

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION GENETICA
DE MUTANTES RESISTENTES A PAROMOMICINA
DE LA LEVADURA KLUYVEROMYCES LACTIS**

T E S I S

LETICIA EUGENIA VARGAS PAREDES

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Objetivo	
1- Introducción	3
1.1- Generalidades sobre la cepa en estudio	3
1.2- Clasificación de mutantes extracromosómicos en levaduras	4
1.3- Revisión sobre antibióticos	6
1.4- Síntesis de proteínas	8
1.5- Análisis genético de las mutantes	14
2- Materiales y Métodos	
2.1- Cepas de la levadura <u>Kluyveromyces lactis</u> utilizadas	16
2.2- Cepa de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	16
2.3- Reactivos y medios de cultivo	16
2.4- Esterilización	18
2.5- Purificación de Cepas	18
2.6- Técnicas de cultivo	18
2.7- Determinación de citocromos	19
2.8- Selección de Cepas sensibles a paromomicina	20
3- Inducción, aislamiento y purificación de mutantes resistentes a paromomicina	
3.1- Mutantes espontáneas	20
3.2- Mutantes inducidas	21
4- Caracterización genética de las mutantes aisladas	22

Resultados y Conclusiones

- 1- *Estudio comparativo de los citocromos en cepas "petite positivas" y "petite negativas" bajo diversas condiciones de cultivo* 24
- 2- *Selección de cepas sensibles a paromomicina* 30
- 3- *Caracterización genética de las mutantes obtenidas* 32

Referencias Bibliográficas 39

Objetivo

La finalidad del presente estudio es, empleando la levadura Kluveromyces lactis, inducir y caracterizar genéticamente mutantes resistentes a paromomicina como las descritas en Saccharomyces cerevisiae (11,12) para tratar de conocer el comportamiento de esta levadura "petite negativa" cuyo DNA mitocondrial es aproximadamente la mitad ($11.4 \mu\text{m}$) del de S. cerevisiae ($25 \mu\text{m}$) (13).

1- Introducción-

El aislamiento de mutantes extracromosómicas de resistencia a antibióticos en Saccharomyces cerevisiae, ha desencadenado gran interés pues ha permitido una mejor comprensión del sistema genético mitocondrial. Este tipo de herencia extracromosómica que no sigue los lineamientos establecidos por Mendel, fué primeramente observada en plantas superiores en los inicios del siglo, por Correns y Bauer y más adelante descrita en algas, hongos, protozoarios y mamíferos. 1)

1.1- Generalidades sobre la cepa es estudio.

Kluveromyces lactis, al igual que S. cerevisiae, es un anaerobio facultativo capaz de crecer con o sin mitocondria funcional, en el primero de los casos, en presencia de oxígeno pudiendo utilizar sustratos respirables como etanol, lactato o glicerol y en el segundo supliendo la funcionalidad de la mitocondria por una fuente energética como glucosa o un azúcar metabolizable por medio de la glucólisis.

Es esta una gran ventaja pues se puede trabajar con células que teniendo una mitocondria alterada o bloqueada en sus funciones por inhibidores específicos son aun capaces de crecer.

1.2- Clasificación de mutantes extracromosómicas en levaduras. 2)

1.2.1- Mutantes "petite"

Si S. cerevisiae es sembrada sobre un medio conteniendo pequeñas cantidades de glucosa, una proporción variable pero considerablemente alta (del 1%) de las colonias que crecen son pequeñas ("petite"). Tales colonias al ser probadas por replica sobre medios conteniendo fuentes de carbono no fermentables tales como glicerol, etanol o lactato no crecen, carecen de los citocromos a, b y c₁ y son respiratorio-deficientes.

Entre las mutantes "petite" se distinguen dos tipos de acuerdo a su forma de herencia. 2)

a)- Petite nuclear o segregacional- esta mutación surge espontáneamente con frecuencias de 10^{-6} a 10^{-8} y puede ser inducida por mutágenos tales como N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidina, rayos X y ultravioleta. Se caracteriza por dar una segregación Mendeliana (2:2) en los productos de la meiosis.

b)- Petite citoplásmica, vegetativa ó ρ^- - la mayoría de las "petite" espontáneas son de este tipo y están caracterizadas por ser mutaciones pleiotrópicas y en las que se afecta el contenido de los citocromos b, c₁ y a+a₃. Estas surgen con frecuencias de 0.1% a 20% dependiendo de la cepa y condiciones de cultivo. También pueden ser inducidas por una gran variedad de mutágenos principalmente colorantes aromáticos polinucleares como euflavina

y bromuro de etidio 3), los cuales en cultivos en crecimiento pueden inducir la formación de "petite" hasta en un 100%.

Esta mutación puede subdividirse en : neutral (ρ^0) y supresora (ρ^-) de acuerdo a su comportamiento en cruzas con la cepa silvestre (ρ^+). En una crusa de una petite neutral con una cepa silvestre, la progenie obtenida es ρ^+ , la esporulación de tales diploides da patrones de segregación 4:0 para el fenotipo ρ^+ contra el ρ^- .

Cuando se cruza la petite supresora con la cepa testigo ρ^+ da ambos tipos de diploides ρ^- y ρ^+ , la proporción de los diploides ρ^- puede variar desde 1% a 100% y es una medida de la supresividad de la cepa haploide ρ^- . La esporulación de los diploides ρ^+ da segregaciones de 4:0 $\rho^+ : \rho^-$. Los diploides ρ^- no pueden ser esporulados normalmente, la esporulación se efectúa tan pronto se ha fusionado el cigoto observando una segregación 0:4 $\rho^+ : \rho^-$; toda la progenie es "petite".

1.2.2- Mutantes de resistencia a antibióticos.

Durante varios años las únicas mutantes mitocondriales de las que se tuvo conocimiento fueron las petite. En 1968 dos grupos de investigadores (Thomas y Wilkie y Linnane y colaboradores) describieron las mutantes extracromosómicas resistentes al antibiótico eritromicina.

Posteriormente se aislaron mutantes resistentes a los antibióticos cloranfenicol, oligomicina, paromomicina, antimicina etc.

Todos estos antibióticos interfieren específicamente con las funciones de la mitocondria sin alterar en forma apreciable las del resto de la célula.

En Kluyveromyces lactis unicamente se han descrito mutantes de resistencia a los antibióticos oligomicina, eritromicina, cloranfenicol y antimicina. 5)

1.3- Resistencia sobre antibióticos.

Han sido usados normalmente tres grandes grupos de antibióticos en estudios de genética mitocondrial: 2)

1.3.1- Inhibidores ribosomales activos contra la subunidad 50S del ribosoma 70S, tales como cloranfenicol, espiramicina y eritromicina.

1.3.2- Inhibidores ribosomales de la subunidad 30S tal como paromomicina.

1.3.3- Inhibidores de la fosforilación oxidativa mitocondrial tales como: oligomicina, rutamicina, venturicidina y trietilistaño entre otros.

La resistencia observada puede ser teóricamente conferida por:

- a)- Cambios en la permeabilidad celular,
- b)- Cambios en la permeabilidad mitocondrial,
- c)- Mecanismos de detoxificación citoplásmica y
- d)- Cambios en el sitio de acción de la droga en la mitocondria.

Resistencia solamente por cambios de los tipos b y d son probablemente debidos a mutaciones mitocondriales. 2)

Se sabe que los antibióticos aminoglicósidos como la paromomicina y neomicina inhiben la síntesis de proteínas por unión con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Efectos inhibitorios de aquellos se han descrito también para las células de levadura.

En base a sus efectos en S. cerevisiae los antibióticos aminoglicósidos están comprendidos en dos grupos. 6,2)

El primero de ellos agrupa a la neamina, kanamicina, estreptomycin y utomicina; los cuales tienen menores efectos en el crecimiento de células de levadura y sobre la síntesis de proteína in vitro, excepto a concentraciones altas.

El segundo grupo incluye la neomicina B, neomicina C y paromomicina; estos actúan de manera compleja sobre el crecimiento y sobrevivencia de las células de levadura, inhibiendo apreciablemente la incorporación de aminoácidos por mitocondria y ribosomas citoplásmicos in vitro.

El grado de inhibición en el crecimiento es proporcional al logaritmo de la concentración de la droga, sobre todo en medios con glicerol. 2). Cuando el cultivo contiene huellas de glucosa y cantidades pequeñas de paromomicina el crecimiento no se afecta en S. cerevisiae; pero si se incrementa la concentración de manera significativa ocurre una inhibición hasta del 50%.

Inhibidores específicos de la síntesis de proteínas mitocondriales tales como eritromicina, impiden la síntesis de los citocromos $a+a_3$, b y c_1 en S. cerevisiae pero, la síntesis de proteínas ribosomal citoplásmica y la viabilidad celular no es afectada en presencia del antibiótico, observándose crecimiento en medios que contienen glucosa.

La neomicina actúa de manera similar sobre la formación de citocromos 2) pero las concentraciones necesarias para producir

tales efectos son menores que las empleadas con paromomicina .

Cuando las células se encuentran en medios adicionados de glucosa la magnitud del efecto producido por el antibiótico sólo ocurre a concentraciones mayores en relación con las usadas en medios con glicerol.

In vitro el sistema sintetizador de proteínas mitocondrial resulta aproximadamente veinticinco veces más sensible a paromomicina y cien veces más sensible a la neomicina que el citoplásmico ribosomal.

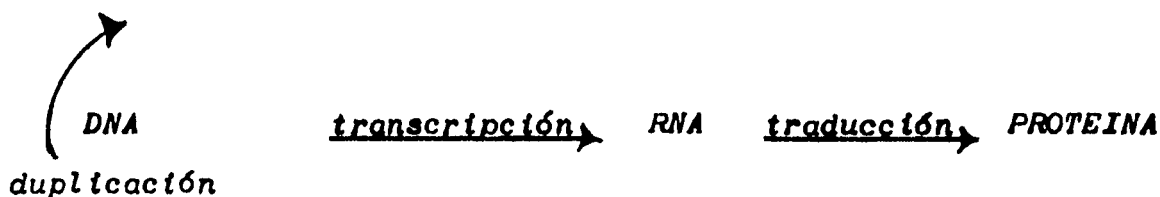
Concentraciones altas de neomicina y paromomicina en el medio de cultivo con glicerol dan lugar a dos divisiones celulares ya que las enzimas requeridas para el crecimiento posterior no son sintetizadas.

Sin embargo, en presencia del antibiótico las células crecen por varias generaciones en medios con glucosa, ya que derivan su energía de glicólisis.

Todos estos estudios se han llevado a cabo en S. cerevisiae pero no se sabe nada del efecto de la droga en Kluuveromyces sp.

1.4- Síntesis de Proteínas.

La información genética del DNA se transfiere a moléculas de RNA, estas actúan como moldes primarios que ordenan las secuencias de aminoácidos en las proteínas.8)



Los aminoácidos se combinan con moléculas transportadoras de RNA para formar los complejos AA transportador (AA + tRNA).

Cada transportador (tRNA) tiene afinidad química por una secuencia de tres nucleótidos específicos del RNA mensajero, funcionando como adaptadores o traductores del mensaje llevado por el mRNA.

Para que el aminoácido pueda reaccionar, debe ser activado, esto se logra cuando los aminoácidos reaccionan con una molécula de ATP. El aminoácido y el ATP forman el complejo AMPNAA (aminoácido activado), el aminoácido es reconocido por la enzima activante (aminoacil-tRNA-sintetasa) específica para los diferentes aminoácidos.

Después de la activación, las moléculas de AA NtRNA difunden a los ribosomas, partículas en cuya superficie se forman los enlaces peptídicos, constan de dos subunidades, la más grande tiene un tamaño casi del doble de la menor y están constituidas por aproximadamente la mitad de proteínas y la mitad de rRNA.

Los moldes activos lo constituyen una fracción de RNA llamado mensajero, este se liga en forma reversible a la superficie de la subunidad ribosómica menor (en un medio con baja concentración del ión Mg^{2+} puede ser removida sin afectar la integridad del ribosoma).

Este molde porta el mensaje genético desde el gen hasta los ribosomas y es denominado RNA mensajero, uniéndose a los ribosomas se desplaza a lo largo de ellos de tal manera que coloca codones sucesivos en posición adecuada para seleccionar los precursores AA NtRNA correctos.

Las cadenas de proteínas crecen en forma escalonada, comenzando por el extremo amino terminal por lo que el extremo en crecimiento debe estar siempre terminado por una molécula de tRNA.

Cada ribosoma 70S contiene dos cavidades en las cuales pueden insertarse moléculas de tRNA. Son los sitios "P" (peptídico) y "A" (amino-acilo).

Las moléculas precursoras AA \backslash tRNA entran normalmente primero en la cavidad "A", permitiendo así la formación posterior de un enlace peptídico con la cadena en crecimiento, sostenida en el sitio "P". Esto transfiere la cadena naciente al sitio "A", a continuación la acción de la enzima translocasa regresa la cadena naciente al sitio "P". Al mismo tiempo, el molde mRNA ligado a la subunidad ribosómica menor se desplaza para colocar el codón n+1 en la posición que ocupaba anteriormente el codón n. El sitio "A" ahora vacío, queda libre para aceptar una nueva molécula de AA \backslash tRNA, cuya especificidad se determina mediante el apareamiento correcto de bases entre el anticodón y el codón de mRNA correspondiente.

Tanto la unión del AA \backslash tRNA al sitio "A" como el proceso de translocación requieren la ruptura de ATP en ADP y \textcircled{P} .

Para la terminación de la cadena se requiere la presencia de un codón que indique que la prolongación polipeptídica debe detenerse, además de ser indispensable la acción de un factor liberador que interprete la señal terminadora de cadena.

La terminación de la síntesis de las cadenas es seguida por la disociación de los ribosomas en las subunidades grande y pequeña, las cuales se unirán sólo cuando el aminoácido iniciador se combine con el complejo mRNA-subunidad pequeña.

La sección de una molécula de mRNA que está en contacto con un ribosoma individual es relativamente corta, esto permite a

una molécula de *miRNA* actuar sobre varios ribosomas (polirribosomas) al mismo tiempo. (Figura 1)

Una gran cantidad de antibióticos han sido de utilidad en el esclarecimiento de las etapas de elaboración de las proteínas g).

En la figura 2 se presenta la estructura del antibiótico paromomicina un inhibidor de la síntesis de proteína, y de acción sobre la subunidad ribosómica menor, el cual fué elegido para tratar de obtener mutantes resistentes de herencia preferentemente mitocondrial en la levadura K. lactis.

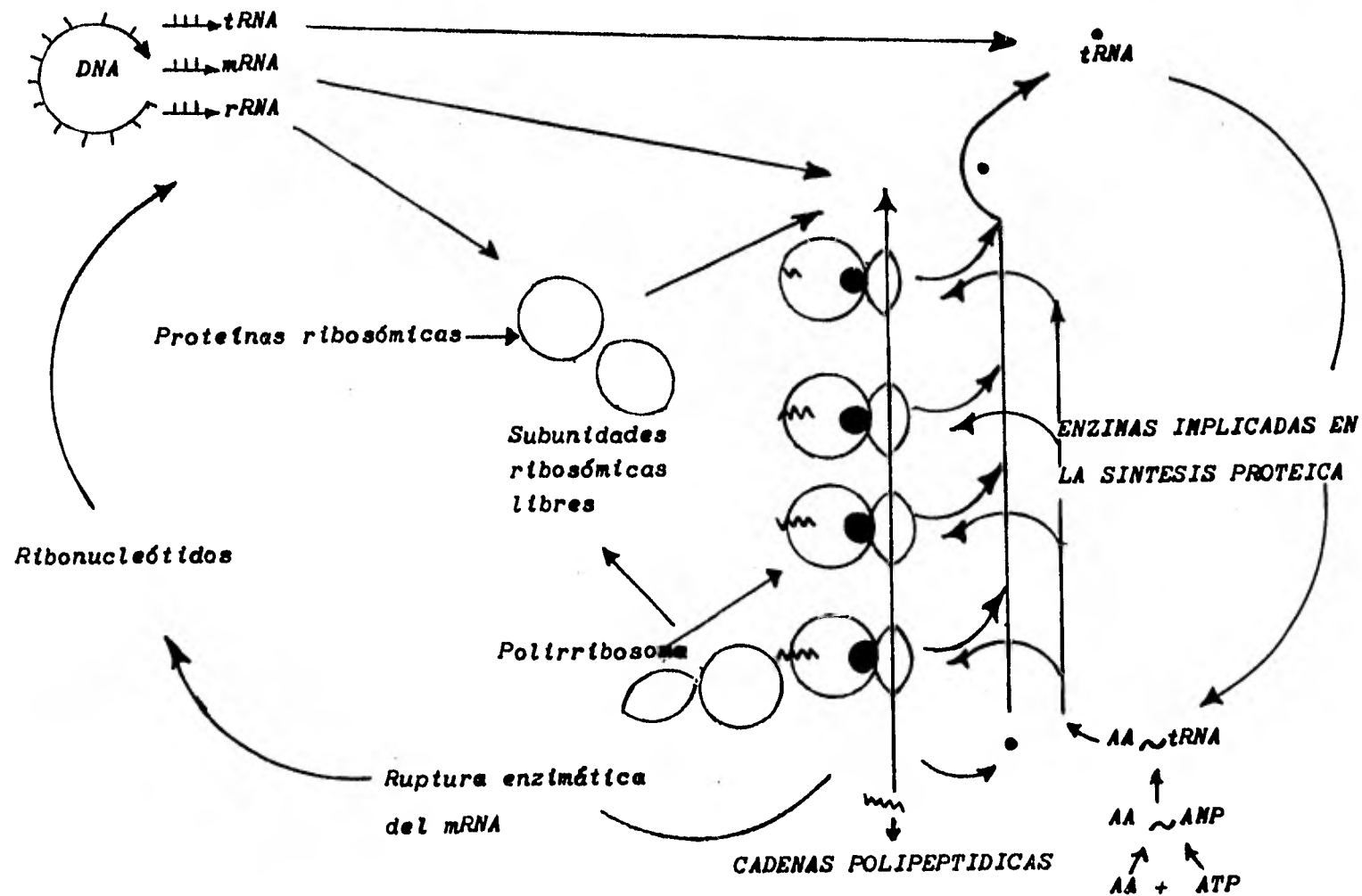


FIGURA 1- SINTESIS PROTEICA

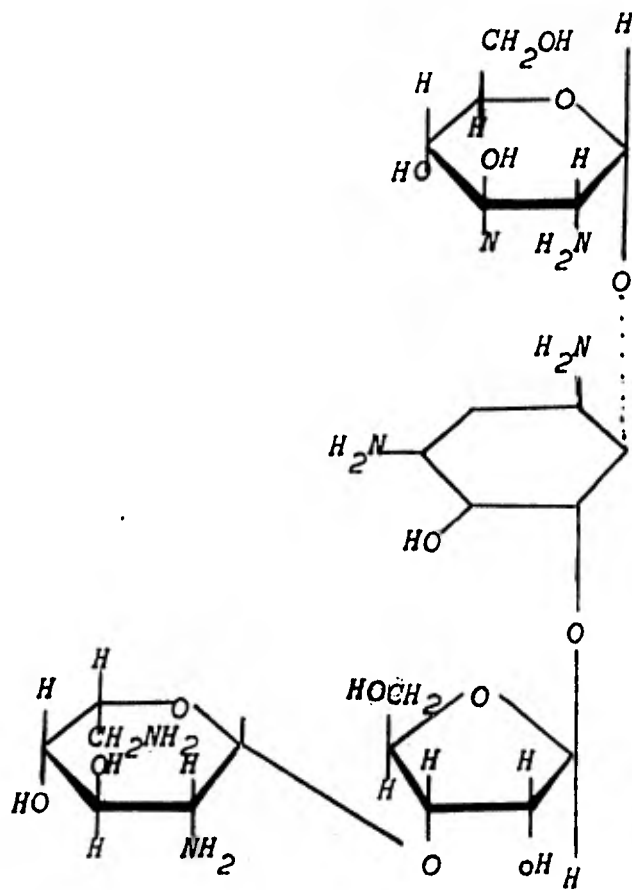
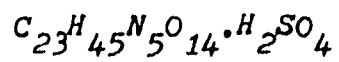


FIGURA 2 - SULFATO DE PAROMOMICINA, antimicrobiano.



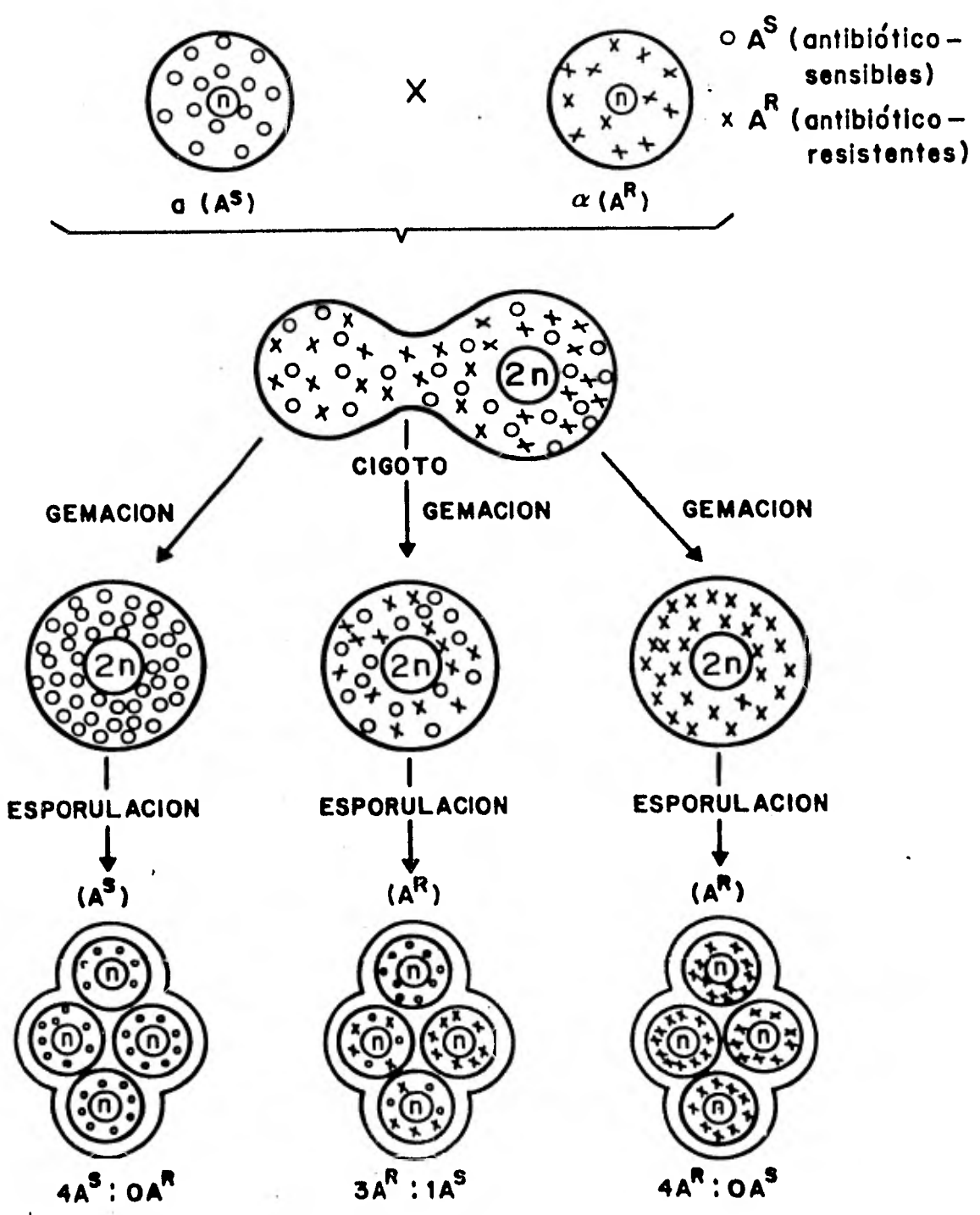
1.5- Análisis genético de las mutantes.2)

Han sido establecidos diversos criterios para la identificación de mutantes mitocondriales, pero los más comúnmente empleados son:

1.5.1- La prueba de la segregación mitótica en diploides, se basa en el hecho de que la progenie de cigotos muestra segregación de los marcadores mitocondriales parentales durante la mitosis es decir, la progenie diploide de cruizas entre cepas resistentes y sensibles consta de una mezcla de células sensibles y resistentes. La proporción entre las dos formas depende de la polaridad de transmisión. (Figura 3)

1.5.2- La segregación no-Mendeliana durante la meiosis - Durante la meiosis los marcadores mitocondriales no segregan 2:2 como los factores nucleares sino que dan segregaciones variables dependiendo de la distribución de las partículas extracromosómicas en la progenie. (Figura 3)

1.5.3- Es posible demostrar la herencia extracromosómica de la mutación por la pérdida de determinantes de resistencia con la inducción "petite" con bromuro de etidio.4)



Los marcadores nucleares segregan 2:2

FIGURA 3

2- MATERIALES Y METODOS.

2.1- Cepas de la levadura Kluyveromyces lactis utilizadas:

WM37	: α ,his ₁ .
KA5-11B	: α ,ade ₁ .
WM27	: α ,lis ₁ .
W600B	: α ,ade ₁ ,ade ₂ ,leu ₁ .
K9	: α ,met ₁ .
KA5-4C	:a,ade ₂ .
KA9-11C	:a,his ₁ ,lis ₁ .
KA9-13D	:a,lis ₁ .
Mn9b	: α ,lis ₁ ,E ^R ₁₉ ,O ^R ₂₇₂ .
106-E ^S	:a,arg ₁ .

2.2- Cepa de Saccharomyces cerevisiae:

D311-3A :a,lis₂,his₁,trp₂.

2.3- Reactivos y Medios de cultivo.

Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.0

KH ₂ PO ₄	2.62 g
K ₂ HPO ₄	7.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Medios de Cultivo:

a)- Medio con Extracto de malta (ME).

Extracto de malta	5.00 g
Agar	3.00 g
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

b)- Medio mínimo (SD)

Base nitrogenada de levadura	
sin aminoácidos	4.02 g
Dextrosa	6.00 g
Agar	6.00 g
Agua destilada c.b.p.	600 ml.

c)- Medio mínimo con aminoácidos (SD+AA)

El mismo medio mínimo adicionado de los siguientes aminoácidos:

Sulfato de adenina	20 mg/l.
L-arginina	20 mg/l.
L-histidina	20 mg/l.
L-leucina	30 mg/l.
Hidrocloruro de lisina	30 mg/l.
L-metionina	20 mg/l.
L-triptófano	20 mg/l.
L-uracilo	20 mg/l.

d)- Medio completo con glucosa (YPAD)

Extracto de levadura	6.00 g
Peptona	6.00 g
Dextrosa	12.00 g
Sulfato de adenina	48.00 mg
Agar	12.00 g
Agua destilada c.b.p.	600 ml.

e)- Medio completo con glicerol (YPAG)

Extracto de levadura	6.00 g
Peptona	6.00 g
Glicerol	18.00 ml.
Sulfato de adenina	48.00 mg
Agar	12.00 g
Agua destilada c.b.p.	600 ml.

f)- Medio completo con glucosa y amortiguador

Solución 1M de Na_2HPO_4	1.0% (V/V)
Solución 1M de KH_2PO_4	4.0% (V/V)

y los componentes del medio YPAD.

g)- Medio completo con glucosa y glicerol (YPADG)

Dextrosa 0.1% (V/V)

adicionado al medio YPAG.

h)- Medio completo de glicerol con paromomicina (YPAG+PAR)

Medio YPAG

Sulfato de paromomicina 4.0 mg/ml

el antibiótico se adicionó de inmediato al medio estéril caliente.

2.4- Esterilización

La esterilización del material y reactivos se efectuó en un autoclave a 120°C y a 20 lb. de presión durante veinte a treinta minutos.

2.5- Purificación de Cepas.

Tanto las cepas silvestres como las mutantes fueron purificadas antes de utilizarlas ya que, de esta manera se evitaron interpretaciones erróneas causadas por la influencia de células con genotipo y fenotipo diferentes a la cepa que se investiga.

Esta se realizó inoculando la cepa a purificar sobre medio sólido (YPAD) estriando toda la superficie para descargar poco a poco el inóculo y poder obtener colonias individuales.

2.6- Técnicas de Cultivo.

Las condiciones de esterilidad dedicadas al cultivo incluyen: un área libre donde las corrientes de aire no sean directas, siendo necesario el empleo de mecheros Bunsen para mantener dicha zona aislada de contaminantes.

2.6.1- Las cepas purificadas se siembran en el medio seleccionado y se incuban las células a 30°C, en los cultivos líquidos la incubación se realizó con agitación continua (250-300

r.p.m.) en un agitador New Brunswick.

2.6.2- Tiempo de incubación.

El tiempo de incubación fué de 24 y 48 horas para los medios completos (YPAD, YPAG) y aquellos conteniendo aminoácidos, no así en el caso de cultivos conteniendo antibióticos en los cuales la incubación se efectuó hasta la aparición de crecimiento.

2.6.3- Recolección.

La recolección de las células se llevó a cabo centrifugando los cultivos a 2000 r.p.m. durante cinco a diez minutos, el paquete celular se lavó tres veces con agua destilada estéril.

2.6.4- Cuantificación.

Para la determinación del número de células se empleó la cámara de Neubauer y para ello se preparó una suspensión de aproximadamente 10^9 células/ml., y de aquí se hizo una dilución 1:1000 en solución amortiguadora de fosfatos a partir de la cual se determinó el número de células por ml.

2.7- Determinación de Citocromos.

Para comprobar el comportamiento de citocromos respiratorios en una cepa "petite-negativa" estudiada, en relación a una cepa "petite-positiva" se procedió a un estudio espectroscópico de los mismos lo que permitió la apreciación de los citocromos bajo diversas condiciones de cultivo. 2)

Las cepas por trabajar se purificaron y sembraron en medios YPAD líquido, para obtener células jóvenes, con las que se inocularon cultivos diversos a razón de 10^6 células/ml. La incubación se efectuó hasta obtener crecimiento (usualmente 24 horas), y se procedió a la recolección y cuantificación de las células. El pa

quete celular se resuspendió en un volumen similar de agua y se diluyó en proporción 1:5, los espectros se lograron al registrar en un espectrofotómetro Aminco-Chance de doble rayo la absorción en el rango de 480 a 650 nm. utilizando como blanco una suspensión de 1.35 g de leche Difco en 9.4 ml de agua destilada de diluciones: 2:5, 1:5 ó 1:10 dependiendo de la concentración de células.

2.8- Selección de Cepas sensibles a paromomicina.

La naturaleza extracromosómica que confiere resistencia a paromomicina se ha descrito en levaduras "petite-positivas" como Saccharomyces cerevisiae, no así en Kluveromyces lactis.

Se sabe que la paromomicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en bacterias y la síntesis de proteínas mitocondriales en S. cerevisiae.

Con el fin de seleccionar cepas sensibles a paromomicina en las que fuera factible la inducción de mutantes resistentes a este antibiótico, las diferentes cepas se replicaron en medio completo (YPAD e YPAG) y en YPAG con amortiguador de fosfatos adicional de concentraciones variables de droga, y se incubó durante cuatro días a 30°C. De las placas se aislaron las colonias que habiendo desarrollado en medios sin antibióticos, manifestaron mayor dificultad de crecimiento en presencia de la droga.

3- Inducción, aislamiento y purificación de mutantes resistentes a paromomicina.

3.1- Mutantes espontáneas- a partir de cultivos frescos de las cepas sensibles al antibiótico se inocularon 10^7 células en placas de YPAG conteniendo 4 mg/ml de paromomicina, concentración

en la que todas las cepas probadas no manifestaron crecimiento. Las placas sembradas se incubaron hasta la aparición de crecimiento, las colonias obtenidas se purificaron y se comprobó la resistencia sembrando las colonias en medios completos y en medios YPAG+PAR 4 mg/ml.

3.2- Mutantes inducidas- Existen diversos mutágenos que inducen la formación de mutantes extracromosómicas en un porcentaje muy alto, tal como las sales de Mn^{++} 9), esto nos llevó a emplearlas para tratar de obtener mutantes extracromosómicas resistentes a paromomicina. El experimento se inició con un número aproximado de 10^6 células/ml las que fueron sembradas en medio YPAD con diferentes concentraciones de $MnCl_2$ y $MnSO_4$ y se incubaron a $30^{\circ}C$ con agitación durante 48 y 72 hrs.

Para la selección de mutantes resistentes se usó medio YPAG +PAR 4 mg/ml. Las mutantes se purificaron y su resistencia se comprobó de acuerdo a lo descrito para las mutantes espontáneas.

Se llevó a cabo una segunda mutagénesis empleando las mismas cepas pero, ampliando el rango de concentraciones de $MnCl_2$ y $MnSO_4$ y con reducción en el tiempo de exposición a 24 y 48 hrs. en presencia de amortiguador de fosfatos. La selección de las mutantes resistentes en este caso se efectuó sobre YPAG+PAR 4 mg/ml e YPAG+PAR 2 mg/ml.

Se sabe que la presencia de varias mutaciones citoplásmicas de resistencia en una cepa, favorecen la inducción de una mutación más, razón por la cuál se usó la cepa $Mn9b E^R O^R$ que lleva los factores de resistencia a eritromicina y a oligomicina para tratar de obtener mutantes de resistencia a paromomicina de naturaleza extracromosómica; se usaron las mismas concentraciones de

$MnCl_2$ y $MnSO_4$ y los mismos tiempos de tratamiento.

4- Caracterización genética de las mutantes aisladas-

Para caracterizar genéticamente las mutantes aisladas independientemente del método que se empleó para su obtención, la cepa mutante se cruzó con una cepa silvestre de sexo contrario y requerimientos auxotróficos complementarios, sensible al antibiótico empleando el método de la cruce en masa en medio de MEi. La incubación se efectuó a 30°C hasta observar por microscopía la presencia de cigotos, los que se sometieron a esporulación y análisis de tetradas.

4.1- Análisis genético de las mutantes aisladas-

Tanto las mutantes aisladas en forma espontánea como las inducidas con manganeso se caracterizaron genéticamente siguiendo dos criterios:

a)- Segregación de la resistencia en diploides durante la mitosis.

b)- Segregación de la resistencia durante la meiosis, empleando el procedimiento de análisis de tetradas.

a)- Segregación de la resistencia en diploides durante la mitosis. Se observó una aparente segregación mitótica de la resistencia en diploides, lo que parecía indicar la presencia de factores extracromosómicos responsables de la resistencia a paromomicina. Para comprobarlo se llevó a cabo el análisis de los productos de la meiosis, seleccionando diploides con fenotipo P^R (resistentes) y P^S (sensibles).

b)- Con este fin se empleo el análisis de tetradas, para lo

cual las ascas fueron tratadas enzimáticamente con β -glucuronidasa del caracol de jardín Helix sp solución al 50% (laboratorios Sigma) en proporción 3:1 a temperatura ambiente y durante 15 minutos.

La disección de las tetradas para separar los productos de la meiosis se llevó a cabo microscópicamente 10) con el uso de un micromanipulador Leitz. El contenido de cada tetrada fué colocado sobre medio YPAD para su germinación y posteriormente fueron probados sobre medios completos y medios conteniendo el antibiótico para determinar las características hereditarias.

RESULTADOS

1- Contenido de citocromos.

En las figuras 4 y 5 observamos los espectros de absorción de las cepas WM27 y D311-3A cuando no están afectados por algún inhibidor específico de la síntesis de proteínas mitocondrial, apareciendo los tres picos en las longitudes de onda características para cada uno.

Con glucosa en el medio de cultivo, los citocromos $a+a_3$ y b están disminuidos no así el citocromo c; mientras que en el medio conteniendo glicerol ambos están presentes en la proporción esperada.

En presencia de inhibidores (figuras 6 y 7) como cloranfenicol y paromomicina en medios adicionados con glucosa, los citocromos $a+a_3$ y b están totalmente ausentes en S. cerevisiae (D311-3A).

En el caso de K. lactis el cloranfenicol en medios con glucosa inhibe también la síntesis de citocromos $a+a_3$ y b pero en el caso de paromomicina en el medio de glucosa con amortiguador no se observa inhibición. (Tabla 1). (Posteriormente se vio que esto se debió a la aparición de mutantes resistentes).

Para este estudio se usó la cepa WM27 debido a que es menos sensible a la paromomicina que la cepa WM37.

YPD+ AMORTIGUADOR DE FOSFATOS

WM27

YPD

YPG

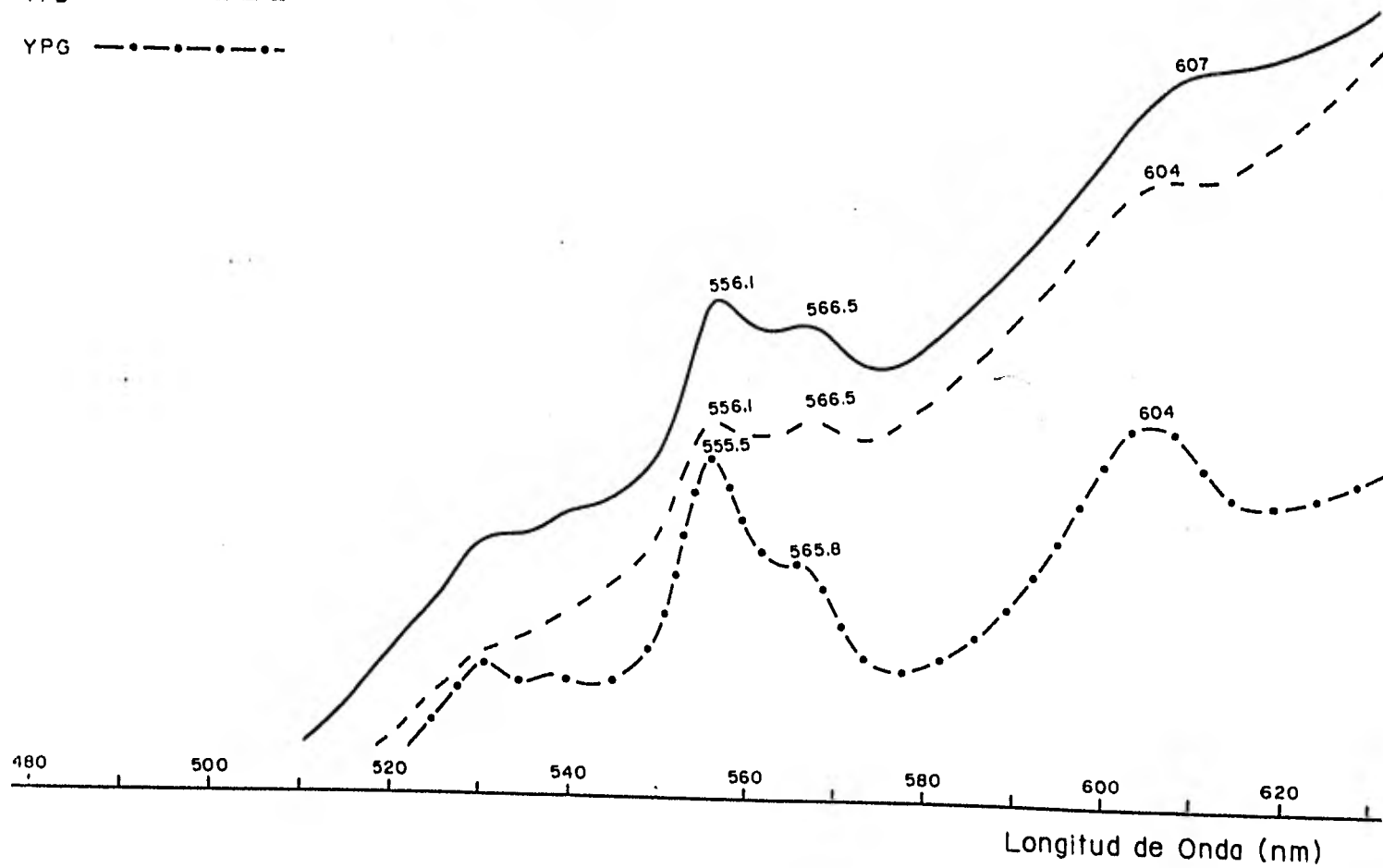


FIGURA 4

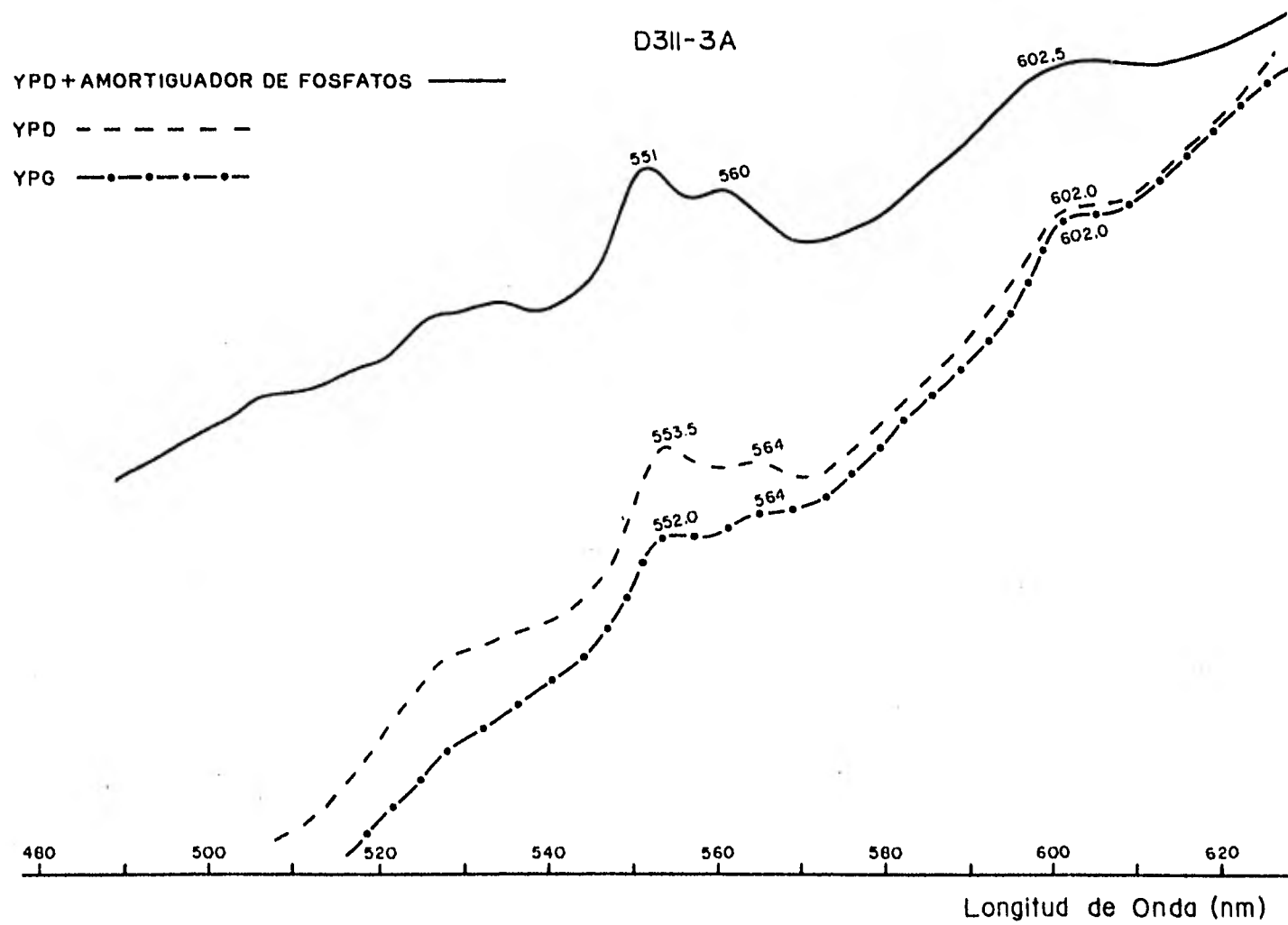


FIGURA 5

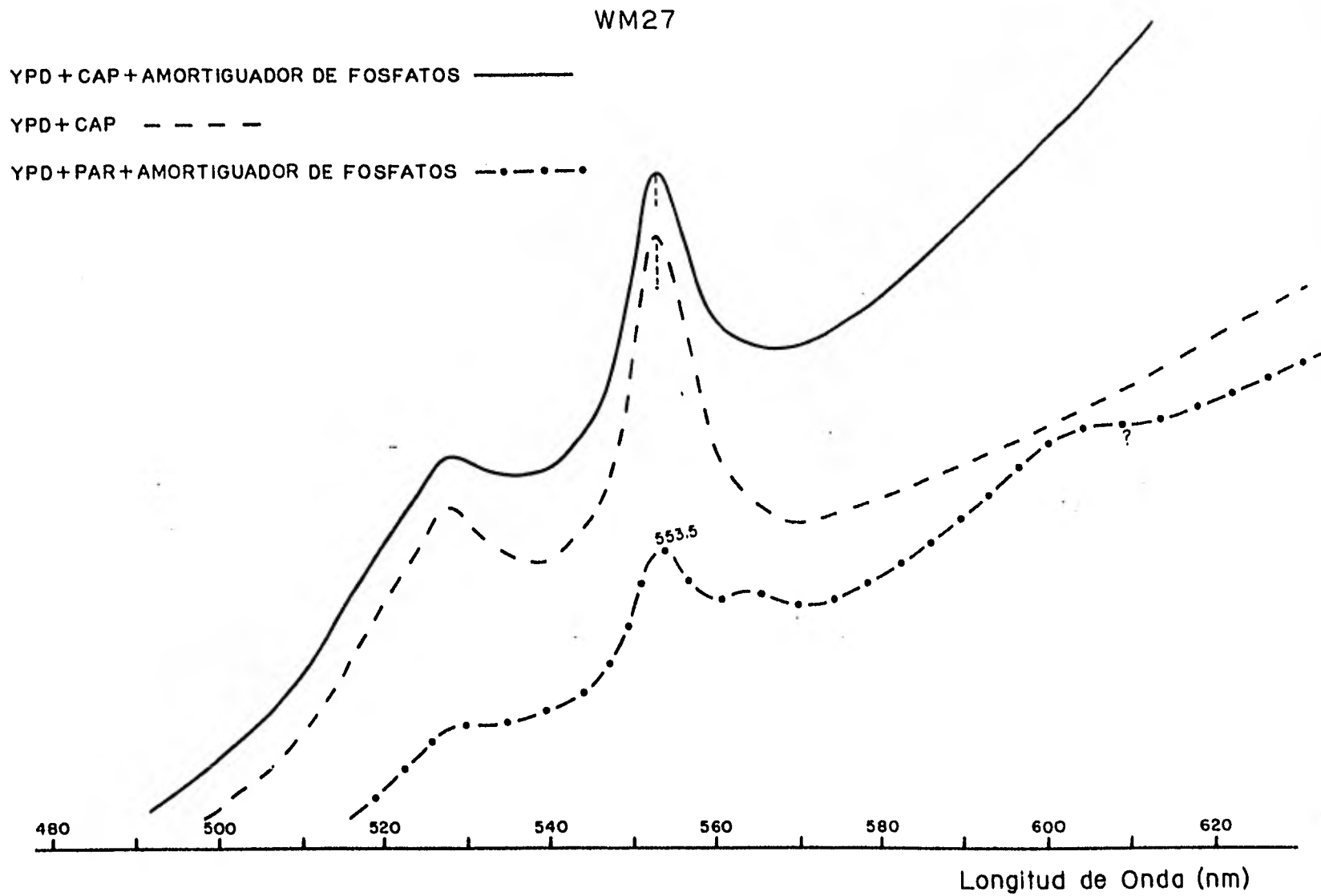


FIGURA 6

D311-3A

- 1 YPD + CAP + AMORTIGUADOR
- - - 2 YPD + CAP
- 3 YPD + PAR + AMORTIGUADOR

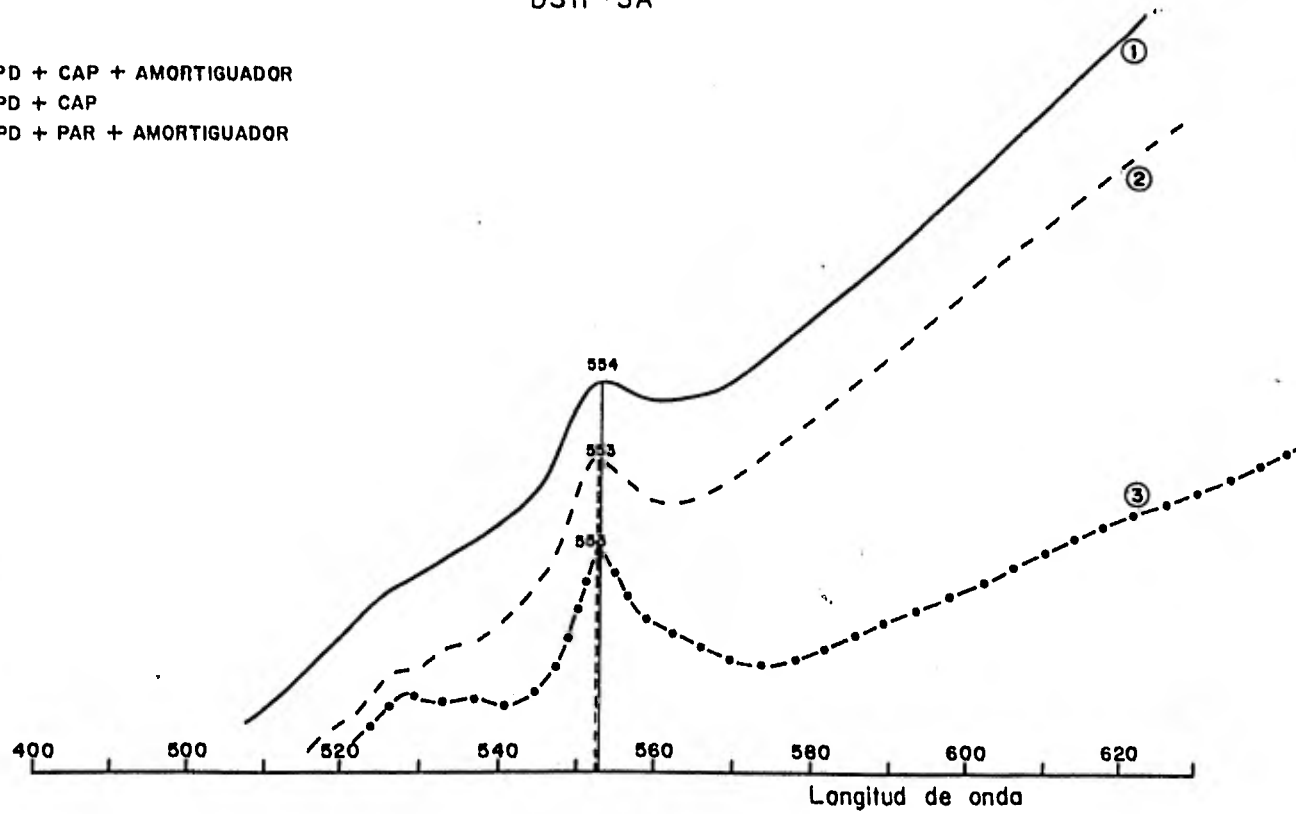


FIGURA 7

T A B L A 1

	CEPA	YPD	YPD+AMORTI- GUADOR.	YPD+AMORTI- GUADOR+PAR.	YPD+CAP.	YPD+AMORTI- GUADOR+CAP.	YPG
	WM27	(2.6x10 ⁸)*	(2.78x10 ⁸)	(1.42x10 ⁸)	(1.88x10 ⁸)	(1.34x10 ⁹)	(2.99x10 ⁸)
Citocromo	c	++	+	++	+++	+++	++
"	b	+	+	+	0	0	+
"	a+a ₃	+	+	+	0	0	++
	D311-3A	(1.22x10 ⁸)	(0.86x10 ⁸)	(0.61x10 ⁸)	(1.13x10 ⁸)	(1.25x10 ⁸)	(1.04x10 ⁸)
Citocromo	c	+	+	++	++	+	+
"	b	+	+	0	0	0	+
"	a+a ₃	+	+	0	0	0	++

Estudio comparativo de los citocromos en la cepa "petite negativa WM27 (*Kluuveromuces lactis*) y la cepa "petite positiva D311-3A (*Saccharomuces cerevisiae*).

* Entre paréntesis se da el número de células/ml empleadas en la determinación de los espectros.

2.8 - Selección de cepas sensibles a paromomicina.

En la siguiente tabla podemos observar la sensibilidad de diferentes cepas de *Kluyveromyces lactis* al antibiótico, la concentración que inhibió totalmente el crecimiento de las células fue de 4mg/ml y ésta, salvo en raras ocasiones, se utilizó para todos los estudios. Entre las cepas más sensibles está WM37 que no crece aún en concentraciones más bajas de 0.5 mg/ml, esta cepa fue elegida para obtener mutantes resistentes así como la cepa W600B que tiene factor de compatibilidad complementario.

T A B L A 2

CEPA	YPAD	YPAG	SULFATO DE PAROMOMICINA (mg/ml)					FENOTIPO DE FOSFATOS.
			0.5	1.0	2.0	4.0	4.0+AMORTIGUADOR	
WM37	++	++	-0	-0	-0	0	-0	α, his_1 .
KA5-11B	++	++	+	+	0	0	-0	α, ade_1
WM27	++	++	+	+	-	0	+	α, lis_1
W600B	++	++	+	+	0	0	-0	$\alpha, ade_1, ade_2, leu_1$
K9	++	++	+	\pm	-	0	-0	α, met_1
KA5-4C	++	++	-0	-0	-	0	-0	α, ade_2 .

No se obtuvieron mutantes espontáneas resistentes a paromomicina de la cepa WM37, solo se logró el aislamiento de cuatro mutantes a partir de la cepa W600B.

Por lo que respecta a la inducción de mutantes resistentes a paromomicina no fué posible obtenerlas de la cepa WM37, cuando se efectuó la mutagénesis a 48 y 72 horas, por lo que se redujo el tiempo de exposición y se adicionó una concentración mayor, apareciendo colonias mutantes cuando se aislaron sobre el medio conteniendo paromomicina en concentraciones menores, principalmente a las 24 horas de tratamiento. Además conforme se incrementa la concentración del agente mutagénico se reduce notablemente la aparición de colonias.

Por el contrario, para la cepa W600B el número fue apreciable sobre todo en concentraciones bajas de los mutágenos, especialmente en el medio YPADG.

La mutagénesis con la cepa Mn9b $E^R O^R$ dió un número de colonias resistentes a paromomicina elevado pero menor en relación al obtenido cuando se trabaja con la cepa W600B (Tablas 3,4 y 5).

De los resultados se deduce que la cepa WM37 resultó ser más afectada por ambos mutágenos, aún en concentraciones pequeñas. Sólo en la segunda mutagénesis usando el amortiguador de fosfatos se pudieron obtener algunas colonias mutantes resistentes a paromomicina, pero se observó que el amortiguador dió lugar a la precipitación de las sales, con lo que la concentración efectiva del manganeso en el medio descendió.

Con W600B se tuvo crecimiento aún en concentraciones mayores de los agentes mutagénicos en ambas condiciones de cultivo.

La presencia de las mutaciones extracromosómicas en la cepa tratada no pareció influenciar la inducción de resistencia a paromomicina.

En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis de los diploides obtenidos en los diferentes tratamientos, observando patrones de segregación de 0:4, 1:3 y 2:2 de resistencia contra sensibilidad en la mayoría de las tetradas analizadas. Esto se puede explicar por la existencia de más de un gene responsable de la mutación que confiere resistencia a paromomicina. 14) En caso de tratarse de una mutación extracromosómica, se esperaría una segregación meiótica 4:0 ó 0:4 de la resistencia contra la sensibilidad.

Para los requerimientos auxotróficos la segregación fué 2:2, es decir de tipo Mendeliano como se esperaría de una mutación nuclear.

Con el propósito de comprobar la naturaleza nuclear de la mutación se eligió al azar una segregante (KG49-4A) para efectuar una retrocruza seguida de análisis de tetradas. (TABLA 7). Nuevamente la segregación obtenida, parece indicar la participación de varios genes nucleares.

El interés para la obtención de mutantes resistentes a paromomicina de naturaleza extracromosómica específicamente de tipo mitocondrial, es tener un marcador más del DNA mitocondrial que favorezca su mapeo y conocer el comportamiento de esta levadura frente a dicho antibiótico cuyo blanco de acción es la subunidad ribosómica pequeña, sobre todo ahora que se ha demostrado que los genes mitocondriales que codifican para las subunidades ribo

somales están juntos en Kluuweromuces lactis (17,18) a diferencia de lo que sucede en Saccharomuces cerevisiae.

Estos resultados sólo aportan una pequeña información sobre esta levadura, se necesitan estudios más extensos los cuales que dan para trabajos posteriores.

T A B L A 3

Obtención de mutantes resistentes a paromomicina empleando $MnCl_2$ y $MnSO_4$ como mutágenos.

CEPA	Concentración de:		Nº de células		Mutantes aisladas:			
	$MnCl_2$	$MnSO_4$	sembradas en:		YPAG+PAR(4mg/ml)		YPADG+PAR(4mg/ml)	
	(mM)	(mM)	$MnCl_2$	$MnSO_4$	$MnCl_2$	$MnSO_4$	$MnCl_2$	$MnSO_4$
<u>Resultados a las 48 hrs. de tratamiento.</u>								
WM37:a, his ₁ , F ^S .	5	5	2.3×10^8	1.8×10^8	0	0	0	0
	10	10	6.2×10^5	_____	0	-	0	-
	15	15	_____	_____	0	-	0	-
	0	0	1.13×10^8	_____	0	-	0	-
W600B:α, ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , F ^S .	5	5	6.0×10^7	5.6×10^7	530	824	860	1024
	10	10	5.0×10^5	_____	1	0	2	0
	15	15	1.25×10^5	_____	0	0	0	0
	0	0	4.3×10^7	_____	1	0	2	0
<u>Resultados a las 72 hrs. de tratamiento.</u>								
WM37:a, his ₁ , F ^S .	5	5	1.0×10^7	1.0×10^7	0	0	0	0
	10	10	2.5×10^7	_____	0	-	0	-
	15	15	2.0×10^6	9.4×10^7	0	0	0	0
	0	0	7.8×10^8	_____	0	-	0	-
W600B:α, ade ₁ , ade ₂ , leu ₂ , F ^S .	5	5	2.5×10^7	1.4×10^8	276	368	215	220
	10	10	_____	4.04×10^8	14	1	0	0
	15	15	_____	_____	0	1	0	0
	0	0	_____	_____	0	-	0	-

T A B L A 4

Segunda mutagénesis con $MnCl_2$ y $MnSO_4$ para la obtención de mutantes resistentes a paromomicina, y en presencia de amortiguador de fosfatos.

CEPA	Concentración de :		Nº de células		Mutantes aisladas:			
	$MnCl_2$	$MnSO_4$	sembradas en:		YPAG+PAR(4mg/ml)		YPAG+PAR(2mg/ml)	
	(mM)	(mM)	$MnCl_2$	$MnSO_4$	$MnCl_2$	$MnSO_4$	$MnCl_2$	$MnSO_4$
<u>Resultados a las 24 hrs. de tratamiento.</u>								
WM37: α, his_1, P^S .	10	10	7.6×10^8	11.0×10^8	0	0	0	0
	15	15	8.0×10^8	5.8×10^8	0	0	1	0
	20	20	7.0×10^8	5.2×10^8	0	0	2	12
	0	0	6.9×10^8	_____	0	-	2	-
W600B: $\alpha, ade_1, ade_2,$ leu_1, P^S .	10	10	5.0×10^8	6.1×10^8	75	74	-	-
	15	15	4.4×10^8	5.0×10^8	100	78	-	-
	20	20	3.8×10^8	2.2×10^8	25	186	175	250
	0	0	6.7×10^8	_____	153	-	160	-
<u>Resultados a las 48 hrs. de tratamiento.</u>								
WM37: α, his_1, P^S .	10	10	7.8×10^8	1.0×10^9	0	0	0	0
	15	15	1.1×10^9	1.4×10^9	0	0	0	0
	20	20	_____	1.8×10^9	0	0	2	0
	0	0	2.1×10^9	_____	0	-	0	0
W600B: $\alpha, ade_1, ade_2,$ leu_1, P^S .	10	10	5.7×10^8	8.3×10^8	1	12	2	31
	15	15	3.7×10^8	7.4×10^8	4	2	87	71
	20	20	7.2×10^8	_____	56	100	130	763
	0	0	8.4×10^8	_____	6	-	130	-

T A B L A 5

Obtención de mutantes resistentes a paromomicina a partir de una cepa portadora de - dos mutaciones mitocondriales, empleando $MnCl_2$ u $MnSO_4$ como mutágenos.

<u>CEPA</u>	<u>Concentración de :</u>		<u>Nº de células</u>		<u>Mutantes aisladas:</u>	
	<u>$MnCl_2$</u> (mM)	<u>$MnSO_4$</u> (mM)	<u>sembradas en:</u>		<u>YPAG+PAR(4mg/ml)</u>	
			<u>$MnCl_2$</u>	<u>$MnSO_4$</u>	<u>$MnCl_2$</u>	<u>$MnSO_4$</u>
	<u>Resultados a las 24 hrs. de tratamiento.</u>					
$Mn9b:\alpha, lts_1, E^{R}_{19}O^{R}_{272}$	5	5	1.6×10^8	1.7×10^9	8	8
	10	10	2.2×10^7	1.6×10^7	6	15
	15	15	4.3×10^6	5.4×10^6	5	36
	0	0	2.2×10^8	—	0	—
	<u>Resultados a las 48 hrs. de tratamiento.</u>					
	5	5	1.9×10^8	2.2×10^8	12	2
	10	10	6.5×10^7	4.3×10^7	20	10
	15	15	1.8×10^7	1.3×10^7	24	2
	0	0	2.4×10^8	—	0	—

T A B L A 6

Análisis de tetradas de las mutantes resistentes a paromomicina.

CRUZA	Tratamiento	Diploide	Segregación meiótica de:			
			Resistencia a paromomicina		Requerimientos	
			4 mg/ml	4 mg/ml + Amortiguador de fosfatos.	auxotróficos.	
KP-1D: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₁ . X WM37: a, hts ₁ , P ^S .	Espontánea	KF77	OR:4S (9) ^a 1R:3S (3)	OR:4S (9) 1R:3S (3)	ade 4:0 (1) 3:1 (5) 2:2 (6) leu 2:2 (12) hts 2:2 (12)	
KP-4C: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₄ . X WM37: a, hts ₁ , P ^S .	Espontánea	KF78	OR:4S (7) 1R:3S (3)		ade 4:0 (2) 3:1 (7) 2:2 (1) leu 2:2 (10) hts 2:2 (10)	
KP-2A: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₂ . X WM37: a, hts ₁ , P ^S .	Espontánea	KF86	OR:4S (5)	OR:4S (1) 2R:2S (2) 1R:3S (2)	ade 4:0 (2) 3:1 (1) 2:2 (2) leu 2:2 (5) hts 2:2 (5)	
KL-82: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₈₂ . X KA9-11C: a, hts ₁ , lts ₁ , P ^S .	MnSO ₄ 5 mM 48 hrs.	KG33 (P ^R)	OR:4S (5) 2R:2S (1) 1R:3S (4)		ade 4:0 (1) 3:1 (1) 2:2 (8) leu 2:2 (10) hts 2:2 (10) lts 2:2 (10)	
KL-107: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₁₀₇ . X KA9-11C: a, hts ₁ , lts ₁ , P ^S .	MnSO ₄ 5 mM 48 hrs.	KG34 (P ^R)	OR:4S (3) 1R:3S (2)		ade 4:0 (1) 3:1 (3) 2:2 (1) leu 2:2 (5) hts 2:2 (5) lts 2:2 (5)	
KL-51: α , ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₅₁ .	MnSO ₄ 5 mM 72 hrs.	KG35 (P ^R)	OR:4S (3) 1R:3S (2)		ade 4:0 (1) 3:1 (3)	

X					2:2 (1)
KA9-11C:a, his ₁ , lts ₁ , P ^S .					leu 2:2 (5) his 2:2 (5) lts 2:2 (5)
KL-31:α, ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₃₁ .	MnCl ₂ 20 mM 48 hrs.	KG47	2R:2S (3) 1R:3S (2)		4:0 (4) ade 3:1 (1) leu 2:2 (5)
X					lts 2:2 (5)
KA9-13D:a, lts ₁ , P ^S .					
KL-18:α, ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₁₈ .	0 48 hrs.	KG48	2R:2S (4) 1R:3S (1)		3:1 (3) ade 2:2 (2) leu 2:2 (5)
X					his 2:2 (5)
KA9-13D:a, lts ₁ , P ^S .					
KL-20:α, ade ₁ , ade ₂ , leu ₁ , P ^R ₂₀ .	0 48 hrs.	KG49	2R:2S (4) 1R:3S (1)		4:0 (1) ade 3:1 (2) 2:2 (2)
X					leu 2:2 (5)
KA9-13D:a, lts ₁ , P ^S .					lts 2:2 (5)
Mn9b-11:α, lts ₁ , P ^R ₁₉ O ^R ₂₇₂ .	MnCl ₂ 5 mM 24 hrs.	KG59 P ^S	OR:4S (2) 1R:3S (5)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)
X					
106-E ^S :a, arg, P ^S .		KG59 P ^R	OR:4S (4) 1R:3S (3)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)
Mn9b-12:α, lts ₁ , P ^R ₁₉ O ^R ₂₇₂ .	MnSO ₄ 5 mM 24 hrs.	KG62 P ^S	OR:4S (6) 1R:3S (1)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)
X					
106-E ^S :a, arg, P ^S .		KG62 P ^R	OR:4S (1) 2R:2S (1) 1R:3S (5)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)
Mn9b-21:α, lts ₁ , P ^R ₁₉ O ^R ₂₇₂ .	MnCl ₂ 5 mM 48 hrs.	KG65 P ^S	OR:4S (5) 2R:2S (1) 1R:3S (1)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)
X					
106-E ^S :a, arg, P ^S .		KG65 P ^R	OR:4S (6) 1R:3S (1)		arg 2:2 (7) lts 2:2 (7)

T A B L A 7

R E T R O C R U Z A

Análisis de tetradas.

<u>CRUZA</u>	<u>DIPLOIDE</u>	<u>SEGREGACION MEIOTICA DE:</u>	
		<u>Resistencia a paromomicina</u> 4 mg/ml	<u>Requerimientos</u> <u>auxótroficos.</u>
KG49-4A:oc,ade ₁ ,leu ₁ , P ^R .	KG58 (P ^R)	OR:4S (3)	ade 2:2 (7)
		1R:3S (4)	leu 2:2 (7)
x			
KA9-13D:a,lts ₁ ,P ^S .	KG58 (P ^S)	OR:4S (5)	ade 2:2 (7)
		1R:3S (2)	leu 2:2 (7)
			lts 2:2 (7)

- 1- SAGER, R. (1971) "Cytoplasmic Genes and Organelles", Academic Press, New York.
- 2- P. R. AVNER (1976) "Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Academic Press, London.
- 3- PIOTR P. SLONIMSKI, GISELE PERRODIN and JAMES H. CROFT (1968) "Ethidium bromide induced mutation of Yeast mitochondria: Complete transformation of cells into Respiratory-Deficient Non-Chromosomal "Petites". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, No 2 232-239.
- 4- D. Y. THOMAS and WILKIE (1968) "Recombination of mitochondrial Drug-Resistance factors in Saccharomyces cerevisiae", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, No 4 368-372.
- 5- BRUNNER, A. (1978) "Herencia citoplásmica de la resistencia a oligomicina, eritromicina y cloranfenicol en la levadura "Petite-Negativa" Kluyveromyces lactis. En temas Bioquímicos de Actualidad Eds. Piña, E.; Peña, A.; Chagoya de Sánchez, V.; y Martuscelli, J. UNAM. México 267-269.
- 6- N. R. TOWERS, H. DIXON, G. M. KELLERMAN, and A. W. LINNANE (1972) "The Sensitivity of rat liver mitochondria to antibiotics; a Phylogenetic difference between a mammalian system and Yeast". *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 361-369.
- 7- P. J. DAVEY, J. M. HASLAM, and ANTHONY W. LINNANE (1970) "The effects of aminoglycoside antibiotics on the mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems of Saccharomyces cerevisiae, *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 54-64.
- 8- J. D. WATSON (1974) "Biología Molecular del Gen", Fondo Educativo Interamericano, S.A.

- 9- PUTRAMENT, A.; BARANOWSKA, A.; EJCHART, A.; and PRAZMO, W.
(1973) "Induction by Manganese of mitochondrial antibiotic resistance Mutations in Yeast". *Mol Gen. Genet.* 126, 357-366.
- 10- ROBERT K. MORTIMER and DONALD C. HAWTHORNE, (1973) "Yeast Genetics" in "The Yeast" Vol. 1 (Eds. ROSE, A.H. and HARRISON, J.S.), Academic Press, London, New York. p. 396
- 11- REGINA KUTZLEB, RUDOLF J. SCHWEYEN and FRITZ KAUDEWITZ (1973)
"Extrachromosomal Inheritance of Paromomycin Resistance in Saccharomyces cerevisiae", *Mol Gen. Genet.* 125, 91-98.
- 12- BERNARD DUJON and PIOTR P. SLONINSKI (1973) "Multifactorial Mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae", *Molec. Gen. Genet.* 125, 53-90.
- 13- J.P.M. SANDERS, P.J. WEIJERS, G.S.P. GROOT and BORST (1974)
"Properties of mitochondrial DNA from Kluveromyces lactis
Biochim. Biophys. Acta., 374, 136-144.
- 14- MICHAEL F. WAXMAN, JEFFREY A. KNIGHT and PHILIP S. PERLMAN
(1979) "Suppression of mitochondrially-determined resistance to Chloramphenicol and Paromomycin by nuclear genes in Saccharomyces cerevisiae", *Molec. Gen. Genet.* 167, 243-250.
- 15- BRUNNER, A. (1974) Obtención y caracterización de mutantes mitocondriales en una levadura "petite negativa". En los perfiles de la Bioquímica en México. Ed. Mora, J.; Estrada Orihuela S.; Martuscelli, J. UNAM. México. 91-99.
- 16- M. DEQUARD, J.L. COUDERC, P. LEGRAIN, L. BELCOUR, and M. PICARD-BENNOUN (1980) "Search for ribosomal mutants in *Podospora anserina* : Genetic Analysis of Mutants Resistant to paromomycin", *Biochem. Genet.* Vol. 18, Nos 3/4 263-280

- 17- GERT S.P. GROOT and NEL VAN HARTEN-LOOSBROEK (1980) "The Organization of Genes for Ribosomal RNA on Mitochondrial DNA of Kluuveromyces lactis", *Curr. Genet.* 1, 133-135.
- 18- MICHELINE WESOLOWSKI, ANGELA ALGERI, and HIROSHI FUKUHARA (1981) "Gene Organization of Mitochondrial DNA of Yeasts: Kluuveromyces lactis and Saccharomycopsis lipolytica", *Curr. Genet.* 3, 157-162.