

Micromanipulación. Análisis genético de las levaduras

Ana María Rodríguez Torres.

Dpto. de Biología Celular y Molecular. Area de Bioquímica.
Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña.

Los micromanipuladores han tenido mucho éxito en todas las ramas de la Medicina y Biología donde es necesario llevar a cabo operaciones quirúrgicas o químicas sobre animales vivos, organismos vegetales, y en procesos que solo pueden observarse a través de un microscopio. Con el concepto de micromanipulación se entiende la manipulación de objetos minúsculos. Las aplicaciones sobre todas las áreas de la Ciencia y Tecnología son muy diversas como: Microcirugía; microinyecciones de biomoléculas; inseminación artificial; producción de cultivos unicelulares; aislamiento de virus, bacterias, órganos, parte de órganos ó células; medidas electrofisiológicas, etc. En el área de la Biología, se puede incluir el análisis genético de las levaduras, ya que es importante conocer la localización cromosómica de un nuevo gen ya identificado, una mutación o un fragmento de DNA recientemente clonado.

Micromanipuladores

Los micromanipuladores se definen como brazos artificiales de manipulación de objetos minúsculos, por lo que están acoplados a diferentes tipos de microscopios. En general constan de un sistema de manipulación simple o doble, según la técnica a utilizar, que puede estar automatizado o no, sobre un material que sólo puede observarse bajo grandes aumentos. A su vez puede estar conectado a una pantalla de un ordenador que permite observar con mayor claridad la manipulación que está realizándose, e incluso procesar los datos y guardarlos. Así también se acoplan cámaras fotográficas, vídeos, etc. Constan fundamentalmente de un microscopio con unos mangos de sujeción de micropipetas de inyección, o mani-

pulación en general; a su vez pueden estar conectados a un motor que automatiza sus movimientos; un sistema de microinyección; un portaobjetos controlado por un microprocesador, que nos indica las coordenadas de posición de las células a estudio; así como la conexión a un ordenador, cámara fotográfica, vídeo, etc.

Las micro-herramientas de trabajo son principalmente micropipetas estiradas, hechas de capilares de vidrio con un diámetro de 1 mm. hasta conseguir agujas tan finas como de 1 μm . de diámetro. Estas se insertan en unos mangos cuya firmeza asegura un movimiento suave de microinyecciones o extracciones. Como consecuencia de su fragilidad por un uso continuo, existen unidades termoeléctricas de estiramiento de capilares para obtención de agujas de diferente diámetro, cuya finalidad es la reproducción de las mismas.

Análisis genético de las levaduras

El estudio de la genética de *Saccharomyces cerevisiae* fué comenzado por Winge y colaboradores en el laboratorio Carlsberg en Dinamarca. En 1935, establecieron el ciclo celular haploide-diploide. Las células crecen de forma vegetativa por división celular mitótica. Las cepas de tipo salvaje son haploides durante la mayor parte de su ciclo de vida y existen como uno de los 2 tipos de células o tipos de fusión celular (mating), llamados "a" y "alfa". No se llaman masculino y femenino, o +/-, porque el proceso de fusión celular es simétrico. Como se sabe, toda la información de ambos padres, tanto la cromosómica como la citoplasmática (no-cromosómica), es aportada a los cigotos. En medios limitantes de nutrientes las células haploides conjugan (se fusionan) con células de diferente tipo de fusión celular o entran en la fase estacionaria. La conjugación conlleva la formación de un tipo de célula diploide; cuando se le priva de nutrientes entra en la fase de meiosis y forma una asca que contiene 4 esporas.

Cuando las células se ponen en contacto en un medio rico, cada una detiene el ciclo celular de la otra cerca del punto de inicio de la vía de producción constitutiva de una feromona de fusión. La producida por las células "alfa" se llama hormona "alfa" y tiene la secuencia (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr). La producida por las células "a" se llama hormona "a" y tiene la secuencia (Lys-Gly-Val-Phe-Trp-Ala-Asx-Pro). La feromona alfa, tiene una función relacionada con el sexo en levaduras, y es similar en secuencia a la hormona hipotalámica, hormona liberadora de gonadotropinas (Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂).

El tipo de fusión celular que se expresa en una cepa de levadura depende de qué información esté presente en el locus MAT del cromosoma III. Mientras que la mayoría de las cepas de laboratorio mantienen de forma estable su tipo de fusión celular, las cepas salvajes alternan rápidamente entre "a" y "alfa". Este fenómeno es debido a la presencia de copias extra de información de tipo de fusión celular "a" y "alfa" en sitios distantes del locus MAT en el cromosoma III. Estas secuencias son frecuentemente incorporadas al locus MAT con eliminación

de las secuencias que residían allí previamente. El gen HO necesario para la reacción de transposición, se pierde o es defectuoso en la mayoría de las cepas de laboratorio, de manera que estas cepas tienen un tipo de fusión celular estable. Este control de “diferenciación” celular por reordenación o transposición de DNA es análogo a procesos similares en eucariotas superiores.

Las células haploides de tipo de fusión celular opuesto, aglutinan en una reacción específica y fusionan para formar una célula heterocariótica (Heterokaryon) transitoria que es una célula simple con 2 núcleos. En el proceso de fusión celular normal, ésta es seguida rápidamente por fusión nuclear (Karyogamy) para producir un célula diploide (el cigoto). Los cigotos pueden ser reconocidos bajo el microscopio y directamente entresacados de un mezcla de fusión celular con una aguja de micromanipulador. Más comunmente, se selecciona células diploides de la mezcla de fusión celular usando marcadores auxótrofos.

Las células diploides formadas pueden crecer indefinidamente por mitosis y, en cualquier punto, ser inducidas a experimentar meiosis y formación de esporas por alteración de las condiciones de cultivo. Específicamente, se usa Acetato como fuente de carbono (usualmente 1% de Acetato potásico), y se incluye un poco o nada de Dextrosa (0,05% o menos) o fuente de nitrógeno (0,1% de extracto de levadura o menos) ya que la meiosis y esporulación son inhibidas por los niveles usuales de dextrosa o fuente de nitrógeno. El proceso global lleva de 12 a 24 horas en medio líquido, pero de 24 a 48 horas en placas, y cada núcleo diploide experimenta una meiosis típica produciendo 4 núcleos haploides, cada uno de los cuales origina una espora. Estas 4 esporas permanecen dentro de la que era la pared de la célula diploide; esta pared se llama asca, y las esporas se llaman ascosporas.

El control nutricional de la decisión mitosis-meiosis es mediado por el sistema protein-kinasa dependiente de la AMP-Adenilato ciclasa. Específicamente, el AMP cíclico es necesario para comenzar el ciclo celular y actúa en G1 siempre antes del punto de acción de la hormona “alfa”. Por otro lado, el AMP cíclico debe estar ausente para que las células entren en meiosis. La decisión mitosis-meiosis en levaduras es bastante similar a la decisión crecimiento-diferenciación en eucariotas superiores. Quizás por ello no debería sorprendernos que las levaduras tengan proteínas homólogas a los oncogenes “RAS” de los mamíferos. Estas proteínas en levaduras RAS están envueltas en el control de la producción de AMP cíclico y por lo tanto en modular la decisión de crecimiento-diferenciación en levaduras. Actúan como estimuladoras de adenilato ciclasa dependiente de GTP.

Las 4 ascosporas son rutinariamente separadas unas de otras usando una aguja unida a un micromanipulador mientras se observa el proceso bajo un microscopio. Este proceso Disección se lleva a cabo bajo 250X aumentos. Para tener suficiente espacio entre el objetivo y la superficie de la placa de agar sobre la que se va a realizar la disección, es aconsejable usar un objetivo 10X ó 15X con un par de binoculares 25X ó 20X ó 15X. El campo de trabajo tiene

que ser desplazado a lo largo de una sección, y por ello es útil ser capaz de volver al sitio donde previamente se hizo la disección. Esto puede ser realizado sin quitar los ojos de los binoculares si el campo de trabajo tiene manipuladores que se mueven 1 mm por vuelta. Un micromanipulador unido directamente al campo de trabajo de un microscopio reduce los efectos de vibraciones próximas y reduce la probabilidad de mover accidentalmente la aguja fuera del campo.

Las 4 esporas de cada tétrada son diseccionadas aparte y situadas en una zona definida de una fina placa de agar o agar conteniendo medio rico (YPD). Esto puede hacerse (1) directamente sobre una placa de Petri invertida sobre la aguja de disección ó (2) plancha de agar sobre una placa de vidrio. En el último caso, la plancha debe ser transferida a una placa YPD para germinación y crecimiento. Las esporas clones pueden ser luego [caso (1)] replicadas directamente a varios medios para comprobación ó [(1) ó (2)] recogidas e inoculadas en placa YPD para crecimiento y posterior comprobación.

Todos los marcadores utilizados en el cruzamiento son generalmente analizados por resiembra en medios convenientes y realizando tests de complementación.

Esporulación y disección

Antes de comenzar el experimento, es importante tomar nota de los siguientes puntos. Los cruzamientos deben llevarse a cabo: a) Con células recientemente inoculadas, es decir, que estén creciendo activamente. b) Unos 2 ó 3 días antes de la disección, los cruzamientos ya maduros (de 2 ó 3 días) deberán colocarse en nevera a 4°C, de otra manera las ascas se romperían espontáneamente, y así pueden guardarse a esta temperatura durante unos pocos días.

Tradicionalmente, la formación de esporas en cultivos diploides se lleva a cabo simplemente transfiriéndolos a un medio carencial tal como acetato potásico. Esto da lugar a la formación de ascas de 4 esporas. Existen variaciones según la especie en el uso de medios líquidos en vez de sólidos; de esporular a 21°C en vez de 27°C; etc.

En orden a facilitar el aislamiento de las esporas, éstas tienen que ser extraídas de la pared del asca. Para digerirla, se sitúa un inóculo del medio de esporulación en un tubo de ensayo conteniendo una dilución de 1:40 de enzima, esterilizada por filtración, Glusulasa. Este es un método simple y rápido de obtener esporas libres para el propósito de diseccionar la tétrada. Existen numerosos métodos alternativos usados cuando el objetivo es la obtención de grandes cantidades de esporas simples, entre los que se encuentran el tratamiento por el calor, la parafina y la electroforesis para separar células vegetativas de esporas.

Las tétradas son diseccionadas con la ayuda de una aguja de vidrio muy fina montada sobre un micromanipulador. La operación de este instrumento requiere un considerable entrenamiento y experiencia, pero con el tiempo las tétradas pue-

den ser diseccionadas con relativa facilidad. Luego se permite a las esporas simples germinar en la superficie del agar sobre la cual han sido diseccionadas. Luego, dependiendo de lo que se desee, las esporas conteniendo el genotipo apropiado pueden ser fusionadas a otras para construir una nueva cepa.

Un posible procedimiento con los pasos a seguir se resume de la siguiente manera:

1° PASO: Incubación de las cepas parentales en placas con medio YPD al 0,5% (Bactopeptona 0,5%, Yeast Extract 1%, Dextrosa 0,5 % y Bacto-agar 1,5%) durante la noche a 25-30°C.

2° PASO: Mezcla de pequeñas cantidades de las cepas parentales juntas en una placa YPD, y dejarlas crecer de 1 a 2 días a 25-30°C.

3° PASO: Selección de diploides en placa selectiva, es decir, medio completo con falta de al menos 2 aminoácidos, uno de ellos ausente en una de las cepas pero presente en la otra, y viceversa con respecto al segundo aminoácido, de manera que solamente puedan crecer células diploides.

4° PASO: Después de 2 días de incubación, siembra de las células diploides en placas de esporulación (9,8 gr. de Acetato potásico, 2,5 gr. de Yeast Extract, 1 gr. de Dextrosa y 20 gr. de Bactoagar, para un litro de mezcla). Se dejan en la estufa a 30°C durante 3 a 5 días, y ya están listas para su disección.

5° PASO: Se prepara Glusulasa, al 0,5% de concentración final, con el fin de romper las paredes celulares y de las ascas, y se añade un gran inóculo de las células esporuladas. Se dejan durante 10 minutos a temperatura ambiente, y antes de comenzar la disección se observan al microscopio para ver si la pared de las ascas está rota y así poder separar las esporas. Si es así, se detiene la reacción añadiendo 0,5 ml. de agua estéril y se coloca en hielo.

6° PASO: El siguiente paso consiste ya en el proceso de disección de las esporas una a una, y su colocación en una placa de YPD separadas a una distancia de 1mm ya estandarizado en el microscopio de observación, para poder retornar al punto de partida donde está situada el asca con las esporas. Luego se coloca la placa en un incubador a 25-30°C, durante al menos 2 días.

7° PASO: Una vez que las esporas (células haploides) han crecido en la placa YPD se replican en placas con diferentes medios, con el fin de estudiar el genotipo de cada una a través de su fenotipo.

Finalmente se realiza una tabla con todas las observaciones, espora a espora y tétrada a tétrada, de manera que cada colonia (espora) deberá ser estudiada para cada marcador, incluyendo el tipo de fusión celular (mating). Asimismo, debe de observarse el tipo de segregación, la posibilidad de segregación conjunta de varios marcadores (lo que nos indicaría que su posición física está en el mismo cromosoma), etc. También se puede calcular la distancia genética usando la fórmula que se reseña en el apartado siguiente. Tétradas en las cuales sólo han crecido 3 de las esporas también pueden ser incluídas en el análisis, ya que se puede deducir el genotipo de la cuarta espora.

Análisis de tétradas

El análisis de tétradas es el método de elección para la mayoría de los análisis genéticos. Si los padres haploides de un cruzamiento difieren en algún rasgo determinado por un gen simple cromosómico, los diploides formados por fusión celular serán heterocigotos en aquel locus. La mecánica de la meiosis implica que 2 de los 4 núcleos formados tendrán el genotipo de uno de los padres y 2 tendrán el genotipo del otro padre. Esto se llama segregación 2:2 (ó 2+:2-). Desviaciones de la segregación 2:2 pueden ser debidas a control poligénico del rasgo examinado, y la conversión génica, recombinación mitótica durante el crecimiento del diploide, herencia citoplasmática, o aneuploidía. La precisa segregación 2:2 de genes individuales permite deducir con frecuencia el genotipo de una espora a partir del de las otras tres en una tétrada.

Es esencial recordar que el factor determinante de la segregación de un marcador en un núcleo hijo es la conexión de las copias del marcador a sus respectivos centrómeros. Recombinaciones que ocurren entre un marcador y su centrómero pueden cambiar la conexión, pero recombinaciones que ocurren en posición distal al centrómero no afectan la conexión.

Si los padres en un cruzamiento difieren en 2 genes cromosómicos simples (como AB x ++) y si estos 2 genes están completamente separados uno del otro o de sus respectivos centrómeros, las distribuciones de los alelos mutante y tipo salvaje de los 2 genes son al azar con respecto uno del otro. Todos los posibles patrones de segregación relativa son como sigue:

AB	AB	AB	A+	A+	A+
AB	A+	A+	AB	AB	A+
++	+B	++	+B	++	+B
++	++	+B	++	+B	+B
—	—	—	—	—	—
PD	T	T	T	T	NPD

El primero de estos tipos de tétradas tiene solo 2 tipos de esporas llamados A B y ++. Esta es la llamada tétrada-ditipo. Ya que estos 2 tipos de esporas tienen los mismos genotipos que las cepas parentales con respecto a estos 2 marcadores, es llamada Tétrada Ditipo Parental (PD). La última tétrada también tiene solamente 2 tipos de esporas con respecto a los marcadores A y B, A+ y +B. Como estos dos son genotipos recombinantes comparados a los parentales, la tétrada se llama Tétrada Ditipo No Parental (NPD). Cada una de las otras tétradas tiene los 4 genotipos, 2 parentales (AB y ++) y 2 recombinantes (A+ y +B), y así son llamadas Tétradas Tetratipo (T). Como se puede ver, la relación de tétradas PD:NPD:T es 1:1:4 en este caso. Existen desviaciones de esta relación indicando ó (1) unión de A y B, en cuyo caso PD es mayor que NPD, ó (2) unión de ambos A y B, a sus respectivos centrómeros, en cuyo caso PD:NPD:T::1:1:<4.

Si 2 marcadores B y C están bastante cerca uno del otro, la mayoría de las tétradas serán PD. Un cruzamiento simple entre B y C cambia el tipo PD en T. Para una segunda recombinación entre B y C, el resultado depende de qué par de cromátidas estaban involucradas en el primer cruzamiento. Sólo esta clase de cruzamiento doble entre cromátidas da lugar a un tétrada NPD. A la inversa, una tétrada NPD implica que al menos 2 cruzamientos han ocurrido entre B y C, asumiendo que están en el mismo cromosoma. El otro posible segundo intercambio se realizaría produciendo tétradas tetratipo (doble cruzamiento triple-hebra), o produciendo un parental ditipo (doble cruzamiento doble-hebra) y revertiendo el efecto del primer cruzamiento. Para llegar a una fórmula simple para distancias genéticas, se asume que no ocurren más de 2 cruzamientos en un intervalo corto y se basa en que (1) las tétradas NPD son un cuarto del total de los dobles cruzamientos y (2) las tétradas T son la mitad de las tétradas doblemente cruzadas, un número igual a 2 veces las tétradas NPD.

Así, en el intervalo entre B y C, el total de cruzamientos es igual:

$$1 \times \text{cruzamientos simples} + 2 \times \text{dobles cruzamientos} =$$

$$1 \times (T - 2 \text{ NPD}) + 2 \times (4 \text{ NPD}) = T + 6 \text{ NPD}$$

Ya que un cruzamiento produce sólo la mitad de esporas recombinantes y esporas parentales, el porcentaje de recombinación (es decir, el porcentaje de hijos que son recombinantes en el caso límite de distancias muy cortas) es igual a:

$$\frac{100 \times \text{Cruzamientos dobles}}{2 \text{ (Tétradas totales)}} = \frac{50 (T + 6 \text{ NPD})}{(PD + NPD + T)}$$

Las unidades son centiMorgans (cM). Esta fórmula deriva asumiendo que ocurren sólo uno o dos cruzamientos en el intervalo B-C. Esto es bastante erróneo al aumentar la distancia genética. Fórmulas más precisas han sido publicadas y su representación gráfica es una curva que relaciona cM con unidades de mapa linealmente aditivas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-BILINSKI, C.A., RUSSELL, I. & STEWART, G.G. (1986a). Analysis of sporulation in brewer's yeast: induction of tetrad formation. *Journal of the Institut of Brewing*.
- 2.-DeFEO-JONES, D., SCOLNICK, E.M., KOLLER, R. & DHAR, R. (1983). ras-Related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 306, 707-709.
- 3.-FOWELL, R.R. (1969). The Yeasts, Vol.1: Sporulation and hybridization of yeasts, A.H. Rose and J.S. Harrison (eds.), 303-385. London Academic Press.
- 4.-GALLWITZ, D., DONATH, C. & SANDER, C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human C-has/bas protooncogene product. *Nature* 306, 704-707.
- 5.-HERSKOWITZ, I. & OSHIMA, Y. (1981). Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating type and mating type interconversion. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance* (J. N., Strathern, E. W. Jones, and J.R. Broach, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 181-209.
- 6.-JONES, R.M., RUSSELL, I. & STEWART, G.G. (1987). Classical genetic and protoplast fusion techniques in yeast. *Yeast Biotechnology*, Allen & Unwin, London, pp. 55-79.
- 7.-LOUMAYE, E., THORNER, J. & CATT, K.J. (1982). Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: Evolutionary conservation of a reproductive hormone? *Science* 218, 1323-1325.
- 8.-MATSUMOTO, K., UNO, I., OSHIMA, Y. & ISHIKAWA, T. (1982). Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.79, 2355-2359.
- 9.-MATSUMOTO, K., UNO, I. & ISHIKAWA, T. (1983b). Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Exp. Cell. res.* 146, 151-161.
- 10.-MATSUMOTO, K., UNO, I. & I, T. (1985). Genetic analysis of the role of cAMP in yeast. *Yeast* 1, 15-24.
- 11.-MA, C. & MORTIMER, R.K. (1983). Empirical equation that can be used to determine genetic map distances from tetrad data. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1886-1887.
- 12.-MORTIMER, R.K. & HAWTHORNE, D.C. (1975). Genetic mapping in yeast. *Methods Cell Biol.* 11: 221-233.
- 13.-MORTIMER, R.K. & SCHILD, D. (1980). Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 44, 519-571.
- 14.-PERKINS, D.D. (1949). Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* 34, 607-626.

- 15.-SNOW, R. (1979). Maximum likelihood estimation of linkage and interference from tetrad data. *Genetics* 92, 231-245.
- 16.-STRATHERN, J.N., JONES, E.W. & BROACH, J.R., Eds. (1981). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 2 vols. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 17.-TATCHELL, K., ROBISON, L.C. & BREITENBACH, M. (1985). RAS2 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 3785-3789.
- 18.-TODA, T., UNO, I., ISHIKAWA, T., POWERS, S., KATAOKA, T., BROECK, D., CAMERON, S., BROACH, J., MATSUMOTO, K. and WIGLER, M. (1985). In *Yeast*, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- 19.-UNO, I., MATSUMOTO, K. and ISHIKAWA, T. (1982). Characterization of cyclic AMP- requiring yeast mutants altered in the regulatory subunit of protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257, 14110-14115.
- 20.-WICKNER, R.B. (1991). *Methods in classical genetics. Biotechnology handbooks 4: Saccharomyces*, 101-147.
- 21.-WICKNER, R.B. (1979). Mapping chromosomal genes of *Saccharomyces cerevisiae* using an improved genetic mapping method. *Genetics* 92, 803-821.
- 22.-WINGE, O. (1935). On haplophase and diplophase in some *Saccharomycetes*. *Comptes Rendus du Travail de la Laboratoire Carlsberg, Série de Physiologie* 21, 77-111.