEU2* que nos permite seleccionar los recombinantes como Leu<sup>+</sup>. Dado que cada copia de la repetición lleva una deleción diferente del gen *LEU2*, los recombinantes sólo se pueden generar mediante una deleción o una inversión, según sea el sistema de repeticiones directas o invertidas, respectivamente, y nunca por conversión génica. Este estudio nos ha permitido conocer con mayor detalle los mecanismos y funciones responsables de las deleciones y el papel de la mutación *hpr1* en el control de la estabilidad de las repeticiones directas.

### IV. 1. FORMACIÓN DE DELECIONES ENTRE REPETICIONES DIRECTAS

#### IV. 1. 1. Mecanismos de formación de las deleciones

En nuestros sistemas las deleciones espontáneas ocurren a una frecuencia 6-10 veces superior a las inversiones entre las mismas repeticiones de 0.6 kb. Dado que las inversiones sólo pueden generarse por recombinación recíproca, creemos que el incremento en la frecuencia de deleciones se debe a la existencia de sucesos de recombinación adicionales específicos de los sistemas de repeticiones directas. Nuestros datos concuerdan con los publicados previamente por Jinks-Robertson *et al.* (1993), quienes han observado un incremento en la frecuencia de deleciones de 3-11 veces respecto a los niveles de inversiones en diferentes repeticiones cromosómicas de más de 200 pb. Dornfeld y Livingston (1992) no ven diferencias entre repeticiones directas e invertidas entre dos heteroalelos de *his3*, pero en estos sistemas los recombinantes se pueden producir también por conversión génica, por lo que los datos no son comparables.

El estudio comparativo de la recombinación estimulada por DSB en sistemas de repeticiones directas e invertidas sugiere que el incremento en la frecuencia de deleciones espontáneas respecto a la inversiones puede deberse a que las deleciones, a diferencia de las inversiones, pueden iniciarse por un DSB en la secuencia intermedia. Nuestros resultados indican que un DSB producido entre dos repeticiones directas es reparado de una forma muy eficiente (la

frecuencia de transformación es similar con el plásmido cortado y sin cortar), y que la reparación del corte se produce mediante una delección (en más del 90% de los casos). Por el contrario, cuando el DSB no está flanqueado por repeticiones directas (en la secuencia intermedia del sistema de repeticiones invertidas o fuera de las repeticiones, tanto directas como invertidas), el corte se repara de forma muy poco eficiente y no induce la recombinación. Por tanto, un DSB se repara de forma muy eficiente en *S. cerevisiae* cuando está flanqueado por una repetición directa y no cuando lo está por una repetición invertida, sugiriendo que las delecciones pueden ocurrir de forma espontánea por iniciación tanto en la secuencia intermedia (no homóloga) como en la secuencia repetida (homóloga).

Las delecciones espontáneas en los sistemas L, LU y LY, que difieren exclusivamente en el tamaño de la secuencia intermedia (31 pb, 2.51 kb y 5.57 kb, respectivamente), ocurren a la misma frecuencia, lo que sugiere que la distancia entre las repeticiones no supone ninguna limitación de tipo estérico al emparejamiento entre las repeticiones. Sin embargo, es posible que las delecciones se produzcan por un DSB que ocurre antes que el emparejamiento de las repeticiones.

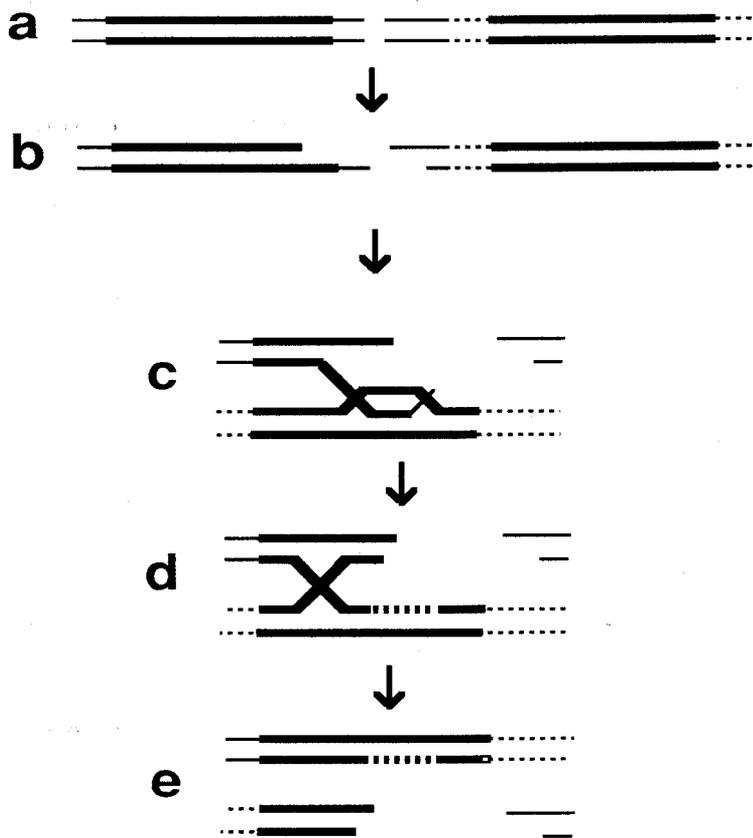
En nuestros sistemas de repeticiones tanto las delecciones como las inversiones son fuertemente dependientes de *RAD52*, con niveles 50-200 veces por debajo de los niveles silvestres. Este comportamiento de los sistemas de repeticiones directas es una característica específica de estos sistemas en relación a otros previamente publicados. Tanto la recombinación recíproca entre repeticiones invertidas (Willis y Kein 1987; Aguilera y Klein 1989; Dornfeld y Livingston 1992) como la conversión génica (Jackson y Finck 1981; Klein 1988; Aguilera y Klein 1989) dependen fuertemente de *RAD52*, con descensos de más de un orden de magnitud. Sin embargo, los niveles de delecciones previamente descritos muestran descensos entre 0-10 veces por debajo de los niveles silvestres (Jackson y Finck 1981; Klein 1988; Ronne y Rothstein 1988; Aguilera y Klein 1989; Thomas y Rothstein 1989; Dornfeld y Livingston 1992; Santos-Rosa y Aguilera 1994). Estos datos sugieren que las delecciones pueden producirse por mecanismos tanto dependientes como independientes de *RAD52*, mientras que las inversiones sólo por mecanismos dependientes de *RAD52*. Esta ruta de formación de delecciones independiente de *RAD52* también está presente en nuestros sistemas (la frecuencia de delecciones es de  $0.6 \cdot 2 \times 10^{-5}$ , frente a una frecuencia de inversiones de  $0.2 \times 10^{-5}$ ), pero a diferencia de otros previamente publicados, en nuestros sistemas de repeticiones directas las delecciones ocurren preferentemente por la ruta dependiente de *RAD52*. Esta dependencia de *RAD52* la hemos corroborado en la búsqueda de mutantes deficientes en recombinación, donde sólo hemos encontrado alelos de *RAD52*. Resultados similares los hemos

obtenido en el estudio de las deleciones justo después de transformar con los plásmidos sin cortar; donde de nuevo la frecuencia de deleciones en estirpes *rad52* es dos órdenes de magnitud inferior a la frecuencia en estirpes silvestres ( $>10^{-3}$  frente a  $8-10 \times 10^{-2}$ ). Por tanto, creemos que en nuestros sistemas las deleciones producidas por mecanismos dependientes de *RAD52* se ven favorecidas por algún tipo de características estructurales.

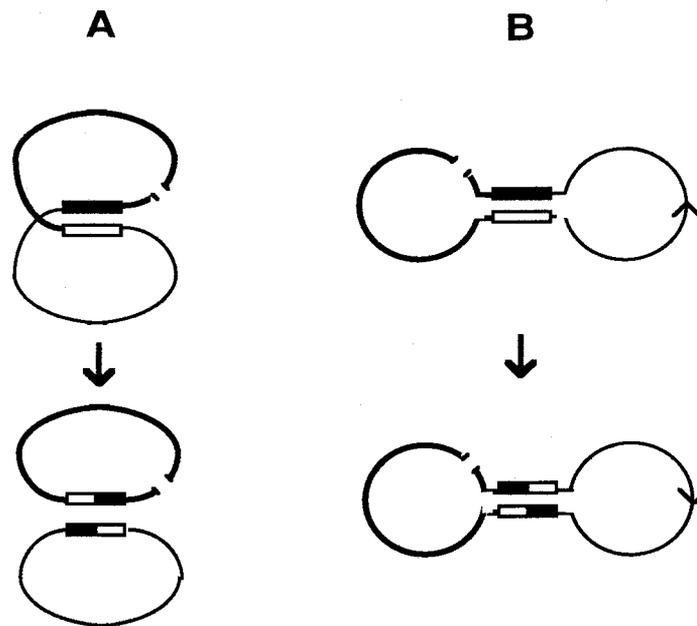
El análisis de las deleciones estimuladas tanto por un DSB en la secuencia intermedia, como por la recombinasa específica de sitio flipasa como por la mutación *hpr1* muestra que las deleciones se producen tanto por rutas dependientes como independientes de *RAD52*. Hemos observado un descenso en la frecuencia de transformación con los plásmidos cortados mediante enzimas de restricción en la secuencia intermedia en estirpes *rad52*, que indican que las deleciones estimuladas por un DSB se reparan tanto por rutas dependientes como independientes de *RAD52*. Además, las deleciones estimuladas por la expresión de la flipasa en el círculo de  $2 \mu$  y bajo control del promotor GAL1 ocurren a una frecuencia 10 y 100 veces inferior en estirpes *rad52* que en estirpes silvestres, respectivamente. De acuerdo con los datos de recombinación espontánea, las deleciones estimuladas por la mutación *hpr1* ocurren por mecanismos tanto dependientes como independientes de *RAD52* (Aguilera y Klein 1989; Santos-Rosa y Aguilera 1994; Fan y Klein 1994). En nuestros sistemas, al igual que hemos descrito a nivel espontáneo, las deleciones estimuladas por *hpr1* son mucho más dependientes de *RAD52* que en los sistemas previamente descritos, aunque las deleciones independientes de *RAD52* son también estimuladas en nuestros sistemas en estirpes *hpr1*.

Los resultados del estudio de las deleciones inducidas por corte (con enzimas de restricción y con la flipasa) sugieren que las deleciones se pueden producir por dos mecanismos de recombinación no conservativos. El primero es el mecanismo de realineamiento de cadena sencilla (SSA) propuesto en células animales por Lin *et al.* (1984) (ver INTRODUCCION). Se ha observado en levaduras que un DSB inducido por la endonucleasa *HO* entre dos repeticiones directas induce las deleciones (Rudin y Haber 1988; Nickoloff *et al.* 1989) y éstas son independientes de *RAD52* (Ozenberger y Roeder 1991; Fishman-Lovell *et al.* 1992; Sugawara y Haber 1992; Mezard y Nicolas 1994). Se ha sugerido que en levaduras el mecanismo de SSA es el responsable de las deleciones entre repeticiones directas (Ozenberger y Roeder 1991; Fishman-Lovell *et al.* 1992). De acuerdo con esta hipótesis, hemos observado que un DSB producido *in vitro* entre las repeticiones (hasta un 85% del total de los transformantes), un corte producido por la flipasa (50 veces) y la mutación *hpr1* (3- 5 veces) estimulan las deleciones en estirpes *rad52*.

Nosotros proponemos que un segundo mecanismo no conservativo responsable de las deleciones es la invasión de cadena sencilla (FIGURA 43). Este mecanismo probablemente ocurre de acuerdo con el modelo de reparación de DSBs (Szostak et al. 1983). Un DSB producido en la secuencia intermedia induce un entrecruzamiento por invasión de una cadena sencilla que no puede reparar el corte, pero lo elimina en uno de los productos recombinantes. El producto de este proceso es equivalente a medio entrecruzamiento, como se ha propuesto en *E. coli* (Takahashi et al. 1992), aunque mecánicamente puede ocurrir mediante un entrecruzamiento completo, como se ilustra en la FIGURA 43. Este proceso sólo genera productos viables cuando el DSB está flanqueado por repeticiones directas (genera la deleción); cuando está flanqueado por repeticiones invertidas el corte sin reparar no se elimina y la molécula es inviable (FIGURA 44).



**FIGURA 43.** Representación grafica del mecanismo de invasión de cadena sencilla.



**FIGURA 44.** Productos de recombinación producidos por invasión de cadena sencilla.

Aunque no podemos saber cual de estos mecanismos, SSA o invasión de cadena sencilla, corresponde a la ruta dependiente y cual a la independiente de *RAD52*, creemos que el mecanismo de SSA es el responsable de las deleciones observadas en estirpes *rad52*, de acuerdo con la interpretación original propuesta por Ozenberger y Roeder (1991) para explicar las deleciones independientes de *RAD52* que ocurren en el rRNA y por Fishman-Lovell y Haber (1992) para explicar las deleciones estimuladas por un corte producido por la endonucleasa *HO*. El mecanismo de SSA sería responsable de las deleciones independientes de *RAD52* que se producen de forma espontánea en estirpes silvestres y *hpr1* o inducidas por corte *in vitro* (DSB) o *in vivo* (mediado por la flipasa) en nuestros sistemas.

Las deleciones dependientes de *RAD52* observadas por esos autores y por nosotros se pueden explicar por invasión de cadena sencilla. De acuerdo con esta idea, hemos observado que tanto las deleciones espontáneas como las inducidas por DSB en nuestros sistemas (fuertemente dependientes de *RAD52*) son independientes de la distancia, entre las repeticiones, mientras que las deleciones inducidas por corte con *HO* (independientes de *RAD52*) disminuyen con la distancia entre las repeticiones (Fishman-Lovell y Haber 1992). De acuerdo con nuestra hipótesis el mecanismo de invasión de cadena sencilla corresponde mecánicamente al modelo de recombinación de DSBs, dependiente de *RAD52*.

Como mecanismos responsables de las deleciones hemos descartado tanto el intercambio desigual entre cromátidas hermanas (USCE) como la conversión génica desigual entre cromátidas hermanas (USGC) (ver INTRODUCCION), ya que ambos procesos deberían producir frecuencias similares de deleciones y de inversiones en recombinación espontánea; además, el USCE producirán un plásmido dicéntrico por intercambio recíproco que sería inestable. Por otro lado hemos descartado la formación de deleciones por desplazamiento e intercambio desigual de las cadenas complementarias que se generan en la horquilla de replicación, propuesto en *E. coli* para explicar las deleciones independientes de RecA, ya que este proceso genera, además de la deleción, bien una duplicación o bien una triplicación (Lovett *et al.* 1993; Biu y Liu 1994).

En conclusión, nuestros datos sugieren que las deleciones entre repeticiones directas se pueden producir por tres procesos de recombinación diferentes: intercambio recíproco, invasión de cadena sencilla y SSA. El intercambio recíproco genera tanto deleciones entre repeticiones directas como inversiones entre repeticiones invertidas. Los sucesos pueden iniciarse sólo en la secuencia de homología y se producen mecanísticamente según el modelo de recombinación conservativa de reparación de DSB, dependiente de *RAD52*. La invasión de cadena sencilla y el SSA son procesos no conservativos que generan exclusivamente deleciones y que pueden iniciarse tanto en la repetición (región homóloga) como en la secuencia intermedia (región no homóloga). La mayor frecuencia de deleciones frente a inversiones puede explicarse por un incremento en el sustrato de recombinación; los sucesos pueden iniciarse también en la secuencia intermedia y resolverse por invasión de cadena sencilla o por SSA.

Por último, hemos observado que el comportamiento en recombinación de nuestros sistemas, tanto en estirpes silvestres como *hpr1*, es independiente de la localización de los sistemas de repeticiones (plásmidos centroméricos, minicromosomas o cromosomas). En este sentido Kaitor y Livingston (1994) han observado que la frecuencia de recombinación entre repeticiones invertidas cromosómicas basadas en marcadores *his3* ocurren a una frecuencia dos órdenes de magnitud inferior a la frecuencia que presentan cuando están localizadas en plásmidos centroméricos, lo que sugiere que el locus donde se integre el sistema puede determinar su comportamiento en recombinación.

#### **IV. 1. 2. La endonucleasa Rad1/Rad10 es necesaria para la invasión de cadena sencilla y el SSA.**

Hemos observado que el nivel espontáneo de deleciones e inversiones es similar en estirpes silvestres y *rad1*. Sin embargo, la frecuencia de deleciones justo tras transformar con los plásmidos sin cortar es 5-10 veces inferior en estirpes *rad1*

a la frecuencia obtenida en estirpes silvestres. Es posible que esta diferencia sea consecuencia del estado del DNA al entrar en la célula (p. ej., falta de una estructura cromatínica adecuada). En general nuestros resultados concuerdan con dato publicado previamente en los que no hay o es muy ligero el efecto de las mutaciones *rad1* y *rad10* (Klein 1988; Ronne y Rothstein 1988; Schiestl y Prakash 1988; Thomas y Rothstein 1989).

Nuestros datos indican que tanto Rad1p como Rad10p son necesarios para la reparación mediante delección de un DSB producido en la secuencia no homóloga entre las repeticiones directas cuando el corte está alejado de las repeticiones, y no son necesarias cuando el corte se produce próximo a las repeticiones. Tanto la frecuencia de transformación (que determina la capacidad de reparación) como la frecuencia de delecciones entre los transformantes (que determina el porcentaje de reparación mediante una delección) disminuyen en estirpes *rad1* y *rad10* respecto a la estirpe silvestre cuando el DSB se produce a 0.77 (LU-*PstI*), 2.19 (LY-*SmaI*) o 2.19 kb (LY-*SaII*) de la repetición más próxima. La frecuencia de transformación disminuye 5-10 veces respecto a la estirpe silvestre, mientras que la frecuencia de recombinación pasa del 86-96% en estirpes silvestres al 26-43% en estirpes *rad1* y al 41-50% en estirpes *rad10*. Sin embargo, las frecuencias de transformación y de recombinación presentan los mismos en silvestre, *rad1* y *rad10* cuando el DSB se produce a 8 y 27 pb de cada repetición (L-*PstI*).

Fishman-Lovell y Haber (1992) han sugerido que *RAD1* es necesario en la formación de delecciones entre repeticiones directas para eliminar las secuencias de DNA heterólogo de cadena sencilla que permanecen sin hibridar, y proponen que esta actividad sería necesaria para el proceso de SSA. Nuestros datos están de acuerdo con ese planteamiento y lo hacen extensivo a *RAD10*. Este comportamiento de Rad1p y Rad10p en recombinación apoya los datos bioquímicos que indican que ambas proteínas actúan *in vitro* como un complejo (Bardwell *et al.* 1992) que tiene capacidad de promover el realineamiento de cadenas sencillas (Sung *et al.* 1992). Sin embargo, nuestros resultados muestran que *rad1* y *rad10* son necesarios incluso cuando el corte se produce a 5.27 y 0.3 kb de la repeticiones (LY-*SaII*), donde la mayor parte de las delecciones se producen por una ruta dependiente de *RAD52*, lo que sugiere que las proteínas Rad1p y Rad10p son también necesarias en el proceso de invasión de cadena sencilla.

Por tanto, el complejo Rad1/Rad10 es necesario para la formación de delecciones tanto dependientes como independientes de *RAD52* cuando el corte se produce en la secuencia de DNA heterólogo a más de al menos 8 pb del extremo 3' libre de la repetición más cercana. A 8 y 27 pb de la región de homología no se

requiere probablemente la capacidad de eliminar los extremos 3' que no se emparejan durante la recombinación. De acuerdo con estos datos, el doble mutante *rad1 rad52* presenta los niveles de deleciones del mutante simple *rad52* cuando el DSB se produce a 8 y 27 pb de las repeticiones, y un efecto sinérgico respecto a los mutantes simples *rad1* y *rad52* cuando el corte se produce 1.74 y 0.77 kb de las repeticiones.

#### **IV. 1. 3. Importancia del intercambio recíproco, la invasión de cadena sencilla y el realineamiento de cadena sencilla en la formación total de deleciones.**

Nuestro estudio de las deleciones que ocurren de forma espontánea o inducida por cortes sugieren la existencia de al menos dos factores que determinan la contribución de cada uno de los mecanismos de recombinación propuestos en la formación de deleciones. Por un lado está la proteína *Rad52p* y por otro la iniciación de la recombinación.

Es importante indicar que la invasión de cadena sencilla requiere que la degradación exonucleolítica 5->3' que se produce tras el DSB llegue tan sólo a una de las repeticiones y exponga un extremo 3' libre homólogo, mientras que el SSA requiere que la degradación exonucleolítica exponga las dos cadenas complementarias. El grupo de Haber ha mostrado que la degradación exonucleolítica tras un DSB inducido por *HO* es mayor en estirpes *rad52* (White y Haber 1990; Sugawara y Haber 1992), lo que sugiere que la proteína *Rad52p* previene una degradación exonucleolítica excesiva. Por otro lado, un complejo proteico dependiente de *Rad52p*, en el que podría estar *Rad51p*, con quien se ha observado que *Rad52* interactúa, podría catalizar el intercambio y apareamiento de cadenas necesario para el proceso de invasión de cadena sencilla, como se propone en el modelo de reparación de DSBs. De acuerdo con estos elementos, la falta de *Rad52p* favorecería el mecanismo de SSA en relación con la invasión de cadena sencilla. En este sentido, Fishman-Lovell *et al.* (1992) han observado que las conversiones génicas (que compartirían con la invasión de cadena los primeros pasos dependientes de *RAD52*) se ven favorecidas en relación a las deleciones inducidas por corte con *HO* en una de las repeticiones y procesadas por SSA a medida que las repeticiones se alejan.

Un segundo factor determinante en la regulación de los procesos que producen las deleciones es la localización del suceso de iniciación de la recombinación. Tanto la invasión de cadena sencilla como el SSA pueden iniciarse en la secuencia intermedia o en la secuencia repetida, a diferencia del intercambio recíproco que sólo puede iniciarse en la región homóloga. Teóricamente, mientras más asimétrica respecto a las repeticiones sea el punto de

iniciación en la secuencia intermedia, más favorecido estará el mecanismo de invasión de cadena sencilla respecto al de SSA, ya que la degradación exonucleolítica expondrá antes un extremo 3' libre homólogo que las dos cadenas complementarias. En este sentido, Fishman-Lovell y Haber (1992) han mostrado que el DSB se procesa hacia ambos lados. De acuerdo con este argumento, hemos observado que las deleciones son mucho más dependientes de *RAD52* cuando el DSB en la región intermedia se produce asimétrico (LY-Sall) que cuando se produce simétrico respecto de las repeticiones (LY-Smal) (26 frente a 90%, respectivamente).

Estos factores pueden explicar la diferente dependencia de *RAD52* como una característica específica de cada sistema. Es necesario conocer, sin embargo, qué factores determinan la localización del suceso de iniciación.

#### **IV. 2. DELECIONES ESTIMULADAS POR LA MUTACION *hpr1***

##### **IV. 2. 1. Las deleciones estimuladas por *hpr1* dependen de la elongación de determinadas regiones de la secuencia intermedia**

En primer lugar, mediante el análisis de una serie de sistemas de repeticiones directas que sólo difieren en la secuencia intermedia hemos mostrado que la estimulación de las deleciones por la mutación *hpr1* no es general, sino específico de cada sistema de repeticiones directas. Este dato confirma la hipótesis de Santos-Rosa y Aguilera (1994), según la cual el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* no debería ser en todas las regiones cromosómicas. El fenotipo hiper-recombinante (>30 veces) o no hiper-recombinante (2-3 veces) de *hpr1* no depende ni de la secuencia primaria de DNA ni del tamaño de la secuencia intermedia, sino de la elongación de la transcripción. Todos los sistemas estudiados son transcritos desde el mismo promotor de *LEU2* situado fuera del sistema de repeticiones. Sin embargo, una característica exclusiva de los sistemas hiper-recombinantes es que presentan transcritos iniciados en el promotor de *LEU2* que elongan a través de determinadas secuencias de la región intermedia. Los sistemas que no presentan el fenotipo de hiper-recombinación no presentan transcritos que elongen a través de dichas secuencias, bien porque no están en sus secuencia intermedia o bien porque un promotor fuerte impida que la transcripción progrese. De acuerdo con esta hipótesis, la inserción de un terminador fuerte de la transcripción que impide que los transcritos progresen a través de la región intermedia en un sistema claramente hiper-recombinante elimina totalmente el fenotipo de hiper-recombinación. Por tanto, el fenotipo de hiper-recombinación depende de la transcripción de determinadas secuencias de la región intermedia.

La segunda evidencia clara de la asociación de la hiper-recombinación a la elongación de la transcripción es la disminución de los niveles de los transcritos en los sistemas hiper-recombinantes en estirpes *hpr1*. Mientras que los niveles de transcritos son similares en estirpes silvestre y *hpr1* en los sistemas no hiper-recombinantes, hay un descenso de 3 veces en estirpes *hpr1* en todos los sistemas hiper-recombinantes. Esta regla no tiene excepción en ninguno de los sistemas estudiados. Así, incluso en los pocos casos de sistemas no hiper-recombinantes en los que los transcritos progresan a través de la región intermedia los niveles de esos transcritos son los mismos en estirpes silvestres y *hpr1*. Estos datos indican claramente que la progresión de la transcripción por determinadas secuencias en estirpes *hpr1* está asociada a una disminución en los niveles de los transcritos y a una alta frecuencia de recombinación.

En principio, la disminución de los niveles de transcripción en los sistemas hiper-recombinantes en estirpes *hpr1* podría estar relacionado con el fenotipo de falta de activación de la transcripción sugerido por diferentes grupos para explicar la falta de transcripción producida por la mutación *hpr1* (Fan y Klein 1994; Zhu et al. 1995). Sin embargo, la expresión del promotor *LEU2* es independiente de *HPR1* (ver *LEU2* endógeno), y nuestros datos sobre deleciones espontáneas indican que las deleciones no pueden iniciarse fuera del sistema de repeticiones.

Nuestros resultados sugieren que el descenso en los niveles de transcritos en los sistemas hiper-recombinantes en estirpes *hpr1* son consecuencia de un defecto en la elongación de la transcripción. Este defecto podría estar reduciendo la tasa de transcripción o generando transcritos abortivos que se pierden como consecuencia de la alta inestabilidad de los mRNA cuando terminan en señales de terminación no naturales. De acuerdo con esto, hemos observado una correlación entre los niveles más altos de transcritos y la terminación en terminadores naturales de levadura. Esta asociación es independiente del fenotipo de hiper-recombinación. De hecho, nuestros resultados sugieren que la terminación no es el factor que está determinando los fenotipos de hiper-recombinación y de transcripción, ya que los transcritos terminan en los mismos terminadores en los sistemas LYΔP y LNA, que presentan diferentes patrones de transcripción y de recombinación.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que el fenotipo de hiper-recombinación y la reducción asociada en los niveles de transcritos en estirpes *hpr1* son consecuencia de una elongación defectiva a lo largo de determinadas secuencias de la región intermedia. Este defecto en elongación no es general en todas las regiones de DNA. Sólo la elongación a través de determinadas secuencias es alterada de forma que produce niveles más bajos de transcritos y un fenotipo asociado de hiper-recombinación. Aunque nuestros estudios sugieren

apuntan a una cadena de regiones de *Amp*, *Tet* o *URA3* como posibles secuencias que contengan sitios que afecten a la progresión de la polimerasa II de RNA en ausencia de Hpr1p, es necesario un análisis molecular más detallado.

#### **IV. II. 2. El papel de Hpr1p en deleciones no está mediado por la activación de la transcripción**

Existen numerosos datos que relacionan Hpr1p con transcripción y con recombinación (ver INTRODUCCION). Sin embargo, uno de los aspectos más interesantes es conocer cual es la relación entre el defecto de *hpr1* en la activación de numerosos genes no relacionados y el fenotipo de hiper-recombinación. En este sentido, se ha descrito recientemente que *hpr1* estimula 10 veces las deleciones entre dos repeticiones directas del gen *GAL10* cuando se activa la transcripción (Fan *et al.* 1995). Sin embargo, el sistema de repeticiones empleado (Thomas y Rothstein 1989) no permite distinguir entre un defecto en la activación de la transcripción del promotor *GAL10* o un defecto en elongación como posibles causas del incremento en la frecuencia de deleciones. De hecho, el incremento observado en estirpes silvestres por Thomas y Rothstein (1989) en la frecuencia de deleciones como consecuencia de la activación de la transcripción correlaciona con un incremento en la expresión de una región de la secuencia intermedia a partir del promotor divergente *GAL1* de un de las repeticiones.

Si el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* estuviera asociado a un posible defecto de la mutación en la activación transcripcional, deberíamos esperar un fuerte incremento en la frecuencia de deleciones asociado a la estimulación de la transcripción de promotores dependientes de *HPR1* flanqueados por repeticiones directas. Sin embargo, ni el promotor *GAL1,10* ni el promotor *PHO5*, ambos dependientes de *HPR1*, como se ha observado en fusiones con *lacZ* (Fan y Klein 1994, Zhu *et al.* 1995; este estudio), estimulan considerablemente las deleciones entre repeticiones en condiciones de activación de la transcripción. Por tanto, el posible papel de Hpr1p como activador de la transcripción no está relacionado con el fenotipo de hiper-recombinación.

#### **IV. 2. 3. La mutación *hpr1* no afecta a la estructura de la cromatina ni al grado de superhelicidad de plásmidos**

Recientemente, Zhu *et al.* (1995) han sugerido que los fenotipos de hiper-recombinación y de falta de activación de la transcripción de *hpr1* puedan estar asociados a un papel de Hpr1p sobre la estructura de la cromatina. De hecho, hay datos que relacionan *HPR1* con las topoisomerasas (ver INTRODUCCION). Con objeto de estudiar esta hipótesis hemos analizado la estructura general de la cromatina y la estructura de las regiones reguladoras de los genes *GAL1* y *MMTV*

dependientes de *HPR1*. No hemos observado ninguna modificación en el posicionamiento de los nucleosomas o en el patrón de sensibilidad a DNasal asociados a la mutación *hpr1*. Por tanto, los fenotipos de *hpr1* en recombinación y transcripción no son consecuencia de un reordenamiento de la cromatina.

Dado que se ha sugerido que Hpr1p sea un activador de la transcripción, un posible efecto en la estructura de la cromatina podría estar asociado a la activación de la transcripción. Tanto en el promotor de GAL1 como en el de MMTV esta activación está asociada a modificaciones en la estructura de las regiones reguladoras. Nuestros datos muestran que mientras *hpr1* no afecta a los cambios en el patrón de sensibilidad a MNasa descritos en GAL1, elimina los sitios de hipersensibilidad a DNasal asociados a la activación del promotor de MMTV. Aunque no podemos descartar un efecto diferencial de *hpr1* sobre estos promotores, este diferente comportamiento puede estar asociado a las modificaciones que cada tipo de nucleasa detecta. En este sentido estamos analizando un posible efecto de *hpr1* sobre el patrón de sensibilidad a DNasal del promotor de GAL1.

Nuestros datos sugieren que el fenotipo de recombinación de *hpr1* está asociado a un defecto en la elongación de la transcripción de determinadas regiones de la secuencia intermedia, además, datos preliminares de nuestro grupo apuntan a que el defecto en transcripción descrito para *hpr1* es consecuencia también de un defecto en elongación. De acuerdo con estos datos, las modificaciones observadas en la región reguladora de MMTV pueden ser consecuencia de un papel adicional de Hpr1p en activación de la transcripción, como originalmente se ha sugerido, o de una conexión entre los procesos de elongación/terminación e iniciación de la transcripción, similar a la descrita por Dieci y Sentenac (1996) en la transcripción dependiente de la polimerasa III de RNA.

Por último, hemos observado que *hpr1* no afecta al grado de superhelicidad de un plásmido centromérico, incluso aunque el plásmido presente un sistema de recombinación sensible a *hpr1*, lo que sugiere que Hpr1p carece de actividad topoisomerasa.

#### **IV. 2. 4. Iniciación de las deleciones estimuladas por *hpr1***

Como hemos indicado, el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* no está asociado ni a la activación de la transcripción ni a modificaciones en la estructura de la cromatina. La estimulación de las deleciones en estirpes *hpr1* es consecuencia de la elongación defectiva de determinadas secuencias de DNA de la región entre las repeticiones directas; como consecuencia de esta elongación

deficiente, el fenotipo de hiper-recombinación está asociado a un descenso en los niveles de los transcritos.

La estimulación de las deleciones en estirpes *hpr1* es diferente de otros sistemas previamente descritos de estimulación de la recombinación por la transcripción (ver INTRODUCCION). En esos casos, se ha sugerido que la estimulación de las deleciones es consecuencia de efectos indirectos de la transcripción sobre la estructura de la cromatina, tales como un desenrollamiento de las cadenas, la acumulación de dominios locales de superenrollamiento o la eliminación de un posible papel represor de la cromatina en la recombinación. En los casos mejor caracterizados, como son la estimulación de las deleciones por la secuencia *HOT* (Voelkel-Meiman et al. 1987; Steewart y Roeder 1989) o por la activación de la transcripción de un sistema de repeticiones basadas en el gen *GAL10* (Thomas y Rothstein 1989) hay una asociación entre elongación y recombinación. De hecho, la inserción de un terminador que impide la elongación de los transcritos a través del sistema de repeticiones elimina la estimulación de las deleciones dependiente de *HOT1*. Sin embargo, en estos sistemas hay una correlación entre la fuerza del promotor y los niveles de deleciones, mientras que en los sistemas analizados en este estudio no existe correlación entre los niveles de transcritos y el fenotipo de recombinación de los sistemas. Además, la estimulación de las deleciones está asociada a una disminución en los niveles de transcrito en los sistemas hiper-recombinantes en estirpes *hpr1*.

Hemos considerado dos posibilidades para explicar la estimulación de las deleciones por *hpr1*, ambas asociadas a un complejo de la polimerasa II de RNA que requiere Hpr1p para salvar determinados obstáculos durante el proceso de elongación. Una posibilidad es que este complejo bloqueado o frenado en determinadas zonas genere lesiones recombinogénicas, bien creando sitios de hipersensibilidad anucleasa o bien al ser reparado. Cuando tales lesiones se producen en las repeticiones o en la secuencia intermedia pueden ser eficientemente reparadas por los mecanismos no conservativos de invasión de cadena sencilla o SSA.

Otra alternativa es que este complejo bloqueado interfiera con la maquinaria de replicación. Esta posibilidad ha sido propuesta para explicar deleciones ilegítimas en *E. coli*, que son estimuladas cuando la transcripción y la replicación en la región donde se producen las deleciones están entretadas (Vilette et al. 1995). En *S. cerevisiae*, se ha observado recientemente que las orquillas de replicación hacen una pausa en una región de 500 pb cuando hay una colisión entre las maquinarias de transcripción y replicación (Deshpande y Newlon 1996). Estos resultados sugieren que un posible bloqueo del holoenzima en estirpes *hpr1*

estimularía este tipo de colisiones, lo que generaría extremos libres recombinogénicos en las cadenas cuya síntesis se ha bloqueado.

## **V. CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

1.- Las deleciones entre repeticiones directas se producen por tres tipos de mecanismos diferentes. Un mecanismo conservativo de recombinación recíproca, dependiente de *RAD52* y responsable de las inversiones que se producen entre repeticiones invertidas, y dos mecanismos no conservativos específicos de la formación de deleciones, uno independiente y otro dependiente de *RAD52*, que presumiblemente son realineamiento de cadena sencilla (SSA) e invasión de cadena sencilla, respectivamente.

2.- Los procesos no conservativos de invasión de cadena sencilla y de SSA pueden iniciarse tanto en las repeticiones (homólogas) como en la secuencia intermedia (no homóloga).

3.- Los procesos no conservativos de invasión de cadena sencilla y de SSA requieren la endonucleasa Rad1/Rad10 cuando el corte que inicia la deleción está alejado de las regiones de homología, y no lo requieren cuando el corte está muy próximo.

4.- La contribución de estos procesos a la formación de deleciones totales parece depender de la proteína Rad52p y de la localización de la iniciación del suceso de recombinación. Por un lado, la falta de la proteína Rad52p eliminaría la ruta de invasión de cadena sencilla y estimularía las deleciones por SSA; por otro lado, mientras más asimétrico se produzca el corte que inicia la deleción más se favorece la ruta de invasión de cadena sencilla.

5.- La diana *FRT* estimula las deleciones cuando está flanqueada por repeticiones directas hasta 1000 veces, en un proceso dependiente de la expresión de la endonucleasa específica de sitio del círculo de 2  $\mu$  (flipasa). Las deleciones se producen, al igual que las deleciones espontáneas o inducidas por DSB, por mecanismos tanto dependientes como independientes de *RAD52*.

6.- La estimulación de las deleciones por la mutación *hpr1* no es general a todos los sistemas de repeticiones directas. El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* depende de la elongación de la transcripción a lo largo de determinadas secuencias de la región intermedia y está asociado a una disminución en los niveles de dichos transcritos.

7.- El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1* no está asociado ni a la activación de la transcripción ni a modificaciones en la estructura de la cromatina.

8.- Proponemos que las deleciones estimuladas por *hpr1* se producen por un bloqueo o parada de la maquinaria de transcripción durante la elongación, que genera extremos recombinogénicos. Cuando este bloqueo se produce entre dos reeticiones directas es eficientement reparado mediante una deleción.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, A.** (1995). Genetic evidence for different *RAD52*-dependent intrachromosomal recombination pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **25**: 298-305.
- Aguilera, A., and H. L. Klein** (1988). Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics* **119**:779-790.
- Aguilera, A., and H. L. Klein** (1989). Yeast intrachromosomal recombination: long gene conversion tracts are preferentially associated with reciprocal exchange and require the *RAD1* and *RAD3* gene products. *Genetics* **123**:683-694.
- Aguilera, A., and H. L. Klein** (1989). Genetic and molecular analysis of recombination events in *Saccharomyces cerevisiae* occurring in presence of the hyper-recombination mutation *hpr1*. *Genetics* **112**: 503-517.
- Aguilera, A., and H. L. Klein.** (1990). *HPR1*, a novel yeast gene that prevents intrachromosomal excision recombination, shows carboxy-terminal homology to the *Saccharomyces cerevisiae* *TOP1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1439-1451.
- Aguilera, A., and H. L. Klein.** (1994). Hyperrecombination mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Genetics.* **3**:107-130.
- Ahn, B. Y., and D. Livingston** (1986). Mitotic gene conversion length, coconversion patterns, and the incidence of reciprocal recombination in a *Saccharomyces cerevisiae* plasmid system. *Mol. Cel. Biol.* **6**:3685-3693.
- Andreadis, A., Y.-P. Hsu, M. Hermodson, G. Kohlhaw, and P. Schimmel** (1984). Yeast *LEU2* Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product. *J. Biol. Quemis.* **13**:8059-8062.
- Bailly, V., C. H. Sommers, P. Sung, and L. Prakash** (1992) Specific complex formation between proteins encoded by the yeast DNA repair and recombination genes *RAD1* and *RAD10*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8273-8277.
- Bailis, A. M., L. Arthur, and R. Rothstein** (1992). Genome rearrangement in *top3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* requires a functional *RAD1* excision repair gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4988-4993.
- Baltimore, D.** (1981). Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. *Cell.* **24**:592-594.

- Bardwell, L., A. J. Cooper, and E. C. Friedberg (1992).** Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins *RAD1* and *RAD10* in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3041-3049.
- Bardwell, A. J., L. Bardwell, A. E. Tomkinson, and E. C. Friedberg (1994).** Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. *Science* **265**:2082-2085.
- Beato, M., R. Candau, S. Chávez, C. Mows, and M. Truss (1996).** Role of a positioned nucleosome in constitutive repression and hormone induction of the MMTV promoter. "Nuclear organization, chromatin structure and gene expression". (en prensa).
- Bishop, D. K., D. Park, L. Xu, and N. Kleckner (1992).** *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* RecA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**:439-456.
- Bishop, D. K. (1994).** RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* **79**:1081-1092.
- Biu, X., and F. L. Liu (1994).** *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* **235**:414-423.
- Bolivar, F., and K. Backman (1979).** Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**:245-267.
- Bollag, R. J., A. Waldman, and R. M. Liskay (1989).** Homologous recombination in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* **23**:199-225.
- Broach, J. ., and F. C. Volkert (1991).** Circular DNA plasmids of yeast, p. 297-332. In J. R. Broach, E. W. Jones, and J. R. Pringle (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Genome*, vol1. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Calderon, I L., and E. Cerda-Olmedo (1983).** Induction by N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmic mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **108**:133-146.
- Candau, R., S. Chávez, and M. Beato (1996).** The hormone responsive region of mouse mammary tumor virus positions a nucleosome and precludes access of nuclear factor I to the promoter. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (En prensa).
- Cao, L., A. Eric, and N. Kleckner (1990).** A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* **61**:1089-1101.
- Chávez, S., R. Candau, and M. Beato (1995).** Constitutive repression and nuclear factor I-dependent hormone activation of the mouse mammary tumor virus promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:6987-6998.

- Christman, M.F., F. S. Dietrich and G. R. Fink (1988).** Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* **55**: 413-425.
- Clewell, D., and D. Helinski (1970).** Properties of a supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. *Biochemistry* **9**:4428-4440.
- Connolly, B., C. A. Parsons, F. E. Benson, H. J. Dunderdale, G. J. Sharples, R. G. Lloyd, and S. C. West (1991).** Resolution of Holliday junctions *in vitro* requires the *Escherichia coli* *ruvC* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6063-6067.
- Cùte, J., J. Quinn, J. L. Workmann, and C. L. Peterson (1994).** Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**:53-59.
- Deshpande, A. M., and C. S. Newlon (1996).** DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* **272**:1030-1033.
- Dornfeld, K. J., and D. M. Livingston (1992).** Plasmid recombination in a *rad52* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **131**:261-276.
- Dieci, G., and A. Sentenac (1996).** Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* **84**:245-252.
- Drapkin, R., A. Sancar and D. Reinberg. (1994).** Where transcription meets repair. *Cell* **77**: 9-12.
- Drögue, P. (1994).** Protein tracking-induced supercoiling of DNA: a tool to regulate DNA transactions *in vivo*?. *BioEssays* **2**: 9199.
- Dul, J. L., and H. Drexler (1988).** Transcription stimulates recombination II specialized transduction of *Escherichia coli* by  $\lambda$ *trp* phages. *Virology* **162**:466-470.
- Dul, J. L., and H. Drexler (1988).** Transcription stimulates recombination II generalised transduction of *Escherichia coli* by phages T1 and T4. *Virology* **162**:471-477.
- Dunderdale, H. J., and S. C. West (1994).** Recombination genes and proteins. *Curr. Op. Genet. Devel.* **4**:221-228)
- Egel, R. (1981).** Intergenic conversion and reiterated genes. *Nature*. **290**:191-192.
- Eggleston, A. K., and S. C. West. (1996).** Exchanging partners: recombination in *E. coli*. *TIG* **12**: 20-26.
- Esposito, M. S., R. M. Ramirez, and C. V. Bruschi (1994).** Recombinators, recombinases and recombination genes of yeasts. *Curr. Genet.* **25**:1-11.
- Esposito, M. S., and J. E. Wagstaff (1981).** Mechanisms of mitotic recombination, pp. 341-370 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* :

Life Cycle and Inheritance, edited by J. N. STRATHERN, E. W. JONES and J. R. BROACH. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Fan, Q.-Q., and T. D. Petes** (1996). Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the *HIS4* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2037-2043.

**Fan, H.-Y., and H. L. Klein** (1994). Characterization of mutations that suppress the temperature-sensitive growth of the *hpr1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **137**:1-12.

**Fan, H.-Y., K. H. Cheng, and H. L. Klein** (1996). Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1Δ* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**:749-759.

**Fedor, M. J., and R. D. Komberg** (1989). Upstream activation sequence-dependent alteration of chromatin structure and transcription activation of the yeast *GAL1-GAL10* genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**:1721-1732.

**Feinberg, A. P., and B. Vogelstein** (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**:266-267.

**Feinstein, S. O., and K. B. Low** (1986). Hyper-recombination recipient strains in bacterial conjugation. *Genetics* **113**:13-33.

**Fishman-Lobell, J., and J. E. Haber** (1992). Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene *Rad1*. *Science*. **258**:480-484.

**Fishman-Lobell, J., N. Rudin, and J. E. Haber** (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1292-1303.

**Friedberg, E. C., W. Siede, and A. J. Cooper** (1991). Cellular responses to DNA damage in yeast. Eds. Broach, J. R., J. R. Pringle, and E. W. Jones. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. pp. 147-192.

**Fogel, S., R. K. Mortimer, and K. Lusnak** (1981). Mechanisms of meiotic gene conversion, or "wanderings on a foreign strand", pp.289-339 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces : Life cycle and Inheritance*, edited by J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Fu, Y.-H., D. P. A. Khul, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, S. Richards, A. J. M. H. Verkerk, J. J. A. Holden, R. G. F. Fenwick, Jr., S. T. Warren, B. A. Oostra, D. L. Nelson, and C. T. Caskey** (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetics instability: Resolution of the Sherman Paradox. *Cell* **67**:1047-1058.

- Fukuchi, K., G. M. Martin, and R. J. Monnat, Jr.** (1989). Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5893-5897.
- Futcher, A. B.** (1986). Copy number amplification of the 2 $\mu$ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Theor. Biol.* **119**:197-204.
- Game, J. C.** (1993). Pulsed-field gel analysis of the pattern of DNA double-strand breaks in the *Saccharomyces* genome during meiosis. *Devel. Genet.* **13**: 485-497.
- Gottlieb, S., R. E. Esposito** (1989). A new role for yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**: 771-776.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Haber, J. E.** (1983). Mating type genes of *Saccharomyces cerevisiae*, pp.559-650. En J. A. Shapiro (Eds), *Mobile genetic elements*. Academic Press, Inc., NY.
- Hartwell, L. H. and D. Smith** (1985). Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. *Genetics* **110**:381-395.
- Hastings, P. J. and S. M. Rosemberg** (1992). Gene conversion. En: Roit, I. M., and P. J. Devels (Eds). *Encyclopedia of immunology*. Saunders Scientific Publications, London, 602-605.
- Hidehito, K. and E. B. Kmiec** (1994). Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1949-1955.
- Hoffman, C. S., and F. Winston** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272.
- Hollyday, R.** (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**: 282-304.
- Ikeda, H., and T. Matsumoto** (1979). Transcription promotes recA-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4571-4575.
- Imbalzano, A. N., H. Kwon, M. R. Green, and R. E. Kingston** (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* **370**:481-485.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, and M. Perucho** (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. **363**:558-561.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura** (1983). Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.

- Ivanov, E. L., and J. E. Haber** (1995). *RAD1* and *RAD10*, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:2245-2251.
- Ivanov, E. L., N. Sugawara, J. Fishman-Lovell, and J. E. Haber** (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**:693-704.
- Jackson, J. A., and G. R. Fink** (1981). Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast. *Nature*. **292**:306-311.
- Jeggo, P. A., G. E. Taccioli, and S. P. Jackson** (1995). Menage à trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *BioEssays* **17**:949-957.
- Jinks-Robertson, S., and T. D. Petes** (1986). Chromosomal translocations generated by high-frequency meiotic recombination between repeated yeast genes. *Genetics* **114**:731-752.
- Jinks-Robertson, S., M. Michelitch, and S. Ramcharan** (1993). Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3937-3950.
- Kans, J. A., and R. K. Mortimer** (1991). Nucleotide sequence of *RAD57* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **105**:139-140.
- Kassavatis, G. A., and E. P. Geiduschek** (1993). *Science* **259**:944-945.
- Keil, R. L., and G. S. Roeder** (1984). *cis*-Acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell* **57**:377-386.
- Keil, R. L. and A. D. McWilliams** (1993). A gene with specific and global effects on recombination of sequences from tandemly repeated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **135**: 711-718.
- Klar, R. L., J. N. Strathern, and J. A. Abraham** (1984). Involvement of double-strand chromosomal breaks for matyng-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**:77-88.
- Kim, R. A., and J. C. Wang** (1989). Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **208**:257-267.
- Klein, H. L.** (1984). Lack of association between intrachromosomal gene conversion and reciprocal exchange. *Nature*. **310**:748-753.
- Klein, H. L.** (1988). Different types of recombination events are controlled by the *RAD1* and *RAD52* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **120**:367-377.
- Klein, H. L., and T. D. Petes** (1981). Intrachromosomal gene conversion in yeast. *Nature*. **289**: 144-148.
- Koleske, A. J., S. buratowski, M. Nonet, and R. A. Young** (1992). A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID. *Cell* **69**: 883-894.

- Koleske, A. J., and R. A. Young** (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* **368**:466-469.
- Koleske, A. J., and R. A. Young** (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *TIBS* **20**: 113-116.
- Konrad, E. B.** (1977). Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced recombination between chromosome duplications. *J. Bacteriol.* **130**:167-172.
- Kotani, H., and E. B. Kmiec** (1994). Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1949-1955.
- Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder and W. M. Rehauer** (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 401-465.
- Kunkel, T. A.** (1993). Slippery DNA and diseases. *Nature* **365**:207-208.
- Kuzminov, A.** (1995). Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 373-384.
- Kwon, H., A. N. Imbazano, P. A. Khavari, R. E. Kingston, and M. R. Green** (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* **370**:477-481.
- Lanfrancone, L., G. Pelicci, and P. G. Pelicci** (1994). Cancer Genetics. *Curr. Op. Gen. Devel.* **4**:109-119.
- Larionov, V., N. Kouprina, M. Eldarov, E. Perkins, G. Porter, and M. A. Resnick** (1994). Transformation-associated recombination between diverged and homologous DNA repeats is induced by strand breaks. *Yeast* **10**:93-104.
- Lea, D. E., and C. A. Coulson** (1948). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* **49**:264-284.
- Li, Y., S. Bjorklund, Y. W. Jiang, Y-J. Kim, W. S. Lane, D. J. Stillman, and R. D. Konberg** (1995). Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10864-10868.
- Lichten, M., R. H. Borts, and J. E. Haber** (1987). Meiotic gene conversion and crossing over between dispersed homologous sequences occurs frequently in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **115**: 233-246.
- Lichten, M., and J. E. Haber** (1989). Position effects in ectopic and allelic mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **123**:261-268.
- Liefshitz, B., A. Parket, R. Maya and M. Kupiec** (1995). The role of DNA repair genes in recombination between repeated sequences in yeast. *Genetics* **140**: 1199-1211.

- Lin, H., K. Skerle, and N. Sternberg** (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. cell. Biol.* **4**:1020-1034.
- Ling-wen, Y., and R. L. Keil** (1990). Distance-independence of mitotic intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 263-273.
- Liskay, R. M., and J. L. Stachelek** (1983). Evidence for intrachromosomal gene conversion in cultured mouse cells. *Cell* **35**:157-167.
- Lovett, S. T., P. T. Drapkin, V. A. Sutura, Jr., and T. J. Gluckman-Peskind** (1993). A sister-strand exchange mechanism for recA-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics*. **135**: 631-642.
- Lovett, S. T., T. J. Gluckman, P. J. Simon, V. A. Sutura, Jr and P. T. Drapkin** (1994). Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a recA-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol. Gen. Genet.* **245**:294-300.
- Lovett, S. T.** (1994). Sequence of the *RAD55* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: similarity of RAD55 to prokaryotic RecA and other RecA-like proteins. *Gene* **142**:103-106.
- Lutzker, S., P. Rothman, R. Pollock, R. Coffman, and F. W. Alt** (1988). Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line  $\gamma$ lg 2b transcripts: Evidence for directed heavy chain class-switching. *Cell* **53**:177-184.
- Malagón, F., and A. Aguilera** (1996). Differential intrachromosomal hyper-recombination phenotype of *spt4* and *spt6* mutants of *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* (en prensa).
- Maldonado, E., R. Shiekhattar, M. Sheldon, H. Cho, R. Drapkin, P. Rickert, E. Lees, C. W. Anderson, S. Linn, and D. Reinberg** (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**:86-89.
- Malone, R. E., and R. E. Esposito** (1980). The *RAD52* gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:503-507.
- Malone, E. A., J. S. Fassler, and F. Winston** (1993). Molecular and genetic characterization of *SPT4*, a gene important for transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **237**:449-459.
- Maloney, D. H., and S. Fogel** (1987). Gene conversion, unequal crossing-over and mispairing at a non-tandem duplication during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **12**:1-7.
- Maryon, E., and D. Carroll** (1991). Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus laevis* oocytes: evidence for a

nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3278-3287.

**Melamed, C., Y. Nevo, and M. Kupiec** (1992). Involvement of cDNA in homologous recombination between Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1613-1620.

**Meyn, M. S.** (1993). High spontaneous intrachromosomal recombination rates in Ataxia-Telangiectasia. *Science.* **260**:1327-1330.

**Mezard, C., and A. Nicolas** (1994). Homologous, homeologous, and illegitimate repair of double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and a rad52 mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* **13**:3937-3950.

**Murray, A. W., and J. W. Szostak** (1983). Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* **34**:961-970.

**Nasmyth, K. A., K. Tatchell, B. D. Hall, C. Astell, and M. Smith** (1980). Physical analysis of mating type loci en *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **45**: 961-981.

**Nickoloff, J. A** (1992). Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**:53-115318.

**Nickoloff, J. A., J. D. Singer, M. F. Hoekstra, and F. Heffron** (1989). Double-strand breaks stimulate alternative mechanisms of recombination repair. *J. Mol. Biol.* **27**:527-541.

**Nicolas, A., D. Treco, N. P. Schultes, and J. W. Szostak** (1989). An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **338**:35-39.

**O'Brien, T., S. Hardin, A. Greenleaf, and J. T. Lis** (1994). Phosphorilation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* **370**:75-77.

**Ogawa, T., Y. Xiong, A. Shinohara, and E. H. Egelman** (1993). Similarity of the yeast *RAD51* filament to the bacterial RecA filament. *Science* **259**:1896-1899.

**Ohta, K., T. Shibata, and A. Nicolas** (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J.* **13**:5754-5763.

**Orr-Weaver, T. L., and J. W. Szostak** (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4417-4421.

**Orr-Weaver, T.L., A. Nicholas and J. W. szostak** (1988). Gene conversion adjacent to regions of double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **8**:5292-5298.

**Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak and R. J. Rothstein** (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6354-6358.

- Ozenberger, B. A., and G. S. Roeder** (1991). A unique pathway of double strand break repair operates in tandemly repeated genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1222-1231.
- Petes, T. D., R. E. Malone, and L. S. Symington** (1991). Recombination in yeast, p. 407-521. In J. R. Broach, E. W. Jones, and J. R. Pringle (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Genome*, vol1. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Plessis, A., A. Perrin, J. E. Haber and B. Dujon** (1992). Site-specific recombination determined by *I-SceI*, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* **130**: 451-460.
- Piruat, J. I., and A. Aguilera** (1996). Mutations in the *SRB2* general transcription factor suppress *hpr1*-induced recombination and show defects in DNA repair. *Genetics* (en prensa).
- Prakash, L., and S. Prakash** (1977). Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **86**: 33-55.
- Ramdas, J., E. Mythili, and K. Muniyappa** (1991). Nucleosomes on linear duplex DNA allow homologous pairing but prevent strand exchange promoted by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1344-1348.
- Rattray, A. J., and L. S. Symington** (1995). Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **139**: 45-56.
- Ray, A., I. Siddiqi, A. L. Kolodkin and F. W. Stahl** (1988). Intrachromosomal gene conversion induced by a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **201**: 247-260.
- Roeder, G. S.** (1990). Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *TIG* **6**: 385-389.
- Ross-MacDonald, P., and G. S. Roeder** (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* **79**:1069-1080.
- Rothstein, R., C. Helms, and N. Roseberg** (1987). Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between  $\delta$  sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1198-1207.
- Rudin, N., and J. E. Haber** (1988). Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol. Cell. Biol.* **8**:3918-3928.
- Rudin, N., E. Sugarman, and J. E. Haber** (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **122**:519-534.



- Santos-Rosa, H., and A. Aguilera (1994).** Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae hpr1Δ* strains. *Mol. Gen. Genet.* **16**: 339-346.
- Santos-Rosa, H., and A. Aguilera (1995).** Isolation and genetic analysis of extragenic suppressors of the hyper-deletion phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpr1Δ* mutation. *Genetics* **139**: 57-66.
- Santos-Rosa, H., Clever, B., W-D. Heyer, and A. Aguilera (1996).** The yeast *HRS1* gene encodes a polyglutamine-rich nuclear protein required for spontaneous and *hpr1*-induced deletions between direct repeats. *Genetics* **142**:705-716.
- Saparbaev, M., L. Prakash, and S. Prakash (1996).** Requirement of mismatch repair genes *MSH2* y *MSH3* in the *RAD1-RAD10* pathway of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**:727-736.
- Schiestl, R. H., and R. D. Gietz (1989).** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**:339-346.
- Schiestl, R. H., S. Igarashi, P. J. Hastings (1988).** Analysis of the mechanism for reversion of a disrupted gene. *Genetics* **119**:237-247.
- Schiestl, R.H., and S. Prakash (1988).** *RAD1*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination. *Mol. Cell. Biol.* **8**:3619-3626.
- Schiestl, R.H., and S. Prakash (1990).** *RAD10*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*S, is involved in the *RAD1* pathway of mitotic recombination. *Mol. Cell. Biol.* **10**:2485-2491.
- Schofield, M. A., R. Agbunag, M. L. Michaels, J. H. Miller (1992).** Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.* **174**:5168-5170.
- Schwacha, A., and N. Kleckner (1995).** Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* **83**:783-791.
- Schwedler, U., H.-M. Jäck, and M. Wabl (1990).** Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* **345**:452-455.
- Shah, R., R. J. Bennet, and S. C. West (1994).** *Cell* **79**:853-864.
- Sharp, P. A., B. Sugden, and J. Sambrook (1973).** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**:3055-3057.
- Shenkar, R., M. H. Shen, and N. Arnheim (1991).** DNase I-hypersensitive sites and transcription factor-binding motifs within the mouse E beta meiotic recombination hot spot. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1813-1819.

- Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks** (1986). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sikorski, R. S., and P. Hieter** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **122**:19-27.
- Song, W., I. Treich, N. Qian, S. Kuchin, and M. Carlson** (1996). *SSN* genes that affect transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* encode SIN4, ROX3, and SRB proteins associated with RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **16**:115-120.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Stark, W. M., M. R. Boocock, and D. J. Sherratt** (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *TIG.* **8**:432-439.
- Stewart, S. E., and G. S. Roeder** (1989). Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:3464-3472.
- Strathern, J. N., A. J. S. Klar, J. B. Hicks, J. A. Abraham, J. M. Ivy, K. A. Nasmyth, and C. McGill** (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. *Cell* **31**:183-192.
- Strathern, J. N., K. G. Weinstock, D. R. Higgins, and C. McGill.** (1991). A novel recombinator in yeast based on Gene II protein from bacteriophage  $\phi$ 1. *Genetics* **127**:61-73.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzagui, and M. Inouye** (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**:77-84.
- Sugawara, N., and J. E. Haber** (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.* **12**:563-575.
- Sun, H., D. Treco, N. P. Schultes, and J. W. Szostak** (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* **338**:87-90.
- Sun, H., D. Treco, and J. W. Szostak** (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the *ARG4* recombination initiation site. *Cell* **64**:1155-1161.
- Sung, P., I. Prakash, and S. Prakash** (1992). Renaturation of DNA catalysed by yeast DNA repair and recombination protein *RAD10*. *Nature.* **355**:743-745.
- Sung, P.** (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast *RAD51* protein. *Science* **265**:1241-1243.

- Sung, P., and D. L. Roberson** (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* **82**:453-461.
- Swanson, M. S. and F. Winston** (1992). SPT4, SPT5 and SPT6 interactions: effects on transcription and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**:325-336.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl** (1983). The double-strand break repair model for recombination. *Cell* **33**:25-35.
- Takahashi, N. K., K. Yamamoto, Y. Kitamura, S. Q. Luo, H. Yoshikura, and I. Kobayashi** (1992). Nonconservative recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5912-5916.
- The Huntington's disease collaborative research group** (1991). *Cell* **72**:971-983.
- Thibodeau, S. N., G. Bren, and D. Schaid** (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. **260**:816-819.
- Thomas, B. J., and R. Rothstein** (1989a). Elevated recombinational rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**:619-630.
- Thomas, B. J., and R. Rothstein** (1989b). The genetic control of direct repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of *rad52* and *rad1* on mitotic recombination at *GAL10*: a transcriptionally regulated gene. *Genetics*. **123**:725-738.
- Thompson, C. M., A. Koleske, D. M. Chao and R. A. Young** (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding Protein in yeast. *Cell* **73**: 1361-1375.
- Tomkinson, A. E., A. J. Bardwell, I. Bardwell, N. J. tappe, and E. C. Friedberg** (1993). Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded DNA endonuclease. *Nature*. **362**:860-862.
- Vilette, D., S. D. Ehrlich and B. Michel** (1995). Transcription-induced deletions in *Escherichia coli* plasmids. *Mol. Microbiol.* **17**: 493-504.
- Voekel-Meiman, K., R. L. Keil and G. S. Roeder** (1987). Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* **48**: 1071-1079.
- Wagstaff, J. E., S. Klapholz, C. S. Waddell, L. Jensen, and R. E. Esposito** (1985). Meiotic exchange within and between chromosomes requires a common Rec function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3532.
- Wallis, J. W., G. Chrebet, G. Brodsky M. Rolge and R. Rothstein** (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419.

- White, M. A., M. Dominska, and T. D. Petes** (1993). Transcription factors are required for the meiotic recombination hotspot at the *HIS4* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6621-6625.
- White, C. I., and J. E. Haber** (1990). Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **9**:663-673.
- Whitehouse, H.** (1982). Genetic recombination. John Wiley and Sons Ltd, London.
- Willis, K. K., and H. L. Klein** (1987). Intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: Reciprocal exchange in an inverted repeat and associated gene conversion. *Genetics*. **117**:633-643.
- Wilson, C. J., D. M. Chao, A. M. Imbalzano, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston, and R. A. Young** (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**: 235-244.
- Winston, F. and M. Carlson** (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *TIG* **8**:387-391.
- Wolffe, A. P.** (1994). Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *TIBS*. **19**:240-244.
- Wu, T.-C., and M. Lichten** (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**:515-518.
- Yuan, L-W., and R. L. Keil** (1990). Distance-independence of mitotic intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **124**:263-273.
- Zaret, K. S., and K. R. Yamamoto** (1984). Reversible and persistent changes in chromatin structure accompanying activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. *Cell* **38**:29-38.
- Zawel, L., and D. Reinberg** (1995). Common themes in assembly of eukaryotic transcription complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **64**:533-561.
- Zenvirth, D., T. Arbel, A. Sherman, M. Goldway, S. Klein, and G. Simchen** (1992). Multiple sites for double-strand breaks in whole meiotic chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**: 3441-3447.
- Zeig, J., V. F. Maples, and S. R. Kushner** (1978). Recombination levels of *Escherichia coli* K12 mutants defective in various replication, recombination, or repair genes. *J. Bacteriol.* **134**:958-966.
- Zhu, Y., C. L. Peterson and M. F. Christman** (1995). *HPR1* encodes a global positive regulator of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1698-1708.

Félix Prado Velasco  
Control genético de las deleciones entre sucesional  
repetidas directas en Saccharomyces cerevisiae

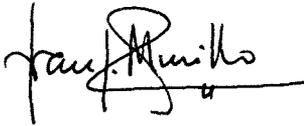
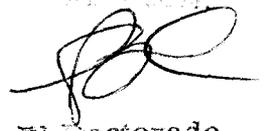
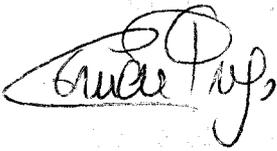
unanimidad

Apto "cum laude", por

12

septiembre

96



1 Ca a c e r v i s .

