



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA LEVADURA
KLUYVEROMYCES LACTIS CON ENDONUCLEASAS DE
RESTRICCIÓN**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

P r e s e n t a :

GLORIA ALVAREZ JIMENEZ

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	3
1. Generalidades sobre Mitocondrias	3
A. Funciones Principales	3
B. ADN Mitocondrial	4
2. Endonucleasas de Restricción	9
3. Herencia Extracromosómica en Levaduras	12
4. Objetivo	21
III. MATERIALES Y METODOS	22
1. Cepas de la Levadura <u>K. lactis</u> Empleadas	22
2. Reactivos y Medios de Cultivo	22
A. Medios de Cultivo	22
B. Reactivos	22
3. Obtención de ADN de Mitocondria	22
A. Obtención de Protoplastos	23
B. Obtención de Mitocondrias	24
C. Obtención de ADN	25
4. Enzimas	27
5. Electroforesis en Geles de Agarosa ó Poliacrilamida	29

IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSION	40
VI. REFERENCIAS	47

A B R E V I A T U R A S

=====

- ADN - Acido Deoxirribonucleico
- ADN_m - Acido Deoxirribonucleico de mitocondria
- ADP - Difosfato de Adenosina
- ARN - Acido Ribonucleico
- ATP - Trifosfato de Adenosina
- BrEt - Bromuro de Etidio
- DTT - Ditiotreitol
- EDTA - Acido Etilendiamino Tetracético (Sal disódica)
- NADH - Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
- TEMED - N, N, N', N', - Tetrametiletilendiamina
- Tris - Tris hidroximetil aminometano

I. INTRODUCCION

Desde los años de 1940 en que se aisló por primera vez la mitocondria (ó condrioma, como se le llamó en aquel tiempo), los conocimientos sobre su funcionamiento se vieron reforzados por los continuos estudios sobre su estructura y por los grandes avances en genética Mendeliana y no Mendeliana, relacionados con este organelo.

A pesar de la gran cantidad de información obtenida, siguen sin contestarse totalmente varias preguntas importantes. ¿Cuáles son, en definitiva, las funciones del ADN mitocondrial? ¿Cuáles son las proteínas codificadas por este organelo? ¿Cuál es el papel del ADN mitocondrial en la biogénesis ó formación de la mitocondria? En resumen, ¿para qué existe el genoma mitocondrial?

Varias de estas preguntas ya se han empezado a contestar gracias a los estudios realizados en la levadura Saccharomyces cerevisiae y en el ADN mitocondrial de mamíferos, los cuales han dejado en claro varios puntos importantes.

En el estudio del papel que desempeña el ADN mitocondrial, han sido de suma importancia una serie de mutantes de resistencia a antibióticos, en las que se ha demostrado que el ADN afectado es el mitocondrial. Genéticamente, estas mutantes presentan un patrón de herencia no Mendeliana y muchos de los avances logrados se deben al estudio detallado y meticoloso de estas mutantes en la levadura de cerveza.

Las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial, caracterizadas hasta la fecha, son membranales. Este ADN no codifica solamente para este tipo de proteínas, sino que lleva también información para la elaboración de los ARNs ribosomales y ARNs de transferencia empleados en la síntesis de proteínas mitocondriales (1).

Se puede decir que la mitocondria está formada por la cooperación de un sistema nuclear y otro citoplásmico, y por lo tanto, resulta de suma importancia el saber cómo se transportan las proteínas citoplásmicas (que son la mayoría) al interior de la mitocondria y si su síntesis está regulada por alguna proteína mitocondrial.

Todavía es mucho lo que se desconoce, pero día a día la tecnología avanza más y se han dado grandes pasos que van más allá de los métodos clásicos de estudio de la genética, como el uso de técnicas de mapeo por mutaciones y cruza genéticas.

El descubrimiento de un conjunto de enzimas, denominadas endonucleasas de restricción (2), así como el conocimiento de elementos genéticos extracromosómicos y el desarrollo de técnicas de hibridización y de recombinación de ácidos nucleicos han permitidos el aislamiento y caracterización de secuencias de ADN de los más diversos orígenes y en la actualidad se conoce la secuencia completa de los ADNs mitocondriales de algunos mamíferos. (3, 4)

II. GENERALIDADES

1. GENERALIDADES SOBRE MITOCONDRIAS

Una de las principales características que diferencian a los organismos procariontes de los eucariontes es que estos últimos, además de tener un núcleo, tienen organelos que realizan funciones específicas e importantes dentro de la célula. Entre estos organelos están las mitocondrias que tienen gran importancia por su papel en la respiración y por tener un ADN de doble hélice distinto al que se presenta en el núcleo de la célula. (5)

A. Funciones Principales.- La función de la mitocondria es oxidar los complejos de carbono y reducir el oxígeno a agua. Este proceso genera energía en forma de ATP por medio de una cadena de transporte de electrones.

Para realizar esta importante función, la mitocondria cuenta con una membrana interna que es una estructura especializada, en donde se localiza todo el aparato respiratorio. Algunos de los polipéptidos y enzimas de esta membrana están codificados por genes del ADN mitocondrial, mientras que las proteínas de la membrana externa, del espacio intermedio y de la matriz mitocondrial son controlados por genes nucleares. (5)

La membrana interna está constituida por cuatro complejos fisicoquímicos que intervienen en el mecanismo respiratorio. En este sistema, el complejo I cataliza la oxidación del NADH (se producen electrones que son aceptados-

por la deshidrogenasa del NADH), y el complejo II cataliza la oxidación del succinato y de otros sustratos)se producen electrones que son aceptados por deshidrogenasas del grupo de las flavoproteínas). Los electrones producidos por estas oxidaciones son transferidos a la coenzima Q (ubiquinona), que se reduce. Por medio de la oxidación de la coenzima Q, los electrones son llevados a través del citocromo b y c_1 hasta el c. En este lugar, se une el complejo IV, en donde los electrones, producto de la oxidación del citocromo c se transfieren a la citocromo oxidasa y de aquí al oxígeno, que se oxida y forma agua. Como se observa, cada eslabón de la cadena supone pérdida de electrones (oxidación) por una molécula y ganancia de los mismos (reducción) por la molécula siguiente. En cada reacción de oxidoreducción se libera energía que se utiliza para la formación de ATP a partir de ADP y fosfato. El acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la formación de ATP se lleva a cabo gracias a un complejo enzimático llamado complejo de ATPasa sensible a oligomicina. Este complejo está formado de tres partes, que son un factor F_1 , una proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP) y un factor membranaral ó F_0 .

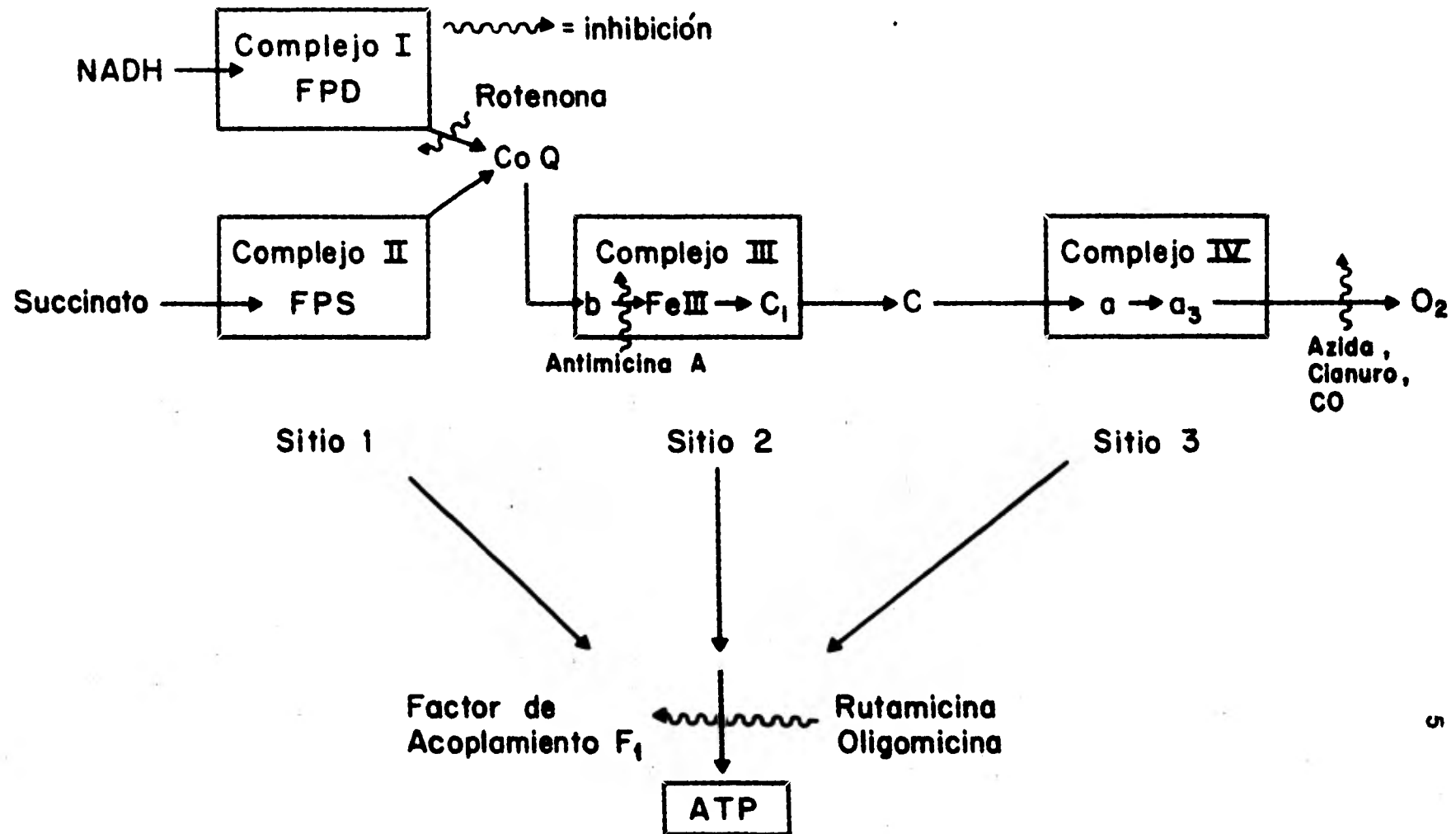
En la figura 1 se muestra el diagrama de la cadena respiratoria mostrando los cuatro complejos y los tres sitios de fosforilación.

B. ADN Mitocondrial.- Otra característica importante de la mitocondria es, como ya se dijo, el hecho de tener un ADN distinto al presente en el núcleo de la célula.

Figura 1.- Cadena respiratoria en la Mitocondria (5)

(FPD = Flavoproteina de la deshidrogenasa del NADH

FPS = Flavoproteina de la deshidrogenasa succínica)



la. La mitocondria, junto con los cloroplastos son los organelos citoplásmicos que contienen, no sólo un propio ADN, sino que también tienen ARNs ribosomales y de transferencia para la transcripción y síntesis de proteínas. (1) El sistema de síntesis de proteínas mitocondriales es sensible a antibióticos, como el cloranfenicol y la eritromicina, que bloquean la síntesis de proteínas en procariontes y no en eucariontes.

Se ha encontrado que el ADN de mitocondria es de doble cadena y en general se encuentra en forma de círculos cerrados (1). La composición de nucleótidos difiere bastante de la del ADN nuclear en la misma célula, lo que permite una separación fácil y dió la primera pauta para pensar que su origen genético y su función eran diferentes.

Dependiendo de las condiciones que se utilicen para el aislamiento del ADN mitocondrial, se pueden encontrar moléculas lineares que varían de tamaño ó moléculas circulares de diferentes tamaños y conformaciones. Se ha visto que las moléculas de ADN grandes se rompen fácilmente durante su aislamiento, mientras que las moléculas pequeñas de algunos hongos y plantas son más fáciles de obtener.

Existen tres formas diferentes de ADN mitocondrial:

- a) Moléculas lineares: Dos cadenas de ADN unidas sólo por puentes de hidrógeno (doble hélice).
- b) Moléculas circulares abiertas: En donde se tiene un corte en la estructura covalente de una de las cadenas del ADN, pero no en la cadena complementaria.
- c) Moléculas circulares superenrolladas: Estas

son moléculas circulares de doble cadena, con ningún corte en ellas. Esta forma se origina cuando se cierra la doble cadena y algunos pares de bases están acomplejados con una proteína. Al ser aislado el ADN y perderse la proteína, la cadena queda enrollada parcialmente y como resultado de esto, son introducidas vueltas superhelicoidales. Figura 2 (6)

En la obtención del ADN mitocondrial, pueden encontrarse las diferentes formas que se mencionaron anteriormente, ya que, aunque generalmente es circular, este ADN se puede romper durante su manipulación.

Estos círculos pueden separarse uno de otro ó de moléculas lineares, porque la forma superenrollada tiende a sufrir un aumento en su densidad de flotación cuando se centrifuga en cloruro de cesio (CsCl). La separación entre los dos diferentes círculos puede aumentarse usando colorantes como el bromuro de etidio (BrEt) ó el yoduro de propidio (IPd), que se intercalan entre los pares de bases del ADN. La forma circular cerrada intercala menos colorante que la forma circular abierta, cuando la concentración del colorante es a saturación. Al entrar moléculas de colorante entre las bases se abre la estructura de doble cadena y se hace menos densa la molécula; de ahí que las moléculas circulares cerradas (que intercalaron menos colorante) estarán más pesadas que las circulares abiertas ó que las lineales. De esta manera, el efecto del colorante es aumentar la separación entre las dos formas en los gradientes de CsCl. Las diferentes bandas de ADN en esos

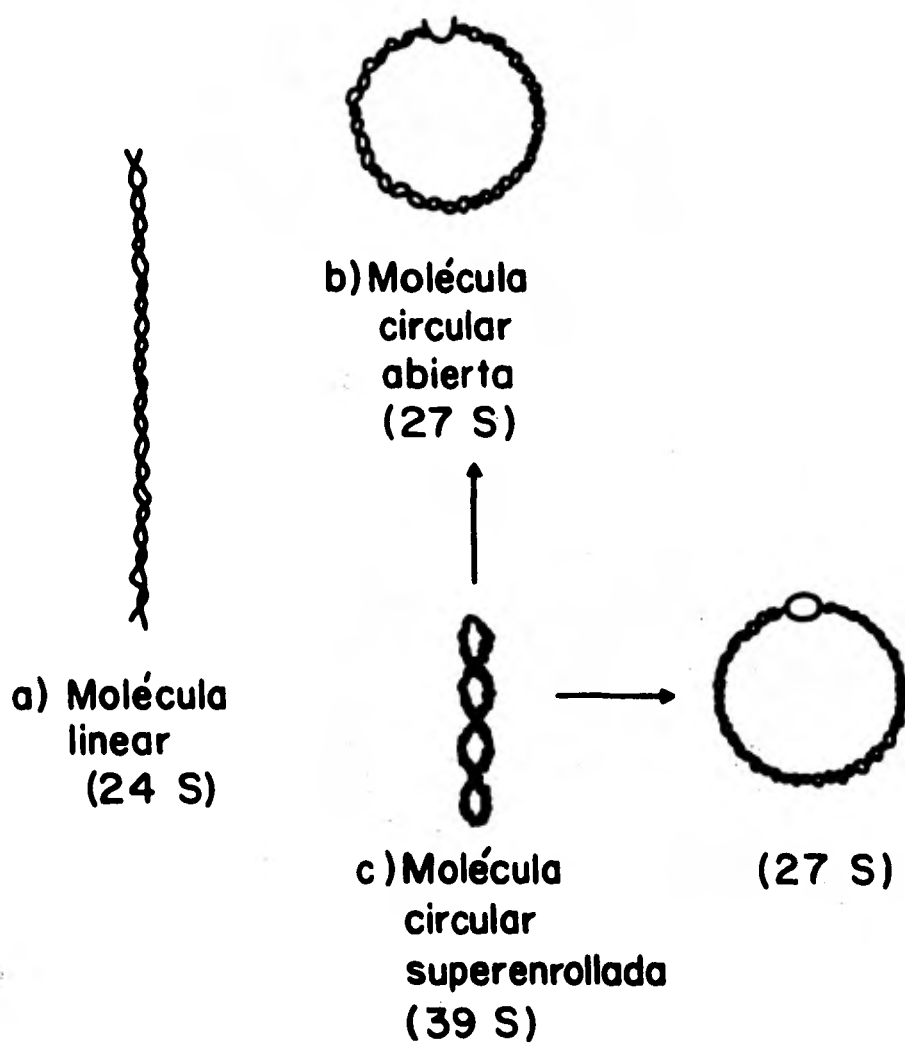


Figura 2.- Formas de ADN mitocondrial (5, 6)
(S=velocidad de sedimentación en ultracentrifugación)

gradientes, se pueden detectar a simple vista cuando se iluminan los tubos de centrifugación con una lámpara de luz ultravioleta (365 nm), ya que estos colorantes fluorescen en esas condiciones.

Una vez separado el ADN mitocondrial, éste puede ser sujeto a la acción de las endonucleasas de restricción (ver más adelante). Después se separan las fracciones mediante electroforesis en geles de agarosa ó poliacrilamida, observándose un patrón definido debido al acomodo que los fragmentos sufren de acuerdo a su peso molecular. Este resultado se denomina patrón de restricción y es útil para comparar fragmentos, purificarlos y caracterizarlos mediante la elaboración de su mapa físico, es decir, la localización relativa de los sitios reconocidos por diferentes endonucleasas de restricción dentro del segmento.

2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Debido al enorme tamaño del ADN y a la estructura simple y repetitiva de los cuatro nucleótidos que lo constituyen, el estudio de secuencias y posibles mutaciones en el ADN era bastante difícil y laborioso.

En 1970, Smith et al (7) descubrieron una enzima que cortaba el ADN en un sitio específico (es decir, reconocía una secuencia dentro de la molécula) y posteriormente esta enzima fue utilizada por Danna (8) para el estudio del ADN del virus SV 40.

A partir de entonces, se han descubierto una gran

cantidad de endonucleasas de restricción que reconocen diferentes secuencias de nucleótidos y que permiten fraccionar el ADN en distintos sitios del genoma. (2) Estas enzimas además permiten un rompimiento de secuencias específicas en forma reproducible, de moléculas de ADN de cualquier organismo.

Las endonucleasas de restricción han sido divididas en clase I, clase II y clase III. (9) Las de clase I y III reconocen secuencias específicas, pero hidrolizan en sitios no específicos que están situados más allá del sitio reconocido. Las segundas reconocen y cortan secuencias específicas ya conocidas.

La clase II es la más estudiada y la que tiene más aplicación. Se han estudiado, hasta la fecha, 355 endonucleasas, con 85 especificidades diferentes (11). Estas enzimas están distribuidas en tres diferentes grupos dependiendo del largo de la secuencia reconocida y por lo tanto, de la frecuencia con que corta el ADN (si la secuencia por reconocer es más pequeña, la frecuencia con que corta el ADN es más alta). Tabla 1

Las secuencias nucleotídicas reconocidas por estas enzimas, pueden ser de 4, 5 y 6 pares de bases y generalmente, corresponden a un palíndromo; es decir, es una secuencia que se lee de igual manera en el sentido 5' → 3' en una hebra que en el mismo sentido de la hebra contraria. Por lo tanto, existe un centro de simetría en cada palíndromo y los productos resultantes del corte de la enzima (uno en cada cadena) son diferentes, de acuerdo al punto

TABLA 1. Endonucleasas Empleadas en este Trabajo y Secuencias que Reconocen

Tetranucleótido		Hexanucleótido	
Hae III	GG↓CC	Eco RI	G↓AATTC
Hpa II	GCG↓C	Hind III	A↓AGCTT
Mbo I	↓GATC	Hpa I	GTT↓AAC
		Hinc II	GTP↓PuAC
		Sal I	G↓TCGAC

(2)

donde el corte se hace: en un enlace 5' - P ó 3' - OH a ambos lados del centro de simetría ó bien en el centro de simetría mismo. De esta manera, pueden resultar moléculas con extremos saliente 5' - P y 3' - OH ó con extremos rasos, es decir, con todas sus bases apareadas. Los extremos salientes generados por una endonucleasa de restricción se denominan extremos cohesivos, esto es debido a su capacidad de formar estructuras de doble hélice uno con otro por la complementariedad de su secuencia de nucleótidos.

Figura 3

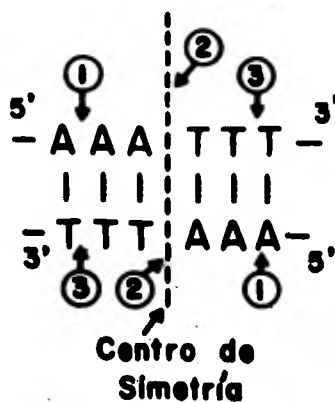
La probabilidad de encontrar una secuencia reconocida por alguna de estas enzimas en una molécula de ADN dada, varía de acuerdo con el número de nucleótidos reconocidos. Para aquellas que reconocen 6 pares de bases, se calcula que existe un sitio cada 4, 000 pares de bases; para aquellos que reconocen 5, existe un sitio cada 515 pares de bases y para las que reconocen 4, existe un sitio cada 256 pares de bases. Generalmente se usan las que reconocen 4 pares de bases para el mapeo físico fino y las que reconocen 6 pares de bases para fraccionar genomas. (12)

3. HERENCIA EXTRACROMOSOMICA EN LEVADURAS

La levadura Kluyveromyces lactis es un organismo unicelular que se reproduce vegetativamente por gemación de las células hijas.

Su reproducción sexual se lleva a cabo gracias a la presencia de dos alelos de sexo opuesto " a " y " α " (también llamados factores de compatibilidad) que no dan lugar

Molécula de ADN



CORTE EN	MOLECULAS RESULTANTES	DENOMINACION DE LOS EXTREMOS	
1	$\begin{array}{l} -A-OH \\ \\ \text{3}'-TTTAA-5'-O-(P) \end{array}$	$\begin{array}{l} (P)-O-5'-AATTT- \\ \\ HO-A- \end{array}$	Salientes 5' (cohesivos)
2	$\begin{array}{l} -AAA-3'-OH \\ \\ -TTT-5'-O-(P) \end{array}$	$\begin{array}{l} (P)-O-5'-TTT- \\ \\ HO-3'-AAA- \end{array}$	rasos
3	$\begin{array}{l} -AAATT-3'-OH \\ \\ -T-O-(P) \end{array}$	$\begin{array}{l} (P)-O-T- \\ \\ HO-TTAAA-3' \end{array}$	Salientes 3' (cohesivos)

Figura 3.- Diferentes cortes efectuados por endonucleasas de restricción y los extremos que generan. (10)

a ninguna diferencia morfológica entre las células de levadura. Cuando el haploide " a " se fusiona con el " α ", forman un cigoto que dará después lugar a una clona diploide.

A diferencia de la levadura S. cerevisiae, esta clona diploide es inestable y entra en el proceso de meiosis, originando una tétrada de ascosporas haploides, las cuales se pueden aislar fácilmente y estudiar en ellas la segregación de caracteres hereditarios. (13) Figura 4

K. lactis es un organismo capaz de crecer aunque su mitocondria sea funcional ó no, siempre y cuando se le proporcionen sustratos fermentables como la glucosa. Cuando crece en presencia de sustratos no fermentables como glicerol, etanol, lactato y acetato, el mecanismo de respiración de la mitocondria se desarrolla completamente. Todos los citocromos están presentes en grandes cantidades, así como las enzimas y el sistema que genera ATP. Es decir, cualquier alteración ó modificación que se produzca en el funcionamiento de la mitocondria, traerá como consecuencia una falta de crecimiento en medios de cultivo que contienen alguno de los sustratos arriba mencionados como fuente de energía.

Alrededor de 1950, Ephrussi (14) encontró en la levadura S. cerevisiae un tipo de mutantes que aparecían espontáneamente con una frecuencia cercana al 1 %. La característica de estas mutantes era que originaban colonias más pequeñas que las normales, por lo que se les llamó "mutantes petite".

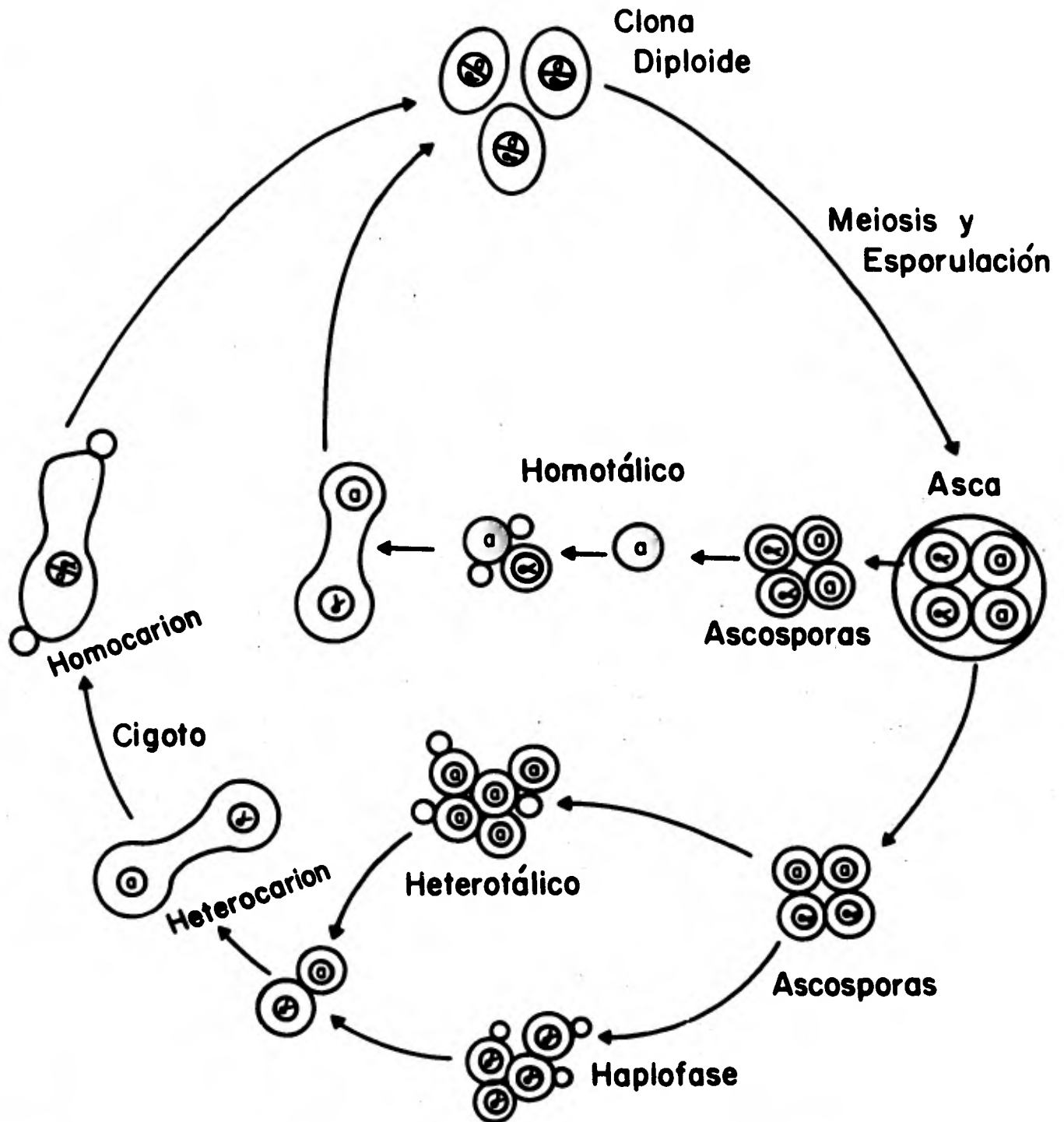


Figura 4.- Ciclo Vital de Kluyveromyces lactis

La mutación "petite" mostró ser una mutación pleiotrófica que provocaba la desaparición de los citocromos a, b y c₁, de algunas deshidrogenasas y de otras proteínas de la membrana interna de la mitocondria; además estas mutantes daban una herencia no Mendeliana cuando se estudiaron desde un punto de vista genético, por lo que se consideró que tenían alterado un ADN extracromosomal.

Al continuarse los estudios con mutantes extracromosómicas se trató de encontrar otro tipo de mutantes en las que se viera afectada una sola función ó proteína mitocondrial, ya que la mutación "petite", siendo pleiotrófica, dificultaba el mapeo y estudio de este ADN. De esta manera, se aislaron mutantes de S. cerevisiae resistentes a antibióticos que interfieren específicamente con funciones mitocondriales, tales como: síntesis de proteínas mitocondriales (cloranfenicol, eritromicina, paromomicina, etc.), transporte de electrones (antimicina A, Diuron, funiculosina, etc.) ó síntesis de ATP (oligomicina, rutamicina, venturicidina, etc.). La mutación puede conferir resistencia directamente sobre los componentes mitocondriales, como son los ribosomas, el factor membranal del complejo ATP-asa ó el citocromo b, ó bien puede provocar que la mitocondria sea impermeable a ciertos antibióticos (5).

En estudios posteriores, se encontró que un tratamiento prolongado con BrEt conducía a la desaparición del ADN mitocondrial. Este procedimiento permitió demostrar que la resistencia a ciertas drogas se perdía al tratar dichas células con el colorante, asociándose directamente es

ta resistencia con el ADN mitocondrial (15).

Las mutantes con que se trabajó en el laboratorio son mutantes resistentes a los antibióticos antimicina A y oligomicina. La antimicina A inhibe el transporte de electrones en el complejo III a nivel del citocromo b. Este citocromo es una proteína de origen bigenómico y se cree que el sitio de unión al antibiótico está localizado en el polipéptido codificado por el ADN mitocondrial (16). La oligomicina actúa sobre la fosforilación oxidativa a nivel del complejo enzimático de acoplamiento, inhibiendo la ATPasa (17).

Sabiendo que los 4 polipéptidos del factor membranal del complejo ATPasa y que el factor membranal del citocromo b son productos del sistema de síntesis de proteínas mitocondriales, era razonable suponer que los genes estructurales que codificaban para estos polipéptidos estaban en el genoma mitocondrial.

Actualmente se conocen los sitios en el genoma mitocondrial de S. cerevisiae responsables de esta resistencia y se han estudiado las características de recombinación de este ADN. (18)

En algunos eucariontes, el tamaño molecular del ADN mitocondrial varía de una especie a otra. En particular, diversas especies de levaduras tienen un ADN mitocondrial muy distinto entre sí, a diferencia de los animales y plantas superiores en donde el tamaño es prácticamente igual.

La levadura K. lactis tiene un ADN mitocondrial cu-

yo tamaño es de 11.4 μm , ó sea, la mitad del de S. cerevisiae (19). Esta levadura ha sido poco estudiada y despertó interés por esta diferencia de tamaño. Por esta razón, con el objeto de conocer más sobre esta levadura, se hicieron estudios preliminares en donde se vió que algunos genes de esta levadura tienen un alto grado de homología con respecto al ADN mitocondrial de S. cerevisiae.

Esta particularidad se ha podido estudiar utilizando la propiedad de los ácidos nucleicos de cadena sencilla de aparearse mediante la formación de puentes de hidrógeno (hibridización) con moléculas de secuencia complementaria. La hibridización puede hacerse entre dos poblaciones de ADN desnaturizadas ó entre ADN desnaturizado y ARN. Una molécula de ácido nucleico purificado que contiene determinada secuencia nucleotídica se ha denominado "rastreador" (probe) de hibridización para dicha secuencia y puede ser marcado radiactivamente. Por esta razón, algunas secuencias específicas son utilizadas como "rastreadores" para detectar y localizar genes equivalentes en los genomas mitocondriales de otras especies.

Entre los experimentos que se han realizado, pueden mencionarse los de Groot (20), quien estudió la organización del rARN en el ADN mitocondrial de *K. lactis* y los del grupo de Fukuhara (21), quienes estudiaron la organización genética del mismo ADN localizando genes que tenían marcadores de resistencia a diferentes antibióticos como oligomicina, cloranfenicol, eritromicina y paromomicina.

En estos estudios se hicieron digestiones del ADN mi

tocondrial con diferentes endonucleasas de restricción y se hibridizaron los fragmentos resultantes de estas digestiones con los "rastreadores" de S. cerevisiae adecuados. En ambos casos se encontró que los genes de S. cerevisiae servían para detectar y mapear secuencias homólogas en el ADN mitocondrial de K. lactis.

En el laboratorio, se aislaron varias mutantes de K. lactis resistentes a diversos antibióticos, las cuales se pensaba eran de origen mitocondrial. Las mutantes resistentes a oligomicina se aislaron en forma espontánea, mientras que las mutantes resistentes a antimicina fueron inducidas por medio de sales de manganeso, las cuales inducen mutaciones preferentemente mitocondriales (22). Desafortunadamente, el tipo de estudio realizado con BrEt en S. cerevisiae (23) no se puede aplicar a esta levadura, ya que las cepas resultantes no son viables. (24)

Se realizaron, entonces, estudios sobre recombinación y transmisión de marcadores extracromosomales (25), utilizando una cepa progenitora y mutantes resistentes a los antibióticos oligomicina y antimicina y se determinó que las mutaciones encontradas eran de origen extracromosómico por medio de pruebas genéticas como:

- a) Segregación de la mutación en los diploides durante la mitosis
- b) Segregación no Mendeliana de la mutación en los productos de la meiosis.

Otros estudios efectuados para comprobar el origen extracromosomal de las mutaciones incluyeron:

a) Explorar el efecto del antibiótico sobre la respiración de células completas, en donde se observó que, aunque las mutantes eran finalmente inhibidas por el antibiótico, las concentraciones requeridas eran cien veces mayores que las necesarias para inhibir la cepa silvestre. (25)

b) Como se dijo anteriormente, la oligomicina actúa sobre la fosforilación oxidativa a nivel del complejo enzimático de acoplamiento inhibiendo la ATPasa. Utilizando partículas submitocondriales de la cepa progenitora y de mutantes O^R como fuente de ATPasa, se midió la actividad de ésta en presencia y ausencia de oligomicina. Aunque las actividades de todas son inhibidas, las mutantes muestran más resistencia que las silvestres, indicando una actividad mitocondrial alterada. (26)

c) Para descartar la posibilidad de que la resistencia a los antibióticos se debiera a una permeabilidad disminuida a nivel de la membrana celular, se estudió el efecto de las drogas sobre la respiración de mitocondrias aisladas a partir de la cepa silvestre y de las mutantes. De nuevo, se observó una mayor tolerancia de las mitocondrias provenientes de las cepas mutantes. (25)

d) La antimicina A inhibe la cadena respiratoria a nivel del citocromo b. Por esta razón, se estudió también el efecto de la droga sobre los citocromos. En los espectros resultantes, se observó que en presencia de antimicina había una desaparición en el contenido de citocromo b en la cepa silvestre, mientras que en la mutante se vió el

espectro normal, indicando que la antimicina no se había unido al citocromo b en la mutante, ó que lo había hecho con menos eficiencia. (25)

4. OBJETIVO

Por las pruebas realizadas anteriormente, se tenía una fuerte sospecha de que las mutaciones que tienen las cepas con que se trabajó eran de origen mitocondrial, sin que de ninguna manera se pudiera afirmar esto.

Por otro lado, en S. cerevisiae se ha descubierto la presencia de plásmidos que confieren resistencia múltiple a ciertos inhibidores como venturicidina y trietilestaño. Esto se ha podido comprobar mediante tratamiento con BrEt (ya que esta sustancia hace desaparecer el ADN mitocondrial mas no el ADN del plásmido) y con gradientes de CsCl en donde aparecen tres bandas que corresponden a ADN mitocondrial, ADN nuclear y ADN del plásmido (27). Aunque es difícil pensar en la presencia de un plásmido responsable de la resistencia a antibióticos en nuestras cepas, esta posibilidad no se puede descartar.

El objetivo de este trabajo surgió a partir de la idea de que nuestras mutantes eran de origen mitocondrial. Una de las formas de demostrar eso era realizar un estudio comparativo con endonucleasas de restricción en el ADN mitocondrial de una cepa silvestre y de mutantes de la levadura K. lactis, y tratar de encontrar alguna diferencia en el patrón electroforético, lo que significaría que hay una variación ó cambio en el genoma mitocondrial de las mutantes.

III. MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS DE LA LEVADURA K. lactis EMPLEADAS

UM 27	:	α	,	lis ₁	
UM 27 - ol ₁	:	α	,	lis ₁	O ₂₇₁ ^R
UM 27 - ol ₂	:	α	,	lis ₁	O ₂₇₂ ^R
AM 34	:	α	,	lis ₁	A ₂₇₃₄ ^R
L - 3	:	α	,	met ₂	(lky)

2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

A. Medios de Cultivo.- El medio para crecer la levadura fue el YFAD que contiene:

Extracto de levadura	1 % (p/v)
Peptona de gelatina	1 % (p/v)
Dextrosa	2 % (p/v)
Agua destilada	

B. Reactivos.- Algunos reactivos especiales que se utilizaron fueron:

Agarosa, TEMED, acrilamida, bis-acrilamida y persulfato de amonio de Bio-Rad. CsCl y azul de bromofenol de Merck. BrEt, ADNasa y β - glucuronidasa (de Helix pomatia) de Sigma.

3. OBTENCION DE ADN DE MITOCONDRIA

La obtención del ADN mitocondrial de K. lactis consiste de tres etapas:

- A. Obtención de protoplastos
- B. Obtención de mitocondrias
- C. Obtención de ADN

A. Obtención de Protoplastos.- Esto se hizo conforme al método utilizado por Duell (28), con las modificaciones realizadas por Kovac (29) y consta de los siguientes pasos:

1. Se inocula la cepa deseada en 25 ml de YPAD y se cultiva durante 24 horas a 30° C.
2. Agregar todo el volumen de ese inóculo a 500 ml de YPAD.
3. Incubar a 30° C con aereación (agitación a 250 rpm) durante 24 horas.
4. Centrifugar las células en el rotor GSA (Sorvall) a 5,000 rpm, 5 minutos a 4° C. (3 - 4 gramos de células)
5. Reuspender las células en 20 ml de 2-mercaptoetanol 0.5 M en Tris-HCl 0.2 M (pH = 9.3).
6. Incubar 5 minutos a 30° C. Centrifugar 10 minutos a 2,750 rpm en el rotor SS-34 (Sorvall).
7. Lavar las células con 40 ml de D-sorbitol 1.5 M (pH = 7). Centrifugar de nuevo 10 minutos a 2,750 rpm.
8. Reuspender la pastilla en un volumen final de 10 ml de amortiguador de protoplastos (sorbitol 1.35 M,

EDTA 2 mM, amortiguador citrato fosfato 10 mM, pH = 5.8).

9. Añadir 1.4 ml de β -glucuronidasa e incubar con movimientos ocasionales a 30^o C. El proceso de formación de protoplastos se sigue por medición de la absorción a 600 nm en alícuotas diluidas en agua destilada y comparando las lecturas con aquellas correspondientes a células muertas por calentamiento a 70^o C durante 50 minutos. Con juntamente, se realizaron observaciones al microscopio de contraste de fases de las células procesadas, suspendiendo una muestra en agua destilada y otra en el amortiguador de protoplastos; los protoplastos al ser diluidos en agua, se rompen y aparecen como células oscuras.

10. Al observar un 80 % de protoplastos, las células se colectan a 2,750 rpm durante 10 minutos. La pastilla se lava dos veces con 40 ml de sorbitol 1.5 M (pH = 7) y dos veces con 40 ml de sorbitol 0.75 M, D-manitol 0.4 M y albúmina bovina 0.1 %, centrifugando después de cada lavado.

B. Obtención de Mitocondrias.- Las mitocondrias se obtienen usando el método reportado por Hollenberg et al. (30):

11. Resuspender la pastilla de protoplastos, ya lavada, en 80 ml de manitol 0.6 M, Tris 10 mM, EDTA 10 mM (pH = 6.7).

12. Lisar los protoplastos suavemente en el homogeneizador Sorvall Omnimix a velocidad máxima durante 10 segundos en hielo. Dejar en reposo otros 10 minutos en hie-

10.

13. Centrifugar el homogenado 10 minutos a 3,600 rpm en el rotor SS-34 (Sorvall) a 4^o C.

14. Desechar la pastilla y centrifugar el sobrenadante a 8,100 rpm, 10 minutos a 4^o C.

15. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 ml de sacarosa 0.35 M, MgCl₂ 5mM y 1 mg de ADN-asa. Incubar 10 minutos a 0^o C.

16. Centrifugar a 3,250 rpm durante 10 minutos a 4^o C.

17. Desechar la pastilla y centrifugar el sobrenadante a 11,900 rpm durante 10 minutos.

18. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 0.5 ml de manitol 0.6 M.

C. Obtención de ADN.- Para la obtención del ADN de mitocondrias, se usó esencialmente la técnica reportada por Sanders et al (19):

19. A 0.5 ml de mitocondrias en manitol, añadir un volumen tal de EDTA (pH = 8) para que la concentración final de éste sea de 100 mM y el volumen total no sea mayor de 2 ml.

20. Agregar un volumen de Sarkosyl al 20 % para que al final quede al 2 %. Incubar 30 segundos a 0^o C.

21. Preparar un gradiente isopícnico a equilibrio en CsCl / BrEt.

a) El lisado anterior con ADN debe tener un volumen aproximado de 2.3 ml.

b) Añadir un volumen de BrEt (solución 5 mg/ml) de tal manera que la concentración final sea de 0.25 mg/ml.

c) Añadir a esto un volumen igual de una solución con CsCl 1.27 g/ml y BrEt 0.25 mg/ml.

d) Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4^o C en el rotor SS-34 (Sorvall).

e) Quitar la capa de proteína y decantar el sobrenadante en un tubo de nitrato de celulosa.

f) Agregar al sobrenadante un volumen igual de otra solución con CsCl 1.27 g/ml y BrEt 0.25 mg/ml.

g) Cubrir con aceite mineral hasta el tope del tubo y balancear los tubos.

22. Centrifugar en un rotor Ti 50 (Beckman) a 36,000 rpm durante 20 hrs. a 20^o C.

23. Como se mencionó anteriormente, el ADN en el gradiente es visible con luz UV, ya que el BrEt fluoresce al iluminarse el tubo. En ocasiones se observan dos bandas, la superior que contiene ADN cromosomal ó roto y la inferior que contiene el ADN superenrollado, circular cerrado. Bajo luz UV, picar el fondo de los tubos y coleccionar lentamente el ADN de mitocondria en un tubo (esto deber ser hecho en la penumbra, ya que el BrEt reacciona con la luz).

24. Para quitar el BrEt agregar un volumen igual de isopropanol saturado con CsCl. De las dos fases formadas, quitar la fase alcohólica que contiene el colorante. Repetir esto 2 ó 3 veces hasta que el colorante haya salido

completamente de la fase acuosa.

25. Dializar el ADN contra 4 litros de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH = 8), durante 24 horas a 4^o C.

26. Sacar el ADN de la bolsa de diálisis y precipitarlo añadiendo 1/25 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de EtOH (alcohol etílico). Poner a -20^o C durante 24 horas.

27. Centrifugar en el rotor SS-34 (Sorvall) a 6,500 rpm durante 1 hora a -4^o C.

28. Resuspender en 50 μ l de amortiguador TEN (Tris HCl 10 mM, NaCl 10mM, EDTA 1mM, pH = 7.6). Medir la densidad óptica (D.O.) a 260 nm para determinar la concentración de ADN. (Una D.O. de 1 equivale a 50 μ g de ADN/ml). Generalmente se obtienen alrededor de 40 μ g de ADN mitocondrial.

4. ENZIMAS

Las enzimas de restricción que se utilizaron son de Bethesda Research Laboratories (Maryland, U.S.A.). Las condiciones de reacción fueron las reportadas por Bolívar et al (31).

Amortiguadores de Enzimas 1 X:

- a) Eco RI: Tris-HCl 100mM (pH = 7.2)
MgCl₂ 5 mM
2-mercaptoetanol 2 mM
- b) Hae III: Tris-HCl 50 mM (pH = 7.9)

- MgCl₂ 5 mM
Ditiotreitol (DTT) 0.5 mM
- c) Hinc II: Tris-HCl 10 mM (pH = 7.9)
MgCl₂ 1 mM
NaCl 30 mM
DTT 1 mM
- d) Hind III: NaCl 60 mM
Tris-HCl 20 mM (pH = 7.4)
MgCl₂ 7 mM
- e) Hpa I: Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5)
MgCl₂ 5 mM
NaCl 50 mM
2-mercaptoetanol 5 mM
- f) Hpa II: Tris-HCl 20 mM (pH = 7.4)
MgCl₂ 7 mM
DTT 1 mM
- g) Mbo I: Tris-HCl 10 mM (pH = 7.4)
NaCl 75 mM
MgCl₂ 10 mM
DTT 1 mM
Albúmina Bovina (BSA) 100 µg/ml
- h) Sal I: Tris-HCl 8 mM (pH = 7.6)
MgCl₂ 6 mM
Na₂EDTA 0.2 mM
NaCl 150 mM

1. Utilizar alrededor de 1.5 µg de ADN para cada reacción.

2. Añadir el amortiguador correspondiente según la enzima que se vaya a utilizar. El volumen final debe ser de aproximadamente 20 μ l.

3. Añadir el volumen de enzima necesario para la reacción (generalmente es de 1 - 2 μ l). Cuando no es necesario digerir, se suprime este paso.

4. Incubar las reacciones con endonucleasas a 37^o C durante el tiempo requerido de acuerdo a la actividad de cada enzima (generalmente es de 1.5 - 2 horas).

5. Para detener la reacción, añadir 1/3 del volumen de mezcla inactivadora (urea 10 M, azul de bromofenol 0.05 % en agua).

5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA O POLIACRIL - AMIDA

La electroforesis se llevó a cabo en placas, según condiciones descritas por Bolívar et al (31).

La agarosa al 0.8 % se disolvió mediante calentamiento a ebullición durante 2 minutos en amortiguador Tris-acetatos (Trisma base 0.05 M, EDTA 0.002 M, acetato de sodio 0.02 M, NaCl 0.019 M, pH = 8.05). Después de vaciar la agarosa y dejarla solidificar, las muestras con ADN, ya listas, se colocaron en los carriles (20 μ l en cada uno). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V a 4^o C durante 3 horas. Este tipo de gel fue usado para separar los fragmen-tos de peso molecular alto (1 - 80 Md).

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 7.5 % y

para esto, se mezcló 7.5 ml de solución de acrilamida-bis-acrilamida al 29.2 % y 0.8 % respectivamente, 16.4 ml de agua y 6 ml de amortiguador Tris-boratos 5X (Trisma base 90 mM, EDTA 2.5 mM, H_3BO_3 90 mM, pH = 8.2) y 15 μ l de per-sulfato de amonio 1 mg/ml. Se degasifica al vacío, se añaden 15 μ l de TEMED y se vacía en el molde.

Se colocaron las muestras en los carriles y la elec-troforesis se llevó a cabo a 150 V durante 2 horas. Se u-só este tipo de gel para separar fragmentos de ADN de tama-ño pequeño (0.015 - 1 Md).

Después de terminadas las electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de BrEt (4mg/ml) durante 10 - 15 minutos y se iluminaron con lámpara UV de onda cor-ta (Ultraviolet Products, San Gabriel, Cal., USA). Los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid MP-5 provista de un filtro de gelatina amarillo Kodak Wratten No. 9 y pe-lícula Polaroid Np, tipo SS.

IV. RESULTADOS

La estrategia que se utilizó para tratar de comprobar si las mutaciones a antimicina y oligomicina son de origen mitocondrial, se basó en la comparación de los patrones generados por varias enzimas de restricción en el ADN mitocondrial de la cepa silvestre y de las cepas mutantes.

Para realizar esto, se purificó ADN mitocondrial de todas las cepas, siguiendo la metodología ya descrita.

En los gradientes de CsCl, la banda de ADN mitocondrial tiene una densidad de flotación diferente a la de ADN nuclear. El ADN nuclear tiene una densidad de 1.7 g/ml, mientras que la del ADN mitocondrial es de 1.55 g/ml, lo que permite separar estos dos ADNs en caso de que haya quedado algo de ADN nuclear, a pesar del tratamiento con ADNasa. Figura 5

En carriles paralelos de un gel de agarosa, se colocaron muestras de ADN_m de la cepa silvestre y de las mutantes con un marcador de peso molecular que fue el plásmido pC 252. Esto fue con el objeto de asegurarse que todas las muestras tenían el mismo peso molecular (24×10^6 daltones) y checar así que ninguna hubiera sufrido una alteración durante la extracción. Figura 6

A continuación se hicieron geles de agarosa y acrilamida, en donde se colocaron muestras de ADN_m de todas las cepas digeridas (UM 27, UM 27-ol₁, UM 27-ol₂ y AM 34) con las diferentes enzimas de restricción.

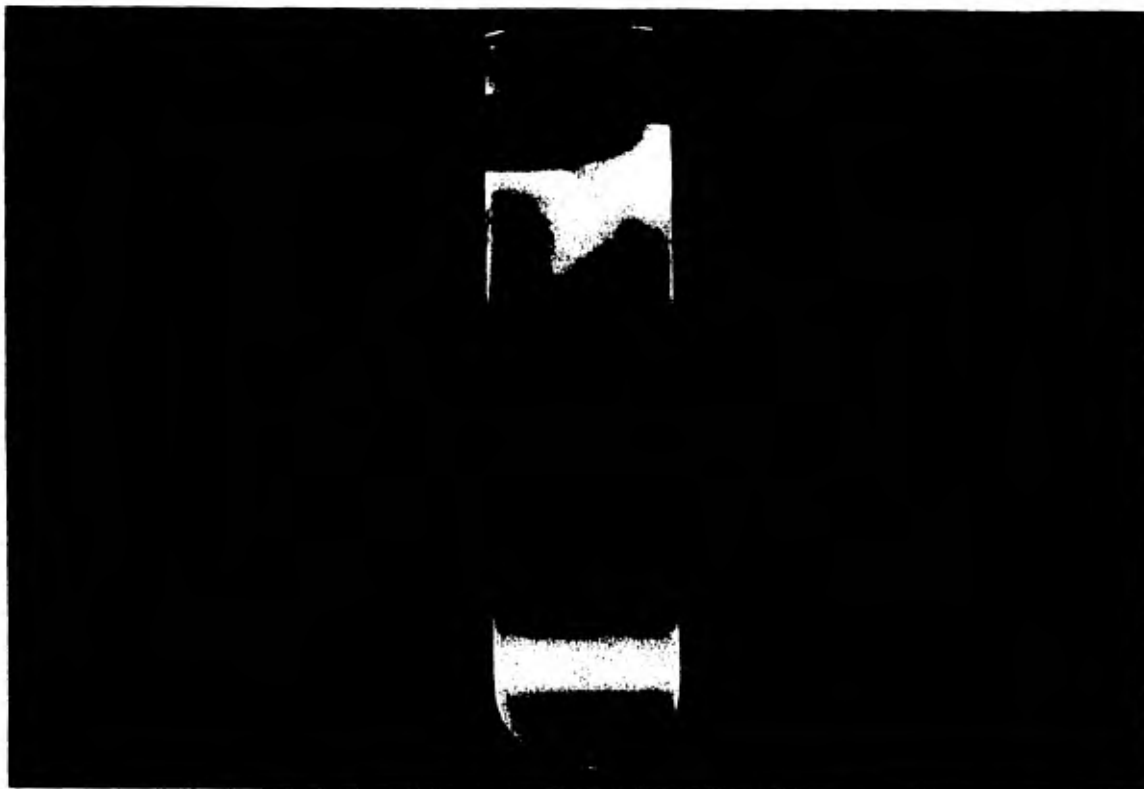


Figura 5.- Gradiente de CsCl/BrEt en donde se observa la banda de ADN mitocondrial

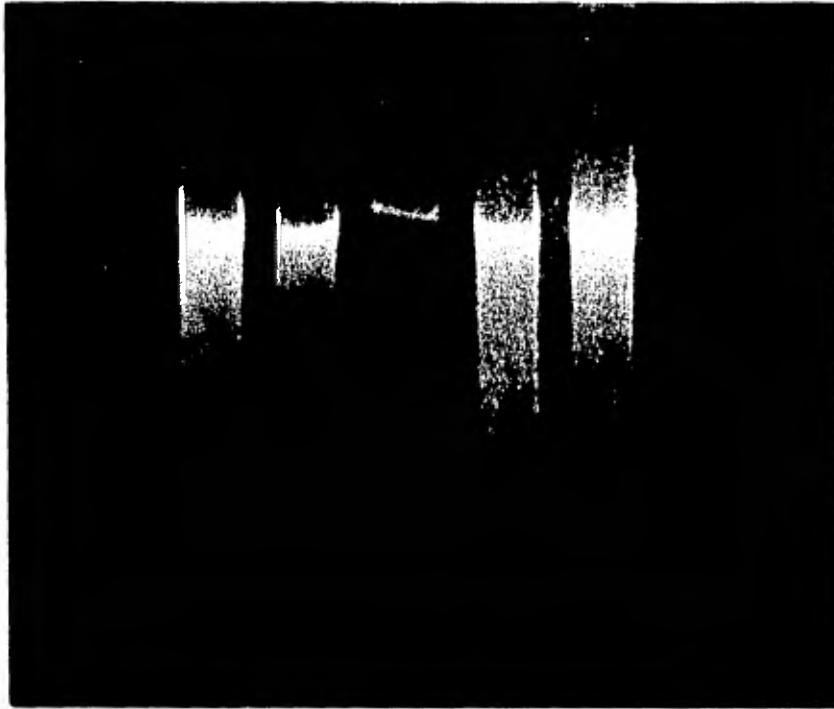


Figura 6 .- Muestras de ADN_m de las cepas WM 27, WM 27-01₁, Plásmido pC 252, WM 27-01₂ y AM 34

A partir de estos geles, se observaron los patrones y se pudo inferir el número de sitios y el tamaño de los fragmentos generados por la digestión de cada una de las 6 endonucleasas de restricción utilizadas: Eco RI, Hae II, Hinc II, Hind III, Hpa I, Hpa II, Mbo I, Sal I. Las digestiones hechas por estas enzimas en las cepas AM 34 y UM 27 ol_2 se observan en las figuras 8 y 9 respectivamente.

En el laboratorio se contaba con varias cepas silvestres (sensibles a antibióticos) y a partir de una de estas cepas (UM 27) se obtuvieron las mutantes que se usaron en este trabajo. Se pensó que sería interesante comparar los patrones generados a partir de esta cepa con los generados de otra cepa silvestre (L - 3) que provenía de diferente lugar. En la figura 10 pueden verse los patrones de restricción de ambas cepas con varias enzimas.

En algunos casos, se observó en el patrón de restricción con algunas enzimas, un aumento de la intensidad de alguna de las bandas con respecto a las demás. Esto se interpretó como la existencia de dos ó más fragmentos que co migraron juntos.

Se construyeron gráficas del logaritmo de pares de bases vs distancia del tope del gel al frente de cada banda de una muestra del fago " λ " digerido con las enzimas Eco RI y Hind III. Los tamaños de estos fragmentos (32) ya están reportados y se usaron como patrón interno de peso molecular en los geles de agarosa. Para los geles de acrilamida se tomaron los valores del plásmido pBR 322 digeridos con Mbo I, (figura no mostrada).

A partir de las gráficas, y con los datos de la distancia recorrida por cada banda generada, se calculó el tamaño aproximado que correspondía a cada uno de los fragmentos de las diferentes digestiones.

a b c d e f

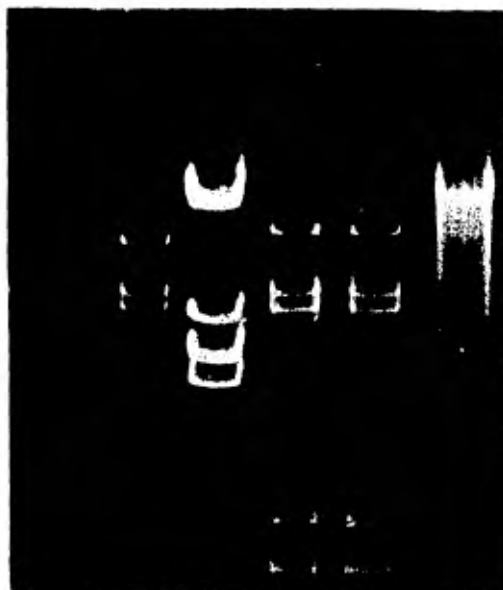


Figura 7.- Comparación de los patrones de restricción generados con Eco RI en los ADN_m de las cepas utilizadas.

- a. WM 27-01₂
- b. AM 34
- c. λ
- d. WM 27
- e. WM 27-01₁
- f. WM 27 sin digerir

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

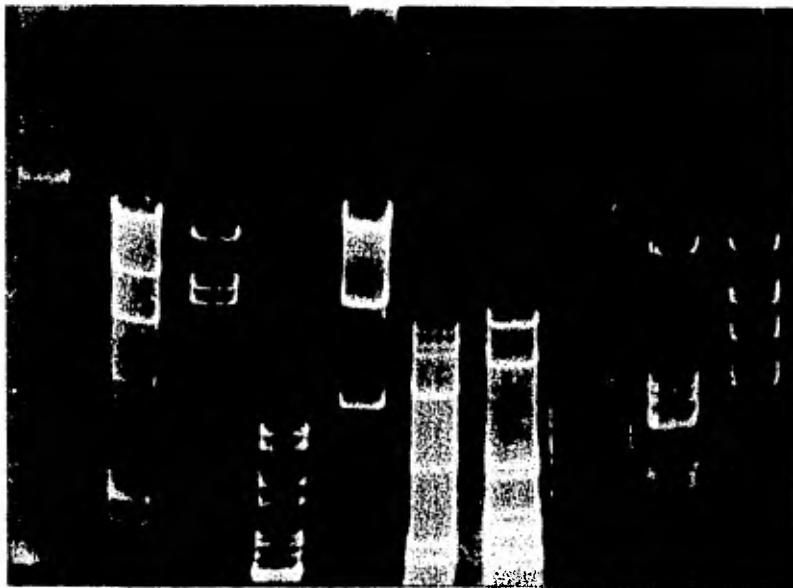


Figura 8.- Gel de Agarosa. Muestras de ADN_m de AM-34 digeridas con enzimas.

1. A M 34
2. λ con Hind III
3. AM 34 con Eco RI
4. AM 34 con Mbo I
5. AM 34 con Hind III
6. AM 34 con Hae III
7. AM 34 con Hpa II
8. AM 34 con Sal I
9. AM 34 con Hinc II
10. AM 34 con Hpa I

a b c d e f g



Figura 9.- Gel de Acrilamida al 7.5 %. Muestras de ADN_m de WM 27-ol₂ digeridas con diferentes enzimas.

- a. WM 27 -ol₂ con Sal I
- b. WM 27 -ol₂ con Hind III
- c. WM 27 -ol₂ con Eco RI
- d. WM 27 -ol₂ con Hpa II
- e. WM 27 -ol₂ con Hae III
- f. WM 27 -ol₂ con Mbo I
- g. L-3 con Eco RI

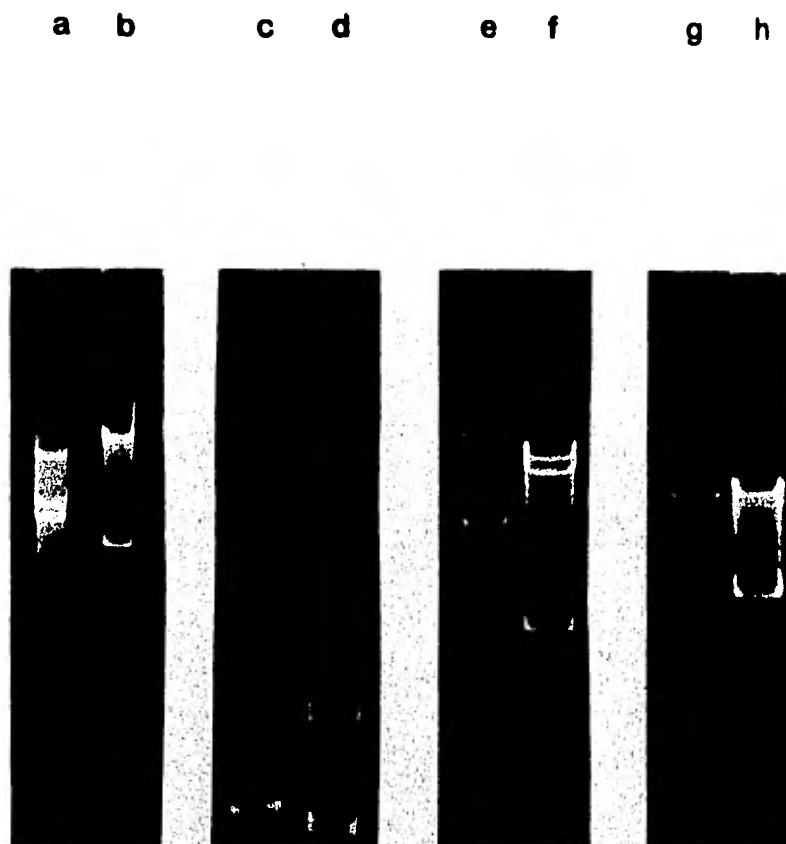


Figura 10.- Gel de Agarosa. Comparación de los patrones generados por diferentes enzimas sobre el ADN_m de las cepas WM 27 y L-3.

- | | | | |
|----|-------|-----|-----------------|
| a | WM 27 | con | <u>Eco</u> RI |
| b. | L-3 | " | <u>Eco</u> RI |
| c. | WM 27 | " | <u>Mbo</u> I |
| d. | L-3 | " | <u>Mbo</u> I |
| e. | WM 27 | " | <u>Hind</u> III |
| f. | L-3 | " | <u>Hind</u> III |
| g. | WM 27 | " | <u>Sal</u> I |
| h. | L-3 | " | <u>Sal</u> I |

V. DISCUSION

Como se dijo anteriormente, es curioso el hecho de que el ADN mitocondrial de K. lactis sea la mitad del de S. cerevisiae, ó sea, tiene la mitad de información genética.

Este dato que tanto llama la atención puede explicarse, porque el ADN mitocondrial de S. cerevisiae posea grandes regiones espaciadoras (33), ó porque contiene numerosos genes involucrados en regulación que no están presentes en el ADN de K. lactis.

Para conocer mejor su arreglo genético, era necesario contar con mutantes diversas y probar que esas mutaciones provenían del ADN mitocondrial.

La mejor manera de probar esto era comparar el patrón de restricción de la cepa silvestre con el de las mutantes. En la figura 6 se observa el ADN mitocondrial de la cepa silvestre, WM 27, y de las tres mutantes: AM 34, WM 27-ol₁ y WM 27-ol₂, y del plásmido pC 252 usado como marcador de peso molecular. De esta manera, se vió que todos estos ADNs tienen el mismo peso molecular, 24×10^6 daltons y que no sufrieron ninguna alteración durante su manipulación.

A los ADNs de las diferentes cepas se les trató con todas las endonucleasas de restricción y se compararon las bandas resultantes, pero los patrones electroforéticos resultaron ser idénticos para la cepa silvestre y las demás mutantes.

En la figura 7 se observa un ejemplo de la cepa silvestre WM 27 y de las mutantes WM 27-ol₁, WM 27-ol₂ y AM 34 digeridas con Eco RI. Se verá que el patrón de restricción es exactamente el mismo. Esto mismo sucedió con el resto de las enzimas, por lo cual sólo se ejemplifican los resultados obtenidos con las cepas AM 34 (gel de agarosa) y WM 27-ol₂ (gel de acrilamida) en las figuras 8 y 9. En la tabla 2 aparecen el número aproximado de pares de bases (p.b.) correspondiente a cada fragmento, obtenido al extrapolar de las gráficas de logaritmo de pares de bases vs distancia de los controles. Como se observa en esta tabla, la suma de fragmentos en pares de bases para cada digestión es alrededor de 37 k.p.b., la misma cantidad que corresponde al ADN_m sin digerir. Con las enzimas Mbo I y Hpa II la suma de fragmentos es un poco menor. Esto se debe a que los fragmentos que se observan en el gel de acrilamida son muy numerosos y pequeños y es difícil saber con exactitud cuántos son y qué tamaño tienen.

Desgraciadamente el objetivo de encontrar una diferencia en el patrón de restricción no se pudo lograr. Esto pudo deberse a dos razones:

- a) Las mutaciones encontradas no son de origen mitocondrial, sino nuclear.
- b) Las mutaciones encontradas son de origen mitocondrial, pero son puntuales ó se deben a un corrimiento de fase de lectura y no a una deleción; ó bien una deleción pequeña no distinguible por métodos de electroforesis de ADN en las condiciones usadas.

T A B L A 2

Tamaño de los fragmentos (en Kp. b.) generados en el ADN_m de la cepa AM 34 por la digestión con diferentes enzimas.

AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34	AM 34
	HindIII	EcoRI	MboI	Hind III	HaeIII	HpaII	SaII	HincII	Hpa I
37	23.67	17.0	3.5	22.6	6.6	7.4	30.0	13.5	14.0
	9.46	8.2	3.1	7.8	6.2	5.4	4.3	5.0	8.6
	6.66	7.8	2.5	4.1	5.4	3.0	2.3	4.3	6.5
	4.26	2.1	2.2	2.1	4.5	2.7	====	4.1	5.0
	2.1	1.7	2.2	====	4.5	2.5	36.6	4.1	2.7
	1.96	====	1.9	36.6	2.9	2.15		2.8	====
	0.58	36.8	1.85		1.8	1.9		2.5	36.8
	====		1.7		1.55	1.8		====	
	48.69		1.7		1.5	1.7		36.8	
			1.4		1.3	1.4			
			1.35		0.72	1.4			
			1.3		0.62	*3.93			
			1.2		0.31	====			
			1.1		====	35.28			
			*8.56		37.20				
			====						
			35.26						

* Suma de todos los fragmentos cuyo tamaño es menor a 1000 p.b.

A la primera explicación se le puede objetar el hecho de que las pruebas genéticas realizadas con esas mutantes dieron como resultado que son de origen extracromosomal. Además, los experimentos bioquímicos hechos con mutantes resistentes a oligomicina y antimicina, mencionados anteriormente, son otras pruebas que apoyan la idea de que las mutaciones son de origen mitocondrial. Se puede asegurar, entonces, que la mutación no es de origen nuclear, sino meramente extracromosomal (posiblemente mitocondrial). A este respecto, se debe mencionar la presencia en S. cerevisiae de otro factor extracromosómico no mitocondrial que puede dar resistencia a antibióticos (27), aunque se cree que este no es el caso.

La segunda explicación parece ser más probable, ya que algunas mutaciones mitocondriales responsables de resistencia a dorgas han resultado ser mutaciones puntuales en S. cerevisiae. Además que la forma en que se obtuvieron las mutantes con que se trabajó parece indicar que estas mutaciones no son debidas a deleciones grandes. Si este fuera el caso, no se observarían diferencias en los patrones de restricción. La digestión con enzimas no puede precisar en qué lugar está el cambio de base ó el corrimiento de fase, a menos que la enzima cortara exactamente en el sitio de la mutación, cosa estadísticamente muy difícil. Un posible método para detectar esos cambios tan pequeños sería el realizar una secuencia de bases del ADN de la fracción en donde probablemente se encuentra la mutación.

Como se mencionó anteriormente, en experimentos realizados por otros laboratorios, se habían hecho digestiones con endonucleasas de restricción de una cepa silvestre de K. lactis (L - 3). Por esta razón, ya se conocía de antemano la distribución de diversos sitios y el patrón electroforético de este ADN_m al ser digerido con algunas endonucleasas.

En base a estos datos, se esperaba que el patrón de restricción de las cepas usadas en este estudio fuera igual a los reportados (21), pero no sucedió así. Por el contrario, se vió que los patrones obtenidos diferían enormemente de los ya conocidos, lo que motivó cierta duda de la fidelidad de los resultados.

Por esta razón, se realizaron digestiones y se compararon los patrones de 2 cepas silvestres que se tenían en el laboratorio: la UM 27, progenitora de las mutantes, y la L - 3, que parecía tener el mismo origen que una de las cepas reportadas en la literatura (cepa reportada por el grupo de Fukuhara (21)).

El patrón de restricción de la cepa L - 3 es el mismo que el reportado por estos investigadores, lo que quiere decir que la cepa UM 27 es diferente y que el análisis de restricción se hizo correctamente. Los patrones de restricción de los ADNs mitocondriales de las dos cepas se ven en la figura 10 y se podrá observar que son bastante diferentes. En la tabla 3 se comparan el número de pares de bases obtenidos en geles de agarosa con cuatro enzimas diferentes.

T A B L A 3

Comparación de los fragmentos generados por la acción de diferentes endonucleasas en los ADN_m de las cepas UM 27 y L - 3. (En K.o.b.)

UM 27 Eco RI	L - 3 Eco RI	UM 27 Mbo I	L - 3 Mbo I	UM 27 Hind III	L - 3 Hind III	UM 27 Sal I	L - 3 Sal I
17.0	28.0	3.5	3.0	22.6	18.4	29.0	30.0
18.2	6.5	3.1	2.1	7.8	14.7	5.3	7.0
7.8	1.4	2.5	2.0	4.1	3.7		
2.1		2.2	1.8				
1.7		2.2	1.6				
		1.9	1.3				
		1.85	1.2				
		1.7	1.0				

En diversos estudios realizados con ADN mitocondrial de diferentes especies como Drosophila, Zea, Rattus, S. cerevisiae y humano se ha visto que existen ciertas diferencias inter e intraespecíficas en sus patrones de restricción. (34, 35, 36, 37, 38) .

Una posible explicación es que los ADNs mitocondriales entre las diferentes cepas son similares en su secuencia general, pero tienen muchos rearrreglos pequeños. Estos rearrreglos pueden ser debidos a pequeñas inserciones ó deleciones ó a regiones espaciadoras de diferente tamaño (regiones ricas en A - T distribuidas entre los genes y con una posible función en regulación). (38, 39)

Este polimorfismo también puede ser un indicio de la divergencia evolutiva dentro de una misma especie como ha sido reportado para Peromyscus, Rattus y Homo sapiens. Por otro lado, esta diversificación en la secuencia nucleotídica del ADN mitocondrial ha permitido establecer en forma definitiva que el genoma mitocondrial de ciertos individuos recibe una herencia materna solamente (a diferencia del genoma nuclear que es heredado en forma biparental) y no se ve alterado por recombinación ó segregación meiótica. (36, 40, 41, 42, 43)

El análisis de restricción que se tiene hasta la fecha es limitado y se necesitarán más estudios con otras enzimas para conocer la base molecular de esta divergencia y el papel de ésta dentro de la evolución de las levaduras.

VI. R E F E R E N C I A S

1. Sager, R., Cytoplasmic Genes and Organelles. Academic Press, New York (1972).
2. Roberts, R., The Role of Restriction Endonucleases in Genetic Engineering; en Recombinant Molecules: Impact on Science and Society. Eds. R. F. Beers, Jr. and E. G. Bassett. Raven Press, New York (1977).
3. Bibb, M. J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M. W. y Clayton, D.A., Sequence and Gene Organization of Mouse Mitochondrial DNA; Cell 26: 167-180 (1981).
4. Anderson, S., Barkier, A.T., Barrell, G. B., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.F., Roe, B.A., Sanger, F., Scherer, P.H., Smith, A.J., Sladen, R. y Young, I.G., Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome; Nature 290: 457-465 (1981).
5. Gillham, N.W., Organelle Heredity. Raven Press, New York (1978).
6. Kornberg, A., DNA Synthesis. W.H. Freeman,
7. Smith, H. y Wilcos, K., A Restriction Enzyme from Haemophilus influenzae. I. Purification and General Properties; J. Mol. Biol. 51: 379 (1970).
8. Danna, H. y Nathans, D., Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonucleases of Haemophilus influenzae; Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 68: 2913 (1972).

9. Yuan, R.; *Ann. Review Biochem.* 50: 285 (1981).
10. Soberón, X., Covarrubias, L., Bolívar, F., Construc -
tion and Characterization of New Cloning Vehicles. IV.
Deletion Derivatives of pBR 322 and pBR 325; *Gene* 9:
287-305 (1980).
11. Roberts, K.J., *Restriction and Modification Enzymes
and their Recognition Sequences*; *Nucl. Ac. Res.* 10,
[5]: r117-r144 (1982).
12. Soberón, X., *Caracterización de un Vehículo Molecular
de Clonación: El Plásmido pBR 325*. Tesis, Universi-
dad Iberoamericana, México, D.F. (1979).
13. Mortimer, R.K. y Hawthorne, D.C., *Yeast Genetics*; en
The Yeasts, Vol. I. Eds. Rose, A.H. y Harrison, J.S.
Academic Press, New York (1969).
14. Ephrussi, B., *The Interplay of Heredity and Environ-
ment in the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast*;
Harvey Lect. 46: 45-67 (1950).
15. Brunner, A., *Herencia Citoplásmica de la Resistencia a
Oligomicina, Eritromicina y Cloranfenicol en la Levadu-
ra "Petite Negativa": Kluyveromyces lactis*; en *Temas
Bioquímicos de Actualidad*. Ed. Piña, E., Peña, A.,
Chagoya de Sánchez, V. y Martuscelli, J. UNAM, México
(1978).
16. Roberts, H., Smith, S., Marzuki, S. y Linnane, A., E-
vidence that Cytochrome b is the Antimycin-Binding
Component of the Yeast Mitochondrial Cytochrome bc₁
Complex; *Arch. Biochem. Biophys.* 200, [2]: 387-395
(1980).

17. Tzagoloff, A., Assembly of the Mitochondrial Membrane System. III. Function and Synthesis of the Oligomycin Sensitivity-Confering Proteins of Yeast Mitochondria; *J. Biol. Chem.* 243, 2 : 1545-1551 (1970).
18. Tzagoloff, A., Foury, F. y Akai, A.; en *The Genetic Function of Mitochondrial DNA*. Eds. Saccone, C. and Kroon, A.M. North Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).
19. Sanders, J.P.M., Weijers, F.J., Groot, G.S.P. y Borst, P., Properties of Mitochondrial DNA from Kluyveromyces lactis; *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 374: 136-144 (1974).
20. Groot, G.S.P. y Loosbroek, N., The Organization of the Genes for Ribosomal RNA on Mitochondrial DNA of Kluyveromyces lactis; *Current Genetics*, 1: 133-135 (1980).
21. Wesolowski, M., Algeri, A. y Fukuhara, H., Gene Organization of the Mitochondrial DNA of Yeasts: Kluyveromyces lactis and Saccharomycopsis lipolytica; *Current Genetics*, 3: 157-162 (1981).
22. Putrament, A., Baranowska, H., Ejchart, A. y Prazmo, W. Induction by Manganese of Mitochondrial Antibiotic Resistance Mutations in Yeast. *Mol. Gen. Genet.* 126: 357-366 (1973).
23. Heritage, J. y Whittaker, P.A., Isolation of Metabolically Active Petite Mutants of Kluyveromyces lactis, A Petite-Negative Yeast; *Molec. Gen. Genet* 156: 93-98 (1977).

24. Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Petrochelo, E., Slonimski, P.P., Bolotin-Fukuhara, M y Coen, D.; Mitochondrial Genetics. VI. The Petite Mutation In Saccharomyces cerevisiae: Interrelations Between the Loss of the Drug Resistance Mitochondrial Genetic Markers; Genetics 76: 195-219 (1974).
25. Brunner, A., Manuscrito en preparaci6n.
26. Brunner, A. y Tuena de Cobos, A., Extrachromosomal Oligomycin-Resistant Mutants of the Petite-Negative Yeast Kluyveromyces lactis. Properties of Mitochondrial ATPase and Cross-Resistance to Inhibitors of Phosphoryl Transfer Reactions; Molec. Gen. Genet., 178: 351-355 (1980).
27. Griffiths, D., Lancashire, W. y Zanders, E., Evidence for an Extra-Chromosomal Element Involved in Mitochondrial Function: A Mitochondrial Episome?; FEBS Letters 53: 126 (1975).
28. Duell, E.A., Inque, S. y Utter, M.F., Isolation and Properties of Intact Mitochondria from Spheroplast of Yeast; J. Bacteriol., 88: 1762-1773 (1964).
29. Kovác, L., Groot, G.S.P. y Racker, E.; Biochim Biophys Acta 256: 55-65 (1972).
30. Hollenberg, D.F., Borst, P. y Van Bruggen, E.F.J., Mitochondrial DNA. V. A 25-u Closed Circular Duplex DNA molecule in Wild-Type Yeast Mitochondria. Structure and Genetic Complexity; Biochim. Biophys. Acta 209: 1-15 (1970).

31. Bolivar, F., Rodríguez, R., Betlach, M.C. y Boyer, H. W., Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. I. Ampicillin-Resistant Derivatives of the Plasmid pMB9; Gene **2**: 75-93 (1977 a).
32. Southern E., Synthesis, Isolation and Purification of DNA: en Methods in Enzymology, Vol. 68 Recombinant DNA Ed. Ray Wu. Academic Press, New York (1979).
33. Prunell, A. y Bernardi, G., The Mitochondrial Genome of Wild-Type Yeast Cells. IV. Genes and Spacers; J. Mol. Biol., **86**: 825-841 (1974).
34. Shah, M.D. y Langley, C.H., Inter and Intraespecific Variation in Restriction Maps of Drosophila Mitochondrial DNAs; Nature, **281**: 696-699 (1979).
35. Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M., Meijlink, C.P.W. y Borst, P., The Organization of Genes in Yeast Mitochondrial DNA; Molec. Gen. Genet., **157**: 239-261 (1977).
36. Denaro, M., Blanc, J., Johnson, M.J., Chan, K.H., Wilmsen, E., Cavalli-Sforza, L.L. y Wallace, D.C., Ethnic Variation in Hpa I Endonuclease Cleavage Patterns of Human Mitochondrial DNA; Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. **78**, [9]: 5768-5772 (1981).
37. Sederoff, R.R., Levings III, C.S., Tymothy, D.H. y Hu, W.W.L., Evolution of DNA Sequence Organization in Mitochondria Genomes of Zea; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **78**, [10]: 5953-5967 (1981).
38. Brown, G.G. y Simpson, M.V., Intra and Interspecific

- Variation of the Mitochondrial Genome in Rattus norvegicus and Rattus rattus: Restriction Enzyme Analysis of Variant Mitochondrial DNA Molecules and their Evolutionary Relationships; Genetics, 97: 125-143 (1981).
39. Prunell, A., Kopecka, H., Strauss, F. y Bernardi, G., The Mitochondrial Genome of Wild-Type Yeast Cells. V. Genome Evolution; J. Mol. Biol., 110: 17-52 (1977).
40. Reilly, J.G. y Thomas, C.A., Length Polymorphisms, Restriction Site Variation and Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA of Drosophilla melanogaster; Plasmid, 3: 109-115 (1980).
41. Buzzo, D., Fouts, D.L. y Walstenholme, D.F., Eco RI Cleavage Site Variants of Mitochondrial DNA Molecules from Rats; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, [2]: 909-913 (1978).
42. Hutchison, C.A., Newbold, J.E., Potter, S.S. y Edgell, M.H., Maternal Inheritance of Mammalian Mitochondrial DNA; Nature, 251: 536-538 (1974).
43. Lansman, R.A., Shade, R.O., Shapira, J.F. y Avise, J.C. The Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. III. Techniques and Potential Applications; J. Mol. Evol., 17: 214-226 (1981).