

ELS LLEVATS COM A ORGANISME MODEL DE RECERCA EN BIOLOGIA

JOAQUÍN ARIÑO

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i Institut de Biotecnologia i Biomedicina,
Universitat Autònoma de Barcelona*

Adreça per a la correspondència: Joaquín Ariño. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Edifici IBB, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.
Tel.: 935 812 182. Adreça electrònica: *Joaquin.Arino@uab.cat*.

RESUM

Els llevats, i en particular el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, han estat durant molts anys un excel·lent organisme model per a estudis fonamentals en bioquímica, biologia cel·lular i genètica eucariòtica, i també per a la recerca aplicada. *S. cerevisiae* acumula una sèrie d'avantatges que no es troben en altres models, com un genoma compacte, una genètica senzilla i una manipulació molt fàcil, i és especialment adequat per a les aproximacions d'alt rendiment en genòmica, proteòmica i interactòmica. Per aquesta raó, és l'organisme d'elecció per desenvolupar i verificar noves tecnologies i per investigar processos biològics fonamentals i conservats evolutivament.

Paraules clau: *Saccharomyces cerevisiae*, llevat, organisme model.

YEAST AS A MODEL FOR RESEARCH IN BIOLOGY

SUMMARY

Yeasts, and particularly the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, have been for many years an outstanding model organism for fundamental studies in eukaryotic biochemistry, cell biology and genetics, as well as for applied research. *S. cerevisiae* accumulates a number of advantages that are not found in other models, such as a compact genome, straightforward genetics and easy manipulation, and it is particularly suitable for high-throughput genomic, proteomic and interactomic approaches. For that reason it is the organism of choice to develop and test new technologies and to investigate fundamental and evolutionarily conserved biological processes.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, model organism.

QUÈ SÓN ELS LLEVATS

Els llevats són eucariotes unicel·lulars que pertanyen al grup dels fongs. Hi comptem entorn de 1.500 espècies distribuïdes en els clades *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Tot i que hi ha diversos llevats (i d'altres fongs) que són objecte continuat d'estudi en biologia (com ara *Neurospora crassa*, *Candida albicans*, *Ustilago maydis* o *Aspergillus nidulans*), aquesta revisió es concentrarà fonamentalment en una espècie, *Saccharomyces cerevisiae*, conegut també com a llevat de panificació o de cerveseria, pel fet que aquest hemiascomicet, a més de la seva rellevància industrial i en biotecnologia, constitueix un dels models de recerca més importants en biologia. De manera menys detallada també es descriuran algunes propietats de *Schyzosaccharomyces pombe*, un llevat filogenèticament molt distant de *S. cerevisiae* i que es reproduïx per fisió, la qual cosa el fa objecte d'interès, per exemple, en l'estudi del cycle celular.

PER QUÈ *Saccharomyces cerevisiae* ÉS UN SISTEMA MODEL EN BIOLOGIA?

El llevat *S. cerevisiae* posseeix pràcticament totes les característiques que configuren un sistema model, a més d'altres que el fan pràcticament únic. Va ser introduït com a organisme experimental cap a la dècada dels trenta del segle passat i, des de llavors, l'elegància de la seva genètica i l'assoliment d'una sèrie de fites tecnològiques han fet que la seva contribució als camps de la biologia cel·lular i molecular hagi estat extraordinària.

Es tracta d'un organisme que:

a) Reuneix la complexitat d'una cèl·lula eucariota i la facilitat de manipulació d'un organisme unicel·lular.

b) És considerat com a no patogen (GRAS, *generally regarded as safe*), i pot ser manipulat sense precaucions especials.

c) Creix ràpidament (temps de duplicació de 90-200 min) en medis de cultiu relativament poc complexos i força econòmics.

d) És genèticament estable, i existeix en formes haploides i diploides que són interconvertibles a voluntat en el laboratori.

e) El seu genoma és relativament petit (poc més de tres vegades el d'*Escherichia coli*), compacte i simple. La facilitat amb què aquest genoma pot ser manipulat és extraordinària i sense precedents en qualsevol altre eucariota.

f) Tot i la seva simplicitat, manté molts dels processos cel·lulars bàsics d'organismes més complexos (com ara processos biosintètics i la seva regulació, transcripció, regulació del cycle celular, reparació del DNA, etc.), per la qual cosa molta de la informació obtinguda pot ser transferida a eucariotes més complexos, incloent-hi l'ésser humà.

g) En part a causa del seu historial com a organisme d'interès industrial i tecnològic, en tenim un gran fons de coneixements bioquímics i genètics i s'han identificat i caracteritzat un gran nombre de mutants per a qualsevol funció cel·lular.

UN REPÀS DE LA BIOLOGIA CEL·LULAR I LA GENÈTICA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Com és una cèl·lula de *Saccharomyces cerevisiae*?

Normalment les cèl·lules haploides de *S. cerevisiae* són esfèriques d'uns 4-5 µm de diàmetre, mentre que les diploides es mostren sota el microscopi com a el·lipsoïdes de 6 × 8 µm (vegeu la figura 1). El seu volum és entorn dels 70-120 µm³. Com tots

els llevats, està recobert d'una paret força gruixuda (100 a 200 nm) i que representa el 20 % de la massa cel·lular. Aquesta paret està feta principalment de polisacàrids (sobretot glucans i mannans, amb un petit percentatge de quitina, que es troba en les cicatrius de gemmació).

La membrana plasmàtica té uns 7 nm de gruix i és una bicapa lipídica típica amb múltiples proteïnes inserides. La seva composició inclou fosfatidilcolina i fosfatidiletanolamina, amb quantitats més petites de fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol i fosfatidilserina. També conté diversos esters, com ara ergosterol i zimosterol.

El vacúol és un orgànel molt important en *S. cerevisiae* i pot arribar a ocupar un volum substancial de la cèl·lula. El seu paper principal és semblant al dels lisosomes en cèl·lules animals, i s'hi dona la degradació no específica de proteïnes per part d'una varietat de proteases (endopeptidases, aminopeptidases, carboxipeptidases, etc.). A més, serveix com a lloc d'emmagatzement d'aminoàcids, alguns metalls i ions, i col·labora en el procés d'osmoregulació. Els llevats contenen també peroxisomes, on tenen lloc diverses funcions metabòliques, com ara l'oxidació de fonts de carboni i nitrogen. Els mitocondris de *S. cerevisiae*, que

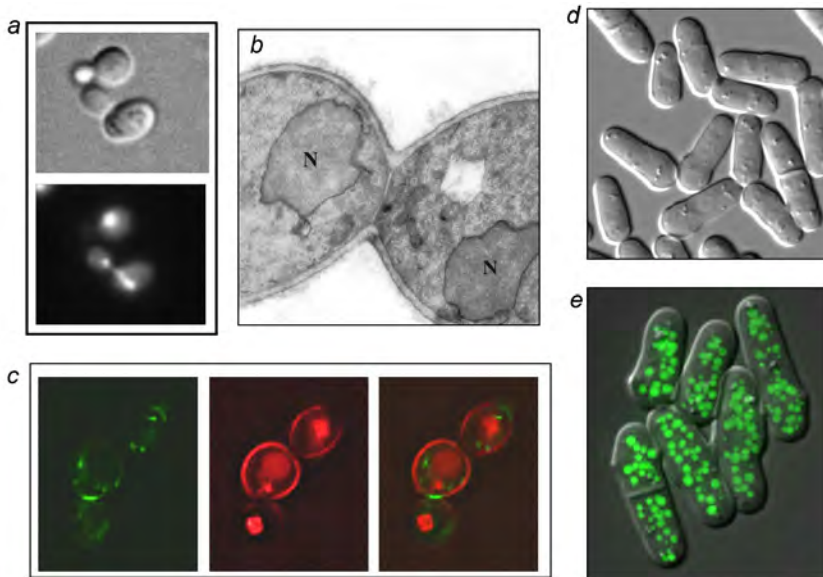


FIGURA 1. Diverses micrografies de *S. cerevisiae* i *S. pombe*. a) Tinció nuclear amb DAPI, que mostra la migració cromosòmica. b) Micrografia al microscopi electrònic en els moments previs a la citocinesi, que mostra el septe intercel·lular. c) Un exemple de marcatge diferencial que permet identificar la localització de dues proteïnes diferents. A l'esquerra la proteïna Chs3 (una quitina-sintasa) està marcada amb GFP. Al centre, la proteïna Pma1 (la H^+ -ATPasa de la membrana cel·lular) es veu amb fluorescència vermella pel marcatge amb RFP (una variant de la GFP). A la dreta observem una composició d'ambdues fotografies, per posar en evidència que la localització d'aquestes dues proteïnes és mútuament exclusiva. d) Micrografia de *S. pombe* amb òptica Nomarski. e) Tinció dels vacúols de *S. pombe*. Les micrografies de *S. cerevisiae* han estat gentilmente cedides per Cèsar Roncero i les de *S. pombe* per Pilar Pérez (tots dos pertanyen a l'Institut de Microbiologia Bioquímica, U. Salamanca/CSIC).

són dispensables durant el període fermentatiu, contenen quasi 86.000 pb de DNA, el qual codifica diverses proteïnes de la cadena de transport electrònic del mitocondri mateix.

En *S. cerevisiae* el nucli té uns 1,5 µm de diàmetre i està separat del citosol per una doble membrana que, contràriament al que ocorre en molts altres eucariotes, no es desfà durant la mitosi. Les soques de laboratori contenen normalment 16 cromosomes, des de 0,23 a més d'1,5 Mbp, que poden ser separats fàcilment per tècniques d'electroforesi en camp polsant (PFGE). A més dels cromosomes, al nucli es poden trobar diversos elements genètics, com ara *a*) el plasmidi de 2 µm, de funció desconeguda, que és present en un alt nombre de còpies (20-50) i es replica a la vegada que els cromosomes; *b*) RNA i DNA lineal de doble cadena, típic de soques *killer*, que són tòxiques per a altres soques, i *c*) els elements *Ty*, que són equivalents al retrotransposons que es troben en altres tipus de cèl·lules eucariotes.

El cicle vital de *Saccharomyces cerevisiae*

Tot i que en la natura molts llevats es troben com a homotàl·lics, de vegades *S. cerevisiae* és heterotàl·lic, heterozigòtic i poliploide. Les soques de laboratori són sempre heterotàl·liques (és a dir, es poden individualitzar les formes sexuals en organismes independents a causa de l'existència d'un al·lel no funcional del gen *HO*, que impedeix l'intercanvi homotàl·lic) i poden existir en forma de cèl·lules haploides o diploides. Aquestes característiques són la base de la potència de la genètica clàssica en *S. cerevisiae* i defineixen el cicle vital d'aquest organisme (vegeu la figura 2). Les cèl·lules haploides poden existir en dues formes, definides per l'al·lel present al lo-

cus *MAT*: *MATa* o *MATα*. Parlem així de cèl·lules *a* o *α*. Totes dues poden dur a terme cicles cel·lulars mitòtics estables, en els quals la nova cèl·lula apareix per gemmació (1 i 2). Cadascun d'aquests tipus produeix una «feromona» peptídica (factor *a* o *α*) que és alliberada a l'entorn. Quan dues cèl·lules de «sexe» oposat es troben a prop, detecten la presència de la feromona mitjançant receptors 7TM i sistemes de senyalització molt semblants als que trobem en animals, i això induïx una aturada del cicle cel·lular en fase G1 i promou la fusió de totes dues cèl·lules i dels seus nuclis (3). De fet, aquestes feromones es fan servir

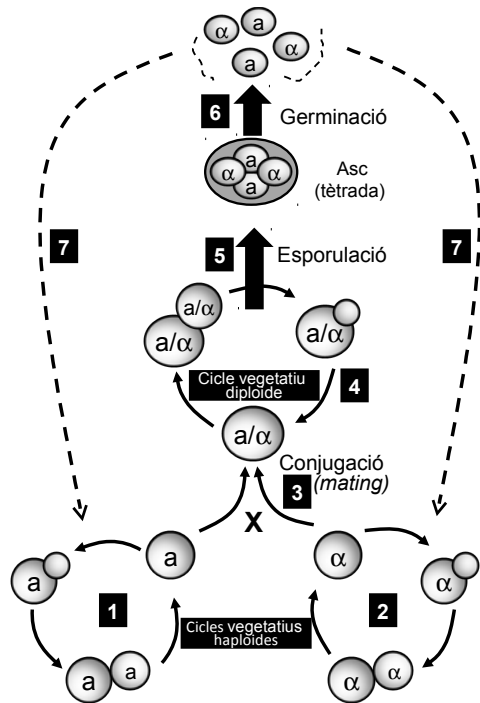


FIGURA 2. El cicle vital de *S. cerevisiae*. Es mostren les etapes següents: 1 i 2) Cicle vegetatiu haploide. 3) Conjugació d'una cèl·lula *a* i una cèl·lula α . 4) Cicle vegetatiu diploide, estable fins a l'esgotament de nutrients. 5) Esporulació i formació de la tètada. 6) Germinació de les espores, amb trencament de l'embolcall de l'asc. 7) Retorn a l'estat de creixement vegetatiu haploide.

al laboratori per sincronitzar cultius, i d'aquesta manera s'«enganyen» els llevats. Es genera llavors una cèl·lula diploide, que és perfectament estable i pot iniciar tot un seguit de cicles mitòtics, sempre per gemmació, almenys mentre hi hagi nutrients. Curiosament, mentre que en les cèl·lules haploides la nova gemma apareix just al costat de la prèvia (gemmació axial), en les diploides apareix al pol oposat (gemmació bipolar). En qualsevol cas, davant l'absència de nutrients, principalment fonts de nitrogen, les divisions mitòtiques cessen i les cèl·lules entren en meiosi, i produeixen quatre espores haploides, dues de *a* i dues de α , normalment anomenades *tètrades* (5), embolcallades per una coberta (asc). Les espores són formes de resistència. En presència de nutrients, les espores haploides poden germinar (6) i entrar en un nou cicle mitòtic haploide o bé tornar a aparellar-se per formar diploides. Al laboratori es pot treure profit de cadascun d'aquests possibles estats (vegeu, per exemple, l'anàlisi de *tètrades* més endavant).

Nocions bàsiques sobre nomenclatura de gens, soques de laboratori i mètodes de cultiu

Des del moment en què es va iniciar la seqüenciació del genoma de *S. cerevisiae* va ser necessari definir una nomenclatura sistemàtica per als seus gens (i d'altres entitats genètiques). Així, la nomenclatura *YFR015C* defineix un gen, o més pròpiament, un *open reading frame*, de llevat (*Y*, de *yeast*, 'llevat'), que es troba al cromosoma 6 (*F* és la sisena lletra de l'alfabet), és el quinze *open reading frame* des del centròmer i està codificat en la cadena Crick (*C*, que correspon a la seqüència complementària de la dipositada en els bancs de dades). Però, en paral·lel a la nomenclatura sistemàtica,

és molt comú fer servir una nomenclatura genètica «clàssica», que sovint fa referència a la manera com es va descobrir el gen o la funció que té la proteïna que codifica. Per exemple, el gen *YER133W* és més conegut com a *GSY1*, nom que ens fa intuir que codifica un enzim del metabolisme del glicogen (de fet, codifica una de les dues glicogen-sintases de *S. cerevisiae*). Com que la nomenclatura genètica en *S. cerevisiae* és una mica particular, val la pena fer-hi esment. Normalment un gen cromosòmic es defineix per tres lletres i un nombre, escrits en cursiva. Quan parlem d'un al·lel dominant, es fan servir majúscules (*GSY1*, *CDC25*...), mentre que denotem al·lells recessius en minúscules (*gsy1*, *cdc25*...). En qualsevol cas, la proteïna que produiria la descriurem com a Gsy1 o Gsy1p. Els diferents al·lells es denominen mitjançant nombres (*glc7-109*, *leu2-3*...). Per indicar una deleció del gen es fa servir el símbol Δ (*gsy1*- Δ 1). Tot i que no és formalment correcte, és freqüent veure formes com *gsy1* Δ , que s'interpreta com una deleció total del gen (o, més comunament, de l'ORF). Si veiem escrit *gsy1::LEU2*, llavors interpretarem que s'ha produït una inserció del gen *LEU2* en el locus *GSY1*, de manera que el primer és funcional (i dominant) i aquest últim esdevé no funcional (i recessiu). Si ens volem referir al fenotip derivat d'un al·lel d'un gen determinat, no es fa servir cursiva i es posa un «+» o «-» com a superíndex segons el gen sigui funcional o no (per exemple, Gsy⁻ ens indicaria una soca que no pot sintetitzar glicogen). La nomenclatura d'altres entitats genètiques cau fora d'aquest capítol. Per a més informació consulteu Sherman (2002) i <http://www.yeastgenome.org/help/yeastGeneNomenclature.shtml>.

Quan es treballa amb *S. cerevisiae* és molt important recordar que no hi ha una «soca salvatge» o de referència universal. De fet, les soques més habituals (S288C, W303,

X2180, BY4741, etc.) contenen diverses mutacions útils (*leu2*, *ura3*, etc.) que permeten la selecció quan es transformen amb plasmidis o altres fragments de DNA que contenen els gens salvatges corresponents, però sovint també d'altres no tan evidents que fan que el seu comportament pugui diferir molt. Per exemple, la mutació de certs gens en determinats fons genètics «salvatges» pot arribar a ser letal, mentre que en d'altres té efectes molt menys dramàtics. És a dir, és indispensable treballar sempre amb soques isogèniques i és molt perillós extrapolar resultats obtinguts amb soques que no ho són. Hi ha diverses fonts «oficials» de soques i de col·leccions de mutants, com ara el Yeast Genetics Stock Culture Center (ATCC), EUROSCARF, etc. (vegeu la taula 1). A Espanya, trobem la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), que inclou també d'altres microorganismes. No sembla haver-hi res semblant a Catalunya. La benevolència quasi llegendària dels investigadors en llevats fa que aquests rara-

ment deixin de respondre a una demanda raonable de soques.

Al laboratori, *S. cerevisiae* es pot fer créixer en líquid (en *batch* o en quimiòstat) o en plaques semisòlides amb agar, normalment a 28-30 °C. Un medi usual és l'YP (extracte de llevat, peptona) suplementat amb una font de carboni. Aquest medi permet un creixement ràpid i vigorós, però no és selectiu. Per a aquesta finalitat es fan servir medis sintètics, com ara l'SD o SC (Adams *et al.*, 1997; Sherman, 1991). La font de carboni ideal per a *S. cerevisiae* és la glucosa (emprada usualment al 2 %), tot i que moltes soques poden créixer a partir d'altres sucres (per exemple, galactosa o rafinosa) o altres fonts (glicerol, etanol, etc.). La font de carboni no és irrellevant. *S. cerevisiae* és un aerobi facultatiu, que metabolitzarà glucosa abans que qualsevol altra font de carboni. De fet, la presència de glucosa bloqueja les vies d'utilització d'altres fonts alternatives. La glucosa es metabolitza inicialment de manera anaeròbica, encara que

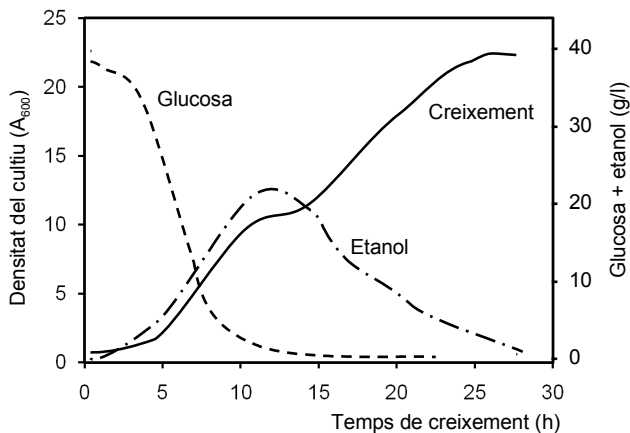


FIGURA 3. La cinètica de creixement d'un cultiu de *S. cerevisiae*. Fins i tot en condicions d'aerobiosi, *S. cerevisiae* fermenta la glucosa, és a dir, la deriva a etanol en lloc d'acetil-CoA i el procés respiratori. Quan la glucosa del medi es comença a esgotar, aquest llevat remodela la seva expressió gènica, reprimint tot un seguit de gens i activant-ne molts altres i comença a transformar etanol en acetil-CoA per dur-ne a terme l'oxidació mitocondrial fins a CO₂.

disposi d'oxigen, i el piruvat producte de la glicòlisi es deriva a etanol, en comptes d'acetil-CoA (vegeu la figura 3). Aquest període fermentatiu dona lloc a un creixement exponencial, fins que s'esgota la glucosa. En aquest moment (*shift diauxic*) *S. cerevisiae* reestructura el seu metabolisme (via remodelació de l'expressió gènica) i comença un creixement respiratori, durant el qual transforma l'etanol produït en diòxid de carboni i aigua. Aquest comportament és força anòmal, fins i tot en llevats, i no cal dir la importància que ha tingut en les aplicacions més tradicionals d'aquest organisme (panificació, viticultura, etc.).

L'EXTRAORDINÀRIA POTÈNCIA DE LA GENÈTICA I LA BIOLOGIA MOLECULAR EN *Saccharomyces cerevisiae*

La importància d'un genoma petit i compacte

El genoma de *S. cerevisiae* va representar el primer genoma eucariòtic completament seqüenciat. Es va iniciar com un projecte cooperatiu europeu, tot i que hi van acabar participant els EUA, el Canadà i el Japó, i des de la publicació de la seqüència del primer cromosoma el 1992 fins a la descripció de la seqüència completa el 1996, va proporcionar una quantitat d'informació sobre l'estructura i la funció gènica que encara a hores d'ara no s'ha acabat d'explotar completament. *S. cerevisiae* conté uns 6.200 gens, densament empaquetats en poc més de 12 Mpb de genoma, distribuït en 16 cromosomes en la soca seqüenciada. Això vol dir una densitat d'un gen per cada 2 kpb, amb una llargària mitjana de 1,45 kpb. Només una minoria de gens contenen introns (aproximadament el 4%), que solen ser curts i rarament més d'un, per la qual cosa

el genoma de *S. cerevisiae* ens apareix com una successió de «cDNA» flanquejats per promotors i terminadors. No obstant això, el processament d'introns és important en *S. cerevisiae*, ja que molts gens que codifiquen proteïnes ribosòmiques en contenen, i aquests gens s'expressen de manera molt abundant. De fet, *S. cerevisiae* ha estat i encara és un model formidable per a l'estudi de la maduració de l'mRNA. També van poder ser definits i caracteritzats d'altres elements gènics, com ara inicis de replicació (ARS), centròmers i telòmers. Aquests coneixements han servit per definir molècules útils per a l'enginyeria genètica (vectors), com ara els YAC (vegeu més endavant). El coneixement detallat del genoma de *S. cerevisiae*, juntament amb l'eficàcia dels processos de recombinació homòloga, han fet possible manipular aquest genoma amb una precisió extraordinària, com veurem més endavant.

La utilitat de la genètica clàssica en *Saccharomyces cerevisiae*

La capacitat de reproduir-se en un període curt de temps (90-180 min, depenent del medi de cultiu) és una característica molt important a l'hora de fer aproximacions genètiques. Molt del que sabem sobre sistemes eucariotes prové de l'estudi de determinats mutants de *S. cerevisiae* incapaços de créixer en absència d'un aminoàcid determinat o que presenten certs problemes per completar el seu cicle, etc. Alguns d'aquests mutants van aparèixer espontàniament, però molts d'altres van ser productes d'experiments de mutagènesi a l'atzar, emprant mutàgens químics (com l'MMS) o radiació UV. Des del moment en què es va aprendre a introduir DNA exogen en *S. cerevisiae* (el 1978) va ser possible aprofitar l'existència de vectors plasmídics

TAULA 1. Webs d'utilitat per als interessats en recerca en llevats

Bases de dades generals	
Saccharomyces Genome Database (SGD Stanford)	http://www.yeastgenome.org/
Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD-MIPS)	http://mips.gsf.de/genrel/proj/yeast/index.jsp
Schizosaccharomyces pombe GeneDB	http://old.genedb.org/genedb/pombe/
Candida Genome Database	http://www.candidagenome.org/
Colleccions de mutants	
Saccharomyces Genome Deletion Project	http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/
EUROSCARF	http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/
Altres webs d'interès	
Mammalian homology to yeast (SGD)	http://www.yeastgenome.org/mammal/
Yeast homologues of human disease-associated genes	http://mips.gsf.de/proj/yeast/reviews/human_diseases.html

per intentar identificar i clonar els gens responsables del fenotips observats.

Es possible transformar *S. cerevisiae* amb relativament bona eficiència per diverses tècniques, que van des de la generació de protoplasts (llevats als quals s'ha eliminat la paret per tractament enzimàtic), fins a l'ús d'acetat de liti o l'electroporació. El DNA introduït pot reproduir-se bé per integració en un cromosoma o bé pel fet d'estar inserit en un vector plasmídic. Els vectors que fem servir en *S. cerevisiae* són de tipus *shuttle*, és a dir, també es poden reproduir en *E. coli*. N'hi ha d'alt nombre de còpies (20-50), que es basen en l'element replicatiu d'un plasmidi natural de *S. cerevisiae*, el plasmidi 2μ , i n'hi ha que porten una seqüència centromèrica (*CEN*, que en *S. cerevisiae* és anormalment petita i simple) i, per tant, pràcticament equivalent a una dosificació cromosòmica.

L'eficiència de la recombinació homòloga en *S. cerevisiae* és extraordinària, de manera que calen no més de 40-50 nucleòtids idèntics per dirigir efectivament un fragment de DNA exogen a un locus cromosò-

mic precís. Això ha permès desenvolupar tècniques com la del *short flanking homology gene deletion* (Wach *et al.*, 1994), que permet el reemplaçament precís de qualsevol seqüència cromosòmica per una altra (per exemple, l'eliminació o genoanul·lació d'un gen per part d'un determinat marcador). D'aquesta manera ha estat possible, per exemple, crear una collecció de mutants, cadascun mancat d'un gen determinat (en soques haploides, si el gen no és essencial, o com a diploides heterozigòtics si ho és).

Una tècnica de gran potència en la genètica de *S. cerevisiae* és l'anàlisi de tètades, que pot tenir utilitat fins i tot per a la recerca en altres organismes. Imaginem que hem clonat un cDNA humà (anomenem-lo *cAbc1*) que pensem que codifica una proteïna funcionalment homòloga a una proteïna de *S. cerevisiae*, diguem-ne que codificada pel gen *ABC1*. Una manera evident de comprovar-ho seria transformar l'hipotètic mutant *abc1* amb un plasmidi que expressés *cAbc1* i verificar que el cDNA humà és capaç de rescatar qualsevol fenotip produït per la mutació del gen de llevat. Però qui-

na seria la situació si el gen *ABC1* fos essencial en *S. cerevisiae*? No és una situació gaire improbable: una mica més del 20 % dels gens ho són. És evident que no podríem generar un mutant haploide *abc1* amb pèrdua total de funció, perquè aquesta soca no seria viable. Ara bé, si generem un mutant diploide heterozigòtic per al gen *ABC1* (*ABC1 abc1*), molt probablement viable, el podem transformar amb el plasmidi portador de *cAbc1*. Si ara induïm l'esporulació d'aquesta soca (simplement posant-la en un medi pobre en nutrients), els diploides vegetatius formaran ascis amb quatre espores. Dues d'aquestes tindran un genotip *ABC1* i les altres dues *abc1*, però totes portaran el plasmidi amb *cAbc1*. És possible digerir parcialment la paret d'un asc i, mitjançant un micromanipulador (vegeu la figura 4), separar físicament les quatre espores dipositant-les en una placa de germinació per permetre el creixement dels derivats haploides. Passades 48-72 h el resultat parla per si mateix: si l'expressió de *cAbc1* no és capaç de rescatar el fenotip letal de mutació *abc1* (i, per tant, no és un homòleg funcional) només dues espores podran germinar (les que són *ABC1*). Si, al contrari, la funció que expressa *cAbc1* correspon a la del gen *ABC1*, llavors totes quatre germinaran donant lloc a cèl·lules haploides viables (vegeu la figura 4).

Saccharomyces cerevisiae com a banc de proves de les tècniques d'anàlisi massiva

La impressionant accessibilitat de *S. cerevisiae* a la manipulació genètica ha permès que aquest organisme esdevingués una veritable plataforma per desenvolupar avenços tecnològics en genòmica i proteòmica funcional. Sense comptar l'aplicació massiva de la tecnologia de microxips de

DNA, avui dia estesa a molts més organismes, descrivim a continuació algunes d'aquestes eines.

La col·lecció de soques mutants per delecció gènica. A causa de l'alta eficiència de la recombinació homòloga, que permet la inserció precisa de les seqüències de DNA en llocs específics del genoma del llevat, ha estat possible crear, per tècniques de PCR, cassets sintètics que substitueixen tots i cadascun dels gen per un simple marcador de selecció, per exemple el gen que codifica resistència a la kanamicina, flanquejats a

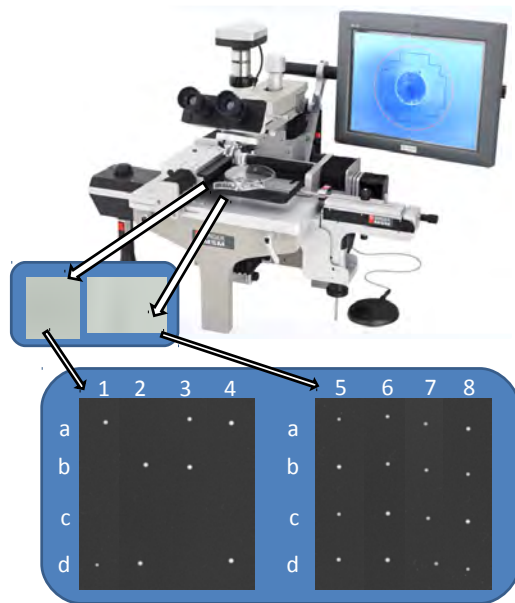


FIGURA 4. L'anàlisi de tètades en *S. cerevisiae*. La figura mostra un micromanipulador MSM 400 (Singer Instruments), la visió a 400× d'un parell de tètades i el producte de la micromanipulació i germinació posterior de vuit tètades en un experiment com el descrit en el text. Els nombres indiquen les diferents tètades (1-4, diploide transformat amb un plasmidi buit; 5-8, amb el plasmidi que expressa el cDNA per comprovar). Les lletres (a-d) indiquen les diferents espores de cada tètada dipositades a la placa. Noteu com dues de cada quatre espores a la placa de l'esquerra no poden germinar, fet que indica el fenotip letal de la mutació. L'equip MSM 400 es reproduïx amb permís de Singer Instruments Co. Ltd, RU.

més per seqüències curtes i específiques per a cada gen («codis de barres») (Winzeler *et al.*, 1999). Aquestes biblioteques de mutants són comercials tant en la seva forma de soques haploides (unes 4.800 soques) com en la de diploides homozigòtiques i heterozigòtiques (unes 6.000 soques). La presència d'aquests «codis de barres» ha permès combinar experiments de creixement d'una barreja de tots aquests mutants en presència d'una determinada condició o compost amb la tecnologia de microxips de DNA, per tal d'esbrinar a escala genòmica global com afecta una determinada mutació al creixement en la condició estudiada (*massive parallel analysis*) (Giaever *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). La mateixa estratègia d'integració genòmica ha estat utilitzada de manera sistemàtica per reemplaçar els promotors de cadascun dels ORF (Mnaimneh *et al.*, 2004) o per introduir-hi diferents etiquetes (GST, GFP) o epítops (HA, Myc, etc.).

Matrius d'interaccions genètiques sintètiques i anàlisi de letalitat sintètica a escala genòmica. La metodologia de matrius d'interaccions genètiques sintètiques (*synthetic genetic array* o SGA) és una aplicació de la col·lecció de mutants esmentada abans que permet la construcció sistemàtica dels mutants dobles i l'anàlisi posterior dels fenotips de creixement (Tong *et al.*, 2004). Es basa a encreuar una soca (A) que porta una mutació específica (una deleció o un allel condicional) amb la col·lecció sencera de mutants per deleció, aplicant un mètode de selecció que, una vegada es força l'esporeulació, només permet el creixement de les cèl·lules haploides (Tong *et al.*, 2006). Finalitzat el procediment de selecció, s'avaluen els fenotips (creixement lent, letalitat, etc.) en els dobles mutants que contenen el marcador de la soca A juntament amb el de la biblioteca de delecions. Aquests procediments es poden robotitzar i executar en

plaques d'alta densitat, que permeten l'anàlisi de manera automàtica de milers de combinacions gèniques. S'han desenvolupat un gran nombre de variants derivades del concepte de SGA. Per a una descripció més àmplia vegeu Suter *et al.* (2006). L'últim *tour de force*, publicat al començament de 2010, ha estat la generació de dades d'interaccions genètiques sintètiques corresponents a l'anàlisi de 5,4 milions de parells de gens (Costanzo *et al.*, 2010).

Identificació massiva de la localització subcel·lular de proteïnes. Aquest ambiciós objectiu va ser atacat fa prop de deu anys enrere pel grup de Michael Snyder fent servir una aproximació basada en l'ús d'etiquetatge a l'atzar de les proteïnes, mitjançant per transposons, amb els epítops de l'hemoaglutinina (HA) i el paramixovirus SV5 i sobreexpressió d'aquestes (Kumar *et al.*, 2002). Aquesta aproximació, tot i rendir resultats molt apreciats, presentava alguns problemes i va ser millorada per la construcció d'una biblioteca de 6.029 fusions GFP C-terminal, que es podien avaluar al microscopi de fluorescència (Huh *et al.*, 2003). En casos més específics, la localització subcel·lular s'ha confirmat per obtenció de preparacions enriquides d'òrgànuls intracel·lulars seguida de la identificació de proteïnes per espectroscòpia de masses (MS).

Els llevats, el regne de la interactòmica? Indubtablement, el llevat *S. cerevisiae* ha estat el territori en què els estudis d'interactòmica s'han desenvolupat amb més ímpetu. Alguns dels estudis originals es van fonamentar en la tècnica del doble híbrid, tal com la van dissenyar Fields i Song (Fields *et al.*, 1989), és a dir, expressant la proteïna per estudiar com una fusió al domini d'unió a DNA de *GAL4* i la proteïna que interacciona com una fusió del domini de transactivació del mateix *GAL4*, de tal manera que la interacció fructífera es detecta com la reconstitució d'un factor de trans-

cripció actiu que pot dirigir l'expressió d'un gen de selecció. Tot i que inicialment no era una tècnica d'anàlisi massiva, els primers estudis a gran escala es van publicar ja al començament de la dècada del 2000 (Ito *et al.*, 2001; Uetz *et al.*, 2000). Aquesta tècnica ha sofert un munt de modificacions, per tal d'adaptar-la a diverses situacions, com la selecció de compostos (com ara possibles fàrmacs) que afavoreixen o impedeixen la interacció de proteïnes (Bharucha *et al.*, 2007), o l'adaptació per a la detecció d'interacció entre proteïnes que es troben ancorades a les membranes cel·lulars com, per exemple, els assaigs de complementació basats en la *split-ubiquitin* o el sistema de doble híbrid basat en membranes, conegut com a MbYTH (Lentze *et al.*, 2008).

Els primers estudis massius d'interaccions proteïna-proteïna en llevats, diferents dels duts a terme pel mètode del doble híbrid, van ser publicats el 2002 (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002) i es basaven en l'aïllament de determinades proteïnes, prèviament etiquetades amb certs epitops, seguit de la identificació de les proteïnes que hi interactuen amb MS. S'han desenvolupat diversos mètodes d'aïllament dels complexos. Avui dia el més popular és el sistema TAP-tag (Puig *et al.*, 2001), basat en una doble selecció, primer retenint el complex amb una matriu d'immunoglobulines, via l'etiqueta de proteïna A, i tot seguit retenint l'eluat (per tractament amb la proteasa TEV) en una matriu de calmodulina, mitjançant una segona etiqueta de CBP (*calmodulin binding peptide*). Les proteïnes se separen llavors per electroforesi en gel i s'identifiquen amb MALDI-TOF MS.

La tecnologia dels microxips de proteïnes. A banda de les típiques matrius de caire analític que contenen, per exemple, una bateria d'anticossos fixats a un suport, la tecnologia de microxips de proteïnes pot ser

emprada per a l'anàlisi funcional d'aquest tipus de molècules i, des d'aquest punt de vista, el treball en llevats ha estat pioner. Es tracta d'immobilitzar un conjunt de proteïnes sobre la superfície d'un microxip en condicions no desnaturalitzants de manera que poden ser assajades simultàniament amb una gran varietat de tests bioquímics. Per exemple, es pot marcar una proteïna (o d'altres molècules, com ara lípids, DNA o fàrmacs diversos) de manera fluorescent i investigar-ne la unió al conjunt de proteïnes presents al microxip de manera similar al que es fa per als microxips de DNA (Wolf-Yadlin *et al.*, 2009). Una demostració de la potència d'aquesta tecnologia va ser l'expressió de 5.800 ORF de *S. cerevisiae* com a fusions amb GST, que va permetre la construcció del primer microxip amb un proteoma complet (Zhu *et al.*, 2001). Aquesta eina va ser feta servir posteriorment per identificar substrats *in vitro* per a moltes de les proteïna-cinases de *S. cerevisiae*, en un treball que va marcar una fita en aquest tipus d'estudis (Ptacek *et al.*, 2005).

ELS LLEVATS «NO CONVENCIONALS» COM A MODELS DE RECERCA

El llevat *Schizosaccharomyces pombe* (la paraula *pombe* deriva del suahili, 'cervesa'), a diferència de *S. cerevisiae*, es divideix per fissió binària, de manera similar al que fan les cèl·lules animals. Això ha fet que, des de fa ja molts anys, hagi estat triat com un excel·lent model per estudiar el procés de divisió cel·lular (Yanagida, 2002). Aquestes cèl·lules tenen forma de bastonet d'uns 10 µm (vegeu la figura 1) i són força accessibles a les tècniques de genètica i biologia molecular. El seu genoma, d'uns 14 milions de pb i distribuït en només tres cromosomes, va ser seqüenciat completament l'any

2002 i les dades són de lliure accés (vegeu la taula 1). Conté uns 5.000 gens, dels quals quasi la meitat tenen un o més introns. Tot i que pertany al grup dels ascomicetals (encara que hi ha estudis que els inclouen en els arqueascomicetals), des d'un punt de vista evolutiu *S. pombe* és extremadament distant de *S. cerevisiae* i ha estat proposat que ambdós organismes van divergir fa més de mil milions d'anys. De fet, podríem considerar *S. cerevisiae* i *S. pombe* com a dos organismes model complementaris (Forsburg, 1999).

Altres espècies de llevats són utilitzats en recerca, encara que de manera menys general, i fonamentalment, a causa de determinades propietats específiques. Per exemple, el llevat metilòtrof *Pichia pastoris* s'ha convertit en el llevat d'elecció per a processos de producció industrial de proteïnes, basat en l'ús del seu potent promotor *AOX1* (Cereghino *et al.*, 2000), mentre que *Candida albicans* és investigada per la seva capacitat patogènica i com a model d'invasivitat en animals, i *Debaryomyces hansenii*, tot i que la seva genètica i biologia moleculars estan encara per desenvolupar plenament, sembla un excellent model per estudiar els mecanismes de tolerància salina (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

COM *Saccharomyces cerevisiae* POT SERVIR PER A LA RECERCA EN ALTRES ORGANISMES MÉS COMPLEXOS

Mes enllà de l'interès que té la recerca en *S. cerevisiae*, tant des d'un punt de vista fonamental com aplicat (producció alimentària, biotecnologia, etc.), el treball desenvolupat i els coneixements acumulats en aquest organisme troben aplicació en la recerca que es duu a terme en altres organismes més complexos. Aquesta capacitat de

transferència la podem considerar com a mínim des de dos punts de vista: quan el llevat és l'eina de treball per estudiar funcions específiques d'altres organismes, i quan el llevat és l'organisme en què es descifra un procés fonamental, compartit per altres éssers vius. Les possibles aplicacions són tan diverses que només en podem descriure superficialment uns pocs exemples a continuació.

Eines generals de recerca en biologia que utilitzen llevats o elements derivats

Els YAC com a vectors de clonatge. Els cromosomes artificials de llevat (*yeast artificial chromosome*, YAC) són vectors de clonatge que contenen els elements bàsics de replicació, segregació cromosòmica (com ara *CEN4*) i seqüències telomèriques dels cromosomes de *S. cerevisiae*, juntament amb sistemes de selecció per la presència d'una inserció. D'aquesta manera és possible vehicular fragments de DNA de 50 a més de 2.000 kb, cosa que excedeix de molt la capacitat del vectors preexistents, basats en fags o cosmidis. Aquest sistema, per tant, fa possible l'estudi detallat d'enormes regions intactes de DNA. D'aquesta manera ha estat possible preparar biblioteques completes de genomes complexos com el de *Caenorhabditis elegans* (Coulson *et al.*, 1991) o fins i tot de mamífers com el ratolí (Nusbaum *et al.*, 1999), com a pas previ per seqüenciar-los. A més, els YAC són una alternativa per considerar com a possibles vectors a l'hora de generar animals transgènics (Moreira *et al.*, 2007).

La tècnica del doble híbrid i les seves variants més enllà del llevat. Com hem comentat abans, la tècnica del doble híbrid —o les seves variants, com el doble híbrid revers, el triple híbrid, etc. (Bruckner *et al.*, 2009)— es poden aplicar als objectius més

variats, des d'establir els dominis d'interacció entre dues proteïnes, sigui quin sigui el seu origen (vegetal, animal, etc.) fins al descobriment o validació de nous fàrmacs (Bharucha *et al.*, 2007). Encara més important, el desenvolupament, fa ja més de vint anys, dels fonaments de la tècnica de doble híbrid en llevats, ha establert les bases per posar a punt tecnologies amb el mateix objectiu en altres tipus de cèl·lules, incloent-hi les de mamífers (Lievens *et al.*, 2009).

S. cerevisiae com a hoste per a expressió heteròloga. Des del punt de vista de la producció massiva de proteïnes, *S. cerevisiae* no és potser l'organisme d'elecció, si el comparem amb *E. coli* o fins i tot altres llevats com *P. pastoris*. No obstant això, el fet que *S. cerevisiae* és una cèl·lula eucariòtica que pot ser manipulada amb molta facilitat el fa molt atractiu com a hoste per a l'expressió heteròloga amb finalitats de recerca. La disponibilitat de mutants de tot tipus dona peu a verificar per complementació o rescat fenotípic en *S. cerevisiae* la hipotètica funció de proteïnes de qualsevol origen amb raonables expectatives que, si la proteïna en qüestió requereix modificacions posttraduccionals per adquirir activitat (com ara fosforilació, miristilació, etc.), el llevat disposi de l'arsenal enzimàtic necessari per dur a terme aquestes transformacions (i, si no és així, sempre hi ha la possibilitat d'introduir-hi els elements necessaris). D'aquesta manera, hi ha una llista de gens d'organismes molt diversos, incloent-hi molts gens humans, la funció dels quals (cicle cel·lular, replicació del DNA, apoptosi o senyalització hormonal) ha estat descoberta o confirmada en *S. cerevisiae* (Osborn *et al.*, 2007).

La capacitat de modificar *S. cerevisiae* genèticament de manera controlada permet produir en aquesta cèl·lula processos que són característics de cèl·lules humanes. Això es diu, col·loquialment, «la humanitza-

ció» del llevat. El que es fa és complementar mecanismes existents en el llevat amb els elements necessaris per reconstituir els processos que volem. Un bon exemple és la senyalització que involucra proteïnes G i els receptors acoblats a aquestes (GPCR), que constitueixen avui dia una de les dianes farmacològiques més importants. La senyalització mitjançant els GPCR és molt semblant a la que transmet en *S. cerevisiae* el senyal de feromones, que permet l'acoblament o *mating*. És possible, en principi, expressar en *S. cerevisiae* un GPCR de mamífer i acoblar-ne funcionalment el senyal, bé al de la subunitat α mateixa (codificada pel gen *GPA1*), o a subunitats α de mamífer (natives o quimèriques) coexpressades. La transmissió d'aquest senyal s'efectua normalment a través d'una cascada de MAP-kinases que determina l'expressió de determinats gens, els quals permeten la selecció o fins i tot la quantificació de la intensitat del senyal. A causa de la senzillesa de cultiu i al curt temps de duplicació, aquests sistemes són perfectament adaptables per a l'anàlisi massiva de nous fàrmacs o inhibidors (Minic *et al.*, 2005).

Els llevats com a model de recerca en biomedicina

La recerca en llevats ha constituït un dels pilars fonamentals per al desenvolupament de la bioquímica, la biologia cel·lular i la genètica i biologia moleculars (Brambl, 2009). A tall d'exemples, comentarem només uns pocs casos. D'una banda, els treballs de L. Hartwell, en *S. cerevisiae*, i P. Nurse, en *S. pombe*, que van ser clau per desxifrar els processos que determinen el cicle cel·lular i, que van ser, finalment, guardonats amb el Premi Nobel el 2001. D'altra banda, els estudis de B. Ephrussi, que van permetre caracteritzar el mutants

petite, els quals van suposar el naixement de la genètica mitocondrial. També trobem en els llevats l'origen del concepte de resposta a l'estrès i de proteïnes de xoc tèrmic, d'on ha derivat la noció de xaperones. Avui dia, el llevat (principalment *S. cerevisiae*) és considerat un model vàlid d'estudi per a molts processos fonamentals de la vida, incloent-hi alguns que es consideraven poc rellevants en aquest organisme, com ara la maduració de l'mRNA (Meyer *et al.*, 2009).

Encara que sembli sorprenent, el llevat també s'ha utilitzat amb èxit durant molts anys com un model per a l'estudi de les malalties dels mamífers. A tall d'exemple, la diana cel·lular de la rapamicina, un immunosupressor usat com un fàrmac antirebuig en els trasplantaments de teixits, va ser descobert en el llevat i posteriorment es va verificar en els éssers humans (Heitman *et al.*, 1991). En aquest sentit, el llevat és un valuós element de predicció de la funció dels gens humans: almenys el 31 % de les proteïnes codificades pels gens del llevat tenen homòlegs humans i, a la inversa, gairebé el 50 % dels gens humans implicats en malalties hereditàries troben homòlegs de llevat (Hartwell, 2004). En els darrers anys s'han dut a terme nombroses anàlisis sistemàtiques a la recerca de gens relacionats amb malalties humanes. Si el gen implicat en la malaltia té un homòleg en llevat, és possible estudiar-ne la funció directament. Si, d'altra banda, el gen subjacent de la malaltia està absent en el llevat, però causa la malaltia per un guany de funció deletèria en humans, pot ser encara modelitzada a través de l'expressió heteròloga del gen humà en cèl·lules de llevat. D'aquesta manera s'han fet importants avenços en àrees molt variades, que inclouen les bases moleculars del càncer, de diverses malalties neurodegeneratives (els llevats poden contenir proteïnes prioniques, semblants a les que desenvolupen les encefalopaties es-

pongiformes transmissibles), de malalties mitocondrials o fins i tot l'envelliment (Miller-Fleming *et al.*, 2008; Perocchi *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2010).

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, A.; GOTTSCHLING, D. E.; KAISER, C. A.; STEARNS, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BHARUCHA, N.; KUMAR, A. (2007). «Yeast genomics and drug target identification». *Comb. Chem. High Throughput. Screen.*, 10: 618-634.
- BRAMBL, R. (2009). «Fungal physiology and the origins of molecular biology». *Microbiology*, 155: 3799-3809.
- BRUCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. (2009). «Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology». *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 2763-2788.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. (2000). «Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66.
- COSTANZO, M. [et al.] (2010). «The genetic landscape of a cell». *Science*, 327: 425-431.
- COULSON, A.; KOZONO, Y.; LUTTERBACH, B.; SHOWNKEEN, R.; SULSTON, J.; WATERSTON, R. (1991). «YACs and the *C. elegans* genome». *Bioessays*, 13: 413-417.
- FIELDS, S.; SONG, O. (1989). «A novel genetic system to detect protein-protein interactions». *Nature*, 340: 245-246.
- FORSBURG, S. L. (1999). «The best yeast?». *Trends Genet.*, 15: 340-344.
- GAVIN, A. C. [et al.] (2002). «Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes». *Nature*, 415: 141-147.
- GIAEVER, G. [et al.] (2002). «Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome». *Nature*, 418: 387-391.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; RAMOS, J.; PLEMENITAS, A. (2009). «Halotolerant and halophilic fungi». *Mycol. Res.*, 113: 1231-1241.
- HARTWELL, L. H. (2004). «Yeast and cancer». *Biosci. Rep.*, 24: 523-544.
- HEITMAN, J.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. (1991). «Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast». *Science*, 253: 905-909.

- HO, Y. [et al.] (2002). «Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry». *Nature*, 415: 180-183.
- HUH, W. K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S.; HOWSON, R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. (2003). «Global analysis of protein localization in budding yeast». *Nature*, 425: 686-691.
- ITO, T.; CHIBA, T.; OZAWA, R.; YOSHIDA, M.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. (2001). «A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 4569-4574.
- KUMAR, A. [et al.] (2002). «Subcellular localization of the yeast proteome». *Genes Dev.*, 16: 707-719.
- LENTZE, N.; AUERBACH, D. (2008). «Membrane-based yeast two-hybrid system to detect protein interactions». *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 19: 19.17.
- LIEVENS, S.; LEMMENS, I.; TAVERNIER, J. (2009). «Mammalian two-hybrids come of age». *Trends Biochem. Sci.*, 34: 579-588.
- MEYER, M.; VILARDELL, J. (2009). «The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing». *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, 8: 60-67.
- MILLER-FLEMING, L.; GIORGINI, F.; OUTEIRO, T. F. (2008). «Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders». *Biotechnol. J.*, 3: 325-338.
- MINIC, J.; SAUTEL, M.; SALESSE, R.; PAJOT-AUGY, E. (2005). «Yeast system as a screening tool for pharmacological assessment of G protein coupled receptors». *Curr. Med. Chem.*, 12: 961-969.
- MNAIMNEH, S. [et al.] (2004). «Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles». *Cell*, 118: 31-44.
- MOREIRA, P. N.; POZUETA, J.; PEREZ-CRESPO, M.; VALDIVIESO, F.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MONTOLIU, L. (2007). «Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI». *Transgenic Res.*, 16: 163-168.
- NUSBAUM, C. [et al.] (1999). «A YAC-based physical map of the mouse genome». *Nat. Genet.*, 22: 388-393.
- OSBORN, M. J.; MILLER, J. R. (2007). «Rescuing yeast mutants with human genes». *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, 6: 104-111.
- PEROCCHI, F.; MANCERA, E.; STEINMETZ, L. M. (2008). «Systematic screens for human disease genes, from yeast to human and back». *Mol. Biosyst.*, 4: 18-29.
- PTACEK, J. [et al.] (2005). «Global analysis of protein phosphorylation in yeast». *Nature*, 438: 679-684.
- PUIG, O.; CASPARY, F.; RIGAUT, G.; RUTZ, B.; BOUVERET, E.; BRAGADO-NILSSON, E.; WILM, M.; SERAPHIN, B. (2001). «The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification». *Methods*, 24: 218-229.
- ROUX, A. E.; CHARTRAND, P.; FERBEYRE, G.; ROKEACH, L. A. (2010). «Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes». *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 65: 1-8.
- SHERMAN, F. (1991). «Guide to yeast genetics and molecular biology». *Methods Enzymol.*, 194: 3-21.
- (2002). «Getting started with yeast». *Methods Enzymol.*, 350: 3-41.
- SUTER, B.; AUERBACH, D.; STAGLJAR, I. (2006). «Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond». *Biotechniques*, 40: 625-644.
- TONG, A. H. [et al.] (2004). «Global mapping of the yeast genetic interaction network». *Science*, 303: 808-813.
- TONG, A. H.; BOONE, C. (2006). «Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Methods Mol. Biol.*, 313: 171-192.
- UETZ, P. [et al.] (2000). «A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*». *Nature*, 403: 623-627.
- WACH, A.; BRACHAT, A.; POHLMANN, R.; PHILIPPSEN, P. (1994). «New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast*, 10: 1793-1808.
- WINZELER, E. A. [et al.] (1999). «Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis». *Science*, 285: 901-906.
- WOLF-YADLIN, A.; SEVECKA, M.; MACBEATH, G. (2009). «Dissecting protein function and signaling using protein microarrays». *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13: 398-405.
- YANAGIDA, M. (2002). «The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*». *Genome Biol.*, 3: 1-2.
- ZHU, H. [et al.] (2001). «Global analysis of protein activities using proteome chips». *Science*, 293: 2101-2105.