

3.1.8. Análisis de la inestabilidad del cromosoma XII

Durante el crecimiento vegetativo, se observaron cambios en la movilidad de las bandas correspondientes al cromosoma XII, tanto en la cepa DC5 como en 5 de los 14 derivados F1 analizados. Dicha variabilidad se dio tanto en cepas estables (ej, DC5-9D) como inestables (ej, DC5-8C), siendo muy poco frecuente o ausente en determinadas cepas inestables (ej, DC5-1D o DC5-1B), así como en alguna cepa estable (ej, DC5-8B) (figura 3-6 y tabla 3-2). Del conjunto de 32 derivados F2 analizados tan sólo 10 presentaban dichas variaciones en crecimiento mitótico y de una forma muy restringida (tabla 3-2).

Por hibridización con sondas específicas se comprobó que las bandas de menor movilidad electroforética correspondían al cromosoma XII (Figuras 3-7A y 3-7B). Estas bandas son muy polimórficas entre diversos clones de la cepa DC5 y sus derivados meióticos. En la mayoría de los casos, se observaron dos variantes de tamaño para el cromosoma XII, aunque con excepciones (figura 3-2A y 3-2B).

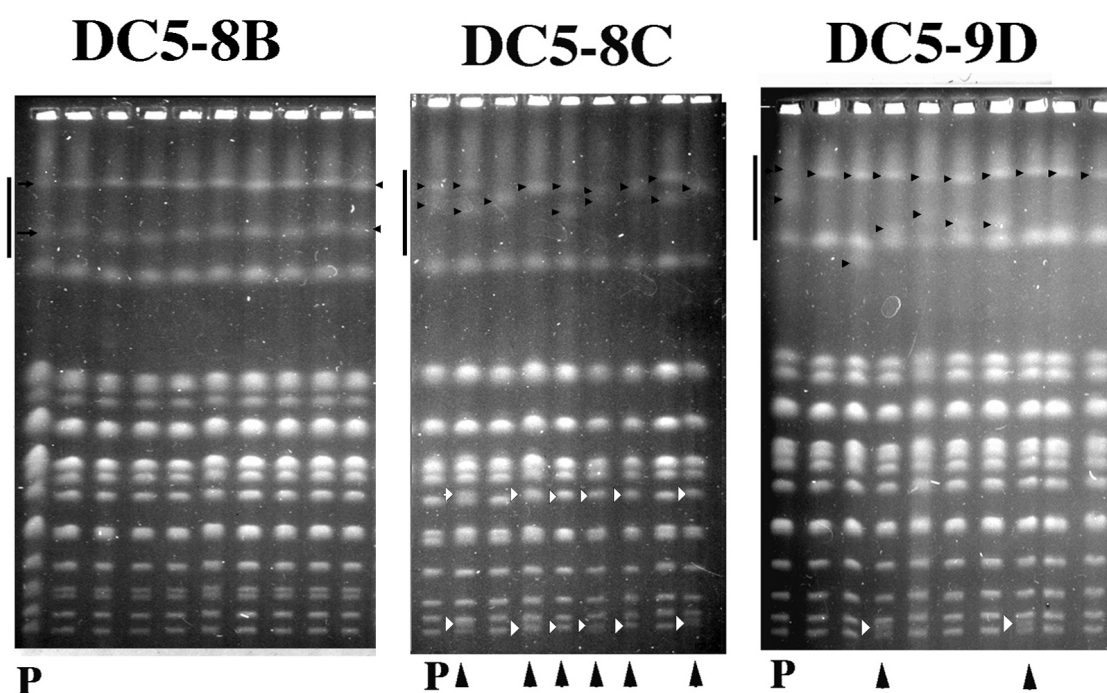


Figura 3-6. Análisis de la inestabilidad del cromosoma XII. En la figura puede observarse la variación clonal del cromosoma XII (parte superior del gel, indicada por flechas negras) en crecimiento mitótico. Obsérvese como las cepas DC5-8B y DC5-9D presentan poca variación en el resto del cariotipo, aunque la variación clonal del cromosoma XII en esta última es muy evidente. La cepa DC5-8C presenta una enorme variación en el cromosoma XII y en el resto del genoma.

El conjunto de resultados indicaba que la inestabilidad genética del cromosoma XII parecía ser independiente de la presentada por el resto de cromosomas, por lo que se realizó un análisis estadístico con el objeto de contrastar esta observación.

El análisis estadístico mediante un test de contingencia 2x2 de la distribución existente entre derivados estables ($P_i > 0.5$) e inestables ($p_i < 0.5$) y la presencia de polimorfismos/variaciones cromosómicas del cromosoma XII en ambos tipos de cepas (tablas 3-2 y 3-3), mostró como no existía una correlación entre ambos fenotipos con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, la inestabilidad del cromosoma XII no fue incluida en el cálculo de frecuencias de reorganización, ni se consideró a las variaciones de este cromosoma como un indicador de inestabilidad cariotípica, al considerar ambos fenómenos como genéticamente independientes.

3.1.9 Caracterización estructural del cromosoma XII

El cromosoma XII contiene los *clusters* de rDNA, cuya variación ha sido descrita como el mecanismo responsable de la variación de tamaño para dicho cromosoma en determinadas cepas de levadura (Chindamporn *et al.*, 1993; Pasero *et al.*, 1993). Se realizó la caracterización estructural de estas variantes del cromosoma XII en dos derivados F1 de DC5: el derivado DC5-8C, que contenía dos variantes del cromosoma XII las cuales además variaban clonalmente, y el derivado DC5-7C, el cual contenía una única banda para el cromosoma XII, la cual presentaba el mismo tamaño en todos los clones (figura 3-7). La metodología empleada consistió en la digestión de bloques de campo pulsante de ambas cepas (figura 3-7B) con *Pst*I y *Xho*I, enzimas que liberan el conjunto de *clusters* de rDNA al no tener dianas internas en ellos. La hibridación con una sonda específica de rDNA dio como resultado una banda de unos 1100 Kb en los dos clones analizados y, en el caso de la cepa con dos variantes (DC5-8C), una banda adicional de unos 700 Kb, probablemente originada a partir de la variante más pequeña del cromosoma XII. La variación de tamaño de estas bandas reflejó estrechamente el polimorfismo del cromosoma XII en estas cepas, por lo que se puede deducir que las variaciones de tamaño detectadas eran debidas a variaciones en la cantidad de subunidades de rDNA presentes en un cromosoma XII determinado.

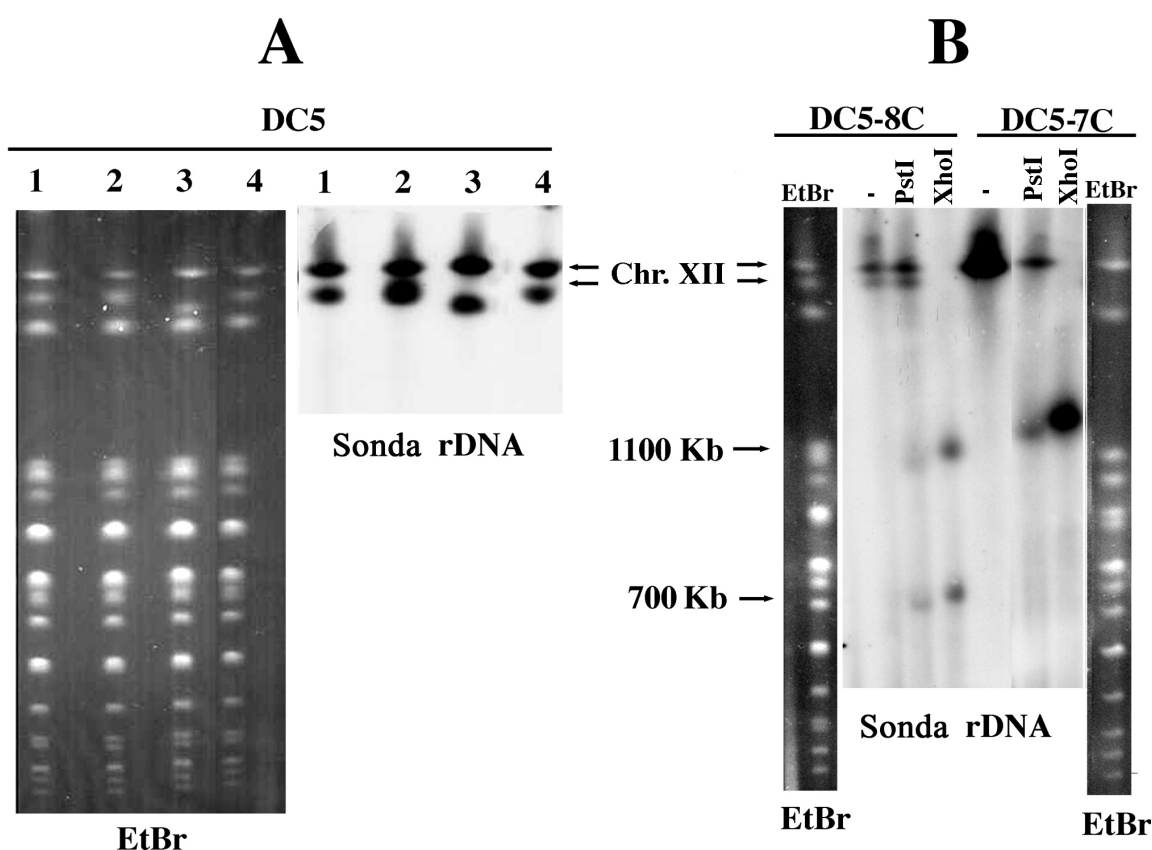


Figura 3-7. Análisis estructural de la variación en *clusters* de rDNA. (A) La parte izquierda de la figura muestra derivados mitóticos de la cepa DC5 mostrando variación clonal en los cromosomas de menor movilidad electroforética. En la parte derecha se muestra el mismo gel de PFGE hibridado con una sonda específica de rDNA. (B) Cariotipo de las cepas DC5-8C y DC5-7C, mostrando dos bandas correspondientes al cromosoma XII en el primero y una en el segundo. La digestión se realizó con *PstI* (digestión parcial) y con *XhoI*, que liberan los *clusters* de rDNA. Puede observarse como al hibridar con la sonda específica de rDNA se obtiene un patrón de bandas que reflejan la variabilidad detectada para el cromosoma XII.

3.2. Inestabilidad cariotípica en mutantes *rad52*.

Diversos estudios han descrito que en la inestabilidad cariotípica intervendrían procesos recombinatorios entre secuencias homólogas dispersas por el genoma (Benítez, 1996; Codón *et al.*, 1997; Rachidi *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2003), proceso que depende del gen *RAD52* (Prado *et al.*, 2003).

Para probar la posible relación de las reordenaciones cromosómicas con procesos de recombinación homóloga se realizó la interrupción del gen *RAD52* de la cepa DC5, con el doble objetivo de evaluar el grado de estabilización del cariotipo, y determinar si dicha interrupción afectaba al potencial industrial de esta cepa.

3.2.1 Obtención del mutante $\Delta rad52$

Debido al carácter protótrofo de la cepa DC5, se utilizaron marcadores dominantes para la disrupción y posterior selección del mutante. Los marcadores elegidos debían de permitir realizar una selección limpia y efectiva, y no interferirse mutuamente. Los marcadores empleados fueron los marcadores *kan^r* y el *nat1*, que confieren resistencia a G418 (geneticina) y a la droga comercial ClonNat® (nurseotricina), respectivamente (Goldstein y McCusker, 1999).

Se amplificaron los *cassettes* de disrupción (ambos clonados en los plásmidos pKanMX4 y pGA25, Wach *et al.*, 1994) con cebadores quimeras; complementarios a secuencias de los marcadores dominantes y con colas de homología con las secuencias de *RAD52*. La cola del cebador *Up* era complementaria a la región de 185 pb a 213 pb del ORF de *RAD52* (considerando 1 como la posición del ATG inicial), mientras que la del cebador *Lo* era complementaria a la región de 1044 pb a 1070 pb del mismo gen. La cepa DC5wt (*RAD52/RAD52*) fue transformada con los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores quiméricos y de un total de 178 clones transformados con ambas construcciones, 117 clones (un 66%) poseyeron la disrupción correcta (Cepas *RAD52/rad52::Nat1* ó *RAD52/rad52::Kan*) (tabla 3-4).

Cepa a transformar	Construcción transformada	Transformantes	Resistencia doble	Disrupciones correctas
DC5	kanMX4 (<i>kan^r</i>)	110	-	70
DC5	natMX4 (<i>nat1</i>)	68	-	47
DC5 <i>RAD52/rad52::kan^r</i>	natMX4 (<i>nat1</i>)	102	60	0
DC5 <i>RAD52/rad52::nat1</i>	kanMX4 (<i>kan^r</i>)	85	11	0
DC5 <i>RAD52/rad52::kan^r</i>	hhRAD52- <i>nat^a</i>	140	20	13

Tabla 3-4. Eficiencia de transformación de la cepa DC5 WT y de la cepa heterocigota (DC5 *RAD52/ rad52::nat1* o DC5 *RAD52/ rad52::kan*) con diferentes estrategias. La única estrategia que permitió la obtención de la cepa homocigota DC5 *rad52::nat1/rad52::kan* fue la última empleada, en la que se amplificó por PCR el cassette *nat1* con altas regiones homólogas flanqueantes al gen *RAD52*, a partir del DNA de la cepa heterocigota DC5 *RAD52/ rad52::nat1*, y se transformó con dicha amplificación la cepa DC5 *RAD52/ rad52::kan*.

La disrupción secuencial de ambos alelos por esta estrategia no resultó efectiva, ya que los clones resistentes a la segunda droga mostraron ser producto de integraciones inespecíficas (tabla 3-4). La estrategia alternativa empleada fue la de amplificar, con cebadores adecuados, el fragmento *rad52::nat1* de un clon de DC5 heterocigoto *RAD52/rad52::nat1*, con lo que el fragmento amplificado

contenía, además del gen de resistencia a ClonNat, largas regiones de homología a las regiones 5' y 3' (195 pb y 504 pb, respectivamente) del gen *RAD52* (tabla 3-4; fragmento *hbRAD52-nat*, *high homology RAD52-nat*). Este fragmento fue transformado en un fondo genético DC5 *RAD52/rad52::kan*, obteniéndose con una frecuencia alta homocigotos DC5 *rad52::kan/rad52::nat1*, de 20 clones transformados y doblemente resistentes, 13 clones, un 65% poseían los dos alelos *RAD52* disrumpidos. Todos los mutantes DC5 Δ *rad52* resultaron sensibles a 0.015% metil metasulfonato (MMS), un fenotipo típico para mutantes Δ *rad52*. La comprobación molecular de la doble disrupción se realizó mediante un *Southern blot* (figura 3-8). Estas observaciones demuestran la presencia de dos y sólo dos copias del gen *RAD52* en la cepa DC5.

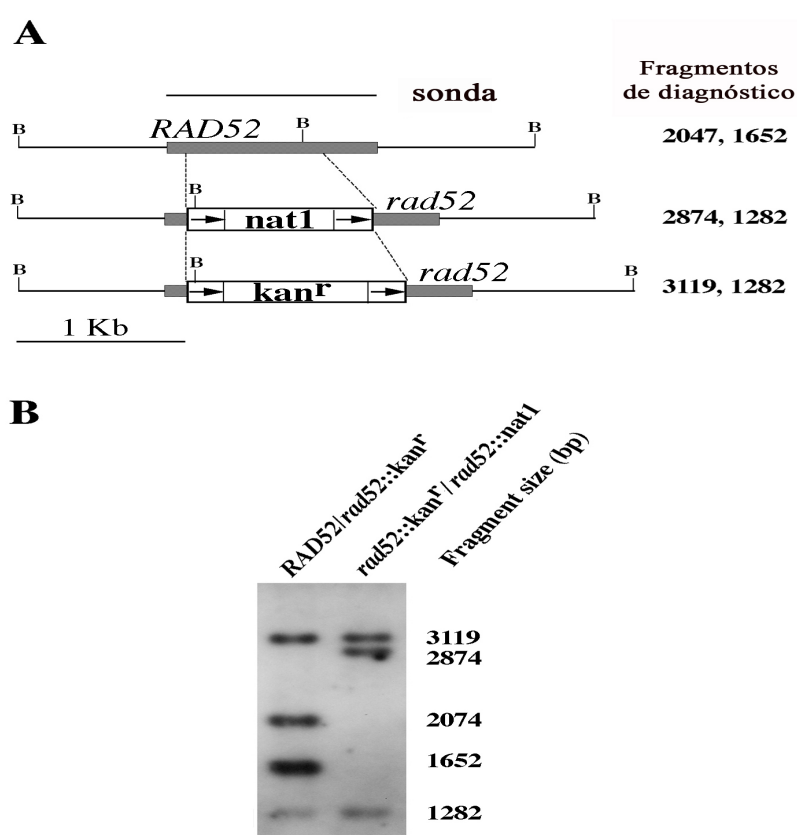


Figura 3-8. (A) Esquema de disrupción de los genes *RAD52* de la cepa DC5. (B) Comprobación por *southern* de dicha disrupción. El gen *RAD52* aparece esquematizado como un rectángulo gris y los cassettes de disrupción (*nat1* y *kan*) como una caja blanca cada uno. La digestión del DNA genómico con *Bam*HI genera diferentes tipos de bandas; para la cepa DC5 WT (*RAD52*) dos bandas de 2047 y 1652 pb; para la cepa DC5 *RAD52/rad52::nat1* cuatro bandas de 2874, 2047, 1652 y 1282 pb; para la cepa DC5 *RAD52/rad52::kan* cuatro bandas de 3119, 2047, 1652 y 1282 pb respectivamente, mientras que para la cepa DC5 Δ *rad52* (*rad52::nat1/rad52::kan*) aparecen tres bandas de 3119, 2874 y 1282 pb (esta última corresponde a una doble banda).

3.2.2 Estabilidad cariotípica de mutantes DC5 Δ rad52.

Se realizó un ensayo de inestabilidad cariotípica en crecimiento mitótico con cuatro clones DC5 Δ rad52 (clones A1, A4, B1, B4) y con la cepa DC5 wt . Tras 100 duplicaciones en YPS, se realizó el cariotipado de 82 clones DC5 Δ rad52, comparándolos con los originales (figura 3-9). El cromosoma XII presentó una enorme variación clonal en el conjunto de derivados analizados, pero debido a que su inestabilidad es genéticamente independiente de la del resto del cariotipo, y además independiente de RAD52, no fue incluida en el cálculo de las frecuencias de reordenación. De los 82 clones analizados, un total de 39 clones, el 48%, presentaban nuevos polimorfismos cromosómicos con una frecuencia conjunta de reordenación de 6.4×10^{-3} reordenaciones/clon/generación. Los cuatro clones DC5 Δ rad52 presentaron diferentes tasas de reordenación, oscilantes entre frecuencias de 3.9×10^{-3} a 8.3×10^{-3} reordenaciones/clon/generación (tabla 3-5). La frecuencia de reordenación de los mutantes DC5 Δ rad52 fue significativamente menor que la presentada por la cepa salvaje DC5 en la misma serie de experimentos (2.1×10^{-2}) y por el conjunto de derivados meióticos inestables de DC5 (1.3×10^{-2}), así como significativamente mayor que el del conjunto de derivados meióticos constantes de DC5 (8.4×10^{-4}) (tabla 3-5).

	N. Clones	Clones reorganizados	P(i)
DC5	17	15	2.1×10^{-2}
<i>Clones Δrad52</i>			
A1	25	8	3.9×10^{-3}
A4	39	22	8.3×10^{-3}
B1	9	4	5.9×10^{-3}
B2	9	5	8.1×10^{-3}
Total Δ rad52	82	39	6.4×10^{-3}
<i>Derivados mono esporídicos a)</i>			
Derivados constante	273	22	8.4×10^{-4}
Derivados variables	181	132	1.3×10^{-2}
a) Datos de experimentos independientes.			

Tabla 3-5. Datos de los ensayos de inestabilidad cariotípica realizados con los clones de la cepa DC5 Δ rad52 y de la cepa salvaje DC5. Los datos de los derivados mono esporídicos corresponden a otro experimento realizado independientemente de los anteriores^{a)}.

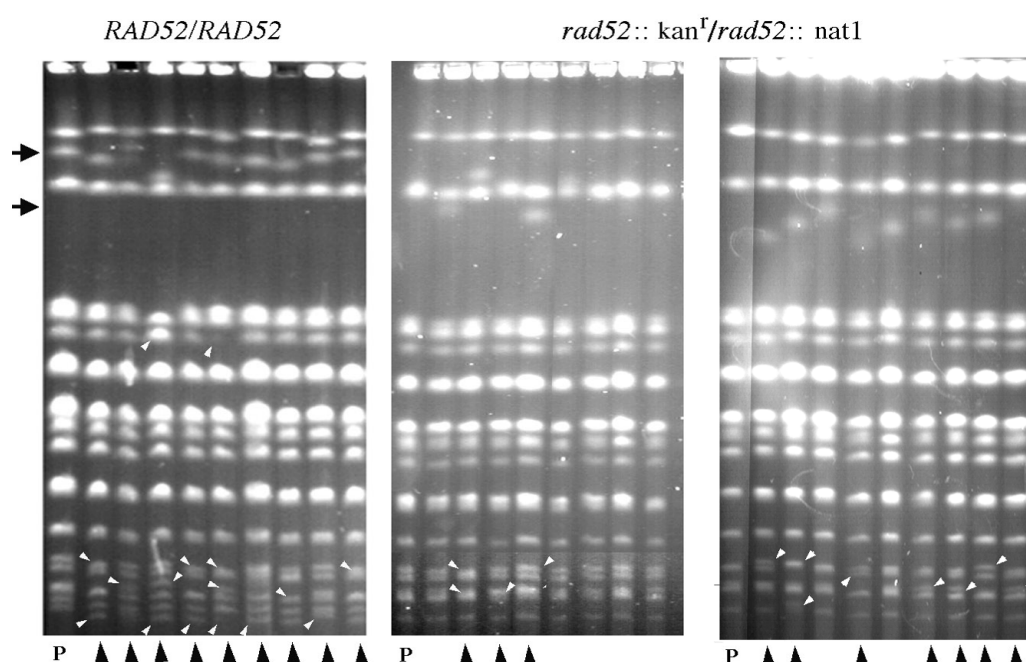


Figura 3-9. Análisis de la inestabilidad cariotípica de DC5 y de la cepa DC5 Δ rad52. Todos los carriles corresponden a cariotipos de clones derivados del clon parental (P) tras 100 duplicaciones en medio rico, salvo los marcados con una P, que son en cada caso, el clon parental (a generación 0). Pueden observarse los cambios cromosomales de tamaño detectados en cada caso (marcados por flechas blancas) y las variaciones del cromosoma XII (indicadas en la parte alta del gel por dos flechas negras). Los clones con cariotipo diferente de su clon parental (P) aparecen marcados en la base con una flecha negra.

3.2.3 Recombinación subtelomérica en Δ rad52.

Las secuencias Y' son secuencias que se encuentran formando tándems de una a cuatro copias en zonas subteloméricas de diversos cromosomas de *S. cerevisiae*. Su número de copias y posición varía entre diferentes cepas (Louis *et al.*, 1994, figura 3-10). Ha sido descrito que estas secuencias participan en el proceso de inestabilidad cariotípica estando implicadas en la generación de polimorfismos cromosómicos (Benítez *et al.*, 1996).

Se analizó las secuencias Y' en mutantes DC5 Δ rad52 mediante análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP). El DNA total de cepas salvajes DC5 y mutantes DC5 Δ rad52 fue aislado y digerido con la enzima *Xho*I. Dada la estructura de los telómeros, esta digestión debería de dar fragmentos de 5.2 y 6.7 Kb correspondientes a las secuencias Y', así como fragmentos de unos 1.3 Kb correspondientes a las secuencias teloméricas (figura 3-10).

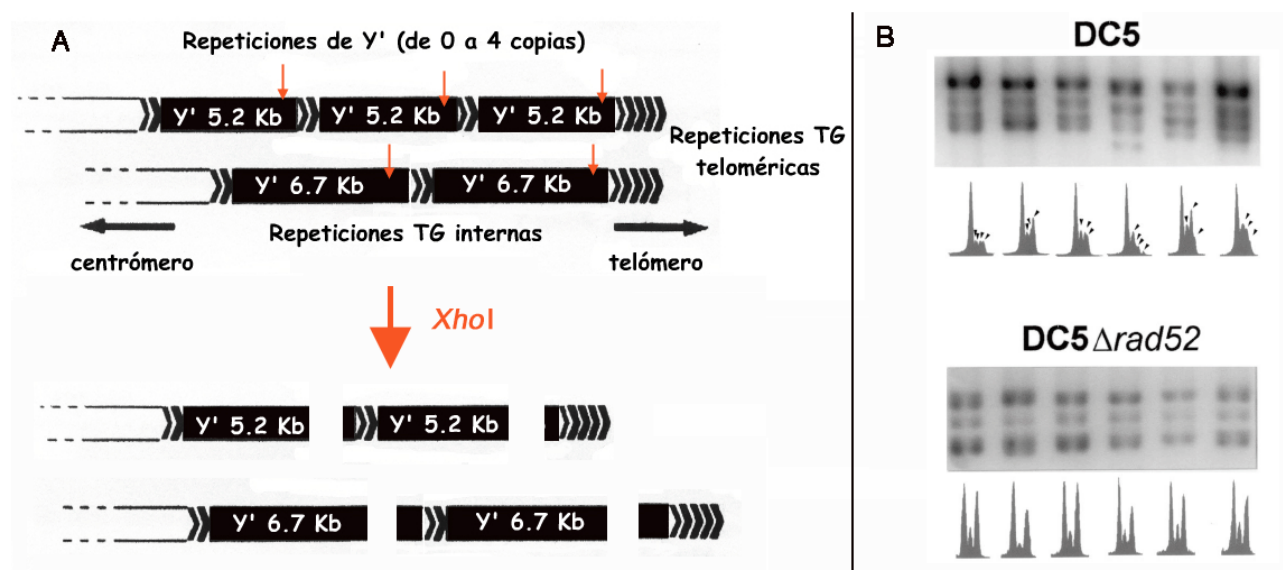


Figura 3-10. Análisis de las secuencias Y' de la cepa DC5 y de la cepa DC5 Δ rad52. El DNA genómico de ambas cepas y diferentes clones fue extraído y digerido con *Xho*I. Puede observarse tanto en el *southern* como en el patrón densitométrico el polimorfismo de tamaño existente en los clones de la cepa DC5 (cada pico del perfil densitométrico aparece marcado por una flecha gris), así como la uniformidad de tamaño existente en el mutante DC5 Δ rad52.

Los clones DC5 aislados tras 100 generaciones mostraron en sus Y' un polimorfismo de tamaño muy acusado (figura 3-10), con la aparición de bandas polimórficas Y' que van desde las 7 Kb hasta unas 5 Kb. Por el contrario, en más de 20 clones DC5 Δ rad52 analizados, tras el análisis de RFLP de Y', todos los clones mostraron el mismo patrón de bandas, demostrando que las secuencias Y' no son polimórficas en estos clones. Sin embargo, estos mismos clones mostraron un alto grado de variabilidad cariotípica como la cepa parental DC5 (figura 3-9).

Así por tanto, concluimos que la recombinación subtelo mérica y más concretamente la originada por las secuencias Y', es dependiente de *RAD52*, mientras que debe haber otro mecanismo alternativo e independiente de *RAD52* que explique la inestabilidad cariotípica detectada en estos mutantes.

3.2.4 Capacidad fermentativa de mutantes RAD52.

La segunda fermentación del cava, que tiene lugar en condiciones microaeróbicas en botellas cerradas a presión, requiere cepas de levadura con muy alta capacidad fermentativa.

La cepa DC5 fue seleccionada por su buen fenotipo en este aspecto, pero en algunos casos la manipulación genética de las cepas vínicas puede traducirse en una alteración en la capacidad fermentativa de éstas y/o en las cualidades organolépticas del producto final. Por tanto, se consideró

necesario comprobar si los mutantes $DC5\Delta rad52$ conservaban su potencial industrial mediante el seguimiento de la capacidad fermentativa en botella. Como se observa en la figura 11, los mutantes $DC5\Delta rad52$ mostraron una cinética prácticamente igual a la de la cepa salvaje DC5 y al derivado monoesporídico DC52B (estable), ya que entre los 10 y 12 días todas las cepas ensayadas alcanzaron una presión en botella de unos 7 bar.

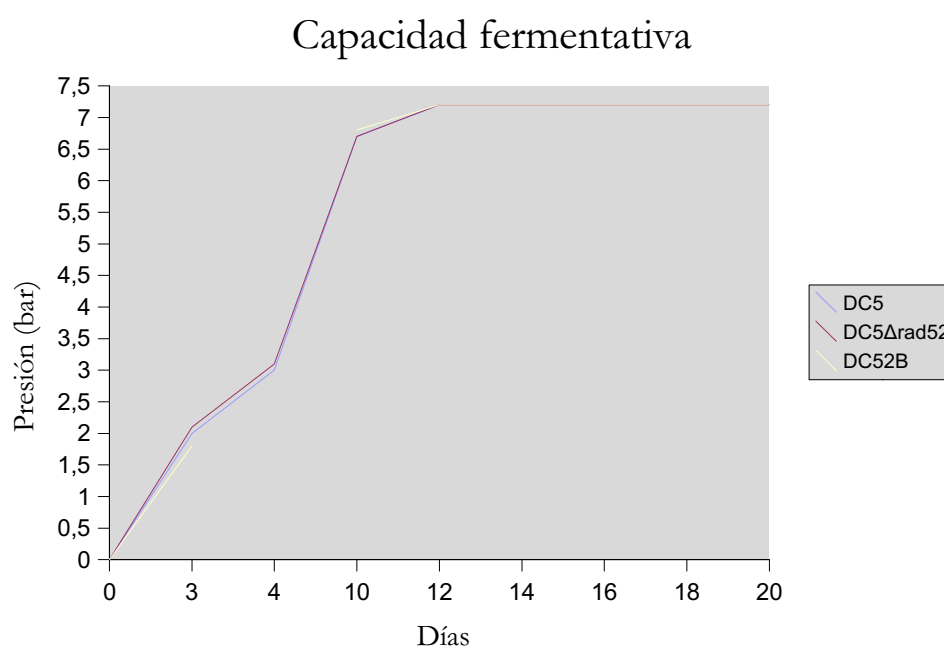


Figura 3-11. Resultados de la comprobación de la capacidad fermentativa de los mutantes $DC5\Delta rad52$. La prueba fue realizada en las típicas botellas de cava y corresponde a una fermentación estándar. Puede observarse como la cepa salvaje (DC5), uno de sus derivados monoesporídicos estables (DC52B) y la cepa mutante ($DC5\Delta rad52$) presentan una cinética sin diferencias significativas, alcanzando una presión en botella de unos 7 bar en unos 10-12 días.

Tras la fermentación se recuperaron viables del mutante $DC5\Delta rad52$ y se realizó un análisis fenotípico de 25 clones tomados al azar. Se comprobó que todos ellos eran doblemente resistentes a ClonNat® y G418, indicando que poseían los dos marcadores empleados para la disrupción de las dos copias de *RAD52*; *rad52::nat1/rad52::kan*. Por tanto, se concluyó que las cepas $DC5\Delta rad52$ eran capaces de realizar la segunda fermentación del cava en las condiciones demandadas por la industria.

Las pruebas organolépticas preliminares (a los 30 días), revelaron que no existían diferencias significativas entre los productos de fermentación de la cepa mutante $DC5\Delta rad52$, de la cepa salvaje DC5 y del derivado monoesporídico DC52B ensayado.