R, 32.884

FACULTAD DE CIENCIAS BIBLIOTECA GRANADA

T 13 26

F A C U L T A D D E C I E N C I A S

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

"CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES nif EN LEVADURA (Saccharomyces cerevisiae) "

Enrique Iáñez Pareja

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 01964557
Nº Copia 12118472

U N I V E R S I D A D D E G R A N A D A

1985

R.32.884

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
SALIDA N.º 950
Fecha 20 MAYO 1987

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES *nif* EN LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*)

Memoria que presenta D. Enrique Iáñez Pareja
para aspirar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS

Fdo.: Enrique Iáñez Pareja,
Ldo. en Ciencias Biológicas

Vº Bº El Director

Fdo.: Enrique Montoya Gómez
Catedrático de Microbiología de
la Facultad de Ciencias de
Granada

VºBº El Codirector

Fdo.: Antonio Jiménez Martínez
Investigador Científico del CSIC.
Centro de Biología Molecular y
Universidad Autónoma de Madrid

Granada, Diciembre de 1985

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y en el Centro de Biología Molecular (UAM-CSIC) de Madrid, durante los años 1981 a 1985.

A MIS PADRES

Agradecimientos

Ante todo quiero expresar mi gratitud a aquellas personas que, durante estos años, me han ofrecido su amistad, y con las que he tenido la suerte de compartir el don de la comunicación. Quiero mencionar especialmente a Malema, Araceli, Maite, Antonio Luis, Virginia, Juan Antonio, Mª Angeles, Félix, Marina, Maribel, Sonia, Mª Rosario, Mª José, Diego e Isabel.

Al continuo estímulo de los doctores Olivares Pascual y Casadesús Pursals debo gran parte de mis inquietudes científicas y "meta-biológicas"; les agradezco el apoyo recibido a través de sus consejos y experiencias.

Esta Memoria de Doctorado ha sido posible gracias a la sabia dirección de los profesores Montoya Gómez y Jiménez Martinez. Sus amplios conocimientos y las facilidades de todo tipo que han puesto a mi alcance han sido determinantes en esta labor.

.../...

A todos cuantos han tenido la amabilidad y paciencia de introducirme en técnicas particulares; a los doctores Nicolás Toro y Antonio Luis Extremera, en Granada; a los muchos que, en el Centro de Biología Molecular de Madrid me dedicaron parte de su tiempo: a los doctores Antonio González, Antonio Talavera y Esteban Domingo, y a los compañeros del "121" Magdalena Zalacaín, Diego Pulido, José Manuel Pardo, José Antonio Perez y Asunción Martín, que facilitaron mi rápida integración en un agradable clima de trabajo.

INDICE

INTRODUCCION		1
A) FIJACIÓN BIOLÓGICA DE DINITROGENO Y SUS PERSPECTIVAS DE MEJORA		2
1.	BIOQUÍMICA DE LA FIJACIÓN	5
1.1.	Componentes de la nitrogenasa	5
1.2.	Sustratos	6
1.3.	Transporte electrónico a la nitrogenasa y poder reductor	8
1.4.	Estequiometría y aspectos energéticos	9
1.5.	Modo de acción de la nitrogenasa	9
1.6.	Modulación de la actividad nitrogenasa	12
1.6.1.	Suministro de energía y carga energética	12
1.6.2.	Estado energético de la membrana	13
1.6.3.	Modificación covalente de la nitrogenasa	13
1.6.4.	Acción del oxígemo	14
2.	GENÉTICA DE LA FIJACIÓN	17
2.1.	Organización de la región genética nif	17
2.2.	Regulación genética de la fijación	21
2.2.1.	Control por fuente de nitrógeno y oxígeno	22
2.2.1.1.	Sistema general ntr	22
2.2.1.2.	Regulación específica nif	27
2.2.1.3.	Aspectos moleculares	30
2.2.2.	Control por temperatura	34
2.2.3.	Control por molibdeno	34
2,2,4,	Otras modalidades de regulación	35
3.	PERSPECTIVAS DE MEJORA EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE DINITRÓGENO	36
3.1.	Mejora de los sistemas fijadores naturales	38
3.2.	Creación de nuevos sistemas fijadores	42
3.2.1.	Nuevos procariotas fijadores	42
3.2.2.	Manipulaciones con plantas	43

3.2.2.1. Técnicas de manipulación de protoplastos 44

3.2.2.2. Técnicas de manipulación *in vitro* de ADN 48

B) LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO UN ORGANISMO EUCARIÓTICO MODELO PARA ESTUDIOS DE ADN RECOMBINANTE 55

4. SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN LEVADURA 57

5. TIPOS DE VECTORES Y DE TRANSFORMANTES 58

5.1. Vectores integrativos (YIp) 59

5.2. Vectores basados en el plásmido 2μm (YEp) 61

5.3. Vectores basados en secuencias cromosómicas de replicación autónoma (YRp) 64

5.4. Vectores basados en secuencias centroméricas (YCp) 66

5.5. Transformaciones con ADN lineal. Cromosomas artificiales 67

6. ESTUDIOS BÁSICOS EN LEVADURA CON TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE 69

6.1. Métodos de alteración y sustitución de genes 69

6.2. Estudios sobre transcripción y traducción: secuencias implicadas 76

6.2.1. Secuencias 5' implicadas en la transcripción 79

6.2.2. Secuencias 5' implicadas en la traducción 82

6.2.3. Secuencias 3 no codificadoras 84

7. INTRODUCCIÓN DE ADN HETERÓLOGO EN LEVADURA 85

7.1. Expresión de genes eucarióticos 86

7.2. Expresión de genes procarióticos 90

7.3. Clonación de genes *nif* en levaduras 94

OBJETO DEL TRABAJO 96

MATERIAL Y METODOS		98
1.	MICROORGANISMOS	99
2.	SISTEMAS GENETICOS	99
2.1.	Fuente del operón nifHDKY: pSA30	101
2.2.	Vector bifuncional de expresión: pAAR6	101
2.3.	Fuente del replicador de 2μm: YEp13	105
3.	MEDIOS DE CULTIVO	108
3.1.	Medios para las estirpes bacterianas	108
3.2.	Medios para levaduras	110
4.	ANTIBIOTICOS	112
5.	METODOS DE AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO	112
5.1.	Aislamiento rápido a partir de pequeños cultivos	112
5.2.	Aislamiento y purificación de plásmidos a gran escala	114
6.	EXTRACCION DE ARN DE LEVADURA	116
7.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ADN Y ARN	117
8.	MANIPULACIONES in vitro DE MOLECULAS DE ADN	118
8.1.	Digestión del ADN por endonucleasas de restricción	118
8.2.	Nucleasa Bal-31	119
8.3.	Ligado de ADN	120
8.4.	Desfosforilación de extremos de ADN lineal	120
8.5.	Fosforilación de extremos 5'-OH	121
8.6.	Marcado de ADN por desplazamiento de mella ("nick-translation")	121
8.7.	Conversión a extremos romos de terminales protuberantes	123

8.7.1.	Conversión a cadena doble de terminales protuberantes 5' de cadena sencilla	123
8.7.2.	Conversión simultánea de terminales protuberantes 5' y 3' a extremos romos	123
8.8.	Preparación de ligadores sintéticos EcoRI	124
8.8.1.	Fosforilación de extremos 5'	125
8.8.2.	Reacciones de funcionalidad de los ligadores fosforilados	126
8.8.3.	Comprobación de la funcionalidad de las reacciones	126
8.8.4.	Eliminación del (γ-^{32}P)ATP de la preparación de los ligadores fosforilados	127
9.	METODOS ELECTROFORETICOS	130
9.1.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	130
9.2.	Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida	131
9.3.	Electroforesis desnaturalizante de ARN	132
10.	ELUCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA	134
10.1.	Electroelución de ADN	134
10.2.	Recuperación de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión	135
11.	METODOS CROMATOGRAFICOS	137
11.1.	Separación de oligonucleótidos y ATP por filtración en minicolumnas de Sephadex	137
11.2.	Cromatografía de ADN en minicolumnas sometidas a centrifugación	138
11.3.	Filtración por Ultrogel	139
11.4.	Cromatografía de afinidad de ARNm en columnas de poli-(U)-Sepharose	139
12.	TRANSFORMACIONES CON ADN PLASMIDICO	141
12.1.	Transformaciones de E.coli	141

12.2.	Transformaciones de S.cerevisiae	143
13.	TECNICAS DE HIBRIDACION ENTRE ACIDOS NUCLEICOS	145
13.1.	Hibridación in situ de ADN a partir de colonias	145
13.1.1	Preparación de las soluciones	145
13.1.2.	Procedimiento	146
13.2.	Hibridación de ARN transferido a membranas de nitrocelulosa	149
13.2.1.	Preparación de las soluciones	149
13.2.2.	Procedimiento	150
14.	SECUENCIADO DEL ADN	153
14.1.	Obtención del fragmento de ADN marcado en un extremo	153
14.2.	Reacciones de rotura química específicas de bases	155
14.2.1.	Tampones y soluciones	156
14.2.2.	Procedimiento	157
14.3.	Electroforesis de secuenciado	158
14.3.1.	Preparación de los geles	159
14.3.2.	Desarrollo de la electroforesis y autorradiografía de los geles	160
14.3.3.	Interpretación de los resultados	161
15.	MARCADO DE PROTEINAS DE LEVADURA Y ELECTROFORESIS EN GELES DE PAA-SDS	162
16.	ENSAYO DE NITROGENASA CON EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS	163
16.1.	Preparación de los extractos de K.pneumoniae	163
16.2.	Preparación de los extractos de levadura	164
16.3.	Ensayo in vitro de la nitrogenasa	165

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS 166

1. CLONACIÓN DEL FRAGMENTO *nif* DE pSA30 EN pAAR6 167

2 MODIFICACIÓN *in vitro* DE LA REGION 5' PREVIA A *nifH* 170

3. CLONACION DE LOS FRAGMENTOS *nif* RESECCIONADOS EN EL VECTOR DE EXPRESION pAAR6 175

4. CARTOGRAFÍA DE LAS DELECCIONES PORTADAS POR LOS PLASMIDOS DE LA SERIE pBA 182

5. SECUENCIACION DE LAS REGIONES 5' PREVIAS A *nifH* EN LOS PLASMIDOS pBA21 y pBA51 190

6. INTRODUCCIÓN EN LEVADURA DE LOS PLASMIDOS *nif* DERIVADOS DE pAAR6 192

7. CONSTRUCCION DE pATM2, UN VECTOR DE EXPRESIÓN CON SEGREGACIÓN MITÓTICA MEJORADA. RECLONACIÓN DE *nif* 197

8. TRANSCRIPCIÓN EN LEVADURA DE LAS SECUENCIAS *nif* 204

9. ENSAYOS DE EXPRESION DE *nif* EN LEVADURAS A NIVEL DE TRADUCCIÓN 210

DISCUSIÓN 218

1. SOBRE EL DISEÑO GENETICO Y SU REALIZACION 219

2. COMPORTAMIENTO MITÓTICO DE LOS PLASMIDOS EN LEVADURA. CONSTRUCCION DE UN NUEVO VECTOR BIFUNCIONAL 223

3. TRANSCRIPCIÓN DE *nif* EN LEVADURA 227

4. EXPRESION TRADUCIONAL 232

CONCLUSIONES 224

BIBLIOGRAFIA 247

INTRODUCCIÓN

A) FIJACIÓN BIOLÓGICA DE DINITRÓGENO Y SUS PERSPECTIVAS DE MEJORA

La entrada del elemento nitrógeno a la Biosfera se produce por procesos reductores que fijan el nitrógeno molecular (N_2 , dinitrógeno) atmosférico en forma de amoniaco. A estos se oponen los fenómenos de desnitrificación, realizados por ciertas bacterias que reducen los nitratos (el principal compuesto nitrogenado asimilable por las plantas) hasta óxidos de nitrógeno y, principalmente, dinitrógeno. En ecosistemas maduros el nitrógeno no suele ser el elemento limitante de la productividad biológica. Por el contrario, en los simplificados ecosistemas artificiales impuestos por el hombre en sus prácticas agrícolas, el suministro natural de nitrógeno de nitrógeno por fijación es insuficiente para mantener la adecuada fertilidad de los suelos. En las tierras de cultivo, aparte de las grandes cantidades de nitrógeno que se desvían del sistema en forma de biomasa de la cosecha, otra porción no despreciable se pierde por lixiviación y desnitrificación. Por esta razón, para sostener la fertilidad de estos suelos se requieren aportes externos de nitrógeno fijado, incorporado como abonos.

Se calcula que anualmente se fijan unos 265 millones de Tm de nitrógeno atmosférico; la mayor parte (un 66%) corresponde a fijación biológica, realizada exclusivamente por ciertos microorganismos procarióticos (llamados

fijadores o diazotrofos). La fijación no biológica se reparte entre la debida a fenómenos naturales como descargas eléctricas, incendios forestales, etc., y la industrial, procedente de fabricación de fertilizantes nitrogenados por el proceso reductivo de Haber-Bosch (11 y 23%, respectivamente).

La explosión demográfica, con la consiguiente demanda incrementada de alimentos, la crisis energética que encarece el precio de los fertilizantes, y los problemas ecológicos derivados de su empleo, han convertido en imprescindible e imperativa la investigación sobre la fijación biológica de dinitrógeno, con vistas a su mejor aprovechamiento por el hombre de cara a satisfacer las necesidades futuras de proteína de la población.

La capacidad de fijación biológica de dinitrógeno está restringida al reino Procariota, existiendo representantes diazotróficos en una amplia gama de taxones (Gordon 1981) que abarcan variados tipos de metabolismo: cianobacterias, eubacterias fotosintéticas y quimiotrofas (aerobias o microaerófilas, anaerobias estrictas y facultativas) e incluso arqueobacterias. Estas últimas se han incorporado recientemente a la lista de fijadores, con dos especies metanogénicas; este descubrimiento, que implica a un grupo considerado como de origen evolutivo muy antiguo, va a activar de nuevo el viejo debate sobre la significación evolutiva y funcional de la diazotrofía en la Tierra primitiva (véase Postgate, 1982, 1984; Stackebrandt y Woese, 1981). La diversidad de tipos fisiológicos entre los fijadores ha debido permitir su expansión a multitud de hábitats donde permanente o estacionalmente los niveles de nitrógeno combinado son bajos, colonizando ambientes extremos, desde fuentes termales a lodos cenagosos o terrenos antárticos.

Algunos se pueden asociar de manera más o menos estrecha con organismos eucarióticos (sobre todo plantas) para verificar la fijación, existiendo notables casos de simbiosis íntimas en las que se inducen adaptaciones anatómicas y fisiológicas especiales. (El informe de Yamada y Sakaguchi, 1980, sobre una supuesta alga verde fijadora de nitrógeno no ha encontrado confirmación).

En los siguientes epígrafes se revisa brevemente el estado actual de los conocimientos sobre aspectos de la bioquímica y genética de la fijación de dinitrógeno, haciendo especial referencia a Klebsiella pneumoniae, para pasar posteriormente a considerar las posibles perspectivas de ampliar y mejorar este importante proceso, con el objetivo de conseguir en un futuro mayores rendimietos en la producción mundial de alimentos.

1. BIOQUIMICA DE LA FIJACIÓN

1.1. COMPONENTES DE LA NITROGENASA

La reducción biológica del dinitrógeno hasta amoníaco se cataliza por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, constituido por dos proteínas: la molibdoferroproteína (MoFe-proteína o componente 1) posee la actividad dinitrogenasa propiamente dicha, que transfiere seis electrones a cada molécula de nitrógeno molecular; la ferroproteína (Fe-proteína o componente 2) actúa como reductasa de la dinitrogenasa, suministrándole los electrones. Ninguno de los dos componentes tiene actividad enzimática por separado. La reacción catalizada por el complejo requiere energía en forma de ATP, un agente reductor que suministre los electrones y un entorno molecular exento de oxígeno, ya que éste inactiva irreversiblemente a las dos proteínas de la nitrogenasa. El estudio de las propiedades físicoquímicas de la nitrogenasa ha avanzado en los últimos años en buena parte debido a diversas técnicas espectroscópicas particulares (Eady y Smith,1979; Mortenson y Thorneley,1979; Burgess,1984).

El componente 1 de K.pneumoniae (Kp1) posee en su estado nativo un peso molecular de 220 KDal. Es una proteína tetramérica ($\alpha_2 \beta_2$) con dos tipos de subunidades, de 50 y 60 KDal respectivamente. Cada tetrámero contiene dos átomos de Mo y de 32 a 34 de Fe. Por análisis espectroscópicos se han detectado dos tipos de grupos metálicos: por un lado existen grupos (4Fe-4S), llamados grupos "P", y por otro está el cofactor de hierro y molibdeno (FeMo-co), en el que la relación Fe:Mo-S es de 6-8:1:4 (Shah y Brill, 1977). Aún se desconoce la verdadera estructura y disposición de estas agrupaciones. Sus potenciales medios

redox son de Em=-400 a -340 mV para los grupos "P" y de -260 a 0 mV para el FeMo-co, pero aún está por aclarar su exacta significación dentro del transporte de electrones durante la catálisis.

El componente Kp2 o ferroproteína es un dímero homomérico (γ_2) cuyo polipéptido constituyente pesa 32 KDal. (Sundaresan y Ausubel, 1981). El dímero activo alberga dos sitios para unión de MgATP y un grupo (4Fe-4S) ligado a cisteínas. La información sobre este complejo metálico y su implicación en la actividad nitrogenasa es todavía confusa (véase comentario de Haaker y Veeger, 1984).

El sitio de unión del sustrato, que muy probablemente es el mismo sitio activo del complejo nitrogenasa,es el cofactor FeMo-co (Hawkes et al., 1984) del componente 1. La capacidad de transferir electrones del componente 2 al 1 puede que resida en el grupo (4Fe-4S) de la Fe-proteína. De cualquier manera, se puede decir que mientras no conozcamos la estructura y función de las agrupaciones metálicas, nuestra comprensión del complejo nitrogenasa será bastante parcial y,en cierto sentido, especulativa.

1.2 SUSTRATOS

La nitrogenasa es relativamente inespecífica en relación a los sustratos: aparte del dinitrógeno , existe una amplia gama de compuestos reducibles, la mayoría de los cuales se pueden considerar como análogos estructurales de aquél por cuanto poseen dos átomos terminales unidos entre sí por triples enlaces covalentes. Entre ellos cabe citar el cianuro, la azida y el acetileno. Todos ellos inhiben

la fijación del dinitrógeno, y requieren también ATP para su reducción. La reducción de acetileno a etileno viene siendo aprovechada desde comienzo de la década de los setenta para la detección y cuantificación de la actividad nitrogenasa, utilizando la sensible técnica de cromatografía en fase gaseosa, que ha hecho avanzar notablemente los estudios sobre los microorganismos diazotrofos (Postgate, 1972).

De enormes consecuencias fisiológicas es el hecho de que la nitrogenasa reduzca asimismo parejas de protones hasta hidrógeno molecular (Schubert y Evans, 1976), lo cual se verifica incluso en atmósferas de nitrógeno puro con tensiones de este gas muy por encima de la K_m aparente. Ello es responsable de que una porción significativa del flujo de electrones y de energía disponibles para la nitrogenasa sean desviados respecto de la reducción del dinitrógeno, lo que supone una merma de la eficacia potencial de ésta. En contrapartida, algunos organismos fijadores (especialmente la mayoría de cepas de cianobacterias y de aerobios) poseen una hidrogenasa especial "unidireccional", capaz de oxidar el hidrógeno liberado por la nitrogenasa, con lo que se pueden recuperar electrones y energía. En general, no se conocen los transportadores que establecen el vínculo entre los electrones recuperados y las cadenas fotosintéticas o respiratorias donde se produce el ATP. Muchos anaerobios facultativos (como K.pneumoniae) o estrictos poseen hidrogenasas "bidireccionales" que pueden tanto liberar hidrógeno como oxidarlo. La obtención de mutantes de K.pneumoniae defectivos en la liberación de hidrógeno molecular a partir de sus reacciones fermentativas permitió deducir que la pérdida media de H debida a la nitrogenasa supone el 30% del flujo de electrones a través del enzima (Andersen y Shanmugan, 1977). El tema del hidrógeno en relación a

la fijación ha sido revisado por Robson y Postgate (1980) y por Evans et al. (1981).

1.3. TRANSPORTE ELECTRONICO A LA NITROGENASA Y PODER REDUCTOR

En K.pneumoniae el transporte de electrones hacia el complejo nitrogenasa implica dos productos específicamente sintetizados en condiciones de fijación: una flavoproteína (flavodoxina) con una cadena polipeptídica de 22 KDal y cuyo grupo prostético es el FMN (Nieva-Gómez et al., 1980) se encarga de reducir al componente Kp2, y por otro lado una piruvato:flavodoxín-óxidorreductasa que actúa acoplando la oxidación de intermediarios metabólicos como el piruvato a la reducción de la flavodoxina (Bogusz et al., 1981; Shah et al.,1983).

En general, no hay demostración clara de cuáles son los transportadores electrónicos para la nitrogenasa en otros diazotrofos, aunque deben ser proteínas del tipo de las ferredoxinas y flavodoxinas, con grupos metálicos (4Fe-4S), (3Fe-3S), etc., y con potenciales redox entre --200 y -450 mV.

El tema de cuál es la fuente última de poder reductor sigue estando debatido. En los últimos años se va abriendo paso la idea de que los equivalentes de reducción para la nitrogenasa son suministrados por la fuerza protónmotriz (potencial electroquímico de protones: Δp) que se crea entre ambos lados de la membrana citoplásmica, concretamente por el componente eléctrico (potencial de membrana: Ψ) Ello pondría de manifiesto la importancia del

estado de energización de la membrana para la fijación del dinitrógeno (Veeger et al, 1980)

1.4. ESTEQUIOMETRIA Y ASPECTOS ENERGETICOS

Debido a que, como se dijo, la liberación de hidrógeno molecular es algo intrínseco a la catálisis de la nitrogenasa, hay que incluir en la fórmula estequiométrica la consideración de dicha reacción "lateral":

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$$

Aunque esta reacción tendría que ser exergónica, de hecho es acentuadamente endergónica, requiriéndose la hidróliisis de dos moléculas de ATP por cada electrón transferido (16 moles de ATP por mol de nitrógeno fijado). Es evidente que alguna sutileza, que hoy por hoy se nos escapa, del mecanismo de la nitrogenasa, hace que esto ocurra así (Veeger et al., 1981).

1.5. MODO DE ACCION DE LA NITROGENASA

El mecanismo molecular de la catálisis de la nitrogenasa aún no ha sido explicado satisfactoriamente, existiendo muchas lagunas que requieren aclaración, pero hay que reconocer el ingente esfuerzo que diversos laboratorios vienen dedicando a uno de los enzimas más complejos.A continuación se ofrece una panorámica del modelo aceptado como plausible para su funcionamiento, así como algunas precisiones introducidas últimamente (Burris et al., 1981;

Postgate, 1982; Burgess, 1984; Haaker y Veeger, 1984).

Se puede considerar la acción de la nitrogenasa en una serie de pasos: La Fe-proteína acepta un electrón de la flavodoxina (o del correspondiente transportador electrónico); en esta forma reducida la Fe-proteína muestra señal en espectro de resonancia electrónica paramagnética (epr-positiva). Dos moléculas de MgATP se unen a la Fe-proteína reducida, de modo que ésta cambia su conformación, lo que afecta al grupo metálico (4Fe-4S) y acarrea un descenso del potencial redox desde -300 a -400. Entonces la MoFe-proteína, en su estado oxidado (activo para epr) se une a la Fe-proteína reducida y activada por ATP, para formar el complejo nitrogenasa. A continuación se transfiere un electrón desde el grupo (4Fe-4S) de la Fe-proteína a los átomos de Fe del cofactor FeMo-co del componente 1, con lo que éste queda silencioso para epr; este flujo de electrón está acoplado a la hidrólisis de las dos moléculas de ATP. Según algunos, el complejo se disociaría en sus dos componentes, quedando la ferroproteína oxidada y preparada para una nueva reducción. Sin embargo, como se comenta más adelante, los datos actuales apuntan más bien a que el complejo no se disocia durante todo el ciclo catalítico. Tras estas fases, el sustrato reducible se une al cofactor FeMo-co a través del átomo de Mo, que previamente se encontraba en un estado de oxidación disminuida; el sustrato primario (antes que el dinitrógeno) parece ser un protón, que forma un grupo hidruro al unirse al Mo. Los pasos anteriores se repiten con otro protón, de modo que, al final de un segundo ciclo como el descrito, se origina un derivado dihidruro de la MoFe-proteína. En presencia de dinitrógeno, entra ahora una molécula de éste al centro activo, desplazando una molécula de hidrógeno, y secuencialmente van

incorporándose otros seis electrones, transfiriéndose de uno a otro componente de la nitrogenasa por el mecanismo citado; se provocaría así la aparición sucesiva de intermediarios cada vez más reducidos de nitrógeno, hasta la liberación de dos moléculas de amoniaco; se han propuesto series de intermediarios de la reducción del dinitrógeno en base a sistemas-modelo químicos, pero falta evidencia directa sobre los intermediarios reales que se pueden formar; ni siquiera se sabe si las dos moléculas de amoniaco se liberan simultánea o secuencialmente.

Datos recientes parecen imponer modificaciones en el modelo hipotético que se acaba de comentar (Haaker y Veeger, 1984; Haaker et al., 1984): la Fe-proteína tiene dos centros metálicos (4Fe-4S) parcialmente acoplados y se comporta como transportadora de parejas de electrones. En su estado reducido se une una molécula de ATP, y en el oxidado, a dos. El ATP se une después de que se haya formado el complejo entre los dos componentes de la nitrogenasa. Además, parece imponerse la idea de que el complejo no se disocia durante la catálisis (Eady, 1973; Roberts et al., 1978).

Se necesita más información sobre la intervención de los grupos metálicos en el transporte de electrones desde el componente 2 al 1. La hipótesis de Haaker et al. (1984) supone que uno de los electrones de Fe-proteína reducida es transferido a un centro metálico de la MoFe-proteína con potencial redox superior al potencial medio de la Fe-proteína reducida (posiblemente se trata del centro "P": -480 mV), y el otro electrón es donado a un centro con potencial inferior (posiblemente el FeMo-co:-290 mV). Concomitante a este flujo electrónico (acoplado a hidrólisis de ATP), la Fe-proteína oxidada queda en conformación distinta,

a la que se unen dos moléculas de ATP, cuya hidrólisis suministra energía para transferir electrones desde el componente 2 al 1. No está aclarado el papel específico del ATP en la catálisis de la nitrogenasa, ni el mecanismo de acoplamiento entre su hidrólisis y la transferencia de electrones.

1.6. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA

La actividad potencial del complejo nitrogenasa puede verse afectada rápidamente por una serie de factores, a través de variados mecanismos (Eady 1981).

1.6.1. Suministro de energía y carga energética

Se ha comprobado que el ADP es un poderoso inhibidor competitivo de la nitrogenasa, afectando tanto a la reducción de los sustratos como a la hidrólisis del ATP.

Los diazotrofos, cuando crecen en condiciones de fijación, pueden emplear hasta el 40% de su ATP en la reacción de la nitrogenasa, lo que condiciona una carga energética disminuida (0.5-0.7) en comparación con la existente en medios ricos en nitrógeno combinado (0.9); por consiguiente, la tasa de crecimiento a expensas de nitrógeno molecular es menor.

Se ha comprobado que pequeños cambios en la relación ATP/ADP afectan marcadamente a la actividad nitrogensa, pero no está aclarado el mecanismo por el cual se produce *in vivo* esta alteración (Upchurch y Mortenson, 1980).

1.6.2. Estado energético de la membrana

Todos aquellos factores que afectan la energización de la membrana influyen sobre la actividad nitrogenasa. Entre ellos se incluyen la intensidad de luz (para los fototrofos), el suministro de oxígeno y los niveles de amonio en el medio. En K.pneumoniae se ha demostrado que la expresión de los genes nif requiere el sistema anaeróbico de transporte al fumarato; se precisa actividad fumarato reductasa para proporcionar la adecuada energización de la membrana, y por lo tanto, la energía para la fijación (Stotnicki y Rolfe, 1978).

1.6.3. Modificación covalente de la nitrogenasa

En las bacterias fotosintéticas de la familia Rhodospirillaceae se ha encontrado una inactivación reversible y rápida de la nitrogenasa ("desconexión"), en respuesta a determinadas condiciones ambientales adversas para la fijación: oscuridad, presencia de oxígeno o de nitrógeno combinado. Esta inactivación se debe a que cada dímero de ferroproteína es modificado covalentemente por adenosín monofosfato (Johansson et al., 1983; Ludden et al., 1984). La desaparición de las condiciones ambientales inactivantes provoca la rápida reactivación de la nitrogenasa por medio de una reacción específica, sensible al oxígeno, que elimina el grupo modificador.

Exceptuando este grupo de bacterias fototrofas, parece que en casi ningún caso se da inhibición de la nitrogenasa por amonio o por otras fuentes de nitrógeno (Gordon et al., 1981). Sin embargo, un informe reciente (Klugkist y Haaker, 1984) parece señalar en Azotobacter la existencia de una inhibición por amonio a bajas tensiones de oxígeno, baja tasa respiratoria y pH reducido.

1.6.4. Acción del oxígeno

Cada uno de los componentes de la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente por exposición al oxígeno, siendo la Fe-proteína más sensible (vida media, 30 seg) que la MoFe-proteína (vida media, 10 min). Parece que ello se debe a interacciones entre el oxígeno y formas reducidas de los polipéptidos del complejo enzimático, lo que da lugar a una serie de cambios que alteran los grupos metálicos. El oxígeno puede igualmente tener un efecto indirecto sobre la nitrogenasa, al causar peroxidación de membranas y representar un competidor por fuente de poder reductor.

Los diversos microorganismos diazotróficos han desarrollado estrategias para proteger a la nitrogenasa del oxígeno o para desreprimir su síntesis bajo condiciones especiales. Este importante capítulo de la fisiología de los fijadores ha sido revisado por Robson y Postgate (1980), Gallon (1981) y Bergersen (1984). En general, y dejando aparte la obvia protección por evitación del oxígeno en los anaerobios, los principales tipos de protección son los siguientes:

-Eliminación metabólica del oxígeno.- Algunos diazotrofos aerobios, como Azotobacter, poseen una alta tasa respiratoria, regulable en función de la tensión de oxígeno. A altas concentraciones de este gas usan una ramificación específica de la cadena respiratoria, menos acoplada a producción de ATP, y que sirve para mantener una concentración interna de oxígeno lo suficientemente baja como para no afectar a la nitrogenasa (protección respiratoria).

Otras bacterias poseen una hidrogenasa que oxida el hidrógeno molecular liberado por la nitrogenasa, de modo que transfiere los electrones a una cadena cuyo aceptor final es el oxígeno, con lo cual éste se elimina, al tiempo que se recupera ATP para la fijación. Este mecanismo puede ser

especialmente importante en condiciones de limitación de fuente de carbono, en que la protección respiratoria no es operativa.

Hay que destacar que, aunque en principio, los anaerobios facultativos fijan sólo en ausencia de oxígeno, de hecho casi todos poseen cierta capacidad de protección respiratoria, por lo que pueden reducir dinitrógeno en condiciones de microaerofilia. Este es el caso de K.pneumoniae, que incluso muestra cierta fijación mejorada cuando crece en quimiostatos con bajas concentraciones de oxígeno (Hill, 1976a, b), debido a que desvía la energía por fosforilación oxidativa hacia la nitrogenasa.

-Barreras físicas y separación espacial.- Las cianobacterias han de evitar que el oxígeno liberado durante la fotosíntesis afecte a la fijación. Algunas especies producen células especializadas, llamadas heteroquistes , que carecen de fotosistema II funcional, por lo que no desprenden oxígeno, y donde se verifica la fijación del dinitrógeno. Los heteroquistes desarrollan una gruesa pared, impermeable al oxígeno, de modo que éste tampoco puede difundir desde el medio ni pasar desde células vegetativas adyacentes.

Otro caso notable de barrera física se da en los nódulos radicales de las leguminosas, donde los bacteroides de Rhizobium (que se encuentran en el interior de las células del nódulo, pero rodeados de membrana derivada del plasmalema) fijan nitrógeno simbióticamente. Un nódulo típico posee un sistema que permite el acceso de aire a su interior, lo que asegura una oxigenación adecuada a sus células. Entre los bacteroides y la membrana peribacteroidal se sitúan grandes cantidades de una hemoproteína específica, la leghemoglobina, que tiene una alta especificidad por el oxígeno. La oxi-leghemoglobina evita que el oxígeno difunda direc-

tamente al bacteroide, pero se lo va suministrando a una tasa tal que es consumido en unas cadenas respiratorias muy eficaces, de modo que al tiempo que se evita que se acumule oxígeno intracelularmente, se obtiene la energía para la fijación del dinitrógeno. La peculiar distribución y propiedades de la leghemoglobina hace que el flujo de oxígeno sea prácticamente homogéneo para toda la población de bacteroides de cada célula, incluidos los más alejados de su superficie. En los nódulos de las plantas leñosas no leguminosas inducidos por el actinomiceto Frankia se han detectado hemoglobinas que parecen estar implicadas igualmente en la difusión controlada del oxígeno al microsimbionte.

-Protección por cambio conformacional.- Algunos microorganismos mantienen la nitrogenasa en una configuración reversiblemente inactiva, pero protegida del oxígeno, cuando otros medios de protección han sido desbordados. Esto ocurre con células de Azotobacter expuestas al oxígeno cuando el flujo de electrones a través de sus cadenas respiratorias es bajo; en estas condiciones la nitrogenasa queda acomplejada por unión no covalente de una sulfoferroproteína (proteína de Shetna). Cuando se restablece un adecuado flujo de electrones y es operativa la protección respiratoria, el complejo se disocia y la nitrogenasa libre reemprende inmediatamente su actividad.

-Separación temporal respecto de condiciones inactivadoras.- Algunas cianobacterias que no forman heteroquistes, como Gloeothece, relegan la fijación de dinitrógeno a los periódos de oscuridad. Además, poseen un complejo sistema de membranas internas, cuya integridad depende de iones Ca^{++}, que puede suponer una protección por compartimentación intracelular.

2. GENETICA DE LA FIJACION

A pesar de la irrelevancia económica para la fijación global de dinitrógeno que tiene K.pneumoniae, esta enterobacteria ha sido la especie más estudiada a nivel de genética y de regulación, merced al importante desarrollo de las técnicas previamente puestas a punto sobre Escherichia coli. Desde el empleo de transducción generalizada con fago P1, que permitió situar con cierta precisión el locus de fijación dentro del mapa genético, se pasó al uso de plásmidos conjugativos de resistencia a drogas, a partir de los cuales se obtuvieron R primas portadores de los genes de fijación (nif) que pudieron ser transferidos a otras enterobacterias no fijadoras naturales, donde se expresaron funcionalmente. En la segunda mitad de la década de los setenta la mutagénesis por transposones, aliada a los clásicos análisis de complementación genética llevó a la elaboración de mapas de la región nif y a la obtención de valiosos datos sobre bioquímica y fisiología de la fijación. En años recientes la incorporación de las técnicas de manipulación in vitro del ADN ha facilitado una detallada disección molecular, con un énfasis especial en los aspectos de regulación genética. La historia de estas investigaciones se puede rastrear en las revisiones de Brill (1980), Roberts y Brill (1981), Dixon (1984a) y Drummond (1984).

2.1. ORGANIZACION DE LA REGION GENETICA nif

El estudio de los genes nif experimentó un gran impulso al construirse cepas recA , que permitian análisis de complementación entre mutaciones nif cromosómicas y muta-

ciones portadas extracromosómicamente en plásmidos conjugativos o en fagos lambda transductores especializados (MacNeil et al., 1980). El orden de los grupos de complementación fue revelándose mediante cruces transduccionales con fago P1 (StJohn et al., 1975; Kennedy, 1977). El uso de elementos genéticos transponibles suministró una gran variedad de mutaciones polares por inserción y delección, que contribuyeron a confeccionar mapas genéticos finos (Bachuber et al., 1976; Dixon et al, 1977; Elmerich et al., 1978; MacNeil et al.,1978a, b; Merrick et al., 1980). La organización transcripcional ha sido estudiada creando operones híbridos entre los distintos promotores nif y la porción codificadora del gen lacZ (β-galactosidasa) de E.coli, recurriendo al fago recombinante Mu d1 (Ap, lac) (MacNeil et al., 1981). Más recientemente, la aplicación de las técnicas del ADN recombinante in vitro ha llevado a la elaboración de mapas físicos correlacionados con los genéticos (Riedel et al., 1979) y a la clonación molecular de la región nif, completa o en diversos fragmentos separados, en vectores genéticos (Cannon et al., 1977, 1979; Riedel et al., 1979; Pühler et al., 1979a, b).

La caracterización de los productos codificados por los genes nif de K.pneumoniae no ha sido completada aún, pero se han realizado avances partiendo de las grandes colecciones de mutantes obtenidos y de los genes clonados y aislados. La observación de los efectos pleiotrópicos de determinadas mutaciones, la complementación in vitro entre extractos o productos purificados de mutantes diferentes (usando la cromatografía gaseosa para medir la actividad reductora de acetileno como índice de la actividad nitrogenasa) han sido reforzados por técnicas electroforéticas capaces de detectar formas alteradas de las proteínas nif (Roberts et al., 1978; Imperial et al., 1984) y por "cartografía proteica" (Roberts y Brill, 1980; Pühler y Klipp, 1981).

De la aplicación de este conjunto de técnicas y estudios ha surgido el siguiente cuadro de la organización genética de los genes nif (Robson et al., 1983; Dixon, 1984a; Drummond, 1984) (véase Fig 1):

Existen 17 genes implicados en la fijación de dinitrógeno en K.pneumoniae, que se disponen contiguamente en una región de unas 23 kb, entre los marcadores his y shiA (MacNeil et al., 1979) agrupándose en 7 u 8 unidades de transcripción: nifJ, nifHDKY, nifENX, nifUSV, nifM, nifF, nifLA y nifBQ. Al parecer, nifM puede ser transcrito igualmente desde el promotor de nifUSV. El sentido de transcripción de todos los genes nif, a excepción de nifF y nifJ es el mismo que el del cercano operón his.

Los genes estructurales de la nitrogenasa son el nifH, que codifica el polipéptido de la Fe-proteína, Kp2, y nifD y nifK, responsables, respectivamente, de las subunidades α y β de la MoFe-proteína, Kp1. En el procesamiento y maduración de la nitrogenasa intervienen los productos de otros genes nif: para que Kp2 sea funcionalemente activa se requiere la participación de nifM, y sobre Kp1 intervienen nifS y nifU (Roberts et al., 1978). Los genes nifN, nifE y nifB están involucrados en el ensamblaje de Mo, Fe y S para la formación del FeMo-co (Roberts et al., 1978; Shah et al., 1984). El gen nifQ está implicado en una fase tardía del procesamiento del Mo (Imperial et al., 1984). La función del gen nifV ha sido muy debatida, pero actualmente se le adjudica un papel al final de la síntesis del FeMo-co, o en su inserción como centro activo en Kp1; los mutantes nifV tienen un patrón alterado de especificidad de sustratos (Hawkes et al., 1984).

En el transporte electrónico específico a la nitrogenasa actúan los genes nifJ, codificador de la piruvato:fla-

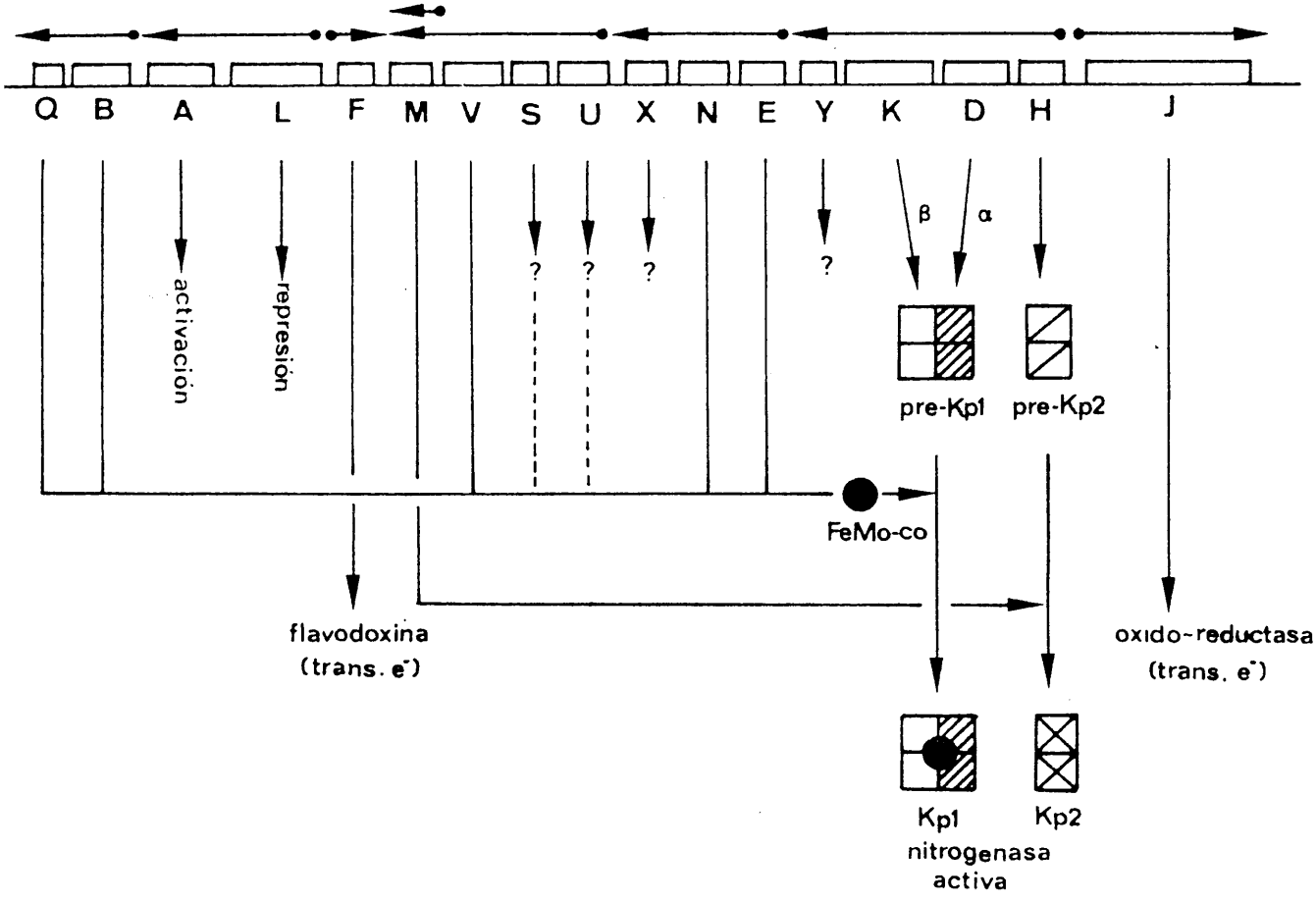


Fig 1: Organización genética del regulón nif de Klebsiella pneumoniae y funciones desempeñadas por los distintos genes.

vcdoxín-óxidorreductasa, y nifF, responsable de la síntesis del polipéptido de la flavodoxina (Bogusz et al., 1981; Nieva-Gómez et al., 1980; Shah et al., 1983).

El operón nifLA está relacionado con la regulación de los genes nif, integrándolos en una unidad de control (regulón), y a su vez establece un vínculo con el sistema general bacteriano de modulación genética del metabolismo del nitrógeno (ver apartado 2.2.1). El producto de nifA es un activador transcripcional, mientras que el de nifL participa en la desconexión específica de la expresión de la fijación ante presencia de oxígeno o fuente de nitrógeno combinado.

Hay dos genes , nifX y nifY que no tienen asignada aún una función.

2.2. REGULACION GENETICA DE LA FIJACION

La fijación biológica de dinitrógeno precisa una gran inversión de energía, se ve afectada por una serie de factores ambientales (presencia de oxígeno, disponibilidad de molibdeno, etc.) y sería un verdadero lujo metabólico cuando en el medio existiera ya una fuente rica de nitrógeno combinado; por lo tanto, no es de extrañar que a lo largo de la evolución se hayan desarrollado para ella estrictos controles de su expresión genética . En K.pneumoniae la síntesis de nitrogenasa es reprimible por diversas fuentes de N (amonio, aminoácidos), por oxígeno disuelto, y por elevadas temperaturas.

2.2.1. Control por fuente de nitrógeno y por oxígeno

Durante cierto tiempo se pensó que, en Enterobacterias, la glutamina sintetasa (GS), producto del gen glnA, aparte de su función catalítica como primera enzima de la ruta asimilativa del amonio, tenía un papel directo en la regulación de ciertos operones implicados en el catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno, así como en la de los genes nif, en K.pneumoniae (Streicher et al., 1974; Tubb, 1974). Se propuso un modelo en que la represión por amonio era mediada por la GS, independientemente de su actividad biosintética. Los conceptos de finales de la década de los setenta (Magasanik, 1977; Mortenson, 1978; Tyler, 1978; Brill, 1980) tuvieron que ser abandonados al descubrirse que glnA no es sino uno más de los elementos sometidos a un sistema de regulación general de metabolismo de nitrógeno (ntr) que afecta a los operones de catabolismo de ciertos aminoácidos y al regulón nif (Leonardo y Goldberg, 1980; DeBruijn y Ausubel, 1981; Espín et al., 1982). La acción del sistema ntr sobre los genes nif se ejerce a nivel del operón nifLA, que codifica las dos proteínas controladoras específicas de la fijación. El producto de nifA se necesita para activar la transcripción de los operones nif (Dixon et al., 1980; Buchanan-Wollaston et al., 1981b), mientras que el de nifL está relacionado con la desconexión genética de la fijación ante fuentes de nitrógeno y oxígeno disuelto (Buchanan-Wollaston et al., 1981b; Hill et al., 1981; Merrick et al., 1982) (véase Fig 2).

2.2.1.1. Sistema general ntr

El primer nivel de regulación de la fijación es el sistema centralizado ntr, general de las Enterobacterias,

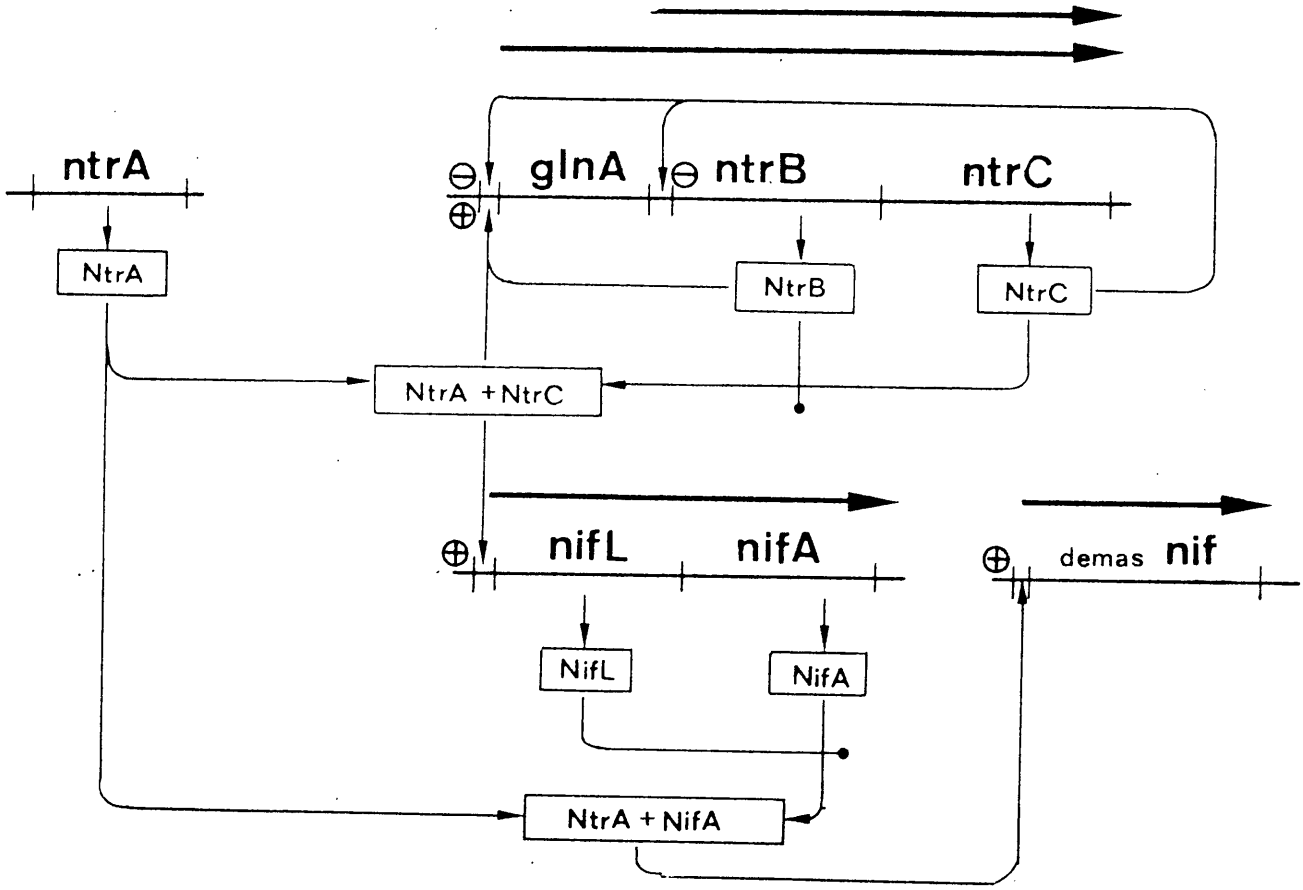


Fig 2: Regulación de los genes nif a través del sistema general y del sistema específico.

encargado de controlar a los operones hut (utilización de la histidina), put (utilización de la prolina), aut (utilización de la arginina), y a los loci reguladores del transporte periplásmico de la histidina (dhu) y de la arginina (argTr) (véase Magasanik, 1982). El sistema ntr consta de tres genes: ntrA, ntrB y ntrC. Los dos últimos forman un operón, transcribible desde un débil promotor constitutivo P_2 ntrBC (Alvarez-Morales et al., 1984), y a su vez están ligados estrechamente al gen glnA, constituyendo el operón complejo P_1glnA P_2 ntrBC (Pahel et al., 1982; Krajewska-Grynkiewicz y Kustu, 1984). El promotor de glnA (denominado, en principio, "P_1") es , en realidad, una intrincada región regulatoria donde se han localizado dos promotores en tándem: uno distal, que da origen al transcrito "RNA2" (o t_1 en E.coli) y otro proximal, responsable de "RNA1" (equivalente a t_2) (Dixon, 1984b; Reizer y Magasanik, 1985). El tercer elemento, el gen ntrA, no está ligado a los anteriores (Leonardo y Goldberg, 1980; DeBruijn y Ausubel, 1983). Los circuitos reguladores establecidos por estos genes son relativamente complicados y aún no están suficientemente esclarecidos, aunque se ha adelantado mucho en los últimos cinco años (Dixon, 1984a; Dixon et al., 1984,para una visión de conjunto, a contrastar con las referencias de 1985 que se citan en los siguientes párrafos).

La expresión del gen ntrA parece que es constitutiva (DeBruijn y Ausubel, 1983). Su producto es un polipéptido de 75-85 KDal (Magasanik, 1982), imprescindible para la expresión de los genes activables por el sistema general ntr y por el específico nif (Leonardo y Goldberg, 1980; Merrick, 1983; Ow y Ausubel, 1983).

El producto de ntrC es un polipéptido de 54 KDal que forma dímeros (Reitzer y Magasanik, 1983) que tienen la capacidad de unirse a determinadas secuencias conservadas

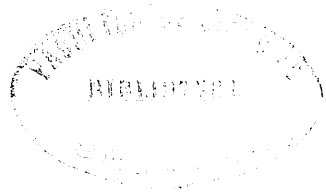
de las regiones promotoras de los genes controlados por el sistema general (Ueno-Nishio et al., 1984; Reitzer y Magasanik, 1985). Es una proteína reguladora bifuncional, con un comportamiento complejo:

- Por sí sola, en ausencia de producto de ntrB, NtrC es capaz de reprimir la transcripción desde el promotor P_2 de ntrBC, independientemente de la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Reitzer y Magasanik, 1983; Ueno-Nishio et al., 1983; Alvarez-Morales et al., 1984). Igualmente, el producto de ntrC ejerce acción negativa sobre el promotor distal ("RNA2") de glnA, pero mientras Reitzer y Magasanik (1985) indican que, en E.coli esta represión es independiente de NtrB, el grupo de la universidad de Brighton ha rectificado un informe previo (Alvarez-Morales et al., 1984) y asegura que, en K.pneumoniae se necesita el concurso adicional de NtrB (Dixon, 1984b). La proteína NtrC no puede, en cambio, ejercer acción represora sobre el promotor de nifLA (ni siquiera con NtrB) (Alvarez-Morales et al., 1984).

- Aparte de su potencialidad como represor, NtrC posee también funciones activadoras sobre otros promotores, las cuales se ejercen cuando la bacteria se encuentra en medios limitados en nitrógeno, y para las que precisa que el el producto de ntrA sea operativo (Merrick, 1983; Ow y Ausubel, 1983). La activación de los operones nifLA y hutUH requiere sólo la intervención de ntrC y ntrA (Espín et al.,1982; Drummond et al., 1983; Ow y Ausubel, 1983), mientras que la del promotor proximal ("RNA1") de glnA necesita adicionalmente la colaboración de ntrB (Alvarez-Morales et al., 1984).

La proteína codificada por ntrB no ejerce ninguna acción regulatoria directa por sí misma, sino que parece ser un modulador de la actividad de NtrC, representando un elemento del sistema general ntr que responde a señales metabólicas que informan de los niveles intracelulares de amonio.

Se ha sugerido que NtrB es capaz de recibir la información sobre la situación celular respecto del nitrógeno (McFarland et al., 1981; MacNeil et al., 1982 ; Backman et al., 1983); ésta le sería suministrada de alguna forma por los productos de dos genes (glnB y glnD) que forman parte del mecanismo de modificación de la actividad catalítica de la glutamina sintetasa por adenilación-desadenilación, en función de la relación entre α-cetoglutarato y glutamina (Chen et al., 1982; Backman et al., 1983; Krajewska-Grynkiewicz y Kustu, 1983). A su vez, NtrB modula rápidamente la función activadora de NtrC (Alvarez-Morales et al., 1984). Según Reitzer y Magasanik (1985), en medio limitado en nitrógeno, NtrB se encargaría de que NtrC adquiriera un estado capaz de estimular una intensa transcripción desde el promotor proximal ("RNA1") de glnA. En estas condiciones se producen grandes cantidades de glutamina sintetasa y cantidades menores de los productos de ntrB y ntrC (La razón de que se sintetice menos NtrB y NtrC que GS, a pesar de que en esta situación se expresan desde el mismo promotor parece adjudicable en parte a que muchas ondas de transcripción acaban en la región intercistrónica entre glnA y ntrB, donde se localiza una secuencia de terminación transcripcional independiente de rho: Ueno-Nishio et al., 1984; Reitzer y Magasanik, 1985). Si en el medio entra una fuente rica de nitrógeno, NtrB detecta rápidamente la nueva situación metabólica y provoca la inutilización de las facultades activadoras de NtrC, de forma que ésta ya no puede estimular la transcripción desde el promotor proximal de glnA. Es decir, se trata de un mecanismo de anti-activación y no de una verdadera represión (Dixon et al., 1984b; Reitzer y Magasanik, 1985). Al parecer (al menos en E.coli), aparte de la interconversión rápida entre los dos estados de NtrC, existe la posibilidad de interconversión lenta, en ausencia de NtrB (Reitzer y Magasanik, 1985).



El mecanismo por el cual se inhibe la transcripción de nifLA en presencia de niveles altos de amonio en el medio parece que depende igualmente de una anti-activación de NtrC (Alvarez-Morales et al., 1984) y, en cualquier caso es un proceso muy rápido, no explicable por cese de la síntesis de los activadores de este operón y posterior dilución de los mismos (Cannon et al., 1985).

2.2.1.2. Regulación específica nif

El segundo nivel de regulación de los genes nif es específico de ellos, y se debe a la acción de los productos del operón nifLA, cuyo promotor es, como se ha dicho, la diana de la activación general por NtrA+NtrC (Dixon et al., 1980; Drummond et al., 1983). El producto de nifA es responsable de la activación transcripcional del resto de los operones nif (Roberts et al., 1978; Dixon et al., 1980; Buchanan-Wollaston et al., 1981a) y para ello es imprescindible que el gen ntrA sea funcional (Merrick, 1983; Ow y Ausubel, 1983) y que en el medio existan niveles muy bajos o nulos de nitrógeno combinado y oxígeno. Por consiguiente la expresión de los genes nif se puede considerar como promovida por un mecanismo en cascada que permite producir elevados niveles de las proteínas requeridas para la fijación , especialmente la nitrogenasa:

- el operón glnA ntrBC se expresa intensamente desde el promotor proximal de glnA (activado por NtrC+NtrB, con participación de NtrA); los productos de ntrA y ntrC intervienen en la activación de nifLA; si el nivel de fuente de nitrógeno es suficientemente bajo, el producto de nifA activa, junto con NtrA, la transcripción de todos los operones nif, sin la participación de NtrC. Los máximos de transcripción de nif coinciden la depresión en el perfil de síntesis de

ARN total, característica de la respuesta estricta bacteriana. Tras estos máximos, la producción de transcritos nif decrece acusadamente mientras va aumentando la actividad nitrogenasa (Cannon et al., 1985).

Según Dixon (1984a) el mecanismo de regulación en cascada puede haberse desarrollado para permitir una considerable amplificación de la expresión de los polipéptidos nif (sobre todo los de la nitrogenasa) sin tener que recurrir a una utilización excesiva de NtrC, proteína que se "reserva" para la activación de los operones bajo control general.

El papel de NifA en el circuito específico es semejante al de NtrC en el general: los productos de ambos genes requieren NtrA para sus funciones activadoras y poseen propiedades bioquímicas similares (Merrick, 1983). Además, NifA puede sustituir a NtrC en su papel activador: en una serie de experimentos con mutantes ntrC en los que nifA se expresaba desde promotores constitutivos se comprobó que NifA, aparte de activar a los demás operones nif podía hacer lo propio con glnA y otros genes que normalmente son activados por el circuito general (Merrick, 1983; Ow y Ausubel, 1983), así como intervenir positivamente sobre la transcripción de su propio operón nifLA (Drummond et al., 1983; Ow y Ausubel, 1983). El reciente y detallado informe de Cannon et al.(1985) apoya más directamente la visión de que, en condiciones fisiológicas, nifLA está autorregulado positivamente por NifA, al demostrar que dicho operón se transcribe en dos oleadas distintas durante la desrepresión: la primera exhibe un máximo una hora antes que el resto de operones nif, y correspondería a la activación general por NtrC, mientras que la segunda coincide en el tiempo con aquellos y sería el reflejo de la auto-activación específica. Sin embargo, a diferencia de NtrC, NtrA no ejerce ninguna acción represora:

concretamente, aunque puede unirse al promotor proximal de glnA para estimular el inicio de transcripción, no puede reprimir simultáneamente al promotor distal como hace NtrC. Esto podría tener algún significado fisiológico relacionado con la optimización de la concentración de GS a la hora de una asimilación eficiente del amonio procedente de la fijación (Ow y Ausubel, 1983; Dixon, 1984b). Por otro lado NtrC no puede participar en la activación específica de los operones nif, a excepción de nifLA (Sundaresan et al., 1983).

La regulación negativa de la fijación por presencia de nitrógeno combinado parece seguir dos vías alternativas, según el tipo de fuente (Collins y Brill, 1985):

-a) en la regulación por amonio hay que distinguir el control ejercido por cada uno de los dos sistemas imbricados: por un lado, cuando en el medio existen niveles medios de amonio, alguna función gln (relacionada con el metabolismo de la glutamina) modifica a la proteína NifL de modo que ésta induce la desconexión de la transcripción de todos los operones nif, menos nifLA, por anti-activación de NifA (Dixon et al.,1984). Si los niveles de amonio suben más la transcripción de nifLA cesa también, por anti-activación de NtrC, probablemente mediada por NtrB (Alvarez-Morales et al., 1984).

-b) la presencia en el medio de ciertos aminoácidos, como glutamina o serina, provoca la capacitación anti-activadora de NifL sobre NifA, pero por algún mecanismo que no depende de las funciones gln, mientras que el sistema ntr no responde a estos aminoácidos, y por lo tanto no reprime la transcripción de nifLA.

De este modo la fijación de nitrógeno, aparte del vínculo con el sistema centralizado ntr, establecido a través del operón nifLA, y que reacciona frente a niveles

"altos" de amonio, es regulada de forma independiente y fina por un circuito propio, ante niveles "medios" de amonio y ante determinados aminoácidos, circunstancias incapaces de influir sobre el sistema general. Todo ello, junto a la sensibilidad del sistema regulador particular nif frente a oxígeno, permite que K.pneumoniae se adapte rápidamente a una amplia gama de condiciones ambientales, evitando despilfarros metabólicos.

El producto de nifL es asimismo el responsable de la "represión por oxígeno" de la fijación de dinitrógeno (Hill et al., 1981; Merrick et al., 1982). En condiciones de desrepresión el producto de nifL se sintetiza, pero queda en un estado inactivo. La introducción de incluso pequeñas tensiones de oxígeno en un cultivo fijador desconecta rápidamente la transcripción de los operones nif, menos nifLA, aunque no elimina el patrón de síntesis de ARN total disminuida, propia de la respuesta estricta, que se produjo al comenzar la desrepresión de nif; al restablecer la anaerobiosis en este cultivo se recupera rápidamente la expresión de los genes nif. Todo esto ha sido interpretado por Cannon et al. (1985) como un indicio de que, durante la "represión" por oxígeno, el cultivo permanece en un estado fisiológico especial, predispuesto para la expresión inmediata de nif en cuanto las condiciones de gases disueltos se hagan favorables de nuevo.

2.2.1.3. Aspectos moleculares

Está en curso la caracterización molecular detallada de los circuitos reguladores que se acaba de explicar (Ausubel, 1984; Dixon, 1984a,b; Dixon et al., 1984). Uno de los rasgos que primero ha saltado a la vista es que la estructura primaria de los promotores de los genes activados

por ntr y/o por nif difiere notablemente de la normal en Enterobacterias: carecen de las típicas secuencias conservadas en -35 y -15 ("módulo Pribnow"). Los promotores nif sometidos exclusivamente a activación por NifA poseen una secuencia consenso distintiva:

```
-27  -24                -15      -11
 C T G G C A C N N N N N T T G C A
```

donde las bases subrayadas están conservadas de manera absoluta en todos los promotores. La observación de que los promotores de genes normalmente no regulados por NifA (nifL, proximal de glnA, dhuA, argTr) se diferencian de esta secuencia solamente en que las bases en -26 y/o -27 son distintas, ha llevado a Beynon et al. (1983) a proponer que es precisamente el tetranucleótido CTGG el que proporciona la especificidad de sitio activable por NifA. La secuencia TTGCA parece esencial para la función de promotor activable por nif o ntr, (quizá equivalente a un "módulo Pribnow") como se desprende del comportamiento de mutantes afectados en ella (en nifL: Dixon et al., 1984 y en nifH: Brown y Ausubel, 1984).

El producto de ntrA, requerido en todas las activaciones transcripcionales, puede que sea una proteína sigma específica que confiera a la ARN-polimerasa la capacidad de reconocer estos promotores. Ahora bien, los promotores activables de ambos circuitos precisan de proteínas activadoras adicionales (NtrC sola o con NtrB, o NifA).

El comportamiento de los activadores, represores y anti-activadores, descrito en páginas anteriores, ha llevado a postular una clasificación de los diversos promotores implicados (Alvarez-Morales et al., 1984; Dixon, 1984a,b; Dixon et al., 1984), que aquí se intenta actualizar a la vista de los nuevos datos:

a) promotores controlados positivamente, como p. ej., los diversos nif. Sólo poseerían sitios de reconocimiento para la ARN-polimerasa modificada por NtrA; requieren proteínas activadoras para que se produzca el nivel desreprimido de transcripción: NtrC para nifLA y NifA para los demás nif. La "represión" se verifica por anti-activación mediada respectivamente por NtrB (que responde a amonio) y por NifL (que responde a fuentes de nitrógeno y a oxígeno). Este tipo no contendría secuencias reconocibles para la forma represora de NtrC.

b) promotores controlados exclusivamente de forma negativa, como p. ej., el P_2 de ntrBC. Tendrían un nivel basal (no regulado) de transcripción relativamente bajo, lo que indica que pueden ser reconocidos por la holoenzima normal de la ARN-polimerasa. Se postula que contienen un sitio reconocible por la forma represora de NtrC. La represión es (al menos parcialmente) indiferente a la situación celular en relación al nitrógeno. No contendrían secuencias para su activación.

c) promotores controlados de forma positiva y negativa, como el "P_1" de glnA. Se anticipó que albergarían dos sitios: uno similar a P_2 de ntrBC , que permite bajos niveles de transcripción, reprimibles por NtrC (junto con NtrB, si se sigue el trabajo de Dixon, 1984b), y otro, cuya activación requiere la ARN-polimerasa modificada por NtrA y la concurrencia de NtrC y NtrB. Según Reitzer y Magasanik (1985), la desconexión de este último promotor se produciría por anti-activación de NtrC mediadada por NtrB, en presencia de amonio. Como se ha visto, la previsión de que "P_1" es un promotor doble fue rápidamente demostrada en K.pneumoniae (Dixon, 1984b) y en E. coli (Reitzer y Magasanik, 1985).

Los promotores sujetos a control negativo por NtrC (o NtrC+NtrB) tienen la siguiente secuencia conservada:

T G C A C T A N N N T G G T G C A A

en la que aparecen zonas de simetría binaria que corresponden bastante bien a las secuencias encontradas en los sitios cromosómicos de unión de represor (Dixon, 1984b; Reizer y Magasanik, 1985). En experimentos de protección *in vitro* de este tipo de promotores contra DNasa-I se ha demostrado la alta afinidad de NtrC por esta zona canónica (Ueno-Nishio et al., 1984; Reitzer y Magasanik, 1985). Es interesante la observación de que esta secuencia aparece en el promotor distal (RNA1) de *glnA* de *K.pneumoniae* solapándose con un perfecto módulo de Pribnow, lo que probablemente debe tener alguna significación en la regulación (Dixon, 1984b).

Uno de los puntos aún confusos es el papel que juega el promotor distal de *glnA* en los circuitos reguladores, y su posible relación con el promotor proximal, que es de donde se inicia la transcripción intensa en fuente pobre de nitrógeno. Dixon (1984b), a partir de sus estudios en *K.pneumoniae* sugiere que las secuencias distales son importantes para la óptima activación del proximal por NtrC+ NtrB, al bloquear estos productos a la ARN-polimerasa el acceso al promotor distal ineficiente. El producto de *nifA* puede activar el promotor proximal de *glnA*, pero a diferencia de NtrC, no es capaz de interaccionar negativamente con las secuencias distales. En cambio, Reitzer y Magasanik (1985) han demostrado que en *E.coli* el promotor distal se encuentra reprimido por catabolito en medios con glucosa, mientras que en medios limitados en fuente de carbono o en caldo sin glucosa se expresa eficientemente (mientras se desconecta el promotor proximal en presencia de amonio).

2.2.2. Control por temperatura

K.pneumoniae no puede fijar nitrógeno a temperaturas mayores de 35ºC (Hennecke y Shanmugan, 1979). Las elevadas temperaturas producen una "represión" de la transcripción de todos los operones nif, menos nifLA (Zhu y Brill, 1981). La adjudicación de la responsabilidad de este fenómeno ha sido controvertida: mientras Merrick et al. (1982) sostenían que se debía a una inducción de la capacidad represora (anti-activadora) de NifL, Buchanan-Wollaston et al.(1981b) argumentaban una inactivación térmica del producto de nifA. Los datos de MacNeil y Brill (1978), de Brooks et al. (1984), y de Collins y Brill (1985) apoyan claramente la segunda alternativa, confirmando que la temperatura provoca una incapacitación reversible de NifA, sin que el gen nifL tenga aquí intervención alguna. Se desconoce si esto tiene alguna significación fisiológica de adaptación a determinadas condiciones ambientales más o menos transitorias.

2.2.3. Control por molibdeno

El tema de la supuesta implicación del Mo en la regulación genética de la fijación ha sido revisado por Shah et al., (1984), quienes favorecen la idea de que el Mo no tiene ningún papel directo. Dixon et al. (1980) y Kahn et al. (1982) habían sugerido previamente la existencia de un circuito de regulación autogénica en que el componente Kp1 maduro (o sea, con el FeMo-co insertado) haría que la transcripción del operón nifHDKY fuera óptima. Sin embargo, esto parece entrar en conflicto con la evidencia de que

los mutantes defectivos en la incorporación de Mo a la apo-Kp1 (nifB, nifE o nifN) pueden activar de manera normal la expresión de dicho operón (Shah et al., 1984).

2.2.4. Otras modalidades de regulación

Hasta hace pocos años no se ha comenzado a evaluar la posible influencia que pudiera jugar el estado metabólico general de la célula en el control de la síntesis de la nitrogenasa. Jensen y Kennedy (1982) han aportado pruebas de que el regulón nif puede verse afectado por la concentración intracelular de nucleótidos. Determinadas mutaciones en el operón his (de biosíntesis de la histidina) dan lugar a fenotipos Nif$^-$ totales o parciales que son explicables por algún mecanismo específico tendente a desconectar la síntesis de nitrogenasa en situaciones en que el nivel de ATP es insuficiente para sostener la actividad del complejo nitrogenasa.

Se ha investigado la relación del nucleótido hiperfosforilado ppGpp sobre la fijación del dinitrógeno (Riesenberg y Kari, 1981; Riesenberg et al., 1982). En Enterobacterias, este nucleótido es uno de los elementos más importantes de un sistema que reorganiza todo el metabolismo celular durante la respuesta estricta (Gallant, 1979). Así, por ejemplo, el cambio desde un medio rico a otro pobre en nitrógeno provoca un acentuado reajuste de procesos celulares: disminuye la síntesis de ARN total, de lípidos, de carbohidratos, aumenta la proteolisis, etc. Estos fenómenos van precedidos de un aumento del nivel de ppGpp, que es sintetizado a partir de GDP por transferencia de pirofosfato desde ATP, en una reacción catalizada por el producto del

gen relA. Los mutantes relA ("relajados") son incapaces de dar la respuesta estricta y no acumulan ppGpp en grandes cantidades. (Para revisión reciente, Lámond y Travers, 1985) .

En K.pneumoniae el aumento del ppGpp en condiciones de bajo nivel de nitrógeno parece tener importancia en la desrepresión de los genes nif. Se han aislado mutantes relA que son simultánemente Nif^-. La respuesta estricta y la fijación de dinitrógeno se recuperan simultáneamente al serles transferidos el alelo silvestre $relA^+$. Descontando el efecto general por el que el ppGpp impide durante la respuesta estricta el agotamiento de la reserva de ATP (lo cual, evidentemente, favorece el mantenimiento de la actividad nitrogenasa), el acúmulo de este nucleósido hiperfosforilado estimula de 5 a 10 veces la síntesis de la nitrogenasa (Riesenberg y Kari 1981). Sin embargo, se desconoce si esta estimulación se ejerce a nivel de transcripción o de traducción, y si se produce de manera directa sobre el sistema nif, o a través del circuito general ntr.

3. PERSPECTIVAS DE MEJORA EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE DINITRÓGENO

Como ya se apuntó, en los ecosistemas silvestres en equilibrio el nitrógeno no suele ser el nutriente limitante, ya que la fijación biológica de dinitrógeno suministra las cantidades adecuadas de este elemento para mantener su fertilidad. Los sistemas agrícolas, sobre todo los cultivos intensivos modernos, introducen desequilibrios en amplias zonas de la Biosfera, al tiempo que la productividad de los

suelos agrícolas depende en buena medida del aporte de nitrógeno en forma de fertilizantes.

Es ya un lugar común hablar de la gravedad del desafío que habrá de encarar la humanidad en las próximas décadas en cuanto a la producción de alimentos. El crecimiento demográfico parece desbordar las posibilidades de suministrar una dieta mínima a toda la población. Suponiendo incluso que el sistema distributivo de la riqueza entre las naciones alcanzara una mayor equidad y eficacia, las previsiones señalan las insuficiencias de la productividad agrícola global para un próximo futuro, acentuada además por desastres ecológicos que están suponiendo la desertización acelerada de enormes extensiones de tierra. La mayor parte de las tierras cultivables están ya aprovechadas (no siempre para tareas agrícolas), por lo que la roturación de suelos marginales no tendrá apenas relevancia. La destrucción en curso de las pluvisilvas tropicales, ecosistemas complejos donde reside la clave de muchos equilibrios de la Biosfera y que representan una reserva genética irremplazable para el futuro del planeta, no es seguro que represente un "adelanto" agronómico ni siquiera a medio plazo.

La dependencia de la agricultura contemporánea de la energía de los combustibles fósiles (en forma de fertilizantes, irrigación, tecnología de labranza y laboreo posterior a la cosecha) ha condicionado que, a partir de la reciente crisis energética, se tome más en serio el desafío de conseguir mejoras en la productividad de los sistemas agrícolas, disminuyendo los costes energéticos y las cargas ecológicas indeseables que puedan mermar la potencialidad de los suelos. En este contexto adquieren interés las expectativas abiertas por las nuevas biotecnologías y su aplicación al campo de la producción vegetal (véase, por ejemplo, Andersen et al.,

1980; Cocking et al., 1981; Swaminathan, 1982; Flawell y Mathias, 1984). A su vez, actualmente , los estudios enfocados a mejorar o ampliar la fijación biológica de dinitrógeno ocupan un lugar prioritario en las programaciones de investigación de numerosos países y organismos internacionales, dada la enorme trascendencia económica de este proceso natural en la fertilidad de los suelos, y sus repercusiones concretas en Agricultura (véase la perspectiva que dan Barton y Brill,1983).

En principio, podemos distinguir dos tipos de líneas de trabajo tendentes a aumentar la fijación por sistemas biológicos:

a) se podría aumentar la eficacia de los microorganismos y simbiosis fijadores, y/o extender el uso de aquellos que presentan mayores eficiencias.

b) se podría intentar la "creación" de nuevos sistemas fijadores recurriendo a las recientes biotecnologías.

Olivares (1982) ha comentado algunas de las posibilidades de mejora de la fijación ante la nueva etapa de técnicas basadas en la manipulación racional del material genético de los seres vivos.

3.1. MEJORA DE LOS SISTEMAS FIJADORES NATURALES

Aquí se plantea la alternativa de actuar sobre algunas de las fases del proceso que conduce a la fijación del dinitrógeno, mejorándolo directamente o interviniendo sobre las condiciones ecológicas, fisiológicas, etc., que afectan al microorganismo o asociación fijadora.

Así por ejemplo, está perfectamente clara la importancia esencial de la disponibilidad de niveles adecuados

de fuente de carbono para la fijación eficiente de los heterotrofos. En este sentido es significativa la estrecha influencia del aporte de fotosintato sobre la fijación por las bacterias que forman simbiosis con las raíces de plantas superiores. Por lo tanto uno de los temas que se investiga activamente en la actualidad es la relación fotosíntesis-fijación, especialmente en el sistema Rhizobium-leguminosa. Un punto de actuación prometedor sería incrementar la tasa fotosintética neta promoviendo un descenso en la fotorrespiración. Como no es factible crear atmósferas enriquecidas en CO_2 a gran escala, habría que conseguir la alteración de la afinidad de la ribulosabifosfato carboxilasa/oxidasa hacia el oxígeno. Sin embargo, parece que tal modificación no es posible de conseguir sin afectar simultáneamente la actividad carboxilasa del enzima. (Para una revisión del problema, véase Ogren, 1984).

Un factor limitante en muchos sistemas fijadores, incluida la simbiosis Rhizobium-leguminosa, es la ausencia de una eficaz actividad hidrogenasa unidireccional que recicle electrones y evite el desperdicio de energía que representa la liberación de hidrógeno molecular por la nitrogenasa. La estrategia en este caso sería introducir en estas bacterias algún tipo de genes hup (hidrogenasa unidireccional). El origen de estos genes podría estar en alguno de los plásmidos Hup caracterizados en razas de Pseudomonas y Alcaligenes metabolizadoras de hidrógeno (Lim et al., 1980) o en genes aislados de cepas de Rhizobium Hup^+. Los esfuerzos podrían ir en la línea de clonar genes hup en vectores estables en el diazotrofo Hup^- a mejorar, que posteriormente sería inoculado en los suelos de donde es nativo (lo cual evitaría o paliaría los arduos problemas que surgen cuando se pretende establecer un nuevo microorganismo en suelos que ya presentan comunidades nativas maduras y bien adaptadas). El tema

de la perspectivas de actuación sobre el metabolismo del hidrógeno en Rhizobium ha sido tratado recientemente por Brewin (1984).

Uno de los mayores escollos con los que se enfrenta la voluntad de modificar los factores que inciden sobre la fijación es la inviabilidad actual de "dirigir" las complejas redes ecológicas en el suelo. Estamos lejos de una "ingeniería de las comunidades edáficas", cuando son aún muchas las lagunas de conocimientos básicos. De antiguo se sabe, por ejemplo, que el haber seleccionado en laboratorio una cepa de Rhizobium con buenas propiedades simbióticas no es garantia de que tenga éxito en el campo de cultivo; de hecho, la cepa puede quedar desplazada por estirpes indígenas que compiten eficazmente ante las condiciones ecológicas naturales. En los suelos tropicales la situación está aún complicada por otros factores de pH, humedad, climatología, etc. que hacen muy difícil introducir estirpes foráneas de Rhizobium que no sean del heterogéneo (y poco conocido) grupo "cowpea". Por otro lado, existen muchas incógnitas en el sistema R.phaseoli-judía, de gran importancia económica en muchos países, y que por razones oscuras fija cantidades relativamente bajas de N en la mayor parte de las condiciones de campo.

A los factores ecológicos que afectan a Rhizobium en el suelo se suman los que lo hacen en el proceso de inducción de la simbiosis y establecimiento y mantenimiento de la fijación. En este sentido, en los últimos años hay una tendencia a dirigir mayor atención a la participación del macrosimbionte: aporte de fotosintato al nódulo, producción de leghemoglobina, senescencia del nódulo en función del estado fisiologico de la planta, etc. (Quispel et al., 1984). La influencia negativa del nitrógeno combinado del suelo sobre la infección, nodulación y efectividad fijadora es conocida des-

de hace tiempo, y se pretende actuar sobre estos niveles para que se amortigüen los efectos potencialmente adversos a la tasa de fijación final.

Continuando con los sistemas Rhizobium-leguminosa, una prometedora línea de investigación se ha abierto recientemente con la caracterización de la simbiosis que se forma en ciertas plantas tropicales de suelos encharcados: en los géneros Sesbania y Aeschynomene se producen nódulos fijadores tanto en la raíz como en el tallo, en gran número. El nitrógeno fijado alcanza fácilmente los 200 kg Ha^{-1} en cada cosecha. Una peculiaridad de la fijación caulinar en la simbiosis de Sesbania es que no se reprime por nitrógeno combinado: la planta puede absorber amonio o nitrato por sus raíces y simultánemente puede ser efectiva la fijación por los nódulos del tallo. Una aplicación inmediata de estos estudios será la promoción inmediata de este tipo de plantas como "abono verde", por cultivo intercalar en explotaciones agrarias y forestales; así por ejemplo ya han mostrado su superioridad sobre los fertilizantes químicos en el aporte de nitrógeno a los arrozales. Un objetivo a más largo plazo, pero no descabellado, es transferir los determinantes genéticos de la nodulación caulinar a otras leguminosas, lo que podría hacerlas menos sensibles a los niveles de nitrógeno del suelo (Legocki y Szalay, 1984).

El conocimiento que se tiene de la genética de cereales, y los métodos de hibridación clásicos, usados con éxito en seleccionar y transmitir multitud de caracteres, tendrían que facilitar conseguir variedades de plantas capaces de interaccionar más eficazmente con sus respectivos microsimbiontes rizocenósicos (de los cuales Azospirillum ha sido uno de los más estudiados en el último decenio).

En general, la mejora de los sistemas asociativos diazotróficos vendrá de la mano de dos tipos de investigaciones:

a) estudios básicos y básico-aplicados destinados a profundizar la comprensión de la asociación, caracterización de las bacterias implicadas, factores fisiológicos, genéticos, ecológicos, las interacciones planta-bacteria, etc. (como ejemplo, véanse los estudios sobre Enterobacterias fijadoras asociadas a raíces de plantas: Vose, 1983; Broughton, et al., 1984).

b) estudios más empíricos, destinados sobre todo a mejoras de la capacidad del macrosimbionte de establecer la asociación y promover la fijación.

3.2. CREACION DE NUEVOS SISTEMAS FIJADORES

3.2.1. Nuevos procariotas fijadores.

Desde el aislamiento inicial de plásmidos conjugativos portadores del regulón nif de K.pneumoniae (Cannon et al., 1974; Dixon et al., 1976) se ha logrado transferir la información genética de la fijación de dinitrógeno a diferentes bacterias no fijadoras en la Naturaleza, en algunas de las cuales se ha expresado funcionalmente: en E.coli (Dixon y Postgate, 1972; Dixon et al., 1976), en Salmonella typhimurium (Postgate y Krishnapillai, 1977), en K.aerogenes (Dunican y Tierney, 1974), en Erwinia herbicola y en Serratia marcescens (Krishnapillai y Postgate, 1980).

Hoy es técnicamente posible lograr derivados fijadores de ciertas bacterias del suelo, pero la aplicación práctica queda limitada por las mismas razones que convierten en irrelevante la fijación por los heterotrofos libres

naturales: la fijación impone unos requerimientos energéticos que no pueden ser satisfechos a partir de las bajas concentraciones de fuente de carbono orgánico del suelo. Una posibilidad más atractiva sería manipular bacterias que de por sí establecen relaciones más o menos estrechas con raíces de plantas, beneficiándose de sus exudados. En este caso el microorganismo debería ser capaz de exportar al menos parte del nitrógeno fijado, de modo que la planta se beneficiara de modo inmediato de él. La comprensión de los mecanismos por los cuales Rhizobium exporta todo el amonio procedente de la fijación (Dilworth y Glenn, 1984; Glenn y Dilworth,1985) podría hacer factible este objetivo en un futuro.

Una alternativa que apenas se ha considerado hasta ahora es la de ampliar el rango y la eficacia de la fijación por bacterias del rumen; en este peculiar ecosistema anaerobio no hay limitación de fuente carbonada, y los beneficios de una alta tasa de fijación redundarían directamente en proteína animal.

3.2.2. Manipulaciones con plantas

La madurez en que van entrando las técnicas de manipulación in vitro de ADN ("Ingeniería Genética") ha dado un impulso a los deseos de modificar racionalmente el genomio de los seres vivos, introduciendo por clonación molecular genes que se desea expresar en organismos a veces muy alejados en la escala evolutiva. En cuanto a la fijación de nitrógeno, el "sueño dorado" sería llegar a realizar el paso que la Naturaleza no ha dado: hacer que organismos eucarióticos, idealmente plantas de cultivo, alberguen genes de fijación funcionales y bien regulados, de modo que se

logren vegetales menos dependientes de abonos nitrogenados, con los esperables beneficios económicos que se derivarían. Evidentemente se trata de un deseo de muy difícil (si no imposible) plasmación, al que sin embargo, de una forma u otra irá encaminada buena parte de la investigación de un próximo futuro dentro de las nuevos enfoques de la mejora vegetal.

A continuación se comentan algunas perspectivas abiertas, o con posibilidad de serlo en plazos más o menos cortos. Como es lógico, se trata de un capítulo en buena parte especulativo, pero nos encontramos en un terreno que demanda buenas dosis de imaginación y de osadía visionaria.

3.2.2.1. Técnicas de manipulación de protoplastos

El desarrollo de métodos para obtener protoplastos o esferoplastos de células vegetales, y de inducir fusión entre protoplastos de razas o especies diferentes por tratamiento con polietilénglicol (PEG) permite, en principio, superar las restricciones que los mecanismos sexuales imponen al intercambio genético entre organismos separados evolutivamente. En algunos casos en que están implicadas especies próximas, la fusión da lugar a un heterocarionte que puede eventualmente formar híbridos nucleares estables. Si tras la regeneración de la pared celular las células del cultivo conservan su totipotencia, la organogénesis subsiguiente rinde plantas completas que son verdaderos híbridos somáticos.

La aplicación de esta técnica para lograr nuevos sistemas fijadores podría ir en la línea de conseguir

híbridos somáticos de plantas no leguminosas que pudieran establecer simbiosis con Rhizobium. Los experimentos de fusión entre protoplastos de leguminosas y otros tipos de plantas (revisados por Davey y Cocking, 1980) han logrado, hasta ahora, la formación de heterocariontes y, raramente, la fusión de núcleos, pero no se ha podido regenerar renuevos. De hecho, no han dado resultado los intentos de organogénesis a partir de cultivos tisulares de leguminosas (parece que la potencialidad embriogénica de estos cultivos es bastante limitada). Sin embargo, ello no tiene por qué constituir una dificultad insalvable para la hibridación somática con no leguminosas, ya que escogiendo plantas con alto potencial regenerador se podrían originar híbridos que retuvieran algunos caracteres de la leguminosa, tal como la capacidad de asociación simbiótica con Rhizobium. Algo similar se podría intentar con otras plantas que en la naturaleza forman simbiosis fijadoras eficaces, como las que ocurren en los nódulos de alisos y otras leñosas con el actinomiceto Frankia.

En los experimentos iniciales de fusión de protoplastos por PEG se observó que se originaba un encogimiento rápido y generalizado de las células, como consecuencia de la inducción de la plasmolisis (Knutton y Pasternak, 1979) Esto llevó a considerar la posibilidad de usar este agente para provocar la captación de pequeñas entidades biológicas (orgánulos, virus o bacterias) por los protoplastos. Los resultados han sido gratificantes en muchos casos de transfusión de mitocondrias, cloroplastos y virus de unas células a otras (Ferenczy, 1981).

Los primeros estudios de captación de bacterias por protoplastos vegetales mostraban que las células bacterianas se adherían primero a la superficie del plasmalema del protoplasto, originándose invaginaciones en la zona

de contacto, al producirse la plasmolisis. Posteriormente estas invaginaciones se cerraban por coalescencia del plasmalema en el extremo abierto, de modo que la bacteria entraba al citoplasma rodeada de membrana (Davey y Power, 1975).

La idea de utilizar esta técnica para inducir la formación de "endosimbiosis artificiales" entre células vegetales (de las que se pudieran regenerar plantas enteras) y microorganismos fijadores era, pues, muy tentadora. Como "microsimbiontes" la elección inicial más lógica parecía la de aquellos que, en su estado natural, fijan dinitrógeno tolerando el oxígeno, principalmente Cianobacterias y Azotobacter. Las primeras presentan, además, el atractivo de su capacidad fotosintética, su probable relación filogenética con los cloroplastos, y su participación natural en ciertos organismos que se pueden considerar como auténticas endosimbiosis (como en Cyanophora paradoxa).

Burgoon y Bottino (1976) introdujeron Gloeothece, cianobacteria de vida libre, en protoplastos de maíz y tabaco, aunque no informaron sobre actividad nitrogenasa del sistema, ni dieron detalles ultraestructurales sobre el estado del microorganismo dentro de las células vegetales.

Giles y Whitehead (1975, 1976, 1977) informaron de lo que podría ser la primera (y hasta ahora única) endosimbiosis artificial diazotrófica. Indujeron con PEG el englobamiento de Azotobacter vinelandii por protoplastos del hongo Rhizopogon, formador de ectomicorrizas en ciertas gimnospermas. Lograron la selección de colonias del hongo que crecían en medios exentos de nitrógeno. El ensayo de reducción de acetileno daba picos de actividad nitrogenasa que fueron atenuándose en sucesivos subcultivos, pero se detectaba aún

tras varios meses. Las observaciones a microscopía electrónica mostraban hifas que albergaban unas estructuras semejantes a formas L bacterianas, o a mitocondrias modificadas, rodeadas de membrana citoplásmica del hongo. Se puso de manifiesto la presencia de gránulos de poli-ß-hidroxibutírico, típico producto de quistes de Azotobacter. Es evidente el interés de profundizar en estos experimentos, e intentar reproducirlos usando protoplastos de otros orígenes, incluyendo de plantas superiores.

Yamada y Sakaguchi (1981) introdujeron células de A.vinelandii y de la cianobacteria Anacystis nidulans en protoplastos de la levadura Saccharomyces cerevisiae. Muchas de las células bacterianas (que aparecían dentro de vesículas o vacuolas) mostraban signos de estar en trance de desintegración, quizá debida a heterofagia de la levadura, promovida por adquisición de la función lisosómica. No se pudo detectar actividad nitrogenasa y, en general las asociaciones eran bastante inestables, desapareciendo al poco tiempo.

Para que el método de la capatación de bacterias por parte de protoplastos vegetales diera origen a asociaciones fijadoras estables, se pueden imaginar dos posibles destinos del microsimbionte diazotrófico: por un lado, si la bacteria conservara más o menos su integridad, debería dividirse de manera más o menos acompasada con las células del hospedador, debería aprovechar nutrientes de éste y no suponer una excesiva carga ni fuente de daños; por otro lado, podría ocurrir que la integridad del microorganismo no fuera necesaria, sufriendo degradación y/ó modificación parcial, y adaptándose al nuevo nicho celular. En este sentido sería interesante estudiar las endosimbiosis naturales en cuanto al estado y relación de la "bacteria" respecto

del hospedador. Ejemplos de tales sistemas son los xenosomas de tipo bacteriano presentes en el ciliado Parauronema (Soldo et al., 1983) y los orgánulos de tipo bacteriano descubiertos en hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (Macdonald et al., 1982).

3.2.2.2. Técnicas de manipulación in vitro de ADN

Con la llegada de la era de la llamada "Ingeniería Genética" las posibilidades de alterar el material hereditario de los seres vivos se ha ampliado extraordinariamente. Como era de imaginar, uno de los objetivos más ansiosamente buscados en cuanto a aplicaciones agrícolas, es el de conseguir introducir de manera estable y funcional la información necesaria para que las plantas de mayor interés económico (principalmente los cereales), puedan fijar de la atmósfera el dinitrógeno necesario para poder cubrir sus necesidades de este elemento.

Para ello se requiere en primer lugar vectores genéticos eficientes que permitan la incorporación de ADN exógeno al vegetal. Además, se han de eliminar las barreras que se puedan opener a la expresión de los genes nif en un entorno celular eucariótico, así como los problemas derivados de la necesidad de protección de la nitrogenasa respecto del oxígeno.

En la naturaleza existe un sistema por el que se transfiere ADN desde una bacteria a plantas superiores: se trata de la integración de una porción del plásmido Ti de Agrobacterium tumefaciens en el genomio de células vegetales. Esta transferencia forma parte de un interesante fenómeno de "colonización genética": la bacteria tiene la capaci-

dad de infectar la mayor parte de las dicotiledóneas y algunas gimnospermas a partir de heridas a nivel de la corona de la raíz. Una parte del plásmido Ti, denominada región T, puede entrar a las células (al parecer en forma de círculos) y finalmente se integra en variadas localizaciones cromosómicas; en el estado integrado (donde se le denomina ADN-T) varios de sus genes se expresan funcionalmente: uno de ellos codifica una opina-sintasa, responsable de la producción de un derivado especial de arginina (octopina, nopalina o agrocinopina, según la variante de plásmido Ti) que es aprovechado por Agrobacterium como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Otros genes del ADN-T son responsables de la síntesis de fitohormonas (auxinas y citoquininas) a niveles tales que alteran el equilibrio endógeno de estos compuestos, lo que provoca un crecimiento neoplásico de células indiferenciadas, que configuran el característico tumor de agalla ("crown-gall") (Hooykaas y Schilperoort, 1985). Las funciones de transferencia de la región T deben de reconocer las repeticiones imperfectas de 25 pares de bases (pb) de sus extremos, y son proporcionadas en trans por los genes vir, situados en zonas de Ti distintas del ADN-T. (Nester et al., 1984 para una revisión sobre fisiología).

Así pues, el tumor en agalla constituye un nicho ecológico especial para Agrobacterium, inducido por la expresión en las células del tumor de unos genes bacterianos incorporados a éstas. Las opinas producidas por el tumor son metabolizables sólo por Agrobacterium. No se requiere la presencia de la bacteria una vez producida la transferencia del ADN, para mantener el estado tumoral. (Véanse las revisiones de Bevan y Chilton, 1982, y de Zambryski et al., 1983a).

El desentrañamiento de este extraordinario caso de "ingeniería genética natural" ha conducido,como era lógico, a su aprovechamiento como sistema de introducción de genes heterólogos en plantas. En este sentido, dos avances experimentales han sido de especial importancia: por un lado las técnicas de regeneración de plantas completas a partir de callos procedentes de células transformadas con ADN-T, y por otro la creación de versiones "desarmadas" de dicho ADN-T, que reteniendo la capacidad de insertarse en el genomio vegetal, han perdido buena parte de su potencialidad tumorigénica (Barton et al., 1983; de Greve et al., 1981). Los plásmidos "desarmados" inducen tumores atenuados, de los que proliferan renuevos, a partir de los cuales se pueden regenerar plantas enterar normales, que conservan en todas sus células copias del ADN introducido. La progenie sexual de estas plantas hereda de forma mendeliana el ADN-T (Barton et al., 1983).

Basándose en esta línea de trabajos se ha logrado la expresión funcional de genes bacterianos de resistencia a drogas en células vegetales, poniendo dichos genes bajo control de promotores del mismo ADN-T (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983; Herrera-Estrella et al.,1983a), y la creación de una amplia gama de vectores y sistemas de transferencia (Shaw et al., 1983; Schröder et al., 1983; Zambryski et al., 1983b). Entre los últimos sistemas perfeccionados (que han eliminado el problema del manejo in vitro derivado del gran tamaño de Ti) cabe citar el de Herrera-Estrella et al.1983b,1984, que recurre a la recombinación homóloga en Agrobacterium entre pequeños plásmidos conjugativos de amplio rango de hospedadores, portadores de la región T manipulada, y el plásmido Ti residente, y el método de Bevan (1984), que emplea un juego doble de pequeños vectores co-residentes: un vector portador de los genes vir de

Ti y otro vector en que el gen a transferir ha sido clonado entre las repeticiones de 25 pb del ADN-T, reconocibles por las funciones de transferencia (vir) en trans.

Recientemente se ha venido a añadir una posibilidad más: la de transformar el genomio de los cloroplastos con el sistema de Agrobacterium. Tras co-cultivar protoplastos de células de mesófilo de tabaco con Agrobacterium portadores de plásmidos Ti que llevaban el gen cat del transposón Tn9, De Block et al. (1985) han regenerado plantas resistentes al cloramfenicol que exhiben herencia materna de dicho carácter, y que muestran ADN cloroplastidial al que se ha incorporado el gen cat.

Paszkowski et al. (1984) han informado del primer caso de transferencia y mantenimiento estable de ADN foráneo sin recurso al sistema Ti: el gen de resistenicia a kanamicina de Tn5, colocado entre las regiones de control 5' y 3' de un gen del virus del mosaico de la coliflor, fue clonado en un plásmido bacteriano de tipo pUC e introducido por transformación en protoplastos de tabaco, obteniéndose callos y renuevos de donde se regeneraron plantas resistentes al antibiótico, con herencia mendeliana del marcador.

Todo ello está suponiendo un aumento de las posibilidades de manipular los genomios de plantas superiores, lo que de hecho abre las puertas a nuevas y poderosas vías de mejora vegetal (Caplan et al., 1983).

Una de las limitaciones que, en principio parece tener el tipo de vectores basados en Ti es que Agrobacterium no infecta a monocotiledóneas, entre las que se encuentran algunas de las más importantes plantas de interés económico, y precisamente las más dependientes de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, Hooykaas-van Slogteren et al. (1984)

han demostrado que el ADN-T es capaz de entrar en células de al menos algunas monocotiledóneas, aunque no induce tumores.

La utilización de virus vegetales como vectores genéticos se encuentra con varios problemas (Hull, 1982). Por lo pronto, la mayoría son virus ARN, cuyo manejo es más complicado que cuando se trata de ADN. Los virus ADN se reducen a los pequeños geminivirus, con ADN de cadena sencilla, y a los caulimovirus, cuyo estrecho espectro de hospedadores no incluye a las monocotiledóneas, y cuyo genomio consiste en unas 8 kilobases de ADN de doble hebra. Sobre estos últimos se han centrado algunos esfuerzos destinados a convertirlos en vehículos genéticos vegetales (Honn et al., 1982), que han permitido propagar (Gronenborn et al., 1981) y expresar (Brisson et al., 1984) ADN bacteriano en vegetales. Sin embargo, quedan por resolver los problemas de la virulencia de los vectores virásicos, y el más arduo de superar los límites del ADN clonable, impuesto por el pequeño tamaño de estos virus y las pocas secuencias de ADN virásico que son dispensables.

Una alternativa que está comenzando a explorarse actualmente es la de usar elementos genéticos transponibles de plantas como vectores para introducir ADN extraño en vegetales (a este respecto, véase la perspectiva ofrecida por Howell, 1982). El conocimiento molecular que ya se ha adquirido de algunos de estos transposones, como el elemento mutador Mu del maíz (Freeling, 1984) permitirá probablemente lograr en plantas refinamientos parecidos a los conseguidos en Drosophila con el transposón P.

En general, se puede decir que la introducción de genes nif es un problema técnico que solo requiere buenos

sistemas vectores; como hemos visto, algunos de los existentes están ya en un elevado grado de perfección, por lo que este objetivo será factible en un cercano futuro.

Los verdaderos problemas comenzarían con las previsibles (e imprevisibles) barreras que se opondrían a la expresión funcional de dichos genes en el nuevo entorno celular. Los primeros obstáculos estarían representados por la sospechable incapacidad de la maquinaria eucariótica de reconocer las señales de transcripción, traducción y regulación de los genes nif. La estrategia sería eliminar los promotores propios de nif y fusionar las porciones codificadoras a señales genéticas reguladoras vegetales. Una dificultad adicional se deriva del hecho que las células eucarióticas no pueden leer mensajes policistrónicos; habría que construir grupos de genes quiméricos a partir de cada operón poligénico nif.

Supuesta la eliminación de estos problemas, quedarían los dependientes de las especiales características bioquímicas y fisiológicas de la fijación: protección de la nitrogenasa respecto del oxígeno, ensamblaje de los grupos metálicos, especialmente el FeMo-co, suministro de energía, cadenas transportadoras de electrones al complejo enzimático, estado energético de la membrana, poder reductor, etc. ¿Qué genes nif serían dispensables y funcionalmente sustituibles por otros de la planta? ¿Qué tipo de control genético y metabólico tendría la fijación?... Los interrogantes se multiplican, imponiendo escepticismo para el logro de un objetivo de esta envergadura. Puede que nunca se llegue a obtener el ansiado eucariota fijador, debido a barreras inherentes a la organización eucariótica. El hecho de que la evolución no haya conducido a tal tipo de organismos

(todo lo más a estrechas simbiosis entre procariotas fijadores y plantas superiores) puede que sea indicio de que en realidad nos encontramos ante un umbral infranqueable. El tema se complica aún más por las grandes lagunas que tenemos de la organización y expresión génicas en vegetales. Sin embargo, mientras se espera que la investigación básica en Biología Molecular de vegetales alcance el suficiente desarrollo, se puede recurrir a sistemas eucarióticos más sencillos y mejor conocidos para intentar la expresión de la fijación de dinitrógeno por técnicas de manipulaciones in vitro. En este sentido contamos con un hongo ascomiceto unicelular, la levadura Saccharomyces cerevisiae, de la que se dispone de una ingente cantidad de información a nivel bioquímico y genético, y en la que se han desarrollado sofisticadas técnicas de disección y manipulación genéticas, tanto in vivo como in vitro, que convierten a este organismo en el "Escherichia coli del reino Eucariota". Con vistas a la expresión de los genes nif presenta, además, la ventaja de que puede crecer en atmósferas anaerobias.

A continuación se hace una revisión de algunas de las técnicas de manipulación genética en levadura que se han ido incorporando en los últimos años y que la convierten en un sistema muy atractivo para clonar genes de otros organismos.

B) LA LEVADURA Saccharomyces cerevisiae COMO UN ORGANISMO EUCARIÓTICO MODELO PARA ESTUDIOS DE ADN RECOMBINANTE

En los últimos diez años los estudios genéticos en la levadura S.cerevisiae han experimentado una auténtica revolución, como fruto directo de la madurez de la tecnología del ADN recombinante in vitro. La posibilidad virtual de aislar cualquier gen, insertarlo en vehículos genéticos e introducirlo en cepas de levadura por transformación, la generación in vitro de mutaciones dirigidas a determinadas zonas genéticas, la sustititucón de genes silvestres por versiones alteradas, la creación de cromosomas artificiales, son sólo algunos de los sillares sobre los que se está asentando el estudio a nivel molecular de este ascomiceto unicelular. Esta nueva genética de la levadura abre,además, una serie de perspectivas de aplicación económica (junto con otras biotecnologías) que pueden llegar a revestir una gran importancia.

Desde un punto de vista histórico, la época de las manipulaciones genéticas in vitro en levaduras comenzó con el aislamiento de genes de rutas biosintéticas, en forma de fragmentos de ADN clonados en vectores bacterianos, que eran capaces de complementar algunas mutaciones auxotróficas de E.coli (Struhl et al., 1976; Ratzkin y Carbon, 1977; Struhl y Davis, 1977). Hacia la misma época se había puesto a punto la técnica de la transformación de esferoplastos de levadura (Hinnen et al., 1978) y se habían construído los primeros

vectores bifuncionales, con facultad de replicación en bacterias y levaduras (Beggs, 1978). Ello hacía posible reintroducir los segmentos de ADN de levadura que habían mostrado complementación en E.coli en cepas mutantes de S.cerevisiae, y determinar con exactitud el gen que se había clonado. Quedaba así abierto el camino para nuevos enfoques en los estudios de la biología de este microorganismo eucariótico: expresión y regulación génicas, replicación de su ADN, recombinación, control del ciclo celular, etc.

En las siguientes páginas se revisan algunas de las facetas de las nuevas técnicas en S.cerevisiae, con especial referencia a los sistemas vectores, su base molecular y sus consecuencias en los estudios básicos, para pasar después a aspectos de expresión genética a nivel de secuencias de ADN implicadas; finalmente, se revisará la bibliografía que da cuenta de los intentos de expresión de genes heterólogos. Una reciente valoración del impacto de la Ingeniería Genética en levaduras se hallará en Struhl (1983).

4. SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN LEVADURA

Los sistemas de transformación desarrollados en levadura son esenciales para obtener adecuados rendimientos de los métodos de manipulación in vitro, ya que representan el lazo de unión entre la estructura genética de los ADNs clonados artificialmente y su respectiva funcionalidad, que se pone de manifiesto haciéndolos operar in vivo en el entorno celular adecuado.

La transformación es un cambio genotípico de una célula, dependiente de la captación por la misma de una molécula de ADN desnuda desde el exterior. Su fundamento,en levadura, es el clásico de otros sistemas: introducir un gen en una cepa receptora de tal modo que se disponga de métodos para seleccionar o distinguir los clones derivados de adquisición de ADN de aquellos inalterados. En levaduras, el ADN con el que se pretende transformar suele ir insertado en un vector que pueda replicarse y seleccionarse previamente en bacterias, con objeto de obtener grandes cantidades del fragmento a introducir en levaduras. El tipo de vectores capaces de propagarse en dos tipos de organismos distintos recibe el nombre de bifuncional o de lanzadera.

El método original de transformación de levadura (Hinnen et al., 1978) consiste en obtener esferoplastos de la cepa a transformar mediante digestión de la pared celular con enzimas líticos adecuados (ß-glucuronidasa, zimoliasa, etc.), incubar los esferoplastos (manipulados en soluciones hipertónicas) con el ADN, en presencia de polietilénglicol (PEG) e iones Ca^{++}, y finalmente sembrar los esferoplastos en medios donde se puedan regenerar las paredes. No hay muchos estudios sobre el mecanismo de entrada del ADN en esta modalidad de transformación: Harashima et al. (1984) han demostrado que la introducción de ADN está directamente asociada a

la fusión de esferoplastos inducida en la mezcla de PEG/Ca^{++}. Brzobohatý y Kováč (1985) han aportado una serie de datos que ellos encajan en el siguiente modelo: el ADN exógeno se une fuertemente a la superficie de la membrana de los esferoplastos en un proceso temporal que requiere iones Ca^{++}; posteriormente el PEG induce la agregación y fusión de los esferoplastos, de modo que el ADN exógeno adsorbido queda atrapado entre las células de los agregados, apareciendo finalmente en células que son productos de estas fusiones.

Se ha descrito un método de transformación que no requiere la obtención de esferoplastos, sino que se basa en el tratamiento de células intactas con determinados cationes monovalentes (especialmente Li^{+}) en presencia de PEG (Ito et al., 1983).

Recientemente se ha demostrado la transformación genética de esferoplastos de levaduras por medio de pulsos eléctricos simples, que probablemente ocasionan poros temporales en la membrana,a través de los cuales puede pasar el ADN foráneo (Karube et al., 1985).

5. TIPOS DE VECTORES Y DE TRANSFORMANTES

Los vectores que se usan para introducir ADN en levaduras suelen ser plásmidos híbridos obtenidos por recombinación in vitro entre típicos vectores bacterianos y material genético de levadura. Contienen, como es habitual en todo vector, al menos un sitio diana único para alguna endonucleasa de restricción, en el cual es posible insertar fragmentos de ADN generados por la misma endonucleasa o algún isos-

quizómero de ella. Las secuencias bacterianas incluyen un origen de replicación procedente de un plásmido (en la mayoría de los casos se trata del correspondiente a ColE1, vía pBR322 o derivados) y al menos un marcador fácilmente seleccionable en bacterias (habitualmente un gen de resistencia a algún antibiótico). El ADN de levadura presente en el vector puede ser de varios tipos, lo que a su vez determina diferentes clases de vectores bifuncionales según su comportamiento tras su entrada en la célula de levadura. Para denominar las diferentes modalidades de vector en el contexto de esta revisión emplearemos la nomenclatura propuesta por Struhl et al. (1979):

a) vectores integrativos (YIp)
b) vectores basados en el círculo -"episoma"- 2μm de levadura (YEp)
c) vectores basados en secuencias cromosómicas de replicación autónoma (YRp)
d) vectores basados en secuencias centroméricas (YCp).

A pesar de su diversidad, todos ellos contienen un marcador seleccionable en levaduras (normalmente genes de rutas biosintéticas capaces de complementar mutaciones del locus cromosómico correspondiente de la cepa receptora). A continuación se revisan los fundamentos y propiedades de los vectores citados, haciendo referencia a algunos aspectos de la biología molecular de la levadura que nos permiten desentrañar.

5.1. VECTORES INTEGRATIVOS (YIp)

Históricamente fueron los primeros en usarse (Hinnen et al., 1978). En su versión más sencilla consisten en

el marcador seleccionable de levadura clonado en un vector bacteriano normal. Carecen, en principio, de secuencias replicativas funcionales en levadura, por lo que el único modo de mantenerse establemente en ésta es integrándose en la región homóloga del marcador (o de cualquier otra región del genomio que presente suficiente homología). El fenómeno de integración se da con una frecuencia baja, lo que determina una escasa tasa de transformantes (1-10 por μg de ADN).

La disposición de las secuencias integradas sugiere que el evento de integración se produce por un mecanismo de tipo Campbell: los transformantes presentan la dos versiones del gen (el marcador seleccionado y el alelo mutante de la cepa receptora) separadas entre sí por las secuencias bacterianas del vector. Ello es indicio de que ha ocurrido una recombinación homóloga sencilla entre las secuencias respectivas de la levadura presentes en el plásmido y en el locus cromosómico. Al igual que ocurre con los sistemas bacterianos similares, la estructura resultante no es totalmente estable: por un segundo evento de recombinación homóloga se produce una escisión de una copia del gen repetido junto con las secuencias bacterianas del vector (evicción de ADN), dando origen a segregantes (0.1% por generación). Según que la evicción afecte a la versión silvestre o a la mutante, se producen dos tipos de segregantes: los que recuperan el genotipo original de la cepa mutante receptora, y los que se convierten en prototrofos estables por retención del alelo silvestre procedente del vector.

A pesar de su baja frecuencia de transformación, los vectores integrativos tienen más estabilidad que los replicativos de las clases YEp y YRp. La integración en los cromosomas permite su consideración en los transformantes como marcadores convencionales a la hora de los clásicos análisis

genéticos. En las cepas diploides segregan como elementos mendelianos sencillos.

Hicks et al. (1979) realizaron experimentos de transformación empleando dos plásmidos YIp distintos en la misma mezcla, comprobando que dentro de la población transformada la proporción de levaduras que habían recibido los dos plásmidos era relativamente alta. Esto es explicable teniendo en cuenta el mecanismo propuesto para la transformación de esferoplastos en PEG/Ca^{++}, comentado en el apartado 4: al estar asociada la entrada de ADN con la fusión de esferoplastos, es normal que, empleando una mezcla de plásmidos queden atrapados representantes de cada tipo en una fracción significativa de los agregados de fusión.

5.2. VECTORES BASADOS EN EL PLASMIDO 2μm (YEp)

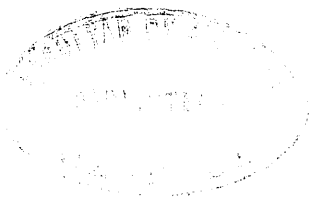
Muchas cepas de levadura albergan un plásmido de ADN de doble hebra, de unas dos micras de longitud, que recibe el nombre de plásmido 2μm o círculo 2μm. Está presente en unas 50 a 100 copias por genomio haploide, heredándose de forma no mendeliana. Se encuentra formando complejos con histonas (Livingston y Hahne, 1979) y muestra una típica configuración nucleosómica (Nelson y Fangman 1979; Fragelius y Livingston, 1984), lo que junto a otra evidencias bioquímicas y genéticas (revisadas por Gunge, 1983) parece zanjar la discusión sobre su localización en favor del núcleo.

Tras las primeras caracterizaciones físicas del plásmido (Livingston y Klein, 1977), se determinó su secuencia

completa (Hartley y Donelson, 1980), consistente en 6318 pb , organizadas en dos segmentos idénticos invertidos de 599 pb que delimitan dos zonas no repetitivas (L, grande y S, pequeña). El plásmido se presenta en las células como una mezcla equimolecular de dos formas isoméricas (A y B), diferenciables por la orientación relativa de L y S. Cada una de estas formas se reconvierte en la opuesta debido a un sistema de recombinación específica (Broach et al., 1932); en él se hallan implicadas interacciones entre determinadas secuencias de los segmentos repetidos con una proteína codificada por el gen FLP del plásmido 2μm (Gerbaud et al., 1979; Broach y Hicks, 1980; Andrews et al., 1985). Se ha puesto a punto un ensayo in vitro para este sistema recombinativo (Vetter et al., 1983) y se ha señalado su semejanza con sistemas procarióticos (Jayaram y Broach, 1983 ; Jayaram, 1985; Jayaram et al.,1985).

Cada copia del plásmido 2 μm se replica una sola vez en todo el ciclo celular, al comienzo de la fase S (Zakian et al., 1979), con la concurrencia de funciones cromosómicas del ciclo celular (genes CDC) (Livingston y Kupfer, 1977). Broach y Hicks (1980) y Kikuchi (1983) identificaron su origen de replicación (ORI) y dos genes plasmídicos (REP1, REP2) involucrados en el control del número de copias. Al parecer, algunas copias del plásmido pueden eventualmente abandonar su estado autónomo e insertarse en varias localizaciones cromosómicas (Falco et al., 1982, 1983). El plásmido 2μm es bastante estable en poblaciones silvestres (Futcher y Cox, 1983), pero es posible eliminarlo con métodos genéticos de curación como los de Ernart y Hollenberg,(1981) y Toh-e y Wickner (1981).

A excepción de un extraño fenómeno de letalidad en líneas clonales que se produce en cepas portadoras de determinadas mutaciones cromosómicas, el plásmido 2μm no confiere ningún fenotipo detectable (Holm, 1982a, b), pero en cambio



ha mostrado ampliamente su utilidad como vector de clonación para S.cerevisiae desde los primeros intentos de Beggs (1978), Hicks et al. (1979), Kielland-Brandt et al., (1979) y Struhl et al., (1979). Estos autores insertaron trozos del círculo 2 μm en plásmidos originalmente integrativos, y obtuvieron rendimientos de transformación mejorados en varios órdenes de magnitud. Ello se debe a que las secuencias de replicación de 2 μm determinan el que estos plásmidos se mantengan en estado autónomo (YEp), con una alta eficiencia de transformación (10^4-10^5 por μg de ADN). La pérdida de este tipo de plásmidos recombinantes por segregación mitótica está alrededor de 1% por generación, y su número de copias es parecido al del 2 μm endógeno (Gerbaud et al., 1979; Chevalier et al., 1980).

Los vectores YEp que no poseen entre sus secuencias de 2 μm el origen de replicación no pueden transformar cepas de levadura carentes de 2 μm indígena (cepas cir^o), pero transforman eficientemente las cepas cir^+. Esto se debe a que la capacidad de transformar de este tipo de moléculas ORI^- depende enteramente de su recombinación con copias del plásmido residente (Dobsen et al., 1980a, b; MacNeil et al., 1980). En cambio, los vectores ORI^+ transforman eficientemente en ambos tipos de cepas, pero son algo más estables en cir^o, debido probablemente a que en éstas no tienen que competir replicativamente con plásmidos silvestres preexistentes (Blanc et al., 1979; Erhart y Hollenberg, 1981). Un estudio reciente (Futcher y Cox, 1984) no ha encontrado evidencias de un control estricto y específico del número de copias y de la incompatibilidad al estilo de los que se hallan entre los plásmidos bacterianos.

Como las cepas de levadura receptoras en las transformaciones suelen ser cir^+, la introducción de plásmidos

YEp puede conducir a recombinaciones in vivo, mediadas tanto por el sistema de recombinación específica como por recombinación homóloga provocada por el producto del gen RAD52 (Whiteway y Ahmed, 1984). Esto puede ser causa de que el análisis de los plásmidos recuperados a partir de transformantes se complique algo, ya que pueden mostrar estructuras diferentes de las del plásmido original. Otro inconveniente potencial de estos vectores se deriva de su gran número de copias, y por lo tanto del aumento de dosis génica de los fragmentos clonados: cuando determinados genes se expresan intensamente (muy por encima de su nivel normal) se pueden producir efectos deletéreos. A pesar de todo ello, el uso de plásmidos YEp se ha extendido considerablemente y hoy existe una amplia gama de derivados adaptados a objetivos más o menos específicos (p.ej.: Storms et al., 1979; Ferguson et al., 1981; Morris et al., 1981; Broach, 1983).

5.3. VECTORES BASADOS EN SECUENCIAS CROMOSÓMICAS DE REPLICACIÓN AUTÓNOMA (YRp)

Las secuencias cromosómicas que confieren replicación autónoma a ADN circular introducido en levadura (secuencias ARS) fueron aisladas por primera vez, de forma casual, en experimentos en los que se transformaban levaduras con plásmidos derivados de insertar fragmentos de ADN genómico total de S.cerevisiae en vectores integrativos. Se observó que determinados trozos de ADN proporcionaban a las moléculas híbridas la capacidad de transformar con mucha mayor eficiencia que la del vector original de tipo YIp. Además, estos híbridos no se integraban, sino que se mantenían en estado autónomo (Hsiao y Carbon, 1979; Struhl et al., 1979). Este

fenómeno se debe a que en determinadas zonas de los cromosomas residen secuencias que actúan como orígenes de replicación autónoma (ARS). Se han aislado varias secuencias de este tipo: ARS1, cerca del gen TRP1 (Stinchcomb et al.,1979; Kingsman et al., 1979), ARS2, cerca de ARG4 (Hsiao y Carbon, 1979), una ARS adyacente al gen HO del homotalismo (Kearsey, 1983), etc. Diversos datos indican que las secuencias ARS corresponden a los auténticos orígenes cromosómicos de replicación, repartidos por el genomio a razón de uno cada 30-40 kb (Beach et al., 1980; Chan y Tye, 1980).

La secuencia ARS1 es hasta ahora la mejor caracterizada. Tiene un tamaño aproximado de 300 pb , que conforman tres regiones: un dominio central (A) que constituye el núcleo de 11 pb , notablemente conservado en otras ARS (Kearsey, 1983), y dos dominios flanqueantes, B y C, de unas 200 y 300 pb , respectivamente. Los estudios del grupo de Campbell (Celniker et al., 1984; Srienc et al., 1985) han demostrado que el dominio A, junto con 4 pb a cada lado, representa la unidad mínima replicadora, necesaria y suficiente para mantener una débil actividad ARS; el papel de las zonas adyacentes parece consistir en aumentar la probabilidad de que el evento de replicación ocurra durante la fase S y, en concreto, en el dominio C es donde se forma la "burbuja" de replicación observable a microscopía electrónica.

La clonación de ADN genómico de diversos eucariotas en vectores integrativos ha permitido aislar fragmentos que confieren igualmente la función de replicación autónoma en levaduras (Stinchcomb et al., 1980). Aún está por aclarar el significado funcional y evolutivo de esta complementación interespecífica de la función ARS.

El estudio de las secuencias ARS tiene un interés intrínseco en cuanto que permite acceder a la disección genética de las funciones relacionadas con la replicación en levadura, tanto in vitro (Celniker y Campbell, 1982) como in vivo (Fangman et al., 1983). Uno de los ejemplos de investigación básica molecular facilitada por los plásmidos YRp es el estudio de la disposición y ensamblaje de los nucleosomas, incluyendo la aclaración de las interacciones entre histonas y ADN (Zakian y Scott, 1982; Thoma y Simpson, 1985).

Las características más destacables de los plásmidos YRp son: elevada capacidad de transformación en levaduras (10^4 transformantes por μg de ADN); gran inestabilidad mitótica debida, al menos en parte, a que experimentan segregaciones anormales asimétricas a la célula madre (Murray y Szostak, 1983a), lo cual condiciona que en la población transformante llegue eventualmente a existir una minoría de células que efectivamente llevan plásmido; la segregación meiótica es igualmente asimétrica (4:0). De vez en cuando pueden surgir variantes estables de los transformantes, originadas por recombinaciones homólogas entre el plásmido y loci cromosómicos (Nasmyth y Reed, 1980; Larionov et al., 1984).

5.4. VECTORES BASADOS EN SECUENCIAS CENTROMERICAS

Los plásmidos basados en ARS mejoran patentemente sus propiedades de estabilidad y segregación cuando partiendo de ellos se construyen derivados (YCp) que llevan secuencias relacionadas con la función del centrómero (Clarke y Carbon, 1980; Stinchcomb et al., 1982; Fitzgerald-Hayes et al., 1982).

De hecho, este nuevo tipo de plásmidos presenta una baja frecuencia de pérdida mitótica (alrededor de 10^{-2}), un modo mendeliano de segregación meiótica (2:2), un bajo número de copias (normalmente una por genomio haploide), y no sufren integraciones cromosómicas. Todo ello indica que las secuencias centroméricas (CEN) estabilizan los plásmidos que ya lleven ARS, confiriéndoles propiedades de minicromosomas circulares, si bien esta estabilidad es mucho menor que la de los auténticos cromosomas lineales (Haber et al., 1984).

5.5. TRANSFORMACIÓN CON ADN LINEAL: CROMOSOMAS ARTIFICIALES

Cuando un plásmido integrativo se linealiza *in vitro* cortando en la zona del marcador de levadura, y se emplea en transformación, se observa un incremento de unas veinte veces en la frecuencia de transformantes (Hicks et al., 1979). Aunque este resultado pudiera parecer paradójico en principio (puesto que la integración de ADN lineal exige dos entrecruzamientos) se puede explicar en base a la gran capacidad recombinogénica de los extremos de las moléculas lineales, que intervienen en un proceso de recombinación homóloga mediada por RAD52, por invasión de cadenas y síntesis reparadora de ADN (Orr-Weaver et al., 1981).

Al linearizar plásmidos replicativos de tipo YEp, la frecuencia de transformación sigue siendo elevada (aproximadamente la mitad de la normal para la versión circular). Esto ocurre incluso cuando los extremos de la molécula lineal no son mutuamente cohesivos, lo cual indica que la levadura

receptora tiene una gran capacidad para repararlos y ligarlos eficientemente (Hinnen y Meyhak, 1982; Suzuki et al., 1983).

Una muy importante derivación de las técnicas de clonación en levadura ha sido la construcción de cromosomas artificiales por reunión en una sola molécula lineal de sus elementos esenciales: ARS, CEN y secuencias con funcionalidad de telómeros (TEL) (Szostak y Blackburn, 1982). Tales moléculas tienen un comportamiento de segregación tanto más normal cuanto más se acerca su longitud a la de los cromosomas naturales (Dani y Zakian, 1983; Murray y Szostak, 1983b). El aislamiento y caracterización de los elementos ARS, CEN y TEL, junto a la disponibilidad de cromosomas artificiales y la cada vez más ampliada capacidad de manipular y rediseñar los cromosomas naturales (Sugawara y Szostak, 1983) está permitiendo abordar diversos aspectos moleculares de la estructura y comportamiento de los cromosomas eucarióticos. Así por ejemplo ocurre con las cuestiones relacionadas con la peculiar replicación de los telómeros (Pluta et al., 1984; Shampay et al., 1984; Walmsley et al., 1984) o con las interacciones entre cromatina y aparato mitótico (Blackburn y Chian, 1981; Bloom y Carbon, 1982). Para una visión general de estos temas se puede acudir a las revisiones de Blackburn y Szostak, 1984; Blackburn, 1985 y Murray, 1985.

6. ESTUDIOS BÁSICOS EN LEVADURA CON TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE

Tras los aislamientos iniciales de genes de levadura se pasó de manera lógica a la obtención de bancos de genes y a los experimentos de perdigonada ("shot-gun") para la localización de genes correspondientes a determinadas mutaciones o a fenotipos previamente investigados por técnicas clásicas. Esta primera fase de la Ingeniería Genética de S.cerevisiae ha quedado reflejada en varias revisiones, de las cuales merece destacarse la de Botstein y Davis (1982).

Tras el aislamiento de un gen en forma de fragmento de restricción insertado en un vector bifuncional se procede a su caracterización por muy diversas técnicas: mapas de restricción, determinación de los sitios de inicio de transcripción, de poliadenilación del mensaje, secuenciación, etc. A continuación se revisan algunos datos recientes que aportan las nuevas técnicas a los análisis genéticos.

6.1. MÉTODOS DE ALTERACIÓN Y SUSTITUCIÓN DE GENES

Una de las consecuencias de mayor alcance de la nueva genética es que permite crear mutaciones in vitro, al azar o en lugares pre-determinados, dentro de moléculas clonadas de ADN (mutagénesis dirigida) para reintroducirlas después en la levadura con objeto de estudiar las alteraciones posibles en el fenotipo que se puedan derivar. Esta nueva modalidad de análisis de mutaciones es lo que se ha dado en llamar "genética inversa", porque sigue el camino opuesto

al análisis tradicional.

Los métodos para provocar mutaciones in vitro son muy diversos (Shortle et al., 1981) y capacitan la producción de una enorme variedad de mutaciones definidas en la secuencia del ADN. Los más sencillos implican la generación de delecciones e inserciones de secuencias definidas. Ultimamente se está recurriendo bastante al empleo de exonucleasas como la enzima Bal31, que permiten producir una colección de fragmentos que se diferencian en el número de nucleótidos eliminados desde los extremos del fragmento original.

Para que las mutaciones in vitro rindan resultados deben ser introducidas en la levadura, y a ser posible que sustituyan a las respectivas versiones silvestres. Esta sustitución de alelos, llamada trasplazamiento, es hoy perfectamente factible en S.cerevisiae gracias a varias aplicaciones de propiedades de los vectores integrativos. Cronológicamente la primera fue la de Scherer y Davis (1979), que consiste en clonar en un plásmido de tipo YIp provisto de un marcador seleccionable (A^+) la versión mutada (b^-) de un gen a ensayar. La construcción híbrida resultante se introduce en una cepa que es a^-, B^+, aplicando presión selectiva para el marcador A^+. Surgen dos tipos de transformantes: los que proceden de integraciones del plásmido en el locus A, y los que proceden de B. Estos últimos son reconocibles porque llevan los alelos B^+ y b^- enmarcando al vector (en el que van incluídas las secuencias de A^+). Como ya se comentó (5.1) esta estructura es inestable y, por una segunda recombinación homóloga da lugar a evicciones del vector junto con una de las copias del gen. Dependiendo de la copia afectada, B^+ o b^-, surgen dos clases de segregantes: los que recuperan la estructura original (a^-, B^+) y los que poseen una copia mutada del gen en

el locus que antes ocupaba la versión silvestre (genotipo a^-, b^-). En resumen, con esta técnica se seleccionan en dos pasos dos fenómenos de entrecruzamiento entre secuencias homólogas del cromosoma y del ADN introducido (Fig 3).

Posteriormente se han diseñado estrategias más rápidas que no requieren el rastreo de productos de segregación. La técnica de disrupción génica de Shortle et al. (1983) emplea plásmidos YIp que, en vez de llevar la secuencia completa de un gen mutante, tiene clonado un fragmento de restricción interno de un gen (o sea, se trata de un mutante de delección de ambos extremos). Tal fragmento suministra homología suficiente para la recombinación con el alelo cromosómico normal. La consecuencia de esta recombinación es que en el locus original aparecen dos versiones deleccionadas del gen, una en 5' y otra en 3'; por lo tanto se rompe en un solo paso la estructura del gen silvestre cromosómico (véase la Fig 4).

El método de Rothstein (1983) parte de un plásmido bacteriano que lleva un gen de levadura; la continuidad de éste se rompe introduciendo en su interior el fragmento con el marcador seleccionable de levadura (A^+). El gen así interrumpido se separa posteriormente de las secuencias bacterianas cortando con enzimas de restricción, y se emplea en esta forma lineal para transformar la correspondiente cepa de levadura. La transformación se produce por doble entrecruzamiento de frecuencia incrementada promovida por los extremos recombinogénicos correspondientes a los segmentos desconectados del gen roto. Ello provoca la sustitución, en un solo paso, del alelo silvestre por un alelo mutante sin funcionalidad (Fig 5).

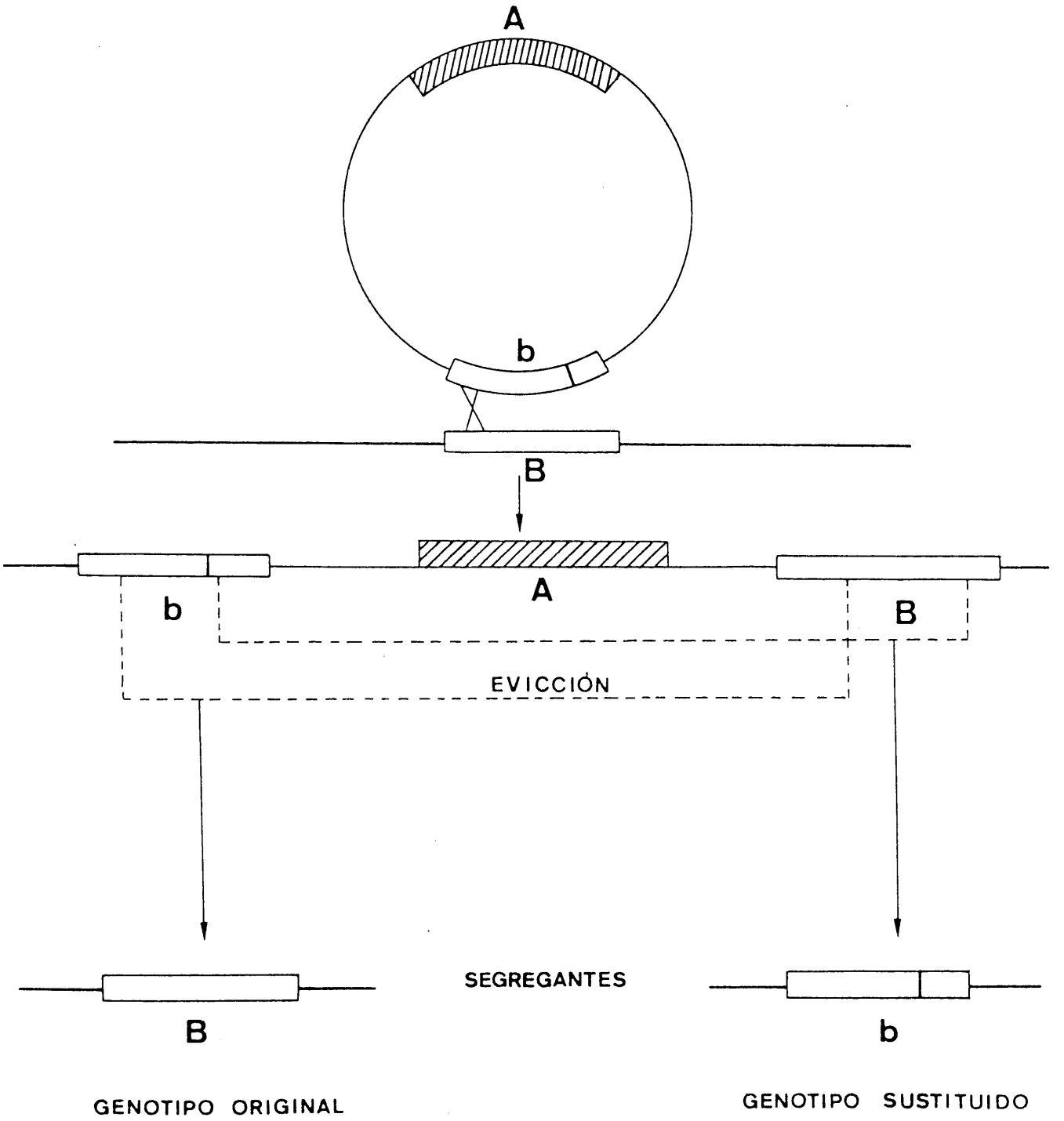


Fig 3: Método de sustitución de alelos en dos pasos, de Scherer y Davis (1979).

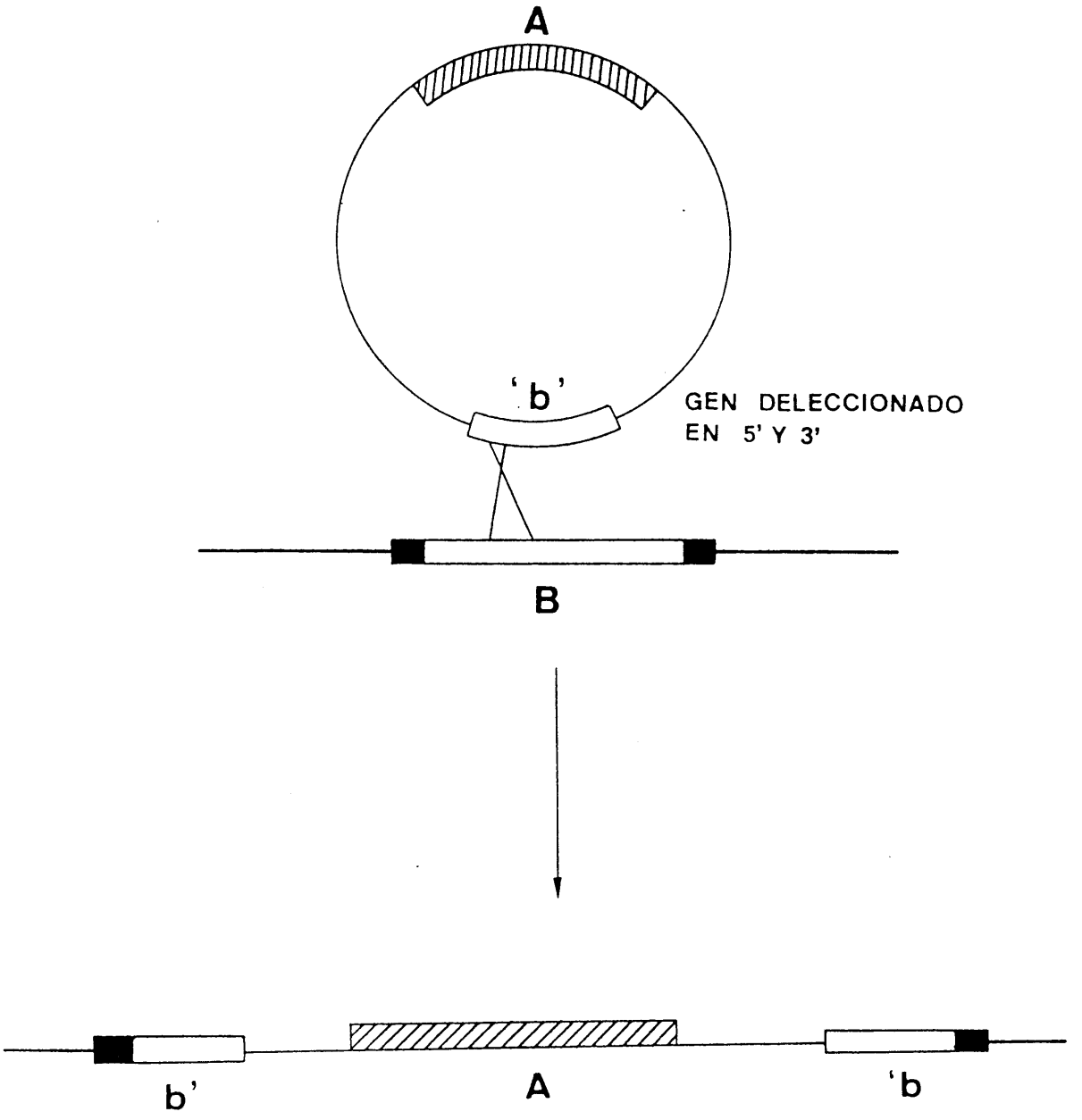


Fig 4: Método de disrupción génica en un solo paso de Shortle et al. (1983).

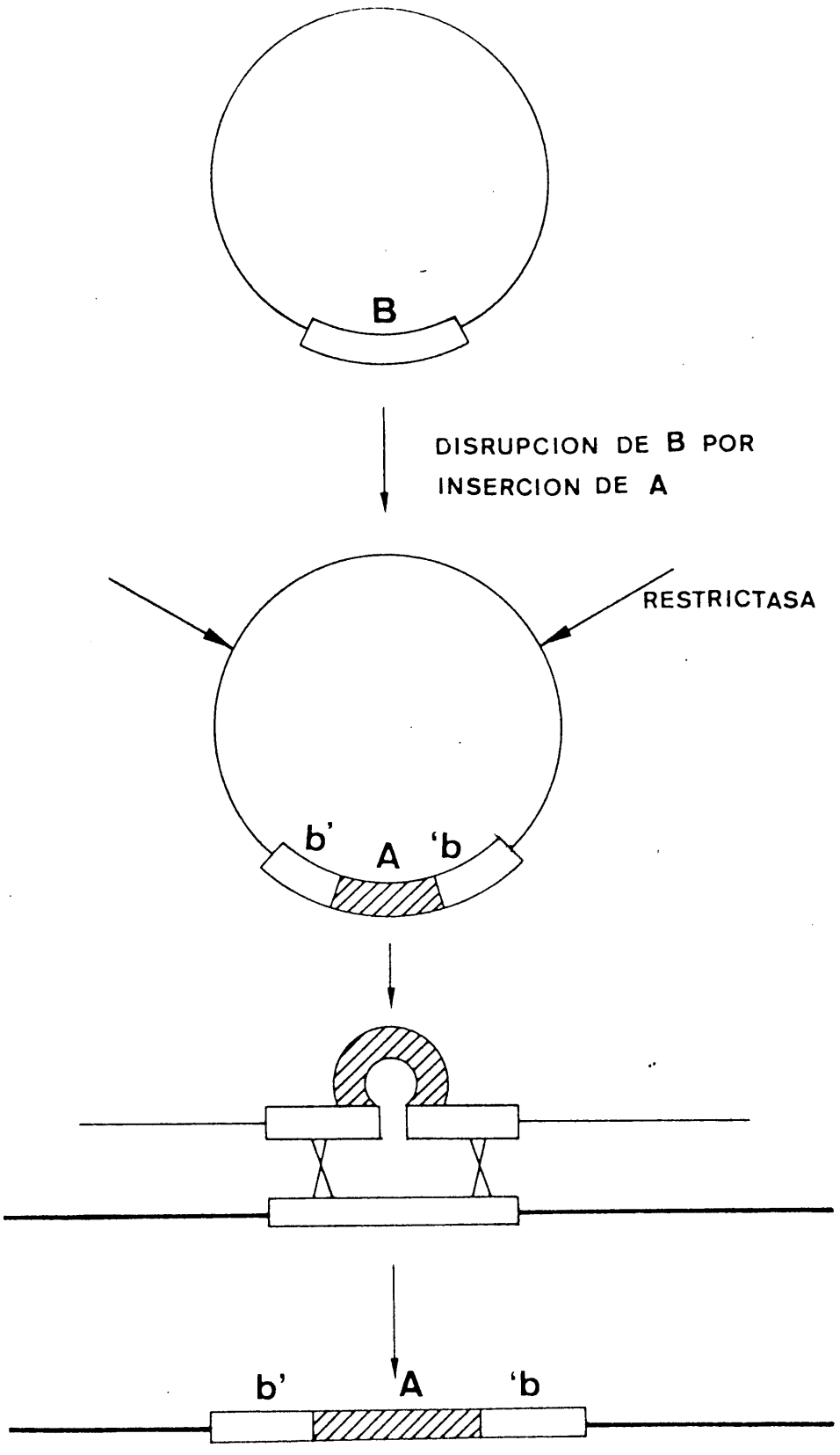


Fig 5: Método de disrupción génica de Rothstein (1983).

Una aproximación conceptual y práctica a estas técnicas flexibles de evicción y sustitución de genes ha sido suministrada por Winston et al. (1983)

Una modalidad de alteración genética particularmente útil para los estudios de regulación es la de las fusiones génicas entre las regiones promotoras o reguladoras de un gen con la porción codificadora de otro gen cuyo producto o función sea fácilmente ensayable. Este tipo de estrategia, ampliamente usada en bacterias desde hace años, ha sido aplicada con éxito también a levaduras. El método consiste en juntar la parte 5' no codificadora de un gen de levadura (con o sin los primeros codones iniciales de dicho gen) a la porción codificadora del gen lacZ (de la β-galactosidasa) de E.coli (Guarente y Ptashne, 1981; Rose et al., 1981). Las cepas transformadas con las fusiones construídas expresan la β-galactosidasa bajo el control del promotor y/o de las secuencias regulatorias correspondientes y pueden hidrolizar los clásicos sustratos cromogénicos (como el "Xgal"), de modo que se hacen muy fáciles tanto la cuantificación de la expresión como la diferenciación en placas de cultivo, de las colonias Gal^+. El método puede adaptarse para identificar y aislar grupos de genes sometidos a un mismo tipo de regulación. Para ello se construye un banco de genes fusionados a lacZ, en vectores especialmente diseñados; entre los transformantes de levadura obtenidos a partir del banco genómico de fusión se rastrean las levaduras que inducen la expresión de β-galactosidasa en respuesta a determinados tratamientos (Ruby et al., 1983). De esta forma ha sido posible clonar varios genes que se activan como consecuencia de daños provocados al ADN (Ruby y Szostak, 1985).

Una vez logrado el aislamiento del gen, la misma técnica de fusión génica permite abordar estudios sobre la estructura, función y regulación del gen. Para ilustrar esto basta leer trabajos como los de Martínez-Arias et al. (1984) sobre LEU2, de Yocum et al. (1984) que se han centrado sobre la región intercistrónica que separa GAL1 de GAL10, o de Silver et al. (1984), donde se determina la localización nuclear del producto de GAL4.

Ante el continuo aislamiento de nuevos genes de levadura es lógico que aumenten las posibilidades de fusiones génicas artificiales, de modo que se puede lograr que un gen se exprese con las características de regulación de otro. Ello puede ser útil cuando se pretende obtener y caracterizar el producto de un gen que se expresa a bajos niveles: se acude a fusionar la porción codificadora del gen correspondiente con un promotor eficiente de otro gen de elevada expresión. Este tipo de estrategia ya ha sido aplicado por Laughon et al. (1984) para producir grandes cantidades de la proteína regulatoria codificada por GAL4, empleando como promotor "prestado" el del gen GAL1.

6.2. ESTUDIOS SOBRE TRANSCRIPCION Y TRADUCCION: SECUENCIAS IMPLICADAS

En levaduras, como en los demás eucariotas, se dan tres formas de ARN polimerasa. La ARN polimerasa I transcribe el ADN correspondiente a los ARNr 18S y 25S. La forma III se encarga de la producción del ARNr 5S y

de los ARNt. La ARN polimerasa II transcribe los genes traducibles a proteínas (para revisión, véase Sentenac y Hall, 1982).

Al contrario que en procariotas, el producto primario de la transcripción en eucariotas no sirve directamente como mensajero, sino que previamente a su traducción ha de sufrir una serie de modificaciones que constituyen el procesamiento del transcrito primario (Nevins, 1983; Hansen y Sharp, 1984). Muchas de las reacciones tienen lugar en el núcleo, antes de la salida del transcrito al citoplasma. Consisten, esencialmente, en las siguientes:

1) adición de un residuo de guanina al extremo 5' original, por acción de una guanilil-transferasa, con posterior metilación, en N-7, de esta guanina (por una metiltransferasa), lo que origina la característica estructura en "caperuza" (el llamado "cap-0"): m^7GpppN... Este proceso ocurre inmediatamente despúes de que comience la transcripción, antes de que la cadena naciente de ARN tenga más de 100 nucleótidos. La estructura en caperuza parece jugar algún papel en el mecanismo de inicio de la traducción, interaccionando con proteínas específicas (Banerjee, 1981; Shatkin, 1985), aunque también puede que intervenga en la protección del ARN contra las exonucleasas (Nevins, 1983).

2) Procesamiento de la porción terminal en 3' del transcrito primario, posiblemente por incisión endorribonucleotídica que genera un nuevo extremo 3', con posterior adición de novo de un conjunto de 20 a 200 residuos de adenina, por acción de la poliadenina-polimerasa, lo que produce la característica "cola poli-A" de los mensajeros eucarióticos. La mayor parte de los mensajeros poli-A^+ posee, a unas 10-30 bases del sitio de poliadenilación una secuencia conservada (AAUAAA , o muy similar) cuyo papel

en el procesamiento del extremo 3' ha sido muy debatido (Nevins, 1983). Los más recientes trabajos parecen indicar que esta secuencia es necesaria, pero no suficiente, para la incisión endorribonucleotídica (Wickens y Stephenson, 1984). Al parecer, más allá del hexanucleótido AATAAA, (en sentido 3') se dan secuencias que igualmente intervienen en la formación del ARNm maduro (Gil y Proudfoot, 1984). Se piensa que la poliadenilación está acoplada de alguna manera a la incisión, pero aún necesita aclararse cómo se determinan ambas reacciones.

3) En muchos genes eucarióticos la porción codificadora no es continua, sino que se encuentra formando segmentos traducibles (exones) separados entre sí por secuencias no codificadoras (intrones). El transcrito primario, que comprende exones e intrones, es sometido a un proceso de maduración por el que estos últimos son eliminados, siendo los exones reunidos de forma contigua ("splicing" del ARN). En levaduras la mayor parte de los genes nucleares transcribibles por ARN polimerasa II estudiados hasta ahora carecen de intrones, habiéndose investigado en detalle el "splicing" en los precursores de los ARNt y en los transcritos de genes mitocondriales (véase Abelson et al., 1981).

En la producción del transcrito, así como en su procesamiento y regulación están implicadas secuencias no codificadoras situadas a ambos lados de la porción traducible. Una primera aproximación a la elucidación de estos fenómenos consiste en la comparación de secuencias 5' y 3' de diversos genes, con vistas a detectar regiones conservadas candidatas a serles adjudicadas funciones en el inicio o término de transcripción y traducción, o como señales de regulación. Pero la asignación definitiva de un papel a cualquier secuencia ha de venir precedida de de cuidadosos

estudios genéticos y bioquímicos, con empleo de mutantes afectados es las secuencias supuestamente implicadas.

6.2.1. Secuencias 5' implicadas en la transcripción

Al igual que la mayoría de los eucariotas, las levaduras poseen secuencias conservadas del tipo módulo de Goldberg-Hogness (TATAAA), pero a diferencia de lo que ocurre en organismos superiores, se encuentran relativamente alejadas del sitio de inicio de traducción (hasta unas 100 bases) y no están enmarcadas en una región rica en G+C. Este hexanucleótido parece esencial para la correcta iniciación de la transcripción por la ARN-polimerasa II; posiblemente facilita la adecuada colocación del enzima sobre el molde de ADN (Sentenac y Hall, 1982). La eliminación de esta secuencia no suprime (al menos totalmente) la transcripción, pero ésta se inicia en sitios anómalos. Las levaduras presentan números variables de inicios de transcripción para un mismo gen: el ADC1 posee dos sitios (Bennetzen y Hall, 1982a), mientras que CYC1 muestra hasta siete sitios alternativos (Faye et al., 1981). En el caso de SUC2 se ha demostrado que sus dos sitios corresponden a dos modalidades de regulación de la expresión (Sarokin y Carlson, 1984).

Muchos eucariotas poseen a unas 70 bases de la secuencia TATAAA, en sentido 5', una región conservada denominada módulo CAT, que parece requerirse para que la transcripción de ciertos genes sea eficaz. Sin embargo en levadura, aunque algunos genes albergan zonas similares (caso de PGK: Hitzeman et al., 1982), por lo general no es posible hallar tal secuencia, o en todo caso, se encuentra muy desfigurada (Dobson et al., 1982).

Aparte del módulo de Goldberg-Hogness, muchos "promotores" de levadura poseen otros elementos esenciales, conocidos como secuencias activadoras UAS ("upstream activator sequences"), situadas por lo general a gran distancia del sitio de inicio de transcripción, en sentido 5'. Se ha comprobado que se requieren para la transcripción eficiente de muchos genes en respuesta a diversas señales metabólicas, y pueden ejercer su efecto dentro de un amplio margen de distancias respecto del módulo Goldberg, así como si se invierte su orientación (Struhl, 1982; Lowry et al., 1983; Guarente y Hoar, 1984; Wrigth y Zitomer, 1984; Guarente, 1985). Grupos de genes sometidos a un mismo tipo de regulación poseen secuencias homólogas dentro de las UASs. Cuando una UAS de un gen se fusiona artificialmente con el módulo Goldberg y la porción codificadora de otro gen, confiere a éste sus peculiaridades regulatorias (Hinnebusch et al., 1985). Todos estos rasgos son similares a algunas de las propiedades desplegadas por los elementos potenciadores ("enhancers") de muchos virus eucarióticos (Khoury y Grass, 1983) y de genes celulares (Serfling et al., 1985). Sin embargo, a diferencia de los potenciadores, las UASs de levaduras no pueden ejercer su efecto a distancias de más de 1 kb del lado 5', y no son funcionales en el lado 3' del gen.

La verdadera significación de los diversos elementos activadores cis y trans que intervienen en el comienzo de la transcripción, así como sus posibles interacciones será un tema de intensa investigación en los próximos años. Guarente (1985) ha resumido los diversos tipos de hipótesis en relación a las funciones de los distintos módulos: puede que la secuencia Goldberg sea el verdadero promotor, el

sitio de entrada para la ARN polimerasa II, y que las UASs posean exclusivamente función regulatoria; o bien las UASs podrían ser los lugares de entrada primaria del complejo enzimático de inicio de transcripción, encargándose el módulo Goldberg de fijar el sitio de comienzo efectivo de la síntesis del ARN, en una región corta precedente al primer codón traducible.

Paralelamente al estudio de las secuencias involucradas en el inicio de transcripción en levaduras se vienen desarrollando trabajos destinados a diseccionar genética y bioquímicamente las modalidades de regulación de la transcripción, para lo que están resultando indispensables las técnicas descritas en el apartado 6.1. Hoy se sabe que grupos de genes sometidos a controles comunes comparten módulos UAS homólogos que responden al mismo tipo de señales reguladoras. Además, determinados genes pueden presentar UASs adicionales correspondientes a otras clases de control más o menos específicas. Entre los sistemas génicos más estudiados están: los de los citocromos-1 (CYC1, CYC7: Guarente, 1985); la compleja red de genes biosintéticos de aminoácidos (Jones y Fink, 1982) que está regulada coordinadamente por los productos de al menos cinco genes (denominados GCN) (Struhl, 1982; Penn et al., 1983, 1984; Hinnebusch y Fink, 1983) ,y los tres genes de la asimilación de la galactosa (GAL7, GAL10 y GAL1) sometidos no sólo a la represión general por catabolito sino a una regulación específica que actúa sobre secuencias conservadas palindrómicas (Citron y Donelson, 1984; Torchia et al., 1984; Johnston y Davis, 1984; Yocum et al., 1984; Bram y Kornberg, 1985).

Los fenómenos de represión transcripcional en levadura están peor caracterizados a nivel molecular, pero

está consiguiéndose una gran profundización estudiando la red de genes MAT y SIR implicados en el cambio de tipo de cruce sexual (Brent, 1985 para una revisión breve). Recientemente se ha descubierto una secuencia de ADN que es capaz de desconectar la transcripción de los genes a grandes distancias, en 5' o 3', e independientemente de su orientación. Este módulo regulatorio negativo, con caracteres posicionales semejantes a los potenciadores, pero con efectos opuestos, ha sido denominado "silenciador". Parece que funciona según un modelo en el que la represión se establece por la creación de una estructura cromatínica que dificulta la transcripción a ambos lados del silenciador (Brand et al., 1985).

Parece muy probable que el mecanismo de potenciadores y silenciadores implique interacciones de orden mayor donde intervenga la estructura nucleosómica, la disposición de los cromosomas dentro del núcleo, y la transmisión de efectos a largas distancias por contactos entre zonas alejadas de la cromatina que portan moléculas regulatorias.

6.2.2. Secuencias 5' implicadas en la traducción

El modelo de inicio de traducción (hipótesis del rastreo: Kozak, 1978, 1981) propone que la subunidad ribosómica 40S, provista de los factores de iniciación y del Met-$tARN_i^{met}$ reconoce el extremo 5' del ARNm (la estructura en "caperuza") y desde allí avanza hacia el primer codón AUG del transcrito, donde comienza la traducción una vez que se incorpora la subunidad 60S. En su versión actual (Kozak, 1983) el modelo supone que la eficacia con que la unidad 40S reconoce el AUG iniciador depende del contexto de secuencia alrededor de este triplete iniciador , proponiéndose

que el contexto óptimo es $\begin{matrix}A\\G\end{matrix}$NNAUGG.

Las regiones 5' del ARNm eucariótico carecen de secuencias de tipo Shine-Dalgarno (GGAGG), cuya complementariedad con una secuencia 3' del ARNr 16S del ribosoma procariótico parece jugar un papel esencial en el inicio de traducción bacteriano (Shine y Dalgarno, 1974). Sin embargo, se ha postulado en los eucariotas un papel semejante para los posibles emparejamientos entre secuencias conservadas en 5' del ARNm y en 3' del ARNr 18S. La propuesta se ha aplicado a algunos genes de levadura (Zalkin y Yanofsky, 1982) basándose esencialmente en análisis comparativos de secuencias, pero la evidencia directa para apoyar esto es más bien débil. El caso de posible emparejamiento más claro lo proporcionan Hitzeman et al. (1982), que destacan la presencia, al comienzo del mensaje de PGK de un octanucleótido complementario de la secuencia terminal 3' del ARNr 18S.

Algunos ARNm de levadura poseen, a unas diez bases del AUG iniciador una secuencia conservada (PuCACAC) (Dobson et al., 1982; Zalkin y Yanofsky, 1982); aunque se ignora si tiene algún significado funcional, su situación sugiere que podría colaborar en el comienzo de traducción, quizá formando parte del sitio de reconocimiento de los ribosomas (Stiles et al., 1981).

Hasta ahora son pocos los datos disponibles sobre el control de expresión génica en levaduras a nivel de inicio de traducción. El estudio más detallado y prometedor es el reciente informe de Thireos et al. (1984) sobre el gen GCN4 (uno de los cinco que intervienen en la activación de los genes biosintéticos de aminoácidos, y cuyo producto es el encargado de interactuar positivamente con las secuen-

cias UAS conservadas de todos ellos). El transcrito de GCN4 posee una región 5' no traducible excepcionalmente larga (577 bases) en la que existen cuatro tripletes AUG seguido cada uno de ellos, a corta distancia, de un codón de terminación traduccional en fase. Al parecer, esta zona 5' con 4 cortos marcos de lectura debe sufrir alguna modificación post-transcripcional en repuesta a deprivación de aminoácidos lo que provoca un incremento en la eficacia de traducción de la verdadera porción codificadora del polipéptido activador. A su vez, los elevados niveles de producto de GCN4 son responsables de la activación de los genes biosintéticos que están bajo este control general. Otro gen regulador de un circuito diferente, el PRRI, aún no caracterizado en detalle, muestra igualmente una región 5' con cortos marcos de lectura (Losson et al., 1983), lo que sugiere algún mecanismo similar a nivel de traducción.

6.2.3. Secuencias 3' no codificadoras

En la mayoría de los mensajeros eucarióticos el sitio de poliadenilación está precedido, a unas 10-30 bases, de la secuencia canónica AAUAAA. Algunos genes de levadura poseen una secuencia similar en una situación parecida. Así, el gen ADC1 (de la alcohol deshidrogenasa citoplásmica) presenta tres repeticiones de AATAAG , separadas entre sí por trechos de 28 y 24 pares de bases, y que se correlacionan con tres regiones distintas y alternativas de terminación de la transcripción (Bennetzen y Hall, 1982a). Sin embargo, muchos genes de levadura no se ajustan a esta estructura. Zaret y Sherman (1982) propusieron, a la vista de secuencias 3'

de varios genes, que la estructura canónica candidata a constituir la señal de terminación y/o poliadenilación es:

TAT.....TA(T)GT...(zona rica en A+T)...TTT...

Por otro lado, se ha propuesto (Henikoff et al., 1983; Henikoff y Cohen, 1984) que en levaduras la secuencia TTTTTAA, presente en regiones 3' no codificadoras, condiciona la terminación de la síntesis del transcrito a unos 50-90 nucleótidos de ella, con intervención de secuencias adicionales aún no caracterizadas, que podrían suministrar alguna señal para la detención de la ARN polimerasa II, con posterior disgregación del complejo de transcripción.

7. INTRODUCCION Y EXPRESION DE ADN HETERÓLOGO EN LEVADURA

Las posibilidades de la Ingeniería Genética en levaduras no se detienen con los estudios básicos sobre estructura y función génicas. Las levaduras se pueden usar como sistema de ensayo para la expresión de material hereditario de otros organismos, procarióticos o eucarióticos. Los resultados pueden adquirir importancia económica dentro del marco de las nuevas biotecnologías: se pueden obtener, en gran escala, sustancias biológicas cuya purificación a partir de los organismos productores naturales presente problemas o no sea rentable desde el punto de vista comercial. Además, las manipulaciones realizadas en levadura pueden constituir un primer paso hacia la expresión de genes en otros sistemas más complejos. Todo ello puede redundar, en última ins-

tancia, en una mejora de varios procesos de interés agronómico, industrial o farmacológico.

7.1. EXPRESION DE GENES EUCARIOTICOS

Beggs et al. (1980) fueron los primeros en intentar la expresión de un gen de un eucariota superior en levadura. Clonaron el gen de la β-globina de conejo en un vector replicativo de tipc YEp, pero su expresión era anómala: la transcripción comenzaba en sitios incorrectos y se detenía en el segundo intrón del gen, mientras que las secuencias de ARN del primer intrón no eran procesadas.

Kiss et al. (1982) demostraron que el gen de la timidín-quinasa del virus del herpes simple no se expresaba en levadura a no ser que se colocara tras secuencias promotoras de ésta. Estos resultados parecían indicar que la levadura no puede madurar adecuadamente los transcritos en mosaico (con intrones) de genes de otros eucariotas y que para que la transcripción comience correctamente se requieren secuencias regulatorias propias de la levadura. El grupo de Beggs ha investigado posteriormente la especificidad de la maquinaria de "splicing" (Watts et al., 1983): el gen de la alcohol deshidrogenasa de Drosophila fue clonado bajo control transcripcional de S.cerevisiae, estudiándose su capacidad para madurar correctamente los transcritos primarios de dicho gen. Se observó que sólo se eliminaba el primero de los tres intrones; los análisis de secuencia mostraron que este intrón posee muchos rasgos en común con los intrones de levadura, por lo que es lógico que ésta pueda procesarlo normalmente.

La impresión general que se desprende de estos trabajos de expresión de genes en mosaico al introducirse en levadura es que tal expresión será incorrecta si no se elimina previamente el conjunto de los intrones no procesables. Para ello se suele obtener el ADN complementario (ADNc) correspondiente al ARNm maduro, por transcripción inversa in vitro, y se clona dicho ADNc bajo el control de un promotor de levadura. Sin embargo, se ha obtenido algún éxito ocasional de aislamiento directo de ADN genómico de otros eucariotas en base a su complementación de mutaciones cromosómicas de levadura: tal es el caso del gen ADE8 de Drosophila, que es capaz de expresarse en S.cerevisiae (Henikoff et al., 1981).

En uno de los primeros experimentos de expresión heteróloga se obtuvo una pobre expresión de ovoalbúmina de pollo a partir de la región regulatoria del operón lac de E.coli (Mercerau-Puijalon et al., 1980).

Hitzeman et al. (1981) lograron la expresión de un gen humano de interferón (rIFN-αD), colocando su región codificadora (que carece de intrones) tras las secuencias 5' no codificadoras del gen ADC1 (también denominado ADH1). En trabajos posteriores se mejoraron los rendimientos reclonando el gen en vectores de expresión regulables metabólicamente: Tuite et al. (1982) y Hitzeman et al. (1983a) utilizaron el promotor de PGK (fosfoglicerato- quinasa), por lo que la síntesis del interferón quedaba sujeta a control por fuente de carbono no fermentable, mientras que Kramer et al. (1984) emplearon el promotor de PHO5 (fosfatasa alcalina reprimible), que permitía la inducción de la expresión por privación de fuente de fosfato inorgánico.

Dentro de los programas de desarrollo de vacunas "recombinantes" la levadura ha sido elegida como sistema

de expresión en varias ocasiones: en el caso del antígeno superficial del virus de la hepatitis B se pudo producir a partir de la región promotora de ADC1 (Valenzuela et al., 1982) y de PHO5 (Miyanohara et al., 1983); la eficacia de la expresión aumentó clonando el gen del antígeno entre el promotor de PGK y la región 3' no traducible (terminador) de TRP1 (Hitzeman et al., 1983b). Esta región 3' aumenta los rendimientos, ya que suministra señales adecuadas para la correcta terminación y poliadenilación de los transcritos del gen heterólogo. Los vectores de expresión provistos de señales 5' y 3' para insertar el gen a expresar entre ellas (vectores "sandwich") se están imponiendo últimamente, por sus evidentes ventajas (Ammerer, 1983). Abdul-Jabbar et al. (1985) expresaron desde el promotor de ADC1 el ADNc de la hemaglutinina del virus de la gripe provisto de su secuencia líder correspondiente al péptido-señal hidrófobo; la proteína parecía haber sido procesada correctamente por la ruta secretoria de la levadura, mostrando un patrón de glicosilación. Sharma y Godson (1985), igualmente desde ADC1, expresaron la proteína superficial del esporozoito de Plasmodium knowlesi.

Existen más productos de interés médico que se están produciendo en levaduras por técnicas de ADN recombinante. La α_1-antitripsina humana, con potencialidad terapéutica contra el enfisema pulmonar congénito está mereciendo gran atención. Cabezón et al. (1984) clonaron el ADNc correspondiente al gen, entre las regiones 5' y 3' de ARG3, obteniendo niveles de expresión equivalentes a un 1% de la proteína soluble total; simultáneamente Rosenberg et al. (1984) informaron de la creación por mutagénesis dirigida in vitro de una versión del ADNc que era responsable de una forma de antitripsina más resistente a la inactivación por daños

oxidativos a su centro activo.

Existe un informe reciente que podría suponer una puerta abierta para la futura producción de anticuerpos monoclonales por técnicas de fermentación: Wood et al.(1985) han logrado que levaduras manipuladas sinteticen, maduren y segreguen cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, detectando en el medio de crecimiento anticuerpos funcionales, aunque en baja cantidad.

Entre los productos de interés para la industria alimentaria sintetizados en levadura cabe mencionar: la quimotripsina de ternera (Mellor et al., 1983) y la α-amilasa de trigo (Rothstein et al., 1984), recurriendo a un sistema basado en señales de PGK, y la taumatina-II, proteína de sabor dulce presente en los arilos de ciertos frutos tropicales, desde el promotor de GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) (Edens et al., 1984). El interés de estos dos últimos casos estriba en gran medida en que la traducción de los correspondientes mensajeros da proteínas precursoras inactivas que la levadura es capaz de procesar adecuadamente hasta proteínas maduras activas funcionalmente, indicando que los segmentos peptídicos señalizadores son reconocidos para su hidrólisis por el nuevo hospedador. Hasta un 60% de la α-amilasa activa es segregada al medio de cultivo, lo cual facilita su posterior purificación y constituye un factor de abaratamiento de los costes de producción industrial.

Cramer et al. (1985) han clonado en levadura el ADNc de dos genes de faseolina de judía, pero en este caso las señales de inicio y término de transcripción procedían de la misma judía; la transcripción se producía eficientemente según las secuencias señalizadoras foráneas, si bien el nivel de traducción era menor del esperable según el

ARNm. Los polipéptidos de faseolina eran procesados y glicosilados (aparentemente en los sitios naturales), sin ser secretados al exterior.

Un paso prometedor para producir y purificar a bajo coste proteínas heterólogas en levadura ha sido el diseño de vectores de expresión-secreción: suministran señales eficientes para la liberación al medio del polipéptido codificado por el gen clonado. Emr et al. (1983) y Brake et al. (1984) han construído plásmidos que permiten la fusión en fase de genes foráneos con el gen MFα1, que codifica la feromona sexual α de S.cerevisiae. El gen a expresar se inserta en uno de estos vectores tras las secuencias de MFα1, lo cual hace que, en los transformantes se sintetice una proteína híbrida (pre-feromona + producto del gen clonado) que es procesada como si se tratase del precursor de la feromona: de esta manera el producto heterólogo pasa al medio de cultivo, escindido de la porción de la hormona sexual. Mediante este diseño se está logrando la producción de varios productos de interés farmacológico: factor de crecimiento epidérmico humano, factor de liberación de la hormona de crecimiento, interleucina, etc.

7.2. EXPRESIÓN DE GENES PROCARIÓTICOS

Tras los éxitos obtenidos al comienzo de las manipulaciones in vitro al clonarse genes de levadura en base a su expresión funcional en bacterias, se realizaron ensayos en sentido inverso: de este modo se logró la complementación de una mutación leu2 de S.cerevisiae por expresión de un

gen silvestre equivalente (leuB) de E.coli, que codifica la ß-isopropilmalato deshidrogenasa (Storms et al., 1981). Sin embargo, en una primera etapa fueron los genes de resistencia a drogas los que más se utilizaron para estudiar la expresión de secuencias bacterianas en levadura (Hollenberg, 1979, 1982).

La expresión de genes plasmídicos bla (TEM-ß-lactamasas) responsables de resistencia a ampicilinas, se puede poner de manifiesto en levaduras mediante ensayos colorimétricos fáciles (Chevallier y Aigle, 1979; Roggenkamp et al., 1981), si bien la levadura en sí es siempre insensible al antibiótico.

El gen cam^r del transposón Tn9, que codifica una cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) fue clonado íntegro en un vector bifuncional y mostró expresión en levadura, confiriendo a los transformantes capacidad de crecer en medios con fuente no fermentable de carbono en presencia de cloranfenicol (Cohen et al., 1980). Posteriormente se aislaron in vivo plásmidos mutantes derivados del original que expresaban la CAT a niveles muy superiores (Cohen et al., 1983); se demostró que uno de ellos procedía de una delección que había eliminado una secuencia en la que existían dos tripletes ATG previos a la región codificadora de cam^r. Se supone que la desaparición de estos tripletes (que podrían dar inicios anómalos de traducción de cam^r en levadura) es responsable de que los mutantes sean más resistentes a la droga, pero quedaría por aclarar la base molecular de la expresión "basal" en la construcción genética primitiva.

Los primeros informes sobre expresión en levaduras de genes de resistencia a antibióticos abrían la posibilidad de disponer de marcadores dominantes para selección

positiva de transformantes en S.cerevisiae, eventualmente aplicables a otros sistemas eucarióticos. En este sentido fue esencial el trabajo de Jiménez y Davies (1980), quienes introdujeron y expresaron en levadura un gen del transposón Tn601(903) que codifica una fosfotransferasa inactivadora de ciertos antibióticos aminoglucosídicos. Las correspondientes levaduras transformantes podían crecer en presencia de G418, antibiótico estructuralmente relacionado con la gentamicina; la incorporación del gen en vectores bifuncionales permite la selección directa de los transformantes en base a la resistencia a la droga (Webster y Dickson, 1984). Otro gen de resistencia expresado en levaduras es el de la higromicina-B-fosfotransferasa (Gritz y Davies, 1983; Kaster et al., 1984), aunque en este caso se emplearon secuencias de inicio transcripcional de levadura.

Muchos de los primeros experimentos no fueron acompañados de una caracterización molecular que aclarara a qué niveles de secuencia comenzaba y terminaba la transcripción de los genes bacterianos. Teniendo en cuenta que en estos trabajos no solía manipularse previamente los genes bacterianos (incluyendo sus propios promotores), pudiera ser que se estuvieran expresando a partir de sus propias secuencias en 5´ (como parece ser el caso de bla: Breunig et al., 1982), aunque también cabe la posibilidad de que la construcción de los plásmidos los haya colocado tras secuencias del vector capaces de actuar como señales para la ARN-polimerasa II (Guarente, 1983; Langeveld et al., 1985).

Existen ejemplos posteriores de genes bacterianos a los que no se les fusionaron secuencias promotoras de levadura y que se han expresado en ésta: el producto primario de ompA, uno de los genes de proteínas de la mem-

brana externa de bacterias Gram-negativas, fue sintetizado y procesado hasta proteína madura por levaduras transformantes (Janowicz et al., 1982); el gen polA de la ADN-polimerasaI (Spanos y Sedwick, 1984); el gen phr de la enzima fotorreactivante de E.coli (Langeveld et al., 1985); el de la citosina-metilasa, de modificación específica de Bacillus sphaericus confiere al ADN de levaduras resistencia parcial a la endonucleasa BspRI (Fehére et al., 1983); el gen dam, de la adenosina-metilasa de E.coli induce igualmente en S.cerevisiae un patrón parcial de metilación (Hoekstra y Malone, 1985); la descarboxilasa G2 de Pseudomonas pudo ser sintetizada por levaduras a partir de un gen no manipulado (Clarke et al.,1985).

Entre las proteínas bacterianas expresadas en levadura recurriendo a promotores de ésta cabe citar: la galactoquinasa de E.coli, cuyo gen, galK, fue colocado tras las secuencias regulatorias de CYC1 (Rymond et al., 1983), y la endonucleasa EcoRI, desde el promotor inducible de GAL1 (galactoquinasa de levadura) (Barnes y Rine, 1985); en este último caso se demostró que en condiciones de inducción de GAL1, la enzima EcoRI sintetizada entraba en el núcleo y rompía el ADN, llevando a la muerte de las células de levadura transformantes.

En la literatura ha quedado constancia igualmente de intentos fallidos de expresar genes bacterianos no alterados en levadura: así ocurrió con el gen lysA de E.coli (Chenais et al., 1981) y con un gen plasmídico codificador de dihidrofolato reductasa; en este último caso hubo de recurrirse a fusiones génicas con promotores de S.cerevisiae para lograr la expresión efectiva, de modo que los transformantes pudieran crecer en medios con metotrexato y sulfanilamida

(Miyajima et al., 1984). Tampoco hubo expresión de una porción del ADN-T del plásmido Ti de Agrobacterium, a pesar de que los genes de dicha región son de tipo eucariótico y se expresan en plantas, si bien eran detectables moléculas de ARN correspondientes (Hirsch y Beggs, 1984).

7.3. CLONACION DE GENES nif EN LEVADURAS

Como fruto de los intensos estudios genéticos que sobre los genes nif de K.pneumoniae se venían realizando desde la década de los sesenta, se pudo disponer de una amplia colección de genes clonados en distintos vectores. La región completa nif había sido aislada originalmente en un experimento de recombinación in vivo que implicó al plásmido RP4 (un plásmido conjugativo del grupo IncP1, de amplio espectro de hospedadores entre las bacterias Gram-negativas) y a una amplia zona cromosómica de K.pneumoniae que incluía el regulón de fijación de nitrógeno. El plásmido resultante (hoy conocido como pRD1: Dixon et al., 1976) sirvió para transferir y expresar los genes nif en otras enterobacterias (véase el apartado 3.2.1). La región nif, portada en dos fragmentos HindIII adyacentes, fue reinsertada in vitro en vectores que permitían su fácil manipulación, dando lugar a pWK120 y pWK220 (Pühler et al., 1979; Riedel et al., 1979).

Una vez disponible la técnica de transformación de levaduras y conocidos los primeros éxitos en la expresión heteróloga, era tentadora la idea de introducir los genes nif en este eucariota, como sistema modelo. Gerbaud et al.,

fabricaron un plásmido lanzadera de tipo YEp, y clonaron en él el regulón nif completo. Las construcciones híbridas resultantes se mantenían en levadura, pero no había indicios de expresión de los genes de fijación.

Se han introducido los genes nif de K.pneumoniae en levadura empleando un sistema de cotransformación (Zamir et al., 1981; Compton et al., 1982). En este sistema se usan dos plásmidos: uno lanzadera de tipo integrativo que porta un típico marcador de levadura, y un plásmido totalmente bacteriano (el pWK220 ya citado) que lleva los genes nif; ambos plásmidos comparten una región de homología consistente en un gen de resistencia a tetraciclina, habitualmente usado en los vectores genéticos; tras la introducción de los dos plásmidos en una misma célula se pueden producir dos fenómenos independientes de recombinación homóloga: el vector lanzadera se integra por recombinación entre el marcador seleccionable y la versión alélica cromosómica; a su vez, el plásmido bacteriano nif se recombina con el otro por medio de sus secuencias de resistencia comunes; con ello se logra que la región nif quede genéticamente ligada a la zona cromosómica del marcador de levadura, mostrando caracteres de estabilidad y segregación propios de los sistemas de transformación integrativos. Tampoco en estos experimentos se pudo evidenciar en absoluto la expresión, a cualquier nivel, de las secuencias de fijación de dinitrógeno.

OBJETO DEL TRABAJO

Según se ha expuesto en páginas anteriores, aunque la introducción de los genes de la fijación del dinitrógeno en levadura es una cuestión técnica resuelta, muy otro resulta el caso cuando se pretende su expresión funcional. Dicha expresión se encuentra con una serie de problemas derivados de las diferencias entre los sistemas de transcripción y traducción de procariotas y eucariotas, y de las peculiaridades estructurales y funcionales del complejo de la nitrogenasa, así como de sus requerimientos energéticos, de transporte electrónico, etc.

Aprovechando la nueva genereración de vectores bifuncionales diseñados para S.cerevisiae, intentamos expresar el gen nifH de K.pneumoniae, responsable de la codificación del polipéptido de la ferroproteína Kp2, bajo el control, en levadura, de un promotor eficiente, salvando de este modo la barrera transcripcional. Se han manipulado las secuencias bacterianas 5' no codificadoras previas a nifH con objeto de evitar obstáculos para el correcto inicio de la traduccion del mensaje de la ferroproteína en la levadura.

Diversos experimentos encaminados a demostrar en las levaduras transformadas con las construcciones genéticas la transcripción y traducción de las secuencias bacterianas son descritos, comentándose los niveles de expresión logrados a la luz de diversos datos sobre la biología molecular de S.cerevisiae.

En el curso del trabajo se ha desarrollado un nuevo vector de expresión que muestra una mayor estabilidad mitótica en levadura.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS.

Las estirpes bacterianas y de levadura empleadas en este trabajo, junto con sus características genotípicas y procedencia, quedan reflejadas en la Tabla 1.

Las cepas GM4, JA221 y HB101 de Escherichia coli sólo fueron usadas como hospedadoras iniciales y fuentes de los plásmidos pSA30, pAAR6 e YEp13, respectivamente. Las moléculas de ADN híbrido conseguidas a lo largo de este estudio fueron introducidas y amplificadas rutinariamente en la cepa MC1061, de gran competencia hacia plásmidos.

Para los ensayos in vitro de actividad nitrogenasa la fuente de los extractos de K.pneumonie fue la estirpe CK2601 (un mutante nifH no polar), con UN como control positivo.

Todas las pruebas con levadura se realizaron con la raza 830 de Saccharomyces cerevisiae .

2.-SISTEMAS GENETICOS.

Se describen a continuación las peculiaridades más relevantes de los tres plásmidos empleados como material de partida para los experimentos descritos en esta memoria;

Tabla 1: CEPAS MICROBIANAS EMPLEADAS

Cepas y denominación	Genotipo o fenotipo	referencia
E.coli K12		
MC1061	*araD139*, Δ(*ara*, *leu*)*7697*, Δ *lacX74* *galU*, *galK*, *hsr*$^-$, *hsm*$^+$, *strA*.	a
JA221	*leuB6*, *lacY*, *trp* Δ*E5*, *recA*, *hsr*$^-$, *hsm*$^+$.	b
GM4	*pro*, *leu*, *thi*, *lacY*, *End*$^-$, *recA*, *hsr*$^-$, *hsm*$^+$, *strR*.	Dr. Cannon
HB101	*recA*, *hsr*$^-$, *hsm*$^+$.	c
K. pneumoniae		
UN (=M5a1)	tipo silvestre	Dr. Cannon
CK2601	*nifH2260*, *hsdR1*, *rpsL4*	d
S. cerevisiae		
830	*MATa*, *his4-713*, *leu2-3*, *trp1-6*	Dr. A. Jiménez

Referencias: a) Casadaban y Cohen(1980); b) Beggs (1978); c) Boyer y Roulland-Dussoix (1969); d) Kennedy, (1977).

en la Tabla 2 se resumen algunos de los rasgos de dichas moléculas.

2.1.-FUENTE DEL OPERÓN nifHDKY: pSA30 (Fig 6)

El plásmido pSA30 (Cannon et al., 1979) deriva de la inserción del fragmento EcoRI de 6.8 Kb. portador del operón de los genes estructurales de la nitrogenasa de K.pneumoniae en el vector pACYC184 (Chang y Cohen, 1978). Este vector se construyó a partir de un pequeño plásmido críptico (p15A) de E.coli, y está aparentemente relacionado con ColE1, aunque es compatible con él. Se comporta como plásmido de control relajado de replicación, siendo su número de copias amplificable en presencia de cloranfenicol o espectinomicina.

2.2.- VECTOR BIFUNCIONAL DE EXPRESIÓN: pAAR6. (Fig 7)

Se ha recurrido a uno de los últimos vectores lanzadera desarrollados: el pAAR6, descrito por Ammerer (1983) y enviado a nosotros previamente a su publicación. Sus principales características son:

a) secuencias bacterianas: derivadas de pBR322,de Bolívar et al. (1977). Por lo tanto, el origen de replicación funcional en E.coli es el de ColE1 (control relajado y amplificable). Como marcador seleccionable en bacterias retiene el de resistencia a ampicilina (Ap^r).

b) Secuencias de levadura: por un lado, fragmento de 1.45 Kb. del cromosoma IV de S.cerevisiae, clonado originalmente por Tschumper y Carbon (1980), y que contiene el gen TRP1 y la secuencia ARS1. El primero confiere la capacidad de complementar mutaciones trpC de E.coli y trp1

Tabla 2: CARACTERISTICAS DE LOS VECTORES EMPLEADOS

VECTOR:	pSA30	pAAR6	YEp13
marcadores (*E. coli*)	tet^r	amp^r, *TRP1*	amp^r, tet^r, *LEU2*
marcadores (*S.cerevisiae*)	-	*TRP1*	*LEU2*
replicón en bacterias	P15A	ColE1	ColE1
replicón en levaduras	-	*ARS1*	ORI 2μm
vector de donde deriva	pACYC184	YRp7	pBR322
otros rasgos de interés	*nifHDKY*	promotor y terminador de *ADC1*	-

Los símbolos usados en los mapas de restricción son los siguientes: E= *EcoR*I, H= *Hind*III, S= *Sal*I, P= *Pst*I, B= *Bam*HI, BG= *Bgl*II . Los símbolos entre parentesis indican sitios destruidos por la construcción genética.

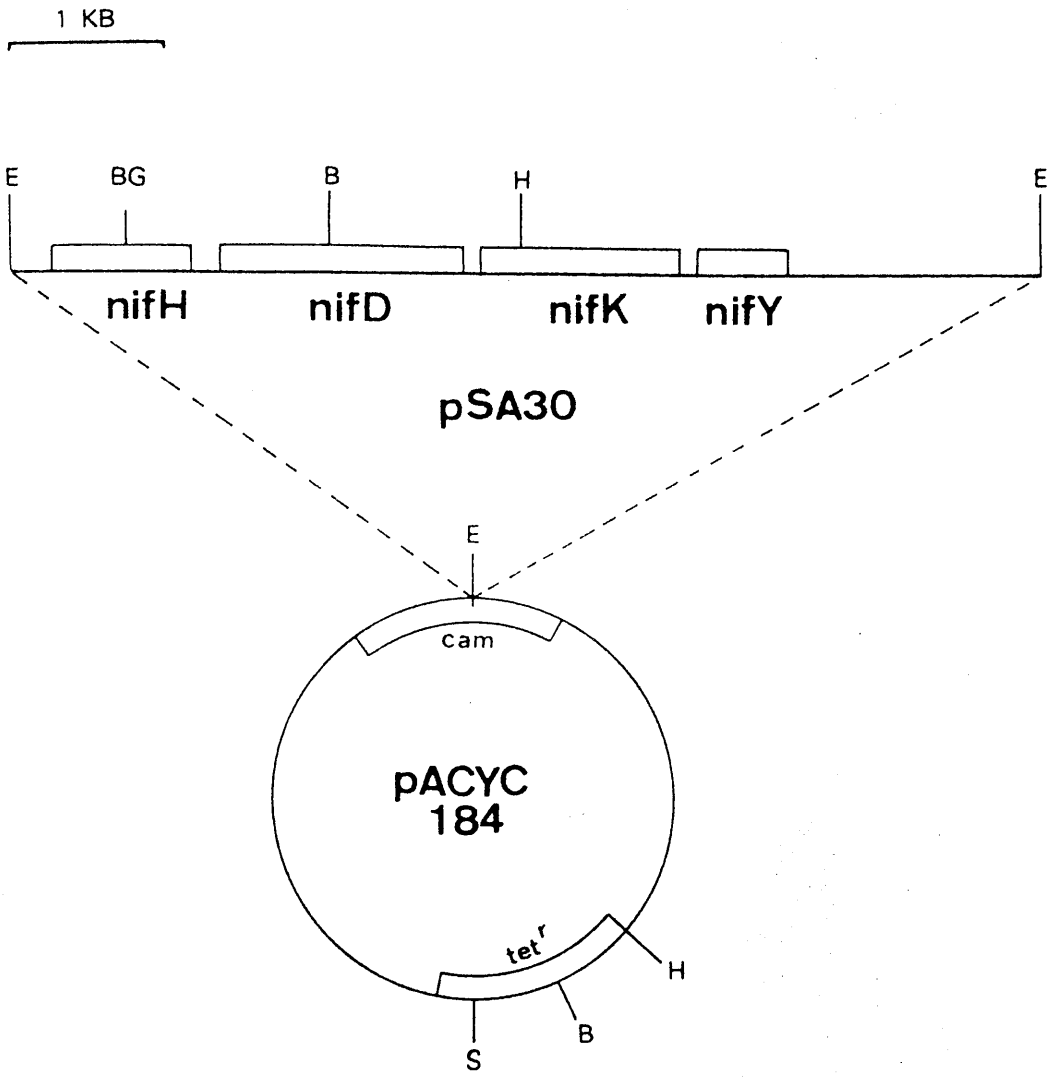


Fig 6: Mapa genético-físico de pSA30. El vector pACYC184 se ha representado al doble de tamaño según la escala superior.

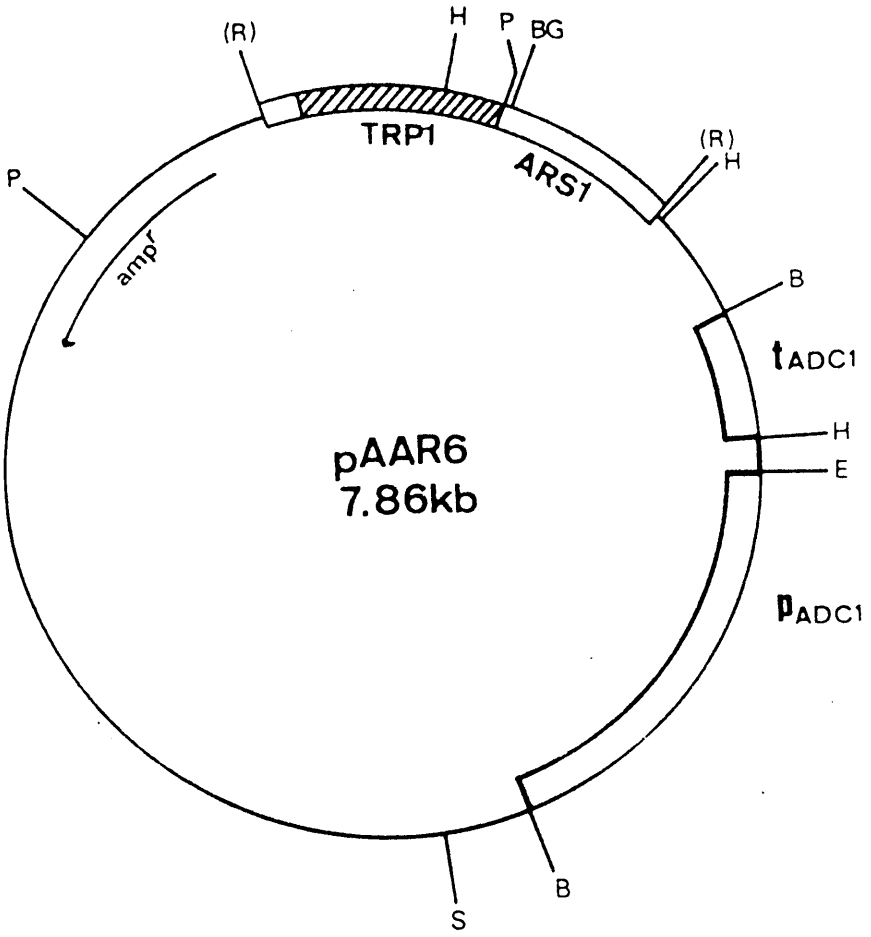


Fig 7: Mapa genético-físico de pAAR6, vector bifuncional de expresión

de S.cerevisiae. La secuencia de replicación autónoma ARS1 mantiene a la molécula en estado plasmídico dentro de levadura.

Las características de sistema para facilitar la expresión de genes clonados (plásmido de tipo "sandwich") le son conferidas por un fragmento BamHI que consta de las siguientes partes:

a) segmento BamHI-EcoRI de unas 1500 p.b. (construido por Hitzeman et al., 1981). Contiene la región flanqueante 5' no codificadora del gen ADC1 (de la alcohol-deshidrogenasa ADH-I), desde la coordenada -1500 a la --15 ("promotor": Fig 8a En posición -128 comienza una típica secuencia de Goldberg-Hogness. Los inicios del ARNm maduro corresponden a las coordenadas -37 y -27.

b) A continuación, un pequeño segmento adaptador EcoRI-HindIII, de 105 pb , procedente del plásmido 2µm.

c) Finalmente, un segmento HindIII-BamHI, de 450 pb que abarca las últimas 133 bases codificadores del gen ADC1 y su región 3'no traducible correspondiente ("terminador": Fig 8b). Hay tres zonas donde se puede producir la poliadenilación del ARNm, pero la mayoritaria está centrada alrededor de la coordenada +1132, a 85 nucleótidos del codón de final de traducción (Bennetzen y Hall, 1982a).

2.3.-FUENTE DEL REPLICADOR DE 2µm: YEp13. (Fig 9)

El vector bifuncional YEp13 sirvió como material de partida para obtener y purificar el origen de replicación del plásmido 2 µm de levadura. Su construcción está descrita en Broach et al. (1979). Consiste, en esencia, en un pBR322 al que se le ha insertado el fragmento pequeño EcoRI de la forma B del 2 µm, más un fragmento portador

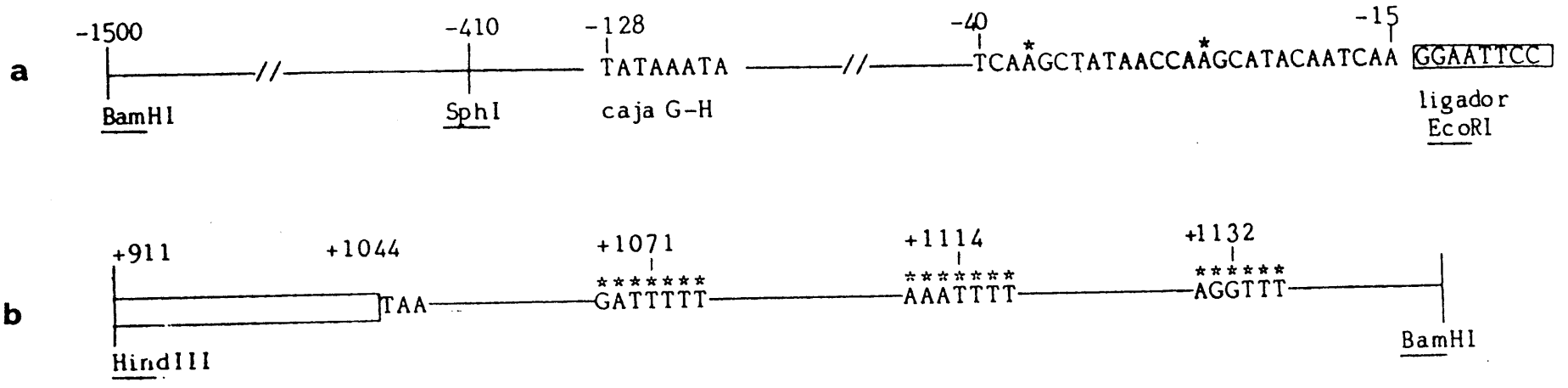


Fig 8a: Esquema del segmento BamHI-EcoRI del vector pAAR6 portador de la región promotora del gen ADC1. Se indica la caja de Goldberg-Hogness (G-H) y los sitios de inicio de la transcripción (*). Los números de coordenadas están referidos a los originales del gen ADC1 silvestre, considerando como +1 el primer nucleótido codificador (Hitzeman et al., 1981)

Fig 8b: Esquema del segmento HindIII-BamHI de pAAR6, que contiene el extremo 3' codificador de ADC1 y la región de terminación y poliadenilación de la transcripción del mismo gen. Se indican (*) los puntos del ADN equivalentes a los extremos 3' del ARNm (excluyendo la cola de poliadenina). Las coordenadas son las originales del gen ADC1 (Bennetzen y Hall, 1982a).

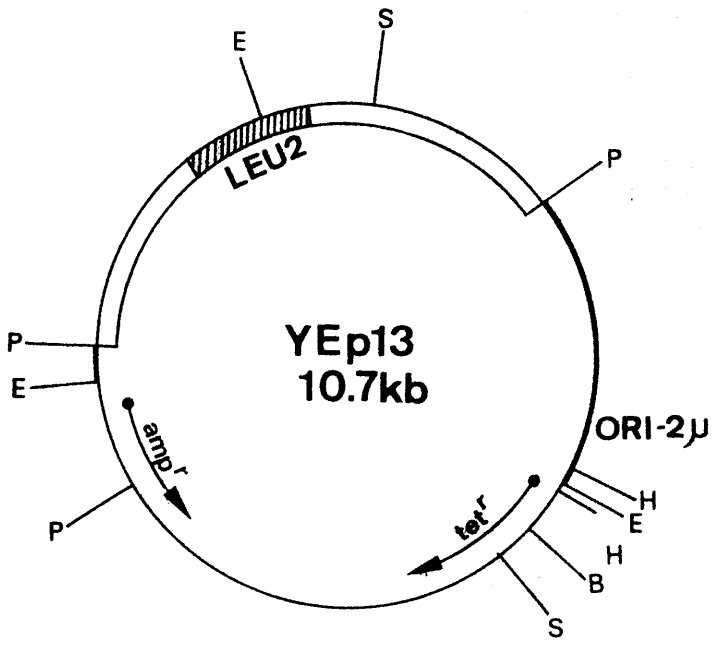


Fig 9: Mapa genético-físico del vector bifuncional YEp13

del gen LEU2, para selección en mutantes adecuados de levadura.

3. MEDIOS DE CULTIVO.

Excepto donde se indique, las fórmulas de los medios de cultivo van referidas a un litro de agua destilada. Para los medios líquidos correspondientes, se omite el agar. Los medios se esterilizan en autoclave, a 121ºC durante 15 min., salvo los que incluyen glucosa, que son sometidos a 115ºC durante 30 min.

3.1.-MEDIOS PARA LAS ESTIRPES BACTERIANAS.

Medio completo LB (Miller, 1972)

Es el medio que, convenientemente suplementado con antibióticos, sirvió para aislar transformantes bacterianos, o para los aislamientos en pequeña escala de plásmidos. Su composición es:

Bacto triptona (Difco)	12 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	1 g
Agar	20 g
pH ajustado a 7-7.5	

Medio semisintético M9CA (Maniatis et al. 1982)

Convenientemente suplementado con requerimientos nutritivos y con antibióticos, es el medio empleado para crecer en

gran escala las cepas de E.coli de las que se aislan plásmidos. Para su preparación, en un litro de agua destilada se disuelve:

fosfato disódico	6 g
fosfato monopotásico	3 g
cloruro sódico	0,5 g
casaminoácidos (Difco)	2 g
pH ajustado a 7.4	

Tras esterilizar y enfriar esta solución, se añade, en condiciones asépticas, los siguientes volúmenes de soluciones acuosas:

sulfato magnésico 1M	2 ml
glucosa 20%	10 ml
cloruro cálcico 1M	0.1 ml
tiamina 0.5 $mg.ml^{-1}$	2 ml

La tiamina es esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22µm de poro.

Medio NFDM (Cannon, 1980)

Este medio exento de nitrógeno combinado se empleó para desreprimir la expresión de los genes de fijación de dinitrógeno, en anaerobiosis, por K.pneumoniae. Para obtener un litro se preparan y se esterilizan por separado las dos siguientes soluciones:

Solución A

sulfato magnésico heptahidratado	0.1 g
molibdato sódico dihidratado	0.025 g
sulfato ferroso	0.025 g
glucosa	20 g
agua destilada	100 ml

Solución B

fosfato dipotásico	12.06 g
fosfato monopotásico	3.4 g
agua destilada	100 ml

Una vez esterilizadas y frías, ambas soluciones se mezclan en condiciones asépticas.

Medio DM

Es idéntico al NFDM, excepto que incluye 10mM de sulfato amónico.

3.2.- MEDIOS PARA LEVADURAS.

Medio NG

Este medio semisintético se ha usado para recuentos de levaduras totales en placas.

sulfato magnésico heptahidratado	1 g
fosfato monopotásico	2 g
sulfato amónico	3 g
peptona seca de carne	3.6 g
extracto de levadura (Oxoid)	4 g
glucosa	10 g
agar	20 g

Medio YEPD

En su versión de caldo, se usó para cultivar las estirpes de levadura que iban a ser sometidas a transformación.

extracto de levadura	10	g
peptona seca de carne	20	g
glucosa	20	g
pH ajustado a 4-4.5		

Solución YNB

Se trata de una solución que contiene todas las vitaminas y minerales requeridas por la levadura para crecer. Se prepara concentrada (x20) disolviendo 13.4 g de "Bacto Yeast Nitrogen Base" (Difco) en 100 ml de agua destilada, y esterilizando por filtración. Se guarda en oscuridad a 4-8ºC.

Medio MGCA

Este medio incorpora todas las sales, vitaminas y aminoácidos, a excepción del triptófano. Para prepararlo, se disuelven en 950 ml de agua destilada:

glucosa	20	g
casaminoácidos (Difco)	5	g
agar purificado	17	g
pH ajustado a 4-4.5		

Una vez esterilizada, la mezcla se deja enfriar hasta 45ºC y se añaden 50 ml de solución concentrada de YNB(x20), repartiéndose en placas en el caso de medio sólido.

Medio de regeneración MR

Es un medio hipertónico para la regeneración de los esferoplastos de levadura y selección de los transformantes Trp^+. Incluye sorbitol a una elevada concentración, que suministra la tonicidad adecuada para evitar el choque osmótico.

glucosa	20 g
sorbitol	182 g
casaminoácidos	5 g
YEPD líquido	10 ml
agar purificado (Difco)	25 g
agua destilada	950 ml

Una vez esterilizada la mezcla anterior, se deja enfriar hasta 50ºC y se completa con 50 ml de solución YNB(x20).

4.-ANTIBIOTICOS.

Los antibióticos y concentraciones empleados en los medios de cultivo para seleccionar el mantenimiento de plásmidos portadores de resistencia son los siguientes:

ampicilina (sal sódica)(Sigma)	50 $mg.l^{-1}$
tetraciclina base (Sigma)	10 $mg.l^{-1}$
cloranfenicol (Sigma)	50 $mg.l^{-1}$

5.- METODOS DE AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO.

5.1.- AISLAMIENTO RAPIDO A PARTIR DE PEQUEÑOS CULTIVOS

Se aplicó el procedimiento de la lisis alcalina de Birnboin y Doly(1979), con modificaciones.

Cada clon del que se desea aislar ADN es inoculado en 2 ml de caldo LB adicionado del antibiótico para

el cual el plásmido codifica resistencia. Se deja crecer a 37ºC en agitación durante 12-16 h. Con cada cultivo se llena un tupo Eppendorf (1,7 ml), que se centrifuga a 12000g durante 1 min a temperatura ambiente. Eliminado el sobrenadante, el sedimento se resuspende en 0.1 ml de solución lítica (50mM glucosa, 10mM EDTA-Na_2, 25mM tris-ClH pH8.0, 4mg.ml^{-1} lisozima) y se deja a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se añaden 0.2 ml de solución de SDS alcalina (1% dodecil-sulfato sódico, 0.2N NaOH) y se mezcla por inversión repetida del tubo (4-5 veces). Se incuba sobre hielo durante 5 min. tras los cuales se procede a la renaturalización selectiva del ADN plasmídico añadiendo 0.15 ml de una solución preenfriada (4ºC) de acetato potásico (3M en K^+ y 5M en acetato; pH 4.8) y agitando vigorosamente en vórtex, dejando en frío durante 5-10 min. Tras centrifugar a 12000g durante 10 min., a 4ºC, el sobrenadante se transfiere con micropipeta a un tubo nuevo. Las muestras se desproteinizan por fenolización: una extracción con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1), seguida de otra con cloroformo:isoamilalcohol (24:1). La La precipitación del ADN de la fase acuosa final se provoca a temperatura ambiente, mezclándola con 0.6 volúmenes de isopropanol y dejando 5-10 min en reposo. El ADN se sedimenta por centrifugación (12000g, 5min), se descarta el sobrenadante, y el material recogido se seca brevemente al vacío, resuspendiéndose finalmente en 50 µl de tampón TE8 (10mM tris-ClH pH8.0, 1mM EDTA-Na_2) adicionado de ribonucleasa pancreática (20 mg.l^{-1}; precalentada a 100ºC, durante 10 min).El ADN así preparado se puede usar para varios análisis de restricción y en muchas manipulaciones in vitro.

5.2.-AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA

Cuando se pretendía obtener gran cantidad de ADN plasmídico en forma purificada, se procedió de la siguiente manera:

Se preinocula con la cepa bacteriana en cuestión 5 ml de caldo M9CA suplementado con la concentración adecuada del antibiótico para el que confiere resistencia el plásmido, incubándose a 37ºC con aireación durante 16 h. El cultivo definitivo se establece diluyendo el precultivo 1:250 en un litro de medio fresco M9CA+antibiótico e incubando a 37ºC con agitación vigorosa, hasta que la D.O. alcance un valor de 0.5-0.7 (a 600 nm), en que se añade cloranfenicol a una concentración final de 200 $mg.l^{-1}$, prolongándose la incubación en las mismas condiciones durante 12-16 horas más, al objeto de lograr la amplificación selectiva del número de copias del plásmido.

El litro de cultivo se recoge y se enfría sobre hielo. (A partir de aquí, hasta que se diga lo contrario, todos los pasos se realizan en frío, con soluciones previamente mantenidas a 4ºC). Las células se recogen por centrifugación y se lavan en 200 ml de tampón 50mM Tris-ClH (pH8.0), 5mM EDTA-Na_2 . Tras una posterior centrifugación, las células se resuspenden en tampón de lisis (25mM sacarosa, 50mM tris-ClH; pH8.0, 5mM EDTA-Na_2 , $5mg.ml^{-1}$ lisozima). Se incuba sobre hielo durante 30 min, tras los cuales se adicionan secuencialmente las siguientes soluciones acuosas (mezclando por repetidas inversiones entre una y otra): 2.5 ml de 0.5M de la sal tetrasódica de EDTA, 1.6 ml de Brij-35 (Sigma) al 5%, y 0.5 ml de desoxicolato sódico al 5%. El tubo se deja sobre hielo otros 20 min.

Los restos celulares y una buena parte del ADN cromosómico son eliminados por sedimentación en una centrifugación a 30000g, durante 30 min a 4ºC, recogiéndose el sobrenadante. Para purificar el ADN plasmídico de éste se recurre a ultracentrifugación en gradientes de densidad de cloruro de cesio, con bromuro de etidio como agente intercalante en las cadenas del ADN. Por cada ml de sobrenadante se disuelve 1 g de ClCs sólido puro y bromuro de etidio (BrEt) hasta 0.6mg.ml^{-1} . La centrifugación se lleva a cabo a 16ºC, en un aparato Beckman L5-50, empleando un rotor vertical VTi65, a 45000rpm durante 12 h, o bien un rotor Ty50, a 38000rpm durante 40 h.

Las dos bandas de ADN formadas en la centrifugación son patentes a simple vista, pero se visualizan mejor iluminando los tubos con luz ultravioleta (de longitud de onda larga, para minimizar los daños en el ADN). La banda inferior, plasmídica, se extrae por punción y succión a través de una aguja del nº21 o similar.

La eliminación del BrEt se realiza mediante extracciones sucesivas (5-6) con volúmenes iguales de una mezcla de isopropanol:agua (9:1), hasta que la fase acuosa (inferior) se muestre incolora. Para precipitar el ADN, se procede primero a diluir el ClCs, por mezcla con dos volúmenes de agua destilada; entonces se añaden seis volúmenes de etanol absoluto (preenfriado a -20ºC), dejándose a -20ºC durante 2-3 h. El ADN se sedimenta por centrifugación, en rotor Sorvall SS34, a 15000rpm, durante 20-30 min, a 0ºC, y se lava 1-2 veces con etanol al 70% en agua, preenfriado. El sedimento se seca brevemente al vacío (2-3 minutos) y se resuspende en 0.1-0.2 ml de tampón TE al pH deseado.

6.-EXTRACCION DE ARN DE LEVADURA.

El método aplicado por nosotros es una adaptación de varios procedimientos, principalmente los descritos por Zitomer y Hall(1976) y por Ammerer y Ruis (1979).

El problema esencial a la hora de obtener ARN intacto es evitar la actuación de toda ribonucleasa. Para ello, se ha de tratar todo el material de plástico y vidrio con una solución acuosa al 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC), durante 2-12 h a temperatura ambiente, tras lo cual se esteriliza al autoclave o al horno. Todas las soluciones y tampones (a excepción del SDS y la cicloheximida) van suplementados con 0.1% DEPC y se esterilizan en autoclave.

Las estirpes de levadura se hacen crecer en 200 ml de caldo MGCA (suplementado con 30 $mg.l^{-1}$ de triptófano en el caso de la cepa original 830 sin transformar) hasta que su D.O. llega a a 0.6-0.8 (a 600nm). Se añade entonces cicloheximida (Calbiochem) hasta 100$mg.l^{-1}$, dejando en agitación a 30ºC durante 5 min. Cada cultivo se enfría rápidamente sobre hielo y se centrifuga a 4ºC, lavándose el sedimento de células dos veces en alícuotas de 40 ml de tampón 10mM Tris-ClH (pH7.5), 10mM acetato amónico, 10mM cloruro potásico, 100$mg.l^{-1}$ cicloheximida. Las células, tras el segundo lavado son recogidas y adicionadas de 1 g de perlas de vidrio (de 0.45mm de diámetro) y de 4 ml de una mezcla a partes iguales de tampón LETS (100mM Tris-ClH; pH7.5, 100mM cloruro de litio, 1mM EDTA-Na_2) y fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1). Se agita el tubo en vórtex, a la máxima intensidad, durante 10 min. Las mezclas se centrifugan a 10000g durante 15 min a 4ºC. La fase acuosa superior se pasa a un tubo nuevo, mientras

que la interfase lechosa y la fase orgánica inferior se reextraen con otros 4 ml de LETS. Tras centrifugar, se decanta la nueva fase acuosa y se mezcla con la primera obtenida. El volumen resultante se extrae dos veces con volúmenes iguales de fenol:cloroformo:isoamilalcohol; para cada extracción se mezcla vigorosamente en vórtex, durante 5-10 min, se separan las fases por centrifugación, y se transfiere la fase acuosa a tubo limpio. De esta fase acuosa se elimina el fenol residual extrayendo una vez con un volumen igual de cloroformo:isoamilalcohol (24:1). El ARN se precipita ajustando la concentración de acetato sódico a 0.2M, mezclando con tres volúmenes de etanol absoluto y dejando en reposo a -20ºC durante unas 12 h, tras las cuales se sedimenta por centrifugación a 12000g, durante 30 min, a 4ºC. Desechado el sobrenadante el ARN del fondo del tubo es secado al vacío, se resuspende en agua destilada y se reprecipita ajustando la concentración de acetato sódico (pH5) a 3M, dejando a 4ºC durante 2-12 h. Se centrifuga a 12000g, 20 min, a 4ºC y se lava dos veces con 20 ml de una mezcla 7:3 de etanol absoluto: 0.4M acetato sódico. Se seca al vacío y finalmente se resuspende en 1 ml de agua destilada. Las preparaciones se conservan a -75ºC hasta su uso.

7.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y ARN

Las preparaciones purificadas de ADN o ARN fueron valoradas rutinariamente por determinación espectrofotométrica de su absorción a 260nm, usando un espectrofotómetro Hitachi 100-80A.

Para el ADN de cadena doble se asume que 1A (a 260nm) equivale a 50 $\mu g.ml^{-1}$, y para el ARN la equi-

valencia está en 40µg.ml $^{-1}$.

En todas las preparaciones se determina asimismo la absorbancia a 280nm. La relación A_{260}/A_{280} es un índice de la pureza de la preparación. Se consideraron aceptables preparaciones de ADN con índices 1.8-2.0 y de ARN con índices 2.0-2.2.

8.- MANIPULACIONES in vitro DE MOLECULAS DE ADN

A continuación se describen las técnicas empleadas en este trabajo para modificar in vitro el ADN, incluyendo : restricción, ligado, tratamiento con polimerasas, fosforilasas, quinasas y nucleasas. En la actualidad existen buenos manuales de métodos de "Ingeniería Genética" que facilitan grandemente muchas labores de laboratorio. Las técnicas aquí descritas provienen en parte de estos manuales, con las modificaciones que la práctica personal y recomendaciones de otros han ido introduciendo. Las recopilaciones de protocolos más consultadas han sido las de Maniatis et al.(1982), Rodríguez y Tait (1983), y los volúmenes de "Methods in Enzymology" dedicados al ADN recombinante (vol. 68 , 100 y 101.).

8.1.- DIGESTION DEL ADN POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las restrictasas empleadas en este trabajo se obtuvieron de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU)

y de Ingenasa (Madrid). En vez de usar un tampón distinto para cada enzima, se preparó un tampón base (tampón "Endo") que se preparaba a distintas fuerzas iónicas, según el tipo de enzima. La composición de las distintas versiones del tampón (a concentración x10 respecto de la presente en la mezcla de reacción) es:

	NaCl	Tris pH7.5	$MgCl_2$	DTT
Tampón Endo-bajas sales	-	100mM	100mM	10mM
Endo-medias sales	0.5M	100mM	100mM	10mM
Endo-altas sales	1.5M	500mM	100mM	10mM

La enzima BglII fue usada en un tampón especial cuya composición (en su fórmula concentrada x10) es: 200mM glicina (ajustada a pH9.5 con NaOH), 100mM $MgCl_2$, 70mM 2-mercaptoetanol.

Todos los tampones se esterilizan por filtración y se conservan congelados (-20ºC) en pequeñas alícuotas.

Por lo general, la reacción se lleva cabo durante 1-2 h a 37ºC. La enzima se inactiva por adición de EDTA-Na_2 hasta10mM o, en aquellas nucleasas susceptibles, por calentamiento a 65ºC durante 5-10 min.

8.2.- Nucleasa Bal-31

El preparado de esta exonucleasa provenía de New England Biolabs. La reacción catalizada por esta enzima se realizó en un tampón 20mM Tris-ClH (pH8.0), 1mM EDTA-Na_2, 12mM cloruro cálcico, 12mM cloruro magnésico y

200mM cloruro sódico.

8.3.- LIGADO DE ADN

Se empleó la ADN-ligasa del fago T4 (New England Biolabs). El tampón de ligado concentrado(x10) consiste en 500mM Tris-ClH (pH7.8), 100mM $MgCl_2$, 200mM ditiotreitol, 10mM ATP y 500 $\mu g.ml^{-1}$ seroalbúmina bovina. La reacción entre moléculas con extremos mutuamente cohesivos se realizaba en volúmenes de 20 µl, con 400 unidades del enzima y una concentración de terminales 5'-P de 0.1-1 µM, incubándose por lo general a 4ºC durante 12 h. Para el ligado de moléculas con los extremos romos, la reacción se llevaba en 20 µl de mezcla de reacción, con 800 unidades de ligasa e incubación a 16ºC durante 12 h.

8.4.- DESFOSFORILACIÓN DE EXTREMOS DE ADN LINEAL

Se realizó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de buey, de la firma Boehringer, siguiendo el protocolo de Maniatis et al. (1982), en tampón CIP : 50mM Tris-ClH (pH9.0), 1mM cloruro magnésico, 0.1mM cloruro de zinc, 1mM espermidina. Como única modificación, la temperatura de incubación fue de 65ºC.

8.5.-FOSFORILACIÓN DE EXTREMOS 5'-OH

En nuestro trabajo, la reacción de fosforilación de extremos 5' desfosforilados se empleó en dos tipos de experimentos: preparación de ligadores sintéticos (ver método 8.8.1) y en una fase del proceso de secuenciado (14.1). En ambos casos se hizo uso de polinucleótido-quinasa de fago T4 (New England Biolabs). El tampón de reacción consiste en 70mM Tris-ClH (pH7.6), 10mM cloruro magnésico y 5mM ditiotreitol.

8.6.- MARCADO DE ADN POR DESPLAZAMIENTO DE MELLA ("NICK-TRANSLATION")

La obtención de una sonda de ADN marcado radiactivamente hasta una alta actividad específica es muy fácil y rápida en un sistema enzimático en el que una endonucleasa crea mellas al azar en en interior de la cadena,y la ADN-polimerasa I, en virtud de su actividades exonucleasa 5'---→ 3' y polimerasa 5'---→ 3', va reemplazando los nucleótidos originales de la cadena por otros suministrados en la mezcla de reacción, entre los cuales uno al menos de los cuatro tipos está marcado con ^{32}P en posición α. En este proceso, las mellas originales se desplazan en el sentido de la actividad de la polimerasa.

Tampón NT (x5)

Tris-ClH	250mM (pH8.0)
cloruro magnésico	25mM
gelatina	250 $\mu g.ml^{-1}$

ditiotreitol	2.5mM
dCTP	63 µM
dGTP	63 µM
dTTP	63 µM

Aparte se prepara una solución madre de DNasa de páncreas de buey, a una concentración de 50 $\mu g.ml^{-1}$ en 0.15M NaCl 50% glicerol. Se guarda en pequeñas alícuotas a -20ºC. Inmediatamente antes de establecer la reacción se hace una dilución 1:1000 en agua destilada.

Para marcar cantidades de 0.2-1 µg de ADN se procede de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf se deseca al vacío un volúmen de d(α - ^{32}P)ATP (Amersham) equivalente a 10 µCi (actividad específica 3000 $Ci.mmol^{-1}$). El tubo se pasa luego a baño de hielo y se añade:

ADN a marcar(en tampón TE8):	0.2-1 µg
tampón NT(x5)	3 µl
DNasaI (50 $ng.ml^{-1}$)	3 µl
ADN-polimerasa I	1 µl(=5unidades)
agua destilada c.s.p.	15 µl

La mezcla se incuba a 13ºC durante 1 h. Para detener la reacción e inactivar las enzimas, se añade EDTA-Na_2 a una concentración final de 10mM.

El siguiente paso es separar el ADN sonda de los nucleótidos no incorporados. Ello se realiza por medio de cromatografía en columna de Sephadex G-50, tal como se describe en la sección 11.

8.7.- CONVERSIÓN A EXTREMOS ROMOS DE TERMINALES DE ADN PROTUBERANTES

8.7.1.- Conversión a cadena doble de terminales protuberantes 5' de cadena sencilla

Para rellenar los extremos 5' protuberantes que se obtienen tras digestión de ADN con ciertas enzimas de restriccción, o los que pueden quedar después de un tratamiento con la nucleasa Bal31, se recurrió al empleo de la llamada porción Klenow de la ADN-polimerasa I (el fragmento mayor tras hidrólisis con subtilisina), que retiene la actividad polimerasa 5'---→3', pero carece de la exonucleasa 5'---→3'.

El ADN (hasta 1 μg) se disuelve en un máximo de 10 μl de agua destilada, se añaden 2.5 μl de tampón K concentrado (500mM Tris-ClH; pH 7.2, 100mM sulfato magnésico, 1mM ditiotreitol, 500 $\mu g.ml^{-1}$ seroalbúmina bovina) y 1 μl de cada una de las soluciones 2mM de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos, completándose el volumen con agua hasta 25 μl. La reacción se inicia adicionando 1 unidad de enzima Klenow, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Para detener la reacción, se calienta a 65ºC durante 5 min.

8.7.2.- Conversión simultánea de terminales protuberantes 5'-P y 3'-OH a extremos romos

En el transcurso de este trabajo se requirió convertir a extremos romos un fragmento de ADN que tenía los dos tipos de terminales protuberantes: 5'-P y 3'OH. Para ello el fragmento se trató, en presencia de los cuatro

desoxinucleósidos trifosfato, con la enzima ADN-polimerasa del fago T4 que, además de la actividad polimerasa 5'---→3' posee una gran actividad exonucleasa 3'---→5' sobre cadena sencilla.

El ADN a tratar (hasta 1 µg en un máximo de 10 µl de agua destilada) se mezcla con 2 µl de tampón concentrado de polimerasa de T4 (330mM Tris-acetato; pH7.9 660mM acetato potásico, 100mM acetato magnésico, 5mM ditiotreitol, 1 $mg.ml^{-1}$ seroalbúmina bovina) y con 1 µl de cada una de las soluciones 2mM de los dNTPs, completándose con agua hasta 20 µl. Se adicionan 2 unidades de ADN-polimerasa de T4 (Bethesda Research Laboratories) y se incuba 5-10 min a 37ºC. La enzima se inactiva calentando a 70ºC durante 5 min.

8.8.- PREPARACIÓN DE LIGADORES SINTÉTICOS EcoRI

Los ligadores de ADN son oligonucleótidos sintéticos de doble hebra y con extremos romos, que contienen la secuencia diana de una o varias enzimas de restricción, y que convenientemente preparados, se pueden unir a fragmentos de ADN para posteriormente suministrar los extremos cohesivos correspondientes a la(s) restrictasa(s) en cuestión.

En nuestro trabajo hemos necesitado dotar a una población de fragmentos de ADN de extremos EcoRI, para lo cual se ha empleado como ligador sintético el siguiente dodecanucleótido, suministrado por Collaborative Research:

5'-C-C-C-G-A-A-T-T-C-G-G-G-3'
3'-G-G-G-C-T-T-A-A-G-C-C-C-5'

Los extremos 5' vienen hidroxilados, por lo que, con vistas a la reacción de ligado, hay que "activarlos" por fosforilación. En esta reacción se emplea (γ-^{32}P)ATP, con objeto de poder verificar su efectividad, así como de permitir controles de funcionalidad previos al experimento definitivo, mediante autorradiografía. El (γ-^{32}P)ATP procedía de Amersham.

8.8.1.- Fosforilación de extremos 5'.

Los ligadores sintéticos liofilizados se disuelven en agua destilada hasta 1 $mg.ml^{-1}$. La mezcla de reacción de la fosforilación consiste en:

ligadores EcoRI ($1mg.ml^{-1}$)	4 µl (=4 µg)
(γ-^{32}P)ATP ($3Ci.\mu mol^{-1}$; $10\mu Ci.\mu l^{-1}$)	4 µl (=13pmoles)
tampón sección 8.5 (x10)	2 µl
agua destilada	5 µl
polinucleótido-quinasa T4	5 µl (=8 unidades)

La reacción se lleva a 37ºC durante 20 min. La "dilucíon fría" ("cold chase") se promueve a continuación por adición de:

tampón sección 8.5 (x10)	2 µl
ATP (10mM)	2 µl
agua destilada	12 µl
polinucleótido-quinasa T4	4 µl (=6.4 uu)

Los 40 µl de mezcla final se incuban a 37ºC durante unos 30 min.

8.8.2.- Reacciones de funcionalidad de los ligadores fosforilados

1ª) Capacidad de ligado: se comprueba en función de la formación de multímeros del oligonucleótido fosforilado en reacción catalizada por ADN-ligasa. Se procede mezclando 2.5 µl de la solución de ligadores obtenida al final del apartado anterior con 400 unidades de ADN-ligasa de T4 en un volumen final de 10 µl de tampón de ligasa (ver 8.3), incubando a 16ºC durante 4 h, al cabo de las cuales se inactiva la enzima por calor (65ºC, 15 min).

2ª) Susceptibilidad a la digestión por endonucleasa de los multímeros del ligador: una alícuota de 5 µl de la mezcla de ligado anterior se emplea en una reacción de hidrólisis por enzima EcoRI (35 unidades en 20 µl de tampón Endo-sales altas; incubación a 37ºC durante 2 horas).

8.8.3.- Comprobación de la funcionalidad de las reacciones

Para comprobar la efectividad de la fosforilación de los ligadores (8.8.1), con su consiguiente capacidad de ligado (8.8.2.-1ª) y digestión por la correspondiente endonucleasa (8.8.2.-2ª), se someten alícuotas de cada mezcla de reacción (equivalentes en cuanto a contenido en ^{32}P) a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (ver apartado 9.2). La electroforesis se desarrolló en una aparato LKB-2001, hasta que el frente de azul de bromofenol queda a la mitad del recorrido. El gel se extrae de su molde, se deseca al vacío en un desecador de geles LKB 2003 sobre papel Whatman 3MM y cubierto con papel de

celofán; una vez seco, se usa para impresionar una película radiográfica (Fuji X-Film) en cajas Kodak X-Omat provistas de pantallas intensificadoras (DuPont Cronex), a -70ºC durante 2 h. El resultado de una autorradiografía típica aparece en la Fig 10a. Se observa efectivamente la fosforilación de los ligadores (calle A), la formación de oligómeros y multímeros (calle B) y la hidrólisis total de estos hasta formar monómeros (calle C).

8.8.4.- Eliminación del (γ-^{32}P)ATP de la preparación de ligadores fosforilados

Se empleó la cromatografía por filtración en Sephadex G-50 (tipo "fine"), utilizando como columna una punta desechable de 1 ml de microdispensador Gilson. La preparación del Sephadex G-50 y el montaje de la columna se describen en 11.1. En este caso el volumen de lecho era de 0.65 ml. La muestra (final apartado 8.8.1) se aplica a la columna, se deja que entre al gel. A continuación se conecta un reservorio de agua, y se van recogiendo fracciones de 35 μl, en un flujo de elución de 350 μl.min^{-1}. La radiactividad de cada fracción fue medida en contador de centelleo. En la Fig 10b se muestra una curva de elución. El pico I (fracciones 11-17) corresponde a los ligadores: las fracciones correspondientes se juntan y se liofilizan hasta su uso.

BIBLIOTECA

Fig 10a: Autorradiograma de un gel de poliacrilamida mostrando la migración electroforética de ligadores sintéticos EcoRI fosforilados con ^{32}P (A), oligómeros de estos ligadores formados por actuación de ADN-ligasa (B) y la regeneración los monómeros a partir de B), por digestión con la endonucleasa EcoRI (C).

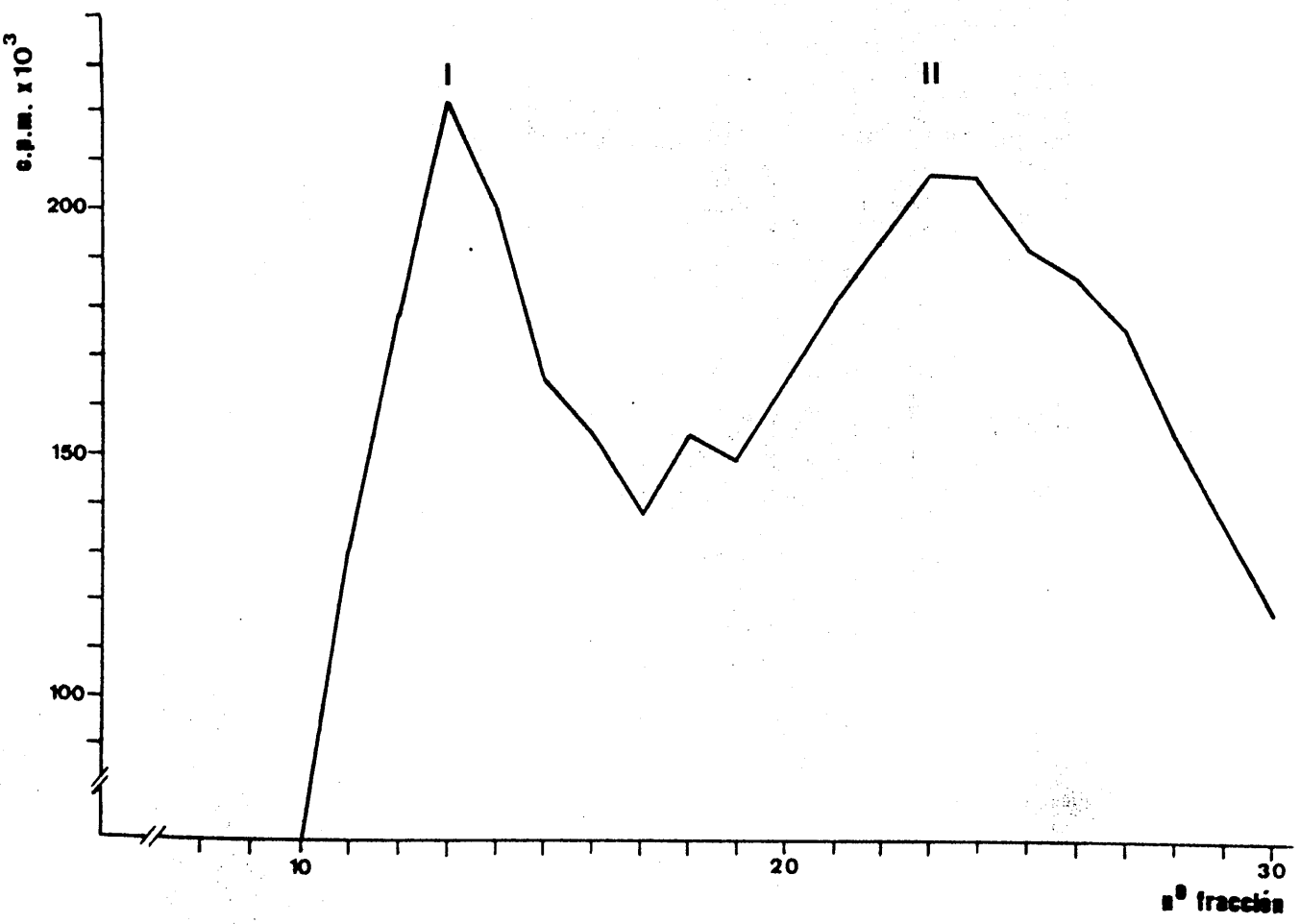


Fig 10b: Curva de elución de ligadores EcoRI (pico I) y de ATP (pico II), por cromatografía en minicolumna de Sephadex G-50.

9. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

9.1.-ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Como ya es normal en la mayoría de los laboratorios, el método rutinario de separación y caracterización de moléculas de ADN se lleva a cabo por electroforesis en geles de agarosa, en configuración horizontal, e inmersos en el seno del tampón de electroforesis ("electroforesis submarina" o sumergida).

Para los propósitos generales se empleó agarosa tipo II (Sigma), mientras que con vistas a la elución preparativa de fragmentos de ADN por fusión de agarosa se recurrió a la variedad de baja temperatura de gelificación (BRL o Bio-Rad). En el primer caso, la agarosa se disuelve en tampón TBE (89mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA-Na_2 ; pH final, 8.3), a la concentración deseada (en este trabajo se utilizó a 0.5, 0.6, 0.7 y 2%). En el segundo caso, la agarosa es preparada en tampón TAE (40mM Tris-acético, pH8.1, 2mM EDTA-Na_2).

La solución de carga (tampón de muestras) consta de 30% glicerol y 0.25% (p/v) azul de bromofenol.

Como patrones de pesos moleculares de ADN lineal de doble cadena se emplearon los digeridos HindIII del ADN del fago lambda y HaeIII de la forma RFII del fago ØX174, suministrados por New England Biolabs.

Los voltajes y tiempos de electroforesis variaban según la concentración de agarosa y el rango de longitudes moleculares que se pretendía discernir. Así, p. ej., para los geles de agarosa normal al 2% se acostumbró a emplear un voltaje constante de 5 $V.cm^{-1}$ durante 4-5 h, mientras

que para los geles de menor concentración el voltaje fue menor (1-1.5 $V.cm^{-1}$), prolongándose el tiempo de desarrollo (12-14 h). En estas condiciones la distancia relativa de migración de moléculas lineales de ADN es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud molecular, excepto para las moléculas muy grandes, que tienden a migrar más rápidamente de lo que les correspondería por extrapolación. Terminada la electroforesis, el gel se tiñe en una solución de 2 $\mu g.ml^{-1}$ de bromuro de etidio, y el ADN se visualiza con la luz ultravioleta de un transiluminador (UV-Products). Los geles se fotografíaron con cámara Polaroid MP-4 provista de filtro Wratten 22A, empleando película 665 o 667 de 3000 ASA.

Con las distancias de migración relativa de los ADN de longitudes moleculares conocidas se traza una recta patrón en representación semilogarítmica, a partir de la cual se deducen los pesos moleculares de los ADN problema.

9.2.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

En este trabajo se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% para evidenciar la efectividad de las reacciones que se realizan con oligonucleótidos sintéticos (ver 8.8): distinción de monómeros respecto de los oligómeros y multímeros.

Para preparar la poliacrilamida (PAA) al 12% se mezclan en un matraz:

solución acrilamida 29%, +	
+bisacrilamida 1%, filtrada	20 ml
agua destilada	23.9 ml
persulfato amónico 3%	1.05 ml
tampón TBE(x10)	5 ml

La solución se degasifica al vacío, se añaden 15 µl de TEMED (catalizador de la gelificación), y la mezcla se vierte sobre el molde del gel (en este caso se empleó un aparato de electroforesis vertical, modelo 2001 de LKB), evitando que se formen burbujas. Una vez manifestada la gelificación (por la formación de patrones de Schlieren alrededor de los los dientes del peine), se procede a lavar los pocillos con agua destilada y a rellenarlos con tampón TBE(x1). Antes de realizar la electroforesis de las muestras se hace pasar por el gel 100 V durante 1 h, para eliminar los catalizadores.

Las muestras (en 25 µl de tampón TBEx1) se mezclan con 5 µl de solución de carga (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilén-cianol) y se introducen con una jeringa Hamilton en sendos pocillos. La electroforesis se desarrolla a 40 V, y se desconecta cuando el frente azul llega a la mitad de su recorrido (unas 13 h). El procesamiento ulterior del gel queda explicado en 8.8.3.

9.3.- ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE ARN

Esta técnica de separación de ARN por tamaños es similar a la electroforesis de ADN en geles sumergidos pero éstos incorporan aquí formol.

Se empleó agarosa tipo II, al 1% en una solución 2.1M formol+tampón MOPS (20mM 3-(N-morfolino)-propanesulfónico, 5mM acetato sódico, 1mM EDTA-Na_2, ajustado a pH7.0 con NaOH).

Cada muestra de ARN (disuelta en agua) se mezcla con solución desnaturalizante (hasta unos valores finales de 6% formol, 50% formamida, en tampón MOPS), se calienta a 60ºC durante 5 min, y es adicionada de solución de carga concentrada (2 μl de 50% glicerol, 0.25% azul de bromofenol en tampón MOPS por cada 10 μl de solución desnaturalizada de ARN). Enseguida se introduce en un pocillo del gel de agarosa-formol, que se encuentra sumergido en tampón MOPS, en el mismo tipo de cubetas de electroforesis que las usadas para el ADN. Para un gel típico (150x105x8 mm) se aplican 100 V durante 4 h (hasta que el azul de bromofenol migra al extremo anódico del gel).

En este trabajo la electroforesis de ARN se ha empleado como paso previo para transferir las moleculas de ARN, separadas por tamaños, a filtros de nitrocelulosa (ver 13.2) con vistas a hibridación con sondas radiactivas, de modo que, en principio no sería imprescindible teñir los geles. Sin embargo, tras la electroforesis se procedió a teñir la porción del gel que lleva los marcadores de pesos moleculares (ARN ribosómico de levadura o ADN de fago lambda digerido por HindIII): se lavó 4-6 veces con agua destilada a lo largo de 2 h, y dos veces con 0.1M acetato amónico durante 1 h. La tinción se verifica sumergiendo la porción de gel en una solución de 1 $\mu g.ml^{-1}$ de bromuro de etidio, 0.1M acetato amónico, 0.01M 2-mercaptoetanol, durante 30 min. Para mejorar el contraste el gel se desteñía en 0.1M acetato amónico, 0.01M 2-mercaptoetanol

durante 30 min.

La visualización de las bandas del ARN se realiza por iluminación a través del gel con luz UV de onda corta. El ARN desnaturalizado migra a lo largo del gel manteniendo una proporción lineal inversa con el logaritmo de su peso molecular.

10.- ELUCION DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Dentro del proceso de clonado es necesario frecuentemente recuperar un determinado fragmento de ADN de un gel de agarosa, al objeto de someterlo a ulteriores manipulaciones.

A continuación se describen los dos métodos que se aplicaron para tal fin en el presente trabajo.El primero de ellos (electroelución) requiere más tiempo y su eficiencia es menor.

10.1.- ELECTROELUCION DE ADN.

Partiendo de un gel normal de agarosa tipo II en el que se ha completado una electroforesis, se recorta la porción que alberga la banda de ADN de interés con un escalpelo limpio, se trocea finamente, y se machaca, de modo que se forme una pasta que, embebida en tampón TBE, se pasa a un tubo de electroforesis de disco que ter-

termina en un estrechamiento provisto de un tapón laxo de algodón hidrófilo o lana de vidrio siliconizada. Con la ayuda de la varilla de vidrio, se apelmaza la pasta de gel en el interior del tubo, y por encima se coloca otro tapón de algodón impregnado en TBE. Al extremo inferior estrechado del tubo se acopla una porción de membrana de diálisis cerrada y llena con TBE. Las dos cubetas del aparato de electroforesis se llenan con el mismo tampón TBE. Se introduce el tubo de electroforesis, de modo que su parte inferior, con la membrana de diálisis, queda sumergida totalmente en el seno del tampón de la cubeta inferior. Por cada tubo se hace pasar una corriente de 4mA durante 2 h, al cabo de las cuales se invierte la polaridad de la corriente durante 2 min, con objeto de provocar la separación del ADN eluído y adsorbido a las paredes de la membrana de diálisis. Se desconecta el aparato, se separa el tubo de diálisis, su contenido se recoge y se somete a fenolización. Finalmente, el ADN se precipita y lava con etanol según los procedimientos habituales, y se resuspende en el tampón adecuado para realizar la siguiente manipulación in vitro.

10.2.- RECUPERACION DE ADN DE GELES DE BAJO PUNTO DE FUSION.

El procedimiento es el de Landgridge et al.(1980), con modificaciones (A. González, comunicación personal).

En este método se requiere preparar dos soluciones saturadas: butanol saturado con agua, conteniendo

CTAB ("But-H_2O"), y agua saturada con butanol, igualmente conteniendo CTAB ("H_2O-but"). Se obtienen mezclando volúmenes iguales de n-butanol y agua destilada, agitando vigorosamente. Se permite la separación de las fases, en reposo (la fase superior es butanol saturado con agua, y la inferior, agua con butanol saturante). Cada fase se recoge por separado. Por cada 100 ml de butanol con agua se disuelve 1.5 g de CTAB; a continuación se añaden 100 ml de agua saturada con butanol, mezclando bien. Se deja en reposo a temperatura ambiente hasta que las fases se separen. Cada una de ellas se transfiere a un frasco con cierre hermético. Antes de ser usadas, deben quedar precalentadas a 37ºC.

Una vez terminada la electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (9.1), el gel se tiñe sin sacarlo de la cubeta, con bromuro de etidio. Localizadas las bandas por iluminación con luz UV de onda larga, se recorta la porción de gel que interese, se transfiere a un tubo de polipropileno, y se funde calentando en baño a 65ºC, durante 5 min. Las siguientes manipulaciones se realizan a 37ºC: se añade un volumen igual de "H_2O-but" y otro volumen de "But-H_2O", mezclando bien por agitación en Vórtex, durante unos 15 seg; se centrifuga a 12000g durante 1 min, pasándose a un tubo nuevo la fase butanólica superior. La fase acuosa inferior se reextrae con un volumen igual de "But-H_2O", y se agita y centrifuga como antes; la nueva fase butanólica se recoge y se junta con la primera, y el total se extrae con 1/4 de su volumen de 0.3M acetato potásico (pH7.0); tras agitar, se centrifuga (ya a temperatura ambiente) a 12000g durante 2 min, y se recoge la fase acuosa inferior que contiene el ADN. Para eliminar de ella los restos de CTAB se extrae una vez con

un volumen de cloroformo, se centrifuga (12000g, 1min), se toma la fase superior y de ella se precipita el ADN por incubación en frío con etanol.

11.- METODOS CROMATOGRAFICOS

11.1.- SEPARACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS Y ATP POR FILTRACIÓN EN MINICOLUMNAS DE SEPHADEX

Se empleó el Sephadex G-50 (tipo "fine"), siguiendo para su preparación las recomendaciones del fabricante. Para montar la columna se usaron puntas desechables de polipropileno, de 1 ml, del modelo acoplable a dispensador Pipetman de Gilson. El extremo inferior estrecho va provisto de un tapón laxo de lana de vidrio siliconizada, o gasa estéril. Con una pipeta Pasteur se va llenando con la suspensión preparada de Sephadex el interior de la "columna", hasta lograr 0.65 ml de lecho. Para equilibrar y empaquetar el gel, se hacen pasar varios volúmenes de agua destilada.

La muestra se aplica dejándola resbalar suavemente por las paredes internas, encima del lecho; una vez que ha entrado, se conecta un reservorio de agua destilada. El flujo libre era de 350 $\mu l.min^{-1}$. Las fracciones, de 35 μl cada una, se van recogiendo a partir del momento de aplicación de la muestra.

11.2.- CROMATOGRAFIA DE ADN EN MINICOLUMNAS SOMETIDAS A CENTRIFUGACION

Este método rápido de filtración en gel permite eliminar de una solución de ADN las pequeñas moléculas contaminantes, incluyendo fenol residual procedente de desproteinizaciones; igualmente está indicado cuando se quiere eliminar sales de un tampón para sustituirlo por otro.

Se usó Sephadex G-50 (tipo "medium" o "coarse"), que se prepara por los procedimientos habituales. Con la suspensión de Sephadex ya hinchado se llena una jeringa de polipropileno de 1 ml (tipo insulina), que sirve como minicolumna, provista en su punta de un tapón de gasa de vidrio siliconizada. La jeringa se introduce en un tubo de centrífuga de vidrio Corex, de 15 ml de capacidad, de modo que queda suspendida por su parte superior, sin que la punta llegue a tocar el fondo del tubo. Para empaquetar el Sephadex, se centrifuga en un aparato Sorvall GLC-2 provisto de rotor basculante HL-4, a 2500rpm durante 1 min exactamente. Se extrae la jeringa, se llena hasta arriba de agua destilada y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. Se añade a la parte superior de la jeringa 0.2 ml de agua y se repite la centrifugación. La minicolumna así empaquetada se introduce en un tubo Corex de 15 ml, en cuyo fondo ha sido colocado previamente un tubo Eppendorf, de modo que la punta de la jeringa se alberga en éste. Se aplica la muestra de ADN (diluida con agua hasta un volumen de 0.2 ml), se centrifuga empleando las mismas condiciones a las que se ha aludido más arriba y se recoge el eluato que pasa al tubo Eppendorf.

11.3.- FILTRACIÓN POR ULTROGEL.

Para poder separar fragmentos relativamente largos de ADN de oligonucleótidos, se ha recurrido a la filtración en Ultrogel AcA-34 (LKB), siguiendo las indicaciones de A. Talavera (comunicación personal).

El Ultrogel se suministra como partículas de 60-140 μm de diámetro, en suspensión acuosa, listas para su empaquetado en columnas. Se usó como columna una pipeta Falcon de borosilicato, de 5 ml de capacidad, provista en su punta de un tapón de gasa estéril. Se empaquetaron 3.7 ml de la resina, que fueron equilibrados con varios volúmenes de tampón 10mM Tris-ClH (pH8.0), 1mM EDTA-Na_2, 0.4M NaCl, a un flujo de 100 μl.min^{-1}. La muestra (100-200 μl) se aplicó dejándola resbalar suavemente por las paredes; una vez entrada al lecho, se conecta un reservorio del tampón antedicho, y se establece un flujo de elución de 200 μl.min^{-1}. Se recogieron 45 fracciones de 100 μl cada una.

11.4.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE ARNm EN COLUMNAS POLI-(U)-SEPHAROSE.

La existencia de largos segmentos de poliadenina (poli-A) en el extremo 3' de los ARNm eucarióticos se aprovecha para purificar estas moléculas por paso del ARN total a través de columnas de afinidad preparadas a partir de una matriz insoluble (Sepharose) que lleva ligados polímeros de uridina o timina, que merced al establecimiento de puen-

tes de hidrógeno con la "cola" de poli-A de los mensajeros, retienen a éstos en el gel, del que son eluidos posteriormente. En el presente trabajo se ha empleado la cromatografía en Poly-(U)-Sepharose (Pharmacia).

Para preparar el gel se siguieron esencialmente las recomendaciones del fabricante. Cada gramo del polvo liofilizado de Poly-(U)-Sepharose 4B se suspende en 100 ml de 1M cloruro sódico, y se lava sobre filtro de vidrio con otros 100 ml de dicha solución. Las partículas del gel, una vez hinchadas, se lavan con 100 ml de tampón de elución (10mM tampón fosfato sódico; pH7.5, 10mM EDTA-Na_2, 90% formamida), donde se pueden conservar, en frío, durante varios meses.

Como columnas se han utilizado jeringas de tipo insulina (1 ml capacidad) provistas en su punta de tapón de lana de vidrio siliconizada. Con el extremo de salida cerrado, se llena la columna hasta su mitad con tampón de elución y se va añadiendo la suspensión de poly-(U)-Sepharose, hasta lograr 0.3 ml de gel empaquetado. A continuación, se equilibra haciendo pasar unos 50 volúmenes de tampón TENF (50mM Tris-ClH; pH7.5, 10mM EDTA-Na_2, 0.7M cloruro sódico, 25% formamida).

Unos 25 µl de la solución de ARN total de levadura se diluyen con 125 µl de tampón TENF, y se aplican a la parte superior de la columna, dejando abierto el extremo de salida. Una vez que la muestra ha penetrado en el lecho, se conecta un reservorio de TENF, del cual se hacen pasar cinco veces el volumen del lecho.

Para eluir el ARN retenido, se aplican 0.2 ml del tampón de elución, que merced a su alta concentración de formamida, disocia los complejos poli-U/poli-A. Se recoge

el eluato resultante y se precipita el ARN por mezcla con tres volúmenes de etanol absoluto y reposo, a -20ºC durante 12 h. Se centrifuga a 12000g, 15 min a 4ºC, y el sedimento, desecado brevemente al vacío, se resuspende en 20 µl de agua destilada.

Con objeto de eliminar posibles rastros de formamida, el ARN se puede reprecipitar mediante ajuste de la solución a 0.2M de acetato sódico, adición de tres volúmenes de etanol y reposo a -20ºC durante 12 h, procediéndose a una última centrifugación, y resuspensión en 20 µl de agua.

12.- TRANSFORMACIONES CON ADN PLASMIDICO

12.1.- TRANSFORMACIONES DE E. coli.

El método es una derivación del de Mandel y Higa (1970), en el que las células, previamente concentradas y lavadas en frío, se hacen competentes mediante un choque térmico en presencia de iones Ca^{++}.

Se obtiene en primer lugar un precultivo de la cepa a transformar inoculando 5 ml de caldo LB con una colonia reciente de dicha cepa, e incubando, con agitación, a 37ºC durante 12-16 h. A continuación se inoculan 100 ml de caldo LB, mantenido en un matraz de 250 ml, con 1 ml del precultivo, y se incuba en baño, con agitación (200 rpm) hasta una D.O. de 0.6 (a 600nm). El cultivo se enfría sobre hielo, las células se sedimentan por centrifugación en frío (4ºC), se resuspenden en 50 ml de una solución estéril y fría de 50mM cloruro cálcico, 10mM Tris-ClH, pH8.0

y se mantiene sobre hielo durante 10 min, tras los cuales se vuelve a centrifugar en frío, resuspendiéndose el sedimento en 25 ml de la solución $CaCl_2$-Tris citada, manteniéndose en frío otros 15 min. Tras una centrifugación final a 4ºC, las células se resuspenden en 2 ml de $CaCl_2$-Tris, y se reparte en alícuotas de 0.2 ml, que se pueden conservar a 4ºC durante 12-24 h con aumento de la capacidad de competencia sobre las células que se usen inmediatamente (Dagert y Ehrlich, 1979).

Para transformar las células ya competentes, se añade a cada alícuota el ADN plasmídico, preparado en tampón TE8 (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA-Na_2) o en tampón de ligado de ADN (ver 8.3), en un volumen nunca superior a los 100 µl. La concentración final de ADN en cada mezcla de transformación era típicamente de 0.5-2 $\mu g.ml^{-1}$. Cada mezcla se mantiene sobre hielo durante 30 min, tras los cuales los tubos se pasan rápidamente a un baño termostatizado a 42ºC, donde se mantienen durante 2 min.

Tras el choque térmico (en el que se produce la entrada del ADN al interior de la célula), se añade 1 ml de caldo LB a cada tubo , y se incuba a 37ºC durante 1 h, con objeto de permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia a droga conferido por el plásmido introducido. El contenido del tubo es diseminado convenientemente sobre medio sólido LB suplementado con la concentración adecuada del antibiótico correspondiente. Las cajas Petri se incuban a 37ºC durante 12-16 horas.

12.2.- TRANSFORMACIONES DE S.cerevisiae

El procedimiento empleado es una modificación del descrito por Hinnen et al. (1978), basado en la captación de ADN por los esferoplastos de levadura en presencia de polietilénglicol e iones Ca^{++} .

En un experimento típico se parte de un precultivo de la cepa 830 de S.cerevisiae en 10 ml de caldo YEPD, incubado a 30ºC con aireación, durante 16-24 h. Se diluye 1 ml en 200 ml de caldo YEPD fresco, contenidos en un matraz de 500 ml de capacidad. Se incuba a 30ºC, con agitación (200rpm) hasta mitad de la fase logarítmica (D.O 0.3-0.4, a 600nm), en que las células se recogen por centrifugación a temperatura ambiente y se lavan dos veces en sorbitol 1M estéril, resuspendiéndose al final en 20 ml de dicha solución. Se añade la enzima glusulasa (Sigma), hasta una concentración de 1-2%, y se deja que proceda la digestión de paredes celulares, a 30ºC durante 1 h, con agitación suave. Para comprobar la formación de esferoplastos, se diluyen alícuotas de 10 µl de la suspensión anterior en gotas de dodecilsulfato sódico al 5%, y se observa al microscopio de contraste de fases la formación masiva de formas aberrantes e hinchadas, que explotan finalmente. Normalmente bastaban 60-90 min de incubación con glusulasa para que más del 90% de las células se conviertieran en esferoplastos. A partir de aquí las suspensiones celulares se manipulan con especial cuidado, para evitar la lisis; las centrifugaciones se realizan a baja velocidad (1000g durante 10 min), y a temperatura ambiente; para resuspender los esferoplastos se recurre a pipetearlos suavemente.

La suspensión de esferoplastos se lava tres veces

en volúmenes de 20 ml de tampón TCS (10mM Tris-ClH; pH 7.5, 10mM cloruro cálcico, 1M sorbitol), y el sedimento final se resuspende en 1 ml del mismo tampón, repartiendo en tubos Falcon de polipropileno de 10 ml alícuotas de 0.2 ml la suspensión resultante. A cada tubo (menos a un control) se añade una preparación de plásmido bifuncional (en nuestro caso, siempre portador del alelo silvestre TRP1) en un volumen de tampón TE nunca superior a 10 µl. La concentración final de ADN era de 5-30 $\mu g.ml^{-1}$, según los casos. Las suspensiones de esferoplastos con ADN se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 15 min, y a continuación, a cada una se adicionan 2 ml de solución PEG (40% polietilén-glicol, 10mM Tris-ClH, pH7.5, 10mM cloruro cálcico), mezclándose con suavidad. Los tubos se dejan a temperatura ambiente otros 15 min, y se centrifugan a baja velocidad. El sedimento, que es ahora muy compacto debido a la aglutinación provocada por el PEG, se resuspende en 5 ml de TCS, y se añaden a un matraz que alberga 100 ml de medio de regeneración (MR), mantenido en sobrefusión a 50ºC, y tras una mezcla cuidadosa, se reparte en 5 o 6 cajas Petri que ya van provistas de una capa-base del mismo medio. Una vez solidificado el medio vertido, las cajas se incuban a 30ºC durante 3-5 días. Al cabo de este tiempo los transformantes Trp^+ son distinguibles netamente como colonias grandes lenticulares en el seno del agar, sobre un fondo de pequeñas microcolonias crecidas por aprovechamiento durante pocas generaciones, de la pequeña cantidad de YEPD que lleva incorporado el medio. En las condiciones descritas, y con la cepa receptora 830, no se detectaron revertientes espontáneos en las placas de control ($<1x10^{-8}$).

13.- TECNICAS DE HIBRIDACIÓN ENTRE ACIDOS NUCLEICOS

13.1.- HIBRIDACIÓN in situ DE ADN A PARTIR DE COLONIAS

La técnica de hibridación in situ de colonias, descrita por Grunstein y Hogness (1975) es una herramienta de gran sencillez y utilidad para localizar aquellos clones que, procedentes de transformación o transfección, albergan plásmidos o fagos recombinantes con un determinado inserto clonado, siendo claramente distinguibles de todos los demás que carecen del fragmento en cuestión.

La técnica se basa en crecer, sobre filtros de nitrocelulosa, los clones a analizar, lisar directamente las colonias, de modo que el ADN liberado se adhiera al filtro, y someter dicho ADN a contacto con una sonda de ADN o ARN radiactivos. La existencia de hibridación, por complementariedad de zonas más o menos extensas, se pone de manifiesto por ulterior autorradiografía de los filtros.

13.1.1.- Preparación de las soluciones

Mezcla de prehibridación (MPG)

tampón SSC* (x6)
solución Denhardt# (x2)
ADN de esperma de salmón $100_{\mu}g.ml^{-1}$
(desnaturalizado:100ºC, 5 min)

Antes de su uso debe ser precalentada a 56ºC

---

* SSC(x20) es 3M NaCl, 0.3M citrato sódico, pH7.0

\# Denhardt(x100) es 2% ficol, 2% polivinilpirrolidona, 2% seroalbúmina bovina.

Mezcla de hibridación

tampón SSC (x6)	
solución Denhardt (x2)	
dextránsulfato 10%	
ADN esperma salmón	100 $\mu g.ml^{-1}$
ADN sonda ($10^7 cpm.\mu g^{-1}$)	10-100 $ng.ml^{-1}$

Antes de ser incorporadas a la solución, las dos preparaciones de ADN se desnaturalizan calentando a 100ºC durante 5 min, y se enfrían a continuación enseguida sobre hielo. El resto de la solución se precalienta a 65ºC.

Soluciones de lavado

La primera (SLG-I) consiste en tampón SSC(x6), solución Denhardt (x1); la segunda (SLG-II), SSC (x2), dodecilsulfato-sódico(SDS) 0.1%; la tercera es tampón SSC (x2) y SDS 0.1%.

13.1.2.- Procedimiento

Nuestra variante hace uso de la hibridación en solución acuosa sin formamida, en presencia de dextránsulfato y a alta temperatura. El dextrán sulfato tiene la ventaja de permitir menores temperaturas de hibridación debido a que por su estructura ocupa en la mezcla un volumen no accesible a los ácidos nucleicos, que ven así aumentada su concentración efectiva, con la consecuente aceleración de la cinética de hibridación.

i) Réplica de las colonias a papel de nitrocelulosa.

Las colonias transformantes se replican en hileras sobre círculos de filtros de nitrocelulosa (Millipore, tipo HAWP) que cubren la superficie de placas de medio sólido de LB suplementado del antibiótico adecuado, conservando

paralelamente placas matriz de las que posteriormente se podrán recuperar los clones de interés. Se dejan crecer las colonias de 8 a 10 h, a 37ºC. Si se desea, se puede provocar la amplificación de los plásmidos, transfiriendo los filtros a placas de LB con 100 $\mu g.ml^{-1}$ de cloramfenicol e incubando 12 h más.

ii) Lisis in situ de las colonias

Los filtros, con las colonias en la parte superior, se transfieren sucesivamente a bandejas provistas de papel Whatman 3MM empapado en las siguientes soluciones:

1ª) 0.5M NaOH (para lisar las colonias) tiempo: 15 min
2ª) 1M Tris (pH7.5) (neutralización) tiempo: 5 min
3ª) 0.5M; Tris (pH7.5), 1.5M NaCl (idem) tiempo: 5 min

Tras la permanencia del filtro en contacto con cada solución se debe secar aquél durante medio minuto, dejándolo sobre papel secante de laboratorio, antes de transferirlo a la siguiente solución. Es importante cuidar que ninguna de las soluciones moje directamente la parte superior de los filtros.

iii) Fijación del ADN a los filtros

El ADN liberado y adsorbido a las membranas de nitrocelulosa se fija fuertemente cociendo los filtros al vacío a 80ºC, durante 2 horas.

iv) Prehibridación

Cada filtro se sumerge (permitiendo primero que se moje totalmente desde su cara inferior) en la solución de prehibridación (MPG), en un cristalizador de Pyrex de

100 mm de diámetro. Para 5 filtros de unos 80 mm se emplearon 10-15 ml de mezcla de prehibridación (MPG). El tratamiento se realiza en estufa de aire a 65ºC durante 5 h, estando el cristalizador herméticamente cerrado, y en reposo.

v) Hibridación

Tras eliminar la mezcla de prehibridación, se añade la de hibridación (MHG). Para 5 filtros se usan 10 ml. La cantidad de sonda incorporada solía ser de 0.2-0.5 µg de ADN marcado con ^{32}P, con una actividad específica de unas 10^7 cpm. μg^{-1} . El tiempo de hibridación empleado oscilaba entre 4 y 12 h, a 65ºC. Por conveniencia horaria, se puede prolongar durante una noche.

vi) Lavados

Terminado el periodo de hibridación, se decanta la MHG y los filtros se pasan a un recipiente grande, donde se someten a seis lavados, dos por cada una de las soluciones de lavado (SLG-I a III, en este orden), en volúmenes de 500 ml.

vii) Autorradiografía de los filtros

Los filtros se secan sobre papel secante, bajo lámpara incandescente, y posteriormente se pegan con cinta adhesiva a una hoja de papel Whatman 3MM o similar, tras lo cual se envuelve todo en papel de celofán. En cámara oscura se coloca sobre la cara del papel 3MM que lleva los filtros un trozo de película radiográfica (Fuji X-Film) y se introduce en el interior de una caja Kodak X-O-mat

provista de pantallas intensificadoras Cronex (DuPont), y se expone a -75ºC durante 4 a 12 h.

Tras revelar las películas, cada mancha intensa en la zona de los filtros denota una colonia cuyo ADN posee homología con la sonda, y por lo tanto, firme candidato a albergar un plásmido recombinante de los buscados. En la réplica inicial de las colonias a los filtros se incluye siempre un control positivo para evitar ambigüedades de interpretación en la señal de hibridación de las autorradiografías.

13.2.- HIBRIDACIÓN DE ARN TRANSFERIDO A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

En esta técnica se transfieren moléculas de ARN, previamente separadas electroforéticamente por tamaños, a filtros de nitrocelulosa, donde son sondeados con un ADN marcado radiactivamente. La posterior autorradiografía de los filtros permite la identificación de un tipo determinado de ARN. La técnica ha recibido el nombre popular de transferencia "Northern" (Thomas, 1980).

13.2.1.- Preparación de las soluciones

Mezcla de pretratamiento

tampón SSC (x5)
solución Denhardt (x5)
tampón fosfato sódico 50mM (pH6.8)

FACULTAD DE CIENCIAS

Mezcla de prehibridación (MPN)

formamida 50%
dodecilsulfato sódico 0.1%
solución Denhardt (x1)
ADN esperma salmón 250 $\mu g.ml^{-1}$
(desnaturalizado:100ºC, 5 min)

Mezcla de hibridación (MHN)

Se prepara mezclando en proporción 4:1 solución de prehibridación y dextránsulfato del 50%, e incorporando a la mezcla una sonda de ADN marcado con ^{32}P, previamente desnaturalizada por calentamiento a 100ºC durante 5 min, y enfriada rápidamente sobre hielo.

Soluciones de lavado

La primera (SLN-I) consiste en SSC (x4) y dodecilsulfato-sódico (SDS) al 0.1%. La SLN-II es SSC (x2) y SDS al 0.1%.

13.2.2.- Procedimiento

Tras la electroforesis del ARN en gel de agarosa-formol (apartado 9.3) éste se lava en varios volúmenes de 10mM tampón fosfato sódico (pH6.8), durante 1 h. A continuación se procede a través de los siguientes pasos:

i) Transferencia del ARN a membrana de nitrocelulosa

Se llena una bandeja o fiambrera con tampón SSC (x20), y apoyándose en sus bordes, una placa firme y lisa (p. ej. de cristal), en situación horizontal. Sobre

esta placa se colocan dos hojas de papel 3MM empapadas en SSC (x20). Los dos bordes cortos de estas hojas contactan y se introducen en el reservorio de SSC (x20). Encima de los papeles 3MM se sitúa el gel ya lavado, y sobre la cara libre de éste se deposita un trozo de membrana de nitrocelulosa cuyas dimensiones exceden 1-2mm de cada lado del gel, y que ha sido previamente sumergido en agua destilada y en SSC (x20). A continuación se sitúan dos trozos secos de 3MM, y por encima una pila de 5 a 8 cm de grosor de trozos de papel de filtro normal, todos ellos cortados a las mismas dimensiones del gel. Finalmente, y para lograr presión sobre el gel, se coloca un objeto de medio kilo.

Merced a esta disposición, se establece un flujo de solución SSC (x20) desde el reservorio, a través del papel 3MM empapado que sirve de mecha, hasta la membrana de nitrocelulosa, donde queda retenido el ARN. La transferencia de los ácidos nucleicos queda virtualmente completada en 12-15 h, a temperatura ambiente.

ii) Fijación del ARN a la membrana

Se recoge el papel de nitrocelulosa con pinzas, se seca bajo lámpara incandescente y se cuece al vacío, a 80ºC, durante 2 h, con lo que el ARN queda firmemente adherido. El filtro, que ahora es muy frágil y quebradizo, se deja mojar desde abajo, depositándolo sobre la superficie de una solución de SSC (x3), y sumergiéndolo totalmente después durante 2 a 5 min.

iii) Pretratamiento

Con él se persigue eliminar sales e impurezas

procedentes de los pasos anteriores. El filtro se empareda entre dos trozos de plástico que sea fácilmente sellable por calor. Se cierran los cuatro lados, menos una pequeña abertura, por donde se introduce la solución de pretratamiento: 15 ml para un filtro de 150x90 mm. Se eliminan las burbujas de aire y se cierra herméticamente la bolsa. El pretratamiento se lleva en baño con agitación, a 42ºC, durante 2 horas.

iv) Prehibridación

Sirve para saturar lugares del filtro que pueden adherir ácidos nucleicos inespecíficamente. Para un filtro del tamaño descrito se emplean unos 10 ml de mezcla MPN y se incuba a 42ºC durante 2 h.

v) Hibridación

Se emplean 10 ml de mezcla de hibridación que lleva 0.2 µg de ADN sonda, con una actividad específica de 10^7 cpm. μg^{-1} . La hibridación se lleva a 42ºC durante 48-72 horas.

vi) Lavados

Abierta finalmente la bolsa, y eliminado toda la MPN, se recoge el filtro y se somete a sucesivos lavados de media hora cada uno: tres lavados en volúmenes de unos 300 ml de SLN-I a temperatura ambiente, seguidos de dos lavados en volúmenes de 500 ml de SLN-II, a 65ºC.

La exposición del filtro sigue el mismo procedimiento descrito en 13.1.2.vii.

14.- SECUENCIADO DEL ADN

El método de secuenciado escogido es el de método químico original de Maxam y Gilbert (1977), según las modificaciones ulteriores introducidas por los mismos autores (Maxam y Gilbert, 1980), junto a variaciones de A. González (comunicación personal).

La técnica consiste, en esencia, en marcar uno de los extremos de una de las hebras de un trozo de ADN, romper dicho ADN parcialmente en cada una de las cuatro clases de bases, por medio de cuatro reacciones distintas, y desarrollar una electroforesis en la que los productos resultantes se separan por su tamaño. La autorradiografía del gel permite deducir la secuencia observando los nucleótidos sucesivos en que fue rota la cadena por la reacción correspondiente.

14.1.- OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO DE ADN MARCADO EN UN EXTREMO

La estrategia empleada en este trabajo consiste en lo siguiente:

1º) Cortar el ADN con una enzima de restricción (en nuestro caso, la EcoRI). Uno de los fragmentos que se generan contiene la secuencia a elucidar. En la estrategia aplicada aquí, no es necesario separar y purificar este fragmento respecto de los demás.

2º) Marcar los extremos 5' con ^{32}P. Para ello se eliminan los fosfatos 5' terminales originales y se sustituyen con fosfato marcado procedente de (γ-^{32}P)ATP.

3º) El fragmento de cadena doble en el que se

encuentra la secuencia de interés debe manipularse de tal manera que queden separados sus dos extremos marcados en 5'. Se recurre aquí a romper dicho fragmento con una segunda enzima de restricción.

4º) Purificar el subfragmento a estudiar (que está marcado en uno de sus extremos) tras electroforesis preparativa en gel de agarosa.

Procedimiento

En este trabajo se partía de unos 20 µg de plásmido purificado, de unas 14 kb, que se sometían a digestión con EcoRI, reacción que rinde dos fragmentos, constituyendo el fragmentos de interés el 43% del total de ADN. Tras inactivar la restrictasa por calor, los extremos de los fragmentos de ADN se defosforilaron a 37ºC en 30 min, en un volumen de 50 µl de tampón de fosfatasa alcalina (ver 8.4), con una preparación de enzima purificada de intestino de ternero (Boehringer). A continuación se inactivó la fosfatasa y se desproteinizó la mezcla por dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1). Los restos de fenol y las sales de los tampones se eliminaron por paso de la muestra por minicolumna de Sephadex G-50 sometida a centrifugación (ver 11.2). El eluato se ajustaba a 0.3M acetato sódico (pH6.0) , el ADN se precipitaba con etanol, se sedimentaba por centrifugación y se secaba al vacío.

Este ADN defosforilado se marcó en sus extremos, resuspendiéndolo en

agua destilada	9 µl	
tampón quinasa (x10)(#8.5)	2 µl	
(γ-^{32}P)ATP (3Ci.mol^{-1}; 333pmol.µl^{-1})	7 µl	
polinucleótido quinasa T4	2 µl	(=20 unidades)

La mezcla se incubaba durante 30-45 min. Se ajustó luego el volumen hasta 200 µl con agua destilada, y se procedió a desproteinización por dos fenolizaciones. La fase acuosa final se sometió a cromatografía en minicolumna de Sephadex bajo centrifugación. El eluato se ajustó a 0.3M acetato sódico (pH6.0), con posterior precipitación y lavados del ADN por mezcla con etanol frío. El sedimento, una vez secado al vacío, se resuspendía en 40 µl de tampón de BglII, procediéndose a la segunda digestión con restrictasa BglII (20 unidades, en un volumen de 50 µl, a 37ºC, durante 2 horas).

Finalmente la muestra se sometía a electroforesis en gel de 1% de agarosa de bajo punto de fusión. La banda de ADN de la que se quería secuenciar (fragmento EcoRI-BglII, de una 500 p.b.) se extrajo y purificó del gel por el procedimiento descrito en 10.2. El ADN se resuspendió en 30 µl de agua destilada.

14.2.- REACCIONES DE ROTURA QUIMICA ESPECIFICAS DE BASES

El punto central del método de Maxam y Gilbert consiste en las roturas de la cadena del ADN a nivel de las cuatro bases. La preparación de ADN marcado en un extremo se divide en cuatro alícuotas, y con cada una de ellas se realiza una reacción química distinta. La reacción puede ser específica de una o de dos bases, y se verifica en tres pasos: primero, modificación de la estructura electrónica de la base , lo que facilita las otras fases, eliminación de la base modificada respecto del esqueleto azúcar-fosfato y finalmente, rotura de dicho esqueleto a nivel de la base desplazada. En los últimos protocolos desarrollados el desplazamiento de base y rotura de la cadena se logran

simultáneamente por piperidina. El primer paso se ha de realizar en condiciones tales que permitan la modificación de una sola base por cadena en la zona que se pretende secuenciar.

14.2.1.- Tampones y soluciones

El tampón DMS consiste en 50mM cacodilato sódico (pH8.0), 1mM EDTA-Na_2 . La mezcla de parada del dimetil sulfato (MP-DMS) es 1.5M acetato sódico (pH7.0), 1M 2-mercaptoetanol, 100 $\mu g.ml^{-1}$ ARNt de levadura.

Piperidina 1M : se prepara inmediatamente antes de su uso, diluyendo piperidina pura (99%) en agua (1:10). La solución de piperidina-formiato (P-F) se prepara ajustando a pH2.0 con piperidina, una solución de ácido fórmico en agua, al 4%.

El dimetilsulfato (DMS), de 99% de pureza se obtuvo de Aldrich; la hidrazina (HZ) empleada era de grado reactivo (95%), de la casa Eastman-Kodak .

La mezcla de parada de la hidrazina (MP-HZ) se compone de 0.3M acetato sódico, 0.1 mM EDTA-Na_2, 100 $\mu g.ml^{-1}$ ARNt de levadura.

La solución de formamida y colorantes (FXA) se emplea para desnaturalizar el ADN introducido en los geles de secuenciado; consta de 80% (v/v) formamida, 50mM tampón tris-borato (pH8.3), 1mM EDTA-Na_2 , 0.1% xiléncianol, 0.1% azul de bromofenol.

14.2.2.- Procedimiento

i) Rotura del ADN a nivel de guaninas (reacción G)

En un tubo Eppendorf de polipropileno se mezclan 5 µl del ADN marcado (final apartado 14.1) y 200 µl de tampón DMS. El tubo se mantiene sobre baño de hielo; para comenzar la reacción se añade 1 µl de dimetilsulfato (DMS) y se pasa el tubo a un baño termostatizado a 20ºC. Se incuba durante 3 min y la reacción se detiene adicionando 50 µl de MP-DMS preenfriada a 0ºC y pasando a baño de hielo. Para precipitar el ADN, se añaden 750 µl de etanol absoluto frío y se mantiene el tubo sobre nieve carbónica hasta la congelación de la mezcla. Tras centrifugar (12000g, 5 min a temperatura ambiente), el sedimento de ácidos nucleicos se resuspende en 250 µl de acetato sódico 0.3M (pH7.0) preenfriado (0ºC) y se reprecipita por mezcla con 750µl de etanol absoluto frío y congelación sobre nieve carbónica (unos 5 min). Tras centrifugación y lavado en etanol del 70%, el sedimento se seca brevemente al vacio y se resuspende en 100 µl de piperidina 1.0M. El tubo, bien cerrado, se incuba a 90ºC durante 30 min.

ii) Rotura del ADN a nivel de purinas (reacción G+A)

Se diluyen 10 µl del ADN marcado con 10 µl de agua destilada, en tubo Eppendorf emplazado en baño de hielo. Se añaden 2 µl de solución P-F , y se incuba a 37ºC durante 30 min para conseguir la modificación y eliminación limitada de purinas, deteniéndose la reacción por congelación de la muestra sobre hielo seco. A continuación, dicha muestra se somete a liofilización, tras lo cual el ADN se rompe

específicamente mediante su resuspensión y tratamiento en 100 µl de piperidina 1M a 90ºC durante 30 min.

iii) Rotura del ADN a nivel de pirimidinas (reacción T+C)

Se toman 10 µl del ADN marcado y se mezclan a 0ºC con 10 µl de agua destilada. Se añaden 30 µl de hidrazina y se incuba a 20ºC durante 20 min. La reacción de modificación de pirimidinas se detiene añadiendo 200 µl de la mezcla MP-HZ a 0ºC. Para precipitar el ADN se adicionan y mezclan 750 µl de etanol absoluto frío, y se pasa a nieve carbónica hasta congelación de la muestra. Se centrifuga y se elimina el líquido, el sedimento se lava con etanol del 70%, y se seca al vacío, resuspendiéndose finalmente en 100 µl de piperidina 1M. Se calienta a 90ºC durante 30 minutos.

iv) Rotura del ADN a nivel de citosinas (reacción C)

Se mezclan 5 µl del ADN marcado con 15µl de cloruro sódico 5M a 0ºC. Se añaden 30 µl de hidrazina y se procede exactamente igual que en la reacción T+C del apartado anterior.

14.3.- ELECTROFORESIS DE SECUENCIADO

Las cuatro muestras sometidas a las respectivas reacciones detalladas en 14.2 se preparan para ser sometidas a electroforesis en geles delgados de poliacrilamida-urea que permiten discernir fragmentos de ADN que se diferencian en una sola base. Las muestras se congelan sobre nieve carbónica y se liofilizan durante unas 12 h, con objeto de

eliminar la piperidina. El ADN de cada tubo se resuspende en 10 µl de la solución de formamida y colorantes (FXA), en la que es desnaturalizado por calentamiento a 90ºC durante 2 min, pasados los cuales los tubos son pasados rápidamente a baño de hielo para evitar la renaturalización. Las muestras se aplican lo antes posible a sendos pocillos de un gel de secuenciado.

14.3.1.- Preparación de los geles

Ya que en este trabajo sólo se requería conocer una secuencia corta a partir del extremo marcado (no más de 50 nucleótidos), sólo se hizo uso de geles de secuenciado de 20% de poliacrilamida. La electroforesis necesita geles delgados de gran longitud, que permiten una perfecta resolución de bandas sucesivas correspondientes a moléculas que difieren en un solo nucleótido. Siguiendo las recomendaciones de Maxam y Gilbert (1980), para hacer el molde se emplearon dos placas de vidrio de 40x20 cm, y separadores de teflón de 0.5 mm de grosor que, impregnados de grasa de vació se colocaron en los dos lados mayores. El conjunto se cierra por los dos bordes mayores y por uno de los cortos con cinta adhesiva plástica resistente, y como precaución adicional para evitar escapes se colocan varias pinzas "bulldog".

Para preparar el gel se mezclan los siguientes componentes:

solución acrilamida 38%+	
+ bisacrilamida 2%, filtrada	6 ml
urea	15 g
agua destilada	10 ml
tampón TBE (x10)	3 ml

Una vez lograda la disolución total de la urea, la mezcla se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore tipo HAWP; 0.45µm de diámetro de poro) y se degasifica al vacío. Para iniciar la gelificación rápida se añaden 200 µl de una solución fresca de persulfato amónico al 10% y 18µl de TEMED, y se homogeniza por rotación suave del frasco. La mezcla se vierte inmediatamente en el molde hasta que llegue a la parte superior. Entonces se coloca el peine de teflón para producir los pocillos. El molde se coloca ahora en posición inclinada cercana a la horizontal. Producida la polimerización de la poliacrilamida se quita el peine, lavándose los pocillos con tampón TBE(x1), rellenándose luego con dicho tampón. Se retira la cinta adhesiva y el molde se coloca en el aparato de electroforesis vertical, con las cubas llenas de TBE (x1). Antes de colocar las muestras se procede a una pre-electroforesis en blanco, con objeto de eliminar los catalizadores y precalentar las placas de vidrio, a 1600 voltios durante 30-60 min.

14.3.2.- Desarrollo de la electroforesis y autorradiografía del gel

El orden de los pocillos correspondientes a las muestras es, de izquierda a derecha: G, G+A, C+T, C. Las muestras se aplican inyectándolas con aguja Hamilton de extremos romos, al fondo de los pocillos.

La electroforesis se desarrolla a 1400 voltios (aunque eventualmente haya que reajustar el voltaje para que la temperatura de los cristales quede a unos 50ºC) y se desconecta cuando el frente de azul de bromofenol ha recorrido la tercera parte de la longitud del gel. Se retira el molde del aparato de electroforesis. Se retira uno de los cristales; sobre la superficie ahora libre del gel se coloca

un trozo de papel Whatman 3MM empapado en agua, cuidando que se adhiera al gel sin formar arrugas. Se invierte el conjunto y se retira la segunda placa de cristal. La superficie del gel libre se cubre con celofán transparente, evitando la formación de arrugas y burbujas. El gel así cubierto se seca en un desecador de geles, durante 2 h.

En cámara oscura, el gel seco se pone en contacto, por la superficie cubierta con celofán, con un trozo de película radiográfica y se introduce en caja hermética Kodak X-O-mat. La exposición sin pantallas intensificadoras (3-4 días a -75ºC) da mejores resoluciones.

14.3.3 Interpretación de los resultados

Tras la exposición y revelado de la película radiográfica, ésta muestra un patrón de bandas apiladas que representan moléculas marcadas en el mismo extremo. Las bandas de un mismo callejón proceden de moléculas de tamaños discretos diferentes, obtenidas por rotura parcial de del ADN , en una reacción mono- o biespecífica.

La lectura de la secuencia se realiza observando el patrón de bandas en cada nivel horizontal:

- una banda ha de aparecer en A+G o en T+C.
- si una banda purina (A+G) va acompañada en el mismo nivel horizontal por una banda en la calle A, se concluye que esa posición corresponde a adenina. En caso contrario, se trata de guanina.
- similar razonamiento se sigue con las pirimidinas (callejones T+C y C).

Procediendo de esta manera se va anontando la secuencia hasta el límite de resolución de la autorradiografía.

15. MARCADO DE PROTEINAS DE LEVADURA Y ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

El método de pulso de marcado in vivo de proteínas de S.cerevisiae fue derivado a partir del de Hitzeman et al.(1983a). Cada cepa de levadura se inocula en caldo MGCA y se incuba a 30ºC hasta mitad de la fase logarítmica (D.O.=0.5-0.7, a 600nm), en que los cultivos se centrifugan y se lavan en caldo MG (sin casaminoácidos). Alícuotas correspondientes a $2 \cdot 10^7$ células se centrifugan y el sedimento se resuspende en 0.2 ml de caldo MG suplementado con una mezcla de todos los aminoácidos, a excepción de metionina. El pulso radiactivo se verifica añadiendo 10 µCi de (^{35}S)-metionina e incubando a 30ºC durante 1 hora, con agitación suave, tras lo cual las células son recogidas, resuspendidas en 50 µl de tampón de carga de muestras (0.1M Tris-ClH ,pH6.8 2% dodecilsulfato sódico, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol) y lisadas calentando a 95ºC durante 5 min. Los extractos así preparados se usan para desarrollar electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, según la técnica de Laemli (1970). Como patrones de pesos moleculares se incluyeron las proteínas marcadas del fago Ø29 (suministradas por M.Salas) o las del virus de la estomatitis vesicular (cesión de L. Carrasco).

Terminada la electroforesis, el gel se sumerge durante 30 min en una solución 1M de salicilato sódico, se seca al vacío y se expone a una película de rayos X, previamente fogueada con un destello de luz roja. El tiempo de exposición es de 1-3 h, a -70ºC.

16.- ENSAYO DE NITROGENASA CON EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS

16.1.- PREPARACION DE LOS EXTRACTOS DE K.pneumoniae

Se hizo siguiendo en buena parte las recomendaciones de Dixon et al (1977) y Cannon (1980).

Para conseguir los cultivos en condiciones activadoras para la nitrogenasa se procedió de la siguiente manera: se inocula una colonia reciente de la cepa de K.pneumoniae en 5 ml de caldo LB y se incuba a 37ºC, con aireción durante 3-5 h. Dos mililitros del precultivo obtenido se diluyen en 250 ml de caldo DM en un matraz de cierre hermético de medio litro de capacidad. Se incuba a 30ºC durante 12-15 h, con agitación. Al cabo de este tiempo, se centrifuga el cultivo a temperatura ambiente y las células se resuspenden en caldo NFDM, que está exento de nitrógeno combinado, en frascos de cierre hermético, en los que inmediatamente se establece una atmósfera libre de oxígeno y enriquecida en nitrógeno. Los frascos se agitan, a 30ºC, durante 5-6 horas.

A partir de aquí, en el proceso de obtención de extractos, todas las soluciones y suspensiones se manipulan bajo atmósfera de nitrógeno. Los tubos están herméticamente cerrados y sus tapones van provistos de un círculo de goma a través del cual se facilita la inyección de los gases y líquidos requeridos. Las soluciones que aparecen a continuación son burbujeadas intensamente con nitrógeno antes de añadir el ditionito sódico con las que todas van suplementadas (a excepción del tolueno).

El cultivo final se centrifuga, las células se lavan en 50 ml de 25mM Tris-ClH (pH7.4), 0.1 $mg.ml^{-1}$ ditioni-

to sódico, y se vuelven a centrifugar. El sedimento se resuspende en 4 ml de tampón HMD (25mM HEPES, pH7.4, 5mM sulfato magnésico, 0.1 $mg.ml^{-1}$ ditiotreitol, 0.2 $mg.ml^{-1}$ ditionito sódico), añadiéndose 0.25 ml de tolueno e incubándose a 25ºC durante 30 min bajo atmósfera de nitrógeno. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido hasta el momento de la preparación de la reacción de la nitrogenasa; entonces las muestras, ya descongeladas son adicionadas de tritón X-100 hasta 3%, y se agitan a 30ºC durante 30 min bajo atmósfera inerte.

16.2.- PREPARACION DE LOS EXTRACTOS DE LEVADURA

Se realizó adaptando un procedimiento de lisis osmótica de esferoplastos. Cincuenta mililitros de un precultivo de 15 h de la cepa de levadura en cuestión, en caldo MGCA, se mezclan con 200 ml de MGCA fresco, en un frasco hermético de medio litro, en el que se crea una atmósfera de nitrógeno. Se incuba a 30ºC, con agitación, hasta que la D.O. alcance 0.5-0.7 (a 600nm). Las células se recogen por centrifugación en tubos saturados de nitrógeno y se resuspenden en 25 ml de solución SED (1M sorbitol, 25 mM EDTA-Na_2, 50mM ditiotreitol 0.1 $mg.ml^{-1}$ ditionito sódico), incubándose 15 min a 30ºC. Las levaduras se centrifugan y se lavan dos veces en tampón TS (10mM Tris-ClH, pH7.5, 1M sorbitol, 0.1 $mg.ml^{-1}$ ditionito sódico). Para obtener los esferoplastos, las células, resuspendidas en 25 ml de TS se incuban con 0.3-0.5 ml de β-glucuronidasa, a 30ºC, durante 1 hora. Los esferoplastos se recogen por centrifugación y se lavan tres veces en volúmenes de 25 ml de TS.

Finalmente, para provocar el choque osmótico, se resuspenden en 1 ml de tampón HMD (ver 16.1) y tritón X-100 hasta 1% agitando a 30ºC durante 30 min.

16.3.- ENSAYO in vitro DE LA NITROGENASA

Los detalles técnicos del método seguido están descritos por Eady (1980). La reacción de la nitrogenasa se lleva en viales herméticos de cristal de unos 10 ml de capacidad, en 1 ml de mezcla consistente en 25mM HEPES (pH7.5), 12.5 mM cloruro magnésico, 5mM ATP, 3.5mM creatín-fosfato, 0.1 $mg.ml^{-1}$ creatín-quinasa, 0.5 $mg.ml^{-1}$ seroalbúmina bovina, 20 mM ditionito sódico, bajo atmósfera de 90% nitrógeno y 10% acetileno. Dentro del volumen de mezcla de reacción se incluyen alícuotas de los extractos de K.pneumoniae, (con una concentración de 2 $mg.ml^{-1}$ de proteina), de levadura (20-60 $mg.ml^{-1}$ de proteína), o mezcla de ambos. Los tubos se incuban a 30ºC, a diversos tiempos (hasta 12 h) y la reacción se detiene por adición de ácido tricloroacético, hasta 3%.

La actividad nitrogenasa se determina como capacidad de reducción de acetileno a etileno, analizando muestras de la atmósfera de cada tubo al término de la reacción mediante cromatografía gaseosa. Se empleó un cromatógrafo Perkin-Elmer F33, provisto de detector de ionización de llama y columna Poropak de alúmina, de 80 mesh y 45 cm de longitud, a 115ºC, y con nitrógeno como gas portador, con flujo de 50 $ml.min^{-1}$.

Las determinaciones de proteína de los extractos se hicieron según el procedimiento de Lowry et al. (1951).

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

1.-CLONACIÓN DEL FRAGMENTO nif DE pSA30 EN pAAR6.

El operón estructural que codifica los polipéptidos de la nitrogenasa de K.pneumoniae (nifHDKY) está incluído en el fragmento EcoRI de 6.8 kb del plásmido pSA30 (a dicho fragmento lo denominaremos a partir de aquí Eco-nif30). Según los datos de secuencia de la zona 5' que precede a nifH (Scott et al., 1981; véase Fig 25), entre el sitio Eco RI proximal a este gen y su correspondiente codón iniciador existen 291 pares de bases. En esta zona se dan tres tripletes ATG inespecíficos, o sea, que en bacterias no son codificadores al no encontrarse dentro de un marco abierto de lectura ni poder servir como inicios procarióticos de síntesis de proteínas, al no disponer de secuencias previas adecuadas para unión de ribosomas. Si estos tripletes tuvieran que funcionar , pues, como inicios de traducción en levadura, darían marcos de lectura totalmente incompatibles con la síntesis del producto de nifH: los dos primeros tripletes (los más próximos al sitio EcoRI), situados respectivamente en las coordenadas (-278 a -276) y (-187 a -185) respecto del inicio de codificación de nifH (coordenada +1) originarían cortas secuencias traducibles que terminarían antes de nifH. El tercer triplete (-52 a -50) iniciaría un marco de lectura que se introduciría en nifH, pero sin coincidir con la fase correcta de este gen.

En un experimento inicial se procedió a clonar el fragmento Eco-nif30 en el vector bifuncional pAAR6,que

es un plásmido de tipo "sandwich" que suministra señales para el comienzo y la terminación de la transcripción en S.cerevisiae. Con ello se pretendió obtener una construcción genética destinada a expresar la región nif en levadura a nivel de transcripción, pero a partir de la cual previsiblemente no se produciría traducción del mensaje de nifH por las razones antes expuestas.

Se extrajo el plásmido pSA30 de E.coli GM4 usando la purificación por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Unos 25 µg de este plásmido se digirieron totalmente con 50 unidades de la endonucleasa EcoRI. El ADN se sometió a electroforesis preparativa en gel de 0.7% de agarosa. Tras teñir el gel con bromuro de etidio se visualizaron con luz UV de onda larga las dos bandas correspondientes respectivamente al fragmento Eco-nif30 (6.8 kb) y al vector pACYC184 (4 kb). La porción del gel que contenía el fragmento nif fue utilizada para aislar y purificar su ADN por electroelución, tal como se describe en Material y Métodos (apartado 10.1) El ADN electroeluído, una vez sometido a dos fenolizaciones sucesivas para eliminar contaminantes de la agarosa, fue finalmente disuelto en 10 µl de tampón TE8. Se recuperaron unos 4 µg de fragmento nif, lo que teniendo en cuenta el material de partida, supone un rendimiento del 25% de eficiencia de recuperación de ADN tras el proceso de electroelución.

Por otro lado, el vector pAAR6, purificado igualmente por gradiente en cloruro de cesio, fue hidrolizado con EcoRI. Un microgramo de vector así linearizado fue tratado con fosfatasa alcalina para desfosforilar sus extremos y finalmente suspendido en 10µl de tampón TE8.

En un volumen de 20 µl de tampón de ligación se mezclaron 0.5 µg de pAAR6 linearizado desfosforilado y 1 µg de fragmento Eco-nif30, añadiéndose 400 unidades de ligasa de T4. La reacción de ligación se llevó a 4ºC durante 12 h. Pasado este tiempo la mezcla se usó directamente para transformar células competentes de E.coli MC1061. La frecuencia de transformantes resistentes a ampicilina (Ap^R) fue del orden de $6.10^3 - 1.10^4$ por µg de ADN. Un control en paralelo que implicó transformación con una concentración idéntica de pAAR6 linearizado, desfosforilado y tratado con ligasa rindió solamente 20 transformantes por µg, lo que supone indicio de una alta eficiencia de desfosforilación, y por lo tanto gran frecuencia esperable de recombinantes entre los transformantes.

Se analizaron varias colonias al azar de entre los transformantes para la presencia de plásmidos híbridos (utilizando la técnica de extracción de plásmidos en pequeña escala seguida de una sencilla caracterización por endonucleasas). Los clones contenían, en efecto, plásmidos con insertos del fragmento nif en las dos orientaciones posibles. La orientaciones se dedujeron empleando la digestión por BglII, enzima que tiene un sitio diana en la porción del vector y otro en la zona nif. El plásmido recombinante que lleva el fragmento Eco-nif en posición orientada correctamente (o sea, con los genes nif con su sentido de transcripción correspondiente al del promotor de ADC1: configuración 5'-promotor-nif-terminador-3') fue denominado pE11.

2.- MODIFICACION in vitro DE LA REGION 5' PREVIA A nifH

Debido a los previsibles problemas de traducción errónea en levadura del mensaje de nifH a partir del plásmido pE11 a causa de los tripletes ATG situados en la región 5' precedente al operón nifHDKY, todo intento de lograr la expresión del polipéptido de la ferroproteína de la nitrogenasa en S.cerevisiae debe pasar por la eliminación de dichos tripletes, de modo que sea el primer codón de nifH el que suministre el inicio de síntesis proteica.

En la corta secuencia que media entre el tercer triplete erróneo (coordenadas -52 a -50) y el codón inicial de nifH no se da ninguna diana para alguna enzima de restricción que no sea capaz de cortar simultáneamente en el interior de Eco-nif30. Por lo tanto, para eliminar la porción 5' no codificadora se recurrió a una estrategia de delecciones progresivas in vitro, de forma controlada, desde los extremos del fragmento Eco-nif30, empleando la enzima Bal31. Se pretendía, pues, obtener delecciones que afectaran más allá de la coordenada -52, pero que no alcanzaran la coordenada +1, lo que supone lograr que, dentro de la heterogeneidad de fragmentos generados por Bal31 haya una buena representación de delecciones de más de 239 pb y de menos de 291, contabilizadas desde el extremo EcoRI proximal a nifH.

Para aumentar las expectativas de éxito en el experimento definitivo se procedió previamente a calibrar la actividad de Bal31 frente a una alícuota de la misma preparación de ADN que habría de utilizarse en el ensayo

final. Se purificó ADN de pEI1 por gradiente de cloruro de cesio. Unos 50 µg de la preparación se digirieron totalmente con 30 unidades de EcoRI. Tras inactivar la endonucleasa y desproteinizar por fenolización, se precipitó el ADN con etanol, y se resuspendió en 12.5 µl de tampón TE8. Tras unas pruebas de tanteo inicial, las condiciones de ensayo para determinar la actividad de Bal31 sobre la muestra de pEI1 digerida por EcoRI quedaron así: 10µg de dicha muestra se disolvieron en 50µl de tampón de reacción de Bal31 (apartado 8.2 de Material y Métodos), preincubándose en baño a 30ºC durante 5 min. La reacción se inició añadiendo 0.5 µl de una preparación de Bal31, equivalentes a 1.5 unidades. A los 8 y 12 min se detuvo la reacción de sendas alícuotas de 25µl por adición de EGTA (ácido etilénglicol-bis-(β-amino-etil éter)-N,N'-tetraacético) hasta 20mM, a 0ºC. Para comprobar la magnitud de la digestión desde el extremo EcoRI proximal a nifH (uno de los 4 extremos sobre los que actúa la enzima en esta mezcla), alícuotas de cada tiempo de tratamiento (así como un control no tratado) se sometieron a digestiones por BglII, enzima que corta a 728 pb de EcoRI en el fragmento Eco-nif30 original, y se determinaron, a partir de electroforesis en 2% de agarosa (Fig 11), las disminuciones de los tamaños del segmento primitivo EcoRI-BglII. En la Fig 12 se representan los resultados. Como se aprecia, a los 8 min de tratamiento por Bal31 el fragmento EcoRI-BglII ha quedado reducido a una población heterogénea de fragmentos cuyos tamaños oscilan mayoritariamente entre 580 y 680 pb. A los 12 min la mayor parte de los fragmentos está comprendida entre 480 y 680 pb, con una zona muy intensa en la electroforesis, correspondiente a 520-530 pb Tomando en consideración este último valor, se deduce que la enzima Bal31 ha eliminado bajo las condiciones des-

Fig 11: Calibración actividad Bal31 sobre ADN de pEI1 digerido previamente por EcoRI, y posteriormente hidrolizado por BglII. A) control sin Bal31; C) muestra tratada, 8 min. D) muestra tratada, 12 min.' B) patrón ADN de ØX174 (RFI1) digerido por HaeIII.

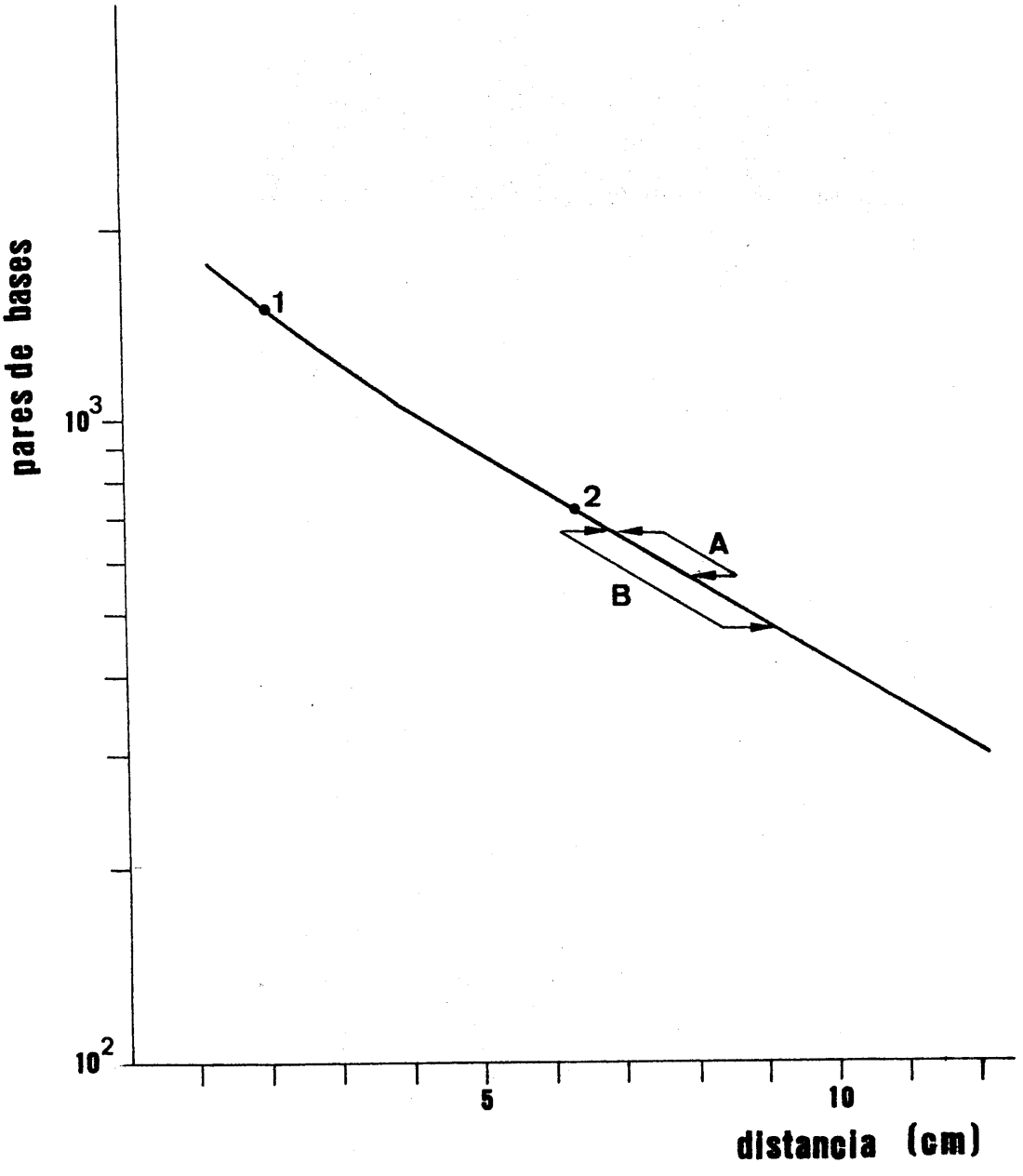


Fig 12: Representación semilogarítmica de la Fig 11: población de segmentos derivados del fragmento EcoRI-BglII de 728 pb (punto 2), tras digestión de los fragmentos Eco-nif de pEI1 por Bal31 durante 8 min (A) y 12 min (B). El punto 1 representa el fragmento EcoRI-BglII de 1500 pb, correspondiente a la porción de pAAR6 de pEI1

critas unas 16-17 pb por minuto desde el extremo EcoRI proximal a nifH. (Esta tasa de digestión coincide con la que se determina si a los 8 min se considera 600 pb como la longitud media representativa). Obsérvese que a los 12 min el límite superior de tamaños de fragmentos apreciables en el gel (unos 680 pb) es prácticamente similar al encontrado a los 8 min. Esto indica que muchas moléculas de Bal31 se detienen en su acción tras haber eliminado unas 50-60 pb Se ha descrito que la enzima Bal31 tiende a atascarse en zonas del ADN ricas en G+C. En nuestro caso, a unas 60 pb de EcoRI existe una región que posee abundantes G y C (Fig 25), lo que seguramente constituye una barrera al avance de muchas moléculas de la nucleasa.

Los fragmentos nif con delecciones adecuadas a nuestros propósitos deben rendir, tras el corte con BglII sub-fragmentos de 437 a 488 pb . Como se ve en el experimento de calibración, a los 12 min hay una zona patente en la electroforesis correspondiente a 480-550 pb , por lo que se puede asegurar que bajo las condiciones empleadas se obtienen delecciones del fragmento original que cumplen los requisitos buscados, aunque la mayor parte de ellas están cercanas al límite superior de tamaño admisible.

Para el experimento definitivo de resección del fragmento Eco-nif30 de pEI1 se reprodujeron todas las condiciones descritas más arriba, variando los tiempos de tratamiento para mejorar la proporción de moléculas buscadas: 10 µg de la misma preparación de ADN digerido por EcoRI se incubaron en 50 µl de tampón con 1.5 unidades de Bal31 a 30ºC. Sendas alícuotas de 25 µl fueron inactivadas para la enzima a los 13 min (210-220 pb que se espera queden eliminados) y a los 15 min (240-260 pb). Tras desproteini-

zar y precipitar el ADN de cada muestra, ésta se resuspende en 25µl de tampón TE8, empleándose 5µl de cada una para la digestión con BglII con vistas a la confirmación de la cuantía de la actuación de la nucleasa Bal31. La subsecuente electroforesis (Fig 13) muestra que a los 13 min los fragmentos pequeños detectables en el gel oscilaban entre 600 y 420 pb de longitud (130 a 310 pb eliminadas). A los 15 min la mayor dispersión de tamaños hace que la población de moléculas pequeñas sea poco visible en el gel, pero asumiendo que Bal31 actúa a igual velocidad desde los cuatro extremos presentes en la mezcla, se puede deducir, tomando como control el fragmento EcoRI-BglII de 1500 pb (correspondiente al vector pAAR6) que se han eliminado de 200 a 650 pb de cada extremo. Por lo tanto, también en la alícuota tratada durante 15 min debe haber asimismo moléculas adecuadas a nuestros propósitos (Fig 14).

3.- CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS nif RESECCIONADOS EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pAAR6.

Tras las delecciones in vitro se procedió a realizar las manipulaciones pertinentes para insertar las moléculas nif en el vector pAAR6. En primer lugar se aislaron los fragmentos nif deleccionados respecto de los fragmentos igualmente acortados correspondientes al vector, presentes en la mezcla de pEI1 tratado por EcoRI y Bal31. Para ello se recurrió a electroforesis preparativa en 0.5% de agarosa (en la Fig 15 se muestra el aspecto del gel tras la electrofo-

Fig 13: Actuación de Bal31 sobre pE11 previamente digerido por EcoRI, visualizado tras hidrólisis con BglII, por electroforesis en 2% agarosa. A) control sin Bal31; C) muestra tratada durante 13 min. D) muestra tratada durante 15 min. B) patrón de ADN de ØX174 (RFII) digerido por HaeIII.

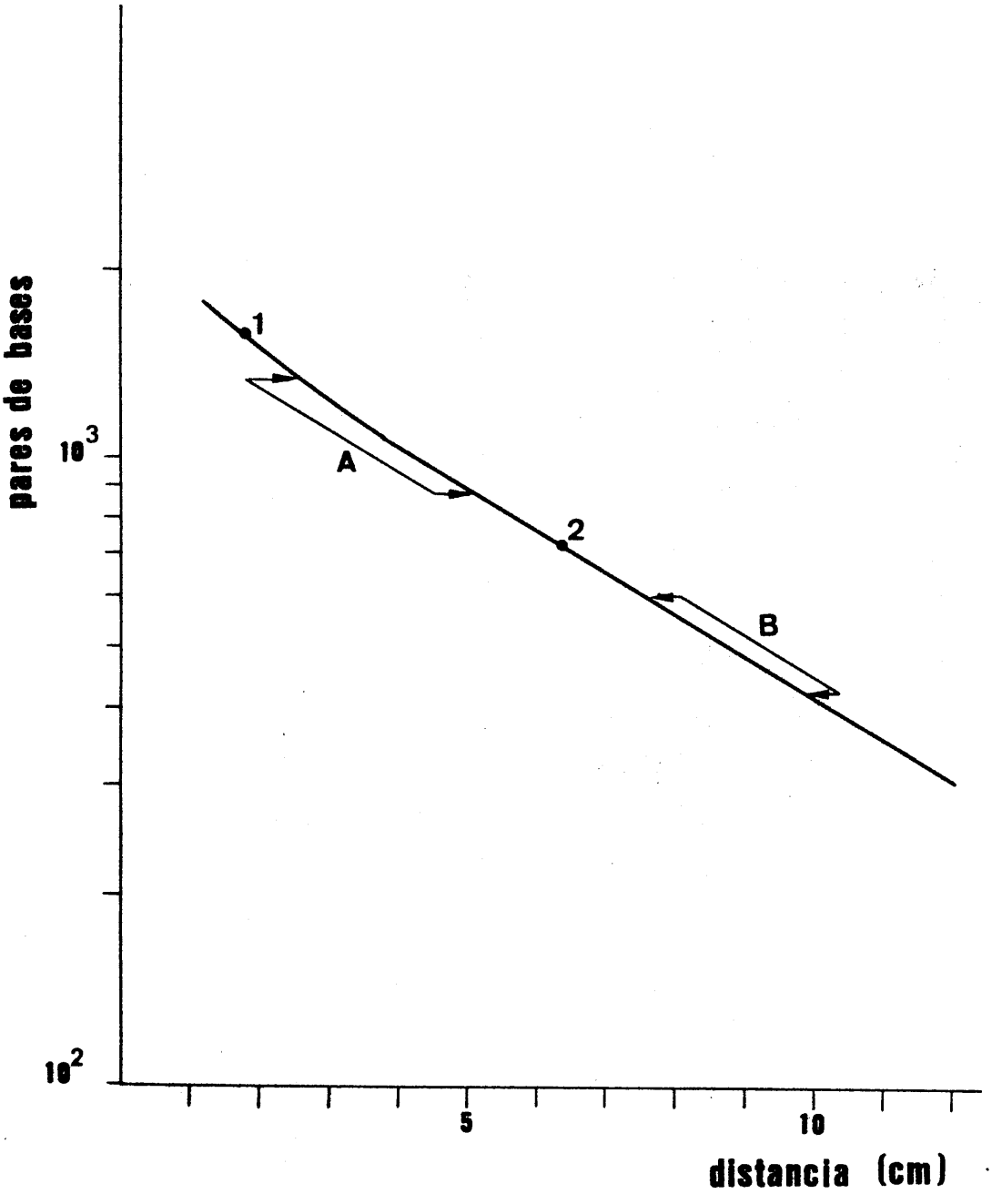


Fig 14: Representación semilogarítmica de los resultados de la Fig 13. La zona B representa el rango de tamaños del fragmento EcoRI-BglII de 728 pb, tras una digestión por Bal31 de 13 min. La zona A es el rango derivado del fragmento de 1500 pb de pAAR6 después de un tratamiento de 15 min.

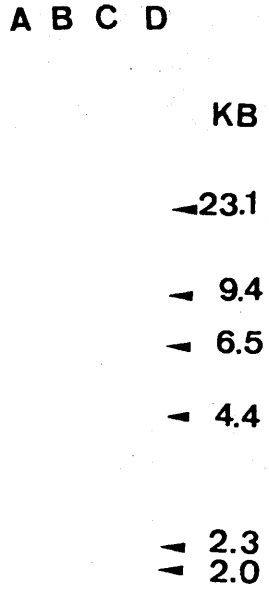


Fig 15: Electroforesis de los fragmentos EcoRI de pEI1 tratados por Bal31 durante A) 0 min., B) 5 min., C) 13 min., D) 15 min.

resis de muestras correspondientes a distintos tiempos de tratamiento con Bal31).

Unos 4 µg de ADN de pEI1 digerido con EcoRI y tratados 13 min con Bal31 se repartieron en varios pocillos de gel para evitar la saturación de ADN en un solo callejón y el consiguiente riesgo de solapamientos de bandas correspondientes a los dos fragmentos. Una vez terminada la electroforesis y teñido el gel, se recortó la banda formada por los fragmentos nif, sometiendo el ADN a electroelución, purificación por fenolización y precipitación con etanol. Finalmente se resuspendió en 20 µl de tampón TE(pH7.6).

Debido a que la acción de Bal31 sobre las dos cadenas puede no ser uniforme, suelen quedar muchas moléculas con cortos extremos protuberantes, heterogéneos. Con objeto de uniformar toda la población de moléculas a extremos romos, que se requieren para el paso ulterior, los fragmentos nif (1 µg de ADN electroeluido) se trataron con la enzima Klenow en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos (Material y Métodos, 8.7.1). Terminada la reacción e inactivada la enzima por calor, el ADN se precipitó por etanol y se resuspendió en 18 µl de agua destilada.

Con estos 18 µl de ADN (correspondientes a unos 0.25 picomoles de fragmento nif) se resuspendieron 2 µg del oligonucleótido sintético portador de la diana para EcoRI, previamente preparado según Material y Métodos (8.8). Se añadieron 2 µl de tampón de ligación concentrado (x10) y 800 unidades de ligasa de fago T4. La concentración aproximada del ligador EcoRI en la mezcla es de 12.5 µM, y la de nif es de 12.5nM. Por lo tanto, se usó un exceso molar de 1000 veces de ligador respecto de los fragmentos nif provistos de extremos romos. La reacción se llevó a 16ºC duran-

te 16 h. Inactivada la ligasa por adición de EDTA, el ADN se precipitó y lavó con etanol, siendo finalmente resuspendido en 36 µl de agua destilada.

El siguiente paso consiste en convertir a extremos protuberantes EcoRI las moléculas ligadas en la reacción anterior, y purificar los fragmentos nif respecto de los oligonucleótidos en exceso no unidos a dichos fragmentos nif. Los 36 µl de solución de ADN del párrafo anterior se ajustaron a 40 µl con tampón concentrado (x10) "Endo-altas sales" y se añadieron 70 unidades de enzima EcoRI, incubándose a 37ºC durante 4 h. Tras inactivar la enzima por EDTA, la muestra se sometió a filtración por columna de Ultrogel tal como se describe en Material y Métodos (11.3), con objeto de separar los fragmentos nif respecto de los oligonucleótidos. Se recogieron 45 fracciones de 0.1 ml cada una, y se midió la emisión beta procedente de los ligadores marcados en un contador de centelleo, obteniéndose la curva de elución mostrada en la Fig 16. Las fracciones que configuran el primer pico (nº 11-17), que contienen el ADN de alto peso molecular correspondiente a los fragmentos nif, se juntaron y dicho ADN se precipitó y secó al vacío.

Este ADN fue resuspendido en 10 µl de tampón de ligación en el que previamente se había disuelto 0.5 µg de vector pAAR6 linearizado por EcoRI. La unión covalente de ambos tipos de moléculas fue promovida por adición de 400 unidades de ligasa e incubación a 4ºC durante 12 horas.

La mezcla procedente de la ligación, repartida en dos alícuotas de 5 µl, se empleó para transformar sendas preparaciones de células competentes de E.coli MC1061. La frecuencia de transformantes fue de 2.10^3 μg^{-1} de pAAR6.

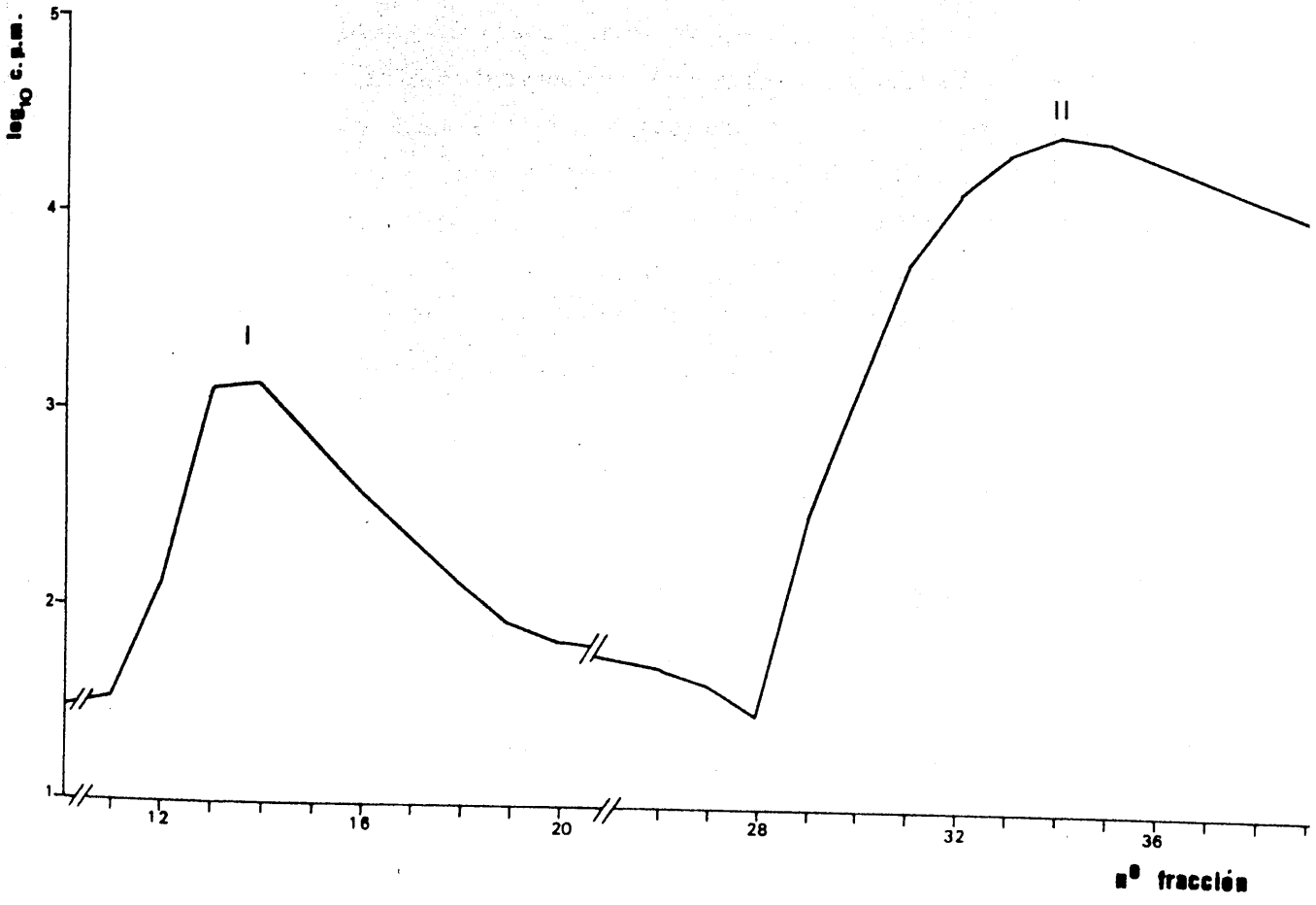


Fig 16: Curva de elución de los fragmentos nif respecto de los ligadores EcoRI no incorporados. Filtración en mini-columna de Ultrogel AcA-34.

FACULTAD DE CIENCIAS
BIBLIOTECA

El análisis electroforético de varias decenas de plásmidos procedentes de distintos transformantes sólo reveló patrones de migración similares a pAAR6, lo que indicaba una elevada proporción de auto-ligamientos del vector. Para localizar a los recombinantes se recurrió a la técnica de hibridación de colonias in situ (Material y Métodos, 13). Un total de 420 colonias transformantes Ap^r se rastrearon para plásmidos híbridos empleando una sonda marcada con ^{32}P basada en el fragmento Eco-nif30 (actividad específica: $10^7 cpm.\mu g^{-1}$). Los autorradiogramas de los filtros revelaron 15 colonias que daban señal positiva de hibridación (Esto supone una proporción de 3.6% de recombinantes sobre el total de transformantes). Los plásmidos quiméricos albergados por estos clones constituyeron la serie que denominamos pBA.

4.- CARTOGRAFIA DE LAS DELECCIONES PORTADAS POR LOS PLÁSMIDOS DE LA SERIE pBA

Cada plásmido de la serie pBA se sometió a un análisis de restricción con objeto de determinar la extensión aproximada de las delecciones en la región proximal a nifH, por comparación con el fragmento Eco-nif30 original. La estrategia empleada consistió en realizar digestiones secuenciales por BglII y EcoRI, con posterior electroforesis de los productos en geles de 2% de agarosa. Se dedujeron las magnitudes de las respectivas delecciones calculando la longitud del fragmento pequeño BglII-EcoRI, reflejo de la hidrólisis que Bal31 produjo en la resección in vitro.

La Fig 17 muestra geles teñidos en los que se realizaron electroforesis de ADN doblemente digerido de algunos de los plásmidos pBA. El resultado del cartografiado de las delecciones, expresado como la situación aproximada del punto final afectado por Bal31 en relación al segmento EcoRI-BglII original, queda expresado en la Fig 18 . Hay dos plásmidos, pBA12 y pBA15 que, a juzgar por la longitud de sus respectivos trozos EcoRI-BglII, deberían albergar, con mucha probabilidad, delecciones eliminadoras de los tres tripletes ATG inconvenientes para la correcta traducción de nifH en levadura, pero que respeten la porción codificadora de este gen. Hay otros dos plásmidos (pBA10 y pBA5) que parecen proceder de delecciones que terminaron cerca de los límites permisibles (superior e inferior, respectivamente) para ser considerados como adecuados, aunque la capacidad resolutiva de los geles de agarosa no permite certeza absoluta sobre su total adecuación a los objetivos propuestos. Por esta razón, en adelante sólo se continuó el trabajo con los plásmidos pBA12 y pBA15.

La orientación de los insertos nif en ambos plásmidos resultó ser la antiparalela, es decir, opuesta a la que daría lugar a un transcripto con sentido en relación al fragmento clonado (véase la electroforesis de plásmidos digeridos por BglII, Fig 19).Por lo tanto se recolocaron los insertos en su sentido correcto, hidrolizando por EcoRI y religando, con la consiguiente transformación de E.coli, caracterizando los plásmidos por análisis de restricción (Fig 20). El derivado reorientado de pBA12 se denominó pBA21, y el correspondiente a pBA15 se llamó pBA51. En la figura 21 se representa el mapa de restricción general de los plásmidos con insertos paralelos.

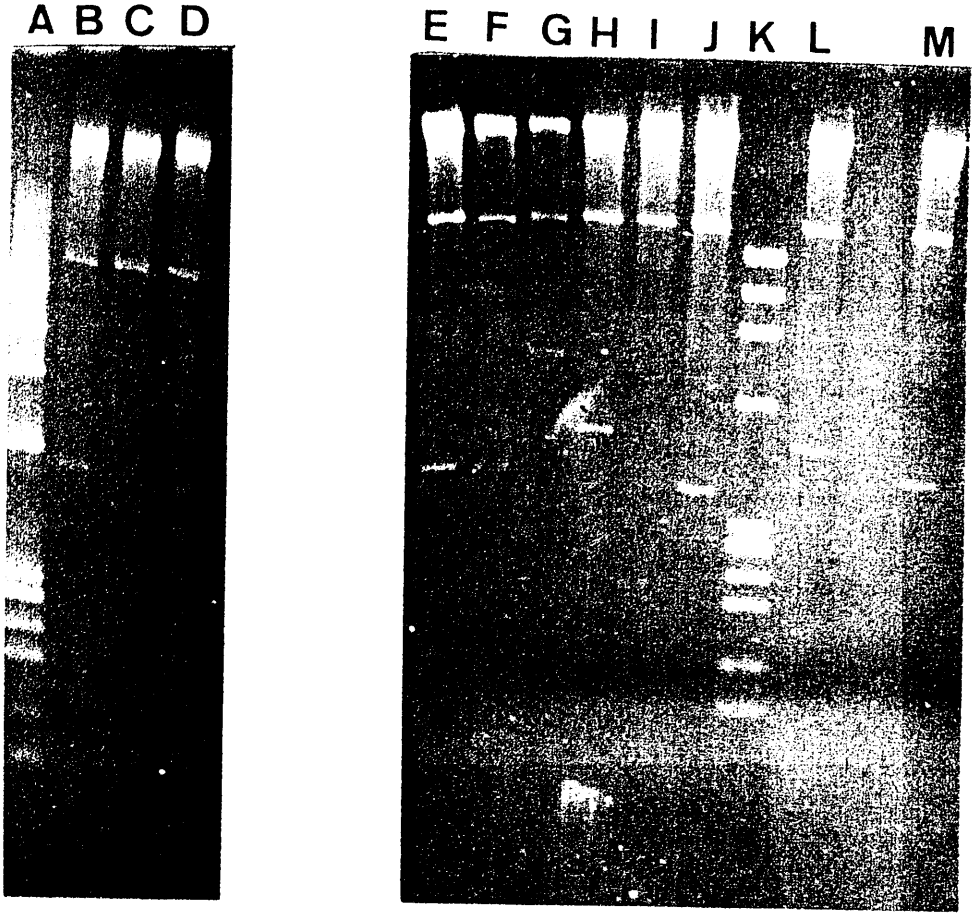


Fig. 17: Electroforesis de ADN de plásmidos de la serie pBA digeridos por EcoRI+BglII: B) pBA7, C) pBA8, D) pBA10, E) pBA4, F) pBA11, G) pEI1, H) pBA12, I) pBA13, J) pBA14, L) pBA 15, M) pBA9. En A) y en K), patrones de pesos moleculares de ADN ØX174 (RFII) digerido por HaeIII.

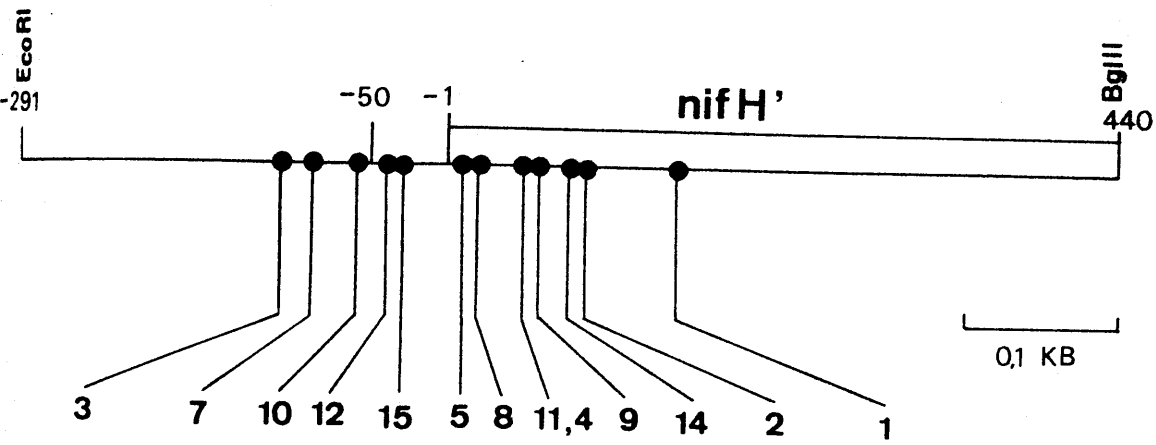


Fig 18 Mapa del segmento EcoRI-BglII del fragmento Eco-nif30 original, con la situación aproximada de los puntos finales de las delecciones de que derivan los plásmidos de la serie pBAn.

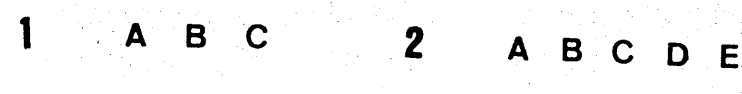


Fig 20.1: Electroforesis de ADN de A) pBA21 y B) pBA51 digeridos por BglII. En C), patrón de ADN de fago lambda digerido por HindIII.

20.2: Electroforesis de ADN de A) pBA12, B) pBA15, D) pBA21 y E) pBA51 digeridos por BglII+EcoRI. En C) patrón de ADN de ØX174 (RFII) digerido por HaeIII.

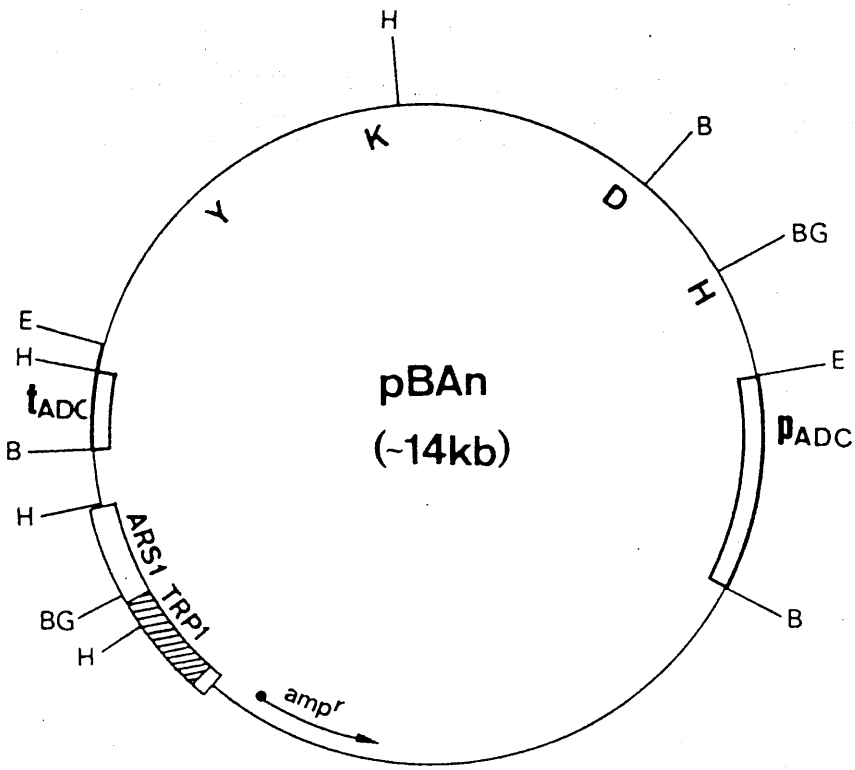


Fig 21. Mapa genético-físico de los plásmidos pBAn con insertos paralelos en relación al promotor ADC1

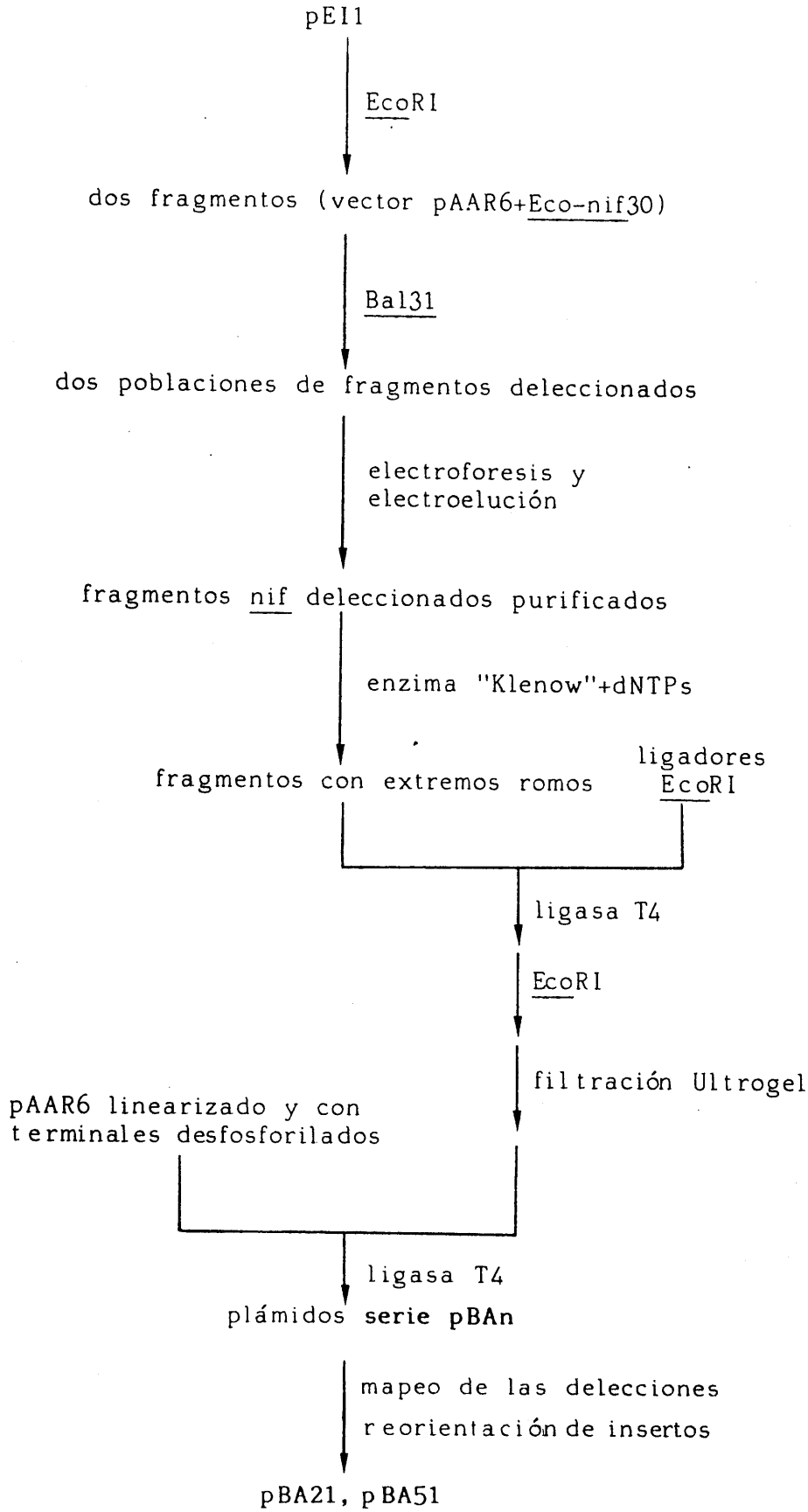


Fig 22 : Esquema del proceso de construcción de los plásmidos pBA21 y pBA51.

En la Fig 22 se representa la estrategia completa que se siguió para conseguir los plásmidos pBA21 y pBA51.

5.- SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES 5' PREVIAS A nifH EN LOS PLÁSMIDOS pBA21 y pBA51

Para confirmar que los plásmidos pBA21 y pBA51 proceden de delecciones que han eliminado todos los tripletes ATG que pudieran suponer inicios anómalos de traducción de nifH en levadura, se determinó la secuencia de ADN desde el sitio EcoRI de sus respectivos fragmentos Eco-nif en dirección a la porción codificadora de nifH, comparándose con la secuencia original en el fragmento Eco-nif30.

La estrategia de secuenciación queda resumida en la Fig 23. Los detalles del experimento están recogidos en Material y Métodos, apartado 14.

Se hidrolizaron unos 20 µg de ADN de cada plásmido con EcoRI ; se eliminaron los fosfatos terminales en 5' y se sustituyeron con fosfato radiactivo a partir de (γ-^{32}P)ATP en reacción catalizada por polinucleótido-quinasa; a continuación se cortó el ADN con la segunda restrictasa (BglII), y los fragmentos se resolvieron por tamaños en geles preparativos de 1% de agarosa de bajo punto de fusión; se fundió la porción de los geles que contenía el ADN marcado correspondiente al fragmento pequeño EcoRI-BglII, y se purificó dicho ADN. Posteriormente éste se sometió a las cua-

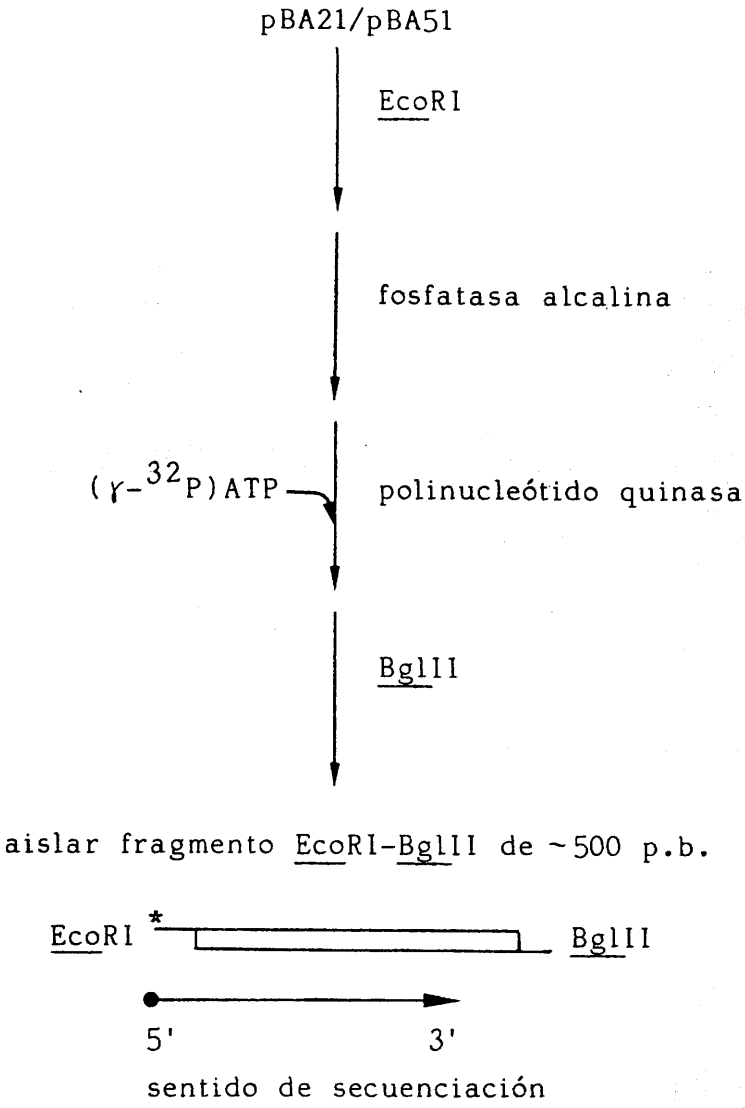


Fig 23: Estrategia de secuenciación de la región 5' no codificadora previa a nifH en pBA21 y pBA51.

tro reacciones de rotura limitada del método de secuenciación de Maxam y Gilbert (1980). Las moléculas resultantes se separaron por electroforesis en geles de urea-poliacrilamida al 20%. Los autorradiogramas obtenidos (Fig 24) permiten establecer las secuencias, referibles a la de la región 5' original de Eco-nif30 (Fig 25). Se aprecia que tanto pBA21 como pBA51 son construcciones genéticas adecuadas a los objetivos propuestos: ambas carecen de los tres tripletes ATG incorrectos; pBA21 tiene su término de delección en la coordenada -42, y pBA51 en la -28. Se confirmó, pues, que los dos plásmidos recombinantes podían ser empleados en los subsiguientes experimentos de expresión de las secuencias nif en levadura.

6.- INTRODUCCIÓN EN LEVADURA DE LOS PLÁSMIDOS nif DERIVADOS DE pAAR6

Una vez construídos y caracterizados los plásmidos recombinantes, se procedió a introducirlos en una cepa de levadura apropiada para selección del marcador TRP1. Se empleó la estirpe 830 de S.cerevisiae, que lleva el alelo mutante trp1-6, de baja frecuencia de reversión. La introducción de los plásmidos bifuncionales se realizó según un protocolo de transformación (Material y Métodos, 12.2), usando esferoplastos obtenidos por digestión enzimática de paredes celulares. Se introdujeron por separado los plásmidos pBA21 y pBA51, sus respectivas construcciones antiparalelas (pBA12 y pBA15), el plásmido pEI1 (portador de la región 5' nif

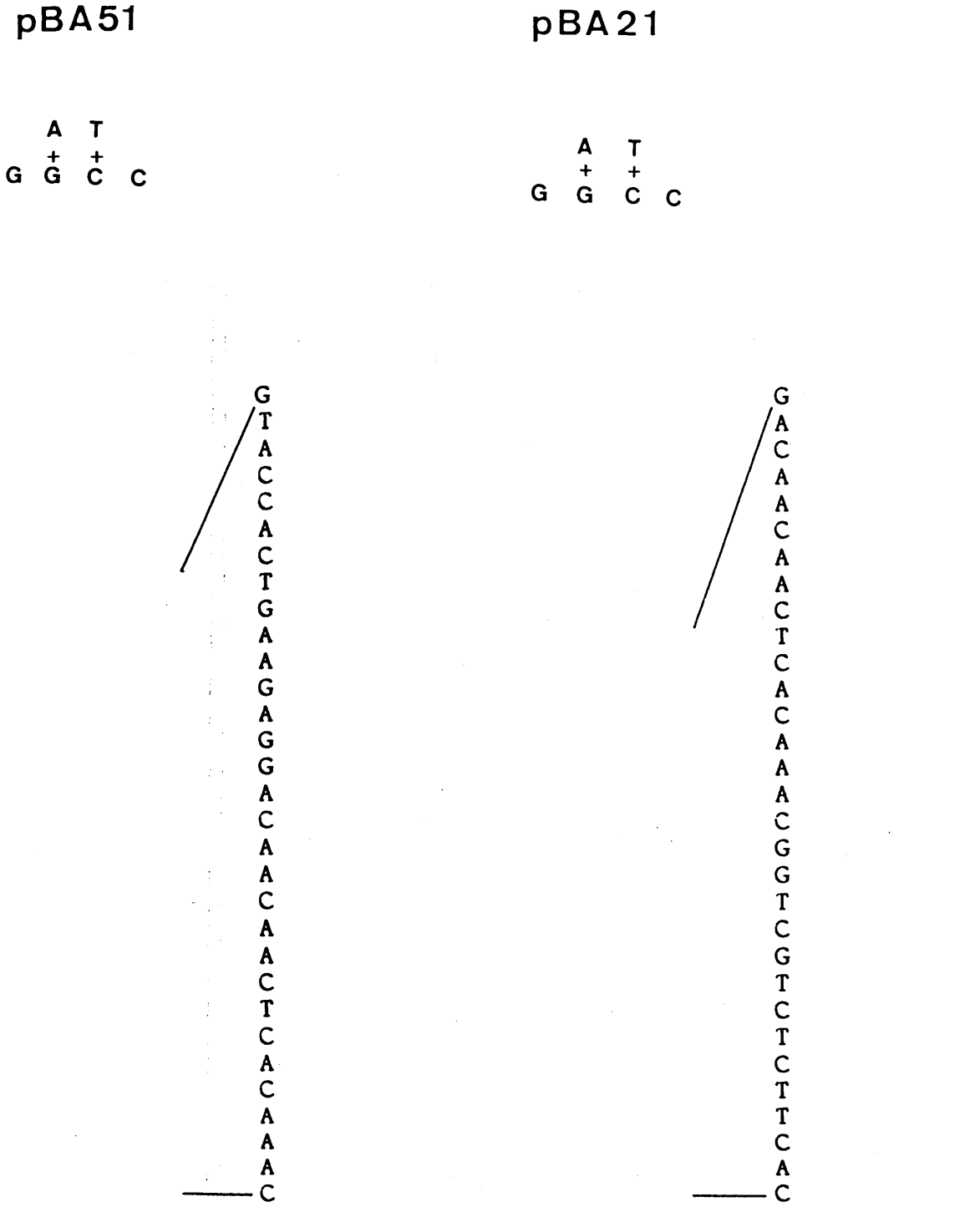


Fig 24: Autorradiogramas de los geles de secuenciación de las regiones 5' proximales a nifH en los plásmidos recombinantes pBA51 y pBA21.

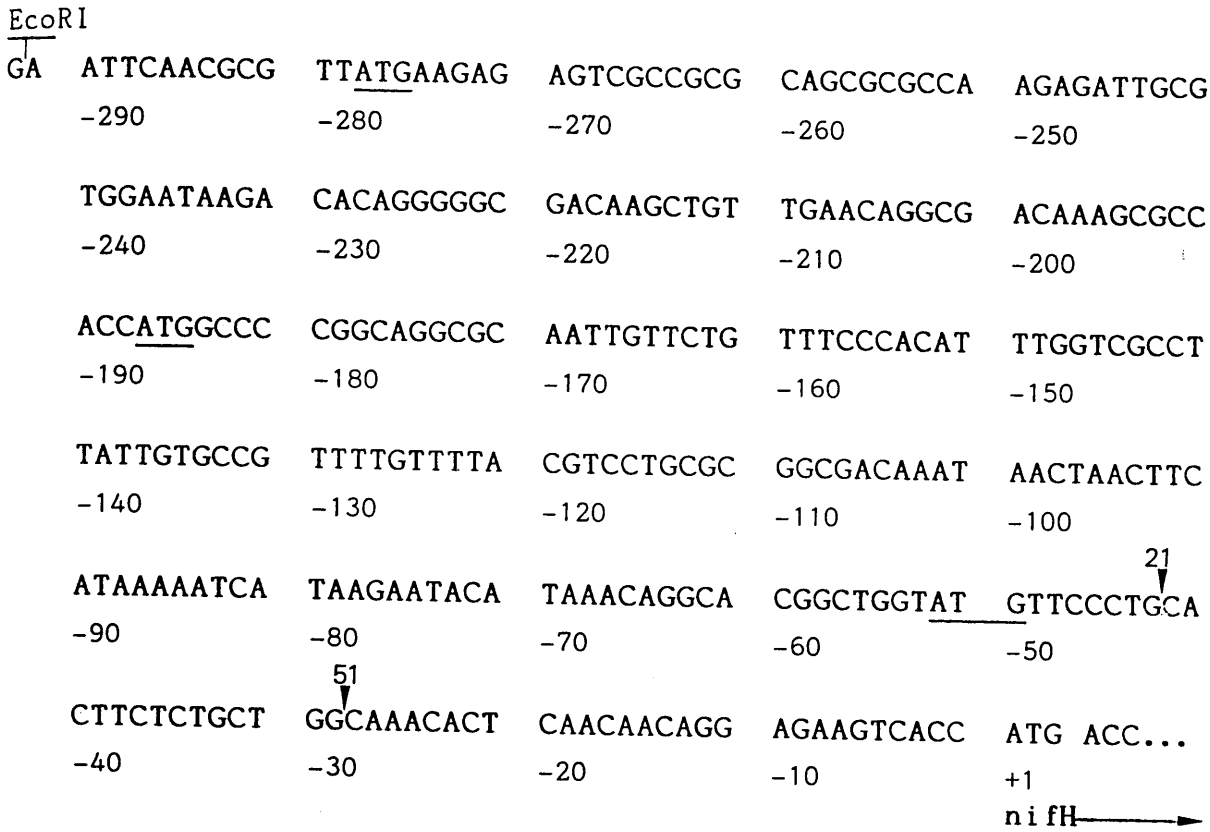


Fig 25: Secuencia de nucleótidos de la región 5' previa al gen nifH de K.pneumoniae con la situación de los puntos finales de las delecciones de pBA21 y pBA51. Se indican, subrayados, los tres tripletes ATG incorrectos para la traducción de nifH.

sin manipular) y el vector pAAR6. Las frecuencias de transformantes fueron del orden de 10^{-4} por célula superviviente (10^3 transformantes Trp^+ por µg de plásmido, por cada 10^7 células), similares a las obtenidas por otros autores usando plásmidos de tipo YRp.

Hasta ahora hay pocos estudios sobre el comportamiento replicativo y segregacional de plásmidos basados en ARS para su mantenimiento en levaduras, pero como se comentó en la Introducción, se sabe que incluso en un cultivo sometido a presión selectiva en favor del plásmido, sólo una porción de células alberga efectivamente copias del mismo, debido a repetidas segregaciones mitóticas asimétricas. Para medir la estabilidad mitótica de pAAR6 en la cepa 830 de S.cerevisiae, un clon individual transformante (representado por una colonia recuperada directamente del medio de regeneración tras la transformación) se sembró en estrías en placas de agar selectivo MGCA. Con colonias crecidas al cabo de dos días a 30ºC en este medio se preparó una suspensión en agua destilada estéril, a partir de la cual se establecieron inóculos del mismo número de células en dos matraces conteniendo 100 ml de caldo MGCA, uno de ellos sin triptófano y el otro, suplementado con 50 $\mu g.ml^{-1}$ de triptófano. Los matraces inoculados se incubaron con agitación (200rpm), a 30ºC; a intervalos de tiempo se extraían muestras de cada matraz, se realizaban diluciones decimales seriadas y se diseminaban alícuotas en lotes de placas de medio selectivo (MGCA) y no selectivo (NG). Tras el período de incubación se procedía al recuento de colonias Trp^+ y totales. En la Fig 26 se representan las cinéticas de inestabilidad mitótica de pAAR6 deducidas del experimento. Se observa que a las doce generaciones en medio no selectivo

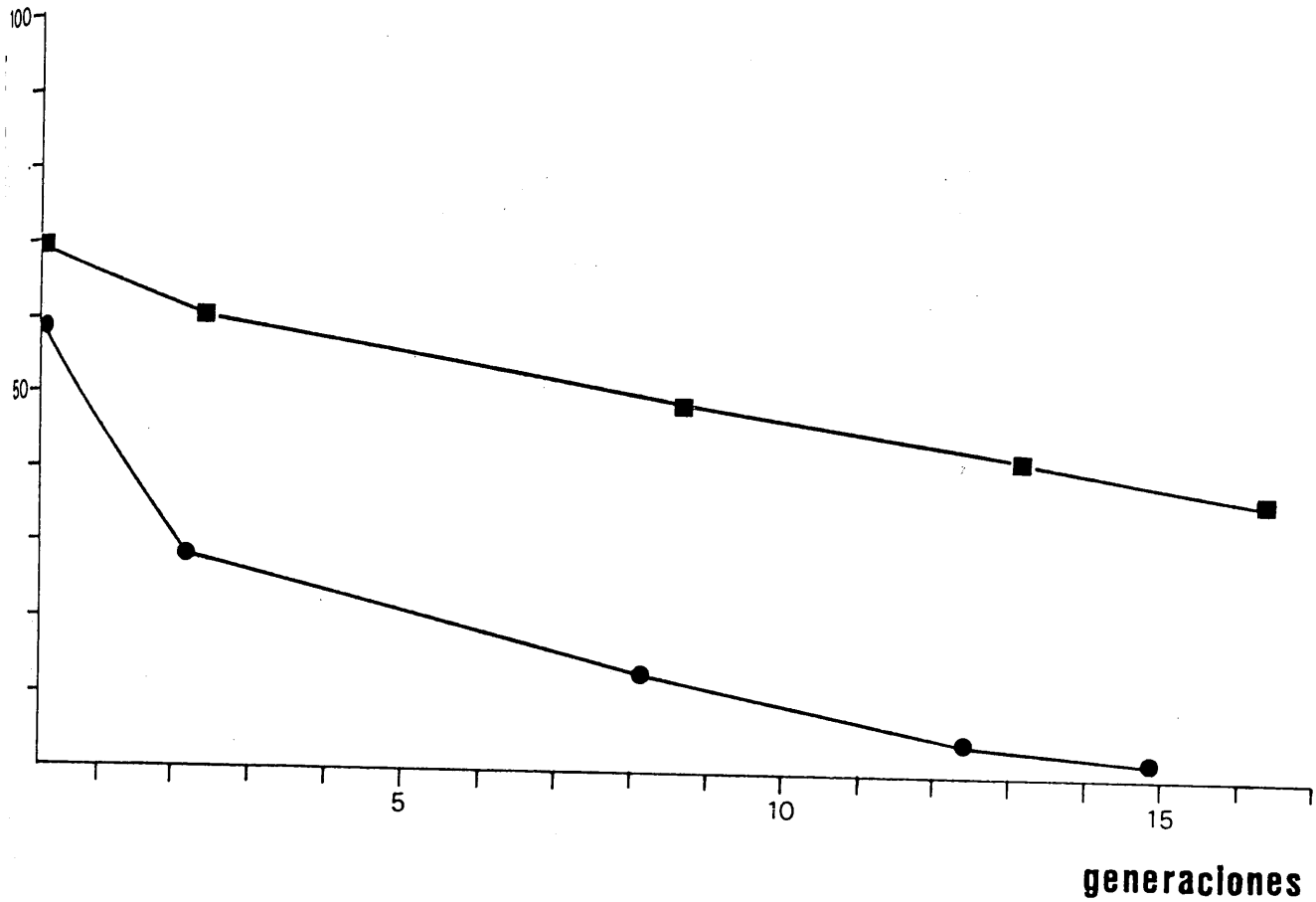


Fig. 26: Cinética de segregación mitótica de pAAR6 en medio MGCA con (—●—) y sin triptófano (—■—).

(con triptófano) la proporción de células que albergan el plásmido es menor de 5%, y que la carencia de triptófano en el medio no impide que se segreguen numerosas células Trp^-, aunque en este caso el ritmo de pérdida del plásmido sea menor (a las 16 generaciones en MGCA hay 35% de células Trp^+).

La segregación continua del plásmido pAAR6 (y por consiguiente, de sus derivados nif) es un fenómeno que, obviamente, puede tener una incidencia negativa a la hora de intentar obtener buenos niveles de expresión de un gen heterólogo en levadura. Por esta razón se decidió acometer la construcción de un vector de expresión con cualidades de segregación mejoradas respecto de pAAR6, para reclonar posteriormente los fragmentos nif obtenidos en los experimentos anteriores.

7.- CONSTRUCCION DE pATM2, UN VECTOR DE EXPRESION CON SEGREGACION MITOTICA MEJORADA . RECLONACION DE nif.

Partiendo de pAAR6 se construyó un derivado que incorpora el origen de replicación del plásmido 2 µm de levadura. La estrategia seguida queda esquematizada en la Fig 27. La fuente de la secuencia ORI de 2 µm fue el vector YEp13 (también conocido como CV13; Broach et al., 1979; Fig 9). Dicha secuencia se puede aislar como parte de un fragmento PstI-SalI de 2648 pb . Sin embargo, con objeto de que el nuevo vector de expresión contenga un solo

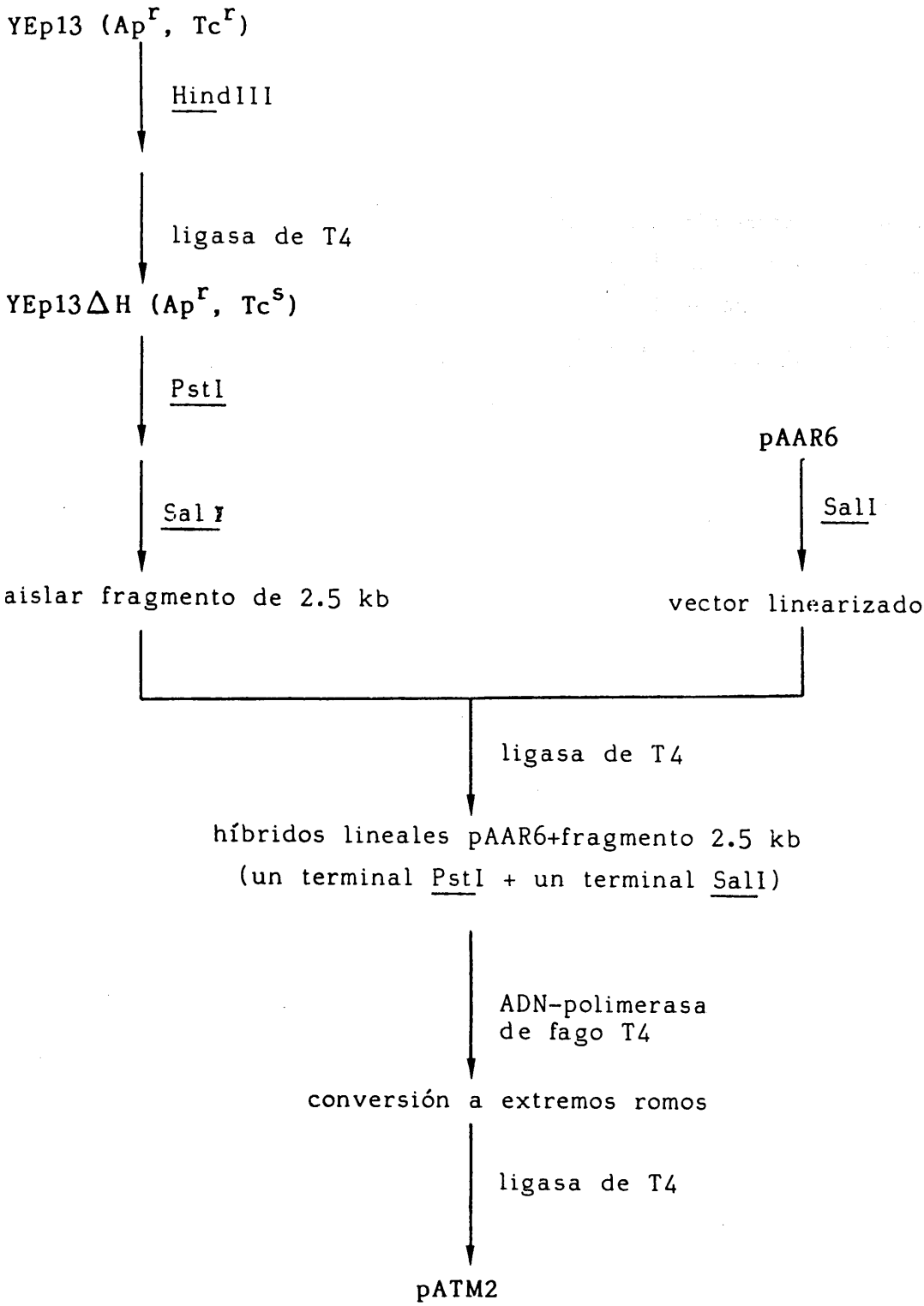


Fig 27: Estrategia de construcción del vector bifuncional de expresión pATM2.

sitio EcoRI utilizable para las clonaciones, hubo que eliminar del fragmento PstI-SalI de YEp13 el sitio EcoRI que posee. Para ello se deleccionó de dicho plásmido el pequeño segmento HindIII que alberga el sitio EcoRI, y que no contiene secuencias esenciales para las funciones de replicación, por digestión con HindIII, religación *in vitro* y transformación de *E.coli* a resistencia a ampicilina. Los clones transformantes sensibles a la tetraciclina contenían el plásmido deleccionado que denominamos YEp13 ΔH (Fig 28 para análisis de restricción). Dicho plásmido fue purificado en gradiente de cloruro de cesio, 20 µg fueron digeridos con PstI en tampón "Endo-medias sales", y más tarde con SalI (previo ajuste de la fuerza iónica hasta conseguir un tampón "Endo-altas sales"). Terminadas las reacciones de restricción por adición de EDTA, los productos de esta doble digestión secuencial se separaron por electroforesis preparativa en gel de 0.6% de agarosa; la porción de gel en la que apareció la banda correspondiente al fragmento PstI-SalI de 2.5 kb fue utilizada para electroelución de ADN. Unos 4µg del fragmento se mezclaron con 2 µg de pAAR6 linearizado por SalI en tampón de ligación, con ligasa de T4. En esta mezcla no se pueden producir recombinantes circulares entre una copia de cada tipo de moléculas, sino que se han de formar híbridos lineales con un extremo de cada tipo, SalI y PstI. Ambos extremos protuberantes fueron convertidos a romos en reacción catalizada por la ADN-polimerasa de fago T4 que, por su actividad polimerasa 5'---→3' introduce los nucleótidos complementarios al extremo protuberante SalI y por su actividad exonucleasa 3'---→5' sobre cadena sencilla elimina las bases no apareadas del extremo PstI. Tras la reacción la mezcla se desproteinizó por fenolización, el ADN se precipitó con etanol en frío y se resuspendió en 20

Fig 28: Comparación de los patrones de restricción EcoRI de A) YEp13 y B) YEp13 H. En C), ADN de λ digerido por HindIII.

µl de tampón de ligación con 800 unidades de ligasa de T4. La unión de extremos romos tuvo lugar a 16ºC durante 12 h. La mezcla de ligación se empleó para transformar una alícuota de 0.2 ml de células competentes de E.coli. Unos 240 transformantes Ap^R fueron analizados por hibridación in situ de colonias empleando como sonda el fragmento HindIII-PstI de YEp13, portador de ORI de 2 µm, marcado por desplazamiento de mella con ^{32}P hasta una actividad específica de 10^7 cpm. μg^{-1} . Se detectaron dos clones que daban señal positiva de hibridación. Uno de ellos contenía un plásmido que, sometido a análisis de restricción, reveló la estructura presentada en la Fig 29, y que fue designado como pATM2.

Introducido pATM2 en levadura por transformación de esferoplastos, se estudió su estabilidad mitótica en presencia y ausencia de presión selectiva (porcentajes de células Trp^+ en cultivos líquidos de MGCA y MGCA+Trp, siguiendo el diseño experimental del apartado anterior). Los resultados (Fig 30) muestran que el nuevo vector es, en efecto, más estable bajo ambos tipos de condiciones que el pAAR6: al cabo de más de 13 generaciones bajo presión selectiva más del 80% de las células son Trp^+, y sin presión para selección del plásmido aún queda un 55% que parecen portarlo.

Los fragmentos EcoRI-nif de pBA21 y pBA51 fueron aislados y purificados por electroelución, empleándose en sendas reacciones de ligación con el vector pATM2 linearizado por EcoRI y cuyos terminales habían sido desfosforilados por fosfatasa alcalina. Las respectivas mezclas de ligación sirvieron para transformar células competentes de E.coli. El análisis de restricción de transformantes Ap^R indivi-

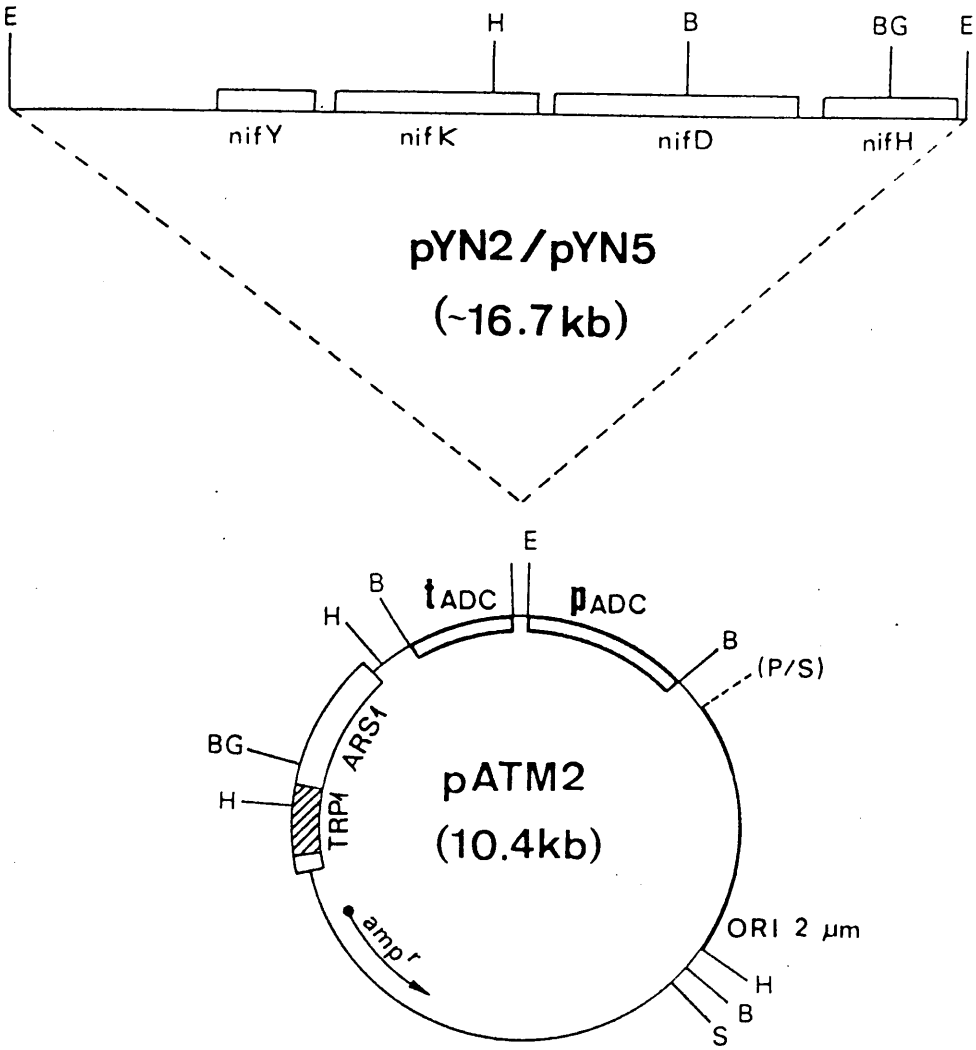


Fig. 29: Mapa genético-físico del vector pATM2 y de sus derivados nif, pYN2 y pYN5.

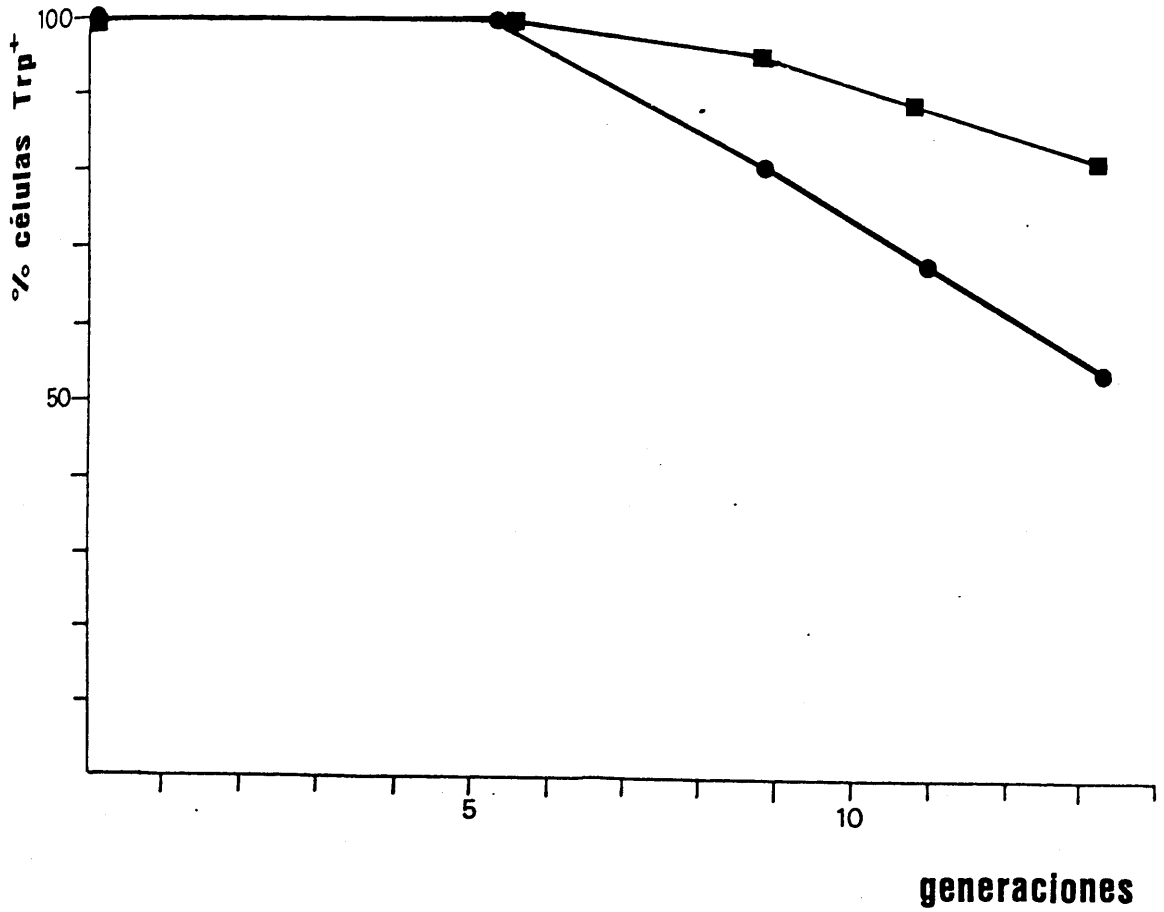


Fig 30: Cinética de segregación mitótica del vector pATM2 en medio MGCA con (—●—) y sin triptófano adicionado (—■—) .

duales (Fig 31) permitió localizar clones con plásmidos recombinantes de los diversos tipos posibles: los que poseen el fragmento nif en orientación paralela respecto del promotor de ADC1 se denominaron pYN2 (inserto nif procedente de pBA21) y pYN5 (nif de pBA51). Las respectivas construcciones opuestas se denominaron pYN12 y pYN15. La Fig 29 muestra el mapa general correspondiente a pYN2-pYN5. En la Fig 32 se aprecian los patrones de restricción BglII y HindIII de dichos plásmidos, comparados con los de pAAR6 y pATM2.

Los plásmidos de la serie pYN fueron introducidos en la cepa 830 de levadura, siendo la frecuencia de transformación de $10^4 . \mu g^{-1}$ de ADN. El comportamiento segregacional mitótico de estos plásmidos queda ilustrado en la Fig 33 por la cinética de pérdida del pYN2 en presencia y ausencia de presión selectiva. Es de destacar que, en comparación con pATM2, los plásmidos con inserto de la serie pYN son algo más inestables en medio no selectivo, aunque en medio selectivo segregan siguiendo una cinética muy similar.

8.- TRANSCRIPCIÓN EN LEVADURA DE LAS SECUENCIAS nif

Mediante el procedimiento descrito en el apartado 6 de Material y Métodos se purificó el ARN total de la cepa 830 de levadura y de diversos derivados de transformación portadores de plásmidos de las series pBA y pYN, así como

Fig 31: Electroforesis de plásmidos hidrolizados por BglII: A) pYN5, B) pBA51, D), E) pAAR6, F) pYN15. En C), patrón de ADN de λ digerido por HindIII.

Fig 32: Caracterización de plásmidos de la serie pYN: A-C, digestiones por BglII, D-J, digestiones por HindIII. Los ADNs corresponden a pYN15 (A,G), pYN2 (B,E) y pYN5 (C,F). Como comparación y patrones pesos moleculares: ADN de λ(D), de pAAR6 (I) y de pATM2 (H).

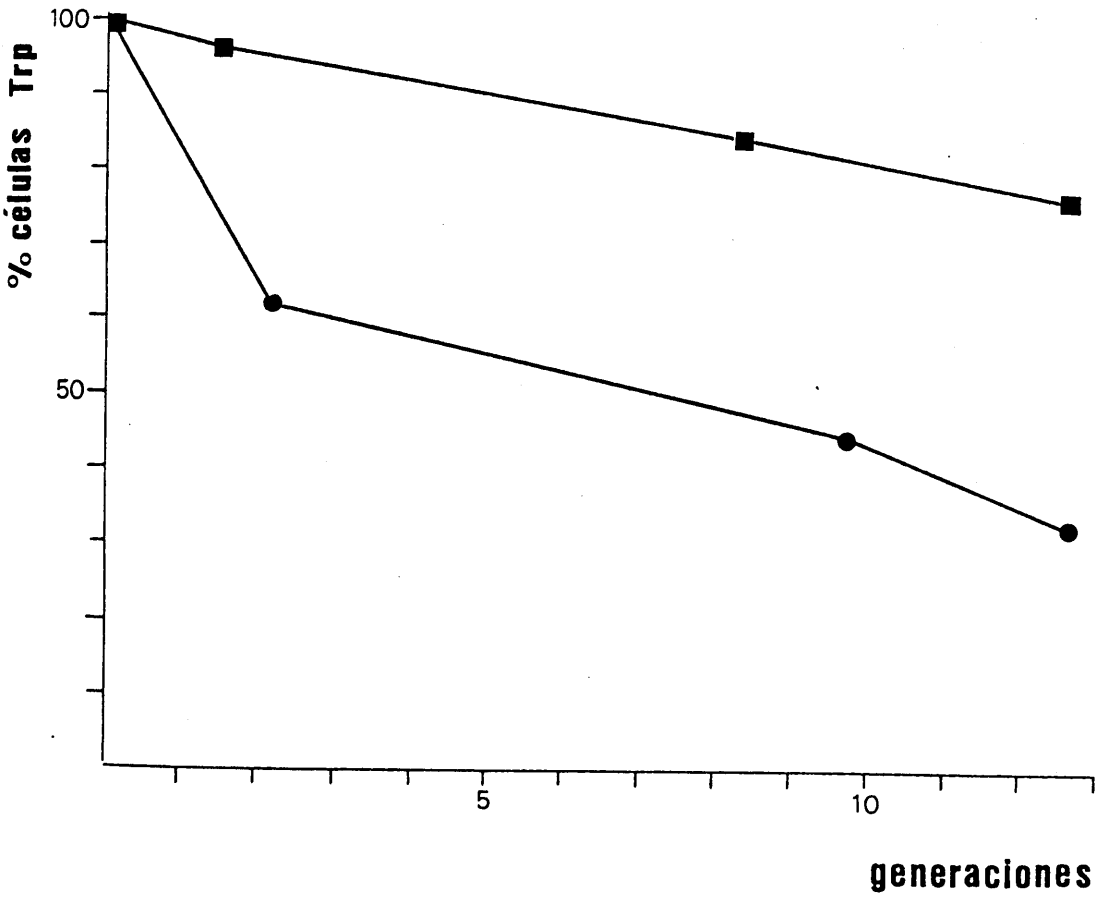


Fig. 33: Cinética de segregación mitótica de pYN2 en medio MGCA con (—●—) y sin triptófano (—■—).

de pEI1 y de los vectores pAAR6 y pATM2.

Para demostrar que las cepas que albergan los plásmidos con secuencias nif insertadas entre el promotor y el terminador de ADC1 producen ARNm correspondiente al fragmento nif se recurrió a la técnica de hibridación de de ARN adsorbido sobre membranas de nitrocelulosa ("Northern blotting": Material y Métodos, 13.2). El ARN extraído se desnaturalizó, se sometió a electroforesis en geles de agarosa-formol y se transfirió a filtros de nitrocelulosa, donde fue expuesto a una sonda de ADN marcado con ^{32}P derivada del fragmento Eco-nif30 (10^{7} cpm. μg^{-1} de actividad específica). Los autorradiogramas de los filtros así tratados mostraban bandas de hibridación correspondientes a ARN homólogo de la sonda (en algunas radiografías aparecieron bandas artefactuales correspondientes a los ARN ribosómicos). En la Fig 34 se muestra el resultado que se obtuvo al emplear ARN total de las estirpes que albergan los plásmidos pBA21, pBA51, pYN5, pYN15, pAAR6 y pATM2. En el caso de estos dos últimos no se detectan bandas de hibridación, como es de esperar de controles negativos carentes de insertos nif. Las calles del gel por donde han corrido ARNs extraídos de cepas portadoras de plásmidos que llevan nif insertado en el sitio EcoRI del correspondiente vector muestran una banda de hibridación de unas 7 kb. Como es lógico, el sistema promotor no discrimina la orientación del inserto, lo cual es patente en la banda de hibridación del ARN de la levadura transformada con pYN15. La longitud deducida para el ARN que da la señal de hibridación es coherente con la esperada para un transcripto que se iniciara en la región -30 del promotor de ADC1, siguiera a lo largo de unas 6.3 kb del inserto nif (más ligadores EcoRI), continuara por la región del segmento EcoRI-HindIII de 105 pb del vector

y abarcara la zona de 220 pb de la región terminadora de ADC1. En el caso de ARN poliadenilado hay que añadir unas 100 bases más. La cepa 830(pEI1) produce igualmente transcriptos que hibridan con la sonda de ADN de nif, con una banda de hibridación ligeramente retrasada en relación a las de las series pBA y pYN (aunque esto no siempre es apreciable en los autorradiogramas debido al rastro "difuminado" que suelen dar las bandas de ARN; (datos no mostrados).

Para comprobar que el ARNm de nif en levadura está poliadenilado como un mensajero eucariótico normal, se realizaron experimentos similares de hibridación empleando ARN eluído de columnas de cromatografía de afinidad en poli-U-Sepharose. La Fig 35 muestra el resultado para ARN poliadenilado purificado de las cepas transformadas por pBA21, pBA51, pYN2 y pYN5. Se aprecia aquí igualmente la banda de hibridación en la zona aproximada de las 7 kb, lo cual indica que los transcriptos nif son terminados y procesados correctamente merced a las secuencias terminadoras de ADC1.

En un último experimento sobre transcripción se pretendió realizar una comparación no cuantitativa entre la intensidad de la transcripción promovida por el promotor cromosómico de ADC1 y por el promotor plasmídico. Se hicieron crecer diversas estirpes derivadas de la 830 en caldo MGCA sin triptófano, hasta mitad de fase logarítmica (D.O.=0.6-0.8, a 600nm), y de cada una se extrajo el ARN, que fue transferido a filtros de nitrocelulosa tras electroforesis desnaturalizante. Para detectar los transcriptos producidos a partir de ADC1 se obtuvo una sonda marcada con ^{32}P a partir del fragmento HindIII de 0.8 kb, de pAAR6,

la cual se empleó en hibridación con los ARNs adsorbidos a los filtros. Los resultados quedan reflejados en los autorradiogramas de la Fig 36. La cepa 830 sin transformar presenta una banda de hibridación de unos 1400 nucleótidos correspondiente a la longitud del transcripto de ADC1 silvestre, deducida por Bennetzen y Hall (1982a). Las cepas de transformación por pAAR6 y pATM2 presentan este mismo transcripto cromosómico y otro menor, de unos 450 nucleótidos, que es el "mensajero-blanco" (no codificador) originado en estos vectores por las secuencias ADC1. Las levaduras que llevan plásmidos con insertos nif presentan, además del ARN del gen cromosómico ADC1, un transcripto de unas 7 kb, adjudicable a nif. Llama la atención que la intensidad de hibridación de las bandas nif sea mucho menor que la debida a la transcripción desde los promotores ADC1 cromosómicos e incluso los plasmídicos de los vectores. En la sección de Discusión se comentará ampliamente esta pobre transcripción de las secuencias nif en comparación con la transcripción silvestre de ADC1.

9.- ENSAYOS DE EXPRESION DE nif EN LEVADURAS A NIVEL DE TRADUCCION

Tras la demostración de la transcripción del operón nifHDKY en levaduras se emprendieron experimentos destinados a detectar la expresión a nivel de síntesis de proteína. Debido a las peculiaridades del sistema de traducción

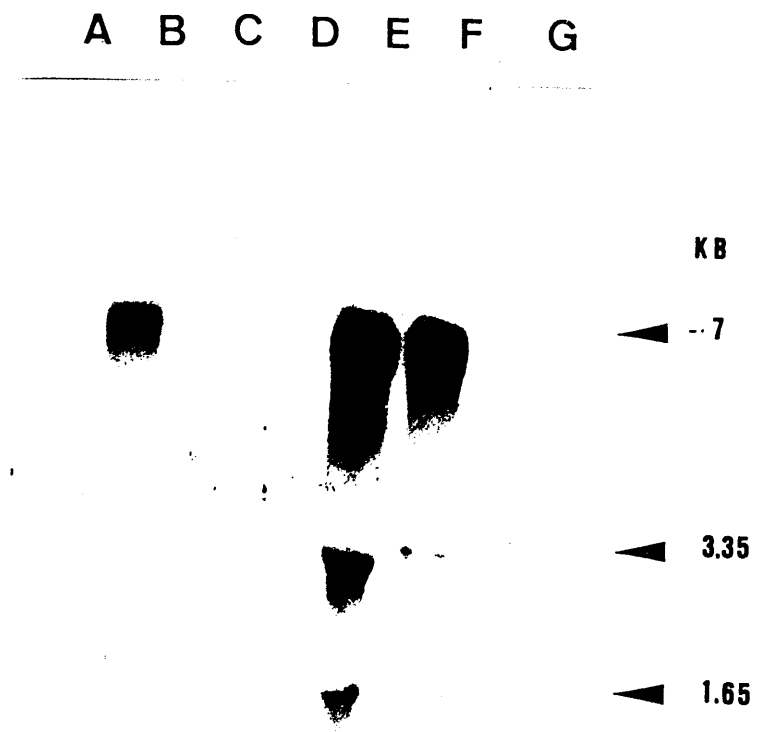


Fig 34: Autorradiograma de filtro de hibridación "Northern" conteniendo ARN de derivados de S.cerevisiae 830, usando como sonda (^{32}P)-ADN del fragmento Eco-nif30. A): cepa 830 sin transformar; B): 830 (pBA21); C): 830 (pBA51); D): 830 (pAAR6); E) 830 (pYN5); F): 830 (pYN15); G): 830 (pATM2). Las flechas indican la posición de los transcriptos nif, y de los marcadores de ARNs ribosómicos mayoritarios de levadura.

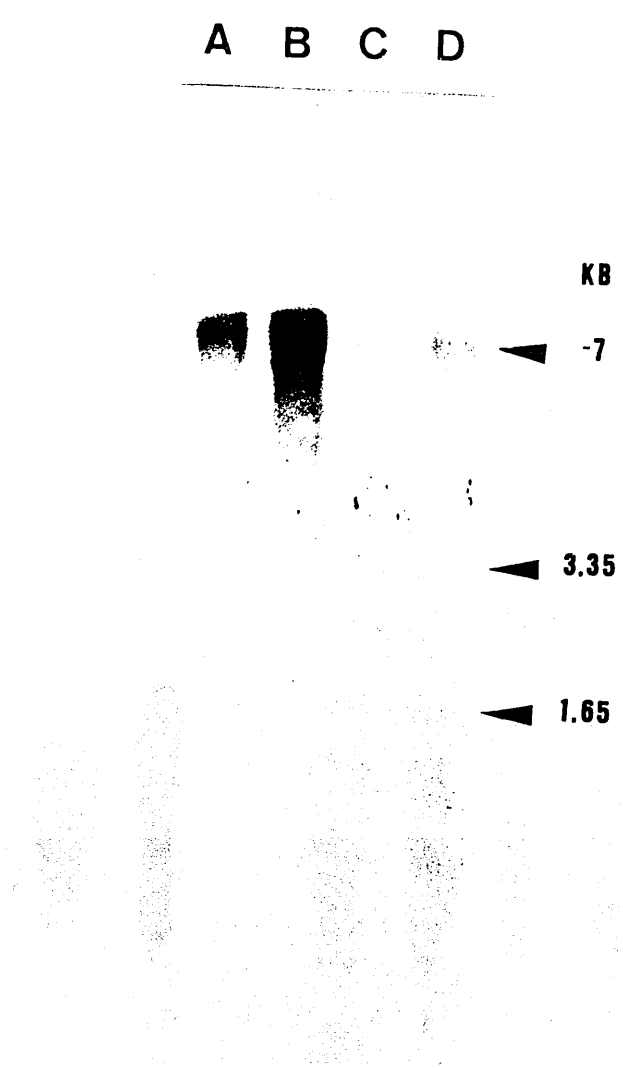


Fig 35: Autorradiograma de hibridación "Northern" entre ARN poliadenilado de cepas transformantes de S. cerevisiae 830 y la sonda de ADN de Eco-nif30. A): cepa con pYN2; B): con pYN5; C): con pBA21; D): con pBA51.

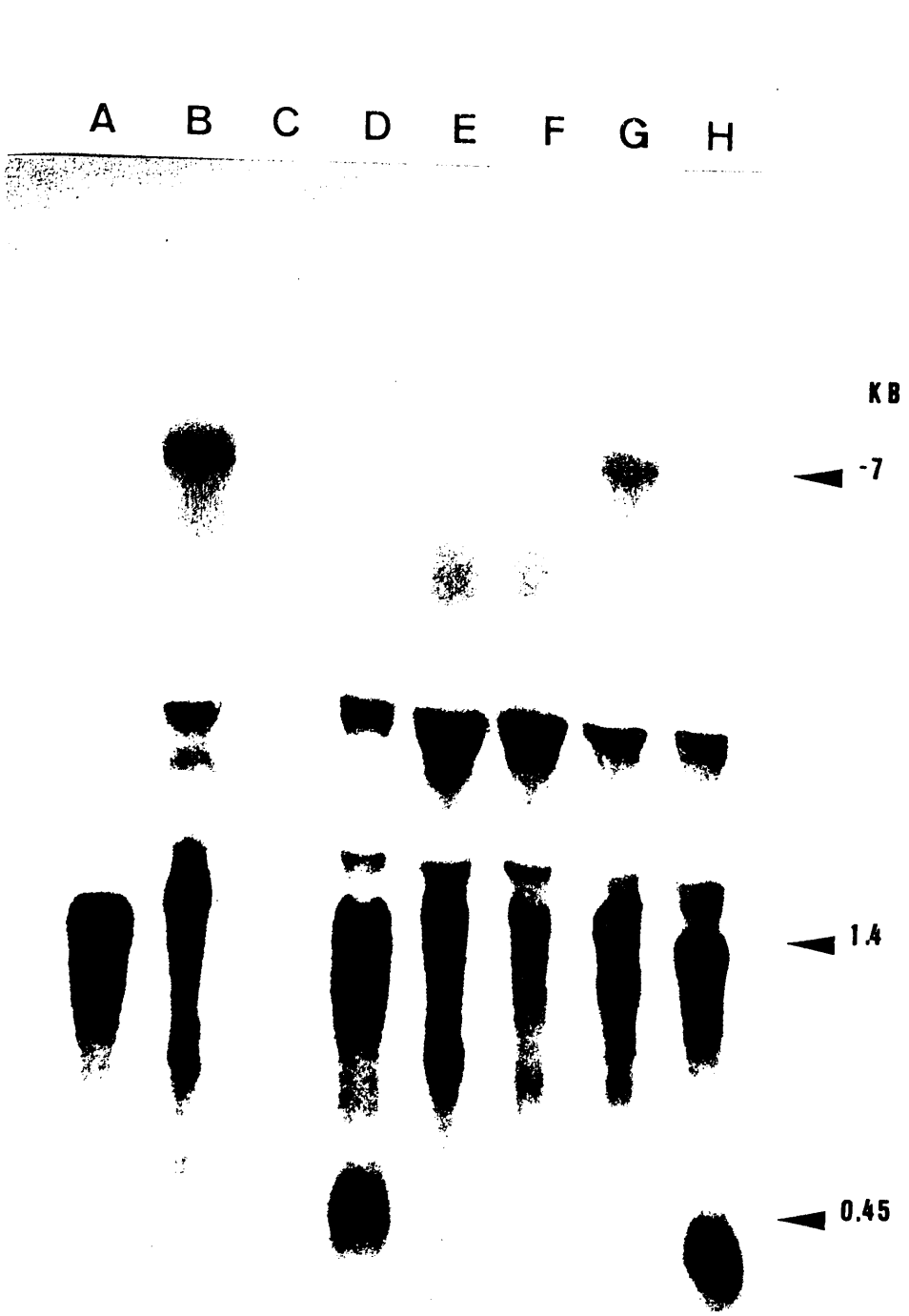


Fig. 36: Autorradiograma de hibridación "Northern" entre ARN de cepas derivadas de S.cerevisiae 830 y una sonda de ADN consistente en el fragmento HindIII de 0.8 kb de pAAR6. A): 830 sin transformar; B): 830 (pBA21); C): 830 (pBA51); D): 830 (pAAR6); E): 830 (pYN2); F): 830 (pYN5); G): 830 (pEI1); H): 830 (pATM2).

del citoplasma de eucariotas, por las que los ribosomas, una vez escindidos del mensajero al reconocer el codón de terminación son incapaces de reiniciar la síntesis proteica en codones AUG más alejados del mismo transcripto, sólo se espera en todo caso que, a partir de las construcciones genéticas adecuadas descritas en los apartados anteriores se produzca el polipéptido de la ferroproteína de la nitrogenasa, correspondiente al primer gen (nifH) tras el promotor plasmídico de ADC1.

En primer lugar se intentó la detección física del polipéptido de Kp2 en extractos crudos de las levaduras. Distintos derivados de transformación de la cepa 830 se hicieron crecer hasta mitad de la fase logarítmica, sus proteínas fueron marcadas in vivo por incubación en presencia de ^{35}S-metionina y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Material y Métodos, 15). Las autorradiografías de estos geles mostraron un patrón de bandas prácticamente idéntico en las distintas cepas transformantes, ya contuvieran las construcciones teóricamente adecuadas a la expresión de nifH o las que poseen insertos inapropiados (Fig 37). En concreto, de haberse producido síntesis en suficiente cantidad de polipéptido de Kp2 se esperaría una banda en la zona de los 32-35 kDalton; tal banda no es discernible en los canales de las construcciones correctas; la región de los autorradiogramas en ese rango de pesos moleculares es indistinguible entre las distintas estirpes, incluyendo la cepa sin transformar. Sin embargo, con esta prueba no se puede descartar que se esté produciendo efectivamente polipéptido de la ferroproteína, aunque a niveles no suficientes para ser detectados en las autorradiografías sobre el fondo común de proteínas propias de la levadura.

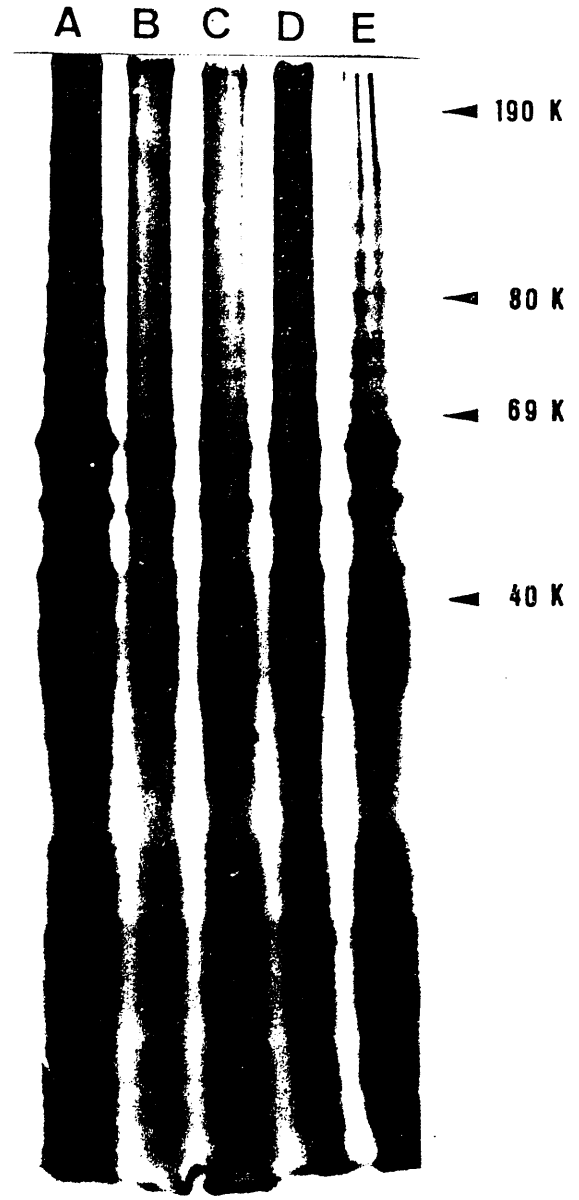


Fig 37: Autorradiograma de una separación en gel de PAA-SDS de polipéptidos marcados con (^{35}S)-metionina, procedentes de derivados de S.cerevisiae 830 transformados por A) pAAR6, B) pYN2, C) pYN5, D) pATM2, E) pYN15. Se indican a la derecha las situaciones y pesos moleculares (en kD) de los principales polipéptidos del virus de la estomatitis vesicular , como marcadores.

Igualmente se aplicó un ensayo funcional *in vitro* encaminado a demostrar la presencia, en extractos de levaduras apropiadamente manipuladas, de actividad de nitrogenasa reductasa capaz de complementar a extractos de un mutante no polar *nifH* de *K.pneumoniae* en cuanto a capacidad de reducción de acetileno a etileno. En estos experimentos de complementación (ver Material y Métodos, 16) se mezclaban extractos anaerobios de *S. cerevisiae* y *K.pneumoniae* en las condiciones adecuadas que promueven la actividad nitrogenasa. Los resultados quedan recogidos en la tabla 3 . Como puede observarse, no hubo aumentos significativos en la reducción de acetileno por los extractos del mutante CK2601 cuando se le añadían extractos de cualquiera de las levaduras transformantes. Los ligeros aumentos, situados siempre en la zona de error experimental, son similares cuando el extracto procede de transformantes con construcciones corretas que cuando procede de transformantes con plásmidos inapropiados para la correcta traducción de *nifH*. Estos ligeros aumentos son producidos exclusivamente por el extracto de levadura en sí, independientemente de la construcción genética o incluso de la presencia de plásmido, y no son achacables en absoluto a su combinación con los extractos bacterianos.

Tabla 3: ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE ACTIVIDAD REDUCTORA DE ACETILENO EN EXTRACTOS DE K.pneumoniae, POR EXTRACTOS DE LEVADURA.

extracto de K.pneumoniae		extracto de levadura	actividad específica (nmol C_2H_4/mg/min)
UN		-	24
CK2601		-	0.38
-		sin plásmido	0.10
-		pATM2	0.12
-		pYN5	0.15
CK2601	+	pATM2	0.45
CK2601	+	pYN5	0.50
CK2601	+	pYN2	0.40
CK2601	+	pBA51	0.43
CK2601	+	pYN15	0.42
CK2601	+	pE11	0.48

Los resultados son la media de tres experimentos

DISCUSION

1.-SOBRE EL DISEÑO GENETICO Y SU REALIZACION.

Como ya se expuso en el capítulo de Introducción, numerosos son los problemas con los que se ha de enfrentar el empeño de expresar la capacidad de fijación de nitrógeno en eucariotas. El sistema de elección para los primeros intentos en este sentido es la levadura, debido a su gran facilidad de manipulación genética y a que es capaz de crecer en anaerobiosis. En las publicaciones de Gerbaud et al. (1981) y de Zamir et al (1981) se había informado de la introducción en S.cerevisiae de todo el regulón nif de K.pneumoniae, pero no hubo ningún indicio de expresión de las secuencias bacterianas. Es evidente que los obstáculos más inmediatos para la expresión de nif en levadura proceden de los distintos sistemas que usan procariotas y eucariotas para la transcripción y traducción de la información genética.

En el presente trabajo el objetivo primordial era lograr la expresión en S.cerevisiae de uno de los genes estructurales del complejo nitrogenasa de K.pneumoniae, el nifH, codificador del polipéptido de la ferroproteína (Kp2), intentando superar las barreras transcripcionales y traduccionales que se oponen a tal fin.

Para obtener una adecuada transcripción se empleó el vector pAAR6 (y más adelante un derivado más estable, pATM2, construido en el transcurso de la investigación). Al comienzo de este estudio había aún pocos vectores de expresión disponibles en levadura. Las primeras comunicaciones sobre expresión heteróloga se basaron en sistemas que portaban sólo secuencias no codificadoras en 5' de algún gen de elevada expresión en levadura, sin recurrir simultáneamente a las secuencias en 3' que condicionan la terminación de la transcripción. El gen a expresar, con su propio codón de iniciación era fusionado a la región promotora del vector (desprovista de su codón de inicio traduccional), creando así una fusión transcripcional. En muchos casos, la terminación de la transcripción no venía fijada por el gen clonado, sino que parecía ocurrir en secuencias alejadas 3' de otras regiones del vector. Así, en la expresión original que se obtuvo de ADNc de interferón (Hitzeman et al.1981) la terminación se daba al llegar la onda de transcripción al extremo 3' del gen TRP1 presente como marcador seleccionable del vector. Sólo a partir de 1983 comenzó a generalizarse el uso de vectores "sandwich" diseñados para insertar segmentos a expresar entre secuencias 5' promotoras y 3' terminadoras de genes de levadura. Los efectos positivos de este tipo de construcción sobre la expresión heteróloga quedan ilustrados por diversos trabajos; así, Mellor et al. (1983), al intentar la expresión en levaduras del gen de la quimosina (renina) detectaron aumentos de 10 veces en el producto si el vector iba convenientemente provisto de las señales en 3' del gen PGK. Aunque los efectos de las secuencias terminadoras sobre

la estabilidad del ARNm son posibles, este extremo no está probado de forma indiscutible. Los plásmidos generados por la Universidad de Washington (Ammerer 1983) usando las señales del gen ADC1 siguen el mismo principio, siendo pAAR6 uno de ellos, diseñado para clonar fragmentos en sitio EcoRI. La región 5' de ADC1 en pAAR6 contiene una delección que afecta a las 14 pb previas a lo que sería el sitio de inicio de traducción de este gen. Tras el punto final de delección se sitúa una secuencia derivada de un ligador sintético EcoRI, que suministra la diana para la inserción de ADN heterólogo (Fig 8a). Esta secuencia modificada de la región 5' de ADC1 no altera el patrón de comienzo de transcripción en los genes híbridos creados (Ammerer 1983).

Por lo tanto, para clonar nifH en pAAR6 este gen había de formar parte de un fragmento EcoRI. Se empleó el fragmento de 6.8 kb, que abarca el operón completo estructural (nifHDKY) y parte de nifE, y que está clonado en el vector amplificable pACYC184, constituyendo el plásmido pSA30 (Cannon et al. 1979).

La clonación directa del fragmento nif de pSA30 (Eco-nif30) en pAAR6 forma un recombinante (pE11) que no parece adecuado para la traducción del mensaje de nifH en levadura, ya que según el modelo del rastreo del comienzo de síntesis proteica en eucariotas, los ribosomas reconocerían el primero de los tres tripletes AUG presentes en la región 5' previa a este gen. Cada uno de estos tripletes, colocado en primera posición tras el promotor de ADC1 daría fases de lectura erróneas : los dos primeros originarían fases que finalizan antes de nifH, mientras que el tercero

se interna dentro del gen, pero con una fase de lectura desplazada. Por esta razón hubo que manipular el fragmento Eco-nif30 para asegurar la eliminación de estos tres tripletes. El diseño de la transformación a que fue sometido queda resumido en la Fig 22, y se basa en su resección a partir de los terminales, por digestión nucleásica de Bal31, adición de ligadores sintéticos EcoRI y reinserción de los fragmentos deleccionados en el vector pAAR6. Lo fundamental en el experimento era controlar la actividad de Bal31 de modo que se produjera una buena representación de delecciones adecuadas (ya que Bal31 no actúa homogéneamente sobre todas las moléculas del fragmento), o sea aquellas que eliminan los tripletes ATG previos a nifH, incluido el tercero, centrado en la coordenada -51, pero sin afectar a la porción codificadora. Así pues, las delecciones buscadas habían de terminar dentro de una estrecha zona de unas 50 pb, eliminando un máximo de 291 pb y un mínimo de 239 pb, desde el extremo EcoRI.

Tras el tratamiento con Bal31 del fragmento Eco-nif30, se purificaron por electroelución los fragmentos resultantes, se completaron los posibles extremos de cadena sencilla a cadena doble, se convirtieron en terminales EcoRI por unión de dodecanucleótidos sintéticos adecuados (y subsiguiente digestión por la restrictasa), y finalmente se insertaron en el sitio EcoRI de pAAR6. Los clones de E.coli portadores de plásmidos recombinantes constotuían una pequeña proporción (3.6%) de la población transformante, y fueron identificados recurriendo a la hibridación in situ de colonias sobre papel de nitrocelulosa, con una sonda marcada radiactivamente.

La cartografía por análisis de restricción de dichos plásmidos, constituyentes de la serie denominada pBA, permitió detectar dos delecciones que se ajustan a los reque-

rimientos buscados: las de los plásmidos pBA12 y pBA15 (Fig 28), cuyos insertos fueron reorientados correctamente en relación al sentido de transcripción iniciable en el promotor de ADC1, obteniéndose pBA21 y pBA51, respectivamente. La verificación del punto exacto de término de delección en estas dos construcciones se realizó secuenciando la zona 5' previa a nifH, desde el extremo EcoRI proximal. El punto final de pBA21 se sitúa en la coordenada -42, y el de pBA51, en la coordenada -28 (Fig 25). Por tanto, ambas carecen efectivamente del obstáculo traduccional que suponían los tripletes inespecíficos ATG para un comienzo correcto del gen de la ferroproteína.

2.- COMPORTAMIENTO MITÓTICO DE LOS PLÁSMIDOS EN LEVADURA. CONSTRUCCIÓN DE UN NUEVO VECTOR BIFUNCIONAL

Las construcciones genéticas recombinantes que se acaba de describir, así como el vector pAAR6, fueron introducidas en la cepa 830 de S.cerevisiae, por transformación de esferoplastos. Uno de los factores que pueden condicionar una pobre expresión en sistemas heterólogos es un bajo número de copias y/o una alta tasa de pérdida del gen introducido, lo cual normalmente depende de las cualidades del vector usado. Las medidas de inestabilidad mitótica de pAAR6 en la citada cepa de levadura, por recuento de los clones segregantes Trp^- que aparecen a lo largo de un período de unas 15 generaciones de cultivo confirman el comporta-

miento de reparto mitótico descrito en plásmidos basados en secuencias de replicación autónoma (ARS): en ausencia de presión selectiva, el vector pAAR6 se pierde con extrema rapidez, de modo que al final a las quince generaciones el porcentaje de segregantes auxotrofos para el triptófano es del 98%. En medio selectivo para el mantenimiento del plásmido la tasa de pérdida es menor, pero a las 16 generaciones los clones Trp^+ constituyen una minoría de un 35%. Esto datos están en concordancia con los constatados en otros plásmidos de tipo YRp: Stinchcomb et al. (1979) detectan 1-5% de clones YRp^+ a las diez generaciones en medio selectivo. Hyman et al. (1982) hallan valores de 5-30% en medio selectivo. El estudio más detallado de estos fenómenos lo han realizado Murray y Szostak (1983a), quienes recurriendo a la micromanipulación han podido seguir durante varias generaciones la descendencia completa de levaduras transformantes individuales, llegando a la conclusión de que las moléculas circulares ARS experimentan segregaciones mitóticas asimétricas, fuertemente sesgadas hacia la permanencia de las nuevas copias en la célula madre.

Aplicando a pAAR6 la fórmula del índice de inestabilidad (i= células sin plásmido x (células con plásmido)$^{-1}$ x (generaciones)$^{-1}$) se obtiene un valor de 0.11 en medio selectivo y de 3.22 en medio no selectivo (cálculos realizados a partir de los datos representados en la Fig 26).

La elevada inestabilidad mitótica de pAAR6, incluso en medio selectivo, nos indujo a construir un derivado que pudiera exhibir una segregación menos anómala. La mejor manera, en principio, de estabilizar un plásmido YRp sería añadiéndole una secuencia centromérica (CEN) (Clarke y Carbon, 1980), pero a costa de un descenso en el número de

copias (normalmente 1-2 por genomio haploide). Por ello no resulta aconsejable convertir un vector de expresión con el que se pretenden altos niveles de traducción de un gen heterólogo a versión centromérica, sino que es mejor incorporarle el eficiente origen de replicación del círculo 2 μm de levadura, que permite números de copias relativamente elevados, con estabilidades mayores que las de los plásmidos YRp.

La fuente del origen replicativo del plásmido 2 μm en el presente trabajo fue el vector bifuncional YEp13 (Broach et al., 1979), que porta el segmento EcoRI de 2.2 kb de la forma B. La mejor manera de incorporar el ORI de 2μm a pAAR6 sin inactivar funciones útiles de éste se describe en el apartado 7 de Resultados (véase Fig 27). Se pretendía aislar el fragmento PstI-SalI, pero previamente se requirió eliminar su sitio EcoRI interno, con objeto de lograr que el nuevo vector sólo contuviera el sitio EcoRI destinado a clonación de ADN viajero. El plásmido YEp13 fue desprovisto del pequeño fragmento HindIII, vuelto a ligar, y el segmento PstI-SalI de 2500 pb del derivado de delección YEp13 ΔH fue aislado, purificado y unido al vector pAAR6 abierto por su diana SalI. Esta reacción de ligamiento produce recombinantes lineales entre una copia de cada tipo de moléculas, dejando un extremo protuberante 5' (uno de los SalI del vector) y otro extremo protuberante 3' (el PstI del fragmento portador de ORI de 2μm). Para poder circularizar esta estructura hubo que convertir ambos terminales a extremos romos, lo que se logró recurriendo a la ADN-polimerasa del fago T4, que rellenó el extremo SalI e hidrolizó la parte de cadena sencilla de PstI. Tras la ligación de extremos romos y transformación en E.coli se aisló y caracterizó el plásmido que denominamos pATM2, una de las dos formas de recombinante

posibles que podían aparecer en el experimento.

El estudio de la estabilidad mitótica del nuevo vector demostró sus mejores cualidades de segregación, acentuadas sobre todo en medio no selectivo, donde al cabo de más de 13 generaciones había sólo un 45% de células carentes de plásmido. Este valor es prácticamente idéntico al obtenido por Futcher y Cox (1984) con YEp13 cultivado en medio rico (YEPD) suplementado con leucina. Según esto, el plásmido pATM2 ha adquirido las propiedades de estabilidad mitótica de YEp13.

Cuando se obtuvieron los plásmidos recombinantes entre pATM2 y los fragmentos nif, para constituir la serie pYN, se realizó igualmente un estudio de estabilidad sobre un representante de éstos. Se observó que la cinética de pérdida de pYN2 es bastante parecida en MGCA a la de pATM2 ($\underline{i}$= 0.02), mientras que en medio no selectivo la inestabilidad aumenta hasta un índice $\underline{i}$=0.16, más del doble de la mostrada por pATM2 en iguales circunstancias. Este aumento de inestabilidad podría ser achacado exclusivamente a algún efecto negativo del aumento del tamaño del recombinante respecto del vector de que procede, con el cual comparte una misma organización genética. Un fenómeno similar ha sido descrito por Gerbaud et al. (1981) y por Futcher y Cox (1984). En el informe de estos últimos se constata que al pasar desde el plásmido YEp13 (10.7 kb) a su derivado TLC (15.2 kb) se produce un aumento de inestabilidad de unas dos veces. Es decir, tanto en este informe como el aquí presentado, un aumento del 50-60% en el tamaño del plásmido supone una duplicación de la inestabilidad, dentro de unos valores absolutos de tamaño bastante parecidos para ambos sistemas.

A efectos prácticos de la expresión de nifH en levadura, el dato de estabilidad a tener en cuenta es el de pocentaje de clones Trp^+ para células de la cepa 830 transformadas por pYN creciendo en medio selectivo, a mitad de la fase de crecimiento exponencial, ya que éstas son las condiciones de cultivo elegidas para los ulteriores ensayos de expresión. La curva de segregación de pYN2 en caldo MGCA (Fig 33) indica que, a mitad de la fase logarítmica, el porcentaje de células con plásmido es de 80-90%. A este dato habría que añadir el del número de copias del plásmido híbrido. Aunque en el presente estudio no se han realizado valoraciones sobre el número medio de copias, se puede aventurar, en base a los datos aportados por Futcher y Cox (1984) y por la semejanza genética entre sus plásmidos TLC y nuestros pYN (manifestada incluso funcionalmente por índices de inestabilidad semejantes), que la media de moléculas de pYN en la levadura debe de estar alrededor de diez.

3.- TRANSCRIPCION DE nif EN LEVADURA

Los resultados de las hibridaciones de tipo "Northern" entre ARN total de los diversos derivados de transformación de la levadura y la sonda de (^{32}P)-ADN de Eco-nif30 indicaron que las levaduras que albergaban plásmidos con segmentos nif clonados en el sitio EcoRI de los correspondientes vectores, entre el promotor y el terminador del gen de la isoenzima I de la alcohol deshidrogenasa de S.cerevisiae (ADC1), producían ARN hibridable de un tamaño (unas 7 kb)

explicable por una transcripción iniciada en las apropiadas secuencias plasmídicas 5' de ADC1, continuada a lo largo de todo el fragmento nif, y finalizada en las secuencias 3' de ADC1. La transcripción de nif es patente tanto en las construcciones en que el inserto es paralelo (coherente) con el sentido de expresión promovido por las secuencias de ADC1 como cuando el inserto está invertido. Experimentos de hibridación empleando ARN poliadenilado eluído de columnas de afinidad de poli-U-Sepharose dieron igualmente resultados positivos, lo que indica el correcto procesamiento del extremo 3' de los transcritos nif primarios, debido a las pertinentes señales suministradas por el terminador de levadura.

El experimento de hibridación en que la sonda de ADN era el pequeño fragmento HindIII (0.8 kb) de pAAR6 (que contiene el trozo BamHI-HindIII donde se localizan las secuencias de terminación y poliadenilación) merece un comentario especial; el objeto de esta prueba era adquirir una idea aproximada sobre la eficiencia de transcripción de la información nif en relación a la transcripción de las secuencias de ADC1, bien en su versión de gen cromosómico silvestre, bien en la versión "fútil", carente de la mayor parte de la porción codificadora, presente en los vectores pAAR6 y ATM2. El autorradiograma (Fig 36) muestra intensas bandas de hibridación correspondientes a las dos clases de transcritos ADC1: todas las cepas exhiben mensajeros de unas 1400 bases, correspondientes a la expresión transcripcional de del gen ADC1 cromosómico; las cepas transformadas con los vectores producen, además, transcritos de unos 450 nucleótidos, explicables por la transcripción iniciada en el promotor plasmídico, continuada por el segmento conector de 105 pb derivado del plásmido 2μm y por la porción codificadora ter-

minal 3' de ADC1 hasta la señal de parada y procesamiento de la transcripción (otras 220 pb), a lo que hay que añadir unas 100 bases de la cola de poliadenina. Sin embargo, lo más destacado del autorradiograma es que las cepas que llevan construcciones nif producen una banda de hibridación de la región nif que es relativamente débil en comparación con las generadas por los transcritos ADC1. Este resultado fue en principio un tanto inesperado, habida cuenta de que se partía de plásmidos multicopia, siendo los de la serie pYN bastante estables, y provistos de un eficiente sistema de inicio y término de la transcripción (en las cepas silvestres el ARNm de ADC1 llega a constituir el 1-2% de los mensajeros celulares totales: Ammerer, 1983).

Otros autores (Dobson et al., 1983; Mellor et al., 1983) han hecho notar igualmente que sus respectivos sistemas de expresión heteróloga en levadura rendían niveles de ARNm del gen foráneo inferiores a los esperables del uso de promotores fuertes. Mellor et al. (1985) acaban de publicar un detallado informe sobre los factores que afectan a la expresión heteróloga en S.cerevisiae; han comparado los niveles estacionarios de ARNm correspondiente al ADNc del interferón IFNα2 con los de la fosfoglicerato quinasa de levadura (PGK), expresados a partir de las señales 5' de PGK, comprobando que la concentración de transcritos del gen heterólogo era de 5 a 10 veces menor que la del gen de levadura, expresados ambos en el mismo tipo de vectores extracromosómicos. Las causas de estos bajos niveles de ARNm de IFNα2 podrían residir en una alta tasa de "turnover" de los transcritos, en una transcripción ineficaz, o en los dos factores al mismo tiempo. Hasta ahora no hay ningún estudio que haya intentado verificar estas alternativas. Mellor et al (1985) se limitan

a comentar resultados no publicados que parecen descartar, en su sistema, un elevado "turnover" de los mensajeros. Sin embargo, nosotros presentamos a continuación una racionalización de nuestros resultados de transcripción en base, esencialmente, a los estudios de expresión génica en levadura llevados a cabo por el equipo de Lacroute (Losson y Lacroute, 1979; Pelsy y Lacroute, 1984), que indican que el mensajero se encuentra protegido y estabilizado de alguna manera por los ribosomas durante la traducción. Trabajando con diversas mutaciones ámbar de URA3 y ocre de URA1 que afectan a regiones distintas de los respectivos genes, demostraron que la estabilidad de los ARNm específicos se encuentra alterada de acuerdo con la situación de la mutación respecto del comienzo del transcrito: cuanto más cercana esté la mutación sin sentido al promotor del gen, menor es la vida media del mensajero, reduciéndose los niveles estacionarios de dicho mensajero. La degradación de los transcritos de genes mutados en la región proximal parece ocurrir rápidamente, pero siempre a partir del mensaje completo, procesado y poliadenilado, que suministra hibridaciones con sondas específicas equivalentes solamente a un 10-25% de las que proporcionan los mensajeros silvestres, o los mutados en su porción terminal en 3'.

Proponemos que los bajos niveles de transcritos nif detectables podrían deberse, al menos parcialmente, a un fenómeno similar. El primer codón sin sentido en el mensajero nif producido en levaduras a partir de las construcciones pBA y pYN de insertos "paralelos" es el TGA de terminación de nifH, situado hacia la coordenada +1000 en relación al inicio de dicho transcrito. Debido a la imposibilidad de lectura de operones policistrónicos, este codón equivaldría

en levadura a una mutación sin sentido "ópalo", que provoca el cese "prematuro" de la traducción en un mensajero casi seis veces mayor que la porción efectivamente codificadora de proteína. De esta manera, y siguiendo las interpretaciones del grupo de Lacroute, la mayor parte del mensaje nif quedaría sin proteger por los ribosomas, lo que podría inducir una rápida degradación, y por lo tanto, condicionar una escasa acumulación de mensajeros completos poliadenilados. Una posibilidad de comprobación de esta hipótesis sería introducir los plásmidos en cepas portadoras de alelos supresores para el codón TGA, y comparar los niveles de ARNm nif en ellas con los producidos por cepas isogénicas no supresoras.

En el autorradiograma de la Fig 36 la cepa transformada con pBA21 muestra una banda adicional, de unas 2400 bases, y cuya intensidad es menor que la de 1400 bases. La explicación de la hibridación en la zona de las 2400 bases puede estar en una serie de observaciones relativamente recientes sobre la regulación del gen ADC1. Hasta hace poco se creía que ADC1 se expresaba constitutivamente, pero Denis et al. (1983) observaron que, al pasar las levaduras de un medio con glucosa a otro con etanol, descendía la expresión de este gen, tanto a nivel de ARNm como proteína; además, parte del ARNm no era traducible a alcohol-deshidrogenasa I (ADH-I); de manera simultánea aumentaba la síntesis de la isoenzima ADH-II, codificada por ADR2. Lo fundamental en relación a nuestra observación es que en esas condiciones se da una transcripción de ADC1 a partir de un punto situado unas 1000 bases por arriba (5') del normal funcional en medio glucosado. Este transcrito no debe ser traducible a ADH-I, debido a que en la zona líder 5' aparece un marco de

lectura que se cierra antes de la región codificadora de ADC1. (Ammerer, 1983). Por los estudios de Beier y Young (1982) se sospecha que esta región 5' está implicada en la regulación de la síntesis de las isoenzimas de ADH en diversas fuentes de carbono. El transcrito de 2400 nucleótidos detectado en 830 (pBA21) debe ser sin duda este supuesto ARN fútil de ADC1, que se comienza a producir en medios con glucosa cuando las células entran en el final de la fase logarítmica (Ammerer, 1983). Al parecer, aunque el cultivo de este transformante fue recogido a una densidad óptica similar a la de las otras cepas, debió de entrar de hecho en la fase estacionaria antes de lo normal, o bien se disparó de una manera prematura la síntesis del mensajero mayor de ADC1.

4.- EXPRESIÓN TRADUCCIONAL

Los dos métodos aplicados para intentar detectar la expresión del producto de nifH en levadura no dieron resultados positivos. El patrón de proteínas marcadas detectables en geles desnaturalizantes de PAA-SDS no reveló ninguna banda adicional patente en las cepas transformadas, ya llevaran construcciones adecuadas para la traducción de nifH, las opuestas, o los vectores. Si efectivamente se está produciendo polipéptido de la ferroproteína Kp2 en las levaduras con plásmidos idóneos, el nivel de éste es insuficiente para destacar sobre el fondo de bandas propias de levadura: no se aprecian alteraciones significativas e inequívocas del patrón en la región de las 35 kDal, donde se espera que aparezca la banda del monómero de la ferroproteína (Roberts

et al., 1978; Cannon et al., 1979).

De igual manera, la prueba de funcionalidad no dio tampoco resultados positivos. Dicha prueba consistió en mezclar extractos de K.pneumoniae CK2601, que lleva una mutación no polar en nifH, con extractos de transformantes de levadura, y medir la capacidad de reducción de acetileno a etileno. Los niveles de etileno producido por CK2601 no aumentaban significativamente tras la adición de los extractos de levadura, no siendo nunca superiores a 3% de la capacidad reductora de la cepa silvestre UN, lejos del 10% que normalmente se toma como límite para considerar una auténtica complementación (Cannon et al., 1979). Se podría argumentar aquí como en la prueba anterior: es bastante probable que la técnica de complementación de extractos tenga una sensibilidad inferior a la que se requeriría para detectar unas supuestas bajas cantidades de proteína Kp2 con capacidad complementadora funcional sintetizada por las levaduras. Precisamente debido a que la prueba exige que la eventual proteína Kp2 sea activa funcionalmente, se impone una seria restricción adicional a la detección del producto de nifH en levaduras, ya que aún cuando se estuviera produciendo y acumulando el polipéptido correspondiente, éste podría verse sujeto a una gran variedad de factores derivados del peculiar entorno celular que impidieran o destruyeran su funcionalidad.

Hay una razón, derivada de la propia bioquímica de la fijación de nitrógeno, que podría condicionar negativamente el éxito de una prueba de funcionalidad según el ensayo de complementación in vitro. Roberts et al. (1978) ya habían señalado que se requiere el producto de nifM, un polipéptido de 15 kDal para que el dímero de Kp2 sea activo.

La naturaleza de esta modificación activadora de la ferroproteína es desconocida, pero un reciente informe (Berman et al., 1985b) apunta que la proteína de nifM está implicada en la síntesis, regulación o estabilidad del monómero de Kp2, pero no en su ensamblaje hasta dímero. Según Eady (comunicación personal, 1985) no se ha demostrado, hasta el momento una activación in vitro de la apoproteína de Kp2 por el producto de nifM. Esto podría ser otra explicación de los resultados negativos en el ensayo funcional, ya que aunque los extractos de levadura contuvieran en efecto proteína Kp2, ésta no lograría ser activada a posteriori por el producto de nifM suministrado por los extractos de CK2601. Dicha cepa mutante contiene el alelo nifH2260, caracterizado por Kennedy (1977), que es una mutación no polar responsable de una ferroproteína inactiva cuya movilidad en geles desnaturalizantes es ligeramente mayor que la de la cepa silvestre (Dixon et al., 1977). La mutación es totalmente complementable en K.pneumoniae (Dixon et al., 1977).

Entre los factores derivados del entorno celular eucariótico en que se encuentra nifH, y que podrían ocasionar problemas a la traducción del mensaje a niveles suficientes cabe citar la capacidad de lectura de los ribosomas de levadura del transcrito nif y el sesgo de codones del gen nifH, distinto del uso de codones propio de S.cerevisiae.

a) capacidad traduccional del ARNm de nif en levadura

A pesar de que las pertinentes manipulaciones in vitro descritas en este trabajo lograron crear fusiones transcripcionales entre el promotor de ADC1 y el operón nif HDKY, de modo que el primer codón AUG del mensaje coincidiera con el inicio de nifH, quedaría la posibilidad de que el

contexto de secuencia previo a este gen no fuera el más adecuado para un comienzo eficiente de la síntesis proteica por los ribosomas citoplásmicos de levadura. Según Kozak (1983), los codones iniciadores funcionales de eucariotas superiores se dan en un entorno de secuencia especial, en que mayoritariamente aparece una purina (esencialmente A) en coordenada -3, y otra purina (sobre todo G) en +4, aunque en muchos casos parece que secuencias adicionales intervienen para aumentar la frecuencia de iniciación. La regla "A en -3 y G en +4" no es totalmente aplicable a levaduras. Dobson et al. (1982), comparando los entornos de secuencia de los codones iniciadores de 17 genes de S.cerevisiae confirma la universalidad de A en -3, pero en +4 existen bastantes ejemplos de bases pirimidínicas en genes de elevada expresión, incluyendo ADC1, que muestra una T. La importancia de la A en -3 para una buena expresión traduccional en levadura ha sido resaltada recientemente de forma elegante por Zitomer et al. (1984). En posición +6 es muy frecuente una pirimidina, normalmente timina. Según todo esto, los alrededores del codón iniciador de nifH no diferirían de los de muchos genes de levadura, ya que se dan sendas adeninas en -3 y +4, y una citosina en +6.

Un rasgo predominante en la zona 5' previa a muchos genes de levadura, la riqueza en A y T, junto con la ausencia o extrema rareza de G (Holland y Holland, 1980; Montgomery et al., 1980; Holland et al., 1982 , no se encuentra en las regiones 5' bacterianas de nifH que quedan en las construcciones genéticas de este trabajo: en el segmento de 20 bases previas al ATG inicial de nifH existe cuatro G y una sola T, mientras que en el segmento análogo de ADC1

no se da ninguna G y existen seis T (Bennetzen y Hall, 1982a). La significación de un segemento 5' con estas características para el comienzo de la traducción es desconocida.

Según Zalkin y Yanofsky (1982), la secuencia PuCACACA, que se localiza poco antes del ATG iniciador del gen TRP5, podría jugar un papel en el inicio de la traducción. Secuencias parecidas se detectan en situaciones similares en otros genes (véase compilación de Dobson et al., 1982) y en el mismo ADC1, donde se observa ACAATCAA entre las coordenadas -22 a -15. Curiosamente, entre las posiciones -21 a -15 de nifH la secuencia es TCAACAA, que se ajusta relativamente a la canónica de levadura. De cualquier manera, estudios con genes mutantes de levadura afectados en esta zona señalan que no es indispensable a la hora de la expresión traduccional (Sherman y Stewart, 1982; Zitomer et al., 1984). Igualmente, diversos genes heterólogos que no se ajustan a esta secuencia han mostrado su expresión a alto nivel en levadura (Hitzeman et al., 1981).

La longitud de la secuencia líder del ARNm no parece que sea un factor de importancia a la hora de la expresión eficiente, como han mostrado Sherman et al. (1982) y Zitomer et al. (1984). De cualquier manera, la longitud del líder no traducible de las dos construcciones genéticas nif de nuestro trabajo (65 nucleótidos para pBA21/pYN2 y 51 nucleótidos para pBA51/pYN5) está dentro del rango normal de muchos genes de levadura.

En unos detallados estudios genéticos Zitomer et al. (1984) han demostrado que los ribosomas de levadura pueden iniciar la síntesis proteica en los tripletes AUA y UUG, aunque con mucha menor eficiencia (un 8% respecto de la del codón AUG), cuando dichos tripletes se encuentran en un contexto adecuado (principalmente adenina en -3). La presencia de cualquiera de estos dos codones iniciadores minoritarios en 5' y fuera de fase respecto del AUG induce un descenso muy marcado de la eficacia de traducción del mensaje auténtico. Observando la porción bacteriana correspondiente a la región líder de los ARNs producidos a partir de nuestras construcciones no se detecta ninguno de estos dos tripletes, por lo que se puede descartar totalmente un efecto negativo sobre la expresión de nif en levadura por esta causa.

En resumen, no parece que el contexto de secuencia en torno al primer codón AUG de nifH, ni en general toda la zona no traducible 5' del mensajero producido en levadura, sean especialmente inadecuados para la actuación de la maquinaria de iniciación traduccional en el nuevo hospedador; exceptuando la presencia de varias guaninas en la región previa al gen de la ferroproteína, el resto se acomoda relativamente bien a las peculiaridades de muchos genes de levadura.

b) uso de codones

La tabulación del uso de codones de varios genes de S.cerevisiae (Bennetzen y Hall 1982b, Hitzeman et al. 1982) muestra un acentuado sesgo para los genes que se expresan a elevados niveles; concretamente, 25 de los 61 tripletes representan más del 95% de la capacidad codifica-

dora, existiendo una notable correlación entre su propia frecuencia de uso y la abundancia en levadura de los respectivos ARNt isoaceptores. Las proteínas minoritarias se apartan menos de un patrón aleatorio de uso de codones; existe un grupo de otros 20 ARNt que están presentes a baja concentración y que, comparamativamente, participan más en la traducción de los mensajes de productos minoritarios. El gran sesgo de uso de codones en genes como ADC1, PGK, etc. puede que sea una respuesta evolutiva a una presión selectiva que opere sobre la eficiencia de síntesis de productos requeridos a grandes concentraciones para el normal metabolismo del microorganismo, y podría tener influencias sobre la expresión de genes clonados heterólogos que se apartaran marcadamente del sesgo propio de S.cerevisiae (Bennetzen y Hall 1982b, Tuite et al. 1982).

En la tabla 4 se compara el uso de codones en nifH y en varios genes de proteínas abundantes de levadura.Las mayores discrepancias se pueden resumir así:

codones de leucina: mientras que en levadura el más representado, con diferencia sobre los demás codones es el TTG (90%), éste no es usado en nifH, el cual recurre a dos codones no existentes en los genes tabulados de S.cerevisiae (CTG y CTC).

codones de valina: en los genes de levadura no se usa GTG, que es el codón más abundante en nifH.

codones de glutamina: el CAG, ausente en levadura, es el más usado en nifH.

codones de cisteína: el más abundante en el gen bacteriano (TGC) no es usado en levadura.

Tabla 4: USO DE CODONES EN CUATRO GENES DE LEVADURA Y EN nifH DE Klebsiella pneumoniae.

	PGK	GAP-"49"	GAP-"63"	ADC1	(%)	nifH
phe/TTT	1	0	0	0	(2)	2
TTC	18	10	11	8	(98)	4
leu/TTA	5	0	0	2	(6)	0
TTG	36	21	20	19	(90)	0
CTT	0	0	0	0	(0)	1
CTC	0	0	0	0	(0)	7
CTA	0	0	1	3	(3)	0
CTG	0	0	0	0	(0)	11
ile/ATT	9	9	7	9	(41)	7
ATC	14	11	12	12	(59)	17
ATA	0	0	0	0	(0)	0
met/ATG	4	6	7	7	(100)	15
val/GTT	16	22	23	19	(55)	2
GTC	22	15	12	17	(45)	8
GTA	0	0	0	0	(0)	0
GTG	0	0	0	0	(0)	12
ser/TCT	16	13	11	12	(56)	0
TCC	6	12	14	7	(40)	5
TCA	2	0	0	0	(2)	1
TCG	0	0	0	0	(0)	2
AGT	0	0	0	0	(0)	0
AGC	2	0	0	0	(2)	1
pro/CCT	0	0	1	2	(6)	0
CCC	0	0	0	1	(2)	3
CCA	17	12	10	10	(92)	1
CCG	0	0	0	0	(0)	4
thr/ACT	10	12	10	5	(45)	0
ACC	8	12	13	9	(51)	12
ACA	0	0	0	0	(0)	0
ACG	0	0	0	0	(0)	4
ala/GCT	32	26	23	19	(70)	1
GCC	10	6	10	16	(30)	14
GCA	1	0	0	0	(0)	1
GCG	0	0	0	0	(0)	13
tyr/TAT	0	0	0	0	(0)	1
TAC	7	10	10	13	(100)	8
his/CAT	1	0	0	1	(6)	0
CAC	7	8	8	10	(94)	2
gln/CAA	8	5	6	9	(100)	2
CAG	0	0	0	0	(0)	8
asn/AAT	1	0	0	0	(2)	1
AAC	13	12	14	11	(98)	11
asp/GAT	8	8	7	2	(29)	5
GAC	18	17	13	14	(71)	11
glu/GAA	28	14	15	20	(99)	18
GAG	1	0	0	0	(1)	11
cys/TGT	1	2	2	8	(100)	2
TGC	0	0	0	0	(0)	7
trp/TGG	2	3	3	5	(100)	0
arg/CGT	3	0	0	0	(7)	4
CGC	0	0	0	0	(0)	9
CGA	0	0	0	0	(0)	0
CGG	0	0	0	0	(0)	0
AGA	10	11	11	8	(93)	0
AGG	0	0	0	0	(0)	0
gly/GGT	35	25	24	41	(98)	5
GGC	1	0	0	0	(1)	20
GGA	0	0	0	0	(0)	1
GGG	1	0	0	0	(1)	1

Referencias: PGK: Hitzeman et al. (1982) ; GAP: Holland y y Holland (1980); ADC1: Bennetzen y Hall (1982a); nifH: Scott et al. (1981).

codones de arginina: el CGC, mayoritario en nifH, está ausente en las cuatro secuencias de levadura, mientras que CGT (4 apariciones en nifH) sólo se muestra tres veces en uno de los genes de levadura (PGK).

codones de glicina: el GCC aparece 20 veces en nifH, pero una sola vez en los cuatro genes de levadura.

codones de prolina: no se usan en estos genes de levadura CCG ni CCC, siendo los más típicos de nifH.

codones de alanina: el GCG, segundo más abundante en nifH no está representado en los genes de proteínas de alta concentración en levadura.

En resumen, los genes de proteínas mayoritarias de levadura suelen carecer de determinados codones que están muy representados en la secuencia de la ferroproteína de K.pneumoniae. Mientras que aquellos tienden a evitar los codones que llevan GC, CG, GG o CC siempre que esto es posible por la disponibilidad de otro tipo de codones sinónimos, el gen nifH se aparta patentemente de esta regla al incluir entre sus tripletes más abundantes a algunos de estos "codones prohibidos".

La influencia real que todo esto pueda tener para la traducción eficiente de un mensaje heterólogo es desconocida. Autores como Tuite et al. (1982) achacan (aunque con base especulativa) parte de la responsabilidad de los rendimientos inferiores de expresión heteróloga a problemas derivados de uso diferente de los codones.

En nuestro caso es aún difícil aventurar hipótesis en esta línea. La no detección de proteína de Kp2 en levaduras transformantes con las técnicas empleadas sugiere que existen problemas post-transcripcionales, pero no cabe cali-

brar la responsabilidad que en ello puede tener el que la información de nifH se aparte en varios puntos del sesgo de tripletas de levadura. Debido a que la expresión de nif viene ya previamente condicionada por niveles relativamente bajos del ARNm, es de suponer que la reserva de ARNt's minoritarios requeridos para traducir el gen de la ferroproteína será comparativamente menos limitante que si el nivel de transcriptos nif fuera el óptimo. De cualquier manera, cabría esperar que el mensaje de nifH fuera traducido a niveles similares a los de las proteínas minoritarias de levadura.

Durante el curso de elaboración de la presente discusión han aparecido dos nuevos trabajos del grupo de Zamir que informan de la expresión en levaduras del gen nifH de K.pneumoniae: Berman et al. (1985b), con una estrategia similar a la nuestra, han insertado nifH, desprovisto de sus secuencias 5' no codificadoras hasta la coordenada -12 en el mismo vector pAAR6, obteniendo el plásmido denominado pJB81. Mediante la técnica inmunoquímica de inmunoblotting han detectado el polipéptido de la ferroproteína a partir de extractos fraccionados en geles desnaturalizantes de PAA-SDS. El crecimiento de las levaduras transformantes en presencia de oxígeno no afecta al nivel del polipéptido de Kp2 (lo que sugiere que la inestabilidad de éste en K.pneumoniae se debe a la bacteria y no es intrínseca al producto de nifH). El contexto de secuencia en pJB81 (que es similar al nuestro hasta -12) no parecía el óptimo para la expresión del gen, ya que los rendimientos de producción del polipéptido aumentaron en una construcción en la que el inicio de traducción era suministrado por un ATG procedente de

pBR322 situado a 12 codones del ATG propio de nifH, y cuya región 5' previa era bastante parecida a la del gen LEU2 de S.cerevisiae. En el trabajo paralelo (Berman et al., 1985a) desarrollaron un sistema de ensayo inmunoquímico para componentes nativos de nitrogenasa en lisados celulares que les ha permitido detectar la forma dimérica de la ferroproteína, similar a la sintetizada por K.pneumoniae en cuanto a peso molecular aparente, inmunorreactividad, sensibilidad al oxígeno y labilidad en presencia de Mg-ATP.

Se pueden hacer algunas precisiones sobre las diferencias entre estos dos informes y nuestro trabajo. Suponiendo que el uso de cepas hospedadoras diferentes no influye significativamente, la variación fundamental entre los experimentos del grupo de Zamir y los aquí presentados, en cuanto a diseño genético, estriba en que aquéllos realizan la clonación de nifH solamente, mientras que nosotros manipulamos un fragmento mucho mayor en donde se incluyen, además, nifD, nifK, nifY y parte de nifE. Por lo tanto, si la interpretación que se ha dado más arriba sobre nuestros bajos niveles de ARNm de nif es correcta, el clonar sólo nifH llevaría a niveles superiores de transcritos; de hecho, estos investigadores israelíes informan de niveles altos de ARN hibridable con sondas específicas (aproximadamente similar a la cantidad de ARN de ADC1 expresado desde el cromosoma). Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados con la expresión transcripcional, los niveles de polipéptido de ferroproteína son reconocidos explícitamente como bajos (Berman et al., 1985b). Sus intentos de detectar Kp2 por marcado in vivo con ^{55}Fe, o por ensayos funcionales

similares a los empleados por nosotros, fueron infructuosos. Por lo tanto, cabe concluir que existen factores post-transcripcionales que, tanto en su sistema como el aquí descrito, condicionan pequeñas cantidades de la ferroproteína. Entre estos factores no se puede descartar unos valores altos de tasa de "turnover" de la proteína foránea (como aprecian Mellor et al., 1985).

CONCLUSIONES

1ª: Se ha clonado el operón de genes estructurales (nifHDKY) de la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae en vectores de expresión bifuncionales, entre el promotor y el terminador del gen ADC1 de Saccharomyces cerevisiae, bien en forma de un fragmento EcoRI original (no manipulado), bien como fragmentos reseccionados in vitro, carentes de tripletes ATG previos al codón iniciador del gen de la ferroproteína (nifH).

2ª: Los plásmidos bifuncionales recombinantes portadores de las secuencias nif promueven en levadura la transcripción de todo el segmento nif clonado, originándose mensajeros poliadenilados. La producción de transcritos nif es independiente de la orientación del inserto en el vector y de la manipulación previa de la región 5' no codificadora de nifH. Los niveles de transcritos nif son inferiores a los esperables de un sistema de expresión basado en plásmidos multicopia portadores de un eficiente promotor de levadura, estando por debajo de los niveles de transcritos del gen ADC1 cromosómico de la cepa receptora de las construcciones genéticas.

3ª: A pesar de la obtención de plásmidos recombinantes carentes de potenciales inicios anómalos de traducción para nifH en levadura, la expresión a nivel de proteína de dicho gen no pudo ser evidenciada por nin-

guno de los dos métodos aplicados (electroforesis de proteína marcadas in vivo, y ensayo funcional de complementación de la actividad reductora de acetileno de un mutante nifH de K.pneumoniae).

BIBLIOGRAFIA

Abdul Jabbar M, Sivasubramanian N, Nayak DP (1985) Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosilated in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 82: 2019

Abelson J, Knapp G, Peebles CL, Ogden RC, Johnson PF, Johnson JD (1981) tRNA splicing in yeast. En "Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution" (Ed: MJ Carlile, JF Collins y BEB Moseley). Cambridge University Press, Cambridge. pp 151-173

Alvarez Morales A, Dixon R, Merrick M (1984) Positive and negative control of the glnA ntrBC regulon in Klebsiella pneumoniae. EMBO J 3:501

Ammerer G (1983) Expression of genes in yeast using the ADC1 promoter. Methods Enzymol 101:192

Ammerer G, Ruis H (1979) Cell-free synthesis of Saccharomyces cerevisisiae catalase T. FEBS Lett 99: 242

Andersen K, Shanmugan KT (1977) Energetics of biological nitrogen fixation: determination of the ratio of formation of H_2 to NH_4^+ catalysed by nitrogenase of Klebsiella pneumoniae in vivo. J gen Microbiol 103: 107

Andersen K, Shanmugan KT, Lim ST, Csonka LN, Tait R, Hennecke H, Scott DB, Hohn SSM, Haury JF, Valentine A, Valentine RC (1980) Genetic engineering in Agriculture with special emphasis on nitrogen fixation. Trends Biochem Sci 5: 35

Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD (1985) The FLP recombinase of the 2μm circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. Cell 40: 795

Ausubel FM (1984) Regulation of nitrogen fixation genes. Cell 37: 5

Bachuber M, Brill WJ, Howe M (1976) Use of bacteriophage Mu to isolate deletions in the his-nif region of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 128: 749

Backman K, Chen YM, Ueno-Nishio S, Magasanik B (1983) The product of glnL is not essential for regulation of bacte-

rial nitrogen assimilation. J Bacteriol 154: 516

Banerjee AK (1981) 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. Microbiol Rev 44: 175

Barnes G, Rine J (1985) Regulated expression of endonuclease EcoR1 in Saccharomyces cerevisiae: nuclear entry and biological consequences. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1354

Barton KA, Brill WJ (1983) Prospects in plant genetic engineering. Science 219: 671

Barton KA, Binns AN, Matzke A, Chilton M-D (1983) Cell 32: 1033

Beach D, Piper M, Shall S (1980) Isolation of chromosomal origins of replication in yeast. Nature 284: 185

Beggs JD (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275: 104

Beggs JD, Van der Berg J, Van Ooyen A, Weissman C (1980) Abnormal expression of chromosomal rabbit -globin gene in Saccharomyces cerevisiae. Nature 283: 835

Beier DR, Young ET (1982) Characterization of a regulatory region upstream of the ADR2 locus of Saccharomyces cerevisiae. Nature 300: 724

Bennetzen JL, Hall BD (1982a) The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for alcoholdehydrogenase I. J Biol Chem 257: 3018

Bennetzen JL, Hall BD (1982b) Codon selection in yeast. J Biol Chem 257: 3026

Bergersen FJ (1984) Oxygen and the physiology of diazotrophic microorganisms. En "Advances in Nitrogen Fixation Research" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp171-180

Berman J, Gershoni JM, Zamir A (1985a) Expression of nitrogen fixation genes in foreign hosts. Assembly of nitrogenase Fe protein in Escherichia coli and in yeast. J Biol Chem 260: 5240

Berman J, Zilberstein A, Salomon D, Zamir A (1985b) Expression of a nitrogen-fixation gene encoding a nitrogenase subunit in yeast. Gene 35: 1

Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucl Acid Res 12: 8711

Bevan M, Chilton MD (1982) T-DNA of the Agrobacterium Ti and Ri plasmids. Ann Rev Genet 16: 357

Bevan M, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304: 184

Beynon J, Cannon M, Buchanan-Wollaston V, Cannon FC (1983) The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell 34: 665

Birnboin HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res 7: 1513

Blackburn EH (1985) Artificial chromosomes in yeast. Trends Genet 1: 8

Blackburn EH, Chian SS (1981) Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in Tetrahymena. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2263

Blackburn EH, Szostak JW (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. Ann Rev Biochem 53: 163

Blanc H, Gerbaud C, Slonimski PP, Guérineau M (1979) Stable yeast transformation with chimeric plasmids using a a 2 µm-circular DNA-less strain as a recipient. Molec gen Genet 176: 335

Bloom KS, Carbon J (1982) Yeast centromere DNA is a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. Cell 29: 305

Bogusz D, Houmard J, Aubert JP (1981) Electron transport to nitrogenase in Klebsiella pneumoniae. Eur J Biochem 120: 421

Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95

Botstein D, Davis RW (1982) Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. En "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression" (Ed: JN Strathern, EW Jones y JR Broach) Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp 607-650

Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA of Escherichia coli. J Mol Biol 41: 459

Brake AJ, Merryweather JP, Coit DC, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ (1984) α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 81: 4642

Bram RJ, Kornberg RD (1985) Specific protein binding to far upstream activating sequences in polymerase II promoters. Proc Natl Acad Sci USA 82: 43

Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K (1985) Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with prperties opposite to those of a transcriptional enhancer. Cell 41: 41

Brent R (1985) Repression of transcription in yeast. Cell 42: 3

Breunig KD, Mackedonski V, Hollenberg CP (1982) Transcription of the bacterial β-lactamase gene in Saccharomyces cerevisiae. Gene 20: 1

Brewin NJ (1984) Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen fixing symbionts. En "Genes involved in Microbe-Plant interactions" (Ed: DPS Verma, T. Hohn) Springer Verlag, Viena. pp 179-203

Brill WJ (1980) Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiol Rev 44: 449

Brisson N, Paszkowski J, Penswick JR, Gronenborn B, Potrykus I, Hohn T (1984) Expression of a bacterial gene in plants using a viral vector. Nature 310: 511

Broach JR (1983) Construction of high copy yeast vectors using 2-μm circle sequences. Methods Enzymol 101: 307

Broach JR, Hicks JB (1980) Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ m circle Cell 21: 501

Broach JR, Strathern JN, Hicks JB (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. Gene 8: 121

Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M (1982) Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific. Cell 29: 227

Brooks SJ, Collins JH, Brill, WJ (1984) Repression of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae at high temperature. J Bacteriol 157: 460

Broughton WJ, Samrey U, Pankhurst CE, Schneider GM, Vance CP (1984) Ecology and microbiology of symbiotic diazotrophs. En "Advances in Nitrogen Fixation Research" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/Junk/ Pudoc Publisshers, La Haya. pp 279-285

Brown SE, Ausubel FM (1984) Mutations affecting regulation of the Klebsiella pneumoniae nifH (nitrogenase reductase) promoter. J Bacteriol 157: 143

Brzobohatý B, Kováč L (1985) Interaction of plasmid DNA with yeast protoplasts and a mechanism of genetic transformation. FEBS Lett 183: 211

Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Beynon JL, Cannon FC, (1981a) Role of the nifA gene product in the regulation of nif expression in Klebsiella pneumoniae. Nature 294: 776

Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Cannon FC (1981b) The use of cloned nif (nitrogen fixation) DNA to investigate transcriptional regulation of nif expression in Klebsiella

pneumoniae. Mol gen Genet 184: 102

Burgess BK (1984) Structure and reactivity of nitrogenase- an overview. En "Advances in Nitrogen Fixation Reseach" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp 103-114

Burgoon AC, Bottino PJ (1976) Uptake of the nitrogen fixing blue green algae Gloeocapsa into protoplasts of tobacco and maize. J Hered 67: 223

Burris RH, Arp DJ, Hageman RV, Honchins JP, Sweet WJ, Tso M (1981) Mechanism of nitrogenase action. En "Currents Perspectivers in Nitrogen Fixation" (Ed: AH Gibson y WE Newton) Australian Academy of Science, Canberra. pp56-66

Cabezón T, DeWilde M, Herion P, Lorian R, Bollen A (1984) Expression of human α_1- antitripsin cDNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 81: 6594

Cannon FC (1980) Genetic studies with diazotrophs. En "Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation" (Ed: FJ Bergersen) John Wiley & Sons, Nueva York. pp 367-413

Cannon FC, Riedel GE, Ausubel FM (1977) Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (nif) cluster of Klebsiella pneumoniae. Proc Natl Acad Sci USA 74: 2963

Cannon FC, Dixon RA, Postgate JR, Primrose SB (1974) Chromososmal integration of Klebsiella nitrogen fixation genes in Escherichia coli. J gen Microbiol 80: 227

Cannon FC, Riedel GE, Ausubel FM (1979) Overlapping sequences of Klebsiella pneumoniae nif DNA cloned and characterized. Mol gen Genet 174: 59

Cannon M, Hill S, Kavanaugh E, Cannon FC (1985) A molecular genetic study of the nif expression in Klebsiella pneumoniae at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. Mol gen Genet 198: 198

Caplan A, Herrera-Estrella L, Inzé D, Van Haute E, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1983) Introduction of genetic material into plant cells. Science 222: 815

Casadaban MJ, Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. J Mol Biol 138: 179

Celniker SE, Campbell JL (1982) Yeast DNA replication in vitro: initiation and elongation events mimic in vivo processes. Cell 31: 201

Celniker SE, Sweder K, Srienc F, Bailey JE, Campbell JL (1984) Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 2455

Chan CSM, Tye BK (1980) Autonomously replicating sequences in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6329

Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. J Bacteriol 134: 1141

Chenais J, Richaud C, Rouceray J, Cherest H, Surdinkerjan Y, Patte JC (1981) Construction of hybrid plasmids containing the lysA gene of Escherichia coli. Studies of expression in E.coli and Saccharomyces cerevisiae. Mol gen Genet 182: 456

Chevallier MR, Aigle N (1979) Qualitative detection of penicillinase produced by yeast strains carrying chimeric yeast-E.coli plasmids. FEBS Lett 108: 179

Chevallier MR, Bloch JC, Lacroute F (1980) Transcriptional and translational expression of chimeric bacterial-yeast plasmid in yeast. Gene 11: 11

Citron BA, Donelson JE (1984) Sequence of Saccharomyces GAL region and its transcription in vivo. J Bacteriol 158: 269

Clarke L, Carbon J (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes.

Nature 287: 504

Clarke LE, Gibson RF, Sherwood RF, Minton NP (1985) Expression of the Pseudomonas gene coding for carboxypeptidase G2 in Saccharomyces cerevisiae. J gen Microbiol 131: 897

Cocking EC, Davey MR, Pental D, Power JB (1981) Aspects of plant genetic manipulation. Nature 293: 265

Cohen JD, Eccleshall TR, Needleman RB, Federoff H, Buchferer BA, Marmur J (1980) Functional expression in yeast of the Escherichia coli plasmid gene coding for chloranphenicol acetyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 77: 1078

Cohen JD, Abrams E, Eccleshall TR, Buchferer BA, Marmur J (1983) Mol gen Genet 191: 451

Collins JJ, Brill WJ (1985) Control of Klebsiella pneumoniae nif mRNA synthesis. J Bacteriol 162: 1186

Compton JL, Zamir A, Szalay AA (1982) Insertion of non-homologous DNA into the yeast genome mediated by homologous recombination with a cotransforming plasmid. Mol gen Genet 188: 44

Cramer JH, Lea K, Slighton JL (1985) Expression of phaseolin cDNA gene in yeast under control of natural plant DNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 82: 334

Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cell. Gene 6: 23

Dani GM, Zakian VA (1983) Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 80: 3406

Davey MR, Power JB (1975) Polyethylene glycol-induced uptake of microorganisms into higher plant protoplasts: an ultrastructural study. Plant Sci Letters 5: 269

Davey MR, Cocking EC (1980) Tissue and cell cultures and bacterial nitrogen fixation. En "Recent Advances in

Biological Nitrogen Fixation" (Ed: NS Subba-Rao) Edward Arnold Publishers, Londres. pp 281-324

DeBlock M, Schell J, Van Montagu M (1985) Chloroplast transformation by Agrobacterium tumefaciens. EMBO J 4: 1367

DeBruijn FJ, Ausubel FM (1981) The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the glnA region of Klebsiella pneumoniae. Identification of glnR, a gene involved in the regulation of the nif and hut operons. Mol gen Genet 183: 289

DeBruijn FJ, Ausubel FM (1983) The cloning and characterization of the glnF (ntrA) gene of Klebsiella pneumoniae. Role of GlnF (NtrA) in the regulation of nitrogen fixation (nif) and other nitrogen assimilation genes. Mol gen Genet 192: 342

DeGreve H, Decraemer H, Seurink J, Van Montagu M, Schell J (1981) The functional organization of the octopine Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiB653. Plasmid 6: 235

Denis CL, Ferguson J, Young ET (1983) mRNA levels for the fermentative alcoholdehydrogenase of Saccharomyces cerevisiae decrease upon growth on a non-fermentable carbon source. J Biol Chem 258: 1165

Dilworth M, Glenn A (1984) How does a legume nodule work? Trend Biochem Sci 9: 519

Dixon RA (1984a) The genetic complexity of nitrogen fixation . J gen Microbiol 130: 2745

Dixon RA (1984b) Tandem promoters determinate regulation of the Klebsiella pneumoniae glutamine synthetase (glnA) gene. Nucl Acid Res 12: 7811

Dixon RA, Postgate JR (1972) Genetic transfer of nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli. Nature 237: 102

Dixon RA, Cannon FC, Kondorosi A (1976) Construction of a R plasmid carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. Nature 260: 268

FACULTAD DE CIENCIAS BIBLIOTECA

Dixon RA, Kennedy C, Kondorosi A, Krishnapillai A, Merrick M (1977) Complementation analysis of Klebsiella pneumoniae mutants defective in nitrogen fixation. Molec gen Genet 157: 189

Dixon RA, Eady RR, Espín G, Hill S, Iaccarino M, Kahn D, Merrick M (1980) Analysis of regulation of the Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation (nif) gene cluster with gene fusions. Nature 286: 128

Dixon RA, Alvarez Morales A, Clements J, Drummond M, Merrick M, Postgate JR (1984) Transcriptional control of the nif regulon in Klebsiella pneumoniae. En "Advances in Nitrogen Fixation research" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp 635-642

Dobsen MJ, Futcher AB, Cox BS (1980a) Control of recombination within and between DNA plasmids of Saccharomyces cerevisiae. Current Genet 2: 193

Dobsen MJ, Futcher AB, Cox BS (1980b) Loss of 2-μm DNA from Saccharomyces cerevisiae transformed with the chimeric plasmid pJDB219. Current Genet 2: 201

Dobson MJ, Tuite M F, Roberts NA, Kingsman AJ, Kingsman SM, Perkins RE, Convoy SC, Dubnar B, Fothergill LA (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in Saccharomyces cerevisiae. Nucl Acid Res 10: 2625

Dobson MJ, Tuite MF, Mellor EJ, Roberts NA, King RM, Burke DC, Kingsman AJ, Kingsman SM (1983) Expression in Saccharomyces cerevisiae of human interferon-alpha directed by TRP1 5' region. Nucl Acid Res 11: 2287

Drummond MH (1984) The nitrogen fixation genes of Klebsiella pneumoniae: a model system. Microbiol Sci 1: 29

Drummond MH, Clements J, Merrick M, Dixon RA (1983) Positive control and autogenous regulation of the nif promoter in Klebsiella pneumoniae. Nature 301: 302

Dunican LK, Tierney AB (1974) Genetic transfer of nitrogen fixation from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes Biochem Biophys Res Comm 57:

Eady RR (1973) Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae: interaction of the component proteins studied by ultracentrifugation. Biochem J 135: 531

Eady RR (1980) Methods for studying nitrogenase. En "Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation" (Ed: FJ Bergersen) John Wiley & Sons, Nueva York. pp 213-264

Eady RR (1981) Regulation of nitrogenase activity. En "Current Perspectives in Nitrogen Fixation" (Ed: AH Gibson y WE Newton) Australian Academy of Sciences, Canberra. pp 172-181

Eady RR, Smith BE (1979) Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. En "A Treatise on Dinitrogen Fixation" (Ed: RWF Hardy, F Bottomley y RC Burns) John Wiley & Sons, Nueva York. pp 399-490

Edens L, Bom I, Ledeboer AM, Maat J, Toonen MY, Visser C, Verrips CT (1984) Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. Cell 37: 629

Elmerich C, Houmard J, Sibold L, Manheimer I, Charpin N (1978) Mol gen Genet 165: 181

Emr SD, Schekman R, Flessel MC, Thorner J (1983) An MF 1-SUC2 (α-factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. Proc Natl Acad Sci 80: 7090

Erhart E, Hollenberg CP (1981) Curing of Saccharomyces cerevisiae 2- μm DNA by transformation. Current Genet 3: 83

Espín G, Alvarez Morales A, Cannon F, Dixon RA, Merrick M (1982) Cloning of the glnA, ntrB and ntrC genes of Klebsiella pneumoniae and studies of their roles in regulation of the nitrogen fixation (nif) gene cluster. Mol gen Genet 186: 518

Evans HJ, Purohit K, Contrell MA, Eisbrenner G, Russell SA, Hanus FJ, Lepo JE (1981) Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. En: "Current Perspectives in Nitrogen Fixation" (Ed: AH Gibson y WE

Newton) Australian Academy of Science, Canberra. pp 84-96

Falco SC, Li Y, Broach JR, Botstein D (1982) Genetic properties of chromosomally integrated 2 μm plasmid DNA in yeast. Cell 29: 573

Falco SC, Rose M, Botstein D (1983) Homologous recombination between episomal plasmids and chromosomes in yeast. Genetics 105: 843

Fangman WL, Hice RH, Chlebowicz-Sleziewska E (1983) ARS replication during the yeast S phase. Cell 32: 831

Faye G, DW Leung, Tatchele K, Hall B, Smith M (1981) Deletion mapping of sequences essential for in vivo transcription of the iso-1-cytochrome c gene. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2258

Fehér Z, Kiss A, Venetianer P (1983) Expression of a modification methylase gene in yeast. Nature 302: 266

Fergusson J, Groppe JC, Reed SI (1981) Construction and characterization of three yeast-Escherichia coli shuttle vectors designed for rapid subcloning of yeast genes on small DNA fragments. Gene 16: 191

Ferenczy L (1981) Microbial protoplast fusion. En "Genetics as a Tool in Microbiology" (Ed: SW Glover y DA Hopwood) Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-34

Fitzgerald-Hayes M, Buhler JM, Cooper TG, Carbon J (1982) Isolation and subcloning analysis of functional centromere (CEN11) from Saccharomyces cerevisiae chromosome XI. Mol cell Biol 2: 82

Flavell R, Mathias R (1984) Prospects for transforming monocot crop plants. Nature 307: 108

Fragelius TJ, Livingston DM (1984) Location of DNAI-sensitive cleavage sites in the yeast 2 μm plasmid DNA chromosome. J Mol Biol 173: 1

Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Gal-

luppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803

Freeling M (1984) Plant transposable elements and insertion sequences. Ann Rev Plant Physiol 35: 277

Futcher AB, Cox BS (1983) Maintenance of the 2μm circle plasmid in populations of Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 154: 612

Futcher AB, Cox BS (1984) Copy number and the stability of 2 μm circle-based artificial plasmids of Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 157: 283

Gallant J (1979) Stringent control in Escherichia coli. Ann Rev Genet 13: 393

Gallon JR (1981) The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. Trend Biochem Sci 6:19

Gerbaud C, Fournier P, Blanc H, Aigle M, Heslot H, Guérineau (1979) High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2-μm yeast plasmid. Gene 5: 233

Gerbaud C, Elmerich C, Tandeau de Marsac N, Chocat P, Charpin N, Guérineau M, Aubert JP (1981) Construction of new yeast vectors and cloning of the nif (nitrogen fixation gene cluster of Klebsiella pneumoniae in yeast. Current Genet 3

Gil A, Proudfoot NJ (1984) A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit β-globin mRNA 3' end formation. Nature 312: 473

Giles KL, Whitehead HCM (1975) The transfer of nitrogen fixing ability to an eukaryote cell. Cytobios 14: 49

Giles KL, Whitehead HCM (1976) Uptake and continued metabolic activity of Azotobacter within fungal protoplasts. Science 193: 1125

Giles KL, Whitehead HCM (1977) The localization of introduced Azotobacter cells within the mycelium of a modified mycorrhiza (Rhizopogon) capable of nitrogen fixation. Plant Sci Letters 10: 367

Glenn AR, Dilworth MJ (1985) Ammonia movements in Rhizobia Microbiol Sci 2: 161

Gordon JK (1981) Introduction to the nitrogen-fixing prokaryotes. En "The Prokaryotes" Vol I. (Ed: MP Starr, H Stolp, HG Trüper, A Balows, HG Schlegel) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg. pp 781-794

Gordon JK, Shah VK, Brill WJ (1981) Feedback inhibition of nitrogenase. J Bacteriol 148: 884

Gritz L, Davies J (1983) Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Gene 25: 179

Gronenborn B, Gardner RC, Schaefer S, Sepherd RJ (1981) Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as a vector. Nature 294: 773

Grunstein M, Hogness DS (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc Natl Acad Sci USA 72: 3961

Guarente L (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. Methods Enzymol 101: 181

Guarente L (1985) Regulation of the Saccharomyces cerevisiae CYC1 gene. En "Microbiology 1985" (Ed: L Leive) American Society for Microbiology, Washington. pp 379-383

Guarente L, Ptashne M (1981) Fusion of Escherichia coli lacZ to the cytochrome c gene of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2199

Guarente L, Hoar E (1984) Upstream activation sites of the CYC1 gene of Saccharomyces cerevisiae are active when inverted but not when placed downstream of the "TATA box". Proc Natl Acad Sci USA 81: 7860

Gunge N (1983) Yeast DNA plasmids. Ann Rev Microbiol 37:253

Haaker H, Veeger C (1984) Enzymology of nitrogen fixation. Trends Biochem Sci 9: 188

Haaker H, Braaksma A, Cordewener J, Klugkist J, Wassink H, Grande H, Eady R, Veeger C (1984) Iron-sulfide content and ATP binding properties of nitrogenase component II from Azotobacter vinelandii. En : "Advances in Nitrogen Fixation Research" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp123-131

Haber JE, Thorburn PC, Rogers D (1984) Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 106: 185

Hansen U, Sharp PA (1984) Transcription by RNA polymerase II. En "Comprehensive Virology", vol 19 (Ed: H Fraenkel-Conrat y RR Wagner) Plenum Press, Nueva York. pp 65-97

Harashima S, Takagi A, Oshima Y (1984) Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. Mol cell Biol 4: 771

Hartley JL, Donelson JE (1980) Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature 286: 860

Hawkes TR, McLean PA, Smith BE (1984) Nitrogenase from nifV mutants of Klebsiella pneumoniae contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor. Biochem J 217:317

Henikoff S, Cohen EH (1984) Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 1515

Henikoff S, Tatchell K, Hall BD, Nasmyth KA (1981) Isolation of a gene from Drosophila by complementation in yeast. Nature 289: 33

Henikoff S, Kelly JD, Cohen EH (1983) Transcription terminates in yeast distal to a control sequence. Cell 33: 607

Hennecke H, Shanmugan KT (1979) Temperature control of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. Arch Microbiol 123: 259

Herrera Estrella L, DeBlock M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J 2:987

Herrera Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983b) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature 303: 209

Herrera Estrella L, Van den Broek G, Maenhaut R, Van Montagu M, Schell J, Timko M, Cashmore A (1984) Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimeric gene introduced into Nicotiana tabacum using a Ti plasmid vector. Nature 310: 115

Hicks JB, Hinnen A, Fink GF (1979) Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 43: 1305

Hill (1976a) Influence of atmosferic oxygen concentration on acetylene reduction and efficiency of nitrogen fixation in intact Klebsiella pneumoniae. J gen Microbiol 93: 335

Hill S (1976b) The apparent ATP requirement for nitrogen fixation in growing Klebsiella pneumoniae. J gen Microbiol 95: 297

Hill S, Kennedy C, Kavanaugh E, Goldberg R, Hanau R (1981) Nitrogen fixation gene (nifL) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. Nature 290: 424

Hinnebusch AG, Fink GR (1983) Positive regulation in the general aminoacid control of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 80: 5374

Hinnebusch AG, Lucchini G, Fink GR (1985) A synthetic HIS4 regulatory element confers general aminoacid control on the cytochrome c gene (CYC1) of yeast. Proc Natl Acad Sci 82: 498

Hinnen A, Meyhak B (1982) Vectors for cloning in yeast. Curr Top Microbiol Immunol 96: 101

Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978) Transformation of yeast. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1929

Hitzeman RA, Hagie FE, Goeddel DV, Ammerer G, Hall BD (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293: 717

Hitzeman RA, Hagie FE, Hayflick JS, Chen CY, Seeburg PH, Derynk R (1982) The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for 3-phosphoglycerate kinase. Nucl Acid Res 10: 7791

Hitzeman RA, Leung DW, Perry LJ, Kohr WJ, Levine HL, Goeddel DV (1983a) Secretion of human interferons by yeast. Science 219: 620

Hitzeman RA, Chen CY, Hagie FE, Patzer EJ, Liu CC, Estell, DA, Miller JV, Yaffe A, Kleid D, Levinson AD, Opperman H (1983b) Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucl Acid Res 11: 2745

Hirsch PR, Beggs JD (1984) Agrobacterium tumefaciens T-DNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol gen Genet 195: 209

Hoekstra MF, Malone RE (1985) Expression of the Escherichia coli dam methylase in Saccharomyces cerevisiae: effect of in vivo adenine methylation on genetic recombination and mutation. Mol cell Biol 5: 610

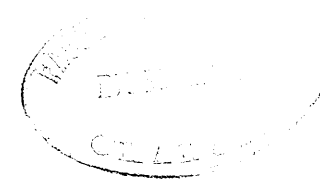
Hohn T, Richards K, Lebeurier G (1982) Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector. Curr Top Microbiol Immunol 96: 193

Holland JP, Holland MJ (1980) Structural comparison of two nontandemly repeated yeast glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase genes. J Biol Chem 255: 2596

Holland MJ, Holland JP, Thile GP, Jackson KA (1982) The primary structures of two yeast enolase genes. J Biol Chem 256: 1385

Hollenberg CP (1979) The expression of bacterial antibiotic resistance genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. En "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance" (Ed: KN Timmis y A Pühler) Elsevier-North Holland, Amsterdam. pp 481-491

Hollenberg CP (1982) Cloning with the 2-µm DNA and the expression of foreign genes in Saccharomyces cerevisiae. Curr Top Microbiol Immunol 96: 119



Holm C (1982a) Clonal lethality caused by the yeast plasmid 2 μm DNA. Cell 29: 585

Holm C (1982b) Sensitivity to the yeast plasmid 2 μm DNA is conferred by the nuclear allele nib. Mol cell Biol 2: 985

Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1985) The Ti-plasmid of Agrobacterium tumefaciens: a natural genetic engineer. Trends Biochem Sci 10: 307

Hooykaas-van Slogteren GMS, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1984) Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with Agrobacterium tumefaciens. Nature 311: 763

Howell SH (1982) Plant molecular vehicles, potential vectors for introducing foreign DNA into plants. Ann Rev Plant Physiol 33: 609

Hsiao CL, Carbon J (1979) High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. Proc Natl Acad Sci 76: 3829

Hull R (1983) The current status of plant viruses as potential DNA/RNA vector systems. En "Plant Biotechnology" (Ed: SH Mantell, H Smith) Cambridge University Press, Cambbridge. pp 299-312

Hyman BC, Cramer JH, Rownd RH (1982) Properties of a Saccharomyces cerevisiae mtDNA conferring high-frequency yeast transformation. Proc Natl Acad Sci USA 79: 1578

Imperial J, Ugalde RA, Shah VK, Brill WJ (1984) Role of the nifQ gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 158: 187

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol 153: 163

Janowicz ZA, Henning U, Hollenberg CP (1982) Synthesis of Escherichia coli outer membrane OmpA protein in yeasts. Gene 20: 347

Jayaram M (1985) Two-micrometer circle site-specific recombi-

nation: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. Proc Natl Acad Sci USA 82: 5875

Jayaram M, Broach JR (1983) Yeast plasmid 2-μm circle promotes recombination within bacterial transposon Tn5. Proc Natl Acad Sci USA 80: 7264

Jayaram M, Sutton A, Broach JR (1985) Properties of REP3: a cis-acting locus required for stable propagation of the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2-μm circle. Mol cell Biol 5: 2466

Jensen JS, Kennedy C (1982) Pleiotropic effect of his gene mutations on nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. EMBO J 1: 197

Jiménez A, Davies J (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces. Nature 287: 869

Johansson BC, Nordlund S, Baltscheffsky (1983) Nitrogen fixation and ammonia assimilation . En "The Phototrophic Bacteria" (Ed: JG Ormerod) Blacwell, Oxford. pp120-145

Johnston M, Davis RW (1984) Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 1440

Jones EW, Fink GR (1982) Regulation of aminoacid and nucleotide biosynthesis in yeast. En "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression" (Ed: JN Strathern, EW Jones, JR Broach) Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. pp 181-299

Kahn D, Hawkins M, Eady R (1982) Nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: nitrogenase levels and the effect of added molybdate on nitrogenase derepressed under Mo-deprivation. J gen Microbiol 128: 779

Karube I, Tamiya E, Matsuoka H (1985) Transformation of Saccharomyces cerevisiae spheroplasts by high electric pulse. FEBS Lett 182: 90

Kaster KR, Burgett SG, Ingolia TD (1984) Hygromycin B resistance as a dominant selectable marker in yeast. Current Genet 8: 353

Kearsey S (1983) Analysis of sequences conferring autonomous replication in baker's yeast. EMBO J 2: 1571

Kennedy C (1977) Linkage map of the nitrogen fixation (nif) genes in Klebsiella pneumoniae. Mol gen Genet 157:199

Khoury G, Gruss P (1983) Enhancer elements. Cell 33: 313

Kielland-Brandt MC, Nilsson-Tillgren T, Holmberg S, Litske Petersen JG, Svenningsen (1979) Carlsberg Research Commun 44: 77

Kikuchi Y (1983) Yeast plasmid requires a cis-acting locus and two plasmid proteins for its stable maintenance. Cell 35: 487

Kingsman AJ, Clarke L, Mortimer RK, Carbon J (1979) Replication in Saccharomyces cerevisiae of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast TRP1 region. Gene 7:141

Kiss G, Pearlman RE, Cornish KV, Friesen JD, Chan VL (1982) The herpes simplex virus thymidine kinase gene is not transcribed in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 149: 542

Klugkist J, Haaker H (1984) Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in Azotobacter vinelandii. J Bacteriol 157: 148

Knutton S, Pasternak CA (1979) The mechanism of cell-cell fusion. Trends Biochem Sci 4: 220

Kozak M (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? Cell 15: 1109

Kozak M (1981) Mechanism of mRNA recognition by eucaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis. Curr Top Microbiol Immunol 93: 81

Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. Microbiol Rev 47: 1

Krajewska-Grynkiewicz K, Kustu S (1984) Evidence that nitrogen regulatory gene ntrC of Salmonella typhimurium is transcribed from the glnA promoter as well as from a separate ntr promoter. Mol gen Genet 193: 135

Kramer RA, DeChiara T, Schaber MD, Hilliker S (1984) Regulated expression of a human interferon gene in yeast. Control by phosphate concentration or temperature. Proc Natl Acad Sci USA 81: 367

Krishnapillai V, Postgate JR (1980) Expression of Klebsiella his and nif genes in Serratia marcescens, Erwinia herbicola and Proteus mirabilis. Arch Microbiol 127:115

Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680

Lamond AI, Travers AA (1985) Stringent control of bacterial transcription. Cell 41: 6

Landgridge J, Landgridge P, Bergquist PL (1980) Extraction of nucleic acids from agarose gels. Anal Biochem 103: 264

Langeveld SA, Yasui A, Eker APM (1985) Expression of an Escherichia coli phr gene in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol gen Genet 199: 396

Larionov V, Kouprina N, Karpova T (1984) Stability of recombinant plasmids containing the ars sequence of yeast extrachromosomal rDNA in several strains of Saccharomyces cerevisiae. Gene 28: 229

Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF, (1984) Identification of two proteins encoded by the GAL4 gene. Mol cell Biol 4: 268

Legocki RP, Szalay AA (1984) Molecular biology of stem nodulation. En "Genes Involved in MIcrobe-Plant Interactions" (Ed: DPS Verma y T Hohn) Springer Verlag, Viena. pp 255-268

Leonardo JM, Goldberg RB (1980) Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 142: 99

Lim ST, Andersen K, Valentine RC (1980) Genetic engineering in agriculture: hydrogen uptake (hup) genes. Trends

Biochem Sci 5: 167

Livingston DM, Klein HL (1977) Deoxyribonucleic acid sequence organization of a yeast plasmid. J Bacteriol 129: 472

Livingston DM, Kupfer DM (1977) Control of Saccharomyces cerevisiae 2 µm DNA replication by cell division cycle genes that control nuclear DNA replication. J Mol Biol 116: 249

Livingston DM, Hahne S (1979) Isolation of a condensed intracellular form of the 2 µm DNA plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 76: 3727

Losson R, Lacroute F (1979) Interference of nonsense mutations with eucaryotic messenger RNA stability. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5134

Losson R, Fuchs RPP, Lacroute F (1983) In vivo Transcription of eukaryotic regulatory gene. EMBO J 2: 2179

Lowry BH, Rosenberg NI, Farr AL, Randall J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol Chem 193: 265

Lowry CC, Weiss JL, Walthall DA, Zitomer RS (1983) Modulator sequences mediate oxygen regulation of CYC1 and a neighboring gene in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 80: 151

Ludden PW, Murrell SA, Pope M, Kanemoto R, Dowling TE, Saari LL, Triplett E (1984) Regulation of nitrogen fixation in photosynthetic bacteria. En "Advances in Nitrogen Fixation Research" (Ed: C Veeger y WE Nexton) Nijhoff/Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp 181-187

Macdonald RM, Chandler MR, Mosse B (1982) The occurrence of bacterium-like organelles in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 90: 659

MacNeil T, Brill WJ, Howe M (1978a) Bacteriophage Mu-induced deletions in a plasmid containing the nif (N_2 fixation) genes of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 134: 821

MacNeil T, MacNeil D, Roberts GD, Supiano MA, Brill WJ (1978b) Fine-structure mapping and complementation ana-

lysis of nif (nitrogen fixation) genes of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 136: 253

MacNeil D, Supiano MA, Brill WJ (1979) Order of genes near nif in Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 138: 1041

MacNeil D, Howe MM, Brill WJ (1980) Isolation and characterization of lambda specialized transducing bacteriophages carrying Klebsiella pneumoniae nif genes. J Bacteriol 141: 1264

MacNeil D, Zhu J, Brill WJ (1981) Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: isolation and characterization of strains with nif-lac fusions. J Bacteriol 145: 348

MacNeil T, Roberts GP, MacNeil D, Tyler B (1982) The products of glnL and glnG are bifunctional regulatory proteins. Mol gen Genet 188: 325

Magasanik (1977) Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. Trends Biochem Sci 2: 9

Magasanik B (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann Rev Genet 16: 135

Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol 53: 159

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

Martínez-Arias A, Yost HJ, Casadaban M (1984) Role of an upstream regulatory element in leucine repression of the Saccharomyces cerevisiae LEU2 gene. Nature 307:740

Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 74: 560

Maxam AM, Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol 65: 449

McFarland N, McCarter L, Artz S, Kustu S (1981) Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed

of cistrons ntrB and ntrC: identification of their protein products. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2135

McNeil JB, Storms RK, Friesen JD (1980) High frequency recombination and the expression of genes cloned on chimeric yeast plasmids: identification of a fragment of 2μm circle essential for transformation. Current Genet 2: 17

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Tuite MF, Emtage JS, White S, Lowe PA, Patel T, Kingsman AJm Kingsman SM (1983) Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in Saccharomyces cerevisiae. Gene 24: 1

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Kingsman AJ, Kingsman SM (1985) Factors affecting heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae. Gene 33: 215

Mercereau-Puijalon O, Lacroute F, Kourilsky P (1980) Synthesis of a chicken ovoalbumin-like protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Gene 11: 163

Merrick M (1983) Nitrogen control of the nif regulon in Klebsiella pneumoniae: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. EMBO J 2: 39

Merrick M, Filser M, Dixon R, Elmerich C, Sibold L, Houmard J (1980) The use of translocatable genetic elements to construct a fine-structure map of the Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation (nif) gene cluster. J gen Microbiol 117: 509

Merrick M, Hill S, Hennecke H, Hahn H, Dixon R, Kennedy C (1982) Repressor properties of the nifL gene product in Klebsiella pneumoniae. Mol gen Genet 185: 75

Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. p 433

Miyajima A, Miyajima I, Arai KI, Arai N (1984) Expression of plasmid R388-encoded type II dihydrofolate reductase as a dominant selective marker in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 407

Miyanohara A, Toh-e A, Nozai C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara (1983) Expression of hepatitis B surface B antigen in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1

Montgomery DL, Leung DW, Smith M, Shalit P, Faye G, Hall BD (1980) Isolation and sequence of the gene for iso-2-cytochrome c in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 77: 541

Morris DW, Noti JD, Osborne FA, Szalay AA (1981) Plasmid vectors capable of transferring large DNA fragments to yeast. DNA 1: 27

Mortenson LE (1979) Regulation of nitrogen fixation. Curr top Cell Regulat 13: 179

Mortenson LE, Thorneley RNF (1979) Structure and function of nitrogenase. Ann Rev Biochem 48: 387

Murray AW (1985) Chromosome structure and behaviour. Trends Biochem Sci 10: 112

Murray AW, Szostak JW (1983a) Pedigree analysis of plasmid segregation of plasmid segregation in yeast. Cell 34:961

Murray AW, Szostak JW (1983b) Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature 305: 189

Nasmyth KA, Reed SI (1980) Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene Proc Natl Acad Sci USA 77: 2119

Nelson RG, Fangman WL (1979) Nucleosome organization of the yeast 2 μm DNA plasmid: a eukayotic minichromosome Proc Natl Acad Sci USA 76: 6515

Nester EW, Gordon MP Amasino RM, Yanofsky MF (1984) Crown-gall: a molecular and physiological analysis. Ann Rev Plant Physiol 35: 387

Nevins JR (1983) The patway of eukaryotic mRNA formation Ann Rev Biochem 52: 441

Nieva-Gómez D, Roberts GP, Klevikis S, Brill WJ (1980) Electron transport to nitrogenase in Klebsiella pneumoniae. Proc Natl Acad Sci USA 77: 2555

Ogren WL (1984) Photorespiration: patways, regulation and modification. Ann Rev Plant Physiol 35: 415

Olivares J (1982) Posibilidades de aplicación de la ingeniería

genética a la agricultura. Anal Edafol Agrobiol 41: 1113

Orr-Weaver T, Szostak JW, Rothstein RJ (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination Proc Natl Acad Sci USA 78: 6354

Ow DW, Ausubel FM (1983) Regulation of nitrogen by nifA gene product in Klebsiella pneumoniae. Nature 301: 307

Pahel G, Rothstein DM, Magasanik B (1982) Complex glnA-glnL --glnG operon of Escherichia coli. J Bacteriol 150: 202

Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandak V, Hohn T, Hohn B, Potkyrus I (1984) Direct gene transfer to plants EMBO J 3: 2717

Penn MD, Galgoci B, Greer H (1983) Identification of AAS genes and their regulatory role in general control of aminoacid biosynthesis in Sacchaomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2704

Pelsy F, Lacroute F (1984) Effect of ochre nonsense mutations on yeast URA1 mRNA stability. Current Genet 8: 277

Penn MD, Thireos G, Greer H (1984) Temporal analysis of general control of aminoacid biosynthesis in Saccahromyces cerevisiae: role of positive regulatory genes in initiation and maintenance of mRNA derepression. Mol cell Biol 4: 520

Pluta AF, Dani GM, Spear BB, Zakian VA (1984) Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from Oxytricha macronuclear DNA. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1475

Postgate JR (1972) The acetylene reduction test for nitrogen fixation. En "Methods in Microbiology" (Ed: JR Norris y PW Ribbons) Academic Press, Londres. pp 343-356

Postgate JR (1982) The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge.

Postgate JR (1984) New kingdom for nitrogen fixation (commentary) Nature 312: 194

Postgate JR, Krishnapillai V (1977) Expression of Klebsiella pneumoniae nif and his genes in Salmonella typhimurium J gen Microbiol 98: 379

Pühler A, Klipp W (1981) Fine structure analysis of the gene region for N_2 - fixation (nif) of Klebsiella pneumoniae En "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur" (Ed: H Bothe y A Trebst) Springer Verlag, Berlín. pp 276-286

Pühler A, Burkardt HJ, Klipp W (1979a) Cloning of the entire region for nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae on a multicopy plasmid vehicle in Escherichia coli. Mol gen Genet 176: 17

Pühler A, Burkardt HJ, Klipp W (1979b) Cloning in Escherichia coli the genomic region of Klebsiella pneumoniae which encodes genes responsible for nitrogen fixation. En "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance" (Ed: KN Timmis y A Pühler) Elsevier-North Holland, Amsterdam. pp 435-447

Quispel A, Kijne JW, Van Brussel AAN, Pees E, Wijffelman CA, Burggraaf AJP (1984) Recent ideas on the physiology of infection and nodulation. En "Advances in Nitrogen Fixation Research" (Ed: C Veeger y WE Newton) Nijhoff/ Junk/Pudoc Publishers, La Haya. pp 381-388

Ratzkin B, Carbon J (1977) Functional expression of cloned yeast DNA in E.coli. Proc Natl Acad Sci USA 74: 487

Reitzer LJ, Magasanik B (1983) Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR_I, the product of the glnG gene of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 80: 5554

Reitzer LJ, Magasanik B (1985) Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1979

Riedel GE, Ausubel FM, Cannon FC (1979) Physical map of chromosomal nitrogen fixation (nif) genes of Klebsiella pneumoniae. Proc Natl Acad Sci USA 76: 2866

Riesenberg D, Kari C (1981) Isolation and characterization of prototrophic relaxed mutants of Klebsiella pneumoniae. Mol gen Genet 181: 476

Riesenberg D, Erdei S, Kondorosi E, Kari C (1982) Positive involvement of ppGpp in derepression f the nif operon in Klebsiella pneumoniae. Mol gen Genet 185: 198

Roberts GP, Brill WJ (1980) Gene-product relationships of the nif regulon of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 144: 210

Roberts GP, Brill WJ (1981) Genetics and regulation of nitrogen fixation. Ann Rev Microbiol 35: 207

Roberts GP, MacNeil T, MacNeil D, Brill WJ (1978) Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 136: 267

Robson RL, Postgate JR (1980) Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. Ann Rev Microbiol 34: 183

Robson R, Kennedy C, Postgate J (1983) Progress in comparative genetics of nitrogen fixation. Can J Microbiol 29: 954

Rodríguez RL, Tait RC (1983) Recombinant DNA techniques: an introduction. Addison-Wesley, Reading, MA.

Roggenkamp R, Kustermann-Kuhn B, Hollenberg CP (1981) Expression of bacterial β-lactamase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci USA 78: 4466

Rose M, Casadaban MJ, Botstein D (1981) Yeast genes fused to β-galactosidase in Escherichia coli can be expressed normally in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 78: 2460

Rosenberg S, Barr PJ, Najarian RC, Hallewel RA (1984) Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of α_1-antitrypsin. Nature 312: 77

Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. Methods Enzymol 101: 202

Rothstein RJ, Lazarus CM, Smith WE, Baulcombe DC, Gatenby AA (1984) Secretion of a wheat α-amylase expressed in yeast. Nature 303: 662

Ruby SW, Szostak JW (1985) Specific Saccharomyces cerevisiae genes are expressed in response to DNA-damaging agents Mol cell Biol 5: 75

Ruby SW, Szostak JW, Murray AW (1983) Coning regulated yeast genes from a pool of lacZ fusions. Mehods Enzymol. 101: 253

Rymond BC, Zitomer RS, Schmüperly D, Rosenberg M (1983) The expression in yeast of the Escherichia coli galK gene on CYC1::galK fusion plasmids. Gene 25: 249

Sarokin L, Carlson M (1984) Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 2750

Scherer S, Davis RW (1979) Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4951

Schröder J, de Greve H, Hernalsteens JP, Leemans J, van Montagu M, Otten L, Schröder G, Willmitzer L, Schell J (1983) Ti plasmid-mediated gene transfer to higher plant cells. En "Plant Biotechnology" (Ed: SH Mantell y H Smith) Cambridge University Press, Cambridge. pp 313-326

Schubert KR, Evans HJ (1976) Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc Natl Acad Sci 73: 1207

Scott KE, Rolfe BG, Shine J (1981) Biological nitrogen fixation: primary structures of the Klebsiella pneumoniae nifH and nifD genes. J Mol Appl Genet 1: 71

Sentenac A, Hall B (1982) Yeast nuclear RNA polymerases and their role in transcription. En "The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression" (Ed: JN Strathern, EW Jones y JR Broach). Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. pp 561-606

Serfling E, Jasin M, Schaffner W (1985) Enhancers and eukaryotic gene transcription. Trends Genet 1: 224

Shah VK, Brill WJ (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. Proc Natl Acad Sci USA 74: 3249

Shah VK, Stacey G, Brill WJ (1983) Electron transport to nitrogenase: purification and characterization of pyruvate: flavodoxin oxidereductase, the nifJ product. J Biol Chem 258: 12064

Shah V, Ugalde RA, Imperial J, Brill WJ (1984) Molybdenum in nitrogenase. Ann Rev Biochem 53: 231

Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. Nature 310: 154

Sharma S, Godson G (1985) Expression of the major surface antigen of Plasmodium knowlesi sporozoites in yeast. Science 228: 879

Shatkin AJ (1985) mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. Cell 40: 223

Shaw CH, Leemans J, Shaw CH, van Montagu M, Schell J (1983) A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. Gene 23 315

Sherman F, Stewart JW (1982) Mutations altering initiation of translation of yeast iso-1-cytochrome c; contrast between the eukaryotic and prokaryotic initiation. En "The Molecular Bijolgy of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression" (Ed: JN Strathern, EW Jones y JR Broach) Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. pp 301-333

Shine J, Dalgarno L (1974) The 3'-terminal sequence of E.coli 16S ribosomal RNA: complementability to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc Natl Acad Sci USA 71: 1342

Shortle D, DiMaio D, Nathans D (1981) Directed mutagenesis Ann Rev Genet 15: 265

Shortle D, Haber JE, Botstein D (1983) Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative transformation. Science 217: 371

Silver PA, Keegan LP, Ptashne M (1984) Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. Proc Natl Acad Sci USA 81: 5951

Soldo AT, Brickson SA, Larin F (1983) The size and structure of the DNA genome of symbiont xenosome particles in the ciliate Parauronema acutum. J gen Microbiol 129: 1317

Spanos A, Sedgwick SG (1984) Plasmid cloning and expression of the E.coli polA$^+$ gene in S.cerevisiae. Current Genet 8: 333

Srienc F, Bailey JE, Campbell JL (1985) The effect of ARS1 mutants on chromosome stability in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 5: 1676

Stackebrandt E, Woese CR (1981) The evolution of prokaryotes. "Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution" (Ed: MJ Carlile, JF Collins y BEB Moseley) Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-31

Stiles J, Szostak J, Young A, Wu R, Consoul, Sherman F (1981) DNA sequence of a mutation in the leader region of the yeast iso-1-cytochrome c mRNA. Cell 25: 277

Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW (1979) Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature 282: 39

Stinchcomb DT, Thomas M, Kelly J, Selker E, Davis RD (1980) Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 77: 4559

Stinchcomb DT, Mann C, Davis RW (1982) Centromeric DNA from Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol 158: 157

StJohn RT, Johnston HM, Seidman C, Garfinkel D, Gordon JK, Shah VK, Brill WJ (1975) Biochemistry and genetics of Klebsiella pneumoniae mutant strains unable to fix N_2. J Bacteriol 121: 759

Storms RK, McNeil JB, Khandekar PS, An G, Parker J, Friesen JD (1979) Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic acid sequences in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 140: 73

Storms RK, Holowachuck E, Friesen EW (1981) Genetic complementation of the Saccharomyces cerevisiae leu2 gene by the Escherichia coli leuB gene. Mol cell Biol 1:836

Stotnicki ML, Rolfe BG (1978) Interaction between the fumarate reductase system of Escherichia coli and the nitrogen fixation genes of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 133: 415

Streicher SL, Shanmugan KT, Ausubel F, Morandi C, Goldberg RB (1974) Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. J Bacteriol 120: 815

Struhl K (1982) The yeast HIS3 promoter contains at least two distinct elements. Proc Natl Acad Sci USA 79: 7385

Struhl K (1983) The new yeast genetics. Nature 305: 391

Struhl K, Cameron JR, Davis RW (1976) Functional genetic expression of eukaryotic DNA in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA 73: 1471

Struhl K, Davis RW (1977) Production of a functional eukaryotic enzime in Escherichia coli: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerol phosphate dehydrogenase (his3). Proc Natl Acad Sci USA 74: 5255

Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S, Davis RW (1979) High frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1035

Sugawara N, Szostak JW (1983) Construction of specific chromosomal rearrangements in yeast. Methods Enzymol 101:269

Sundaresan V, Ausubel FM (1981) Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from Klebsiella pneumoniae. J Biol Chem 256: 2808

Sundaresan V, Ow DW, Ausubel FM (1983) Activation of Klebsiella pneumoniae and Rhizobium meliloti nitrogenase promoters by gln (ntr) regulatory proteins. Proc Natl Acad Sci USA 80: 4030

Suzuki K, Imai Y, Yamashita I, Fukui S (1983) In vivo ligation of linear DNA molecules to circular forms of the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 155: 747

Swaminathan MS (1982) Biotechnology reseach and the Third World agriculture. Science 218: 967

Szostak JW (1982) Cloning yeast telomeres on a yeast linear plamid. Cell 29: 245

Thireos G, Penn MD, Gree H (1984) 5'-untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. Proc Natl Acad Sci USA 81: 5096

Thoma F, Simpson RT (1985) Local protein-DNA interactions may determine nucleosome positions on yeast plasmids. Nature 315: 250

Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA 77: 5201

Toh-e A, Wickner RB (1981) Curing of the 2μ DNA plasmid from Saccaromyces cerevisiae. J Bacteriol 145: 1421

Torchia TE, Hamilton RW, Cano CL, Hopper JE (1984) Disruption of regulatory gene GAL80 in Saccharomyces cerevisiae: effects on carbon-controlled regulation in the galactose/mellibiose pathway genes. Mol cell Biol 4: 1521

Tschumper G, Carbon J (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. Gene 10: 157

Tubb RS (1974) Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella. Nature 251 : 481

Tuite MF, Dobson MJ, Roberts NA, King RM, Burke DC, Kingsman SM, Kingsman AJ (1982) Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J 1: 603

Tyler B (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann Rev Biochem 47: 1127

Ueno-Nishio S, Backman KC, Magasanik B (1983) Regulation at the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J Bacteriol 153: 1247

Ueno-Nishio S, Mango S, Reitzer LJ, Magasanik B (1984) Identification and regulation of the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of Escherichia coli. J Bacteriol 160: 379

Upchurch RG, Mortenson LE (1980) In vivo energetics and control of nitrogen fixation: changes in the adenylate energy charge and adenosine 5-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate ratio of cells during growth on dinitrogen versus growth on ammonia. J Bacteriol 143: 274

Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature 289: 347

Veeger C, Laane C, Scherings G, Matz L, Haaker H, Zeeland Walbers LV (1980) Membrane energization and nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii and Rhizobium leguminosarum. En "N_2-fixation" Vol I (Ed: WE Newton y WH Orme-Johnson) Universsity Park Press, Baltimore. pp 111-137

Veeger C, Haaker H, Laane C (1981) Energy transduction and nitrogen fixation. En "Current Perspectives in Nitro - gen Fixation" (Ed: AH Gibson y WE Newton) Australian Academy of Science, Canberra. pp 101-104

Vetter D, Andrews BJ, Roberts-Beatty L, Sadowski PD (1983) Site-specific recombination of yeast 2 μm DNA in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 80: 7284

Vose PB (1983) Developments in nonlegume N_2 -fixing systems. Can J Microbiol 29: 837

Walmsley RW, Chan CSM, Tye BK, Petes TD (1984) Unusual DNA sequences associated with the needs of yeast chromosomes. Nature 310: 157

Watts F, Castle C, Beggs J (1983) Aberrant splicing of Drosophila alcohol dehydrogenase transcripts in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J 2: 2085

Webster TD, Dickson RC (1984) Direct selection of Saccharomyces cerevisiae resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn 903. Gene 26: 243

Whiteway MS, Ahmed A (1984) Recombinational instability of a chimeric plasmid in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 195

Wickens M, Stephenson P (1984) Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3'-end formation. Science 226: 1045

Winston F, Chumley F, Fink GR (1983) Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. Methods Enzymol 101: 211

Wood CR, Boss MA, Kenten JH, Calvert JE, Roberts, NA, Emtage JS (1985) The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast. Nature 314: 446

Wright C, Zitomer RS (1984) A positive regulatory site and a negative regulatory site control the expression of the Saccharomyces cerevisiae CYC7 gene. Mol cell Biol 4: 2023

Yamada T, Sakaguchi K (1980) Nitrogen fixation associated with a hostspring gree alga. Arch Microbiol 124: 161

Yamada T, Sakaguchi K (1981) Polyethyleneglycol-induced uptake of bacteria into yeast protoplasts. Agric Biol Chem 45: 2301

Yocum RR, Hanley S, West JR, Ptashne M (1984) Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae. Mol cell Biol 4: 1985

Zakian, VA, Scott JF (1982) Construction, replication and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from Saccharomyces cerevisiae chromosomal DNA. Mol cell Biol 2: 221

Zakian VA, Brewer BJ, Fangman WL (1979) Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during S phase. Cell 17: 923

Zalkin H, Yanofsky C (1982) Yest gene TRP5: structure, function, regulation. J Biol Chem 257: 1491

Zambryski P, Goodman HM, Van Montagu M, Schell J (1983a)

Agrobacterium tumor induction. En "Mobile Genetic Elements" (Ed: JA Shapiro) Academic Press Orlando. pp 505-535

Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983b) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J 2: 2143

Zamir A, Maina CV, Fink GR, Szalay AA (1981) Stable chromosomal integration of the entire nitrogen fixation gene cluster from Klebsiella pneumoniae in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3496

Zaret KS, Sherman F (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28: 563

Zhu J, Brill WJ (1981) Temperature sensitivity of the regulation of nitrogenase synthesis by Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol 145: 1116

Zitomer RS, Hall BD (1976) Yeast cytochrome c messenger RNA: in vitro translation and specific immunoprecipitation of the CYC1 gene product. J Biol Chem 251: 6320

Zitomer RS, Walthall DA, Rymond BC, Hollenberg CP (1984) Saccharomyces cerevisiae ribosomes recognize non-AUG initiation codons. Mol cell Biol 4: 1191