

R-16252



**RELACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN CON LA RECOMBINACIÓN
ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS EN *S. cerevisiae***

72

202

01 ABR. 1998

Piruat Palomo

TD

Tesis Doctoral

José Ignacio Piruat Palomo

Universidad de Sevilla
1998

TD

JIP



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

T.D. 390

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral RELACION DE LA TRANSCRIPCION CON LA RECOMBINACION ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS EN *S. cerevisiae* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

JOSE IGNACIO
PIRUAT PALOMO

Sevilla, a 30 de JUNIO de 1998

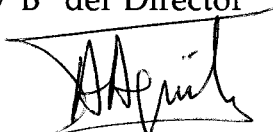
RELACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN CON LA RECOMBINACIÓN ENTRE SECUENCIAS REPETIDAS EN *S. cerevisiae*

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

José Ignacio Piruat Palomo


Sevilla, 30 de Marzo de 1998

VºBº del Director


Dr. Andrés Aguilera López
Profesor titular de Genética

A María
A mis Padres y Hermanos

A lo largo de estos cinco años han sido muchas las personas que me han ayudado a hacer esta tesis. A todas ellas quiero darles las gracias:

A mi director, Andrés Aguilera, por su dedicación, su esfuerzo y su interés en que mi proyecto se hiciera realidad.

A mis compañeros del grupo "REC", Helena, Félix, Paco, Sebastián, Sergio, Mercedes y Ana Beatriz, no sólo por su aportación científica sino por su amistad y porque entre todos han sabido crear un ambiente de auténtica "camaradería" en el laboratorio.

Al resto de investigadores, profesores, técnicos y secretarias, del departamento, porque "siempre había alguien ahí" para echarme una mano.

A la Dr. Carol S. Newlon, del UMDNJ, por su amabilidad y su hospitalidad durante mi estancia corta en Estados Unidos, y por supuesto, a Lolo, porque él hizo posible mi "aventura americana".

En el ámbito extra-científico, les doy las gracias a las personas que más quiero y a las que he dedicado esta tesis. A mis padres y mis hermanos, por su constante apoyo, interés, ilusión y confianza, y por haberme proporcionado ese ambiente familiar esencial para mí durante esta tesis. Y a María, mi novia, por haber compartido los éxitos, sufrido las "malas rachas" y por haber aprendido biología "a la fuerza".

Finalmente, pero no por ello menos, a mis amigos de fuera del laboratorio, Jose Enrique, Paula, Raúl, Luís,...y tantos otros, por su interés en la evolución de mi trabajo y su confianza en mí.

A todos.....GRACIAS.

An age or a culture is characterized less by the extent of its knowledge than by the nature of the questions it puts forward.(...) what is important in science is as much its spirit as its product.

François Jacob.
The Logic of Life.
(Traducido al inglés por
Betty E. Spillmann)

Era necesario encontrar otro método, resignarse quizá a componer breves trabajos monográficos o, en último extremo, renunciar incluso a hacer obra y recuperar la plenitud del mero acontecer, y el gusto del conocimiento sin otro objeto que su propio deleite...

Luis Landero.
Caballeros de Fortuna.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Mecanismos de recombinación genética	3
I.2. Recombinación intramolecular entre secuencias repetidas directas	4
I.3. Control genético de la recombinación entre secuencias repetidas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
I.4. Relación entre recombinación y transcripción	7
I.5. Transcripción por la ARN polimerasa II	9
I.5.1. Iniciación de la transcripción	9
I.5.2. Regulación de la elongación por la ARN polimerasa II	11
I.5.3. Acoplamiento de la transcripción a otros procesos metabólicos del ADN	13
I.6. Recombinación y transcripción en mutantes <i>hpr1Δ</i>	14
I.7. Supresores de <i>hpr1Δ</i>	16
I.8. Objetivos	17
II. RESULTADOS	19
II.1. Clonación del gen <i>HRS2/SRB2</i> y análisis de recombinación, reparación y expresión génica en diferentes mutantes <i>srb2</i>	21
II.1.1. Clonación del gen <i>HRS2</i>	21
II.1.2. Identificación de <i>HRS2</i> como <i>SRB2</i>	23
II.1.3. Clonación de la mutación <i>hrs2-1</i>	23
II.1.4. Deleción de <i>HRS2/SRB2</i>	24
II.1.5. Recombinación en estirpes <i>srb2Δ102</i>	26
II.1.6. Crecimiento de las estirpes <i>srb2</i>	27
II.1.7. Reparación del ADN en mutantes <i>srb2</i>	28
II.1.8. Expresión génica en mutantes <i>srb2</i>	29
II.1.9. Rezumancia de la mutación <i>srb2-101</i>	31
II.2. Análisis funcional de la mutación <i>hrs1Δ</i>	32
II.2.1. Regulación transcripcional de genes cromosómicos en mutantes <i>hrs1Δ</i>	33
II.2.2. Regulación de la expresión de fusiones <i>lacZ</i> en mutantes <i>hrs1Δ</i>	35

II.2.3. Fenotipo Gal ⁻ y defecto en la producción de factor α en mutantes <i>hrs1</i> Δ	38
II.2.4. Efecto de <i>hrs1</i> Δ en silenciamiento	39
II.2.5. Activación de promotores UAS ⁻ en mutantes <i>hrs1</i> Δ	40
II.2.6 Fenotipo Spt ⁻ de las estirpes <i>hrs1</i> Δ	42
II.2.7. Recombinación en mutantes <i>gal11</i> Δ y <i>sin4</i> Δ	43
II.3. Clonación e identificación de los genes <i>THO1</i> y <i>THO2</i> como supresores de <i>hpr1</i> Δ . Estudio de la recombinación asociada a elongación de la transcripción en mutantes <i>tho2</i> Δ	43
II.3.1. Aislamiento de <i>THO1</i> y <i>THO2</i> como genes supresores en multicopia de la termosensibilidad y el defecto en transcripción de <i>hpr1</i> Δ	44
II.3.2. Expresión del gen <i>lacZ</i> y recombinación en mutantes <i>tho1</i> Δ y <i>tho2</i> Δ	49
II.3.3. Efecto de la mutación <i>tho2</i> Δ en la transcripción por la ARN polimerasa II	54
II.3.4. Defectos en elongación de la transcripción independientes de promotor en mutantes <i>tho2</i> Δ	58
II.3.5. Análisis <i>run-on</i> de la transcripción en mutantes <i>tho2</i> Δ	59
II.3.6. Recombinación asociada a transcripción en mutantes <i>tho2</i> Δ	61
II.3.7. Inestabilidad de plásmidos en células <i>tho2</i> Δ	64
II.3.8. Supresión de <i>tho2</i> Δ por <i>srb2</i> Δ y <i>hrs1</i> Δ	64
III. DISCUSIÓN	67
III.1 La mutación <i>hrs2-1</i> está en el gen <i>SRB2</i> , que codifica un componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II	69
III.2. Implicación de Srb2p en reparación de ADN	70
III.3. El gen <i>HRS1</i> determina un nuevo componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II funcionalmente análogo a <i>GAL11</i> y <i>SIN4</i>	71
III.4. <i>THO1</i> y <i>THO2</i> , dos nuevos genes relacionados funcionalmente con <i>HPR1</i>	73
III.5. Función de <i>THO2</i> en transcripción	74
III.6. Recombinación asociada a defectos de elongación en células <i>tho2</i> Δ	76
III.7. Supresión de la hiper-recombinación de <i>hpr1</i> Δ y <i>tho2</i> Δ por mutaciones en Srb2p y Hrs1p	79
III.8. Sumario y perspectivas	79

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	81
IV.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	83
IV.1.1. Medios de cultivo para levaduras:	83
IV.1.2. Medios de cultivo para bacterias:	84
IV.1.3. Condiciones de crecimiento	84
IV.2. Estirpes	84
IV.3. Plásmidos	88
IV.4. Análisis genético en levadura	92
IV.5. Determinación de las frecuencias de recombinación	93
IV.6. Determinación de la estabilidad de plásmidos	93
IV.7. Determinación de la sensibilidad a radiación ultravioleta	93
IV.8. Determinación de la sensibilidad a MMS	93
IV.8.1 Exposiciones cortas a alta concentración de MMS	93
IV.8.2. Exposiciones largas a baja concentración de MMS	94
IV.9. Estudio de la expresión dirigida por promotores	94
IV.10. Ensayo de actividades enzimáticas	95
IV.10.1. Ensayo de actividad β -galactosidasa	95
IV.10.2. Ensayo de actividad fosfatasa ácida	95
IV.11. Transformaciones	95
IV.11.1. Transformación de bacterias	96
IV.11.2. Transformación de levaduras	96
IV.12. Extracción de ácidos nucleicos	96
IV.12.1. Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	96
IV.12.1.1. Preparación a pequeña escala (minipreps)	96
IV.12.1.2. Preparación a gran escala	97
IV.12.2. Preparación de ADN de levaduras	97
IV.12.3. Preparación de ARN de levaduras	97
IV.13. Electroforesis de ácidos nucleicos	98
IV.13.1. Geles de agarosa	98
IV.13.1.1. geles de ADN	98
IV.13.1.2. geles de ARN	98
IV.13.2. Geles de acrilamida	98
IV.14. Transferencia de ácidos nucleicos a membranas	99
IV.14.1. Transferencia de ADN	99
IV.14.2. Transferencia de ARN	99
IV.15. Hibridación de ácidos nucleicos	100
IV.15.1. Hibridación de ADN (<i>Southern</i>)	100
IV.15.1.1. Hibridación con sonda no radiactiva	100
IV.15.1.2. Hibridación con sonda radiactiva	100
IV.15.2. Hibridación de ARN (<i>Northern</i>)	101
IV.15.2.1. Hibridación con sonda radiactiva	101
IV.16. Marcaje de sondas	101
IV.16.1. Marcaje de sondas no radiactivas	101
IV.16.2. Marcaje de sondas radiactivas	101

IV.17. Secuenciación de ADN	102
IV.18. Análisis "run-on" de los transcritos de un gen	102
IV.19. Amplificación del gen <i>KAN1</i> por PCR	98
V. CONCLUSIONES	105
VI. BIBLIOGRAFÍA	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Recombinación intramolecular entre repeticiones directas e invertidas	4
Figura 2.	Modelos de recombinación de invasión de una cadena y SSA	5
Figura 3.	Holoenzima de la ARN polimerasa II	10
Figura 4.	Sistema de recombinación <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	22
Figura 5.	Mapa de restricción de la región de <i>HRS2/SRB2</i>	22
Figura 6.	Clonación de la mutación <i>hrs2-1/srb2-101</i>	24
Figura 7.	Delección del gen <i>HRS2/SRB2</i>	25
Figura 8.	Análisis de <i>Southern</i> de deleciones en <i>srb2</i>	28
Figura 9.	Curvas de viabilidad frente a luz UV de <i>srb2</i>	29
Figura 10.	Curvas de viabilidad frente a MMS de <i>srb2</i>	30
Figura 11.	Crecimiento en YEPD+MMS de <i>srb2</i>	30
Figura 12.	Crecimiento en SC+MMS de <i>srb2-101</i>	32
Figura 13.	Análisis de <i>Northern</i> en <i>hrs1Δ</i>	34
Figura 14.	Actividad fosfatasa ácida en <i>hrs1Δ</i>	35
Figura 15.	Expresión de fusiones <i>lacZ</i> en <i>hrs1Δ</i>	36
Figura 16.	Fenotipo Gal ⁻ de <i>hrs1Δ</i>	39
Figura 17.	Producción de factor α en <i>hrs1Δ</i>	40
Figura 18.	Silenciamiento en <i>hrs1Δ</i>	41
Figura 19.	Expresión de la fusión <i>CYC1(ΔUAS)</i> en <i>hrs1Δ</i>	42
Figura 20.	Mapas de restricción de las regiones de <i>THO1</i> y <i>THO2</i>	45

Figura 21.	Supresión del defecto en crecimiento a 37°C de <i>hpr1Δ</i> por <i>THO1</i> y <i>THO2</i>	46
Figura 22.	Secuencias de Tho1p y Tho2p	47
Figura 23	Supresión del defecto en transcripción de <i>hpr1Δ</i> por <i>THO1</i> y <i>THO2</i>	48
Figura 24.	Delección de <i>THO1</i>	49
Figura 25.	Delección de <i>THO2</i>	50
Figura 26.	Crecimiento a 30°C y 37°C de <i>tho2Δ</i>	51
Figura 27.	Expresión de <i>GAL1::lacZ</i> en <i>tho1Δ</i> y <i>tho2Δ</i>	52
Figura 28.	Sectores en <i>tho2Δ</i>	54
Figura 29.	Expresión de <i>GAL1::lacZ</i> y <i>GAL1::PHO5</i> en <i>tho2Δ</i>	55
Figura 30.	Supresión de <i>tho2Δ</i> por <i>HPR1</i>	55
Figura 31.	Análisis de <i>Northern</i> de <i>GAL1::lacZ</i> y <i>GAL1::PHO5</i> en <i>tho2Δ</i>	57
Figura 32.	Análisis de <i>Northern</i> de <i>GAL1</i> y <i>ACT1</i> en <i>tho2Δ</i>	58
Figura 33.	Análisis de <i>Northern</i> de <i>GAL1::PHO5-lacZ</i> en <i>tho2Δ</i>	59
Figura 34.	Análisis "run-on" de <i>GAL1::PHO5-lacZ</i> en <i>tho2Δ</i>	60
Figura 35.	Análisis de recombinación y transcripción en <i>tho2Δ</i>	62
Figura 36.	Supresión de <i>tho2Δ</i> por <i>srb2Δ</i> y <i>hrs1Δ</i>	65
Figura 37.	Modelo de recombinación en <i>hpr1Δ</i> y <i>tho2Δ</i>	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Frecuencia de deleciones en el sistema <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i> en estirpes <i>hrs2/srb2</i> en fondos <i>HPR1</i> y <i>hpr1Δ</i>	27
Tabla 2.	Actividad β-galactosidasa de estirpes <i>srb2</i> con la fusión <i>GAL1::lacZ</i>	31
Tabla 3.	Caracterización genética de <i>hpr1Δ srb2-101</i>	32
Tabla 4.	Frecuencia de deleciones en el sistema <i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i> en estirpes <i>hrs1, sin4</i> y <i>gal11</i> en fondos <i>HPR1</i> y <i>hpr1Δ</i>	44
Tabla 5.	<i>leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i> en estirpes <i>tho1Δ</i> y <i>tho2Δ</i> en fondos <i>HPR1</i> y <i>hpr1Δ</i>	53
Tabla 6.	Estabilidad de plásmidos centroméricos en <i>tho2Δ</i>	65
Tabla 7.	Estirpes de levadura	84

ABREVIATURAS

ADN	Acidodesoxirribonucléico	kD	Kilodalton
ADNr	ADN ribosómico	l	Litro
Amp	Ampicilina	Leu	Leucina
Arg	Arginina	LiAc	Acetato de litio
ARN	Acido ribonucléico	Lys	Lisina
ARNm	ARN mensajero	m	Metro
ARNr	ARN ribosómico	MMS	Metil -metanosulfonato
ARNt	ARN transferente	min.	Minuto
Asn	Asparagina	MOPS	Acido morfolino-propanosulfónico
Asp	Acido aspártico	ONPG	O-nitrofenil-galactopiranosido
ATP	Adenosín-trifosfato	pb	Pares de bases
Can	Canavanina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ci	Curio	PEG	Polietilen-glicol
CTP	Citidín-trifosfato	Pi	Fosfato inorgánico
dATP	Deoxiadenosín-trifosfato	r.p.m.	Revoluciones por minuto
dCTP	Deoxicitidín-trifosfato	s	Segundo
DEPC	Dietil-pirocarbonato	SDS	Laurilsulfato sódico
dGTP	Deoxiguanosín-trifosfato	Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
D.O.	Densidad óptica	Trp	Triptófano
dTTP	Deoxitimidín-trifosfato	TTP	Timidín-trifosfato
dUTP	Deoxiuridín-trifosfato	U	Unidad de actividad enzimática
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético	UA	Unidades arbitrarias
EtBr	Bromuro de etidio	Ura	Uracilo
FOA	Acido fluoro-orótico	UTP	Uridín-trifosfato
gal	Galactosa	UV	Ultravioleta
glu	Glucosa	V	Voltio
Gly	Glicina	W	Watio
GTP	Guanosín-trifosfato	YNB	Bases nitrogenadas de levadura
h	Hora		
his	Histidina		
J	Julio		
kb	Kilobase		

I. INTRODUCCIÓN

La recombinación genética es un proceso fundamental en el metabolismo del ADN en todos los organismos vivos. Existen multitud de procesos biológicos en los que la recombinación está directamente implicada. El cambio de sexo en *Saccharomyces cerevisiae* (Klar *et al.*, 1984) o la producción de inmunoglobulinas en eucariotas superiores (Schwedler *et al.*, 1990) constituyen dos ejemplos de ello. En eucariotas, la recombinación durante la meiosis asegura una correcta división reduccional del núcleo y contribuye a la diversidad genética de las especies mediante la generación de nuevas combinaciones alélicas. Durante la mitosis, la importancia de la recombinación viene determinada fundamentalmente por su papel en la reparación de roturas del ADN. Sin embargo, la recombinación puede representar una fuente de inestabilidad genómica. Por ello, para la célula es importante mantener un estricto control sobre los mecanismos de recombinación que mantenga la integridad de su genomio. La recombinación entre secuencias repetidas de ADN, ubicuas en los genomios eucarióticos, puede dar lugar a reorganizaciones con consecuencias deletéreas para la célula. En humanos, existen diversas enfermedades, como el síndrome del "X-frágil" (Fu *et al.*, 1991), la corea de Huntington, el síndrome de Werner (Fukuchi *et al.*, 1989), la Ataxia telangiectasia (Meyn, 1993) y algunos tipos de cáncer colorrectal (Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993) que se asocian a una inestabilidad de regiones repetidas de ADN.

I.1. Mecanismos de recombinación genética

Existen distintos mecanismos de recombinación entre regiones repetidas de ADN dependiendo del tipo de secuencias de que se trate. Las secuencias cortas (<10 pb) repetidas "en tandem" multitud de veces (*ADN satélite*), están sujetas a reordenaciones provocadas fundamentalmente por errores de la maquinaria de replicación. En cambio, las repeticiones largas (>100 pb) y las regiones homólogas de los genomios constituyen el sustrato para una maquinaria específica de recombinación homóloga.

El modelo de recombinación homóloga más aceptado actualmente es el que se basa en la **reparación de cortes de doble cadena** (Szostak *et al.*, 1983). La característica más relevante de este modelo es la iniciación del proceso por un corte de doble cadena que se repara mediante síntesis de ADN usando como molde la molécula homóloga. A menudo, este mecanismo supone el intercambio recíproco entre las dos cadenas de ADN. Además de la recombinación entre cromosomas homólogos (recombinación alélica), también se da recombinación entre secuencias repetidas localizadas en regiones no homólogas, ya sea en el mismo o en distintos cromosomas (recombinación ectópica). Según su localización la recombinación entre las secuencias repetidas tendrá distintas consecuencias sobre el producto final (Petes *et al.*, 1991). El intercambio recíproco entre secuencias repetidas localizadas en cromosomas distintos produce translocaciones de ADN. Cuando las repeticiones están en

orientación invertida en el mismo cromosoma el producto de la recombinación entre ellas es la inversión de la región entre ambas (Figura 1A). Sin embargo, si están en orientación directa, el producto es una deleción de una de las secuencias repetidas y de la región intermedia. En este último caso, la recombinación puede ser intracromatídica (Figura 1B) o entre cromátidas hermanas (Petes *et al.*, 1991).

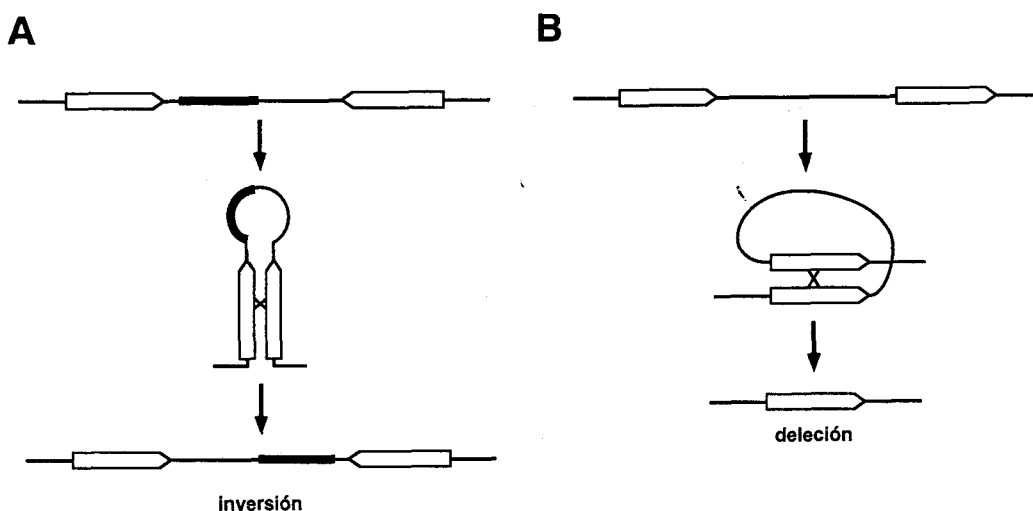


Figura 1. Diagrama que muestra como un suceso de recombinación recíproca entre dos secuencias repetidas en la misma molécula de ADN puede dar lugar a una inversión de la secuencia entre las repeticiones (A) o una deleción de una de las repeticiones y la secuencia entre estas (B) según las repeticiones estén orientadas de forma invertida o directa respectivamente. El sentido de las flechas indica la orientación de las repeticiones. El suceso de recombinación está representado por un aspa. En A una caja negra permite visualizar la inversión.

Las deleciones en el ADN son reordenaciones genéticas con consecuencias graves para la célula por cuanto suponen la pérdida de información genética. El estudio de los mecanismos moleculares por los que se producen deleciones, así como la identificación de los factores que en ellos intervienen es fundamental para entender los fenómenos de inestabilidad genómica.

1.2. Recombinación intramolecular entre secuencias repetidas directas

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye un modelo de organismo eucariótico ideal para el estudio de la recombinación mitótica, ya que es posible su análisis en células haploides. En *S. cerevisiae* se han definido distintos mecanismos moleculares por los que se puede dar recombinación intramolecular

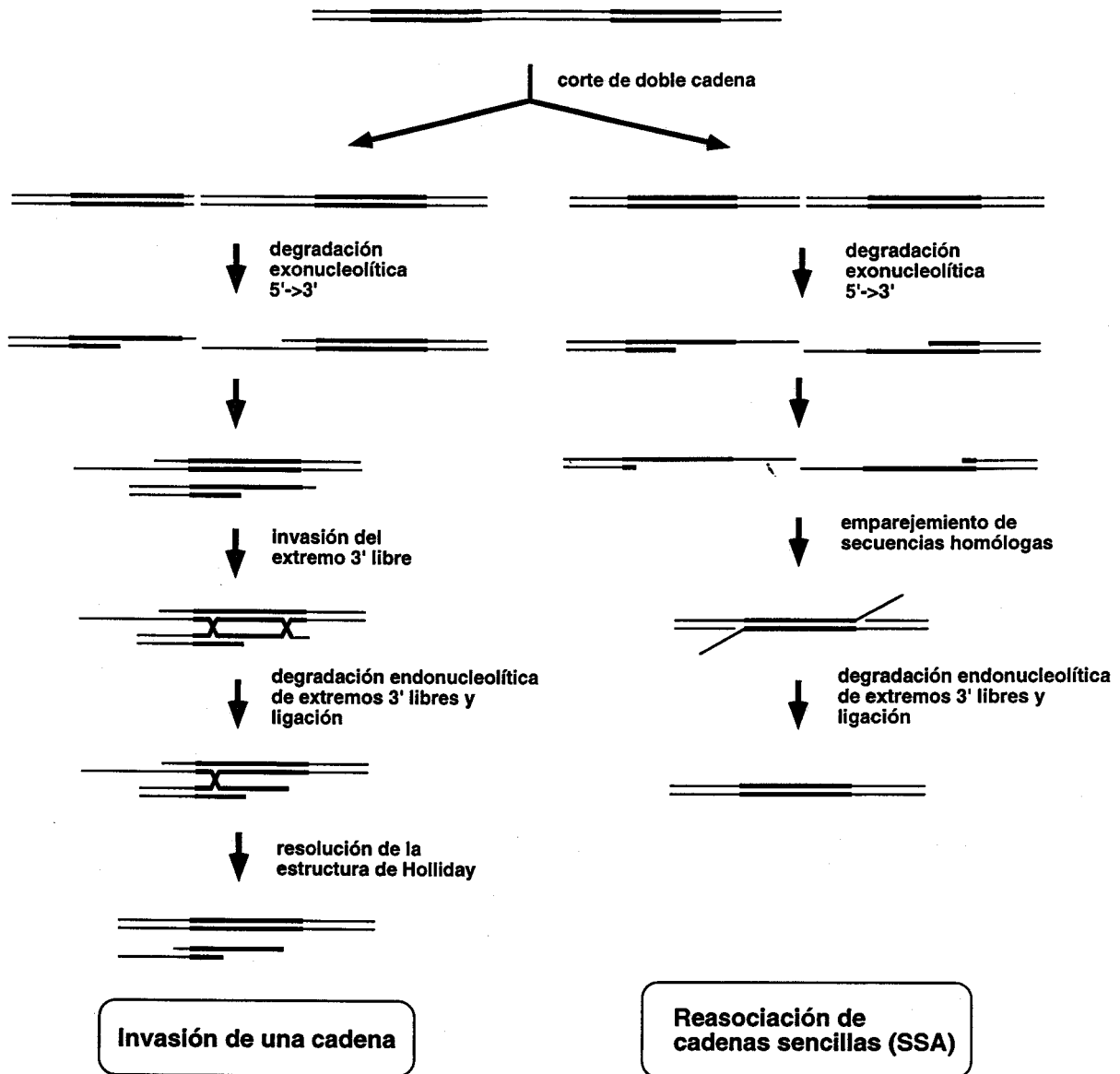


Figura 2. Modelos de recombinación no conservativa entre repeticiones directas en la misma molécula de ADN. Se muestran los mecanismos de invasión de una cadena y reasociación de cadenas sencillas (SSA).

entre repeticiones directas. En primer lugar, la recombinación puede darse por los mismos mecanismos de *intercambio recíproco* por los que se produce recombinación entre regiones homólogas en general (Szostak *et al.*, 1983). Este mecanismo supone la iniciación de la recombinación por un corte de doble cadena en una de las repeticiones y un intercambio entre dos cadenas de ADN.

Como resultado se produce una deleción y la formación de una molécula circular compuesta por una de las repeticiones y la región situada entre ellas (Figura 1B). Debido a que, en esta clase de recombinación no se da degradación y pérdida de ADN, la denominamos **recombinación conservativa**.

Cuando el corte de doble cadena se da en la región situada entre las repeticiones, se puede reparar por los mecanismos de *invasión de una cadena* (Mezard y Nicolas, 1994; Prado y Aguilera, 1995) o de *reasociación de cadenas sencillas* (SSA, del inglés *single-strand annealing*) (Ozenberger y Roeder, 1991; Fishman-Lobell y Haber, 1992; Mezard y Nicolas, 1994; Prado y Aguilera, 1995) (Figura 2). Dependiendo de la posición relativa del corte de doble cadena que inicia la recombinación respecto a las repeticiones flanqueantes parece ser que se favorece un mecanismo u otro. Cuando el corte se da próximo a una de las repeticiones este se repararía preferiblemente por el mecanismo de invasión de una cadena, mientras que los cortes equidistantes a las repeticiones favorecerían la reparación por SSA (Prado y Aguilera, 1995). Estos mecanismos suponen la deleción de una de las repeticiones y de la secuencia intermedia, pero, a diferencia del intercambio recíproco, se degrada y se pierde parte del ADN de las secuencias repetidas. A esta clase de recombinación la denominamos, por tanto, **recombinación no conservativa**.

I.3. Control genético de la recombinación entre secuencias repetidas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Poco se conoce acerca de la enzimología de estos mecanismos de recombinación. En *S. cerevisiae*, el gen fundamental en la recombinación recíproca es el gen *RAD52* (Petes *et al.*, 1991). Este gen actúa en más de una ruta de reparación por recombinación, como se deduce de estudios genéticos con mutantes *rad51* y *rad57* (Aguilera, 1995; Rattray y Symington, 1995). Sin embargo, algunos de los mecanismos de recombinación propuestos, como por ejemplo el SSA, son independientes de *RAD52* (Jackson y Fink, 1981; Ozenberger y Roeder, 1991; Fishman-Lobell y Haber, 1992; Prado y Aguilera, 1995). Por otro lado, tanto la invasión de una cadena como el SSA requieren la endonucleasa Rad1p/Rad10p (Schiestl y Prakash, 1988, 1990; Mezard y Nicolas, 1994; Prado y Aguilera, 1995; Ivanov y Haber, 1995) para eliminar los segmentos heterólogos de ADN de cadena sencilla que se producen por estos mecanismos (Figura 2) (Fishman-Lobell y Haber, 1992).

En ocasiones encontramos que mutaciones en genes implicados en otros procesos metabólicos del ADN producen un efecto sobre la recombinación entre repeticiones. Por ejemplo, mutaciones en genes que funcionan en replicación como el de la ligasa de ADN, *CDC9*, o los de las helicasas *RAD3* y *HPR5/SRS2*, y en otros genes de ciclo celular como *CDC5*, *CDC6* y *CDC13*, producen un fenotipo de hiper-recombinación en diferentes sistemas de repeticiones (Hartwell y Smith,

1985; Aguilera y Klein, 1994). También mutaciones en los genes estructurales de las ADN polimerasas I y III, *CDC17* y *CDC2* (Aguilera y Klein, 1988), o en los genes de reparación *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* (Aguilera, 1995; Rattray y Symigton, 1995; Liefshitz *et al.*, 1995) estimulan la recombinación entre secuencias repetidas. Este tipo de efectos se había observado anteriormente en bacterias. Concretamente, mutaciones en la helicasa II (Arthur y Lloyd, 1980), en la metilasa Dam (Marinus y Konrad, 1976; Zieg *et al.*, 1978), y en los genes de la ADN polimerasa I y de la ligasa (Zieg *et al.*, 1978) provocan un aumento de la recombinación en *E. coli*. Estas observaciones sugieren una relación entre la recombinación, la reparación y la replicación del ADN.

En los últimos años, una serie de trabajos han demostrado una relación de la recombinación con la transcripción. Debido a que en el trabajo desarrollado en esta tesis hemos analizado la implicación de determinados factores de transcripción en recombinación entre secuencias repetidas, centraremos el resto de la introducción en la relación entre ambos procesos.

I.4. Relación entre recombinación y transcripción

La primera evidencia de una relación de la transcripción con la recombinación se obtuvo en *S. cerevisiae* con el aislamiento de *HOT1*, una secuencia reguladora de la transcripción por la ARN polimerasa I, como un activador de la recombinación en la región del ADN_r (Keil y Roeder, 1984; Voelkel-Meiman *et al.*, 1987). *HOT1* es capaz de inducir recombinación de una forma directamente relacionada con su capacidad de promover la transcripción (Stewart y Roeder, 1989). También se ha observado inducción de recombinación por transcripción dependiente de la ARN polimerasa II. Así, en *S. cerevisiae* la activación de la transcripción produce un aumento en la frecuencia de deleciones entre repeticiones de *GAL10* (Thomas y Rothstein, 1989) o entre elementos Ty (Nevo-Caspi y Kupiec, 1994), y en el proceso de cambio de sexo sólo tiene capacidad de iniciar la recombinación el *locus* que se expresa (Klar *et al.*, 1981). En *Schizosaccharomyces pombe*, la transcripción a partir del promotor *ADH1* induce la recombinación de las secuencias transcritas (Grimm *et al.*, 1991). En células de mamíferos, la activación de la transcripción estimula la recombinación entre secuencias repetidas de ADN, aunque en los sistemas estudiados sólo ocurre si se produce un corte de doble cadena en las repeticiones antes de inducir la transcripción (Nickoloff y Reynolds, 1990; Nickoloff, 1992). En células de mamíferos, se da una mayor frecuencia de recombinación entre los segmentos transcripcionalmente activos de los genes de las inmunoglobulinas (Blackwell *et al.*, 1986; Leung y Maizels, 1992; Lauster *et al.*, 1993; Oltz *et al.*, 1993). Por último, también se ha observado relación entre la recombinación y la transcripción en virus y bacterias. En *E. coli* las deleciones mediadas por *IS102* requieren la transcripción de la región en la que se inserta la secuencia de inserción (Bernardi y Bernardi, 1988) y la formación de deleciones en plásmidos se induce por

transcripción (Vilette *et al.*, 1995). La transcripción de determinados genes de algunos fagos de *E. coli* estimula la transducción tanto especializada como generalizada (Dul y Drexler, 1988a,b). Resultados similares se han obtenido con poliomavirus (Bourgeaux-Ramoisy *et al.*, 1995).

La recombinación inducida por transcripción puede ser una consecuencia del efecto que esta última tiene sobre la estructura del ADN. La apertura de la doble hélice y los cambios en el grado de superenrollamiento o en la estructura de la cromatina que están asociados al proceso de transcripción pueden conducir a una mayor accesibilidad de la maquinaria de recombinación al ADN, generar estructuras hipersensibles a nucleasas endógenas o facilitar la reacción de intercambio de cadenas. Existen estudios que demuestran que esta clase de fenómenos inducen recombinación. En *S. cerevisiae*, se ha comprobado que los sitios donde se producen los cortes de doble cadena que inician la recombinación meiótica coinciden con las regiones promotoras de los genes (Nicolas *et al.*, 1989; Baudat y Nicolas, 1997) y que la recombinación se inicia preferentemente en los sitios de unión de factores de transcripción (White *et al.*, 1991). Este fenómeno se ha observado también en células de mamíferos (Shenkar *et al.*, 1991). Un ejemplo de ello es RBP2N, una proteína de unión a sitios iniciadores de la recombinación meiótica en humanos, que funciona como un represor transcripcional (Dou *et al.*, 1994). Por otro lado, mutaciones en los genes estructurales de las topoisomerasas de ADN, *TOP1*, *TOP2* (Christman *et al.*, 1988) y *TOP3* (Wallis *et al.*, 1989), o en los genes implicados en el mantenimiento de la estructura de la cromatina *SIR2* (Gottlieb y Esposito, 1989), *SPT4* y *SPT6* (Malagón y Aguilera, 1996) producen un fenotipo hiper-recombinante. En este sentido, se ha demostrado que el superenrollamiento negativo que produce el avance de la ARN polimerasa estimula la recombinación específica de sitio por las resolvasas bacterianas $\gamma\delta$ y Tn3 *in vitro* (Dröge, 1993). También se ha observado que la transcripción estimula el intercambio de cadenas catalizado por RecA *in vitro* (Kotani y Kmiec, 1994). Todos estos resultados sugieren que las alteraciones estructurales del ADN que produce el avance de la ARN polimerasa, son responsables, al menos en parte, del efecto de la transcripción sobre la recombinación.

Sin embargo, no se pueden descartar situaciones en las que se de una conexión directa entre transcripción y recombinación. Así, en *Schizosaccharomyces pombe*, la proteína heterodimérica Mts1p/Mts2p, que funciona como factor de transcripción, es esencial para que el sitio M26 actúe como iniciador de la recombinación meiótica (Kon *et al.*, 1997). Por otro lado, la identificación de la proteína de reparación hRad51p, homóloga a RecA en humanos, como un componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Maldonado *et al.*, 1996), abre la posibilidad de que los mecanismos de reparación por recombinación en los que actúa Rad51p estén asociados a la maquinaria de transcripción.

I.5. Transcripción por la ARN polimerasa II

Antes de centrarnos en los fenómenos de recombinación e inestabilidad genómica asociados a la transcripción en *S. cerevisiae* es conveniente introducir algunos aspectos importantes de la transcripción en eucariotas, como son la iniciación de la transcripción y su regulación, la elongación y el acoplamiento de la transcripción con otros procesos metabólicos del ADN.

I.5.1. Iniciación de la transcripción

La iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II requiere el reclutamiento en los promotores génicos de un gran complejo protéico constituido por la propia ARN polimerasa II y por diversos factores polipeptídicos denominados *factores generales de la transcripción*. Entre estos factores generales de transcripción están: TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFIIJ y TFIID, constituido por la proteína TBP (proteína de unión al elemento TATA de los promotores) y los factores TAFs (del inglés *TBP-associated factor*) (Koleske y Young, 1995; Björklund y Kim, 1996; Kornberg, 1996; Stargell y Struhl, 1996) (Figura 3). Los polipéptidos componentes de la ARN polimerasa II así como la mayoría de los factores generales de transcripción, están conservados desde levaduras a humanos.

Tradicionalmente se ha pensado que la ARN polimerasa II y los distintos factores generales de transcripción se ensamblaban en los promotores de una forma secuencial para dar lugar a un complejo de iniciación (Buratowski, 1994). Según esta idea, el TFIID sería el primer factor en unirse al ADN a través de la proteína TBP, que reconoce al elemento TATA de los promotores. A continuación se ensamblarían los factores TFIIA, TFIIB, TFIIIF con la ARN polimerasa II, TFIIE, TFIIH y TFIIJ (Zawel y Reinberg, 1992; Buratowski, 1994) por este orden y de forma secuencial. Sin embargo, estudios más recientes han identificado en levaduras y en mamíferos distintas formas de un complejo protéico, no asociado al ADN, que contiene la ARN polimerasa II, algunos de los factores generales de transcripción y otros polipéptidos que conforman un subcomplejo llamado "mediador" (Kim *et al.*, 1994; Koleske y Young, 1994). Esto ha llevado a proponer el modelo aceptado actualmente según el cual la ARN polimerasa II está previamente ensamblada a algunos de los factores generales y a otros complejos protéicos de una forma estable antes de su unión al ADN, constituyendo lo que se conoce como **holoenzima de la ARN polimerasa II** (Figura 3A). La presencia de TBP unida a la caja TATA del promotor, y de TFIIE catalizarían la unión de la holoenzima al promotor (Koleske y Young, 1995). Para que se inicie la transcripción ha de fosforilarse el dominio CTD (*carboxi-terminal domain*) de la ARN polimerasa II (Figura 3B), constituido por 27 repeticiones de un heptapéptido. Cuando el CTD está fosforilado la polimerasa es procesiva (Allison y Ingles, 1989; Scafe *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). Una vez fosforilado

el CTD, la doble hélice se abre mediante una función helicasa constituyéndose lo que se conoce como "complejo abierto" de la transcripción. Es probable que el factor TFIIF, que posee actividad quinasa capaz de fosforilar el CTD y actividad helicasa, sea el responsable de realizar ambas funciones *in vivo*, posiblemente en cooperación con el factor TFIIF (Svejstrup *et al.*, 1996).

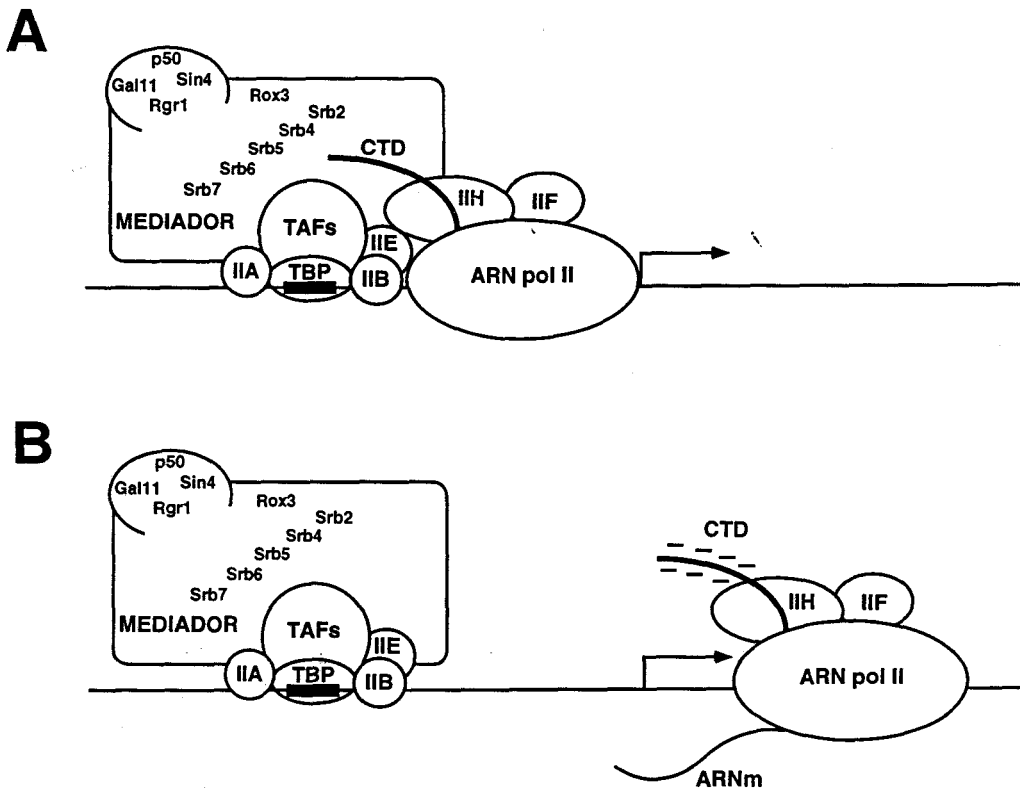


Figura 3. Holoenzima de la ARN polimerasa II. Se muestran la mayoría de los factores generales de transcripción, el complejo "mediador" y la ARN polimerasa II ensamblados en el promotor (A). La fosforilación del dominio CTD, que le confiere una carga neta negativa, posibilita el inicio de la transcripción (B). En este modelo, solamente los factores TFIIF y TFIIH acompañan a la ARN polimerasa II durante la elongación mientras que el resto de los componentes del holoenzima permanece unido al promotor. El rectángulo negro representa el elemento TATA. Una flecha indica el sitio de inicio de la transcripción.

La transcripción de muchos genes por la ARN polimerasa II está regulada a nivel de iniciación. Esta regulación la ejercen una gran variedad de proteínas que pueden actuar como activadores o represores. La interacción entre las proteínas reguladoras y la ARN polimerasa II está mediada por el complejo denominado "mediador" que constituye un elemento integrador de todas las señales

reguladoras que actúan sobre la ARN polimerasa II. El "mediador" se descubrió inicialmente en levaduras como una fracción cruda que eliminaba la inhibición de la transcripción en un extracto nuclear (Kelleher *et al.*, 1990). Posteriormente se descubrió que esta misma fracción era necesaria para reconstituir la respuesta a activadores en un sistema *in vitro* (Kim *et al.*, 1994). Por otro lado, se habían identificado genéticamente una serie de factores que interaccionaban con el dominio CTD de la ARN polimerasa II. El dominio CTD está implicado en la respuesta de la maquinaria de transcripción a los activadores en función de su capacidad de fosforilación (Allison y Ingles, 1989; Scafe *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). Los factores que interaccionan con el CTD constituyen el complejo Srb (Koleske y Young, 1994) y están codificados por los genes *SRB*, aislados a partir de mutantes de *S. cerevisiae* supresores de deleciones parciales del CTD de la ARN polimerasa II (Nonet y Young, 1989). Distintos estudios genéticos y moleculares han permitido definir el "mediador" como un gran complejo protéico constituido por aproximadamente 20 polipéptidos entre los que están algunos de los factores Srb y otros, identificados genéticamente a partir de estudios independientes, como Gal11p, Sin4p, Rgr1p y Rox3p (Kim *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Gustafsson *et al.*, 1997) (Figura 3). Recientemente se ha establecido, mediante análisis bioquímicos, que las proteínas Gal11p, Sin4p y Rgr1p forman, junto con otra proteína denominada p50, un subcomplejo dentro del "mediador" (Li *et al.*, 1995) (Figura 3). La caracterización genética de mutantes en los genes de los componentes de este subcomplejo ha mostrado una gran similitud fenotípica entre ellos. Estos mutantes son incapaces de regular la transcripción de distintos genes y presentan fenotipo pleiotrópico. Cabe destacar los fenotipos Gal⁻ y Spt⁻, cambios en el grado de superenrollamiento de plásmidos, la incapacidad de mantener el silenciamiento asociado a telómeros o la activación constitutiva de promotores en los que se ha delecionado la secuencia activadora UAS (*upstream-activating sequence*) (Fassler y Winston, 1989; Jiang y Stillman, 1992; Suzuki y Nishizawa, 1994; Jiang *et al.*, 1995).

Recientemente, se ha observado que el complejo SWI/SNF (Cairns *et al.*, 1994; Cote *et al.*, 1994), implicado en la remodelación de la estructura cromatínica del ADN, está también asociado a la holoenzima de la ARN polimerasa II (Wilson *et al.*, 1996) aunque está en controversia si esto refleja una situación real *in vivo* (Myers *et al.*, 1988; Svejstrup *et al.*, 1997).

I.5.2. Regulación de la elongación por la ARN polimerasa II

La regulación de la transcripción por la ARN polimerasa II se da también en la fase de elongación (Kane, 1994). La elongación de la transcripción puede sufrir "pausas" que producen una parada de la ARN polimerasa II sin que se libere el transcrito. Algunos activadores transcripcionales funcionan, al menos en parte, aumentando la eficiencia de la elongación de la ARN polimerasa II a través de los sitios de pausa (Yankulov *et al.*, 1994). Estos sitios de pausa a

menudo se dan en la zona proximal de algunos promotores. Este fenómeno forma parte de la activación de dichos promotores, en la que se sintetiza un pequeño transcrito antes de que se produzca la pausa de la polimerasa (Bentley, 1995). La regulación de la transcripción por este mecanismo se observó por primera vez en el gen *hsp70* de *Drosophila* (Lis y Wu, 1993). La re-activación de la transcripción en el gen *hsp70* humano a partir de un sitio de pausa requiere la acción del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF así como del activador HSF1 (Brown et al., 1996; Brown y Kingston, 1997). Un ejemplo en *S. cerevisiae* es la activación por Gal4p, que implica la elongación de un pequeño transcrito sintetizado por una ARN polimerasa II que permanece bloqueada en una región próxima al promotor. Esta activación requiere la fosforilación del CTD de la polimerasa (Akhtar et al., 1996). Estos resultados han llevado a proponer un modelo según el cual, en estos genes, existirían dos tipos de complejos de transcripción: uno *no-procesivo* y otro *procesivo*. En el estado no activado del promotor la forma predominante sería la no-procesiva, y en el activado la procesiva. Según este modelo, la función de los activadores transcripcionales consistiría en aumentar la procesividad del complejo de la ARN polimerasa (Yankulov et al., 1994). Esto abre la posibilidad de que algunos mecanismos de regulación de la transcripción que aparentemente operan a nivel de iniciación, tengan un componente de regulación a nivel de elongación.

Las pausas o bloqueos de la ARN polimerasa pueden deberse a la presencia de determinadas secuencias, a la disminución de la concentración intracelular de nucleótidos, a errores en la incorporación de ribonucleótidos, a la formación de estructuras secundarias del ARN o a la presencia de proteínas en el ADN, entre ellas las que determinan la estructura cromatínica (Bentley, 1995). Existen factores de transcripción cuya función consiste en permitir a la ARN polimerasa II evitar dichas pausas. Entre estos factores está TFIIS, que permite avanzar a la polimerasa a través de sitios de pausa mediante un mecanismo que conlleva el corte del último nucleótido incorporado en el transcrito naciente (Reines, 1994). El gen *PPR2*, que codifica el factor TFIIS en *S. cerevisiae*, está conservado en especies tan divergentes como arqueobacterias, levaduras y humanos (Reines et al., 1996). Los mutantes *ppr2* son sensibles a agentes como el 6-azauracilo que reducen la concentración intracelular de ribonucleótidos (Exinger y Lacroute, 1992). Otros factores implicados en elongación son TFIIF, la elongina (SIII) y ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*). La función de estos factores, a diferencia de TFIIS, no consiste en la liberación a la ARN polimerasa II de un sitio de pausa. Es posible que actúen aumentando la procesividad de la polimerasa y, por tanto, disminuyendo la probabilidad de una parada de la transcripción en sitios críticos de pausa (Reines et al., 1996).

Una barrera importante para el avance de la transcripción lo constituye la organización cromatínica del ADN. La ARN polimerasa II requiere factores adicionales que permitan la elongación de la transcripción a través del ADN

organizado en nucleosomas. Se han identificado diferentes complejos con capacidad de remodelar la estructura de la cromatina. En levaduras, se ha implicado al complejo SWI/SNF en remodelación de la estructura de la cromatina durante la elongación de la transcripción (Brown et al., 1996; Brown y Kingston, 1997). Otros complejos con actividad de remodelación de la cromatina son NURF (Tsukiyama y Wu, 1995) y CHRAC (Varga-Weisz et al., 1997) purificados a partir de extractos de *Drosophila*, y el complejo SWI/SNF en humanos (Kwon et al., 1994; Wang et al., 1996). Estos complejos funcionan permitiendo el acceso de factores a sus sitios de unión, pero no se ha demostrado un papel claro en remodelación de la cromatina durante la elongación. Recientemente, se ha aislado a partir de embriones de *Drosophila* un complejo que facilita la elongación de la transcripción a través de cromatina organizada. Este factor, denominado FACT (*facilitates chromatin transcription*), no es necesario para la formación del complejo de iniciación de la transcripción ni para la incorporación del primer ribonucleótido en el transcrito naciente, pero sí es indispensable para que la polimerasa pueda elongar a través de la cromatina (Orphanides et al., 1998).

En definitiva, la elongación de la transcripción se nos presenta como un proceso complejo con un papel importante en la regulación de la transcripción.

I.5.3. Acoplamiento de la transcripción a otros procesos metabólicos del ADN

Aunque tradicionalmente se ha estudiado la transcripción del ADN como un proceso independiente del resto de fenómenos que se dan en el núcleo de las células eucarióticas, existen evidencias de un acoplamiento de la transcripción con otros procesos metabólicos del ADN. El ejemplo más paradigmático es el acoplamiento de la transcripción con la reparación a través del factor general de transcripción TFIIH en eucariotas. Este factor parece ser responsable de la fosforilación del CTD de la ARN polimerasa II y está implicado en el avance de la polimerasa a lo largo del ADN durante la iniciación de la transcripción mediante una función helicasa. Además contiene proteínas de la maquinaria de reparación por escisión (NER) acoplada a la transcripción (Aboussekhra y Wood, 1994; Cleaver, 1994; Drapkin et al., 1994). La fosforilación del CTD de la ARN polimerasa II es esencial para la iniciación de la transcripción y para la disociación del complejo elongante del resto del complejo protéico ensamblado en el promotor. La actividad quinasa responsable de la fosforilación del CTD radica en la subunidad Kin28p de *S. cerevisiae*, o en su homóloga CDK7/MO15 en humanos. Por otro lado, TFIIH posee un actividad helicasa bidireccional implicada en la elongación durante la iniciación de la transcripción. Las proteínas identificadas de TFIIH con actividad helicasa son Rad25p/Ssl2p y Rad3p de *S. cerevisiae*, cuyas homólogas en humanos son XPB y XPD respectivamente. Estas mismas helicasas son fundamentales para un tipo específico de reparación por escisión denominado "reparación acoplada a transcripción" o TCR (del inglés

transcription-coupled repair). Este mecanismo de reparación implica la eliminación de daños en el ADN por escisión de un oligonucleótido que contiene la/s base/s dañada/s y nueva síntesis de ADN. El proceso requiere la actividad helicasa proporcionada por Rad25p (XPD) y Rad3p (XPB), que se acoplan con el resto de la maquinaria de reparación por escisión (Svejstrup *et al.*, 1996; Hoeijmakers *et al.*, 1996). El mecanismo de TCR se da en aquellas regiones del genomio con actividad transcripcional y concretamente en la cadena que se transcribe. Mutaciones en los genes homólogos humanos son responsables de enfermedades como la *xeroderma pigmentosum*, cuyos síntomas están relacionados con defectos en reparación de ADN. En este tipo de enfermedades se observan a menudo síntomas "colaterales" más fácilmente atribuibles a defectos transcripcionales motivados por un factor TFIIH no funcional que a defectos en reparación (Bootsma y Hoeijmakers, 1993).

Otro fenómeno que sugiere una asociación entre la transcripción y la reparación, es la relación entre la actividad transcripcional y la tasa de mutación. En levaduras se han detectado altos niveles de mutación en genes que son activamente transcritos (Datta y Jinks-Robertson, 1995). En mamíferos, el mecanismo de hiper-mutación implicado en la producción de las inmunoglobulinas está asociado a la transcripción de sus genes (Goyenechea *et al.*, 1997).

I.6. Recombinación y transcripción en mutantes *hpr1Δ*

La relación entre los distintos procesos metabólicos del ADN, bien por vía directa mediante una asociación entre las distintas maquinarias moleculares, o bien de forma indirecta como consecuencia del efecto que tiene cada proceso sobre el ADN, es de gran importancia para entender los mecanismos responsables de la inestabilidad del genomio. Un organismo modelo ideal para estudiar el origen de la inestabilidad genómica y su relación con otros procesos del metabolismo del ADN es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El aislamiento de mutantes de recombinación en levaduras ha permitido establecer en muchos casos una relación entre ésta y otros procesos como la transcripción (ver sección I.4.).

Entre los genes aislados cuyas mutaciones provocan un aumento de la inestabilidad genómica en *S. cerevisiae* se encuentra el gen *HPR1*, identificado en una búsqueda de mutantes de levadura con fenotipo de hiper-recombinación (Aguilera y Klein, 1989a). Los mutantes *hpr1Δ* presentan un aumento de recombinación específico de secuencias repetidas directas (Aguilera y Klein, 1990; Santos-Rosa y Aguilera, 1994), sin ningún efecto aparente sobre la recombinación entre repeticiones invertidas, entre cromosomas homólogos o entre cromátidas hermanas (Aguilera y Klein, 1989a; Santos-Rosa y Aguilera, 1994). La recombinación observada en los mutantes *hpr1Δ* es parcialmente dependiente

tanto de *RAD52* como de *RAD1* (Santos-Rosa y Aguilera, 1994), lo que implica que se produce por los mismos mecanismos que en estirpes silvestres. La hipótesis más plausible consiste en que la carencia de Hpr1p en la célula aumenta la frecuencia de los sucesos que inician el proceso de recombinación, como son los cortes de doble cadena o la generación de extremos libres de ADN. De acuerdo con esta hipótesis los mutantes *hpr1Δ* presentan una alta tasa de pérdida de cromosomas (Santos-Rosa y Aguilera, 1994).

Además del fenotipo de recombinación de *hpr1Δ* se han definido otros fenotipos relacionados con la expresión génica como son la termosensibilidad y la incapacidad de activar la expresión a partir de promotores de diferentes genes (Fan y Klein, 1994; Zhu *et al.*, 1995). Sin embargo, este defecto en la expresión es debido a una incapacidad de las estirpes *hpr1Δ* de transcribir el gen *lacZ* de *E. coli* usado como gen indicador en los experimentos que implicaron originalmente a Hpr1p en activación de la transcripción, y no a un efecto directo sobre los promotores. De hecho, en nuestro laboratorio se ha demostrado un papel de Hpr1p en la elongación de la transcripción (Chávez y Aguilera, 1997).

Para que se de hiper-recombinación entre repeticiones directas de ADN en los mutantes *hpr1Δ* es necesario que se produzca transcripción entre las repeticiones. El fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* depende del tipo de secuencia localizada entre las repeticiones (Prado *et al.*, 1997). Así mismo, los defectos en la elongación de la transcripción observados en los mutantes *hpr1Δ* dependen de la naturaleza de la secuencia que se transcribe. El efecto más acusado se ha observado en secuencias de origen bacteriano como el gen *lacZ* o regiones del plásmido pBR322. En estos mutantes existe una relación directa entre la incapacidad de transcribir determinadas secuencias de ADN y la hiper-recombinación. Aquellas secuencias que pueden ser transcritas en mutantes *hpr1Δ* no confieren hiper-recombinación cuando están localizadas entre repeticiones directas. Por el contrario, secuencias como el gen *lacZ*, cuya transcripción está fuertemente afectada en mutantes *hpr1Δ*, provocan un aumento de hasta 2000 veces en el nivel de deleciones cuando se ubican entre repeticiones directas (Chávez y Aguilera, 1997). Estos resultados han llevado a proponer un modelo según el cual los defectos en la elongación de la transcripción que se dan en los mutantes *hpr1Δ* provocarían daños en el ADN que podrían ser reparados mediante recombinación entre secuencias repetidas adyacentes. En el caso de que estas secuencias repetidas no existieran, sería más difícil reparar esos daños, produciéndose un eventual pérdida de la molécula de ADN dañada. Esto último explicaría la alta tasa de pérdida de cromosomas (Santos-Rosa y Aguilera, 1994) y el aumento en la inestabilidad de plásmidos dependiente de transcripción observados en estirpes *hpr1Δ* (Chávez y Aguilera, 1997).

Poco se sabe respecto a la naturaleza molecular del suceso iniciador de

recombinación que se produce durante la elongación en ausencia de Hpr1p. Puede ocurrir que una polimerasa bloqueada genere estructuras más sensibles a nucleasas endógenas o a daños producidos por agentes intracelulares que generen cortes en el ADN. Una alternativa es que se produzca una colisión entre las maquinarias de transcripción y replicación del ADN que genere extremos libres recombinogénicos, un fenómeno observado en *E. coli* (Vilette *et al.*, 1995). También es difícil, a partir de los datos obtenidos hasta ahora, determinar cuál es la función exacta de Hpr1p en la elongación de la transcripción. El hecho de que Hpr1p presente una homología del 48% en la región carboxilo terminal con Top1p, una topoisomerasa de tipo I de ADN, y que los dobles mutantes *hpr1 top1*, *hpr1 top2* y *hpr1 top3* crezcan muy mal (Aguilera y Klein, 1990), deja abierta la puerta para una posible función de Hpr1p relacionada con topoisomerasas durante la elongación. Otra posibilidad es que la proteína Hpr1p actúe como un factor de elongación aumentando la procesividad de la ARN polimerasa II o impidiendo eventuales bloqueos de la maquinaria de transcripción en sitios crípticos de pausa (Chávez y Aguilera, 1997).

I.7. Supresores de *hpr1Δ*

Para conocer más acerca de la función de Hpr1p se había realizado en nuestro laboratorio un aislamiento de mutaciones supresoras del fenotipo hiper-recombinador de *hpr1Δ*. Se aislaron 5 grupos de complementación denominados *hrs* (del inglés *hyper-recombination suppressor*) (Santos-Rosa y Aguilera, 1995). De entre ellos, sólo los mutantes *hrs1* y *hrs2* suprimen completamente el fenotipo de hiper-recombinación provocado por *hpr1Δ*. El gen *HRS1* se ha clonado y secuenciado (Santos-Rosa *et al.*, 1996) y ha resultado ser idéntico a *PGD1*, un gen clonado paralelamente como un supresor multicopia de una mutación supresora de mutaciones en el gen estructural de la ARN polimerasa mitocondrial, *RPO41* (Bröhl *et al.*, 1994). Hrs1p presenta un dominio de poliglutaminas en el extremo carboxilo terminal, típico de factores de transcripción. De ahí el nombre *PGD1* (*Poly-glutamine domain*) (Bröhl *et al.*, 1994). Por métodos de inmunofluorescencia se ha demostrado en nuestro laboratorio que la proteína Hrs1p/Pgd1p es una proteína nuclear. Experimentos preliminares sugieren un posible papel en expresión génica (Santos-Rosa *et al.*, 1996).

Entre otras características interesantes de los genes *hrs*, cabe destacar la sensibilidad al agente alquilante MMS de los mutantes *hrs2* en fondo *hpr1Δ* y el fenotipo mutador de *hrs4* (Santos-Rosa y Aguilera, 1995), lo cual sugiere nuevas conexiones entre los procesos de recombinación, transcripción y reparación del ADN

I.8. Objetivos

Para comprender la función de Hpr1p en la célula y el origen de la inestabilidad de secuencias repetidas en los mutantes *hpr1Δ*, hemos considerado objetivos fundamentales, por un lado, clonar el gen *HRS2* y caracterizar sus mutantes nulos, y por otro, definir la función del gen *HRS1*, en particular, la relacionada con la transcripción

Además, hemos querido identificar nuevos genes de levadura con función análoga o relacionada con Hpr1p. Para ello, hemos buscado genes que, localizados en un plásmido multicopia, supriman los fenotipos de termosensibilidad y de transcripción de los mutantes *hpr1Δ*. La identificación de genes funcionalmente análogos a *HPR1* contribuirá a descifrar su función en la célula y a entender el origen de la inestabilidad genómica de las secuencias repetidas.. Estos factores además de facilitar el avance de la polimerasa durante la elongación, están implicados en la unión de algunos activadores transcripcionales a sus sitios de unión en los promotores.

II. RESULTADOS

II.1. CLONACIÓN DEL GEN *HRS2/SRB2* Y ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN, REPARACIÓN Y EXPRESIÓN GENICA EN DIFERENTES MUTANTES *srb2*

Entre los mutantes *hrs* aislados por su fenotipo de supresión de la hiper-recombinación inducida por *hpr1Δ*, uno de ellos, el portador de la mutación *hrs2-1*, además de ser el único junto al mutante portador de la mutación *hrs1-1*, en el que la frecuencia de deleciones en fondo *hpr1Δ* era similar a la del tipo silvestre, presentaba sensibilidad al agente alquilante MMS (Santos-Rosa y Aguilera, 1995). Esto sugería una posible función del gen *HRS2* en reparación de ADN. Por otro lado, resultaba interesante su efecto parcial de supresión del defecto en expresión génica de las estirpes *hpr1Δ* (Santos-Rosa y Aguilera, 1995). El conocimiento de la función del gen *HRS2* contribuiría a entender cómo la mutación *hpr1Δ* inducía la recombinación entre repeticiones directas, así como a definir una posible relación entre los procesos de recombinación, reparación y expresión génica en la célula. Decidimos, por tanto, clonar el gen *HRS2* y realizar la caracterización funcional tanto del mutante *hrs2-1* aislado originalmente, como de los mutantes nulos *hrs2Δ*.

II.1.1. Clonación del gen *HRS2*

Para clonar el gen *HRS2* aprovechamos el fenotipo de sensibilidad a MMS de las estirpes *hrs2-1*. Transformamos la estirpe haploide *hpr1Δ hrs2-1* SS713B-1A con la genoteca de ADN genómico MW90, construida en el plásmido episómico YEp351 (Waldherr *et al.*, 1993) y con una genoteca de ADN genómico construida en el plásmido centromérico pBS32 (F. Spencer y P. Hieter, sin publicar). Ambas genotecas estaban basadas en el gen *LEU2*, usado como marcador. Seleccionamos transformantes Leu⁺ en medio SC-leu suplementado con 0.017% de MMS. Seleccionamos aquellas colonias que crecieron en dicho medio como candidatas portadoras de plásmidos con un inserto capaz de complementar la sensibilidad a MMS conferida por *hrs2-1*. De un total de aproximadamente 80000 transformantes obtenidos con la genoteca MW90 y 27000 con la genoteca basada en pBS32 seleccionamos 31 candidatos (16 y 15 de cada genoteca respectivamente) resistentes a MMS. De ellos, 6 transformantes (4 y 2 de cada genoteca respectivamente) mostraban una correlación entre el fenotipo Leu⁺ y la capacidad de restablecer en el doble mutante *hpr1Δ hrs2-1* SS713B-1A tanto la resistencia a MMS como el fenotipo hiper-recombinador de la mutación *hpr1Δ*. Para determinar el efecto en recombinación utilizamos el sistema de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* (Figura 4) presente en la estirpe SS713B-1A. La recombinación entre las repeticiones de *leu2-k* causa la pérdida de los genes *ADE2* y *URA3* localizados entre ellas. Los recombinantes forman colonias rojas (Ade⁻) y resistentes a FOA (Ura⁻). En un mutante *hpr1Δ* la alta frecuencia de deleciones da lugar a colonias con sectores rojos en medio completo. El aislamiento y análisis de restricción de los plásmidos de los 6 transformantes seleccionados reveló que habíamos aislado tres plásmidos diferentes (De los

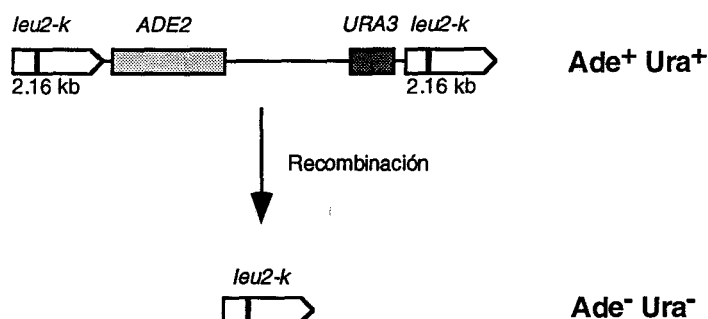


Figura 4. Sistema de recombinación *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. Localizado en el cromosoma III, consiste en una repetición directa de 2.16 kb que contiene el alelo *leu2-k*. Entre ambas repeticiones hay un fragmento de 11 kb que contiene los genes *ADE2* y *URA3*. La recombinación entre las repeticiones produce la delección de una de ellas y de la región intermedia. En las estirpes utilizadas, las colonias portadoras del sistema son blancas y sensibles a FOA (Ade⁺ Ura⁺). Las células recombinantes se pueden detectar porque dan lugar a colonias rojas y resistentes a FOA (Ade⁻ Ura⁻). La línea delgada indica ADN de bacteria. La mutación *leu2-k* se representa como una línea gruesa vertical.

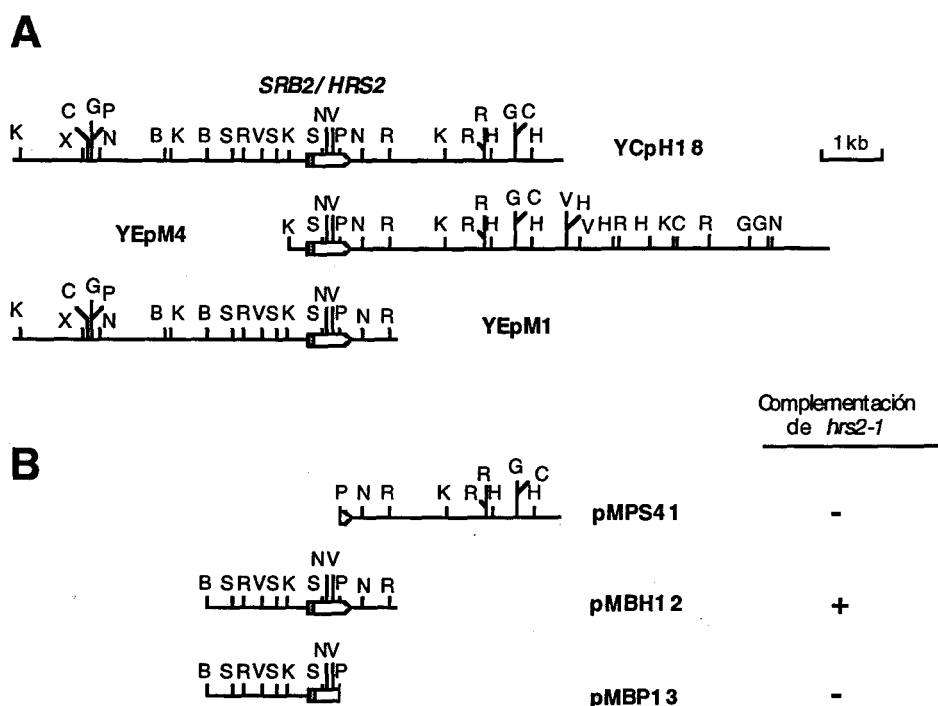


Figura 5. Estructura de la región de *HRS2/SRB2*. (A) Mapas de restricción de los insertos de los tres plásmidos aislados, YCpH18, YEpM4 y YEpM1, que complementan la mutación *hrs2-1*. (B) Análisis de distintas delecciones de la región de *HRS2/SRB2*. Se muestran los distintos fragmentos

de los insertos subclonados y su capacidad de complementar la mutación *hrs2-1* (+: complementa; -: no complementa). El gen *HRS2/SRB2* se representa como una flecha que indica el sentido de la transcripción del gen. La región sombreada corresponde al intrón de la zona 5' del gen. Las abreviaciones de las dianas de restricción son: B, *Bam*HI; C, *Cl*aI; G, *Bgl*II; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; R, *Eco*RI; S, *Sac*II; V, *Eco*RV; X, *Xho*I.

candidatos obtenidos con la genoteca MW90, tres de ellos portaban el plásmido YEpM1, y uno el plásmido YEpM4. Los dos candidatos obtenidos con la genoteca basada en pBS32 portaban el plásmido YCpH18). Los mapas de los tres insertos diferentes se muestran en la Figura 5A. Los tres insertos solapan en una región de 1.9 kb. Retransformamos la estirpe *hpr1Δ hrs2-1* SS713B-1A con los tres plásmidos. En todos los casos los transformantes Leu⁺ eran resistentes a MMS y mostraban los niveles de recombinación propios de una estirpe *hpr1Δ*. Según este resultado la región solapante de 1.9 kb complementaba la mutación *hrs2-1*. La deleción de distintas regiones de los fragmentos clonados (Figura 5B), confirmó que la única diana *Pst*I de la región solapante estaba dentro del gen *HRS2*.

II.1.2. Identificación de *HRS2* como *SRB2*

Secuenciamos 83 pb desde la diana *Pst*I de la región de *HRS2* hacia la derecha (Figura 5). La comparación de la secuencia obtenida con los bancos de datos GenBank 88.0 y EMBL 42.0 usando el algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) mostró que *HRS2* era idéntico al gen *SRB2* (Koleske *et al.*, 1992), un componente del complejo SRB del holoenzima de la ARN polimerasa II (Thompson *et al.*, 1993) (ver *Introducción*, sección I.5.1.). El análisis comparativo de los mapas de restricción de nuestros fragmentos clonados con los de la región de *SRB2* confirmó que nuestros clones contenían el gen *SRB2* completo.

II.1.3. Clonación de la mutación *hrs2-1*

Con objeto de conocer la naturaleza de la mutación *hrs2-1* y para corroborar que la mutación estaba en el gen *SRB2*, decidimos clonar mediante rescate alélico el alelo *hrs2-1* aislado originalmente (Santos-Rosa y Aguilera, 1995) para posteriormente secuenciarlo. Para ello, cortamos el plásmido pMBH12 con *Eco*RV (digestión parcial), de forma que obtuvimos un fragmento lineal de 8 kb carente de 1145 pb de la región de *SRB2* (357 pb correspondientes a la región 5' codificante de *SRB2*) y con *Nco*I para obtener un fragmento lineal de 8.6 kb carente de 570 pb de la región de *SRB2* (439 pb correspondientes a la región 3' codificante de *SRB2*) (Figura 6). Usamos ambos fragmentos independientemente para transformar la estirpe *hpr1Δ hrs2-1* SS713B-1A. Los transformantes se seleccionaron en SC-leu. Obtuvimos 173 transformantes con el fragmento de 8 kb de la restricción con *Eco*RV. Todos complementaban el fenotipo de recombinación de la mutación *hrs2-1*, es decir, formaban colonias con sectores

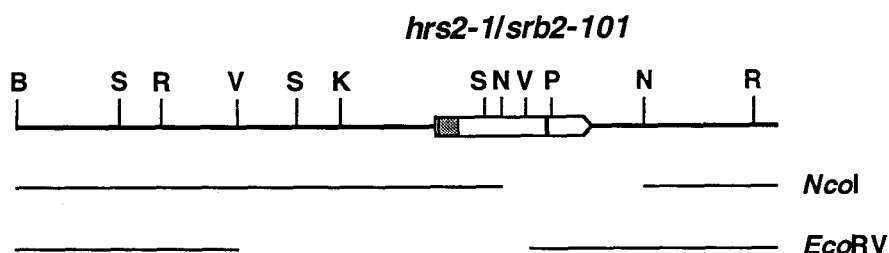


Figura 6. Clonación de la mutación *hrs2-1/srb2-101*. Se muestra la región del alelo *srb2-101* que corresponde al inserto de pMBH12. La línea vertical gruesa indica la localización de la mutación (ver Figura 5 para más detalles). Las líneas finas horizontales indican los fragmentos del inserto presentes en el plásmido pMBH12 tras digerirlo con *NcoI* o *EcoRV*, que se utilizaron para el rescate alélico de la mutación *srb2-101*.

rojos, indicando que el "hueco" había sido reparado con un fragmento silvestre de ADN genómico. Con el fragmento de 8.6 kb de la restricción con *NcoI* obtuvimos 1600 transformantes. Ninguno complementaba la mutación *hrs2-1*, es decir, todos formaban colonias blancas y eran sensibles a MMS. Esto indicaba que el "hueco" había sido reparado con un fragmento de ADN genómico que contenía la mutación *hrs2-1*. Aislamos los plásmidos de 10 de estos transformantes. Todos mostraban el mismo patrón de restricción que el plásmido pMBH12. Seleccionamos uno de ellos (pHRS21), al que previamente se le confirmó su incapacidad de complementar el fenotipo de *hrs2-1*, para su secuenciación. Previamente subclonamos el inserto en dos partes en el plásmido pRS315, generando los plásmidos pRS-03 y pRS-09 (ver *Materiales y Métodos* sección IV.3.). La secuenciación de ambos insertos cubría los 490 pb del extremo 3' de la región codificante de *SRB2*, los cuales incluyen la región recuperada por rescate alélico. El único cambio observado en la secuencia obtenida fue una transición de G a A, la cual determina un cambio de Gly por Asp en la posición 150 de *Srb2p*. Este resultado confirma que *hrs2-1* es un alelo del gen *SRB2*. Decidimos re-denominar al alelo *hrs2-1, srb2-101*.

II.1.4. Delección de *HRS2/SRB2*

Para obtener el mutante nulo *srb2Δ* seleccionamos el gen *SRB2* genómico por reemplazamiento génico (Rothstein, 1983). Construimos el alelo mutante *srb2Δ102::HIS3* reemplazando el fragmento *SacII-PstI* de 0.3 kb interno de *SRB2* por un fragmento *SacII-PstI* de 1.32 kb que contiene el gen *HIS3* (Figura 7A). Transformamos la estirpe haploide *hpr1Δ W19Y-1B* con el fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2.71 kb del plásmido pSRB35H, que contiene el alelo *srb2Δ102::HIS3* y

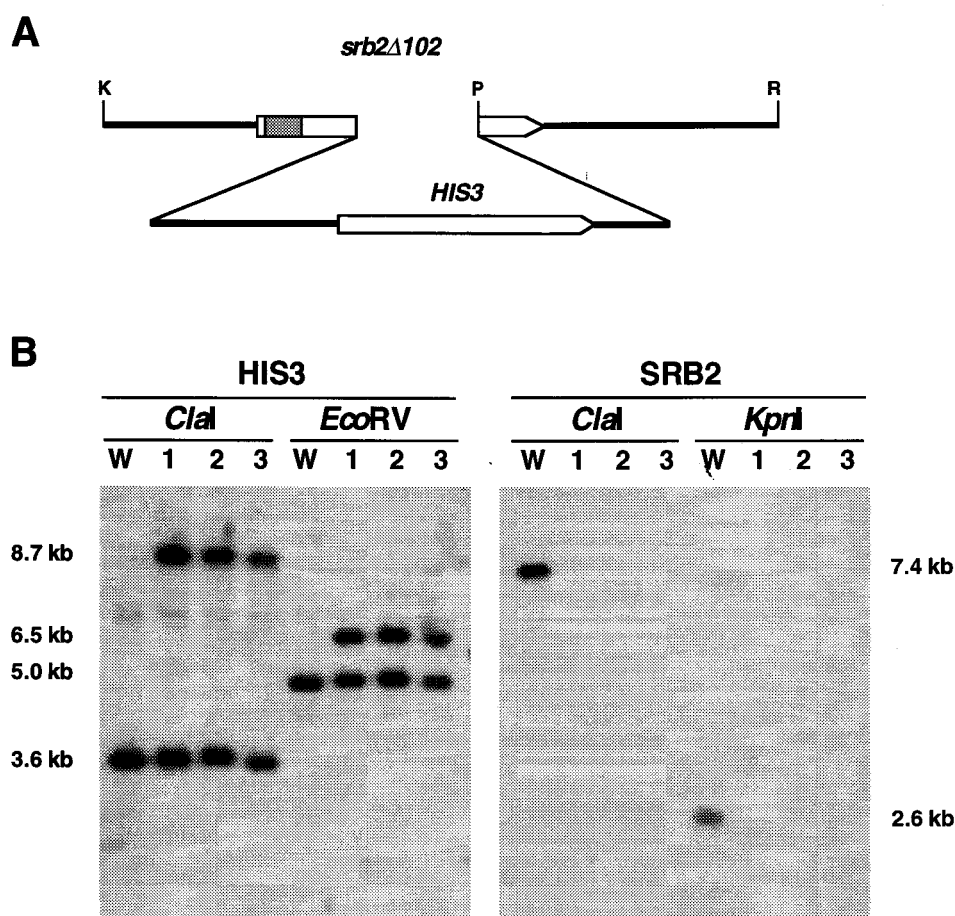


Figura 7. Delección del gen *HRS2/SRB2*. (A) Estructura del alelo *srb2Δ102::HIS3*. Se sustituyó un fragmento interno *SacI-PstI* de 310 pb del gen *SRB2* por el fragmento *BamHI-XhoI* de 1.32 kb que contiene el gen *HIS3* para dar lugar al plásmido pSRB35H tal como se indica en *Materiales y Métodos* (sección IV.3.). El fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2.71 kb que lleva el alelo *srb2Δ102::HIS3*, se utilizó para transformar la estirpe *hpr1Δ* W19Y-1B, tras lo cual se seleccionaron varios transformantes *His*⁺. Las flechas indican la longitud y el sentido de la transcripción de cada gen. La región sombreada corresponde al intrón de *SRB2*. Las abreviaturas de los sitios de restricción son: K, *KpnI*; P, *PstI*; R, *EcoRI*. (B) Análisis de *Southern* de la delección. Se analizaron la estirpe parental W19Y-1B (W) y tres transformantes *His*⁺ (1, 2 y 3) de la misma. El ADN genómico se digirió con las enzimas indicadas. Las sondas utilizadas fueron el fragmento *BamHI-XhoI* de 1.32 kb que contiene el gen *HIS3* (sonda HIS3) y el fragmento interno *SacI-PstI* de 310 pb del gen *SRB2* (sonda SRB2). Los tres transformantes presentan las bandas de 8.7 kb y 6.5 kb esperadas al cortar con *Clal* y *EcoRV* respectivamente, e hibridar con la sonda HIS3. Las bandas de 3.6 kb y 5.0 kb corresponden al alelo *his3* del cromosoma XV. Como se esperaba, ninguno de los tres transformantes muestra las bandas de 7.4 kb (digestión *Clal*) y de 2.6 kb (digestión *KpnI*) correspondientes a la región delecionada de *SRB2*.

seleccionamos transformantes His⁺. Las colonias seleccionadas en medio SC-his presentaban un tamaño muy pequeño, acorde con la observación de que la delección del gen *SRB2* provocaba un crecimiento muy lento de la levadura (Nonet y Young, 1989). El análisis de *Southern* de tres transformantes His⁺ obtenidos confirmó que eran portadores del alelo *srb2Δ102::HIS3* (Figura 7B). El análisis de tétradas del cruce de uno de ellos con la estirpe *hpr1Δ srb2-101* WS1971-3D mostró la segregación esperada 2His⁺:2His⁻. La segregación del alelo *srb2Δ102::HIS3* se comprobó, de nuevo, mediante análisis de *Southern* a dos tétradas completas. El patrón esperado para la delección segregaba coincidiendo con el fenotipo His⁺ de las esporas (dato no mostrado).

II.1.5. Recombinación en estirpes *srb2Δ102*

Analizamos el nivel de recombinación del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en 8 esporas procedentes de dos tétradas completas del diploide anterior, a partir de la formación de colonias ("papilas") resistentes a FOA (Ura⁻). En todos los casos la cantidad de papilas en SC+FOA era similar a la del tipo silvestre, indicando que la mutación *srb2Δ* suprime el fenotipo hiper-recombinador de *hpr1Δ*.

Para cuantificar el efecto de *srb2Δ* tanto en recombinación inducida por *hpr1Δ* como en recombinación espontánea, determinamos la frecuencia de delecciones del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en distintas estirpes mutantes (ver *Materiales y Métodos* sección IV.5.). La Tabla 1 muestra que la mutación *srb2Δ* redujo la frecuencia de delecciones de las estirpes *hpr1Δ* a niveles silvestres. Así mismo, las frecuencias de recombinación de los mutantes simples *srb2-101* y *srb2Δ102* fueron similares a la del silvestre. Por tanto, *SRB2* es necesario para la formación de delecciones inducidas por *hpr1Δ* pero no para la formación de delecciones espontáneas.

Para confirmar que el menor número de colonias resistentes a FOA (Ura⁻) obtenidas de las estirpes *hpr1Δ srb2Δ* era una consecuencia directa de un menor nivel de recombinación entre repeticiones y no de un artefacto debido al pobre crecimiento de estas estirpes, decidimos analizar las delecciones del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* a nivel molecular. Para ello analizamos por *Southern* distintas estirpes *hpr1Δ srb2* portadoras de dicho sistema cultivadas en medio rico YEPD. Como se observa en la Figura 8, las estirpes *hpr1Δ* mostraron una banda débil de 7.3 kb que corresponde a la copia simple de *leu2-k* que queda en el cromosoma tras la delección del sistema. Debido a la alta frecuencia a la que esto sucede en un fondo genético *hpr1Δ*, esta banda es detectable mediante *Southern* en estos mutantes, pero no en estirpes silvestres. En las estirpes *hpr1Δ srb2Δ102* las únicas bandas detectables fueron las correspondientes al sistema sin deleccionar, confirmándose que la delección de *SRB2* suprime el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ*.

TABLA 1. Frecuencia de deleciones (x10⁶) en el sistema de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en diferentes estirpes mutantes *hrs2/srb2* en fondos genéticos silvestre y *hpr1Δ*

Genotipo	estirpe	Frecuencia ^a
silvestre	AYW3-1B	56
	A3Y3A	73
	W19Y-1B [<i>HPR1</i>]	28
<i>hpr1Δ</i>	W19Y-1B	79000
	HDY3-7D [<i>SRB2</i>]	47000
	HDSB-2B [<i>SRB2</i>]	130000
<i>hrs2-1(srb2-101)</i>	SB71-5A	42
	SB71-8A	70
<i>srb2Δ</i>	HDY3-7D [<i>HPR1</i>]	49
	HDSB-2B [<i>HPR1</i>]	150
<i>hpr1Δ hrs2-1(srb2-101)</i>	HDSB-2A	78
	HDSB-2C	64
<i>hpr1Δ srb2Δ</i>	HDY3-7D	130
	HDSB-2B	190

^a Los recombinantes se seleccionaron en medio SC+FOA, sin leucina en el caso de estirpes portadoras de plásmidos. En estos casos el gen relevante del plásmido se indica entre corchetes. Los plásmidos usados fueron YCpA13 para *HPR1* y pMBH12 para *SRB2*.

II.1.6. Crecimiento de las estirpes *srb2*

Aunque los fenotipos de recombinación conferidos por los alelos *srb2-101* y *srb2Δ102* eran similares, las estirpes *srb2Δ102* crecían mucho más lentamente que las estirpes *srb2-101*. Determinamos el tiempo de generación de estas estirpes en medio rico YEPD mediante la determinación de la D.O.₆₆₀ de sus cultivos líquidos. Este tiempo fue de 92 min. para las estirpes silvestres, 132 min. para las *srb2-101* y 170 min. para las *srb2Δ102*, tanto en fondo silvestre *HPR1* como *hpr1Δ*. Este resultado indica que los alelos *srb2-101* y *srb2Δ102* no son funcionalmente equivalentes.

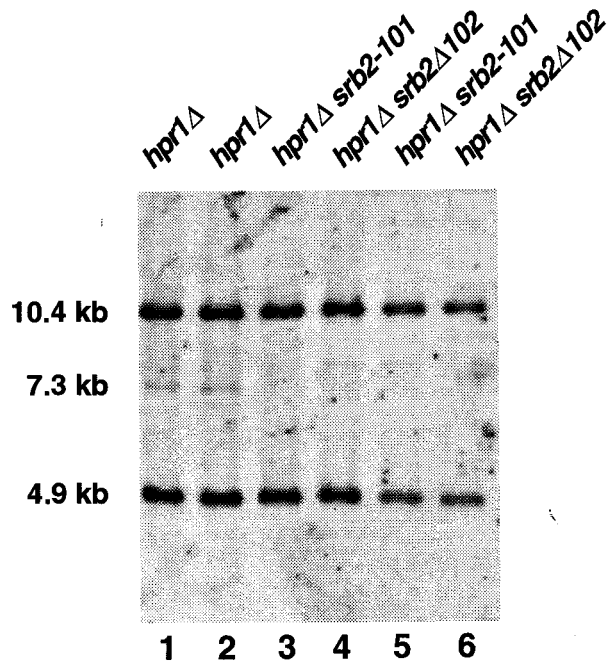


Figura 8. Análisis de *Southern* de distintas estirpes portadoras del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. El ADN genómico extraído de las estirpes cultivadas en medio YEPD se digirió con *Bam*HI. Se usó como sonda el fragmento *Cla*I-*Sal*I de 1.6 kb del gen *LEU2*. Las estirpes analizadas fueron: W19Y-1B (carril 1), HDY3-7C (carril 2), HDSB-2A (carril 3), HDSB-2B (carril 4), HDSB-2C (carril 5) y HDSB-2D (carril 6). El genotipo relevante de cada estirpe se muestra en la parte alta de cada carril. Las bandas de 10.4 kb y 4.9 kb corresponden a las repeticiones de *leu2-k* del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*, mientras que la banda de 7.3 kb corresponde a la copia de *leu2-k* que queda en el cromosoma tras el suceso de recombinación.

II.1.7. Reparación del ADN en mutantes *srb2*

Dado que los mutantes *hpr1Δ hrs2-1(srb2-101)* presentaban un fenotipo de sensibilidad a MMS (Santos-Rosa y Aguilera, 1995) decidimos analizar la capacidad de los mutantes *srb2Δ* de reparar daños producidos por luz ultravioleta (UV) y por MMS (ver *Materiales y Métodos*, secciones IV.8. y IV. 9.). Como se observa en la Figura 9, la viabilidad de las estirpes *srb2-101* y *srb2Δ102* frente a diferentes dosis de luz UV fue similar a las de las silvestres *SRB2* tanto en fondo silvestre *HPR1* como *hpr1Δ*. Según este resultado, *SRB2* no parece estar implicado en la reparación de daños producidos por luz UV.

Para analizar la sensibilidad de los mutantes *srb2Δ* al agente radiomimético MMS, el cual produce cortes de doble cadena en el ADN, determinamos la capacidad de las estirpes de formar colonias en YEPD después de exponerlas a 0.5% de MMS durante diferentes tiempos (*exposiciones cortas a*

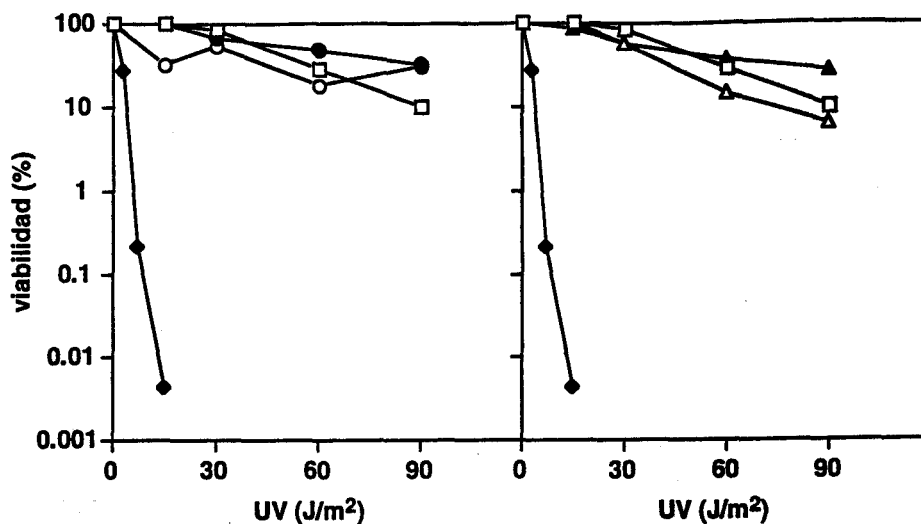


Figura 9. Curvas de viabilidad después de la exposición a distintas dosis de radiación UV. Las estirpes analizadas fueron: silvestre, A3Y3A (□); *srb2-101*, SB71-5A (●); *srb2Δ102*, HDY3-3D (○); *hpr1Δ srb2-101*, SS713B-1A (▲); *hpr1Δ srb2Δ102*, HDY3-7D (Δ); *rad-1*, AF515-2B (◆).

alta concentración de MMS). El mutante nulo *srb2Δ102* presentaba niveles de resistencia a MMS similares a los del silvestre, independientemente de si estas estirpes eran *HPR1* o mutantes *hpr1Δ* (Figura 10). Esto es diferente de lo que se había observado en el mutante *srb2-101* (Santos-Rosa y Aguilera, 1995; Figura 10), claramente sensible a MMS en un fondo *hpr1Δ*. Sin embargo, en experimentos de réplica a placas de YEPD+0.02% MMS habíamos observado una ligera incapacidad de crecimiento de los mutantes *srb2Δ*. Decidimos, por tanto, determinar la viabilidad de estas estirpes en YEPD+0.02% MMS (*exposiciones largas a baja concentración de MMS*). Como se observa en la Figura 11, la mutación *srb2-101* confiere sensibilidad a MMS tanto en fondo silvestre como *hpr1Δ*, mientras que la mutación *srb2Δ102* sólo confiere sensibilidad a MMS en un fondo *hpr1Δ*. Por tanto, la sensibilidad a MMS de los mutantes *srb2* es específica de alelo y se manifiesta fundamentalmente cuando se someten las células a una exposición continuada de MMS.

II.1.8. Expresión génica en mutantes *srb2*

Debido al mal crecimiento de los mutantes *srb2Δ* y al hecho de que *Srb2p* pertenece al complejo de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Koleske *et al.*, 1992), decidimos analizar la expresión génica en nuestras estirpes mutantes. Determinamos los niveles de expresión del gen *lacZ* de *E. coli* fusionado a un promotor *GAL1-CYC1* de levaduras, mediante ensayos de actividad β-galactosidasa. Como se observa en la Tabla 2, las mutaciones *srb2-101* y *srb2Δ102*

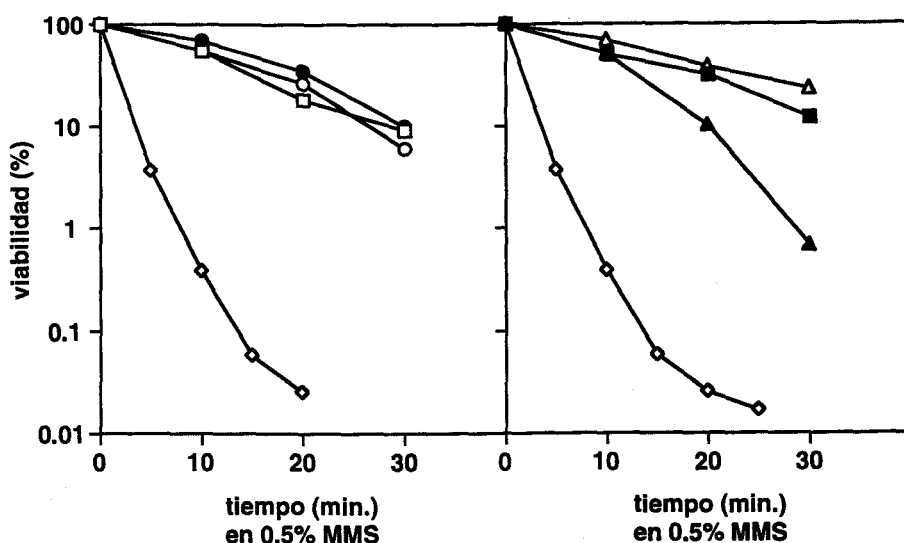


Figura 10. Curvas de viabilidad frente a distintas exposiciones de 0.5% de MMS. Las estirpes analizadas fueron: silvestre, A3Y3A (□); *hpr1Δ*, AYW3-3D (■); *srb2-101*, SB71-5A (●); *srb2Δ102*, HDY3-3D (○); *hpr1Δ srb2-101*, SS713B-1A (▲); *hpr1Δ srb2Δ102*, HDY3-7D (△); *rad52-1*, X260-3A (◇).

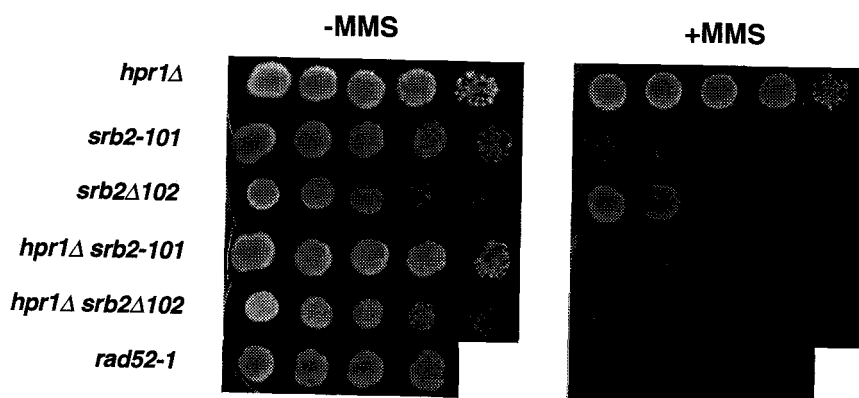


Figura 11. Crecimiento en placas de YEPD (-MMS) o YEPD suplementado con 0.02% de MMS (+MMS). Las estirpes analizadas fueron: AYW3-3D (*hpr1Δ*), SB71-5A (*srb2-101*), HDY3-3D (*srb2Δ102*), SS713B-1A (*hpr1Δ srb2-101*), HDY3-7D (*hpr1Δ srb2Δ102*) y X260-3A (*rad52-1*). Se sembraron 10 μ l de cinco diluciones de un cultivo por cada estirpe y placa. El número aproximado de células inoculadas en cada siembra fue, de izquierda a derecha, 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 y 3×10^2 (este último no se muestra en la estirpe control *rad52-1*).

redujeron esta actividad aproximadamente 3 y 6 veces respectivamente respecto a la del silvestre. Por otro lado, mientras que la mutación *hrs2-1*(*srb2-101*) suprimía parcialmente la falta de expresión observada en mutantes *hpr1Δ*

(Santos-Rosa y Aguilera, 1995; Tabla 2), la mutación nula *srb2Δ102* no la suprimía en absoluto (Tabla 2). Por tanto, el efecto sobre la expresión génica de *srb2-101* es, al igual que la sensibilidad a MMS, específico de alelo.

TABLA 2. Actividad β-galactosidasa (U) de diferentes estirpes mutantes *srb2* portadoras del plásmido pLGSD5, el cual contiene el gen *LacZ* bajo el promotor de *GAL1,10*

Genotipo	β-Galactosidasa (U) ^a	
	Glucosa	Galactosa
silvestre	0.29 ± 0.02	1807.5 ± 123.7
<i>hrs2-1 (srb2-101)</i>	0.12 ± 0.02	574.5 ± 67.1
<i>srb2Δ</i>	0.17 ± 0.01	301.5 ± 112.2
<i>hpr1Δ</i>	0.05 ± 0.01	15.1 ± 2.5
<i>hpr1Δ hrs2-1 (srb2-101)</i>	0.09 ± 0.01	83.1 ± 19.0
<i>hpr1Δ srb2Δ</i>	0.05 ± 0.01	9.6 ± 10.2

^a Los datos muestran la media y la desviación típica de dos determinaciones distintas. Se analizaron las estirpes AYW3-1B (silvestre), SS713B-1A transformada con YCpA13 (*hrs2-1*), HDY3-7D transformada con YCpA13(*srb2Δ*), W19Y-1B (*hpr1Δ*), SS713B-1A (*hpr1Δ hrs2-1*) y HDY3-7D (*hpr1Δ srb2Δ*). Se obtuvieron resultados similares con otras estirpes con los mismos genotipos.

II.1.9. Rezumancia de la mutación *srb2-101*

Dada la especificidad alélica de la mutación *srb2-101* en reparación y expresión génica y teniendo en cuenta que dicha mutación producía un cambio de aminoácido, nos planteamos la posibilidad de que la proteína *Srb2-101p* tuviera actividad rezumante. Para determinar esto, transformamos una estirpe *hpr1Δ srb2-101* con los plásmidos YEpHRS21 y pHRS21, los cuales llevan el alelo *srb2-101* en múltiple número de copias o en una sola copia respectivamente (ver *Materiales y Métodos*, sección IV.3.). Analizamos los fenotipos de recombinación, sensibilidad a MMS y expresión génica asociados a mutaciones en *SRB2*. Como puede observarse en la Tabla 4, la estirpe *hpr1Δ srb2-101* portadora del alelo *srb2-101* en multicopia presentaba una frecuencia de deleciones 20 veces superior a la de la misma estirpe con el mismo alelo en el plásmido unicopia pHRS21. Además, se volvía más resistente a MMS (Tabla 4, Figura 12) y presentaba una menor supresión parcial del defecto en la expresión de la fusión *GAL1-CYC1::lacZ* de la mutación *hpr1Δ*. La complementación parcial de los fenotipos de los mutantes *srb2-101* por la sobreexpresión de la proteína mutante *Srb2-101p*

sugiere que esta tiene una actividad rezumante.

TABLA 3. Caracterización genética de diferentes estirpes *hpr1Δ srb2-101*

Plasmido	Deleciones (x 10 ⁶) ^a	MMS ^a	β-Galactosidasa (U) ^a	
			Glucosa	Galactosa
YEp[-]	56	S	1.01 ± 0.12	193.6 ± 28.4
YCp[SRB2]	28000	R	0.78 ± 0.07	19.2 ± 2.6
YCp[srb2-101]	61	S	1.96 ± 0.49	199.9 ± 76.6
YEp[srb2-101]	1200	R	0.86 ± 0.12	40.6 ± 16.7

^a La frecuencia de deleciones y los niveles de actividad β-galactosidasa se obtuvieron como se explica en las Tablas 1 y 2 respectivamente. Los datos de sensibilidad a MMS (R: resistente; S: sensible) se obtuvieron tal como se indica en la Figura 12. Se analizó la estirpe SS713B-1A (*hpr1Δ srb2-101*) transformada con YEp351 (YEp[-]), pMBH12 (YCp[SRB2]), pHRS21 (YCp[srb2-101]) o YEpHRS21 (YEp[srb2-101]).

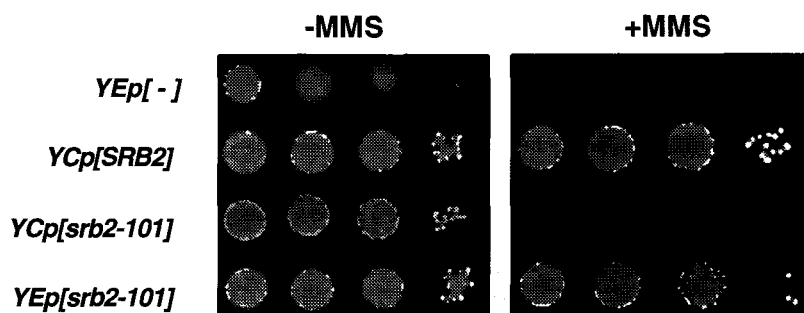


Figura 12. Crecimiento en placas de SC-leu (-MMS) o SC-leu suplementado con 0.017% de MMS (+MMS) de la estirpe *hpr1Δ srb2-101* SS713B-1A transformada con los plásmidos YEp351 (YEp[-]), pMBH12 (YCp[SRB2]), pHRS21 (YCp[srb2-101]) o YEpHRS21 (YEp[srb2-101]). Se sembraron 10 µl de cuatro diluciones de un cultivo por cada transformante y placa. El número aproximado de células en cada siembra fue, de izquierda a derecha, 3x10⁵, 3x10⁴, 3x10³ y 3x10².

II.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN *hrs1Δ*

El gen *HRS1* había sido clonado y secuenciado por complementación del fenotipo de supresión de la mutación *hrs1-1* (Santos-Rosa *et al.*, 1996), una mutación aislada como supresora del fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ*

(Santos-Rosa y Aguilera, 1995). *HRS1* es idéntico al gen *PGD1*, clonado colateralmente como un supresor multicopia de un supresor de una mutación en el gen estructural de la ARN polimerasa mitocondrial, *RPO41* (Bröhl *et al.*, 1994). La proteína Hrs1p posee un dominio de poliglutaminas en la región carboxilo-terminal, típico de activadores transcripcionales. De ahí que se la haya denominado también *PGD1* (*Poliglutamine domain*). El dominio de poliglutaminas es homólogo a una región de Gal1p y de otros factores transcripcionales (Santos-Rosa *et al.*, 1996). Esta relación estructural entre Hrs1p y Gal1p, un componente del complejo "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II, junto con el hecho de que Srb2p, otro componente del mismo complejo, sea también un supresor de la mutación *hpr1Δ* (ver Resultados, sección II.1.), podría estar indicando una relación funcional entre Hrs1p y el "mediador". De acuerdo con esta hipótesis, los mutantes *hrs1Δ* crecían muy lentamente y mostraban niveles reducidos de expresión de una fusión *GAL1-CYC1::lacZ* (Santos-Rosa *et al.*, 1996). Por todo ello decidimos determinar el posible papel de *HRS1* en transcripción analizando el efecto de la mutación *hrs1Δ* sobre la regulación de la transcripción de diferentes genes.

II.2.1. Regulación transcripcional de genes cromosómicos en mutantes *hrs1Δ*

Determinamos el efecto de la mutación *hrs1Δ* en la transcripción de diferentes genes mediante análisis de *Northern*. Analizamos los niveles de transcritos de los genes *GAL1*, *PHO5*, y *HSP26*, cuya expresión está regulada por diferentes factores. La expresión del gen *GAL1* está regulada por la fuente de carbono, de forma que se activa por galactosa y se reprime en presencia de glucosa (St John y Davis, 1981). La expresión del gen *PHO5* se activa ante bajas concentraciones de fósforo inorgánico en el medio (Rudolph y Hinnen, 1987). La expresión del gen *HSP26* se induce en condiciones de estrés térmico (Chen y Peterson, 1993). Para preparar el ARN, cultivamos las estirpes silvestres y *hrs1Δ* en las condiciones de inducción y represión correspondientes que se explican en *Materiales y Métodos* (sección IV.9.). La Figura 13 muestra que la regulación de la expresión de estos genes estaba fuertemente afectada y de forma diferente en cada caso. De este modo, los niveles de ARNm de *GAL1* en condiciones de inducción fueron casi indetectables en las estirpes *hrs1Δ* (Figura 13A). La cuantificación por densitometría de los transcritos mostró niveles 25 veces inferiores a los de las estirpes silvestres. Por tanto, *HRS1* es necesario para la completa activación de la transcripción de *GAL1*. La expresión del gen *ACT1* no se vió afectada por *hrs1Δ* cuando se cultivaron las estirpes en medio con 2% de glucosa (Figura 13A-C). Sin embargo, se observó una reducción significativa de sus niveles de ARNm en presencia de galactosa. De hecho, se había observado previamente que la fuente de carbono en el medio influía sobre la expresión del gen *ACT1* (McLean *et al.*, 1995). Nuestros datos indican que *HRS1* está también implicado en la regulación de la expresión de *ACT1* por fuente de carbono. (Por esta razón, la cantidad de transcrito de *GAL1* está normalizada respecto al ARNr 16S; Figura 13A).

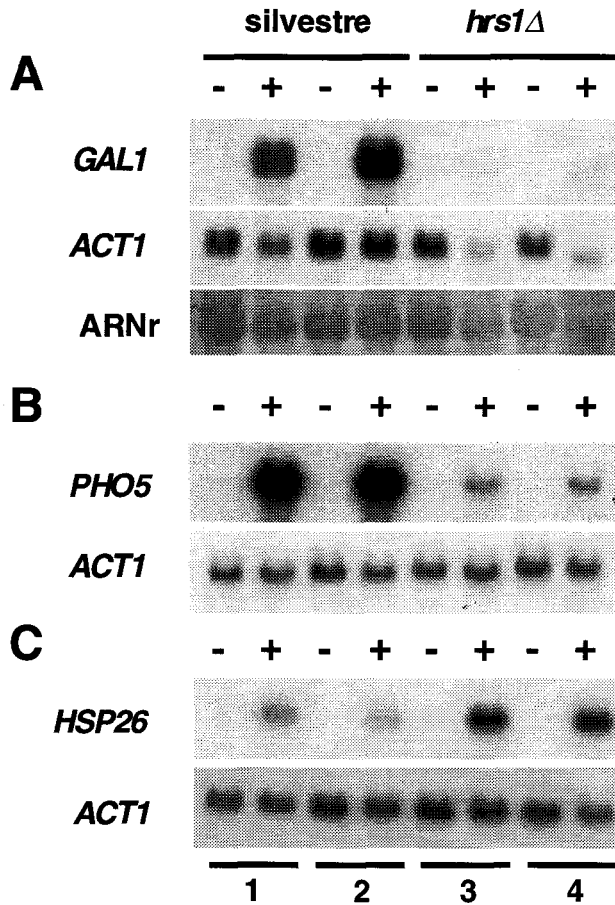


Figura 13. Análisis de Northern del efecto de la mutación *hrs1Δ* en los niveles de ARNm de genes endógenos. Se analizaron los genes regulados *GAL1* (A), *PHO5* (B) y *HSP26* (C) en las condiciones de represión (-) o activación (+) descritas en *Materiales y Métodos* (sección IV.9.). Las estirpes analizadas fueron las silvestres A3Y3A (carril 1) y AYW3-1B (carril 2) y las mutantes *hrs1Δ* SSAB-2C (carril 3) y SSAB-4A (carril 4). Las sondas utilizadas en cada caso fueron: un fragmento interno *AvaI-PvuII* de 0.75 kb del gen *GAL1* (A), un fragmento interno *EcoRI-PstI* de 1.4 kb del gen *PHO5* (B) y un fragmento interno *PstI-BglII* de 1.4 kb del gen *HSP26* (C). Después de cada hibridación se eliminaron las sondas de los filtros y se hibridaron de nuevo con el fragmento *ClaI* de 0.55 kb del gen *ACT1*, el cual se usó como control de la cantidad de ARN cargado en cada pocillo del gel. Debido a que los niveles de ARNm de *ACT1* son inferiores en las estirpes *hrs1Δ* cultivadas en medio con galactosa, se utilizó la tinción con azul de metileno del ARNr 16S para normalizar la cantidad de ARN.

La cantidad de transcrito de *PHO5* producido en condiciones de inducción fue claramente inferior en las estirpes *hrs1Δ* (cuatro veces respecto a la del silvestre) (Figura 13B). Este resultado se confirmó ensayando la actividad fosfatasa ácida, determinada por el gen *PHO5*. La Figura 14 muestra que, en

condiciones de inducción, las estirpes *hrs1Δ* presentan siete veces menos actividad que las silvestres. No se observó diferencia alguna en condiciones de represión. Por tanto, se puede concluir que *HRS1* es necesario también para la completa activación del gen *PHO5*.

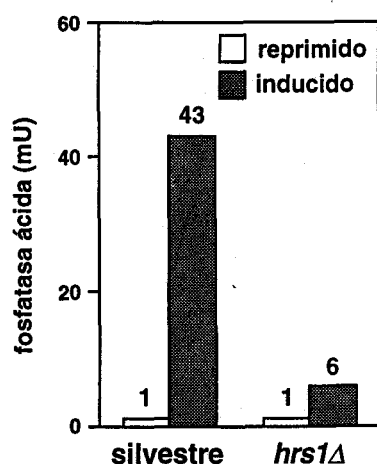


Figura 14. Actividad fosfatasa ácida en las estirpes AYW3-1B (silvestre) y SSAB-2C (*hrs1Δ*) bajo condiciones de represión e inducción. Los valores de actividad se indican encima de cada columna. Las condiciones de represión e inducción son las especificadas en *Materiales y Métodos* (sección IV.9.) para el estudio de la expresión dirigida por el gen *PHO5*. Se obtuvieron resultados similares con las estirpes A3Y3A (silvestre) y SSAB-4A (*hrs1Δ*) (no mostrados). mU.: mili-unidades de actividad enzimática.

Finalmente, la cantidad de transcrito del gen *HSP26* detectada en condiciones de inducción, fue 2.4 veces mayor en los mutantes *hrs1Δ* que en las estirpes silvestres (Figura 13C). Esto confiere a *HRS1* un papel represor en la activación transcripcional del gen *HSP26*. Por tanto, nuestros datos indican que *HRS1* podría estar implicado en la regulación de la activación de la transcripción de una forma tanto positiva como negativa.

En condiciones de represión, los niveles de ARNm de *GAL1*, así como los de *PHO5* y *HSP26*, eran indetectables por este método (Figura 13).

II.2.2. Regulación de la expresión de fusiones *lacZ* en mutantes *hrs1Δ*

Además de los análisis de *Northern* del ARNm, una forma de estudiar la expresión génica consiste en el análisis de la expresión de genes "chivatos" fusionados a diferentes promotores. Uno de estos genes es el gen *lacZ* de *E. coli*, que determina la actividad β-galactosidasa, detectable mediante un sencillo ensayo enzimático (ver *Materiales y Métodos*, sección IV.10.1.).

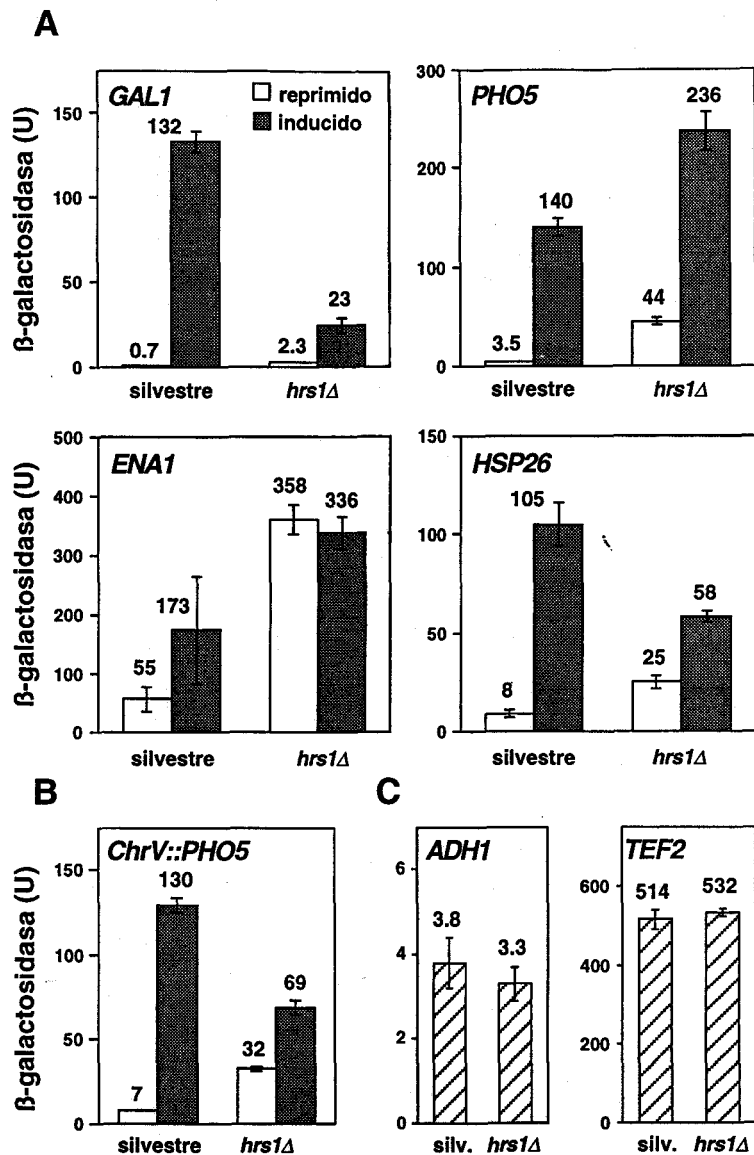


Figura 15. Efecto de la mutación *hrs1Δ* sobre la expresión del gen *lacZ* fusionado a los promotores de los genes *GAL1*, *PHO5*, *HSP26*, *ENA1*, *ADH1* y *TEF2*. Se ensayó la actividad β -galactosidasa de las estirpes AYW3-1B (silvestre) y SSAB-2C (*hrs1Δ*) transformadas con: (A) plásmidos p416GAL1lacZ, pSch135, pFR70 o 26-YEp, los cuales llevan el gen *lacZ* bajo el control de los promotores de *GAL1* (de -416 a -1), *PHO5* (de -541 a +6), *ENA1* (de -1381 a -40) y *HSP26* (de -1500 a -1); (B) plásmido p306PHO5LacZ integrado en el locus *URA3* del cromosoma V, el cual lleva la misma fusión *PHO5::lacZ* que pSCH135, y (C) plásmidos p416ADH1lacZ o p426TEF2lacZ, los cuales llevan el gen *lacZ* bajo el control de los promotores de *ADH1* (de -1500 a -1) y *TEF2* (de -402 a -1) (los números son relativos al primer nucleótido que se traduce en cada caso). Se analizaron dos transformantes independientes por estirpe y plásmido. Se da el valor medio de ambas medidas el cual se indica encima de cada columna. La desviación típica se indica con barras verticales. Las condiciones de represión e inducción indicadas son las especificadas en *Materiales y Métodos* (sección IV.9.). Se obtuvieron resultados similares con las estirpes A3Y3A (silvestre) y SSAB-4A (*hrs1Δ*) (no mostrados). U.: unidades de actividad enzimática.

Decidimos cuantificar el efecto de la mutación *hrs1Δ* sobre la expresión del gen *lacZ* dirigida por los promotores regulables *GAL1*, *PHO5*, *ENA1* y *HSP26* mediante ensayos de actividad β-galactosidasa en estirpes portadoras de dichas fusiones (Figura 15A). En condiciones de represión, la expresión de *GAL1::lacZ* en el mutante *hrs1Δ* fue 3.3 veces mayor que en el silvestre. En condiciones de inducción la actividad detectada en el mutante cayó 5.7 veces respecto al silvestre (Figura 15A). Este resultado es consistente con el del análisis de *Northern* del gen *GAL1* endógeno (Figura 13A). Por tanto, *HRS1* es necesario para la activación del promotor *GAL1* y, en menor medida, para su completa represión.

La expresión de *lacZ* dirigida por el promotor de *PHO5* estaba claramente desreprimida en los mutantes *hrs1Δ* en condiciones de represión, en los que se detectó un aumento de 12.6 veces de la actividad β-galactosidasa respecto a la estirpe silvestre (Figura 15A). En condiciones de inducción la expresión de *PHO5::lacZ* fue ligeramente superior en el mutante *hrs1Δ* (Figura 15A). Este resultado es contrario al observado para el gen *PHO5* endógeno mediante *Northern*, en el que la transcripción en el mutante se inducía en menor medida que en el silvestre (Figura 13B). En conjunto la expresión de *PHO5::lacZ* continúa estando regulada en las estirpes *hrs1Δ*, aunque dicha regulación es menos precisa que en las estirpes silvestres. Así, mientras que la expresión se induce 40 veces por encima de los niveles de represión en estirpes silvestres, en los mutantes *hrs1Δ* la inducción es de sólo 5.3 veces.

El gen *ENA1* se activa en condiciones de estrés salino (Márquez y Serrano, 1996). Los niveles de expresión de la fusión *ENA1::lacZ* en el mutante *hrs1Δ* fueron superiores a los del silvestre tanto en condiciones de represión (6.5 veces) como de inducción (2 veces) (Figura 15A). De hecho, los niveles de actividad en *hrs1Δ* fueron iguales en condiciones de inducción y represión. Esto

indica que la ausencia de la proteína Hrs1p en la célula desreprime la expresión dirigida por el promotor de *ENA1*.

La expresión de *HSP26::lacZ* en el mutante *hrs1Δ* fue 3.1 veces superior a la del silvestre, en condiciones de represión, y la mitad en condiciones de activación (Figura 15A). De nuevo, aunque la expresión de *HSP26* continúa estando regulada en el mutante *hrs1Δ*, el patrón de regulación es mucho más suave. Así, la inducción respecto a los niveles basales conseguida en la estirpe silvestre fue de 13 veces, mientras que en el mutante solamente fue de 2.3 veces.

Los resultados observados en los mutantes *hrs1Δ*, en los que en condiciones de inducción la expresión de *PHO5::lacZ* determinada por los niveles de actividad β-galactosidasa, es superior a la del silvestre y la de *HSP26::lacZ* es inferior (Figura 15A), son contrarios a los análisis de *Northern* de los respectivos genes endógenos (Figuras 13B y 13C). Estas diferencias no parecían ser debidas a la

secuencia de *lacZ* ya que el resultado obtenido era opuesto en los dos promotores analizados. Una posible explicación de esta discrepancia podría ser la diferente localización de los genes transcritos, ya que las fusiones con *lacZ* están localizadas en plásmidos mientras que los genes endógenos están localizados en los cromosomas. Por tanto, decidimos integrar la fusión *PHO5::lacZ* en el cromosoma V (Figura 15B). En este caso, los niveles inducidos de actividad en el mutante *hrs1Δ* fueron la mitad de los del silvestre. Este resultado es similar al obtenido en el *Northern* (Figura 13B) y en el ensayo de la fosfatasa ácida (Figura 14), que reflejan la expresión del gen *PHO5* endógeno, y es contrario a lo observado con la fusión *PHO5::lacZ* localizada en el plásmido (Figura 15A). En condiciones de represión se observó un efecto de desrepresión similar al obtenido con la fusión localizada en el plásmido. Por tanto, el efecto de *hrs1Δ* sobre la activación del promotor *PHO5* (Figuras 13B, 14 y 15A) depende de su localización, plasmídica o cromosómica.

Es de destacar el hecho de que en el mutante *hrs1Δ* se observa, en todos los casos, una desrepresión de los promotores en condiciones en las que estos no deben expresarse.

Finalmente, *HRS1* no parece jugar ningún papel en la expresión dirigida por los promotores de los genes *ADH1* y *TEF2*, de expresión constitutiva. La Figura 15C muestra que los niveles de β-galactosidasa de las estirpes portadoras de las fusiones *ADH1::lacZ* y *TEF2::lacZ* fueron similares en estirpes mutantes *hrs1Δ* y silvestres.

Este tipo de efectos, tanto positivos como negativos, sobre la regulación de la transcripción se habían descrito previamente para mutantes en genes estructurales de algunos factores de transcripción, en particular aquellos que codifican las proteínas Gal11p/Spt13p (homóloga a Hrs1p en el extremo carboxilo terminal), Sin4p/Tsf3p y Rgr1p (Fassler y Winston, 1989; Jiang y Stillman, 1992; Suzuki y Nishizawa, 1994; Jiang *et al.*, 1995). Estas proteínas forman parte de un subcomplejo del "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Li *et al.*, 1995). Curiosamente, se había identificado en este subcomplejo una proteína de un peso molecular de aproximadamente 50 kD, p50, un tamaño similar al predicho para Hrs1p a partir de su secuencia de ADN (Bröhl *et al.*, 1994) y observado en la proteína purificada a partir de su sobreexpresión en *E. coli* (Santos-Rosa *et al.*, 1996). Decidimos, por tanto, investigar si los mutantes *hrs1Δ* manifestaban otros fenotipos previamente descritos para mutantes en los genes correspondientes de estos factores generales de transcripción, con el objeto de establecer una posible relación funcional.

II.2.3. Fenotipo Gal⁻ y defecto en la producción de factor α en mutantes *hrs1Δ*

La variedad de genes sobre cuya expresión tiene efecto la mutación *hrs1Δ*

sugería que *HRS1* podría estar implicado en la regulación de diferentes rutas metabólicas de la célula. Analizamos, por ejemplo, la capacidad de las células *hrs1Δ* de fermentar galactosa o de producir factor sexual α , dos procesos que están alterados en mutantes *gal11/spt13* (Fassler y Winston, 1989). El mutante *hrs1Δ* es incapaz de fermentar galactosa (fenotipo Gal⁻), como se deduce del resultado mostrado en la Figura 16 en el que la estirpe mutante *hrs1Δ*, al igual que los mutantes *gal11*, no creció en medio con galactosa como fuente de carbono en presencia del inhibidor de la respiración *antimicina A*.

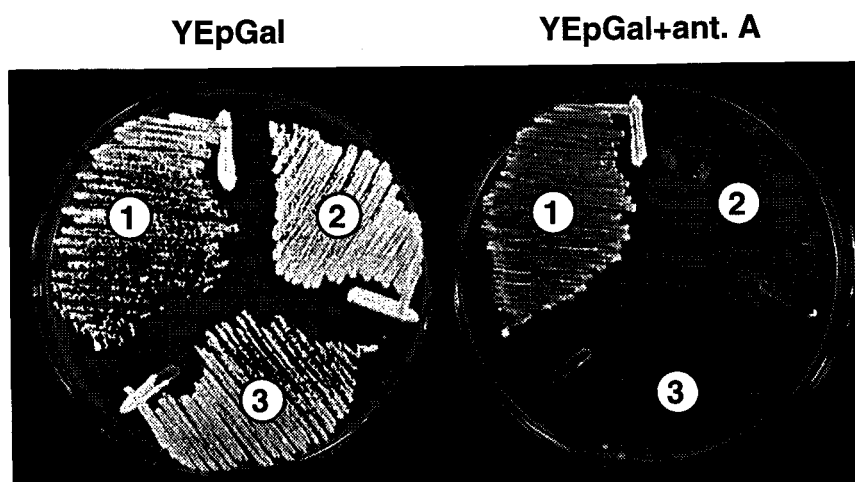


Figura 16. Crecimiento de las estirpe silvestre AYW3-1B (1), *hrs1Δ* SSAB-2C (2) y *gal11Δ* HWY-3C (3) en medio YEPGal y en medio YEPGal suplementado con 1 μ g/ml de antimicina A (ant. A).

Para determinar la capacidad de producir factor α , realizamos un ensayo de *halo de inhibición de crecimiento*. Este ensayo se basa en el fenómeno de que una estirpe mutante *sst1* detiene el crecimiento en presencia del factor α excretado al medio por células de sexo α (Fassler y Winston, 1989). En la Figura 17 se observa que el halo de inhibición de crecimiento que generan las estirpes *hrs1Δ*, de aproximadamente 1 mm de ancho, es menor al generado por una estirpe silvestre, de aproximadamente 4-5 mm de ancho. Esto refleja una menor capacidad de las estirpes mutantes *hrs1Δ* de producir factor α , al igual que se había observado anteriormente en mutantes *gal11/spt13* (Fassler y Winston, 1989).

II.2.4. Efecto de *hrs1Δ* en silenciamiento

Ya que los mutantes *gal11* son incapaces de mantener el silenciamiento

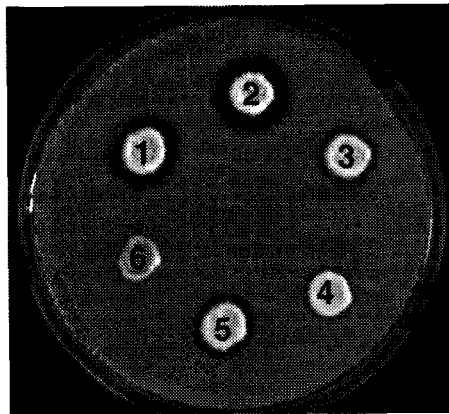


Figura 17. Efecto de *hrs1Δ* en la producción de factor α . Se sembraron en forma de parches las estirpes silvestres de sexo α AYW3-1B (1) y A3Y3A (2), *hrs1Δ* de sexo α SSAB-2C (3), SSAA-12B (4) y SSAA-17B (5) y silvestre de sexo α F4 (6), usada como control negativo, sobre un cesped de la estirpe mutante *sst1* RC634, cuyo crecimiento es inhibido por la presencia de factor α en el medio. El halo de inhibición del crecimiento alrededor de cada parche de biomasa es una medida indicativa de la cantidad de factor α producido.

transcripcional asociado a las regiones teloméricas (Suzuki y Nishizawa, 1994), decidimos determinar el efecto de *hrs1Δ* sobre el silenciamiento analizando la capacidad de formar colonias resistentes a FOA de estirpes que llevan la fusión *adh4::URA3* en el telómero del brazo izquierdo del cromosoma VII. Solamente se formarían estas colonias cuando el gen *URA3* estuviera silenciado. En la Figura 18A se observa que la proporción de células resistentes a FOA fue aproximadamente cuatro órdenes de magnitud menor en las estirpes *hrs1Δ* que en la silvestre, similar a lo observado para *sir4*, usado como control. Por tanto, las estirpes *hrs1Δ* presentan un fenotipo de silenciamiento en telómeros similar al previamente descrito para *gal11/spt13* (Suzuki y Nishizawa, 1994).

Analizamos también el silenciamiento asociado al locus *HMR*. Para ello, determinamos la capacidad de estirpes portadoras de la fusión *hmr::TRP1* de crecer en medio SC-trp. La Figura 18B muestra que las estirpes mutantes *hrs1Δ*, al igual que las silvestres, son incapaces de expresar el gen *TRP1* y por tanto de crecer en SC-trp. Podemos concluir, por tanto, que la mutación *hrs1Δ* afecta al silenciamiento asociado a telómeros pero no al que se da en la región *HMR*, de forma idéntica a lo que ocurre en mutantes *gal11* (Suzuki y Nishizawa, 1994).

II.2.5. Activación de promotores UAS- en mutantes *hrs1Δ*

Se había descrito que los mutantes *gal11/spt13*, *rgr1* y *sin4/tsf3* eran

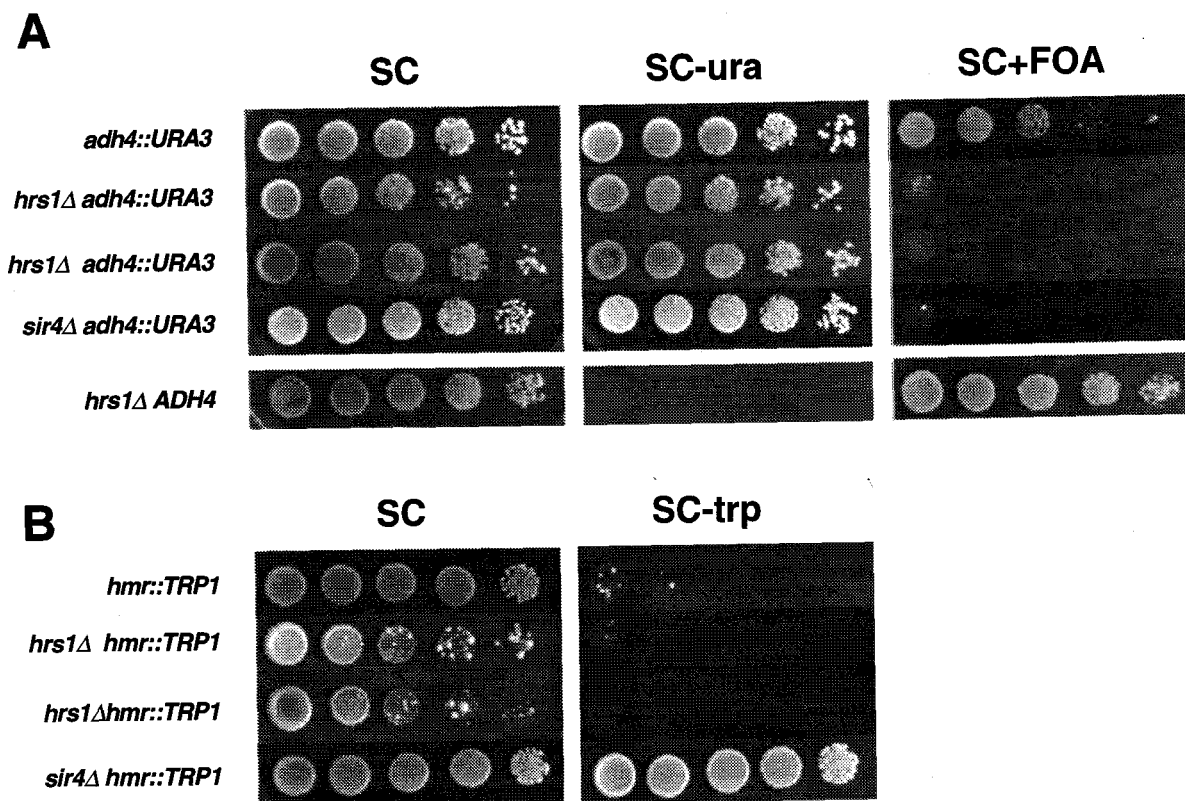


Figura 18. Efecto de *hrs1Δ* en silenciamiento asociado a telómeros (A) y al locus *HMR* (B). La estirpes utilizadas fueron, de arriba a abajo: SAB98-3A (silvestre), SAB98-4B (*hrs1Δ*), SAB98-2A (*hrs1Δ*), YWY98-5C (*sin4*) y SAB98-3B (*hrs1Δ*) para el silenciamiento asociado a telómeros y LSS59-9A (silvestre), LSS59-1D (*hrs1Δ*), LSS59-3B (*hrs1Δ*) y LY598-1B (*sin4*) para el silenciamiento en *HMR*. Colonias independientes procedentes de placas de YEPD se diluyeron sucesivamente por factores de 10, se sembraron en los diferentes medios indicados y se incubaron durante 3 días (estirpes silvestres) o 6 días (estirpes *hrs1Δ*). La estirpe SAB98-3B está incluida como control de que la mutación *hrs1Δ* no impide el crecimiento en SC+FOA.

capaces de activar la transcripción a partir de promotores carentes del elemento activador UAS (Chen *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1995; Jiang y Stillman, 1992). Decidimos comprobar si este era el caso también para los mutantes *hrs1Δ*. Ensayamos la actividad β-galactosidasa de estirpes portadoras del gen *lacZ* fusionado a un promotor de *CYC1* que carecía del elemento UAS (Wright *et al.*, 1990). Los niveles de actividad alcanzados con la estirpe mutante *hrs1Δ* fueron similares a los del silvestre (Figura 19), mientras que en el mutante *sin4* fueron 30 veces superiores. Por tanto, a diferencia de los mutantes *gal11*, *sin4* o *rgr1*, los mutantes *hrs1Δ*, no son capaces de activar promotores carentes del elemento UAS.

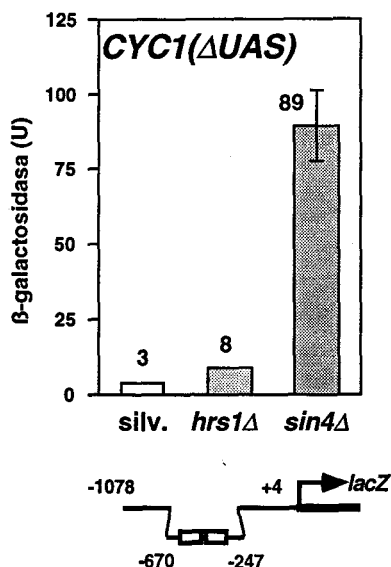


Figura 19. Expresión del gen *lacZ* fusionado a un promotor de *CYC1* que carece del elemento UAS. Se ensayó la actividad β-galactosidasa de las estirpes silvestre A3Y3A, *hrs1Δ* SSAB-2C y *sin4Δ* DY1717, transformadas con el plásmido pLGZ, portador de la fusión *CYC1(ΔUAS)::lacZ*. Las estirpes se cultivaron en las condiciones especificadas en *Materiales y Métodos* (sección IV.9.) para el estudio de este promotor. Se analizaron dos transformantes independientes para cada estirpe. Los valores se indican encima de cada columna y la desviación típica de ambas medidas está indicada por barras verticales. Se muestra un diagrama de la región del promotor utilizado, en el que se indican los elementos UAS delecionados. Los números están referidos al primer nucleótido traducido del gen *CYC1*. U.: unidades de actividad enzimática.

II.2.6. Fenotipo Spt⁻ de las estirpes *hrs1Δ*

Dado el fenotipo Spt⁻ (*Supresión de inserciones de transposones Ty o elementos solo-δ*) de los mutantes *gal11/spt13* (Fassler y Winston, 1989) y *sin4* (Jiang y Stillman, 1992) determinamos si los mutantes *hrs1Δ* presentaban el mismo fenotipo. Obtuvimos mediante cruces genéticos estirpes *hrs1Δ* con los alelos *his4-912δ* o *lys2-128δ*. Estos alelos consisten en inserciones de elementos *solo-δ* en la región promotora del gen *HIS4* y el extremo 5' del gen *LYS2*, respectivamente. En ninguno de los casos se observó reversión del fenotipo de auxotrofia por la mutación *hrs1Δ*, de lo que se deduce que *hrs1Δ* no confiere un fenotipo Spt⁻ con este tipo de inserciones. Sin embargo, el fenotipo Spt⁻ de los mutantes *gal11/spt13*, es específico sobre inserciones de transposones Ty completos (Fassler y Winston, 1989). Cruzamos estirpes mutantes *hrs1Δ* con estirpes portadoras del alelo *lys2-61*, que consiste en la inserción de una secuencia Ty completa en la región 5' del gen *LYS2*. El análisis fenotípico de las esporas

resultantes indicó que aquellas que eran mutantes *hrs1Δ* siempre presentaban un fenotipo Lys⁺. Por tanto, *hrs1Δ* confiere un fenotipo Spt específico de inserciones de transposones Ty completos, al igual que ocurre en mutantes *gal11/spt13*.

II.2.7. Recombinación en mutantes *gal11Δ* y *sin4Δ*

La coincidencia en un variado número de fenotipos entre las estirpes *hrs1Δ* y los mutantes *gal11*, *sin4* y *rgr1*, planteó la posibilidad de que mutaciones en alguno de estos genes pudieran tener un efecto en la recombinación inducida por *hpr1Δ*. Construimos estirpes mutantes *gal11Δ* y *sin4Δ*, en fondos silvestre y *hpr1Δ*, portadoras del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* (Figura 4). En el fondo silvestre *HPR1*, la mutación *hrs1Δ* confirió unos niveles de recombinación entre 10 y 18 veces inferiores a los de estirpes silvestres *HRS1* (Santos-Rosa *et al.*, 1996; tabla 4), mientras que las mutaciones *gal11* y *sin4* confirieron niveles similares a los del tipo silvestre. Por tanto, estos dos genes, a diferencia de *HRS1* no parecen jugar ningún papel en recombinación espontánea entre repeticiones directas. Por otro lado, sabíamos que la frecuencia de recombinación en el doble mutante *hpr1Δ hrs1Δ* era similar a la del mutante simple *hrs1Δ* (Santos-Rosa *et al.*, 1996; Tabla 4). Las frecuencias obtenidas en los dobles mutantes *hpr1Δ gal11Δ* y *hpr1Δ sin4Δ* fueron 19-36 veces inferiores a las del mutante simple *hpr1Δ* (tabla 4). Por tanto, las mutaciones *gal11Δ* y *sin4Δ* suprimen el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* aunque lo hacen en menor medida que la mutación *hrs1Δ*. Esta supresión parcial se ha observado también para mutaciones en los genes de otros componentes de la holoenzima de la ARN polimerasa II, como son TFIIB y la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (Fan *et al.*, 1996).

Por último, es de destacar el que los dobles mutantes *hrs1Δ gal11Δ* y *hrs1Δ sin4Δ* son viables aunque crecen tan mal en medio mínimo como los mutantes simples *hrs1Δ*.

II.3. CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *THO1* Y *THO2* COMO SUPRESORES DE *hpr1Δ*. ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN ASOCIADA A ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN MUTANTES *tho2Δ*

La identificación de mutantes en factores generales de transcripción como supresores del fenotipo de hiper-recombinación de las estirpes *hpr1Δ*, sugería una relación *HPR1* con la transcripción por la ARN polimerasa II y establecía una nueva relación entre recombinación y transcripción. Paralelamente, otras investigaciones otorgaban a *HPR1* una función en la elongación de la transcripción (Chávez y Aguilera, 1997) y sugerían que las paradas o el bloqueo de la elongación de la transcripción podrían provocar inestabilidad genómica en forma de aumento de recombinación entre secuencias repetidas o de inestabilidad de plásmidos (Prado *et al.*, 1996; Chávez y Aguilera, 1997). Para comprender la función de *HPR1* en la elongación de la transcripción y el

TABLA 4. Frecuencia de deleciones (x10⁶) en el sistema de repeticiones directas *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en estirpes mutantes *hrs1*, *sin4* y *gal11* en fondos genéticos silvestre y *hpr1Δ*

Genotipo ^a	Frecuencia ^b	Genotipo ^a	Frecuencia ^b
<i>HPR1</i>	25 47	<i>hpr1</i>	34000 65000
<i>HPR1 hrs1</i>	2.4 (10) 1.4 (18)	<i>hpr1 hrs1</i>	9.2 (3696) 5.3 (6415)
<i>HPR1 sin4</i>	14 (1.8) 24 (1.0)	<i>hpr1 sin4</i>	1600 (21) 1400 (24)
<i>HPR1 gal11</i>	12 (3.9) 38 (1.2)	<i>hpr1 gal11</i>	3400 (19) 1800 (36)

^a La estirpes usadas fueron, de arriba a abajo, DAW-2A (*HPR1*), HWY-7A (*HPR1*), SSAB-2C (*hrs1*), SSAA-12B (*hrs1*), DAW-2C (*sin4*), DAW-1D (*sin4*), HWY-1C (*gal11*), HWY-7C (*gal11*), DAW-1A (*hpr1*), W19Y-7B (*hpr1*), SSYY4-5C (*hpr1 hrs1*), SSYY4-6D (*hpr1 hrs1*), DAW-7A (*hpr1 sin4*), DAW-4D (*hpr1 sin4*), HWY-2C (*hpr1 gal11*) y HWY-9D (*hpr1 gal11*).

^b Los números entre paréntesis indican las veces que caen los valores respecto a los valores de la estirpe *HPR1* o *hpr1*. Para los mutantes *hrs1* y *sin4* se tomaron como referencia los valores de las estirpes congénicas *HPR1* DAW-2A (25) y *hpr1* DAW-1A (34000). Para los mutantes *gal11* se tomaron como referencia los valores de las estirpes congénicas *HPR1* HWY-7A (47) y *hpr1* W19Y-7B (65000).

mecanismo por el que bloqueos de la maquinaria de la transcripción pudieran provocar inestabilidad genómica, decidimos buscar genes cuya sobreexpresión suprimiera el fenotipo transcripcional de los mutantes *hpr1Δ*.

II.3.1. Aislamiento de *THO1* y *THO2* como genes supresores en multicopia de la termosensibilidad y el defecto en transcripción de *hpr1Δ*

Asumiendo que el fenotipo de termosensibilidad de estos mutantes pudiera ser una consecuencia de los defectos en transcripción, decidimos seleccionar genes que, en multicopia, revertieran la falta de crecimiento a 37°C de una estirpe *hpr1Δ*. Transformamos la estirpe *hpr1Δ* AYW3-3D con la genoteca MW90 (Waldherr *et al.*, 1993) basada en el vector multicopia YEp351 y seleccionamos 24 transformantes de aproximadamente 250000 que crecieron a 37°C en medio selectivo SC-leu. De 19 de estos transformantes aislamos 4 plásmidos cuyos insertos definieron dos regiones genómicas diferentes. Los insertos de tres de los plásmidos (pSUP4, pSUP6 y pSUP24, aislados de 8, 2 y 6 transformantes respectivamente) solapaban en una región interna de 4.75 kb

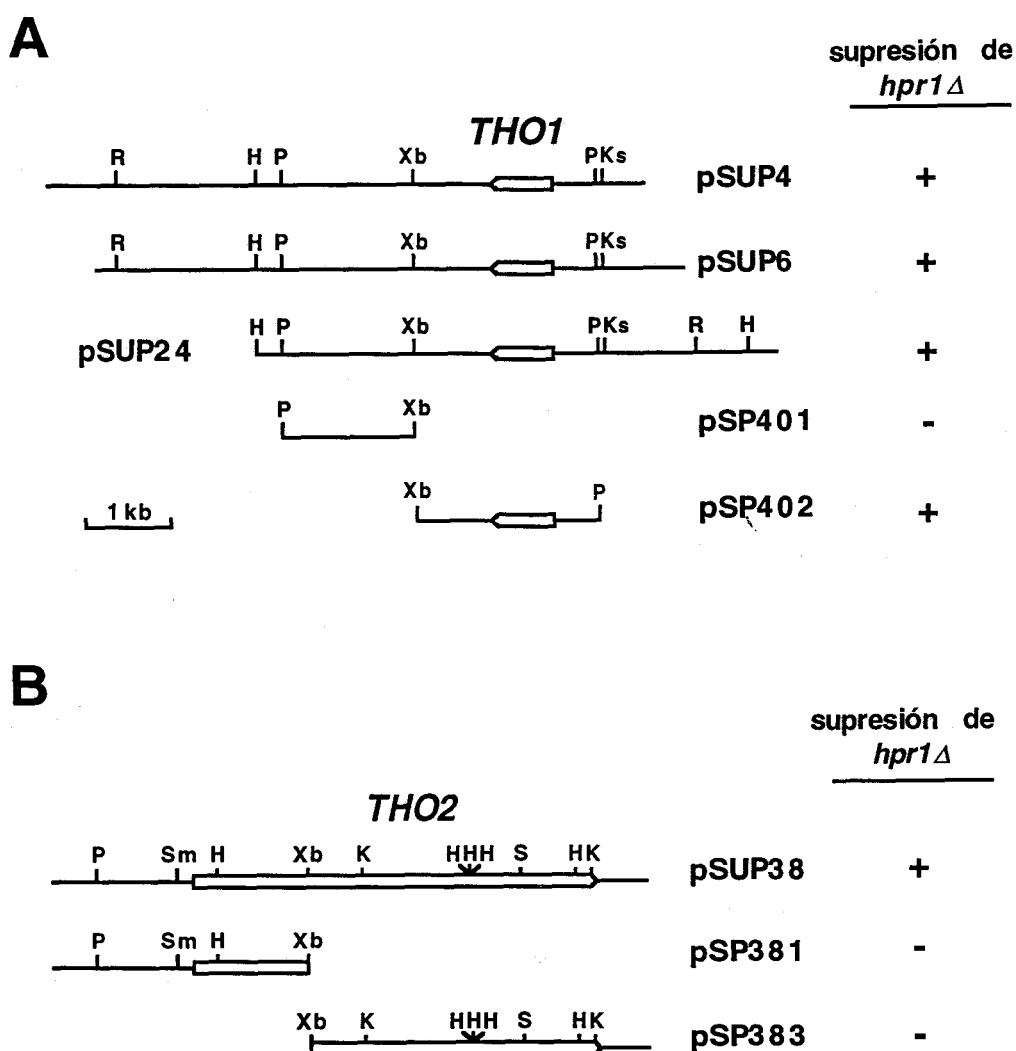


Figura 20. Mapas de restricción de los insertos de los plásmidos aislados de la genoteca MW90 que contienen las regiones de *THO1* (A) y *THO2* (B) y de los fragmentos subclonados en el vector episómico YEp351. Se muestra la capacidad de cada plásmido de suprimir el fenotipo de termosensibilidad del mutante *hpr1*Δ (+: suprime; -: no suprime). Las flechas corresponden a los genes *THO1* y *THO2* y señalan el sentido de la transcripción de los mismos. Las abreviaciones de las dianas de restricción son: H, *Hind*III; K, *Kpn*I; Ks, *Ksp*I; P, *Pst*I; R, *Eco*RI; Sm, *Sma*I; S, *Sal*I; Xb, *Xba*I.

(Figura 20A). El cuarto plásmido (pSUP38, aislado de 3 transformantes) portaba un inserto de 7.3 kb (Figura 20B). Subclonamos distintos fragmentos de estos insertos en el plásmido YEp351 (ver *Materiales y Métodos*, sección IV.3.) y transformamos la estirpe AYW3-3D. Los resultados obtenidos indicaron que el fragmento *Xba*I-*Pst*I de 2.27 Kb de los tres primeros plásmidos contenía un gen con capacidad de suprimir la termosensibilidad de *hpr1*Δ, y que la diana *Xba*I

central del inserto del cuarto plásmido estaba dentro de la región codificante de un segundo gen supresor (Figuras 20 y 21). Denominamos a estos genes *THO1* y *THO2* respectivamente (del inglés *suppressor of the transcription defect of hpr1Δ by overexpression*). Secuenciamos 200 y 181 pb de los extremos *XbaI* y *PstI* respectivamente del inserto de pSP402 (Figura 20A) y 170 pb del extremo izquierdo del inserto de pSUP38 (Figura 20B). La comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos GenBank y EMBL reveló que *THO1* corresponde a la región codificante YER063w en el brazo derecho del cromosoma V (GenBank n°: G731471) y *THO2* a la región codificante YNL139c del brazo izquierdo del cromosoma XIV, también llamado *RLR1* (del inglés *required for lacZ RNA*)(GenBank n°: S59816, Mallet *et al.*, 1995).

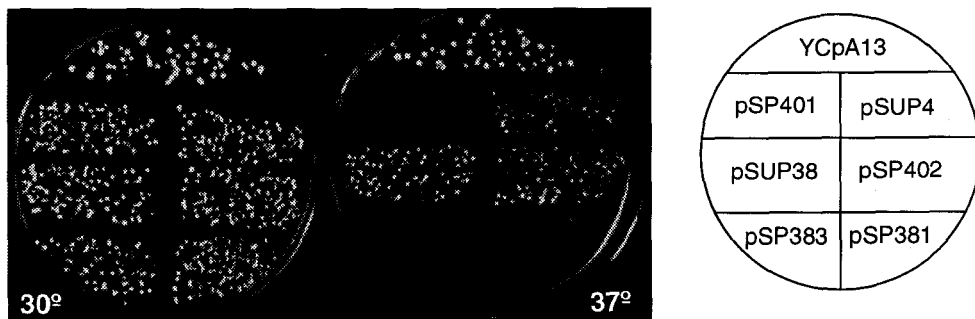


Figura 21. Crecimiento a 30°C y 37°C de la estirpe AYW3-3D transformada con los plásmidos cuyos insertos se describen en la Figura 20, que contienen distintos fragmentos de las regiones de los genes *THO1* y *THO2*. Como control positivo se usó la estirpe transformada con YCpA13 (plásmido centromérico que contiene el gen *HPR1*, ver *Materiales y Métodos*, sección IV.3.). En el esquema de la derecha se indican los plásmidos transformantes correspondientes a cada zona de las placas.

El gen *THO1* codifica una hipotética proteína de 218 aminoácidos (Figura 22A), con un peso molecular de 24.1 kD. En el extremo carboxilo existe una región de unos 30 aminoácidos enriquecida en aminoácidos básicos (Lys, Asn y Arg) y en el extremo amino una región enriquecida en residuos de Leu. Así mismo, la hipotética Tho1p presenta una región de 39 aminoácidos homóloga (53.8% de identidad) a la ribonucleoproteína heterogénea nuclear U de humanos.

El gen *THO2* codifica una proteína de 1598 aminoácidos (Figura 22B), con un peso molecular de 184 kD. Esta proteína tiene un carácter hidrofóbico y posee dos potenciales dominios transmembrana. Por último, Parece existir un gen homólogo a *THO2* en *Schizosacharomyces pombe* (región SPAC22F3.14c).

A

MADYSSLTVVQLKDLLTKRNLVSVGGLKNELVQRLIKDDDEESKGESEVSPQEQNQEQGSEP	60
AAIEEPASQNITEKKEVSSEPKETNEPKEENKDVQKPSDGPSATASENEQAAAATAAPAL	120
SPEEIKAKALDLLNKKLHRANKFGQDQADIDSLQRQINRVEKFGVDLNSKLAEEELGLVSR	180
KNEPESGNNGKFKNRNKNAMNRSRVSKNRRGNRSYRR	218

B

MAEQTLSSKLNALSQKVIPPASPSQASILTEEVIRNWPERSKTLCSDFTALESNDEKEDW	60
LRTLFIELFDFINKNDENSPLKLSDVASFTNELVNHHERQVVSQASIVGKMFIAVSSTVPNI	120
NDLTTISLCKLIPSLHEELFKFSWISSKLLNKEQTLLRHLKSKYELKKYNLLVENS	180
GYGQLVALLILAYYDPDNFSKVSAYLKEIYHIMGKYSLDSIRTLVDVILNVSSQFITEGYK	240
FFIALLRKSDSWPSSHVANNSSYSSLNEGGNMIAANIISFNLSQYNEEVDKENYERYMDM	300
CCILLKNGFVNFYSIWDNVKPEMEFLQEYIQNLETELEEEESTKGVENPLAMAAALSTENE	360
TDEDNALVVNDVNMKDKISEETNADIESKGGKQKTQQDILLFGKIKLLERLLIHGCVIPV	420
IHVLRKQYPKVLYVSELSRYLGRVFEYLLNPLYTSMFSSGESKDMATALMITRIDNGILA	480
HKPRLIHKYKTHEPFESLELNSSYVFYSEWNSNLTPFASVNDLDFENSHIYLSIIGPYLG	540
RIPTLLSKISRIGVADIQKNHGSESLHVTIDKWIDYVRKFIIPATSLQNNPIATSEVYE	600
LMKFFPFKRYFIYNEMMTKLSQDILPLKVSFNKAEREAKSILKALSIDTIAKESRRFAK	660
LISTNPLASLVPVKQIENYDKVSELVVYTTKYFNDFAYDVLQFVLLLRLTYNRPVQFD	720
GVNQAMWVQRLSIFIAGLAKNCPNMDISNIITYILKTLHNGNIIAVSILKELIITVGGIR	780
DLNEVNMKQLMLNSGSPKQYARHLIYDFRDDNSVSSRLTSFFTDQSAISEIILLLYT	840
LNLKANTQNSHYKILSTRCEMNTLLWSFIELIKHCLKGKAFEENVLPFVELMNRPHLST	900
PWTFHIWRDYLDNQLNSNENFSIDELIEGAEFSDVDLTKISKDLFTTFWRLSLYDIHFDK	960
SLYDERKNALSGENTGHMSNRKKHLIQNQIKDILVTGISHQRAFKKTSEFISEKSNVWNK	1020
DCGEDQIKIFLQNCVVRVLFSPSDALFSSFFIFMAFRTENLMSILNTCITSNILKTLFF	1080
CCTSSEAGNLGLFFTDVLKLEKMRNLNGDFNDQASRKLIEWHSVITEQVIDLLSEKNYMS	1140
IRNGIEFMKHVTSVFPVVKAHIQLVYTTLEENLINEEREDIKLPSSALIGHLKARLKDAL	1200
ELDEFCTLTEEEAEQKRIREMELEEIKNYETACONEQKQVALRKQLELNKSQRLQNDPPK	1260
SVASGSAGLNSKDRYTYSRNEPVIPTKPSSSQWSYSKVTRHVDDINHYLATNHLQKAISL	1320
VENDDETRNLRKLSKQNMPIFDFRNSTLEIFERYFRTLQNPQNPDFAEKIDSLKRYIKN	1380
ISREPYPDTTSSYSEAAAPEYTKRSSRYSGNAGGKDGYSNRYRGPSNDRSAPKNIKPIS	1440
SYAHKRSELPTRPSKSKTYNDRSRALRPTGPDREGDFDQRDNRLREEYKKNSSQRSQLRF	1500
PEKPFQEGKDSKANKPYQASSYKRDSPENEEKPNKRFFKDETRNKQFQTDYRNTRDSG	1560
AAHRANENQRYNGNRKSNTQALPQGPKGNGVVSRYQRZ	1598

Figura 22. Secuencias de las proteínas Tho1p (A) y Tho2p (B) deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de sus genes respectivos.

A continuación, analizamos la capacidad de estos clones de suprimir el defecto en la transcripción de *lacZ* causado por *hpr1Δ* (Chávez y Aguilera, 1997). Ensayamos la actividad β-galactosidasa de la estirpe AYW3-3D portadora de la fusión *GAL1::lacZ*, transformada con los plásmidos pSUP4 o pSUP38. Como se observa en la Figura 23A, las células *hpr1Δ* mostraron 13 y 21 veces más actividad

β -galactosidasa en condiciones de inducción cuando portaban los genes *THO1* y *THO2* en multicopia respectivamente. Estos niveles suponen el 7.4% y el 11.8% de los niveles de la estirpe silvestre, respectivamente. Por tanto, la sobreexpresión de los genes *THO1* y *THO2* suprime parcialmente la incapacidad de las células *hpr1* Δ de transcribir el gen *lacZ*.

Dado que la inestabilidad de las secuencias repetidas en las células *hpr1* Δ se debe a defectos en la elongación de la transcripción (Chávez y Aguilera, 1997), la supresión de estos defectos podría suponer a su vez una supresión del fenotipo de hiper-recombinación. Sin embargo, los niveles de recombinación del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en las estirpes *hpr1* Δ no se vieron significativamente afectados cuando portaban los genes *THO1* y *THO2* en multicopia (Figura 23B), aunque hay que destacar que en el caso de *THO2* los niveles fueron aproximadamente 4.5 veces inferiores a los de la estirpe *hpr1* Δ . Este resultado es consistente con la idea de que la transcripción a través de determinadas regiones de ADN sigue siendo deficiente en células *hpr1* Δ con los genes *THO1* y *THO2* en muticopia.

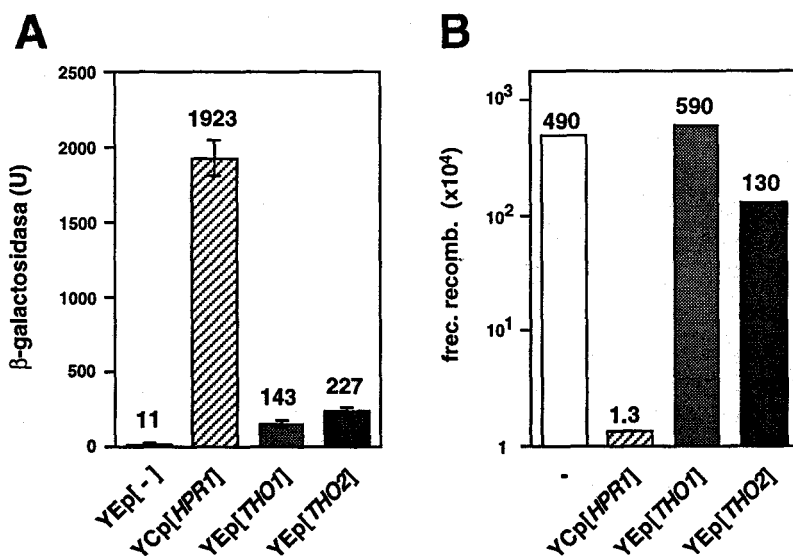


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de *THO1* y *THO2* en la expresión del gen *lacZ* y en recombinación. (A) Actividades β -galactosidasa de la estirpe *hpr1* Δ AYW3-3D portadora del plásmido pLGSD5, que contiene el gen *lacZ* fusionado al promotor híbrido *GAL1-CYC1*, y transformada con los plásmidos YEpl351 (YEpl [-] usado como control), YCpA13 (YCp[HPR1]), pSUP4 (YEpl[*THO1*]) o pSUP38 (YEpl[*THO2*]). Las actividades se ensayaron en células cultivadas en las condiciones de inducción y represión descritas en *Materiales y Métodos* para este promotor (sección IV.9.). Sólo se muestran los valores de expresión inducida (2% de galactosa en el medio). En condiciones de represión (2% de glucosa en el medio) los valores detectados fueron de aproximadamente 1 U en todos los casos. Los números corresponden al valor medio de dos transformantes independientes. La desviación típica se indica con barras verticales. (B) Frecuencias de recombinación del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en la estirpe AYW3-3D sin transformar

o transformada con los plásmidos YCpA13 (YCp[*HPR1*]), pSUP4 (YEp[*THO1*]) o pSUP38 (YEp[*THO2*]).

II.3.2. Expresión del gen *lacZ* y recombinación en mutantes *tho1Δ* y *tho2Δ*

Para esclarecer la función de los genes *THO1* y *THO2* en la célula, generamos los mutantes nulos de ambos genes. Construimos los alelos *tho1Δ::TRP1*, *tho2Δ::LEU2* y *tho2Δ::KAN* y los reemplazamos en el genoma de la levadura por los respectivos alelos silvestres (Figuras 24 y 25).

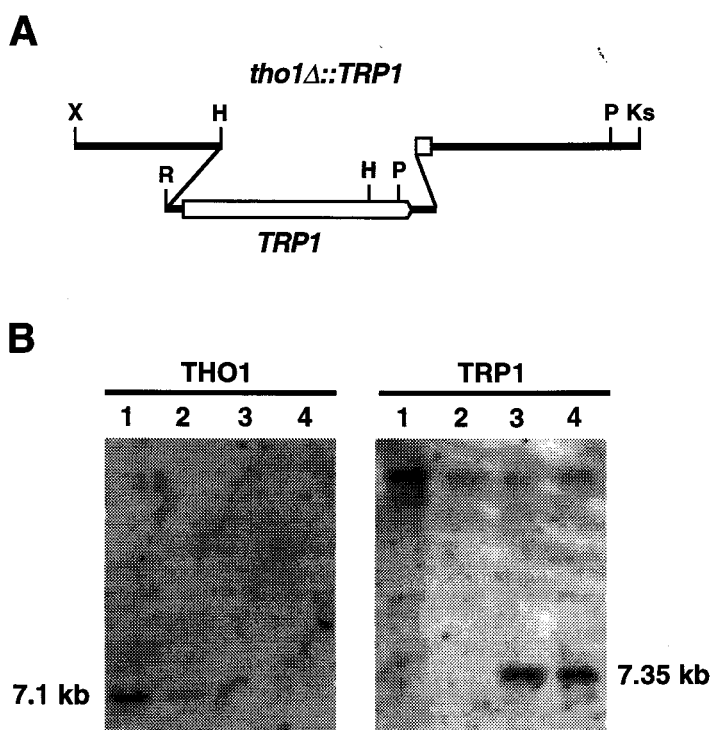


Figura 24. Delección del gen *THO1*. (A) Estructura del alelo *tho1Δ::TRP1*. Se sustituyó el fragmento *SpeI-DraI* de 0.7 kb del gen *THO1* por un fragmento *BgIII-EcoRI* de 0.85 kb que contiene el gen *TRP1* para construir el plásmido pSTH35ΔT, tal como se indica en *Materiales y Métodos* (sección IV.3.). Se transformó la estirpe diploide generada por el cruce de las haploides AYW3-1B y AWY-1A con el fragmento *XhoI-KspI* de 2.3 kb de este plásmido, que contiene el alelo *tho1Δ::TRP1*, y se seleccionaron transformantes *Trp*⁺. Se indica el gen *TRP1* y el fragmento que queda del gen *THO1*. Las líneas gruesas corresponden a ADN genómico. Las abreviaciones de los sitios de restricción son: X, *XhoI*; H, *HindIII*; R, *EcoRI*; P, *PstI*; Ks, *KspI*. (B) Análisis de *Southern* de las cuatro esporas de una tétrada de un diploide transformante *Trp*⁺. El ADN genómico se digirió con *BamHI* y se hibridó con los fragmentos *DraI-SpeI* de 0.31 kb interno de *THO1* (sonda *THO1*) y *PstI-XbaI* de 0.64 kb interno de *TRP1* (sonda *TRP1*). Las estirpes analizadas fueron: W33-1A (carril 1), W33-1B (carril 2), W33-1C (carril 3) y W33-1D (carril 4). En las muestras de las estirpes silvestres (carriles 1 y 2) se

observa una banda de 7.1 kb al hibridar con la sonda THO1, mientras que dicha banda no aparece en las estirpes con la deleción (carriles 3 y 4). Las estirpes mutantes presentan una banda de 7.35 kb a l hibridar con la sonda TRP1, correspondiente al gen *TRP1* usado como marcador de la deleción, además de la banda correspondiente al *trp1* localizado en el cromosoma IV (banda superior). Los patrones de bandas esperados para el alelo *tho1Δ::TRP1* segregaron coincidiendo con el fenotipo *Trp⁺* de las esporas.

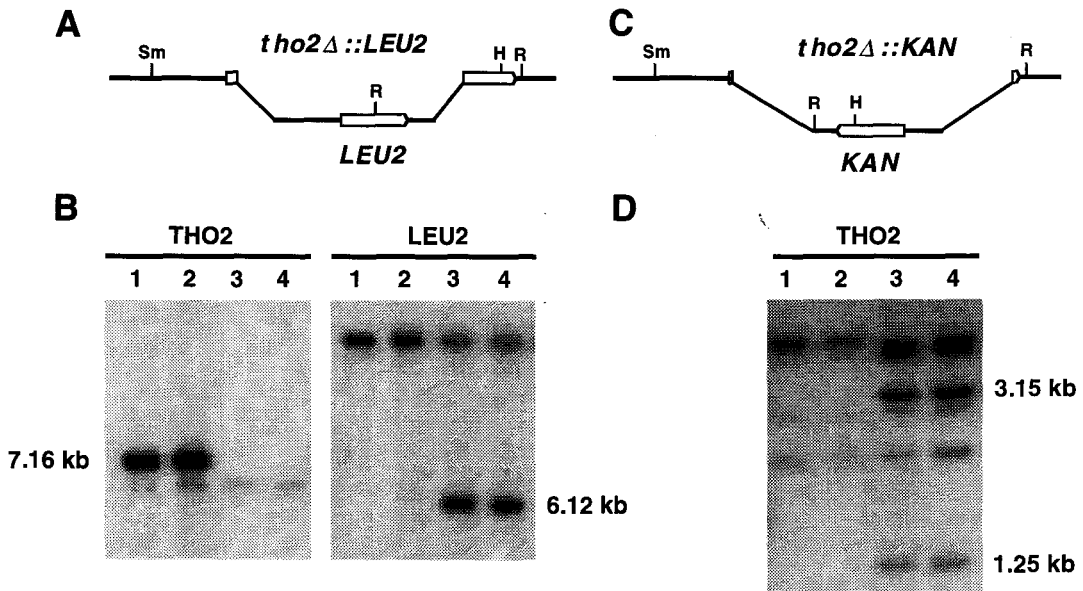
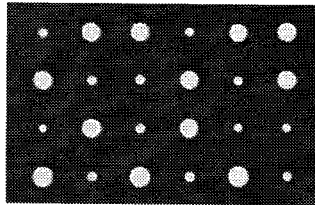


Figura 25. Deleciones del gen *THO2*. (A) Estructura del alelo *tho2Δ::LEU2*. Se substituyó el fragmento interno *HindIII-SalI* de 3.66 kb del gen *THO2* por un fragmento *SalI-BglII* de 2.62 kb, que contiene el gen *LEU2*, para construir el plásmido pBSTHO2Δ, tal como se indica en *Materiales y Métodos* (sección IV.3.). Se transformó la estirpe diploide generada por el cruce de las haploides isogénicas W303-1A y W303-1B con el fragmento *SmaI-HindIII* de 3.8 kb de este plásmido que contiene el alelo *tho2Δ::LEU2* y se seleccionaron transformantes *Leu⁺*. Se indica el gen *LEU2* y los fragmentos que quedan del gen *THO2*. Las líneas gruesas corresponden a ADN genómico. Las abreviaciones de las dianas de restricción son: Sm, *SmaI*; H, *HindIII*; R, *EcoRI*. (B) Análisis de *Southern* de la deleción *tho2Δ::LEU2* a las cuatro esporas de uno de los diploides *Leu⁺* de las esporas. El ADN genómico se digirió con *PstI* y se hibridó con los fragmentos *HindIII-HindIII* de 3.1 kb interno de *THO2* (sonda THO2) y *ClaI-EcoRI* de 0.48 kb interno de *LEU2* (sonda LEU2). Las estirpes analizadas fueron: WR-3A (carril 1), WR-3B (carril 2), WR-3C (carril 3) y WR-3D (carril 4). En las muestras de las estirpes silvestres (carriles 1 y 2) se observa una banda de 7.16 kb a l hibridar con la sonda THO2, mientras que dicha banda no aparece en las estirpes con la deleción (carriles 3 y 4). Las estirpes mutantes presentan una banda de 6.12 kb al hibridar con la sonda LEU2, correspondiente al gen *LEU2* usado como marcador de la deleción, además de la banda correspondiente al *leu2* localizado en el cromosoma III (banda superior). Los patrones de bandas esperados para el alelo *tho2Δ::LEU2* segregaron coincidiendo con el fenotipo *Leu⁺*. (C) Estructura del alelo *tho2Δ::KAN*. Se reemplazó un fragmento de 4.79 kb que constituye el gen *THO2* excepto 40 pb por cada extremo, por un fragmento de 1.53 kb que contiene el gen bacteriano *KAN1*. Para ello se transformó la estirpe diploide generada por el cruce de las haploides isogénicas W303-1A y W303-

1B, con un fragmento lineal de 1.6 Kb que contiene el gen *KAN* flanqueado por los 40 pb de cada extremo de *THO2*. Este fragmento se obtuvo por PCR como se indica en *Materiales y Métodos* (sección IV.19.). Tras la transformación se seleccionaron estirpes resistentes al agente G418, frente al cual confiere resistencia el gen *KAN1*. (D) Comprobación por *Southern* de la delección *tho2Δ::KAN* de cuatro esporas de uno de los diploides. La resistencia a G418 segregaba coincidiendo con el patrón de bandas esperado para la delección de *THO2*. El ADN genómico se digirió con *HindIII* y se hibridó con el fragmento *HindIII-HindIII* de 3.1 kb que cubre la región del gen *THO2*. Las estirpes analizadas fueron: RK2-6A (carril 1), RK2-6B (carril 2), RK2-6C (carril 3) y RK2-6D (carril 4). Las estirpes silvestres (carriles 3 y 4) muestran las bandas de 1.25 Kb y 3.15 kb esperadas, que no aparecen en las estirpes *tho2Δ::KAN*.

Los mutantes nulos de ambos genes son viables, indicando que ninguno de los dos genes es esencial para la célula. Sin embargo, mientras que los mutantes *tho1Δ* tienen un tiempo de generación en medio rico YEPD a 30°C igual al de la estirpe silvestre (85 min.), los mutantes *tho2Δ* crecen con el doble del tiempo de generación (180 min.). En medio sólido el mutante *tho2Δ* forma colonias más pequeñas que el silvestre. Esto es claramente observable en la

A



B

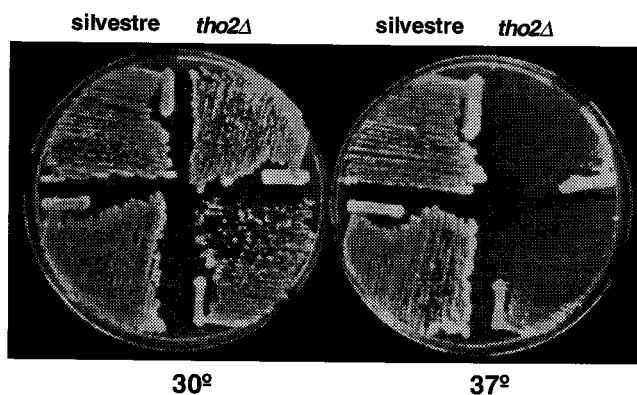


Figura 26. (A) Crecimiento de las esporas procedentes de un diploide heterocigoto *THO2/thoΔ*. La segregación del defecto en crecimiento correlaciona con el marcador *KAN* utilizado para deleccionar el gen *THO2*. (B) Termosensibilidad de los mutantes *tho2Δ*. Se muestra el crecimiento de las cuatro esporas de una de las tétradas de A a 30°C y a 37°C.

germinación de las tétradas procedentes de un diploide heterocigoto *THO2/tho2Δ* (Figura 26A). Además, las células *tho2Δ*, al igual que las *hpr1Δ*, son termosensibles a 37°C (Figura 26B).

El criterio seguido para aislar los genes *THO1* y *THO2* establecía que estos genes podían tener funciones biológicas relacionadas con *HPR1*. Dado que los fenotipos más relevantes de los mutantes *hpr1Δ* consisten en un defecto en la elongación de determinadas secuencias, entre ellas el gen *lacZ* de *E. coli*, y un aumento en los niveles de recombinación entre secuencias directas repetidas (Aguilera y Klein, 1990; Santos-Rosa y Aguilera, 1994; Prado *et al.*, 1997; Chávez y Aguilera, 1997), decidimos analizar la expresión de la construcción *GAL1::lacZ* y la recombinación en el sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en los mutantes *tho1Δ* y *tho2Δ*. Como se observa en la Figura 27, los niveles de actividad β-galactosidasa del mutante *tho1Δ* fueron similares a los de la estirpe silvestre mientras que la actividad detectada en el mutante *tho2Δ* cayó drásticamente, incluso a niveles inferiores a los del mutante *hpr1Δ*. Por tanto, solamente la mutación *tho2Δ* parece afectar a la expresión del gen *lacZ* de una forma similar a lo que ocurre en células *hpr1Δ*.

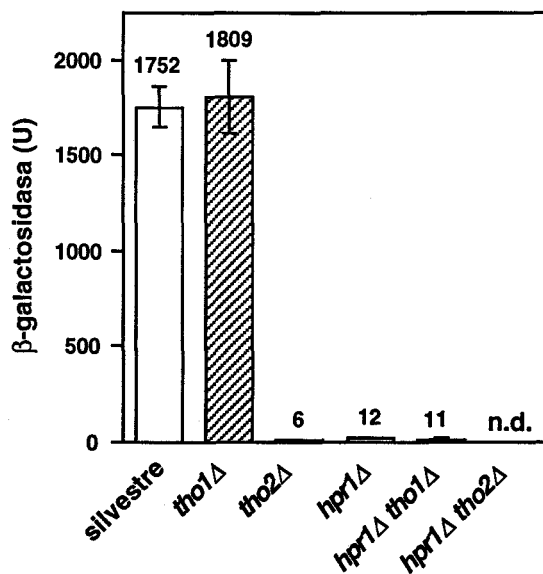


Figura 27. Actividad β-galactosidasa en estirpes mutantes *tho1Δ* y *tho2Δ* transformadas con el plásmido pLGSD5. Sólo se muestran los valores de expresión inducida. En condiciones de represión los valores detectados fueron de aproximadamente 1 U en todos los casos. Las estirpes analizadas fueron AW33-1B (tipo silvestre), AW33-9D (*hpr1Δ*), AW33-2C (*tho1Δ*), WR-4B (*tho2Δ*) y AW33-8A (*hpr1Δ tho1Δ*). Se obtuvieron resultados similares con las estirpes: silvestre WR-4A, *tho1Δ* AW33-9A, *tho2Δ* WR-3C y *hpr1Δ tho1Δ* AW33-14C. Para más detalles ver Figura 23. n. d.: no determinado.

Por otro lado, la frecuencia de deleciones del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k* en estirpes mutantes *tho2Δ* fue entre 1000 y 2600 veces superior a las del silvestre (Tabla 5). En mutantes *tho1Δ* no se observó diferencia significativa respecto al tipo silvestre. El fenotipo de hiper-recombinación observado en el mutante *tho2Δ* es incluso un orden de magnitud superior al de *hpr1Δ*. Al igual que en este último, el sistema utilizado permite visualizar el fenotipo de hiper-recombinación como la aparición de sectores rojos en las colonias debido a la alta frecuencia de pérdida del gen *ADE2* (Figura 28). El doble mutante *hpr1Δ tho2Δ* presentó niveles de recombinación del orden de los del mutante simple *tho2Δ* (Tabla 5). Esta relación de epistasia sugiere que ambos genes pueden estar implicados en el mismo proceso biológico.

TABLA 5. Frecuencia de deleciones ($\times 10^6$) en el sistema de repeticiones directas *leu2-k::URA3-ADE2::leu2-k* en estirpes mutantes *tho1Δ* y *tho2Δ* en fondos genéticos silvestre y mutante *hpr1Δ*

Genotipo	Estirpe	Frecuencia ^a
silvestre	AW33-12A	53
	WRA-7A	62
<i>hpr1Δ</i>	AW33-9D	16000 (278)
	WRA-24D	25000 (435)
<i>tho1Δ</i>	AW33-10B	150 (2.6)
	AW33-1D	87 (1.5)
	AW33-8C	89 (1.5)
<i>tho2Δ</i>	WRA-4B	63000 (1100)
	WRA-4D	93000 (1600)
	WRA-5A	150000 (2600)
	WRA-7B	140000 (2400)
<i>hpr1Δ tho1Δ</i>	AW33-1A	21000 (365)
	AW33-2A	18000 (313)
<i>hpr1Δ tho2Δ</i>	WRA-8A	110000 (1900)
	WRA-31B	90000 (1500)

^a Los números entre paréntesis indican el número de veces que aumenta cada valor respecto a la media de los valores del silvestre.

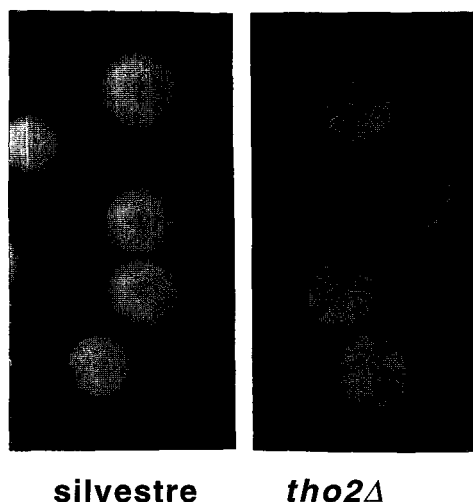


Figura 28. Colonias de la estirpe silvestre AW33-12A y *tho2Δ* WRA-7B cultivadas en medio SC con 16 mg/ml de adenina y 75 mg/l de FOA. En la estirpe *tho2Δ* se observan sectores rojos como consecuencia de la alta frecuencia de pérdida del gen *ADE2* por recombinación.

La supresión de la termosensibilidad y de los defectos en transcripción de los mutantes *hpr1Δ* por la sobreexpresión de *THO1*, sugiere que este puede tener una función en la célula relacionada con la de *HPR1*. Sin embargo, debido a la ausencia de efectos en expresión génica y recombinación de la mutación *tho1Δ*, tanto en fondo silvestre como *hpr1Δ* (Figura 27; Tabla 5), decidimos concentrar nuestra investigación en el estudio de la mutación *tho2Δ*.

II.3.3. Efecto de la mutación *tho2Δ* en la transcripción por la ARN polimerasa II

El defecto de las células *hpr1Δ* en la expresión de la fusión *GAL1::lacZ* se debe a una incapacidad para transcribir a través de *lacZ* en lugar de a un efecto en la activación del promotor *GAL1*. De hecho, los mutantes *hpr1Δ* son capaces de expresar la construcción *GAL1::PHO5* (Chávez y Aguilera, 1997). Para determinar si la mutación *tho2Δ* causaba el mismo defecto en la expresión de *GAL1::lacZ* que *hpr1Δ*, determinamos los niveles de actividad β-galactosidasa y fosfatasa ácida (codificada por el gen *PHO5*) de células transformadas con las construcciones *GAL1::lacZ* y *GAL1::PHO5* localizadas en los plásmidos centroméricos p416GAl1lacZ y pSCh202.

Como se observa en la Figura 29, en condiciones de activación del promotor *GAL1*, la actividad β-galactosidasa en las estirpes *tho2Δ* se redujo a niveles casi indetectables (6% respecto al tipo silvestre), mientras que la actividad fosfatasa ácida detectada alcanzó el 25% de los niveles del silvestre. En condiciones de represión no se observó diferencia entre ambas estirpes. Este resultado sugería que el promotor *GAL1* podría activarse en células *tho2Δ* y que

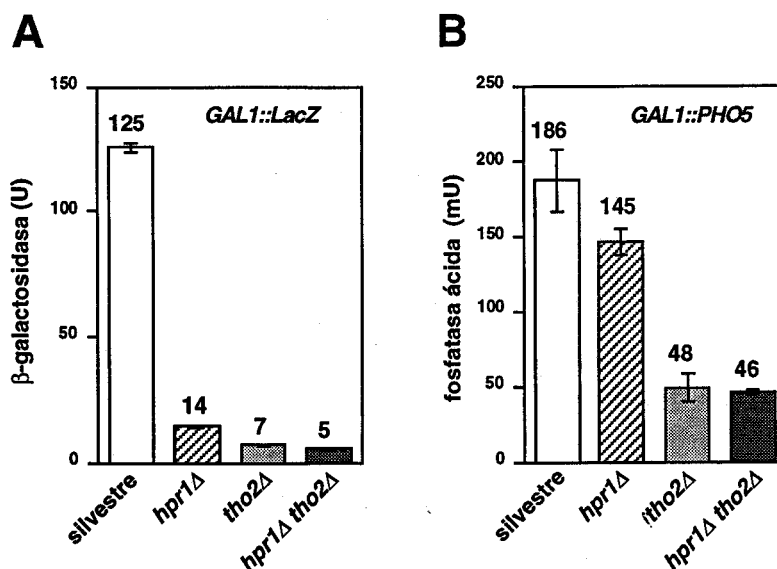


Figura 29. Expresión de los genes *lacZ* y *PHO5* fusionados al promotor de *GAL1*. (A) Actividad β -galactosidasa de las estirpes isogénicas WR-4A (silvestre), U768-4C (*hpr1* Δ), WR-4B (*tho2* Δ) y UR-1A (*hpr1* Δ *tho2* Δ) transformadas con el plásmido p416GAL1lacZ, que lleva la fusión *GAL1::lacZ*. (B) Actividad fosfatasa ácida de las mismas estirpes que antes transformadas en este caso con el plásmido pSch202, que lleva la fusión *GAL1::PHO5*. Sólo se muestran los valores de expresión inducida. En condiciones de represión los valores detectados en todas las estirpes fueron de aproximadamente 1 U para la actividad β -galactosidasa y de aproximadamente 5 mU para la actividad fosfatasa ácida. Para más detalles ver Figura 23.

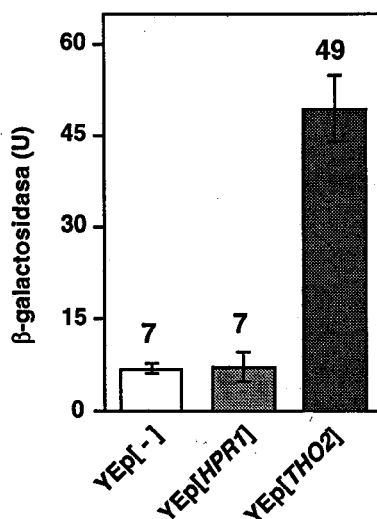


Figura 30. Actividades β -galactosidasa de la estirpe *tho2* Δ RK2-6C portadora del plásmido p416GAL1lacZ y transformada con los plásmidos YEpl351 (YEpl[-] usado como control), YEpl4-A7 (YEpl[HPR1]) o pSUP38 (YEpl[THO2]). Sólo se muestran los valores de expresión inducida. En condiciones de represión los valores detectados en todas las estirpes fueron de aproximadamente 1 U. Para más detalles ver Figura 23.

la incapacidad de expresar el gen *lacZ* se debería a un defecto en la transcripción a través de este gen y no a la falta de activación del promotor. Este mismo defecto se podría dar sobre la transcripción de *PHO5*, aunque en menor medida. No obstante, la reducción al 25% de actividad fosfatasa ácida de los transformantes con la fusión *GAL1::PHO5* planteaba la posibilidad de un efecto añadido de *tho2Δ* sobre el promotor.

Los niveles de expresión de las fusiones *GAL1::lacZ* y *GAL1::PHO5* en los dobles mutantes *hpr1Δ tho2Δ* fueron similares a los de los simples mutantes *tho2Δ*. Esta falta de sinergismo de las dos mutaciones apoya la idea de que ambos genes esten implicados en el mismo proceso biológico. La epistasia de *tho2Δ* sobre *hpr1Δ* podría reflejar un cierto orden de actuación de ambas proteínas. Determinamos si la sobreexpresión de *HPR1* suprimía la falta de expresión de *GAL1::lacZ* en el mutante *tho2Δ*. Transformamos una estirpe mutante *tho2Δ*, portadora del plásmido p416GAL1lacZ, con el gen *HPR1* subclonado en el vector multicopia YEp13 (ver *Materiales y Métodos*, sección IV.3.). Los niveles de actividad β-galactosidasa de este transformante no diferían de los niveles de la misma estirpe transformada con el vector (Figura 30) reforzándose, por tanto, la idea de una "jerarquía" en la acción de ambas proteínas.

Para confirmar que la reducción de la expresión de *lacZ* y *PHO5* observada en los experimentos anteriores se debían a defectos transcripcionales y no post-transcripcionales, determinamos las cinéticas de acumulación de sus transcritos a partir del promotor *GAL1*. La Figura 31 muestra que, mientras que en los mutantes *tho2Δ* no se acumuló transcrito de *lacZ* después de 250 min. de inducción del promotor por galactosa, la cantidad de transcrito de *PHO5* acumulado en la misma estirpe alcanzó el 17.7% respecto al silvestre. Estos datos son consistentes con los datos de actividad enzimática (Figura 29) y confirman que el efecto de *tho2Δ* sobre la expresión de *GAL1::lacZ* y *GAL1::PHO5* se da a nivel de transcripción. La diferencia en la acumulación de ambos transcritos, teniendo en cuenta que su síntesis está dirigida por el mismo promotor, sugiere que el efecto sobre el gen *lacZ* se debe fundamentalmente a un defecto en elongación. De nuevo, la menor acumulación de ARNm de *PHO5* en el mutante *tho2Δ* no nos permite distinguir entre un efecto sobre la elongación a través del gen *PHO5* o a un efecto adicional sobre la activación del promotor *GAL1*.

Ya que todos los resultados mostrados hasta ahora se refieren a fusiones con un promotor regulable, como *GAL1*, localizado en un plásmido centromérico, nos pareció importante determinar si *tho2Δ* afectaba de la misma manera a la transcripción de genes constitutivos y de genes localizados en el cromosoma, especialmente tras los resultados obtenidos del análisis de los mutantes *hrs1Δ* (secciones II.2.1 y II.2.2). Analizamos mediante *Northern* la cinética de acumulación del ARNm del gen *GAL1* endógeno de la levadura. La Figura 32 muestra que en células mutantes *tho2Δ* se alcanzaron niveles de

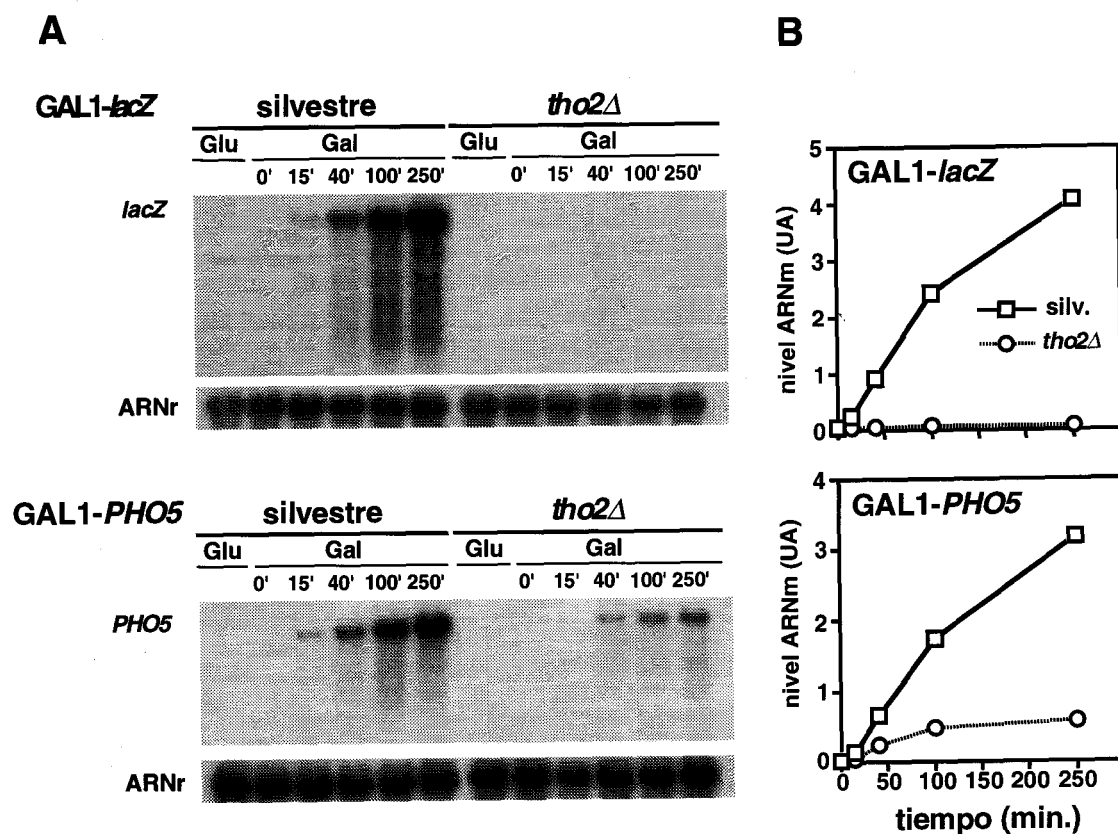


Figura 31. Análisis de transcripción de las fusiones *GAL1::lacZ* y *GAL1::PHO5*. (A) Análisis de Northern del ARNm de *lacZ* y *PHO5* en las estirpes isogénicas WR-4A (silvestre) y WR-4B (*tho2Δ*) transformadas con los plásmidos p416GAL1*lacZ* y pSch202. Se partió de cultivos de células en medio SG/L-ura, los cuales se diluyeron en el mismo medio a una D.O.₆₀₀: 0.5 (estirpe silvestre) o 1.0 (estirpe mutante). En ese momento se añadió galactosa (Gal) al medio y se tomaron muestras para extraerles el ARN a los diferentes tiempos indicados. Para las condiciones de represión (Glu) se preparó ARN de cultivos en SC-ura en fase exponencial de crecimiento. Se usaron como sondas los fragmentos de ADN *Bam*HI-*Hpa*I de 0.5 kb interno de *lacZ* (sonda *lacZ*) y *Eco*RI-*Pst*I de 1.5 kb interno de *PHO5* (sonda *PHO5*). Para determinar la cantidad de ARN cargado en cada pocillo se hibridaron los filtros con un fragmento de 589 pb interno del ADNr 28S obtenido por PCR (ARNr). (B) Cinética de inducción de la expresión de *lacZ* y *PHO5* determinada por la cuantificación de las bandas correspondientes a los transcritos de longitud completa de cada experimento de Northern. Las bandas correspondientes al ARNr 28S se utilizaron para normalizar los valores. UA: unidades arbitrarias.

transcrito de *GAL1* del 15.6% respecto al silvestre, un valor similar al obtenido para la fusión *GAL1::PHO5*. La cantidad de transcrito del gen *ACT1* endógeno en el mutante *tho2Δ* fue de 32-53% respecto al silvestre cuando se cultivaron las células en medio SG/L (medio mínimo con glicerol y lactato como fuente de carbono. Ver *Materiales y Métodos*, sección IV.1.1.) con o sin galactosa (figura 32). Sin embargo, no se observó diferencia con el tipo silvestre en medio con glucosa. Estos resultados confirman un efecto general de la mutación *tho2Δ* sobre la transcripción, independientemente de la localización de los genes, plasmídica o cromosómica, o de su expresión, inducida o constitutiva.

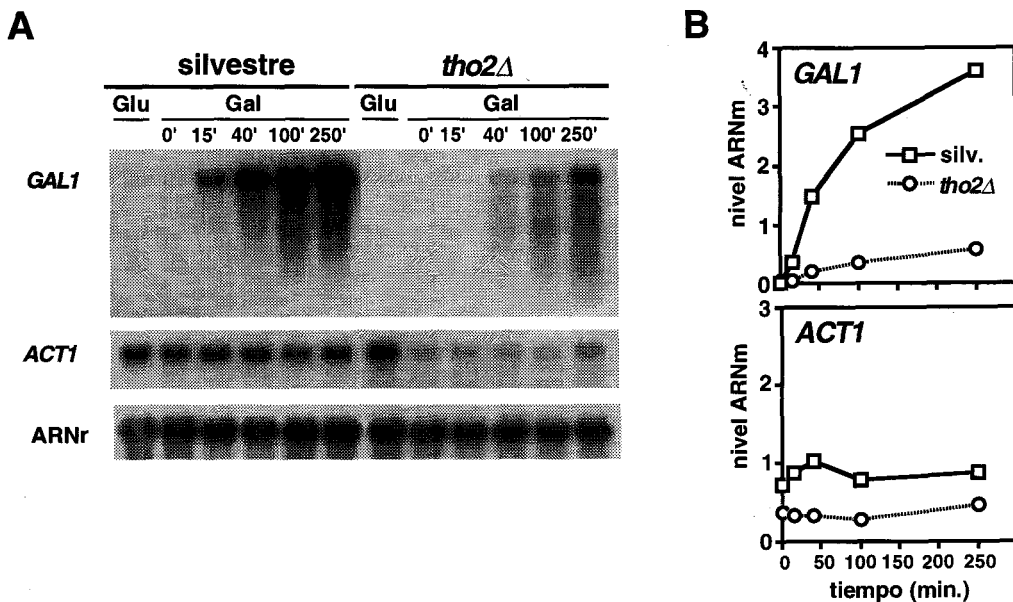


Figura 32. Análisis de transcripción de los genes *GAL1* y *ACT1* endógenos. (A) Análisis de Northern del ARNm de los genes *GAL1* y *ACT1* endógenos de las estirpes WR-4A (silvestre) y WR-4B (*tho2Δ*). (B) Cinética de la inducción de la expresión determinada por cuantificación de las bandas detectadas en cada experimento de Northern anterior. Se utilizaron como sondas los fragmentos *PvuII-AvaI* de 0.75 kb interno de *GAL1* (sonda *GAL1*) y *ClaI-ClaI* de 0.55 kb interno de *ACT1* (sonda *ACT1*). Para más detalles ver Figura 31.

II.3.4. Defectos en elongación de la transcripción independientes de promotor en mutantes *tho2Δ*

Existen genes eucarióticos que presentan regiones de pausa o bloqueo de la transcripción cerca de sus extremos 5'. En estas regiones, la ARN polimerasa II requiere la acción de activadores transcripcionales para continuar la elongación (Eick *et al.*, 1994; Bentley, 1995). Los bloqueos de la elongación a través del gen *lacZ* en el mutante *hpr1Δ*, sin embargo, son independientes del promotor

(Chávez y Aguilera, 1997). Partiendo del hecho de que la transcripción del gen *PHO5* a partir del promotor *GAL1* en mutantes *tho2Δ* se da a niveles superiores que la del gen *lacZ* a partir del mismo promotor (Figura 31), decidimos insertar la región codificante de *lacZ* en el extremo 3' de la fusión *GAL1::PHO5* en la región UTR (*untranslated region*) de *PHO5*. En esta nueva fusión *GAL1::PHO5-lacZ* la ARN polimerasa II tiene que transcribir 1.5 kb del gen *PHO5* antes de entrar en la región de *lacZ*. El análisis de *Northern* mostró que las células *tho2Δ* no acumulaban una cantidad detectable de ARNm de completo *PHO5-lacZ* tras la inducción de la transcripción (Figura 33) al igual que lo observado con la construcción *GAL1::lacZ* (Figura 31). El ARNm total detectado en el *Northern* que incluye aquellos transcritos *PHO5-lacZ* incompletos que se visualizan en el gel como un barrido, se acumuló en el mutante *tho2Δ* hasta un nivel del 12% respecto a los del silvestre. Aunque la ARN polimerasa pierde procesividad al atravesar la región de *lacZ*, es capaz de transcribir a través de *PHO5*. Por tanto, la incapacidad de la ARN polimerasa II de elongar la transcripción a través del gen *lacZ* en el mutante *tho2Δ*, se da independientemente de la distancia de este gen al promotor desde el cual es transcrito.

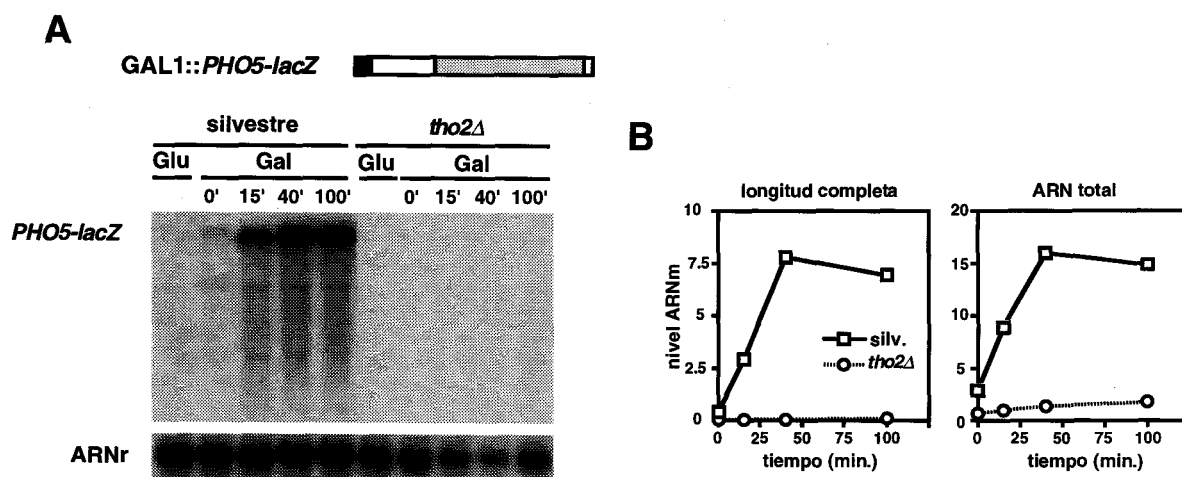


Figura 33. Análisis de transcripción de la fusión *GAL1::PHO5-lacZ*. (A) Análisis de *Northern* de la fusión *GAL1::PHO5-lacZ* en las estirpes RK2-6A (silvestre) y RK2-6C (*tho2Δ*) transformadas con el plásmido pSch212. En este plásmido el gen *lacZ* se ha insertado en la región UTR en el extremo 3' del gen *PHO5*, tal como se muestra en el diagrama. Se usó como sonda el fragmento de ADN *EcoRI-PstI* de 1.5 kb interno de *PHO5* (sonda *PHO5-lacZ*). (B) Cinética de inducción de la expresión de los transcritos completos y ARNm total. Para más detalles ver Figura 31.

II.3.5. Análisis *run-on* de la transcripción en mutantes *tho2Δ*

Para confirmar un efecto de la mutación *tho2Δ* en la elongación de la

transcripción decidimos realizar un análisis *run-on* de la fusión *GAL1::PHO5-lacZ* en células permeabilizadas (*Materiales y Métodos*, sección IV.18.). Mediante este análisis es posible cuantificar la cantidad de transcritos de distinta longitud de un gen en un momento concreto de la transcripción. En el caso de que la elongación se esté parando en uno o varios puntos del gen se observará una reducción en la cantidad de transcritos cuya longitud sobrepase dichos puntos. Como se observa en la Figura 34, los niveles de transcritos de *PHO5-lacZ* del mutante *tho2Δ* fueron de alrededor de un 5% respecto al silvestre después de 1 hora de activación del promotor *GAL1*. Esta reducción fue detectable a partir del primer fragmento analizado. Cabe la posibilidad de que en el caso de que se estuviera dando una parada dentro del gen, esta no se pudiera ser detectar debido a los bajos niveles de transcripción. Este resultado sugiere que la mutación *tho2Δ* también afecta a la expresión de *GAL1::PHO5-lacZ* a nivel de iniciación, aparte de su efecto en la elongación.

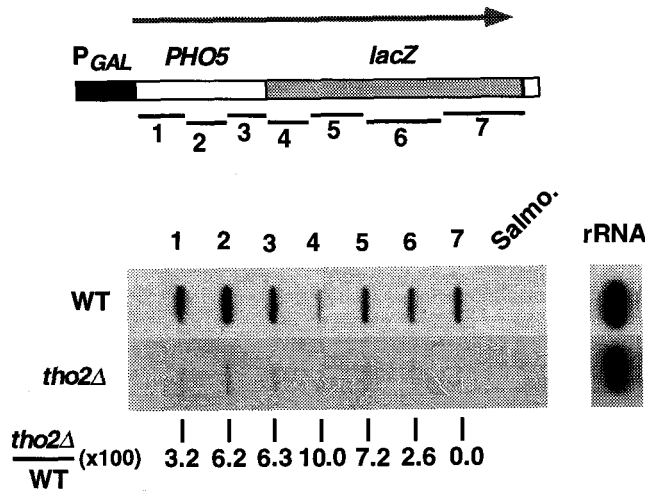


Figura 34. Análisis *run-on* de la transcripción de *GAL1::PHO5-lacZ*. Se analizó el ARN extraído de las estirpes RK2-6A (silvestre) y RK2-6C (*tho2Δ*) transformadas con pSch212. El diagrama muestra la fusión *GAL1::PHO5-lacZ* y los fragmentos de ADN utilizados como sondas (1: *EcoRI-SspI* de 0.55 kb de *PHO5*, 2: *SspI-EcoRV* de 0.47 kb de *PHO5*, 3: *EcoRV-BglII* de 0.46 kb de *PHO5*, 4: *BamHI-HpaI* de 0.44 kb de *lacZ*, 5: *HpaI-HpaI* de 0.62 kb de *lacZ*, 6: *HpaI-SacI* de 0.89 kb de *lacZ*, y 7: *SacI-EcoRI* de 1.06 kb de *lacZ*). Una flecha indica el sentido de la transcripción. Como control de hibridación inespecífica se usó ADN de *Salmonella* (Salmo.). La cantidad de ARN hibridado se cuantificó y se normalizó con el ARNr hibridado con el mismo fragmento de ADNr utilizado en la Figura 27 (ARNr). Se muestra la proporción (en porcentaje) de las intensidades de cada banda obtenida con el ARN de la estirpe mutante en relación con la banda de la misma sonda en el silvestre.

II.3.6. Recombinación asociada a transcripción en mutantes *tho2Δ*

En mutantes *hpr1Δ* los defectos en la elongación de la transcripción provocan una alta frecuencia de recombinación entre secuencias repetidas cuando estas se transcriben (Prado *et al.*, 1997; Chávez y Aguilera, 1997). Dados los fenotipos de recombinación y transcripción de los mutantes *tho2Δ*, comprobamos si en estos mutantes ambos procesos también estaban relacionados.

Para ello, utilizamos sistemas de recombinación localizados en plásmidos centroméricos, basados en repeticiones del gen *LEU2* truncadas en las regiones 3' o 5' (Prado y Aguilera, 1995). Ambas repeticiones comparten una región de homología interna de 0.6 kb. La recombinación entre ellas da lugar a un gen *LEU2* funcional que posibilita la selección en SC-leu de los recombinantes (Figura 35A). Entre ambas repeticiones están insertadas las secuencias codificantes de los genes *lacZ* y *PHO5* estudiadas en los experimentos anteriores, las cuales son transcritas a partir del promotor del gen *LEU2* situado corriente arriba de las repeticiones. El gen *lacZ* está insertado en la misma orientación que las repeticiones de *leu2* (sistema L-*lacZ*), mientras que el gen *PHO5* está insertado en la misma orientación que las repeticiones (sistema L-*PHO5*) o en la opuesta (L-*PHO5r*) (Chávez y Aguilera, 1997) (Figura 35). En estos sistemas, la maquinaria de transcripción tiene que atravesar 760 pb antes de entrar en las secuencias entre las repeticiones. En el sistema L-*PHO5r* existe un terminador de la transcripción justo después de la primera repetición, que coincide con el terminador del gen *PHO5*, y que impide que la transcripción progrese a través de la secuencia intermedia (Chávez y Aguilera, 1997). Si en los mutantes *tho2Δ* se produjeran bloqueos en la elongación a través de *lacZ* y *PHO5*, y estos bloqueos fueran de la misma naturaleza que los que se dan en los mutantes *hpr1Δ*, esperaríamos un efecto de hiper-recombinación al menos en los sistema L-*lacZ* y L-*PHO5*.

Como se observa en la Figura 35B, la frecuencia de recombinación en el sistema L-*lacZ* fue tan alta en la estirpe *tho2Δ*, que todos los transformantes habían perdido la duplicación (100% de células recombinantes). Como consecuencia de ello, no se detectó en el *Northern* el transcrito que se sintetiza a partir del promotor de *LEU2* y que atraviesa la región de *lacZ*, observado en la estirpe silvestre. En el sistema L-*PHO5*, los niveles de transcrito del mutante fueron el 6.7% de los del silvestre, mientras que la recombinación aumentó 700 veces respecto a la del silvestre (el 38% de las células perdieron el sistema) (Figura 35B). Este resultado sugiere que la elongación de la transcripción a través de *PHO5* es defectuosa en células *tho2Δ* provocando la recombinación entre las secuencias repetidas flanqueantes. La mayor frecuencia de recombinación observada en el sistema L-*lacZ* frente al sistema L-*PHO5* es coherente con el hecho de que en el sistema *GAL1::PHO5* se de un 25% de transcripción respecto al

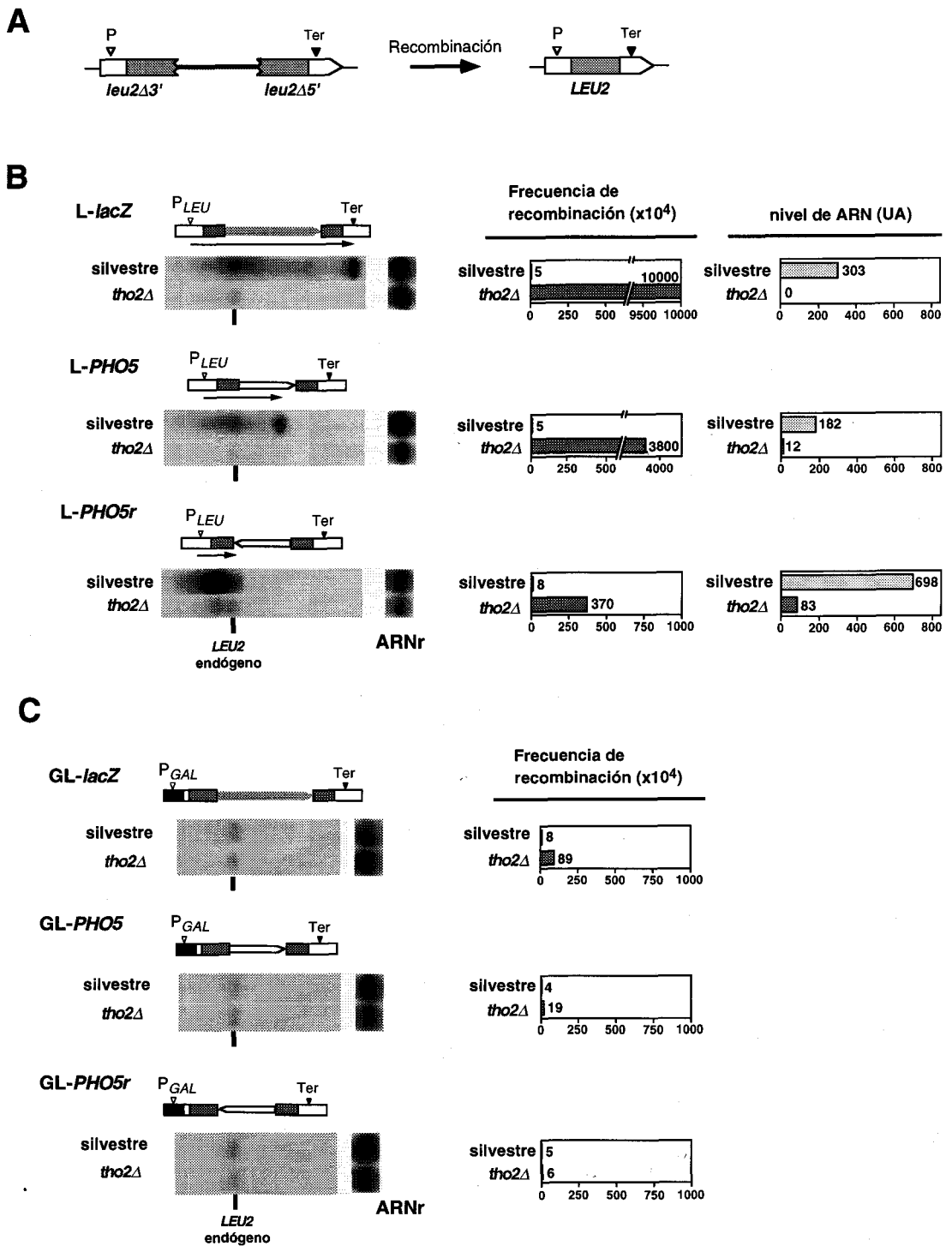


Figura 35. Análisis de transcripción y recombinación de los sistemas basados en repeticiones directas en las estirpes RK2-6A (silvestre) y RK2-6C (*tho2Δ*). (A) Esquema de la delección que resulta de la recombinación entre las repeticiones internas del gen *LEU2*. El diagrama muestra la secuencia repetida de 600 pb (regiones sombreadas), la posición del promotor (P), bien de *LEU2*

(P_{LEU2}) bien de $GAL1$ (P_{GAL1}), y la secuencia de terminación de la transcripción de $LEU2$ (Ter). (B) Frecuencias de recombinación y niveles de ARNm determinado por análisis de *Northern* de las estirpes mencionadas transformadas con los plásmidos pSch204, pSch206 y pSch207, los cuales llevan los sistemas $L-lacZ$, $L-PHO5$ y $L-PHO5r$, respectivamente. Se indica el sentido de la transcripción de los genes $lacZ$ y $PHO5$. Los transcritos sintetizados a partir del promotor de $LEU2$ (P_{LEU2}) se representan con flechas cuyos extremos 3' se han hecho coincidir con la posición de la banda correspondiente en el *Northern*. (C) Análisis de *Northern* y frecuencia de recombinación de los sistemas $GL-lacZ$, $GL-PHO5$ y $GL-PHO5r$ en las mismas estirpes que en B transformadas con los plásmidos p414GLlacZ, pSG206 y pSG207 respectivamente y cultivadas en condiciones de represión del promotor $GAL1$ (medio SC). En estos sistemas el promotor de $LEU2$ se ha sustituido por el promotor de $GAL1$ (P_{GAL1}). La sonda utilizada en B y C fue un fragmento *ClaI-EcoRI* de 0.48 kb de $LEU2$. La sonda de ADN_r utilizada para normalizar la cantidad de ARN cargado fue la misma que en la Figura 27. Una barra vertical indica la posición del transcrito del gen *leu2* localizado en el cromosoma. UA: unidades arbitrarias.

silvestre, frente a los niveles casi indetectables de transcripción del sistema $GAL1::lacZ$. En el sistema $L-PHO5r$, en el que la transcripción no atraviesa $PHO5$, se observó un aumento de la recombinación de 48 veces respecto al silvestre (Figura 35B). Esto sugiere que la elongación de la transcripción a través de $LEU2$ también está afectada. De hecho, los niveles de ARNm de este sistema en el mutante fueron el 12% del silvestre. De nuevo, la diferencia en las frecuencias de recombinación entre los sistemas $L-PHO5$ (38%) y $L-PHO5r$ (3.7%) apoya nuestra hipótesis de que la transcripción a través de $PHO5$ es defectuosa en los mutantes $tho2\Delta$. Es importante tener en cuenta que en estos sistemas la recombinación sólo puede iniciarse dentro de las repeticiones o en la región intermedia, pero no fuera de tales secuencias (Prado y Aguilera, 1995). Por tanto, un posible efecto de la mutación $tho2\Delta$ sobre el promotor de $LEU2$, localizado fuera de las repeticiones, no tendría consecuencias en la recombinación entre las mismas.

Para confirmar que el aumento en la recombinación de estos sistemas en el mutante $tho2\Delta$ era un proceso dependiente de la transcripción, sustituimos el promotor de $LEU2$ por el promotor regulable de $GAL1$, de forma que fuera posible abolir la transcripción en el sistema cultivando las células en condiciones de represión. A estos nuevos sistemas los denominamos $GL-lacZ$, $GL-PHO5$ y $GL-PHO5r$. Como se observa en la Figura 35C, no se detectó transcrito en ninguno de los sistemas cuando las células se cultivaron en medio con glucosa como fuente de carbono (condiciones de represión). La frecuencia de recombinación en los mutantes fue similar a la de los silvestres. Sin embargo, mientras que en los silvestres no se observó diferencia alguna en los niveles de recombinación independientemente de que los sistemas se transcribieran o no, en los mutantes la frecuencia de recombinación en condiciones de transcripción (sistemas con el promotor $LEU2$) fue entre 57 y 200 veces superior a la que se daba en condiciones de no transcripción (sistemas con el promotor $GAL1$ en condiciones de represión). Este resultado implica que la simple presencia de las secuencias de $lacZ$ y $PHO5$ no afecta a la recombinación entre las secuencias que las flanquean,

en un fondo mutante *tho2Δ*, a menos que sean transcritas. La única excepción destacable es el aumento de 10 veces de la recombinación en el sistema *L-lacZ* del mutante *tho2Δ* frente al silvestre, en condiciones de represión del promotor *GAL1*. Este aumento puede ser debido a una transcripción residual del sistema, independiente del promotor *GAL1*. De hecho, cuando se sobreexpusieron las membranas de los experimentos de *Northern* se detectaron señales débiles de transcritos de distintos tamaños (resultado no mostrado). Estos resultados corroboran la idea de que la hiper-recombinación inducida por la mutación *tho2Δ* es dependiente de la transcripción de la región implicada en recombinación.

II.3.7. Inestabilidad de plásmidos en células *tho2Δ*

Las frecuencias de recombinación de los sistemas *GL-lacZ*, *GL-PHO5* y *GL-PHO5r* en condiciones de activación del promotor *GAL1* (medio con galactosa) no se pudieron determinar debido a que en este medio en la estirpe *tho2Δ* los plásmidos que los portaban eran muy inestables y no se conseguían colonias transformantes del tamaño suficiente para realizar el experimento. Ya que se había descrito que en los mutantes *hpr1Δ* aumentaba la inestabilidad de plásmidos de forma dependiente de la transcripción de dicho plásmido (Chávez y Aguilera, 1997), nos planteamos la posibilidad de que en los mutantes *tho2Δ* se diera un fenotipo de inestabilidad de plásmidos asociada a transcripción similar al observado para *hpr1Δ*.

Determinamos la frecuencia de pérdida de los plásmidos centroméricos *p416GAL1lacZ* y *pSCh202* portadores de las construcciones *GAL1::lacZ* y *GAL1::PHO5*, respectivamente, en condiciones de activación y represión de la transcripción a partir del promotor *GAL1*. Los datos que se muestran en la Tabla 6 indican que ambos plásmidos son muy inestables en células *tho2Δ*. Sin embargo, no nos permiten definir si esta inestabilidad es dependiente de la transcripción ya que ambos plásmidos son inestables incluso en condiciones de represión. Es probable que la transcripción constitutiva del gen *URA3*, presente en estos plásmidos como marcador de selección, esté también afectada en el mutante *tho2Δ*, y sea la causa de la inestabilidad observada.

II.3.8. Supresión de *tho2Δ* por *srb2Δ* y *hrs1Δ*

Si Hpr1p y Tho2p poseen funciones relacionadas entre sí en el proceso de elongación de la transcripción y su ausencia en la célula provoca inestabilidad genómica (observada como hiper-recombinación entre secuencias repetidas e inestabilidad de plasmidos) a través de un proceso de la misma naturaleza, las mutaciones *srb2Δ* y *hrs1Δ*, aisladas como supresoras de las deleciones inducidas por *hpr1Δ*, deberían suprimir el fenotipo de hiper-recombinación de *tho2Δ*. Para determinar si esto era así, generamos mediante cruces genéticos estirpes dobles

Tabla 6. Estabilidad mitótica de plásmidos centroméricos en estirpes mutantes *tho2Δ*

Genotipo ^a	Estabilidad (%) ^b			
	p416GAL1lacZ		pSch202	
	Glucosa	Galactosa	Glucosa	Galactosa
silvestre	64.0	27.0	42.0	22.0
<i>tho2Δ</i>	4.9	2.1	5.4	1.3

^a Se utilizaron las estirpes RK2-6A (silvestre) y RK2-6C (*tho2Δ*).

^b La estabilidad se determinó después de 23 generaciones de crecimiento en YEPD suplementado con uracilo.

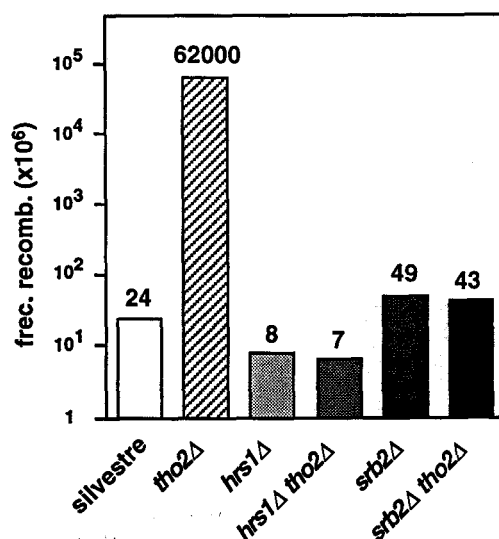


Figura 36. Supresión del fenotipo de hiper-recombinación de *tho2Δ* por *hrs1Δ* y *srb2Δ* en el sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. Se determinaron las frecuencias de recombinación (ver *Materiales y Métodos*, sección IV.5.) en las estirpes WRK5-3C (silvestre), WRK5-1C (*tho2Δ*), WRK5-7B (*hrs1Δ*), WRK5-2D (*tho2Δ hrs1Δ*), HDY3-3D (*srb2Δ*) y WDY3-3C (*tho2Δ srb2Δ*).

mutantes *tho2Δ srb2Δ* y *tho2Δ hrs1Δ* portadoras del sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*. Como se observa en la Figura 36, las mutaciones en ambos componentes del holoenzima de la ARN polimerasa II suprimieron la recombinación estimulada por la mutación *tho2Δ* de forma idéntica a lo observado en el mutante *hpr1Δ*. Este resultado refuerza la idea de que Tho2p y Hpr1p están implicadas en el mismo proceso teniendo sus mutaciones nulas idénticas consecuencias para la célula.

III. DISCUSIÓN

El gen *HPR1* es necesario para la estabilidad de secuencias repetidas directas en *S. cerevisiae*, como lo demuestra el hecho de que los mutantes *hpr1Δ* presentan una frecuencia de deleciones de hasta 1000 veces la del tipo silvestre (Aguilera y Klein, 1990). En esta tesis hemos demostrado que mutaciones en factores generales de transcripción suprimen el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ*, lo que apoya la idea de que Hpr1p juega un papel en transcripción. Hemos demostrado que el gen *HRS2*, supresor de *hpr1Δ* (Santos-Rosa y Aguilera, 1995), es *SRB2* (Koleske *et al.*, 1992), que codifica un componente del complejo "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Koleske y Young, 1994). Hemos determinado que el gen *HRS1*, otro supresor de *hpr1Δ* (Santos-Rosa *et al.*, 1996), es un homólogo funcional de *GAL11*, *SIN4* y *RGR1*, que codifican componentes del complejo "mediador" al que pertenece Srb2p. Por último, hemos identificado dos nuevos genes, *THO1* y *THO2*, relacionados funcionalmente con *HPR1*. La deleción del gen *THO2* causa los mismos fenómenos de inestabilidad genómica asociados a transcripción observados en mutantes *hpr1Δ*, lo que convierte a este gen en un análogo funcional de *HPR1*. El análisis genético y molecular de mutantes *tho2Δ* nos ha permitido implicar a este gen en elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II y en recombinación entre secuencias repetidas directas, al igual que ocurre con *HPR1* (Prado *et al.*, 1997; Chávez y Aguilera, 1997).

III.1. La mutación *hrs2-1* está en el gen *SRB2*, que codifica un componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II

La mutación *hrs2-1* aislada originalmente suprime completamente el fenotipo de hiper-recombinación de los mutantes *hpr1Δ* (Santos-Rosa y Aguilera, 1995). Así mismo, los dobles mutantes *hpr1Δ hrs2-1* presentan un fenotipo de sensibilidad al agente alquilante MMS (Santos-Rosa y Aguilera, 1995). En este trabajo hemos clonado el gen *HRS2* por complementación del fenotipo de sensibilidad a MMS, y hemos demostrado que *HRS2* es *SRB2*, que codifica uno de los componentes del complejo "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Koleske *et al.*, 1992). Los genes *SRB* fueron identificados en una búsqueda de mutantes supresores de mutaciones en el dominio CTD de la ARN polimerasa II (Nonet y Young, 1989) y definen un conjunto de proteínas que interaccionan con el CTD. Algunas de estas proteínas forman parte del "mediador" (Koleske y Young, 1994).

Por otro lado, hemos clonado la mutación *hrs2-1*, a la que hemos denominado *srb2-101*. Tanto los mutantes puntuales *srb2-101* como los nulos *srb2Δ* suprimen totalmente el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* y presentan defectos similares en la activación del promotor *GAL1,10*. Sin embargo, sólo la mutación *srb2-101* es capaz de suprimir, aunque parcialmente, el defecto transcripcional de *hpr1Δ* (Tabla 2). Es difícil explicar este resultado en términos moleculares. Una posibilidad consiste en que la proteína modificada

Srb2-101p participe en un complejo de transcripción que funcione de manera independiente de *HPR1*. Según esta hipótesis, esperaríamos que al sobreexpresar Srb2-101p se favoreciera la formación de dicho complejo y se potenciara la transcripción. Sin embargo, la presencia del alelo *srb2-101* en multicopia reduce los niveles de transcripción del doble mutante *hpr1Δ srb2-101* (Tabla 3), por lo que no deben descartarse otras explicaciones alternativas.

III.2. Implicación de Srb2p en reparación de ADN

Hemos observado que los mutantes *srb2* están afectados en la reparación de daños producidos por el agente MMS. El MMS es un alquilante que, a altas concentraciones, mimetiza el efecto de los rayos X ya que produce cortes en el ADN. La sensibilidad a MMS es diferente en los dos alelos mutantes analizados. Así, mientras que la mutación *srb2-101* confiere un fenotipo de sensibilidad a tratamientos prolongados de MMS tanto en fondo silvestre *HPR1* como *hpr1Δ*, la mutación *srb2Δ102* sólo confiere sensibilidad a MMS en el fondo mutante *hpr1Δ* (Figura 11). Además, el fenotipo de sensibilidad a MMS de los mutantes *srb2-101* no está acompañado por el crecimiento lento y los bajos niveles de expresión génica de los mutantes nulos *srb2Δ*. Estos resultados sugieren que *SRB2* tiene una función en reparación de ADN que es independiente de su papel en expresión génica. Por ello, consideramos improbable que la sensibilidad a MMS de los mutantes *srb2* sea una consecuencia indirecta de un efecto sobre la expresión de genes de reparación. Esta conclusión es consistente con la observación de que mutaciones de falta de función de los genes de reparación *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* confieren un fenotipo de hiper-recombinación entre repeticiones directas (McDonald y Rothstein, 1994; Aguilera 1995; Liefshitz *et al.*, 1995; Rattray y Symington, 1995). Si la sensibilidad a MMS fuera consecuencia de la reducción de la expresión de dichos genes *RAD*, no esperaríamos la supresión del fenotipo hiper-recombinador de los mutantes *hpr1Δ*.

El efecto de las mutaciones de *SRB2* en reparación añade una nueva conexión entre la transcripción por la ARN polimerasa II y la reparación de ADN. Se sabe que algunos polipéptidos del factor de transcripción TFIIH están implicados en la ruta de reparación por escisión (NER), como es el caso de los genes de levadura *RAD3* y *RAD25/SSL2* y sus homólogos humanos *XPB* y *XPB* (Aboussekhra y Wood, 1994; Cleaver 1994; Drapkin *et al.*, 1994). También cabe destacar el descubrimiento de que la proteína hRad51p, homóloga a RecA de *E. coli*, está presente en el holoenzima de la ARN polimerasa II de células humanas (Maldonado *et al.*, 1996). Con nuestros datos no es posible discernir si el mecanismo molecular de reparación afectado en los mutantes *srb2* es el de reparación por recombinación o por escisión. Queda abierta la posibilidad de que la función de reparación de *SRB2* sea la misma función necesaria para que se produzca la recombinación inducida por *hpr1Δ*.

III.3. El gen *HRS1* determina un nuevo componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II funcionalmente análogo a *GAL11* y *SIN4*

La clonación y secuenciación del gen *HRS1* indicó que la proteína Hrs1p posee un dominio de poli-glutamina y otro de poli-glutamina-alanina en el extremo carboxilo (Santos-Rosa *et al.*, 1996). Estos dominios son típicos de factores de transcripción y están implicados en las interacciones proteína-proteína. Esta región rica en glutamina de Hrs1p es similar a la de Gal11p, uno de los componentes del "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II (Koleske y Young, 1995; Björklund y Kim, 1996). *GAL11* se había aislado como un activador de la transcripción de genes del metabolismo de la galactosa (Suzuki *et al.*, 1988). Así mismo, este gen se había aislado de forma independiente como *SPT13*, por su fenotipo Spt⁻ sobre inserciones de elementos Ty. El fenotipo Spt⁻ consiste en la capacidad de algunas mutaciones de suprimir los defectos transcripcionales causados por la inserción de elementos Ty o *solo- δ* en los promotores de algunos genes.

Los mutantes *hrs1 Δ* están alterados en diferentes procesos metabólicos lo que probablemente es debido a su efecto general sobre la regulación de la expresión génica. Hemos estudiado los fenotipos Spt⁻, Gal⁻ (Figura 16), la producción de factor α (Figura 17) y el silenciamiento en telómeros (Figura 18). En todos los casos observamos un efecto de la mutación *hrs1 Δ* similar al descrito en mutantes *gal11 Δ* . Por tanto, la homología estructural entre ambas proteínas se extiende al nivel funcional.

El gen *HRS1* funciona como un regulador general de la transcripción por la ARN polimerasa II, y aparentemente no cumple ninguna función en la expresión de genes constitutivos. Mediante dos aproximaciones experimentales distintas como son el análisis del ARNm de varios genes endógenos de la levadura y los ensayos β -galactosidasa de estirpes portadoras del gen *lacZ* de *E. coli* fusionado a los promotores de dichos genes, hemos comprobado que Hrs1p juega un papel en la activación de la transcripción tanto positivo como negativo. La función de Hrs1p es independiente de la localización de los promotores analizados, plasmídica o cromosómica, o de si estos están fusionados a *lacZ* o a su región codificante natural (Figuras 13-15). Además, todos los promotores fusionados a *lacZ* están parcialmente desreprimidos en mutantes *hrs1 Δ* , lo que confiere un papel a *HRS1* en la represión de la transcripción (Figura 15). La expresión a partir de los promotores *ADH1* y *TEF2*, de expresión constitutiva, no está afectada en estos mutantes.

Este tipo de efectos tanto positivos como negativos sobre la regulación de la transcripción se había observado previamente para mutaciones en *GAL11* (Suzuki *et al.*, 1988; Fassler y Winston, 1989), *SIN4* (Covitz *et al.*, 1994; Jiang y Stillman, 1995) y *RGR1* (Stillman *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1995), genes que

codifican componentes del "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II (ver *Introducción*, sección I.5.1). Las proteínas Gall1p, Sin4p y Rgr1p forman un subcomplejo dentro del holoenzima, junto con un factor de aproximadamente 50 kD identificado bioquímicamente y denominado p50 (Li *et al.*, 1995). Curiosamente, el peso molecular de Hrs1p predicho a partir de su secuencia (Bröhl *et al.*, 1994) y observado en la proteína purificada (Santos-Rosa *et al.*, 1996) era de aproximadamente 49 kD. Estos datos planteaban la posibilidad de que Hrs1p fuera p50.

El grupo de R. Young (MIT, Boston) ha detectado mediante el uso de nuestros anticuerpos anti-Hrs1p (Santos-Rosa *et al.*, 1996) la presencia de Hrs1p en purificaciones de la holoenzima de la ARN polimerasa II, aunque en concentraciones subestequiométricas con otros componentes de la holoenzima (C. Wilson y R. Young, comunicación personal). Por otro lado, el grupo de R. Kornberg (Stanford) ha purificado recientemente una serie de proteínas, denominadas "Med", a partir de componentes asociados a la fracción libre, no asociada al ADN, de la ARN polimerasa II (Myers *et al.*, 1998). Utilizando nuestros anticuerpos anti-Hrs1p (Santos-Rosa *et al.*, 1996), este grupo ha determinado que una de ellas, Med3p, es Hrs1p (Myers *et al.*, 1998). Med3p/Hrs1p es el factor p50 asociado a Gall1p, Sin4p y Rgr1p, que se había detectado previamente como un subcomplejo en el holoenzima (Li *et al.*, 1995). Es decir, nuestras previsiones a partir de datos genéticos, de que Hrs1p podría ser el polipéptido p50 del "mediador" de la ARN polimerasa relacionado con las proteínas Gall1p, Sin4p y Rgr1p, se han visto confirmadas a nivel bioquímico. Por tanto, Hrs1p, al igual que Hrs2p/Srb2p, el otro supresor de la hiperrecombinación en células *hpr1Δ*, forma parte de la holoenzima de la ARN polimerasa II.

El efecto de *hrs1Δ* sobre la regulación de la transcripción podría estar relacionado con un efecto sobre la estructura cromatínica del ADN. La mutación *hrs1Δ* tiene un efecto diferente sobre la activación de *PHO5* y *HSP26* (Figuras 13 y 15), dependiendo de si los promotores están localizados en plásmidos o en sus respectivos *loci* cromosómicos. Así mismo, *hrs1Δ* desreprime los promotores fusionados a *lacZ* estudiados (Figura 13). Una organización cromatínica diferente entre plásmidos y cromosomas podría implicar un efecto distinto de *hrs1Δ* sobre su estructura. Teniendo en cuenta que el superenrollamiento del ADN es un factor determinante en la estructura de la cromatina, es importante mencionar que el grado de superenrollamiento de plásmidos centroméricos está afectado en mutantes *hrs1Δ* (resultado no mostrado). Este fenómeno se ha observado también en mutantes *sin4* y *rgr1* (Jiang y Stillman, 1995; Jiang *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que el efecto de *sin4* en transcripción es dependiente de la posición cromosómica del promotor analizado. Así, en mutantes *sin4* la transcripción a partir del promotor de *HIS5* está potenciada cuando se ubica en los *loci* *URA3* o *LEU2* pero no cuando está en su *locus* natural (Harashima *et al.*,

1995). Es decir, al igual que proponemos para *hrs1Δ*, la organización cromatínica podría determinar el efecto de *sin4* sobre la expresión génica. A pesar de esta similitud entre *hrs1Δ* y *sin4*, en los mutantes *hrs1Δ* no se da la activación del promotor *CYC1-ΔUAS*, desprovisto del elemento UAS (Figura 19). Dicha activación se ha descrito en los mutantes *sin4* (Jiang y stillman, 1992; Chen *et al.*, 1993), *gal11*, *rgr1* (Jiang y stillman, 1995) y en mutantes con alteraciones en la estructura de la cromatina como *spt6/ssn20* (Han y Grunstein, 1988), *hht1*, que codifica la histona H3 (Neigeborn *et al.*, 1987) y en estirpes con niveles bajos de histona H4 (Prelich y Winston, 1993). Sin embargo, también se han descrito mutaciones en la histona H4 de *S. cerevisiae* que alteran la estructura nucleosómica del ADN y desreprimen la expresión del promotor *PHO5* íntegro, pero no la del promotor *PHO5-ΔUAS* (Wechsler *et al.*, 1997). Aunque estos datos sugieren una posible relación entre el fenotipo de transcripción de *hrs1Δ* y un efecto sobre la estructura de la cromatina, no demuestran una función directa de Hrs1p en cromatina. Para resolver esta cuestión sería necesario analizar la estructura nucleosómica de los mutantes *hrs1Δ*.

Hrs1p podría tener una función específica en telómeros, como se deduce de que los mutantes *hrs1Δ* son deficientes en el mantenimiento del silenciamiento telomérico en el locus *adh4::URA3* (Figura 18). Este fenómeno podría estar relacionado con la elevada frecuencia de deleciones de secuencias teloméricas observada en mutantes *hpr1Δ* (Li y Lustig, 1996). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el efecto de *hrs1Δ* sobre el silenciamiento telomérico sea una consecuencia de su fenotipo de desrepresión general de la transcripción.

Dada la similitud de fenotipos transcripcionales de *hrs1Δ*, *gal11*, *sin4* y *rgr1*, no sorprende que tanto *sin4Δ* como *gal11Δ* supriman el fenotipo de hiperrecombinación conferido por *hpr1Δ*. Sin embargo y a diferencia de *hrs1Δ*, esta supresión no es completa (Tabla 4). En los dobles mutantes *hpr1Δ sin4Δ* y *hpr1Δ gal11Δ* se siguen observando unos niveles de recombinación entre 20 y 30 veces los del silvestre. Además, las mutaciones *sin4Δ* y *gal11Δ* por si solas no afectan a la frecuencia de deleciones que se produce de forma espontánea (Tabla 4). El efecto de estas mutaciones en recombinación es similar al observado en mutantes en TFIIB, uno de los componentes del holoenzima de la ARN polimerasa II, y en la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (Fan y Klein, 1994; Fan *et al.*, 1996), lo cual, por otro lado, corrobora la hipótesis de que la recombinación que se produce en ausencia de *HPR1* está mediada por transcripción. Estos resultados abren la posibilidad de que Hrs1p tenga un papel adicional en recombinación entre repeticiones no compartido por otros componentes del complejo de la ARN polimerasa II

III.4. *THO1* y *THO2*, dos nuevos genes relacionados funcionalmente con *HPR1*

El hecho de que la sobreexpresión de los genes *THO1* y *THO2* supriman parcialmente la incapacidad de estirpes *hpr1Δ* de transcribir el gen *lacZ*, sugiere que *THO1* y *THO2* están relacionados funcionalmente con *HPR1*. Los datos obtenidos no permiten asignar con claridad una función a *THO1*. Los mutantes *tho1Δ* no presentan ningún fenotipo de recombinación o de transcripción. Además, no se observa diferencia entre el mutante simple *hpr1Δ* y el doble *tho1Δ hpr1Δ*. El análisis de la secuencia de aminoácidos de Tho1p tampoco aporta información alguna sobre su posible función. No se detectan dominios con función definida ni homología con ningún otro gen de las bases de datos. Por el contrario, el análisis genético y molecular de las estirpes *tho2Δ* sugiere un papel de *THO2* en elongación de la transcripción y estabilidad genómica.

III.5. Función de Tho2p en transcripción

Las estirpes mutantes *tho2Δ* son incapaces de transcribir el gen *lacZ* de *E. coli*, al igual que se había observado en mutantes *hpr1Δ* (Chávez y Aguilera, 1997). Así mismo, la transcripción de genes de levadura en estirpes *tho2Δ* solamente alcanza el 17-37% de los niveles del silvestre, un fenotipo observado en células *hpr1Δ* sólo en presencia de 6-azauracilo, un inhibidor de la elongación de la transcripción. Estos resultados son independientes de que los promotores de los genes estudiados estén localizados en plásmidos o en sus *loci* cromosómicos naturales (Figuras 31-33) y sugieren que Tho2p participa en iniciación y en elongación de la transcripción. El análisis de *run-on* de la construcción *GAL1::PHO5-lacZ* indica que la iniciación de la transcripción está afectada en los mutantes *tho2Δ* (Figura 34). El análisis de *Northern* de distintas construcciones (Figuras 31 y 33) sugiere, sin embargo, un papel adicional de Tho2p en elongación. Así, cuando insertamos la secuencia de *lacZ* en la región UTR del extremo 3' del gen *PHO5* no observamos acumulación de ARNm completo en las células *tho2Δ* (Figura 33), al igual que ocurre con la construcción *GAL1::lacZ* (Figura 31). Esto se puede interpretar como una incapacidad de la ARN polimerasa II de transcribir el gen *lacZ* después de haber transcrito las 1.5 kb del gen *PHO5* que le precede. De hecho, *PHO5* se transcribe en los mutantes *tho2Δ*, aunque con menor eficiencia, tanto en el sistema *GAL1::PHO5* (Figura 31), como en el sistema *GAL1::PHO5-lacZ* (Figura 33). Por tanto, la drástica reducción en la acumulación de transcrito en células *tho2Δ* se observa independientemente del tipo de promotor analizado, ya sea constitutivo o regulado, o de la distancia entre éste y las posibles zonas de parada de la polimerasa. Esto sugiere que los mutantes *tho2Δ* están afectados en elongación de la transcripción, del mismo modo que se ha propuesto para *HPR1* (Chávez y Aguilera, 1997).

Los defectos en transcripción causados por la ausencia de *THO2* pueden ser la causa de que las estirpes mutantes presenten un crecimiento tan lento (Figura 26A). Estos mismos defectos pueden ser críticos para la correcta expresión de algunos genes esenciales a altas temperaturas, lo cual explicaría la

termosensibilidad de las estirpes *tho2Δ* (Figura 26B). Los dobles mutantes *tho2Δ hpr1Δ* no muestran sinergismo en los fenotipos de transcripción y recombinación (Tabla 5, Figura 27). Esto indica que ambos genes funcionan en el mismo paso de la transcripción. El hecho de que las mutaciones *srb2Δ* y *hrs1Δ*, supresoras del fenotipo hiper-recombinante de *hpr1Δ*, también supriman a *tho2Δ* apoya esta conclusión (Figura 36).

Con los datos obtenidos hasta ahora no podemos definir la función concreta de Tho2p en la elongación de la transcripción. Creemos que no debe de ser una función relacionada con la de TFIIS ya que Tho2p parece funcionar al mismo nivel que Hpr1p, que es distinto al de TFIIS (Chávez y Aguilera, 1997). De acuerdo con esto, *tho2Δ* no confiere sensibilidad a 6-azauracilo (resultado no mostrado), como cabría esperar si la actividad de TFIIS estuviera afectada en estirpes *tho2Δ*. Tho2p podría actuar facilitando el avance de la ARN polimerasa a través de determinadas regiones que podrían constituir sitios de pausa de la transcripción. En cuanto a la naturaleza de estas regiones, se han propuesto algunas posibilidades como son conformaciones topológicas alternativas del ADN, la formación de estructuras secundarias en el ARNm, la presencia de algunas proteínas en el ADN, la estructura en cromatina, o una acumulación local de superenrollamiento (Bentley, 1995).

La diferencia entre los efectos que provocan las secuencias de *lacZ* y la de *PHO5* en células *tho2Δ* puede deberse a una diferente organización cromatínica. Sin embargo, dada la diferencia de longitud de la secuencia que ha de ser transcrita entre el gen *lacZ* (3 kb) y el gen *PHO5* (1.6 kb), podría ser que las proteínas Tho2p y Hpr1p fueran necesarias para mantener la procesividad de la ARN polimerasa II. Durante la elongación de la transcripción se genera un superenrollamiento positivo en el ADN por delante de la ARN polimerasa II, que debe ser contrarrestado por la acción de topoisomerasas. Podría ocurrir que en los mutantes *tho2Δ* (y *hpr1Δ*) este superenrollamiento no pudiera ser relajado eficazmente, constituyendo una barrera para la ARN polimerasa de mayor o menor importancia según la longitud y la estructura del segmento de ADN transcrito. En este sentido, cabe destacar que los mutantes *tho2Δ top1Δ*, presentan un crecimiento muy pobre (González-Barrera y Aguilera, sin publicar).

La proteína Tho2p, así como Hpr1p, podría asociarse a la maquinaria de transcripción al pasar por regiones potenciales de pausa o bloqueo, donde una posible ralentización de la elongación provocara su incorporación en el complejo de la ARN polimerasa. Sin embargo, no se puede descartar que ambas proteínas se ensamblasen a la holoenzima de la ARN polimerasa II en el promotor y actuaran cuando la ARN polimerasa tuviera que atravesar dichas regiones de pausa o bloqueo.

Se han identificado varias proteínas que funcionan en la elongación de la

transcripción como son TFIIF, elongina, ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*) (Uptain, 1997) o, en mamíferos, la proteína CSB (grupo B del síndrome de Cockayne) (Balajee *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997a). Estas proteínas forman un complejo ternario con la ARN polimerasa II (Tantin *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997b) y potencian la procesividad de la polimerasa (Selby y Sancar, 1997). Recientemente se ha identificado un nuevo factor a partir de extractos nucleares de células HeLa, denominado FACT (*facilitates chromatin transcription*), que facilita la elongación de la transcripción a través de cromatina organizada en nucleosomas (Orphanides *et al.*, 1998). El factor FACT está compuesto de dos polipéptidos, de 140 y 80 kD, que curiosamente están en el mismo rango de los pesos moleculares estimados de las proteínas Tho2p (180 kD) y Hpr1p (81 kD).

Existe un mecanismo de activación de la transcripción que implica pausas de la ARN polimerasa II en la zona próxima a los promotores de algunos genes tras sintetizar un transcrito corto. Para que continúe la transcripción se requieren activadores específicos y la presencia de complejos remodeladores de cromatina. Por ejemplo, las pausas de la elongación en la zona próxima al promotor del gen humano *hsp70* depende de la presencia de nucleosomas y requiere un complejo SWI/SNF funcional para liberar la ARN polimerasa (Brown *et al.*, 1996; Brown y Kingston, 1997). Sin embargo, pensamos que las pausas de la transcripción durante la elongación en mutantes *tho2Δ* deben ser de naturaleza diferente a las que forman parte integral de la fase de iniciación o están controladas por transactivadores (Yankulov *et al.*, 1994), ya que los defectos en elongación que observamos son independientes de promotor. La incapacidad de los mutantes *tho2Δ* de transcribir el gen *lacZ* fusionado al promotor *GAL1* se da también cuando existe una región, como el gen *PHO5* de 1.5 kb, entre la secuencia de *lacZ* y el promotor (Figura 33).

III.6. Recombinación asociada a defectos de elongación en células *tho2Δ*

Los mutantes *tho2Δ* presentan un fuerte aumento de la recombinación entre repeticiones directas que llega a ser de hasta 2000 veces los niveles silvestres (Tabla 5, Figura 35). Este fenotipo sólo se observa en secuencias de ADN en estado activo de transcripción. Cuanto mayor es el efecto de *tho2Δ* sobre la transcripción de la región situada entre dos secuencias repetidas, mayor es la frecuencia de recombinación. Así, la secuencia de *lacZ*, que no se transcribe en ausencia de Tho2p, no puede mantenerse entre repeticiones directas en un mutante *tho2Δ* (Figura 35B).

La observación de que *tho2Δ* sólo causa hiper-recombinación en sistemas de repeticiones de ADN en los que tiene lugar la transcripción es consistente con una función de Tho2p en elongación. La iniciación de un suceso de recombinación en los sistemas utilizados solo puede ocurrir dentro de las repeticiones o en la región comprendida entre ellas (Prado y Aguilera, 1995). Si el

defecto en transcripción de los mutantes *tho2Δ* es el causante de la iniciación de la recombinación, este defecto tiene que darse en las regiones mencionadas, es decir, una vez que la ARN polimerasa II está en fase de elongación, ya que en los sistemas estudiados la transcripción se inicia a partir de un promotor (*LEU2* o *GAL1*) localizado fuera de las repeticiones (Figura 35). Un posible efecto de *tho2Δ* en la iniciación de la transcripción no tendría consecuencias sobre los niveles de recombinación. La alta inestabilidad de *PHO5* cuando se transcribe entre las repeticiones de *leu2* (el 38% de las células pierden el gen *PHO5*, Figura 35B), que no se da en ausencia de transcripción (Figura 35C), es consistente con la idea de la elongación de la transcripción de *PHO5* también está afectada en los mutantes *tho2Δ*.

Tho2p es importante también para el mantenimiento de plásmidos centroméricos. A diferencia del fenotipo de hiper-recombinación, no hemos podido establecer que la inestabilidad de plásmidos en mutantes *tho2Δ* sea dependiente de transcripción. Cabe la posibilidad de que la inestabilidad de los plásmidos estudiados pudiera estar asociada a la transcripción constitutiva del gen *URA3*, utilizado como marcador (Tabla 6).

La relación entre la elongación de la transcripción y la recombinación entre repeticiones en los mutantes *tho2Δ* nos permite proponer un modelo para explicar la hiper-recombinación asociada a defectos en la transcripción, que se ilustra en la Figura 37. En ausencia de Tho2p, la maquinaria de transcripción se quedaría bloqueada en determinadas regiones del ADN. Este complejo bloqueado podría promover (i) la formación de cortes de doble cadena o (ii) la parada de la horquilla de replicación, de forma similar a lo propuesto para los mutantes *hpr1Δ* (Chávez y Aguilera, 1997).

En el primer caso, una mayor accesibilidad de nucleasas al ADN podría estimular la producción de cortes, bien porque se constituyera una cromatina más abierta alrededor de la zona del bloqueo, o bien porque proteínas que participen en elongación (por ejemplo, la topoisomerasa I) provocaran cortes en el ADN. En este contexto, no se puede descartar la posibilidad de que la ARN polimerasa bloqueada reclutara la maquinaria de recombinación de una forma similar a lo que ocurre con la maquinaria de reparación acoplada a la transcripción (Bathia *et al.*, 1996; Hoeijmakers *et al.*, 1996; Friedberg, 1996).

Como segunda posibilidad, la hiper-recombinación en células *tho2Δ* podría inducirse por una parada de la horquilla de replicación tras colisionar con un complejo de transcripción bloqueado. La parada de la maquinaria de replicación generaría extremos libres de simple cadena con capacidad recombinogénica, ya que equivaldrían a cortes en el ADN que se podrían reparar por recombinación (Figura 37). Se ha demostrado en *S. cerevisiae* que la replicación se para transitoriamente en regiones 3' de genes de ARNt cuando

estos se están transcribiendo (Desphande y Newlon, 1996). En *E. coli*, las altas frecuencias de deleciones por recombinación ilegítima se asocian con colisiones entre las maquinarias de transcripción y replicación (Vilette *et al.*, 1992) que parecen generar cortes de doble cadena (Michel *et al.*, 1997). Por tanto, parece posible que se produzcan deleciones por defectos en la replicación. Una ADN polimerasa bloqueada podría "saltar" de una repetición a la otra para proseguir la replicación generando una deleción en la cadena sintetizada (Michel *et al.*, 1997).

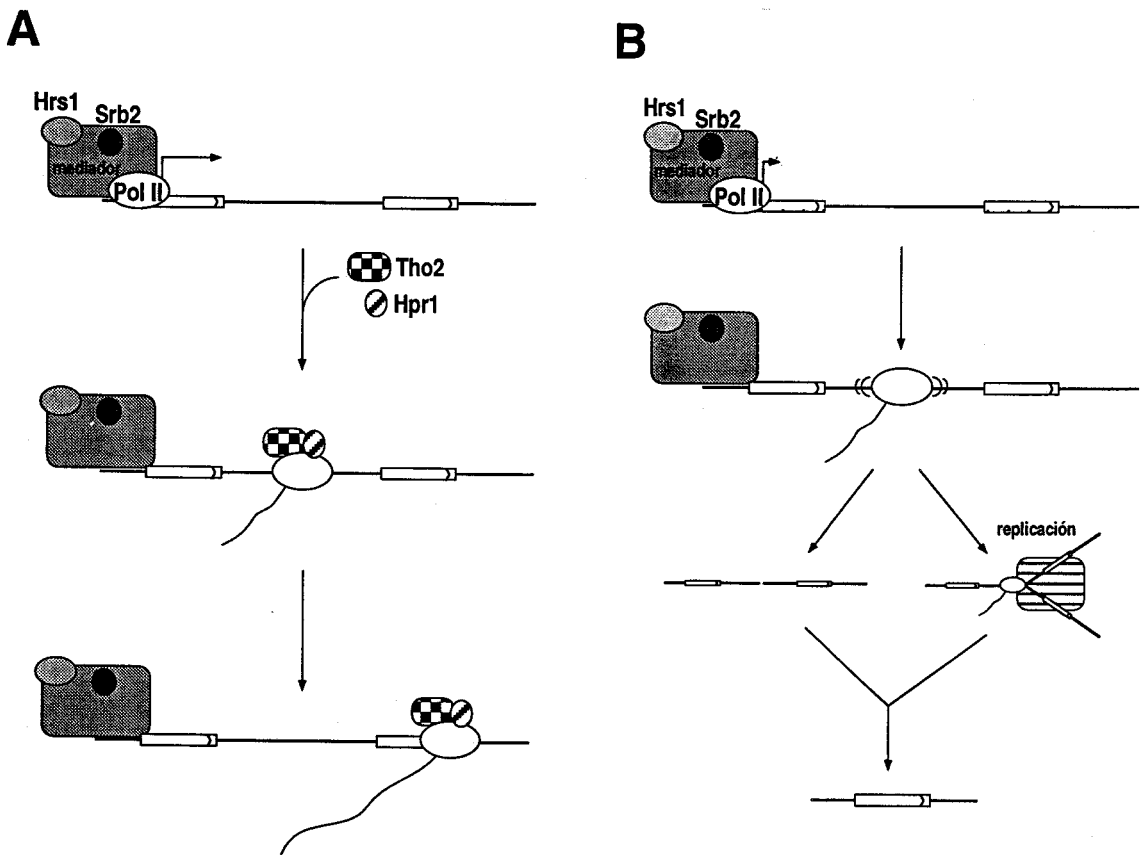


Figura 37. Recombinación inducida por defectos en elongación en mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ*. En este modelo las proteínas Tho2p y Hpr1p se asocian a un complejo elongante para atravesar regiones de pausa de la polimerasa (A). En ausencia de una o ambas proteínas la ARN polimerasa II (Pol II) es incapaz de atravesar dichas regiones y permanece bloqueada en el ADN (indicado como Pol II temblando) (B). Este bloqueo provoca el inicio de un suceso de recombinación, favoreciendo la formación de un corte en el ADN o por colisión con la maquinaria de replicación. Más detalles en el texto.

III.7. Supresión de la hiper-recombinación de *hpr1Δ* y *tho2Δ* por mutaciones en *Srb2p* y *Hrs1p*

La hiper-recombinación en células *tho2Δ*, como en *hpr1Δ*, es dependiente de las proteínas *Srb2p* y *Hrs1p* (Figura 36), dos componentes del complejo "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II. La caracterización de los mutantes *hrs* (*hyperrecombination suppressor*) aislados originalmente (Santos-Rosa y Aguilera, 1995) indicaba que las mutaciones *hrs1-1* y *hrs2-1(srb2-101)* suprimían completamente el fenotipo de hiper-recombinación de los mutantes *hpr1Δ*. Los trabajos posteriores han mostrado que los mutantes nulos *hrs1Δ* presentan niveles de recombinación entre repeticiones directas inferiores a los del silvestre (Santos-Rosa *et al.*, 1996; Tabla 4) lo que sugiere un posible papel de la proteína *Hrs1p* en recombinación espontánea (Santos-Rosa *et al.*, 1996). La proteína *Srb2p* también es necesaria para la formación de deleciones inducidas por *hpr1Δ*, pero no para las deleciones espontáneas. Los mutantes *hrs2-1(srb2-101)*, y *srb2Δ* presentan niveles silvestres de recombinación en el sistema *leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k*, tanto en fondo silvestre *HPR1* como *hpr1Δ* (Tabla 1).

La supresión de la hiper-recombinación de *tho2Δ* y *hpr1Δ* por *srb2Δ* y *hrs1Δ* podría deberse a que en estos mutantes se formara un tipo de holoenzima de la ARN polimerasa II insensible a los sitios de pausa o bloqueo descritos anteriormente. Puede ser que las proteínas *Srb2p* y *Hrs1p* pertenezcan a la forma elongante del complejo de transcripción o que desde el promotor determine una forma de ARN polimerasa II independiente de *Tho2p* y *Hpr1p*. Sin embargo, no creemos que esta variante de ARN polimerasa II elonga a través de las regiones de pausa o bloqueo, ya que la construcción *TEF2::lacZ* (ver *Resultados*, sección II.2.2) que no se expresa en el mutante *hpr1Δ* (Chávez y Aguilera, 1997), tampoco se expresa en el doble mutante *hrs1Δ hpr1Δ* (dato no mostrado). Sería más probable que se desensamblase el complejo ternario bloqueado sin provocar el suceso de recombinación.

Por último, no se puede descartar que las proteínas *Srb2p* y *Hrs1p* conecten físicamente las maquinarias de reparación por recombinación y de transcripción, de una forma análoga al acoplamiento de reparación por escisión a transcripción (Hoeijmakers *et al.*, 1996; Friedberg, 1996). En ausencia de estas proteínas no se daría recombinación acoplada a elongación de la transcripción.

III.8. Sumario y perspectivas

La identificación de un nuevo gen, *THO2*, cuya mutación confiere los mismos fenotipos que *hpr1Δ*, es una nueva evidencia de que la transcripción puede constituir una fuente de inestabilidad genómica. La existencia de factores generales de transcripción que influyen sobre los fenómenos de recombinación

asociados a *tho2Δ* y *hpr1Δ* confirma esta idea. Proponemos una explicación adicional a las sugeridas previamente para explicar la recombinación inducida por transcripción (ver *Introducción*, sección I.4.), según la cual los defectos en elongación de la transcripción causan hiper-recombinación entre secuencias repetidas.

En la célula, deben existir otros factores que funcionen durante la elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II y que eviten las paradas o bloqueos que conducen a una inestabilidad del genomio. Recientemente se ha descubierto que Spt4p, Spt5p y Spt6p, que forman un complejo protéico, están implicadas en elongación de la transcripción, tanto en levaduras (Hartzog *et al.*, 1998), como en células humanas (Wada *et al.*, 1998). En nuestro grupo hemos demostrado que mutaciones en *SPT4* y *SPT6* confieren fenotipo hiper-recombinante entre repeticiones (Malagón y Aguilera, 1996), lo que podría suponer otro ejemplo de recombinación inducida por defectos en elongación.

Mediante el estudio de mutantes en factores transcripcionales y la identificación de nuevos genes hemos establecido una relación entre la transcripción y la recombinación. Sin embargo, quedan aún muchas cuestiones por resolver. La implicación real de Srb2p en reparación de ADN, la naturaleza del suceso que inicia la recombinación en ausencia de Tho2p y Hpr1p, el mecanismo molecular de supresión de la hiper-recombinación de *hpr1Δ* y *tho2Δ* por *srb2Δ* y *hrs1Δ* y la función de *THO1* en la célula son algunas de ellas. Los genes y los sistemas de repeticiones utilizados en este trabajo constituyen una buena herramienta para entender la base molecular de la relación entre la transcripción y la estabilidad del genomio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

IV.1.1. Medios de cultivo para levaduras:

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

Medio rico YEPGal: Idéntico al medio YEPD pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono.

Medio mínimo SD: 0.17% de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 0.5% de sulfato amónico; 2% de glucosa.

Medio completo SC: Medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina y lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman *et al.* (1986). Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos se ha omitido del medio. Por ejemplo; SC-leu indica *medio completo sin leucina*.

Medio completo SGal: Idéntico al medio SC pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. La galactosa se filtró y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

Medio completo SG/L: Idéntico al medio SC pero con 3% de glicerol y 2% de lactato sódico en lugar de glucosa como fuente de carbono. El glicerol se filtró y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.

Medios sin fosfato (-Pi): Para eliminar el fosfato inorgánico de los medios anteriores se siguió el protocolo inicial de Rubin (1974) con las modificaciones descritas por Han *et al.* (1988). Al extracto de levadura y la peptona disueltos en 1/3 del volumen final del medio, en el caso de los medios ricos, o al YNB y el sulfato amónico en el caso de los medios mínimos, se les añadió 1/30 de volumen de MgSO₄ 1 M y de NH₄OH concentrado. Así se precipitó el fosfato inorgánico, que a continuación se eliminó por filtración. A la solución resultante, previamente diluida a su volumen final, se le ajustó el pH y se le añadieron el azúcar y los requerimientos.

Medios con metil-metanosulfonato (MMS): Medios SC o YEPD suplementados con 0.017% o 0.02% de metil-metano sulfonato (MMS) respectivamente. El MMS se añadió al medio una vez autoclavado y enfriado a 60°C.

Medio SC+Can: Medio SC suplementado con 60 mg/l de L-sulfato de canavanina (Can) añadida al medio una vez autoclavado.

Medio SC+FOA: Medio SC suplementado con 500 mg/l de ácido 5-fluoro-orótico

(FOA), con el uracilo a la mitad de la concentración habitual, es decir, a 10 mg/l, y 0.1% de L-prolina en lugar de sulfato amónico como fuente de nitrógeno

Medio de esporulación SPO: 1% de acetato potásico; 0.1% de extracto de levadura; 0.005% de glucosa. Se suplementó con los requerimientos descritos para el SC pero a la mitad de la concentración.

IV.1.2. Medios de cultivo para bacterias:

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

Medio LB+Amp: Consiste en el medio LB suplementado con 70 mg/l de ampicilina sódica (Amp).

Medio SOB: 0.5% de extracto de levadura; 2% de bacto-triptona; 0.005% de NaCl; KCl 2.5 mM; MgSO₄ 10 mM; MgCl₂ 10 mM. El MgSO₄ y el MgCl₂ se añadieron al medio justo antes de usarlo.

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

IV.1.3. Condiciones de crecimiento

Las estirpes de levadura se incubaron a una temperatura de 30°C, excepto en aquellos casos en los que se indique. Las estirpes de bacterias se incubaron a una temperatura de 37°C en todos los casos. En el caso de los cultivos líquidos estos se incubaron con agitación constante horizontal u orbital. Para hacer que las estirpes diploides de levadura esporularan, estas se incubaron a temperatura ambiente durante 3-4 días.

IV.2. ESTIRPES

Las estirpes de levadura utilizadas se muestran en la tabla 7. La única estirpe de bacteria utilizada fue DH5α de *Escherichia coli*.

TABLA 7. Estirpes de levadura

Estirpe	Genotipo	Fuente
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(1)
W303-1B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(1)
U768-4C	<i>MATa ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 hpr1Δ3::HIS3</i>	(1)

A3Y3A	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3 ::leu2-k</i>	(2)
AYW3-1B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 can1-100 leu2-k::ADE2-URA3::leu2</i>	(3)
AYW3-3D	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ3::HIS3</i>	(3)
SS713B-1A	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ3::HIS3 srb2-101</i>	(3)
SSAB-2C	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2</i>	(4)
SSAB-4A	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2</i>	(4)
SSAA-12B	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2</i>	(4)
SSAA-17B	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2</i>	(4)
SSYY4-5C	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2 hpr1Δ3::HIS3</i>	(4)
SSYY4-6D	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hrs1Δ::LEU2 hpr1Δ3::HIS3</i>	(4)
AF515-2B	<i>MATα ura3 his3 leu2 rad1-1</i>	(12)
X260-3A	<i>MATα ura3 rad52</i>	(5)
DY1702	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2 lys2 can1-100 sin4Δ::TRP1</i>	(6)
DY1717	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2 lys2 sin4Δ::TRP1</i>	(7)
F4	<i>MATα thr4</i>	(5)
FW486	<i>MATα his4-912Δ leu2-101 lys2-61 ade8 trp4</i>	(8)
RC634	<i>MATα ura1 ade2 his6 met1 leu2 can1 cyh2 rme1 sst1-3</i>	(9)
SLL10	<i>MATα ura3 his4-912Δ leu2 lys1 spt2Δ::URA3</i>	(10)
MC22D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 lys2-128Δ</i>	(11)
W19Y-1B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1</i>	(12)
SB71-5A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k srb2-101</i>	(12)
SB71-8A	<i>MATα ura3 ade2 his3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k srb2-101</i>	(12)
HDY3-7D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ4::TRP1 srb2Δ102::HIS3</i>	(12)
HDY3-7C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ4::TRP1</i>	(12)
HDY3-3D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 srb2Δ102::HIS3</i>	(12)
HDSB-2A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1 srb2-101</i>	(12)
HDSB-2B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1 srb2Δ102::HIS3</i>	(12)
HDSB-2C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1 srb2-101</i>	(12)
HDSB-2D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1 srb2Δ102::HIS3</i>	(12)
WS1971-3D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1 srb2-101</i>	(12)

Relación entre transcripción y recombinación

SAB98-3A	<i>MATα ura3 ade2 trp1 leu2 adh4-TEL::URA3</i>	(12)
SAB98-4B	<i>MATα ura3 ade2 trp1 leu2 adh4-TEL::URA3 hrs1Δ::LEU2</i>	(12)
SAB98-2A	<i>MATα ura3 ade2 ade1 trp1 leu2 adh4-TEL::URA3 hrs1Δ::LEU2</i>	(12)
SAB98-3B	<i>MATα ura3 ade2 ade1 leu2 hrs1Δ::LEU2</i>	(12)
YWY98-5C	<i>MATα ura3 trp1 leu2 adh4-TEL::URA3 sir4Δ::LEU2</i>	(12)
LSS59-9A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 can1-100 hmr::TRP1</i>	(12)
LSS59-1D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hmr::TRP1 hrs1Δ::LEU2</i>	(12)
LSS59-3B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 hmr::TRP1 hrs1Δ::LEU2</i>	(12)
LY598-1B	<i>MATα ura3 ade2 ade1 his3 trp1 leu2 can1-100 adh4-TEL::URA3 hmr::TRP1 sir4Δ::LEU2</i>	(12)
DAW-2A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(12)
DAW-1A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
DAW-2C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 sin4Δ::TRP1</i>	(12)
DAW-1D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 sin4Δ::TRP1</i>	(12)
DAW-7A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 sin4Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
DAW-4D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 sin4Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
HWY-7A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(12)
W19Y-7B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ4::TRP1</i>	(12)
HWY-3C	<i>MATα ura3 his3 his1 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k gal11Δ::LEU2</i>	(12)
HWY-1C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 gal11Δ::LEU2</i>	(12)
HWY-7C	<i>MATα ura3 ade1 his3 his1trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 gal11Δ::LEU2</i>	(12)
HWY-2C	<i>MATα ura3 ade1 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 gal11Δ::LEU2 hpr1Δ4::TRP1</i>	(12)
HWY-9D	<i>MATα ura3 ade2 ade1 his3 his1 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 gal11Δ::LEU2 hpr1Δ4::TRP1</i>	(12)
AWY-3A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100</i>	(12)
WR33-1A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100</i>	(12)
WR33-1B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100</i>	(12)
WR33-1C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho1Δ::TRP1</i>	(12)
WR33-1D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-1B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2</i>	(12)

AW33-1C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
AW33-2C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-9A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-8A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 tho1Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
AW33-14C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2 tho1Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
AW33-12A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	(12)
AW33-9D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
AW33-1D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-8C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-10B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho1Δ::TRP1</i>	(12)
AW33-1A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho1Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
AW33-2A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho1Δ::TRP1 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
WRA-7A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100</i>	(12)
WRA-24D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
WRA-4B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WRA-4D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WRA-5A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WRA-7B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WRA-8A	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
WRA-31B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
WR-3A	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(12)
WR-3B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(12)
WR-3C	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WR-3D	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WR-4A	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(12)
WR-4B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
UR-1A	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::LEU2 hpr1Δ3::HIS3</i>	(12)
WRK5-3C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100</i>	(12)
WRK5-1C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 tho2Δ::LEU2</i>	(12)
WRK5-7B	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k can1-100 hrs1Δ::KAN</i>	(12)
WRK5-2D	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho2Δ::LEU2 hrs1Δ::KAN</i>	(12)
WDY3-3C	<i>MATα ura3 ade2 his3 trp1 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k tho2Δ::LEU2 srb2Δ102::HIS3</i>	(12)

RK2-6A	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(12)
RK2-6B	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(12)
RK2-6C	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::KAN</i>	(12)
RK2-6D	<i>MATα ura3-1 ade2-1 his3-11,5 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 tho2Δ::KAN</i>	(12)

(1) R. Rothstein; (2) Aguilera y Klein, 1990; (3) Santos-Rosa y Aguilera, 1995; (4) Santos-Rosa; (5) G. Fink; (6) Jiang y Stillman; (7) Jiang *et al.*, 1995; (8) F. Winston; (9) J. Thorner; (10) Lefebvre y Smith, 1993; (11) Malagón y Aguilera, 1996; (12) Este estudio.

IV.3. PLASMIDOS

pLGSD5: Plásmido episómico basado en *URA3* que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor híbrido *CYC1-GAL1,10* de levadura (Guarente *et al.*, 1982).

pTZ18U: Vector derivado de pUC18 (Stratagene). 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).

YIp1: Plásmido integrativo basado en pBR322 que contiene el gen *HIS3* (Struhl y Davis, 1980).

YRp7: Plásmido replicativo basado en pBR322 que contiene el gen *TRP1* (Struhl *et al.*, 1979).

YEp351: Vector episómico basado en pUC18 que contiene el gen *LEU2* (Hill *et al.*, 1986).

pBS32: Vector centromérico que contiene el gen *LEU2* (F. Spencer y P. Hieter).

pRS306: Vector integrativo que contiene el gen *URA3* (Sikorski y Hieter, 1989).

pRS314, pRS315 y pRS316: Vectores centroméricos que contienen los genes *TRP1*, *LEU2* y *URA3* respectivamente (Sikorski y Hieter, 1989).

pRS416: Vector centromérico que contiene el gen *URA3* (Sikorski y Hieter, 1989).

pRS426: Vector episómico que contiene el gen *URA3* (Sikorski y Hieter, 1989).

YCpA13: Plásmido centromérico basado en *LEU2* que contiene el gen *HPR1* (Aguilera y Klein, 1990).

- YE_p4A-7:** Plásmido episómico basado en *LEU2* que contiene el gen *HPR1* (Aguilera y Klein, 1990).
- p414GAL1:** Vector centromérico basado en *TRP1* que contiene el promotor del gen *GAL1* (Mumberg *et al.*, 1994).
- p416GAL1lacZ:** pRS416 con el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *GAL1* (Mumberg *et al.*, 1994).
- p416ADH1lacZ:** pRS416 con el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *ADH1* (Mumberg *et al.*, 1995).
- p426TEF1lacZ:** pRS426 con el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *TEF2* (Mumberg *et al.*, 1995).
- pLGZ:** Plásmido episómico basado en *URA3* que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control de un promotor *CYC1* que carece de la región "UAS" (Wright *et al.*, 1990).
- pPZ:** Plásmido centromérico basado en *TRP1* que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *PHO5* (Straka y Hörz, 1991).
- pFR70:** Plásmido episómico basado en *URA3* que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *ENA1* (F. Estruch).
- 26-YEp:** Plásmido episómico basado en *URA3* que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *HSP26* (F. Estruch).
- pYA301:** Plásmido pBR322 con el gen *ACT1* (Galtwitz y Sures, 1980).
- pBKGAL1:** Plásmido pBluescriptII-SK(-) (Stratagene) que contiene el fragmento *EcoRI* de 2.023 Kb de la región 5' del gen *GAL1* (F. Prado).
- pJDB207-PHO5:** Plásmido pJDB207 basado en *LEU2*, con el fragmento *BamHI-HindIII* de 2.0 Kb que contiene el gen *PHO5* (Meyhack *et al.*, 1989).
- pVZ26:** Vector pVZ.1 con el fragmento *BamHI-PstI* que contiene el gen *HSP26* (S. Lindquist).
- p314LB:** Plásmido YCp basado en *TRP1*, que lleva dos repeticiones directas "en tandem" de 600 pb del gen *LEU2* (Prado y Aguilera, 1995).
- pFA6KANMX4:** Vector de *E. coli* que lleva el gen *KAN* de Tn903 fusionado traduccionalmente al gen *TEF* de *A. gossypii* (Wach *et al.*, 1994).

YEpM1: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 6.5 kb que contiene el gen *SRB2* insertado en la diana *Sall*.

YEpM4: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 8.9 kb que contiene el gen *SRB2* insertado en la diana *Sall*.

YCpH18: pBS32 con el fragmento genómico de 10.3 kb que contiene el gen *SRB2*.

pMPS41: YEp351 con el fragmento *SacI-PstI* de 3.86 kb del inserto de YEpM4 subclonado en *SacI-PstI*.

pMBH12: pRS315 con el fragmento *BamHI-HindIII* de 3.25 kb del inserto de YEpM1 subclonado en *BamHI-HindIII*.

pMBP13: Fragmento *PstI* de 8.25 kb de pMBH12 religado.

pHRS21: Idéntico a pMBH12 pero con el alelo *srb2-101* en lugar de *SRB2*. Se obtuvo mediante "rescate alélico" transformando una estirpe mutante *srb2-101* con el fragmento *NcoI* de 8.6 kb de pMBH12.

YEpHRS21: YEp351 con el fragmento *BamHI-HindIII* de 3.25 kb de pHRS21 subclonado en *BamHI-HindIII*.

pRS-03: pRS315 con el fragmento *SacII-PstI* de 0.31 kb del inserto de pHRS21 subclonado en *SacII-PstI*.

pRS-09: pRS315 con el fragmento *PstI* de 0.9 kb del inserto de pHRS21 subclonado en *PstI*.

pSRB5: pTZ18U con el fragmento *PstI* de 0.9 kb del inserto de pMBH12 subclonado en *PstI*.

pSRB35: pSRB5 con el fragmento *KpnI-SacII* de 0.63 kb del inserto de pMBH12 subclonado en *KpnI-SmaI*. Previamente se hizo romo el extremo *SacII* del fragmento mediante reacción de polimerización con la polimerasa Klenow.

pSRB35H: pSRB35 con el fragmento *BamHI-XhoI* de 2.84 kb de YIp1 que contiene el gen *HIS3*, subclonado en *BamHI-Sall*. Este plásmido es portador del alelo *srb2Δ102::HIS3*.

pSch135: pRS416 con el fragmento *BamHI-HindIII* de 3.97 kb de pPZ que contiene el promotor del gen *PHO5* fusionado al gen *lacZ* de *E. coli*.

p306PHO5lacZ: pRS306 con el fragmento *HindIII-KpnI* de 3,98 kb de pPZ que

contiene el promotor del gen *PHO5* fusionado al gen *lacZ* de *E. coli*.

pSUP4: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 7.5 kb que contiene el gen *THO1* insertado en la diana *SalI*.

pSUP6: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 7.4 kb que contiene el gen *THO1* insertado en la diana *SalI*.

pSUP24: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 6.3 kb que contiene el gen *THO1* insertado en la diana *SalI*.

pSUP38: YEp351 con el fragmento genómico *Sau3A* de 7.3 kb que contiene el gen *THO2* insertado en la diana *SalI*.

pSP401: YEp351 con el fragmento *PstI-XbaI* de 1.6 kb del inserto de pSUP4 subclonado en *PstI-XbaI*.

pSP402: YEp351 con el fragmento *PstI-XbaI* de 2.2 kb del inserto de pSUP4 subclonado en *PstI-XbaI*.

pSP381: YEp351 con el fragmento *XbaI* de 3.0 kb del inserto de pSUP38 subclonado en *XbaI*.

pSP383: YEp351 con el fragmento *XbaI-PstI* de 4.0 kb del inserto de pSUP38 subclonado en *XbaI-PstI*.

pSTH5: pRS316 con el fragmento *SpeI-SacII* de 0.75 kb de pSUP4 subclonado en *SpeI-SacII*.

pSTH35: pSTH5 con el fragmento *XhoI-DraI* de 0.45 kb de pSP402 que contiene la región 3' de *THO1*, subclonado en *XhoI-ClaI*. Previamente se hizo romo el extremo *ClaI* del vector mediante reacción de polimerización con la polimerasa Klenow.

pSTH35ΔT: pSTH35 con el fragmento *BglII-EcoRI* de 0.85 kb de YRp7 que contiene el gen *TRP1*, subclonado en *EcoRI-BamHI*. Este plásmido es portador del alelo *tho1Δ::TRP1*.

pSP38L: pSUP38 en el que el fragmento *BamHI-SalI* de 5.75 kb ha sido sustituido por un fragmento *BglII-SalI* de 2.68 Kb que contiene el gen *LEU2*.

pSP38ΔL: pSP38L con el fragmento *HindIII* de 1.9 kb de pSUP38, que contiene la región 5' de *THO2*, subclonado en *SmaI*. Previamente los extremos *HindIII* del inserto fueron romizados mediante reacción de polimerización con la polimerasa Klenow. Este plásmido es portador del alelo *tho2Δ::LEU2*.

pBSTHO2Δ: Plásmido pBluescriptII-SK(-) con el fragmento *SmaI-HindIII* de pSP38ΔL que contiene el alelo *tho2Δ::LEU2* subclonado en *SmaI-HindIII*.

pSCh202: p416GAL1lacZ con la región codificante del gen *PHO5* en lugar de *lacZ*, fusionada al promotor de *GAL1* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSCh204: pRS314 con la construcción *L-lacZ* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSCh206: pRS314 con la construcción *L-PHO5* (Chávez y Aguilera, 1997).

pSCh207: pRS314 con la construcción *L-PHO5r* (Chávez y Aguilera, 1997).

p414GLEUΔ: p414GAL1 con un fragmento *ClaI-SalI* de 1.41 kb que lleva la región 3' del gen *LEU2*, subclonado en *ClaI-XhoI*.

p414GLEU2: p414GLEUΔ con un fragmento *BamHI-ClaI* de 0.16 kb subclonado en *BamHI-ClaI*. Esta fragmento se obtuvo por digestión de otro sintetizado por PCR, el cual consiste en una región del gen *LEU2* que va desde 6 pb "corriente arriba" del primer nucleótido de la región codificante hasta 500 pb "corriente abajo" de dicho nucleótido. Al fragmento sintetizado se le incorpora una diana *BamHI* en el extremo 5' de *LEU2*. Los oligos utilizados fueron: CGCGGATCCATTCTAATGTCTGCCCCTAA y CTTCTGGAACGGTGTATTGT. La diana *BamHI* se muestra en negrita.

pSG206: pSCh206 en el que la región *SacI-ClaI* de 1.22 kb correspondiente al promotor y a la zona 5' del gen *LEU2* ha sido sustituida por el fragmento *SacI-ClaI* de p414GLEU2 que contiene el promotor del gen *GAL1* y la zona 5' del gen *LEU2*.

pSG207: Igual que pSG206 pero basado en pSCh207.

p314GLB: p314LB en el que la región *SacI-ClaI* de 1.22 kb correspondiente al promotor y a la zona 5' del gen *LEU2* ha sido sustituida por el fragmento *SacI-ClaI* de p414GLEU2 que contiene el promotor del gen *GAL1* y la zona 5' del gen *LEU2* (S. González-Barrera).

p314GLlacZ: p314GLB con el fragmento *BamHI* de 3.0 kb de pPZ que contiene el gen *lacZ* subclonado en *BglIII*, entre las repeticiones de *LEU2* (S. González-Barrera).

pSCh212: pSCh202 con el gen *lacZ* fusionado al gen *PHO5* (Chávez y Aguilera, 1997)

IV.4. ANALISIS GENETICO EN LEVADURA

Las estirpes parentales se cruzaron mezclando biomasa de ambas en YEPD sólido e incubando a 30°C. Los diploides se aislaron por micromanipulación, o por selección en el medio adecuado cuando esto fue posible, y se hicieron esporular en medio SPO. Las ascas se diseccionaron tras un tratamiento con zimoliasa 20-T a 2 mg/ml en agua durante 5 min. a temperatura ambiente. Las esporas se incubaron en YEPD a 30°C y su fenotipo se determinó mediante réplicas a los medios selectivos adecuados. El sexo se determinó analizando la capacidad de las esporas de formar diploides con otras estirpes de sexos α y α .

IV.5. DETERMINACION DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACION

Se determinaron a partir de 6 colonias independientes aisladas en YEPD o en los medios mínimos oportunos según las células portaran plásmidos o no (Aguilera y Klein, 1988). Se estimó la proporción de recombinantes sembrando las diluciones oportunas en los medios adecuados para seleccionar los recombinantes y para calcular el número de células viables totales. La frecuencia de recombinación se calculó como la mediana de las proporciones de recombinantes en la 6 colonias analizadas.

IV.6. DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE PLASMIDOS

Se aislaron 6 colonias independientes de cada transformante en YEPD o YEPGal suplementados con 20 mg/l de uracilo. Se determinó la proporción de células con y sin plásmido sembrando las diluciones oportunas en SC-ura para estimar el número de células portadoras de plásmido, y en SC para el de células totales. La estabilidad del plásmido se determinó como la mediana de los seis valores obtenidos en cada caso.

IV.7. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A RADIACION ULTRAVIOLETA

Se cultivaron las células hasta una D.O._{660nm}: 0.6. Se sembraron en YEPD sólido con las diluciones oportunas para obtener unas 100 o 200 colonias por placa. Las placas se irradiaron durante 0, 10, 20, 30 y 40 segundos con una lámpara de luz ultravioleta (UV) de 1.5 W/m² e inmediatamente se cubrieron con papel de aluminio para evitar la reparación por fotorreactivación. Tras 3 días de incubación a 30°C se contaron las colonias.

IV.8. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A MMS

IV.8.1 Exposiciones cortas a alta concentración de MMS

Se realizó según Prakash y Prakash (1997). Las células se cultivaron en YEPD líquido hasta una D.O._{660nm}: 0.65, tras lo cual se recogieron por

centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en un volumen igual de tampón fosfato 0.05 M pH 7.0. Tras incubar 5 minutos a 30°C, se añadió MMS a una concentración final de 0.5%. Se tomaron muestras a 0, 10, 20 y 30 minutos y se sembraron en YEPD sólido con las diluciones oportunas para obtener 100 o 200 colonias por caja.

IV.8.2. Exposiciones largas a baja concentración de MMS

Se cultivaron distintas diluciones de una suspensión de células en placas de YEPD+0.02% MMS en el caso de estirpes sin transformar, o SC+0.017% MMS en el de estirpes portadoras de plásmidos.

IV.9. ESTUDIO DE LA EXPRESION DIRIGIDA POR PROMOTORES

Para analizar la expresión dirigida por el promotor de *GAL1,10*, inducible por galactosa en el medio como fuente de carbono, se obtuvieron cultivos de células en fase exponencial en medio SC, se lavaron con H₂O y SG/L y se inocularon en SG/L a una concentración final de 1.5-2.0x10⁷ células/ml. Tras 16 h de incubación se añadió al medio 2% de glucosa (condiciones de represión) o 2% de galactosa (condiciones de activación). Después de 8 h a 30°C se recogieron las células para realizar ensayos enzimáticos o para el análisis del ARN.

Para analizar la expresión dirigida por el promotor de *PHO5*, inducible por falta de fósforo inorgánico en el medio, cultivos celulares en fase exponencial procedentes de medio SC se lavaron con H₂O y SC(-Pi) y se inocularon en SC(-Pi) a una concentración final de 1.5-2.0x10⁷ células/ml. Este cultivo se dividió en dos. A una de las mitades se le añadió 7.5 mM de Na₂PO₄ (condiciones de represión) mientras que a la otra no se le añadió nada (condiciones de activación) (Rudolph y Hinnen, 1987). Después de 6.5 h de incubación a 30°C se recogieron las células para realizar ensayos enzimáticos o para el análisis del ARN.

Para analizar la expresión dirigida por el promotor de *ENA1*, inducible por alta concentración salina, se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento en SC, el cual se dividió en dos. A una mitad se añadió NaCl a una concentración final de 0.8 M (condiciones de inducción), a la otra mitad no se le añadió nada (condiciones de represión). Se incubaron los cultivos durante 90 min. a 30°C, tras lo cual se recogieron las células para realizar el ensayo enzimático (Márquez y Serrano, 1996).

Para analizar la expresión dirigida por el promotor de *HSP26*, inducible por altas temperaturas, la mitad de un cultivo en fase exponencial de crecimiento procedente de medio SC se pasó a otro tubo precalentado a 42°C y se incubó durante 30 minutos a 39°C (condiciones de inducción) (Susek y Lindquist, 1989). La otra mitad del cultivo se mantuvo a 30°C (condiciones de represión). Trás esto,

se recogieron las células para realizar ensayos enzimáticos o para el análisis del ARN.

La expresión dirigida por los promotores de *TEF2*, *ADH1* y *CYC1* se analizó en células de cultivos en SC en fase exponencial de crecimiento.

IV.10. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

IV.10.1. Ensayo de actividad β -galactosidasa

Se realizó siguiendo el protocolo para células permeabilizadas descrito por Guarente (1983). Las células, una vez cultivadas en las condiciones oportunas, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 1 ml de **Tampón Z** (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM) obteniéndose una suspensión con una D.O.₆₀₀: **D**. El ensayo se realizó añadiendo un volumen *v* (ml) de la suspensión celular a un volumen final de 1 ml de tampón Z. Las células se permeabilizaron con 25 μ l de SDS 0.1% y 50 μ l de cloroformo y posterior agitación fuerte en un agitador excéntrico durante 10-15 segundos. Tras una incubación de 5 min. a 30°C, se añadieron 0.2 ml de una solución de 4 mg/ml de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en tampón Z. Después de un tiempo *t* (minutos), determinado por el momento en que la solución adquirió un color amarillo, a 30°C, la reacción se paró añadiendo 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la D.O._{420nm} del sobrenadante. Las unidades (U) de actividad β -galactosidasa se definen según la fórmula: $U = D.O._{420nm} \times 1000 / D \times v \times t$.

IV.10.2. Ensayo de actividad fosfatasa ácida

Se realizó siguiendo el método descrito por Haguenaer-Tsapis y Hinnen (1984). Las células, una vez cultivadas en las condiciones oportunas y recogidas, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 1 ml de tampón acetato 50 mM pH4, obteniéndose una suspensión con una D.O.₆₀₀: **D**. El ensayo se realizó añadiendo un volumen *v* (ml) de la suspensión celular a un volumen final de 0.45 ml de tampón acetato. Seguidamente se añadieron 50 μ l de una solución de 5 mg/ml de p-nitrofenilfosfato a en tampón acetato. Después de 10 minutos a 37°C se paró la reacción añadiendo 0.12 ml de ácido tricloroacético al 25% y 0.6 ml de Na₂CO₃ en saturación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la D.O._{405nm} del sobrenadante. Las unidades (U) de actividad fosfatasa ácida se definieron según la fórmula: $U = \mu\text{moles de p-nitrofenol} / 10 \times D \times v$. (el p-nitrofenol es uno de los productos de la reacción y su coeficiente de extinción molar a 405 nm es 18300).

IV.11. TRANSFORMACIONES

IV.11.1. Transformación de bacterias

Se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue *et al.* (1990). Las células competentes se obtuvieron a partir de un cultivo de *E. coli* incubado a 22°C en medio SOB hasta una D.O._{600nm}: 0.5. Para transformar se mezclaron 100 µl de células competentes con 50-100 ng de ADN y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 35 segundos, tras lo cual se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 45 min. a 37°C antes de sembrarlas en LB+Amp.

IV.11.2. Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método descrito por Ito *et al.* (1983) y modificado por Schiestl y Gietz (1989). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en YEPD hasta una densidad D.O._{660 nm}: 0.4-0.6. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H₂O y con 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 1 M pH7.5). Finalmente se resuspendieron en un volumen de LiAc-TE 1X hasta una concentración final de 2x10⁹ células/ml. Para transformar se mezclaron 50 µl de células, 50-1000 ng de ADN transformante, 5 µl de ADN de esperma de salmón a 10 mg/ml y 300 µl de PEG 40% (preparado en el momento a partir de PEG-4000 50%, TE 10X y LiAc 10X). Tras incubación durante 30 min. a 30°C con agitación, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 20 minutos, tras lo cual se sembraron en el medio oportuno.

IV.12. EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS

IV.12.1. Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*

IV.12.1.1. Preparación a pequeña escala (minipreps)

Se realizó siguiendo en el método descrito por Bolivar y Backman (1979). De 1.5 ml de cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de **Solución I** (Glucosa 50 mM; Tris-Cl 25 mM pH8.0; EDTA 10 mM pH8.0). Tras 5 min. a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de **Solución II** (NaOH 0.2 M; SDS 1%), se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó durante 5 min. en hielo. Seguidamente se añadieron 150 µl de **Solución III** (KAc 3 M; ácido acético glacial 11.5%). De nuevo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min.. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se fenolizó con 50 µl de fenol y 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ADN presente en la fase acuosa se precipitó con NaCl 0.3 M y 0.9 ml de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 ml de TE 1X.

IV.12.1.2. Preparación a gran escala

Se preparó ADN a gran escala por centrifugación del ADN en gradiente de CsCl siguiendo el protocolo descrito por Clewell y Helinski (1970). Se partió de un cultivo de 400 ml, del cual se recogieron las células por centrifugación. Las células se lavaron con 20 ml de Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH7.4 y se resuspendieron en 2 ml de **Solución A** (sacarosa 25%; EDTA 50 mM pH8.0; Tris-HCl 50 mM pH8.0). Seguidamente, se añadieron 0.2 ml de lisozima 10 mg/ml y 0.2 ml de ribonucleasa 1 mg/ml, y se incubaron 5 min. en hielo, tras los cuales se añadieron 0.4 ml de EDTA 0.5 M pH8.0 y se incubaron de nuevo en hielo durante 10 minutos. Pasado este periodo se añadieron 4 ml de **Solución de rotura** (TritónX-100 0.3%; Tris-HCl 50 mM pH7.4; EDTA 50 mM pH8.0) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el ADN plasmídico se purificó del sobrenadante por centrifugación en gradiente de CsCl. Para obtener el gradiente de CsCl se disolvieron en 4.1 ml del sobrenadante, 4 g de CsCl, 0.2 ml de EDTA 50 mM pH8.0 y 0.2 ml de bromuro de etidio (EtBr) 10 mg/ml. Esta solución se centrifugó para eliminar posibles restos celulares y se pasó a tubos **Quick-Seal** de 5.1 ml (BECKMAN) para rotor **VTi65** (BECKMAN) y se centrifugaron a 50000 r.p.m. durante 12-16 h a 20°C en una ultracentrífuga BECKMAN modelo **Optima L-70**. La banda correspondiente en el gradiente al ADN plasmídico se recuperó con una jeringa. El EtBr se extrajo de la solución varias veces mezclándola con un volumen de alcohol isoamílico. El ADN se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en TE.

IV.12.2. Preparación de ADN de levaduras

Se siguió el protocolo descrito por Sherman *et al.* (1986). Se partió de 5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.32 ml de **Solución de Sorbitol** (sorbitol 0.9 M; EDTA 0.1 M pH8.0). Después se añadieron 3.2 µl de β-mercaptoetanol (dilución 1/10) y 10 µl de zimoliasa 20-T 15 mg/ml. Tras incubación 60 min. a 37°C, la mezcla se centrifugó 20 segundos y el precipitado se resuspendió en 0.37 ml de **Solución Cocktail** (EDTA 20 mM pH8.0; Tris-HCl 50 mM pH8.0) a la cual se añadieron 16 µl de SDS 10% y 1 µl de dietil-pirocarbonato (DEPC). Tras incubación 30 min. a 65°C los restos de membranas celulares se precipitaron añadiendo 85 µl de solución III de *miniprep* (ver arriba) e incubando durante al menos 1 hora en hielo. El ADN se trató con ribonucleasa y, tras fenolización, se precipitó con NaCl 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de TE.

IV.12.3. Preparación de ARN de levaduras

Se siguió el método de extracción con fenol ácido descrito por Köhrer y Dombey (1991). A partir de 10 ml de cultivo en fase exponencial (D.O.: 0.5-0.7) se

recogieron las células por centrifugación y se lavaron con H₂O. Posteriormente se resuspendieron en 0.4 ml de **Tampón TES** (Tris-HCl 10 mM pH7.5; EDTA 10 mM pH8.0; SDS 0.5%) y 0.4 ml de fenol ácido (saturado con H₂O), tras lo cual se agitaron fuertemente en agitador excéntrico durante al menos 10 segundos. La mezcla se incubó durante 45 min. a 65°C con agitación ocasional. Trás la incubación, se dejó 5 min. en hielo, se centrifugó y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. Después se realizaron una nueva extracción con fenol ácido y otra con cloroformo. El ARN se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M pH5.3 y 2 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de H₂O. La concentración del ARN se determinó mediante espectrofotometría, o por tinción con EtBr en geles de agarosa. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo o a bajas temperaturas y el material plástico utilizado se manipuló siempre con guantes. El H₂O y las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con DEPC al 0.1% y autoclavadas.

IV.13. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

IV.13.1. Geles de agarosa

IV.13.1.1. geles de ADN

Los fragmentos de ADN se separaron según su tamaño por electroforesis en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.6% y 1.5% en función del tamaño de los fragmentos a analizar, con **Tampón TAE 1X** (preparado a partir de TAE 50X: Tris-acetato 2 M; EDTA 0.05 M pH8.0) y EtBr 5 µg/ml. El ADN se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de longitud del gel. Previamente, a las muestras de ADN se les añadió **Tampón de carga 1X** (tampón de carga 5X: 0.25% azul de bromofenol; 30% glicerol).

IV.13.1.2. geles de ARN

El ARN preparado de levaduras se separó en geles de agarosa al 1% en **Tampón MOPS 1X** (tampón MOPS 10X: MOPS 0.4 M pH7.0; NaAc 0.1 M; EDTA 0.1M) y formaldehido 0.664 M. El ARN se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de gel, con recircularización constante del tampón. Previamente, las muestras de ARN se prepararon mezclando : 3 µl de ARN (unos 10 µg), 1.25 µl de tampón MOPS 10X, 2.25 µl formaldehido 12.3 M y 6.25 µl de formamida. Después se calentaron 15 min. a 65°C y se les añadieron 2 µl de **Tampón de carga-formaldehido 10X** (EDTA 1 mM pH8.0; 0.25% azul de bromofenol; 50% glicerol).

IV.13.2. Geles de acrilamida

El ADN procedente de las reacciones de secuenciación se sometió a electroforesis en geles homogéneos de acrilamida al 6% preparados en **Tampón**

TBE 1X (a partir de tampón TBE 5X: Acido Bórico 45 mM; Tris-HCl 45 mM; EDTA 1 mM) a partir de una solución de 38% de acrilamida y 2% de bis-acrilanida. El ADN se sometió a un campo eléctrico con una potencia constante de 90 W. Previamente las muestras se calentaron 2 min. a 75-80°C.

IV.14. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS

IV.14.1. *Transferencia de ADN*

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en una solución de HCl 0.25 M durante 10-15 minutos. Después se lavó con H₂O y se le sometió a un tratamiento de acuerdo al tipo de membranas a las que se fuera a transferir el ADN.

Membranas neutras. El gel se incubó en **Solución de desnaturalización** (NaCl 1.5 M; NaOH 0.5 M) durante 30 min, se lavó con H₂O y se incubó durante dos periodos de 15 min. en **Solución de neutralización** (NaCl 1.5 M; Tris-HCl 0.5 M pH7.2; EDTA 1 mM). La transferencia del ADN se efectuó por capilaridad en tampón **SSC 20X** (NaCl 3 M; Na-citrato 0.4 M; ajustado a pH7.0 con NaOH) durante 12-16 h (Southern, 1975) a una membrana de nailon **HybondTM-N** (Amersham International). Una vez transferido, se lavó la membrana con SSC 2X. El ADN se fijó covalentemente irradiando con luz ultravioleta (70000 µJ/cm²) por ambas caras.

Membranas cargadas positivamente. El gel se incubó en NaOH 0.4 M durante 30 minutos. La transferencia y fijación del ADN se efectuó por capilaridad en solución de NaOH 0.4 M, durante 12-16 h a una membrana de náilon cargada positivamente **HybondTM-N+** (Amersham International). Una vez transferido el ADN, se lavó la membrana con SSC 2X.

IV.14.2. *Transferencia de ARN*

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en H₂O a 65°C durante 2 intervalos de 5 min. para eliminar el formaldehído. A continuación se incubó en una solución NaOH 50mM-NaCl 10 mM durante 20 min. y en otra solución Tris-HCl 10 mM pH7.5 durante otros 20 minutos. Finalmente se incubó en SSC 20X durante 30 minutos. Este tratamiento se realizó a temperatura ambiente y con agitación. La transferencia del ARN se efectuó por capilaridad en tampón SSC 20X durante 12-16 h. Una vez transferido, se lavó la membrana con SSC 2X. El ARN se fijó covalentemente irradiando con luz ultravioleta (70000 µJ/cm²) sobre ambas caras. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con **Solución de Azul de metileno** (NaOAc 0.3 M pH5.5; 0.02% azul de metileno) durante 2-3 min. a temperatura ambiente. Para desteñir la membrana se trató con SSPE 0.2X (SSPE 20X: NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0.2 M; EDTA 20 mM)-SDS 1%.

IV.15. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

IV.15.1. Hibridación de ADN (Southern)

IV.15.1.1. Hibridación con sonda no radiactiva

Las membranas se pre-hibridaron durante 2-6h a 42°C con agitación constante en **Solución de hibridación** (formamida desionizada 50%; SSC 5X; reactivo de bloqueo (Boeringer Mannheim) 2%; N-lauroylsarcosina 0.1%; SDS 0.02%; ADN de esperma de salmón 25 µg/ml previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 12-16h. a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro dos veces durante 5 min. con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente y dos veces durante 15 min. con SSC 0.1X-SDS 0.1% a 65°C.

La detección de la señal se llevó a cabo según el método de quimioluminescencia para sondas marcadas con digoxigenina (Boeringer Mannheim). Las membranas se lavaron con **Solución de lavado** (Tween20 0.3% en **Tampón 1 de hibridación**: Acido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH7.5) durante 5 minutos. Seguidamente se incubaron durante 30 min. en **Tampón 2 de hibridación** (reactivo de bloqueo 1% en tampón 1) y otros 30 min. con el anticuerpo *anti-digoxigenina AP-FAB* (anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina) diluido 1:500 veces en tampón 2. El conjugado no ligado se eliminó lavando 3 veces durante 15 min. con solución de lavado. Tras equilibrar las membranas durante 5 min. con **Tampón 3 de hibridación** (NaCl 2.5 M; MgCl₂ 1 M; Tris-HCl 1 M pH9.5) se incubaron 5 min. con CSPD 0.1 mg/ml en tampón 3. Estas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante. Después se envolvieron los filtros en papel celofán para evitar que se secaran y se dejaron 15 min. a 37°C. Finalmente se expusieron a películas de autorradiografía *Kodak X-OMAT K100*.

IV.15.1.2. Hibridación con sonda radiactiva

Las membranas se pre-hibridaron durante 1-4h a 42°C con agitación constante en **Solución de hibridación de ADN** (NaPO₄ pH6.5 25 mM; formamida desionizada 50%; SSC 6X; reactivo Denhardt's 5X; SDS 0.5%; ADN de esperma de salmón 100µg/ml previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con ALPHA³²P-dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro dos veces durante 5 min. con SSC 2X-SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos veces durante 5 min. con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente, una vez durante 30 min. con SSC 2X-SDS 0.1% a 50°C y una última vez durante 30 min. con SSC 0.2X-SDS 0.1% a 65 °C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

IV.15.2. Hibridación de ARN (Northern)

IV.15.2.1. Hibridación con sonda radiactiva

Las membranas se pre-hibridaron durante 1-4h. a 42°C en agitación constante en **Solución de hibridación de ARN** (formamida desionizada 50%; SSPE 5X; reactivo Denhardt's 1X; SDS 0.1%; ADN de esperma de salmón 100µg/ml previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor. Tras la hibridación se lavó el filtro con SSPE 2X-SDS 1% una vez durante 5 min. a temperatura ambiente, otra durante 20 min. a 65°C con la misma solución y una última vez durante 20 min. con SSPE 0.2X-SDS 0.1% a 65°C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía. La cantidad de sonda marcada unida al ARN fue cuantificada en un *analizador de radiación β FUJIX*.

La rehibridación de membranas con nuevas sondas se llevó a cabo tras eliminar la sonda previamente hibridada mediante dos tratamientos sucesivos con SSPE 0.1X-SDS 0.1% hirviendo.

IV.16. MARCAJE DE SONDAS

IV.16.1. Marcaje de sondas no radiactivas

Las sondas de ADN se marcaron con **Digoxigenina** (nucleósido DIG-11dUTP) (Boeringer Mannheim), según el método descrito por Feimberg y Vogelstein (1984). La reacción de marcaje se realizó con 0.2-2 µg del fragmento de ADN previamente desnaturalizado al cual se le añadió 1 mM de hexanucleótidos no marcados, una mezcla de dATP 1 mM, dGTP 1 mM, dCTP 1 mM, dTTP 0.65 mM, y DIG-dUTP 0.35 mM y 2 unidades de ADN polimerasa Klenow. La reacción se incubó a 37°C durante 12-16 h tras lo cual se paró con EDTA 0.02 M pH8.0. Finalmente, el ADN se precipitó con LiAc 0.4 M y 3 volúmenes de etanol 96%.

IV.16.2. Marcaje de sondas radiactivas

Las sondas de ADN se marcaron con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP según el protocolo básico para sondas no radiactivas. En este caso, a la misma cantidad de ADN se le añadió 1 mM de hexanucleótidos no marcados, una mezcla de dATP 25 µM, dGTP 25 µM, dTTP 25 µM y 25 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y 2 unidades de ADN polimerasa Klenow. La reacción se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del volumen a través de una columna de **Sephadex G50-TE** (5 g de Sephadex G50 en 75 ml de TE).

IV.17. SECUENCIACION DE ADN

La secuenciación del ADN se realizó a partir de plásmidos de doble cadena según el método descrito por Sanger *et al.* (1977). El ADN se purificó previamente mediante columnas de Sephadex G50 (ver *marcaje de sondas radiactivas*) o mediante precipitación con PEG. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el "kit" comercializado por USB (Ohio, EEUU) el cual utiliza la ADN polimerasa del fago T7 comercializada como **Sequenase™2.0** y $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP.

Los cebadores utilizados fueron: "-40 del promotor de M13" para los plásmidos pMPS41, pRS-0.3, pRS-0.9 y pSP381; "-20 del promotor de T7" para pRS-0.3 y "reverso de M13" para pSP402.

IV.18. ANALISIS "RUN-ON" DE LOS TRANSCRITOS DE UN GEN

Se siguieron los protocolos descritos por Elion y Warner (1986) y Osborne y Guarente (1989) con las modificaciones descritas por Chávez y Aguilera (1997). A cultivos de levadura en SG/L-ura con una D.O.₆₀₀ de 0.1 se les añadió 2% de galactosa. Tras 1h a 30°C se lavaron las células con **Tampón TMN** (Tris-HCl 10 mM pH7.4; MgCl₂ 5 mM; NaCl 10 mM) frío, se resuspendieron en 0.9 ml de H₂O y se incubaron con 0.5% de *N*-lauril-sarcosina durante 20 min. en hielo con objeto de permeabilizarlas. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente por centrifugación y las células se resuspendieron en 60 μl de **Tampón de transcripción 2.5X** (Tris-HCl 50 mM pH7.7; KCl 0.5 M; MgCl₂ 80 mM). La reacción de *run-on* se llevó a cabo añadiendo 2 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP y 120 μCi de (³²P)-UTP. La mezcla se llevó a un volumen final de 150 μl y se incubó durante 3 minutos a 30°C. La reacción se paró añadiendo 1 ml de tampón TMN con UTP sin marcar. Trás lavar dos veces con H₂O se preparó el ARN siguiendo el protocolo anteriormente descrito (ver sección IV.12.3.). Antes de la hibridación se trataron las muestras de ARN con NaOH 0.4 M durante 5 min. en hielo se neutralizaron con HCl 0.4 M y Tris-HCl 100 mM pH7.5. Las hibridaciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito (ver sección IV.15.2.) utilizando 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARNt de *E. coli*. Para preparar la membrana se inmovilizaron 100 μg de cada sonda de ADN en una membrana **Hybond™-N+** (Amersham International) utilizando un aparato *Slot Blot pR600* (Hoefer, USA). Previamente, cada sonda se había desnaturalizado con NaOH 0.4 M-EDTA 10 mM durante 10 min. a 100°C. El ARN marcado unido a cada fragmento de ADN se cuantificó en un *analizador FUJIX de radiación β* .

IV.19. AMPLIFICACIÓN DEL GEN KAN1 POR PCR

Para obtener un fragmento con el gen *KAN1* flanqueado por secuencias del gen *THO2* se amplificó la región del plásmido pFA6KANMX4 que contiene la secuencia de *KAN1* con los oligonucleótidos

ATGGCAGAACAGACGCTACTTTCCAAATGAAACGCTCTTTCTAGTGGATCT
GATATCATC y
AATTACCTCTGGTACCTACTGACGTAATCCCACCCTTGGCAGCTGAAGCTT
CGTACGCT, que corresponden a 20 pb de las secuencias flanqueantes del gen *KAN* (indicadas sin subrayar) más las secuencias que van desde las posiciones +1 a +40 y +4756 a +4796 del gen *THO2* (indicadas como texto subrayado. Los codones de inicio y parada se indican en negrita).

V. CONCLUSIONES

1. La mutación *hrs2-1* de *Saccharomyces cerevisiae*, aislada como supresora del fenotipo de hiper-recombinación de la mutación *hpr1Δ*, está en el gen *SRB2*, que codifica un componente de la holoenzima de la ARN polimerasa II. La delección de este gen también suprime el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* pero no el de transcripción.
2. La sensibilidad de los mutantes *srb2* al agente alquilante metil-metano sulfonato sugiere que el factor *Srb2* está implicado en reparación de ADN.
3. El gen *HRS1*, otro supresor de la hiper-recombinación de *hpr1Δ*, funciona como un regulador general de la transcripción con efectos tanto positivos como negativos. Los mutantes *hrs1Δ* presentan fenotipos similares a los de los mutantes en los componentes del "mediador" de la holoenzima de la ARN polimerasa II, *Gal11p* y *Sin4p*. Esto sugiere que *Hrs1p* es un componente del "mediador".
4. La capacidad de suprimir la recombinación inducida por *hpr1Δ* no es general para todos los mutantes de la holoenzima de la ARN polimerasa II.
5. La sobreexpresión de los genes *THO1* y *THO2* suprime parcialmente los fenotipos de termosensibilidad y transcripción de *hpr1Δ*.
6. El gen *THO2* es funcionalmente análogo a *HPR1*. Los mutantes nulos *tho2Δ* presentan los mismos fenotipos de crecimiento, termosensibilidad, inestabilidad genética y transcripción que los mutantes *hpr1Δ*.
7. El hecho de que el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ* y *tho2Δ* se suprima por mutaciones en los componentes de la holoenzima de la ARN polimerasa II, *Srb2p* y *Hrs1p*, es consistente con una función de *Hpr1p* y *Tho2p* en transcripción y apoya la idea de que la recombinación en mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* depende de transcripción.
8. Proponemos un modelo en el que la ausencia de la proteína *Tho2p*, al igual que la de *Hpr1p*, provoca defectos en la elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II que pueden generar daños en el ADN o impedir el avance de la horquilla de replicación, causando el fenotipo de hiper-recombinación observado.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aboussekhra, A., y R. D. Wood. 1994. Repair of UV-damaged DNA by mammalian cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Op. Genet. Develop.* 4: 212-220.
- Aguilera, A., y 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., y H. L. Klein. 1989a. Genetic and molecular analysis of recombination events in *Saccharomyces cerevisiae* occurring in the presence of the hyper-recombination mutation *hpr1*. *Genetics* 112: 503-517.
- Aguilera, A., y H. L. Klein. 1989b. 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., y 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., y H. L. Klein. 1994. Hyper-recombination mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Genetics* 3: 107-130.
- Aguilera, A. 1995. Genetic evidence for different *RAD52*-dependent intrachromosomal recombination pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 25: 298-305.
- Akhtar, A., G. Faye, y D. L. Bentley. 1996. Distinct activated and non-activated RNA polymerase II complexes in yeast. *The EMBO Journal* 15: 4654-4664.
- Allison, L. A., y C. J. Ingles. 1989. Mutations in RNA polimerase II enhance or suppress mutations in *GAL4*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2794-2798.
- Archambault, J., F. Lacroute, A. Rue, y J. D. Friesen. 1992. Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4142-4152.
- Arthur, H. M. y R. G. Lloyd. 1980. Hyper-recombination in *uvrD* mutants of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 180: 185-191.
- Aso, T., W. S. Lane, J. W. Conaway, y R. C. Conaway. 1995. Elongin (SIII): A multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 269: 1439-1443.
- Balajee, A. S., A. May, G. L. Dianov, E. C. Friedberg, y V. A. Bohr. 1997. Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4306-4311.
- Basthia, P. K., Z. Wang, y E. C. Friedberg. 1996. DNA repair and transcription. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 6: 146-150.
- Baudat, F., y A. Nicolas. 1997. Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5213-5218.
- Bentley, D. L. 1995. Regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 5: 210-216.
- Bernardi, F., y A. Bernardi. 1988. Transcription of the target is required for *IS102* mediated deletions. *Mol. Gen. Genet.* 212: 265-270.

- Biggin, M. D., J. Gibson, y G. F. Hong. 1980. Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3963-3965.
- Björklund, S., y Y. -J. Kim. 1996. Mediator of transcriptional regulation. *Trends in Biochem. Sci.* 21: 335-337.
- Blackwell, T. K., M. W. Moore, G. D. Yancopoulos, H. Suh, S. Lutzker, E. Selsing, y F. W. Alt. 1986. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* 324: 585-589.
- Bolivar, F., y K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68: 245-267.
- Bootsma, D., y J. H. J. Hoeijmakers. 1993. Engagement with transcription. *Nature* 363: 114-115.
- Bourgau-Ramoisy, D., D. Gendron, y P. Bourgau. 1995. A hotspot for promoter-dependent recombination in polyomavirus DNA. *J. Mol. Biol.* 248: 220-224.
- Bratty, J., G. Ferbeyre, C. Molinaro, y R. Cedergren. 1996. Stimulation of mitotic recombination upon transcription from the yeast *GAL1* promoter but not from other RNA polymerase I, II and III promoters. *Curr. Genet.* 30: 381-388.
- Bröhl, S., T. Lisowsky, G. Riemen, y G. Michaelis. 1994. A new nuclear suppressor system for a mitochondrial RNA polymerase mutant identifies an unusual zinc-finger protein and a polyglutamine domain protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 719-731.
- Brown, S. A., A. N. Imbalzano, y R. E. Kingston. 1996. Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Develop.* 10: 1479-1490.
- Brown, S. A., y R. E. Kingston. 1997. Disruption of downstream chromatin directed by a transcriptional activator. *Genes Develop.* 11: 3116-3121.
- Buratowsky, S. 1994. The basis of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1-3.
- Cairns, B. R., Y. -J. Kim, M. H. Sayes, B. C. Laurent, y R. D. Kornberg. 1994. A multi-subunit complex containing the SW1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1950-1954.
- Chávez, S., y A. Aguilera. 1997. The yeast *HPR1* gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Develop.* 11: 3459-3470.
- Chen, J., y D. S. Peterson. 1993. A distal heat shock element promotes the rapid response to heat shock of the HSP26 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 10: 7442-7448.
- Chen, S., R. W. West, Jr, S. L. Johnson, H. Gans, y B. Kruger. 1993. TSF3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast *GAL* genes, also mediates repression by $\alpha 2$ repressor and is identical to SIN4. *Mol. Cell. Biol.* 13: 831-840.
- Christman, M. F., F. S. Dietrich, y 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.
- Clark, A. J., y K. B. Low. 1988. Pathways and systems of general recombination in *Escherichia coli*. En *The Recombination of the Genetic Material*. pp. 155-215. (ed. K. B. Low). Academic Press, New York.
- Cleaver, J. E. 1994. It was a very good year for DNA repair. *Cell* 76: 1-4.

- Clewell, D., y D. Helinski. 1970. Properties of a supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. *Biochemistry* 9: 4428-4440.
- Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman, y C. L. Peterson. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265: 53-60.
- Covitz, P. A., W. Song, y A. P. Mitchell. 1994. Requirement for *RGR1* and *SIN4* in *RME1*-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 138: 577-586.
- Datta, A., y S. Jinks-Robertson. 1995. Association of increased spontaneous mutation rates with high levels of transcription in yeast. *Science* 268: 1616-1618.
- Deshpande, A.M., y C.S. Newlon. 1996. DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* 272: 1030-1033.
- Dou, S., X. Zeng, P. Cortes, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, T. Honjo, y L. D. Vales. 1994. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* 14: 3310-3319.
- Drapkin, R., A. Sancar, y D. Reinberg. 1994. Where transcription meets repair. *Cell* 77: 9-12.
- Dröge, P. 1993. Transcription-driven site-specific DNA recombination *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2759-2763.
- Dul, J. L., y H. Drexler. 1988a. Transcription stimulates recombination. I. Specialized transduction of *Escherichia coli* λ trp phages. *Virology* 162: 466-470.
- Dul J. L., y H. Drexler. 1988b. Transcription stimulates recombination. II. Generalized transduction of *Escherichia coli* by phages T1 and T4. *Virology* 162: 471-477.
- Eick, D., A. Wedel, y H. Heumann. 1994. From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet.* 10: 292-296.
- Elion, E. A., y J. R. Warner. 1986. An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2089-2097.
- Exinger, F., y F. Lacroute. 1992. 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22: 9-11.
- Fan, H. -Y., y H. L. Klein. 1994. Characterization of mutations that suppress the temperature-sensitive growth of the *hpr1 Δ mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 1-12.*
- Fan, H. -Y., K. K. Cheng, y H. L. Klein. 1996. Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1 Δ of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142: 749-759.*
- Fassler, J. S., y F. Winston. 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* *SPT13/GAL11* gene has both positive and negative regulatory roles in transcription. *Mol. Cell Biol.* 9: 5602-5609.
- Feinberg, A. P., y B. Volgelstein. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- Fishman-Lobell, J., y 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.

- Friedberg, E. C. 1996. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu. Rev. Biochemistry* 65: 15-42.
- Fritze, C. E., K. Verschuere, R. Strich, y R. E. Esposito. 1997. Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *The EMBO Journal* 16: 6495-6509.
- 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, y 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, y R. J. Monnat, Jr. 1989. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5893-5897.
- Galtwitz, D., y I. Sures. 1980. Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2546-2550.
- Gottlieb, S., y R. E. Esposito. 1989. A new role for yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 56: 771-776.
- Gottlieb, S., J. Wagstaff, y R. E. Esposito. 1989. Evidence for two pathways of meiotic intrachromosomal recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7072-7076.
- Goyenechea, B., N. Klis, J. Yelamos, G. T. Williams, A. Ridell, M. S. Neuberger, y C. Milstein. 1997. Cells strongly expressing Ig(kappa) transgenes show clonal recruitment of hypermutation: a role for both MAR and the enhancers. *The EMBO Journal* 16: 3987-3994.
- Grimm, C., P. Schaer, P. Munz, y J. Kohli. 1991. The strong ADH1 promoter stimulates mitotic and meiotic recombination at the ADE6 gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 289-298.
- Guarente, L. R., R. Yocum, y P. Gifford. 1982. A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7410-7414.
- Guarente, L. 1983. Yeast promoters and LacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 181-191.
- Gustafsson, C. M., L. C. Myers, Y. Li, M. J. Redd, M. Lui, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, y R. D. Kornberg. 1997. Identification of Rox3 as a component of mediator and RNA polymerase holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 272: 48-50.
- Haguenauer-Tsapis, R., y A. Hinnen. 1984. A deletion that includes the signal peptidase cleavage sites impairs processing, glycosylation and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2668-2675.
- Han, M., y M. Grunstein. 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell* 55: 1137-1145.
- Han, M., U. -J. Kim, P. Kayne, y M. Grunstein. 1988. Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the PHO5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 7: 2221-2228.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harashima, S., T. Mizumo, H. Mabuchi, S. -I- Yoshimitsu, y R. Ramesh. 1995. Mutations causing high basal level transcription that is independent of transcriptional activators but dependent on

- chromosomal position in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 716-725.
- Hartwell, L.H., y D. Smith. 1985. Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. *Genetics* **110**: 381-395.
- Hartzog, G. A., T. Wada, H. Handa, y F. Winston. 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Develop.* **12**: 357-369.
- Hayes, S., P. Shiyonov, X. Chen y P. Raychaudhuri. 1998. DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 240-249.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, y A. Tzagaloff. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hoeijmakers, J.H.J., J.-M. Egly, y W. Vermeulen. 1996. TFIIH: a key component in multiple DNA transactions. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **6**: 26-33.
- Hoffman, C. S., y F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Inoue, H., H. Nojima, y H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, y 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, y A. Kimura. 1983. Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Ivanov, E. L., y 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.
- Jackson, J. A., y G. R. Fink. 1981. Gene conversion between duplicated genetics elements in yeast. *Nature* **292**: 306-311.
- Jiang, Y. W., y D. J. Stillman. 1992. Involvement of the *SIN4* global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4503-4514.
- Jiang, Y. W., y D. J. Stillman. 1995. Regulation of *HIS4* expression by the *Saccharomyces cerevisiae* *SIN4* transcriptional regulator. *Genetics* **140**: 103-114.
- Jiang, Y. W., P. R. Dohrmann, y D. J. Stillman. 1995. Genetic and physical interactions between yeast *RGR1* and *SIN4* in chromatin organization and transcriptional regulation. *Genetics* **140**: 47-54.
- Kane, C. M. 1994. Transcript elongation and gene regulation in eukaryotes. En *Transcription: Mechanisms and Regulation*, pp. 279-296. (ed. R. C. Conaway y J. W. Conaway). Raven Press, New York.
- Keil, R. L., y 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.
- Keil, R. L., y G. S. Roeder 1984. *cis*-Acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell* **57**: 377-386.

- Kelleher, R. J., III, P. M. Flanagan, y R. D. Kornberg. 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61: 1209-1216.
- Kim, Y. -J., S. Bjorklund, L., Y. LI, M. Sayre, y R. Kornberg. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599-608.
- Klar, A. J. S., J. N. Strathern, y J. B. Hicks. 1981. A position-effect control for gene transposition: state of the expression of yeast mating-type genes affect their ability to switch. *Cell* 25: 517-524.
- Klar, R. L. , J. N. Strathern y J. A. Abraham. 1984. Involvement of double-strand chromosomal breaks for mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49: 77-88.
- Klein, H. L. 1988. Different types of recombination events are controlled by the *RAD1* and *RAD52* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 120: 367-377.
- Köhler, K., y H. Dombey. 1991. Preparation of high molecular weight RNA. *Meth. Enzymol.* 194: 398-401.
- Koleske, A. J., S. Buratowski, M. Nonet, y 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., y R. A. Young. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368: 466-469.
- Koleske, A. J. y R. A. Young. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends in Biochem. Sci.* 20: 113-116.
- Kon, N., M. D. Krawchuk, B. G. Warren, G. R. Smith, y W. P. Wahls. 1997. Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13765-13770.
- Kornberg, R. D. 1996. RNA polymerase II transcription control. *Trends in Biochem. Sci.* 21: 325-326.
- Kotani, H., y E. B. Kmiec. 1994. Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1949-1955.
- Kuzminov, A. 1995. Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 373-384.
- Kwon, H., A. N. Imbalzano, P. A. Khavari, R. E. Kingston, y M. R. Green. 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* 370: 477-481.
- Lauster, R., C. -A. Reynaud, I. -L. Martenson, A. Peter, D. Bucchini, J. Jami, y J. -C. Weill. 1993. Promoter, enhancer and silencer elements regulate rearrangement of an immunoglobulin transgene. *The EMBO Journal* 12: 4615-4623.
- Lefebvre, L., y M. Smith. 1993. Mutational and functional analysis of dominant *SPT2(SIN1)* suppressor alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5393-5407.
- Leung, H., y N. Maizels. 1992. Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4154-4158.

- Li, B., y A. J. Lustig. 1996. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Develop.* **10**: 1310-1326.
- Li, Y., S. Bjorklund, Y. W. Jiang, Y. J. Kim, W. S. Lane, D. J. Stillman, y R. D. Kornberg. 1995. Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex-RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 10864-10868.
- Liefshitz, B., A. Parket, R. Maya, y M. Kupiec. 1995. The role of DNA repair genes in recombination between repeated sequences in yeast. *Genetics* **140**: 1199-1211.
- Lin, H., K. Skerle, y 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.
- Lis, J., y C. Wu. 1993. Protein traffic on the heat shock promoter: Pausing, stalling and trucking along. *Cell* **74**: 1-4.
- Malagón, F., y A. Aguilera. 1996. Differential intrachromosomal hyper-recombination phenotype of *spt4* and *spt6* mutants of *S. cerevisiae*. *Curr. Gen.* **30**: 101-106.
- Maldonado, E., R. Shiekhattar, M. Sheldon, H. Sho, R. Drapkin, P. Rickert, E. Lees, C. W. Anderson, S. Linn, y D. Reinberg. 1996. A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* **381**: 86-89.
- Mallet, L., F. Bussereau, y M. Jacquet. 1995. A 43.5 kb segment of yeast chromosome XIV, which contains *MFA2*, *MEP2*, *CAP/SRV2*, *NAM9*, *FKB1/FPR1/RBP1*, *MOM22* and *CPT1*, predicts an adenosine deaminase gene and 14 new open reading frames. *Yeast* **11**: 1195-1209.
- Marinus, M. G. y E. B. Konrad. 1976. Hyper-recombination in *dam* mutants of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **149**: 273-277.
- Márquez, J. A., y R. Serrano. 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt-stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**: 89-92.
- Mead, D. A., E. Szczesna-Skorupa, y B. Kemper. 1986. Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engineering* **1**: 67-74.
- Meyhack, B., A. Hinnen, y J. Heim. 1989. Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*, pp. 311-321. (ed. C. L. Hershberger, S. W. Queener, y G. Hegeman). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Meyn, M. S. 1993. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in Ataxia-Telangiectasia. *Science* **260**: 1327-1330.
- Mezard, C., y A. Nicolas. 1994. Homologous, homeologous, and illegitimate repair of double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and *rad52* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1278-1292.
- McCormack, W. T. y C. B. Thompson. 1990. Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes Develop.* **4**: 548-558.
- McDonald, J. P., y R. Rothstein. 1994. Unrepaired heteroduplex DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is decreased in *RAD1 RAD52*-independent recombination. *Genetics* **137**: 393-405.

- McLean, M., A. V. Hubberstey, D. J. Bouman, N. Pece, P. Mastrangelo y A. G. Wildeman. 1995. Organization of the *Saccharomyces cerevisiae* actin gene UAS: functional significance of reiterated REB1 binding sites and AT-rich elements. *Mol. Microbiol.* 18: 605-614.
- Mitchel, B., S. D. Ehrlich, y M. Uzest. 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *The EMBO Journal* 16: 430-438.
- Mumberg, D., R. Müller, y M. Funk. 1994. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* 22: 5767-5768.
- Mumberg, D., R. Müller, y M. Funk. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156: 119-122.
- Myers, L. C., C. M. Gustafsson, D. A. Bushnell, M. Lui, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, y R. D. Kornberg. 1998. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Develop.* 12: 45-54.
- Neigeborn, L., J. L. Celenza, y M. Carlson. 1987. *SSN20* is an essential gene with mutant alleles that suppress defects in *SUC2* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 672-678.
- Nevo-Caspi, Y., y M. Kupiec. 1994. Transcriptional induction of Ty recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 12711-12715.
- Nickoloff, J. A., J. D. Singer, M. F. Hoekstra, y F. Heffron. 1989. Double-strand breaks stimulate alternative mechanisms of recombination repair. *J. Mol. Biol.* 27: 527-541.
- Nickoloff, J.A., y Reynolds. 1990. Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4837-4845.
- Nickoloff, J.A. 1992. Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5311-5318.
- Nicolas, A., D. Treco, N. P. Schultes, y J. W. Szostak. 1989. An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 370: 35-39.
- Nonet, M. L., y R. A. Young. 1989. Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123: 715-724.
- Oltz, E. M., F. W. Alt, W. C. Lin, J. Chen, G Taccioli, S. Desiderio, y G. Rathbun. 1993. A V(D)J recombinase inducible B-cell line: role of transcriptional enhancer elements in directing V(D)J recombination. *Mol. Cell Biol.* 13: 6223-6230.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C. -H. Chang, D. S. Luse, y D. Reinberg. 1998. FACT, a factor that Facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92: 105-116.
- Osborne, B. I., y L. Guarente. 1989. Mutational analysis of a yeast transcriptional terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4097-4101.
- Ozenberg, B. A., y G. S. Roeder. 1991. A unique pathway of double-strand break repair operates in tandemly repeated genes. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1222-1231.
- Pearson, W. R., y D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.

- Peterson, C. L., W. Kruger, y I. Herskowitz. 1991. A functional interaction between the C-terminal domain of RNA polymerase II and the negative regulator SIN1. *Cell* 64: 1135-1143.
- Petes, T. D., R. E. Malone, y L. S. Symington. 1991. Recombination in Yeast. En *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome*, Vol. 1. pp. 407-521. (ed. J. Broach, E. W. Jones, y J. R. Pringle). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Prado, F., y A. Aguilera. 1995. Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the *RAD1*, *RAD10* and *RAD52* genes. *Genetics* 139: 109-123.
- Prado, F., J. I. Piruat, y A. Aguilera. 1997. Recombination between DNA repeats in yeast *hpr1Δ* cells is linked to transcription elongation. *The EMBO Journal* 16: 2826-2835.
- Prakash, L., y S. Prakash. 1977. Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 86: 33-55.
- Prelich, G., y F. Winston. 1993. Mutations that suppress the deletion and upstream activating sequence in yeast: involvement of a protein kinase and histone H3 in repressing transcription *in vivo*. *Genetics* 135: 665-676.
- Price, D. H., A. E. Sluder, y A. L. Greenlaf. 1989. Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1465-1475.
- Rattray, A. J., y L. S. Symington. 1995. Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139: 45-56.
- Reeder, T. C., y D. K. Hawley. 1996. Promoter proximal sequences modulate RNA polymerase II elongation by a novel mechanism. *Cell* 87: 767-777.
- Reines, D. 1992. Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 267: 3795-3800.
- Reines, D. 1994. Nascent RNA cleavage by transcription elongation complexes. En *Transcription: Mechanisms and Regulation*. pp. 263-278 (ed. R. C. Conaway and J. W. Conaway). Raven Press, New York.
- Reines, D., J. W. Conaway, y R. C. Conaway. 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends in Biochem. Sci.* 21: 351-355.
- Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in Biochem. Sci.* 21: 327-335.
- Ross, J. 1995. Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet.* 12: 171-175.
- Rothstein, R. J. 1983. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 202-211.
- Rubin, G. M. 1974. Three forms of the 5.8-S ribosomal RNA species in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 41: 197-202.
- Rudin, N., y 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.
- Rudolph, H., y A. Hinnen. 1987. The yeast *PHO5* promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1340-1344.

- Sakai, A., Y. Shimizu, S. Kondou, T. Chibazakura, y F. Hishinuma. 1990. Structure and molecular analysis of *RGR1*, a gene required for glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10: 4130-4138.
- Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Santos-Rosa, H., y A. Aguilera. 1994. Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae hpr1Δ* strains. *Mol. Gen. Genet.* 245: 224-236.
- Santos-Rosa, H., y 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., B. Clever, W.-D. Heyer, y 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.
- Scafe, C., D. Chao, J. Lopes, J. P. Hirsch, S. Henry, y R. A. Young. 1990. RNA polymerase II C-terminal repeat influence response to transcriptional enhancer signals. *Nature* 347: 491-494.
- Schwedler, U., H. -M. Jäck y M. Wabl. 1990. Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 345: 452-455.
- Selby, C. P., y A. Sancar. 1997. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11205-11209.
- Sherman, F., G. R. Fink, y J. B. Hicks. 1986. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shi, X., M. Chang, A. J. Wolf, C. -H. Chang, A. A. Frazer-Abel, P. A. Wade, Z. F. Burton, y J. A. Jaehning. 1997. Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymerase II-containing complex distinct from the Srbp-containing holoenzyme. *Mol. Cell Biol.* 17: 1160-1169.
- Schiestl, R. H., y S. Prakash. 1988. *RAD1*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination. *Mol. Cell Biol.* 8: 3619-3626.
- Schiestl, R. S., y 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, y S. Prakash. 1990. *RAD10*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in the *RAD1* pathway of mitotic recombination. *Mol. Cell Biol.* 10: 2485-2491.
- Schultz, M. C., S. J. Brill, Q. D. Ju, R. Sternglanz, y R. H. Reeder. 1992. Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Develop.* 6: 1332-1341.
- Shenkar, R., M. H. Shen, y 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, y J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sikorski, R. S., y 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.

- Smith, G. R. 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 52: 1-28.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- St John, T. P., y R. W. Davis. 1981. The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 152: 285-315.
- Stargell, L. A., y K. Struhl. 1996. Mechanisms of transcriptional activation in vivo: Two steps forward. *Trends in Genet.* 8: 311-315.
- Stewart, S. E., y G. S. Roeder. 1989. Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3464-3472.
- Stillman, D. J., S. Dorland, y Y. Yu. 1994. Epistasis analysis of suppressor mutations that allow *HO* expression in the absence of the yeast *SWI5* transcriptional activator. *Genetics* 136: 781-788.
- Straka, A., y W Hörz. 1991. A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *The EMBO Journal* 10: 361-368.
- Struhl, K., y R. W. Davis. 1980. A physical, genetic and transcriptional map of the cloned *his3* region of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 136: 309-332.
- Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer, y R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039.
- Susek, R. E., y S. L. Lindsquit. 1989. Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the superfamily of small heat shock proteins but is without a demonstrable function. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3791-3799.
- Suzuki, Y., y M. Nishizawa. 1994. The yeast GAL11 protein is involved in regulation of the structure and the position effect of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3791-3799.
- Suzuki, Y., Y. Nogi, A. Abe, y T. Fukushawa. 1988. GAL11 protein, an auxiliary transcription activator for genes encoding galactose-metabolizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4991-4999.
- Svejstrup, J. Q., Y. Li, J. Fellows, A. Gnatz, S. Bjorklund, y R. D. Kornberg. 1997. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6075-6078.
- Svejstrup, J. Q., P. Vichi, y J. -M. Egly. 1996. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends in Biochem. Sci.* 21: 346-350.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, y F. W. Stahl. 1983. The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.
- Tantin, D., A. Kansal, y M. Carey. 1997. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6803-6814.
- Thibodeau, S. N., G. Bren, y D. Schaid. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819.
- Thomas, B. J., y R. Rothstein. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-630.

- Thompson, C. M., A. Koleske, D. M. Chao, y R. A. Young. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding Protein in yeast. *Cell* 73: 1361-1375.
- Thyagarajan, B., B. L. Johnson, y C. Campbel. 1995. The effect of target site transcription on gene targeting in human cells in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23: 2784-2790.
- Tsukiyama, T., y C. Wu. 1995. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodelling factor. *Cell* 83: 1011-1020.
- Uemura, H., S. Pandit, Y. Jigami, y R. Sternglanz. 1996. Mutations in GCR3, a gene involved in the expression of glycolytic genes in *Saccharomyces*, suppress the temperature-sensitive growth of *hpr1* mutants. *Genetics* 142: 1095-1103.
- Uptain, S. M., C. M. Kane, y M. J. Chamberlain. 1997. Basic mechanisms of transcription elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 117-72.
- van Gool, A. J., E. Citterio, S. Rademakers, R. van Os, W. Vermeulen, A. Constantinou, J.-M. Egly, D. Bootsma, y J. H. J. Heijmakers. 1997a. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *The EMBO Journal* 16: 5955-5965.
- van Gool, A. J., G. T. J. van der Horst, E. Citterio, y J. H. J. Heijmakers. 1997b. Cockayne syndrome: defective repair of transcription?. *The EMBO Journal* 16: 4155-4162.
- Varga-Weisz, P. D., M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann, y P. B. Becker. 1997. Chromatin remodeling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388: 598-599.
- Vilette, D., M. Uzest, S. D. Ehrlich, y B. Michel. 1992. DNA transcription and repressor binding affect deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. *The EMBO Journal* 11: 3629-3634.
- Vilette, D., S. D. Ehrlich, y B. Mitchel. 1995. Transcription-induced deletions in *Escherichia coli* plasmids. *Mol. Microbiol.* 17: 493-504.
- Voelkel-Meiman, K., R. L. Keil, y G. S. Roeder. 1987. Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell* 48: 1071-1079.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pöhlmann, y P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.
- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, A. Ferdous, T. Imai, S. Hirose, S. Sugimoto, K. Yano, G. Hartzog, F. Winston, S. Buratowski, H. Handa. 1998. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes and Develop.* 12: 343-356.
- Waldherr, M., A. Ragnini, E. Jank, R. Teply, G. Wiesenbergn, y R. J. Schweyen. 1993. A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeasts. *Curr. Genet.* 24: 301-306.
- Wallis, J. W., G. Chrebet, G. Brodsky, M. Rolfe, M., y R. Rothstein. 1989. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419.
- Wang, W., J. Cote, Y. Xue, S. Zhou, P. A. Khavari, et al. 1996. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI/SNF complex. *The EMBO Journal* 15: 5370-5382.
- Wechser, M. A., M. P. Kladde, J. A. Alfieri, y C. L. Peterson. 1997. Effects of Sin- versions of histone H4 on yeast chromatin structure function. *The EMBO Journal* 16: 2086-2095.

- White, M. A., M. Wierdl, P. Detloff, y T. D. Petes. 1991. DNA-binding protein RAP1 stimulates meiotic recombination at the *HIS4* locus in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9755-9759.
- Wilson, C. J., D. M. Chao, A. N. Imbalzano, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston, y R. A. Young. 1996. RNA Polymerase II Holoenzyme contains *SWI/SNF* regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**: 235-244.
- Wright, A. P., H. J. Carlstedt-Duke, y J. A. Gustafson. 1990. Ligand-specific transactivation of gene expression by a derivative of the human glucocorticoid receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**: 14763-14769.
- Yankulov, K., J. Blau, T. Purton, S. Roberts, y D.L. Bentley (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* **77**: 749-759.
- Yuan, L., -W., y R. L. Keil. 1990. Distance-independence of mitotic intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 263-273.
- Zawel, L., y D. Reinberg. 1992. Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 488-495.
- Zieg, J., V. F. Maples, y S. R. Kushner. 1978. Recombination levels of *Escherichia coli* K-12 mutants deficient in various replication, recombination, or repair genes. *J. Bacteriol.* **134**: 958-966.
- Zhu, Y., C. L. Peterson, y M. F. Christman. 1995. *HPR1* encodes a global positive regulator of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1698-1708.

JOSE IGNACIO PIRUAT PALOMI
Relación de la transcripción con la
recombinación entre secuencias repetidas en
S. cerevisiae

APTO COM LAUDE

8

Junio

98



501105117

FBI E TD / 390

1105117