

CLONACIÓN DE GENES DE rRNA EN CROMOSOMAS ARTIFICIALES

Humberto Monreal, Benito Pereyra, Blanca Rivera, Blanca Sánchez y Arévalo Sigifredo.[?]

[?] Facultad de Ciencias Químicas, UACH, Cd. Universitaria s/n, CP31170, Chih. Chih.

Fax: (01614) 414-4492; E-mail: sareval@uach.mx

Palabras clave: *S. cerevisiae*, rRNA, cromosomas artificiales

Introducción. En *S. cerevisiae* los operones de rDNA están repetidos en tandem con la misma orientación de transcripción (1). Cada operón del precursor rRNA 35S contiene su promotor y un enhancer que incluye secuencias involucradas en la terminación de la transcripción. La expresión de uno o dos genes se ha estudiado en cromosomas y en construcciones de minigenes, sin embargo aún no se ha propuesto un sistema experimental que permita estudiar el efecto de las orientaciones de transcripción en un contexto cromosomal (2).

El objetivo del trabajo fue construir cromosomas artificiales de levaduras como un sistema modelo para el análisis transcripcional de concatenados de genes mutantes de rRNA unidos en diferentes orientaciones de transcripción.

Metodología *S. cerevisiae* W303a (Mat/a, ade2-1, his3-11, leu2-3-112, trp1, ura3-1, can1-100); *E. coli* DH5[?] /pBRrDNA; *E. coli* DH5[?] /pYAC3.

La enzima BamHI se utilizó para separar el fragmento HIS del vector pYAC3 (3) y generar extremos teloméricos; el sitio SalI se utilizó para la clonación y posteriormente el vector fue defosforilado. Fragmentos de rDNA de levaduras de 13.4 Kb del plásmido pBRrDNA (SalI/XhoI) se purificaron, fueron autoligados para obtener concatenados y fueron clonados en el sitio SalI del vector. Con esta mezcla de ligamiento (pYACrDNAs) se transformaron esferoplastos de levaduras y las cepas candidatas a obtener cromosomas artificiales, se crecieron en medios selectivos para identificar los fenotipos Trp⁺, Ura⁺, His⁻.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 67 cepas de cepas transformadas con cromosomas artificiales, con fenotipos estables Ura⁺, Trp⁺, His⁻. Cada construcción contenía un concatenado de genes completos de rRNA mutantes de levaduras unidos en orientaciones de transcripción aleatorias. En medio de cultivo selectivo el 41% presentó tiempos de duplicación semejantes a los de la cepa transformada con el vector (3:00 hrs); el 34% mayores y el 4.5% menores. En medio no selectivo, la cepa huésped presentó una Td de 1:31 hrs; de las transformadas el 45, 8 y el 15% presentaban Tds semejantes, mayores y menores a la cepa control respectivamente.

Las diferencias en los Tds probablemente se deben a que las copias extras de rDNA están afectando la fisiología de la célula. El fenotipo estable de las cepas sugiere la presencia de cromosomas artificiales, sin embargo aun desconocemos el número de repetidos de rDNA en el inserto, así como las orientaciones de transcripción de los operones. Se ha reportado que mientras mayor es el tamaño, mejor es la eficiencia de transformación y la estabilidad de los cromosomas artificiales (3), por lo que esperamos que el concatenado contenga un alto número de genes. Para conocer el tamaño de los pYACrDNAs se desarrollará electroforesis en campos pulsados; la presencia de genes de rDNA mutante en diferentes orientaciones de transcripción se analizará por PCR. Las eficiencias relativas de transcripción de los rRNAs 18S silvestres y mutantes se analizarán por hibridación tipo Northern con sondas específicas.

Conclusiones. La importancia del trabajo radica en dos aportaciones: i) ofrece una colección de cepas de levaduras transformadas con cromosomas artificiales conteniendo operones completos para genes de rRNA. Este sistema permitirá analizar la biogénesis y funcionalidad de ribosomas en levaduras; ii) se propone un procedimiento experimental para lograr la formación de concatenados de fragmentos de DNA hasta de 13 Kb, unidos en diferentes orientaciones, e introducirlos en levaduras por medio de un vector tipo cromosoma artificial. El procedimiento podría permitir aumentar la dosis génica y probablemente la expresión de algún otro gen exógeno en levaduras.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido realizado con financiamiento de CONACYT con Referencia Num. 35354-M, a quien se le agradece el apoyo y la beca otorgada a H.M.

Bibliografía.

- 1.- Petes, T.D. and D. Botstein; (1977); Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA genes; *Cell*; **74**; 5091.
- 2.- Johnson S. and J.R. Warner; (1989); Unusual enhancer function in yeast rRNA transcription; *Molecular and Cellular Biology*; **9-11**; 4896.
- 3.- Burke T.D and cols.; (1987); Cloning of large segments of exogenous DNA in to yeast by means of artificial Chromosome vectors; *Science*; **236**; 806.