

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

BO 468/87  
637 es. 3  
Biología

ESTUDIO GENETICO DE UNA MUTANTE EXTRACROMOSOMICA RESISTENTE A  
ANTIMICINA A, DE LA CEPA WM27 DE LA LEVADURA  
Kluyveromyces lactis.

T E S I S

Que para obtener el titulo de

B I O L O G O

presenta

MARTIN IGNACIO GARCIA CASTRO

MEXICO, D.F.

1987



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.

A mis padres que me brindaron además de su apoyo incondicionado, un aliento inagotable, amor y comprensión.

A mis hermanas, a todas con mucho cariño

A Pablo, por hacerme sentir parte de su vida

A Ignacio mi primo, por haberme enseñado la puerta de la biología, siendo siempre además de un ejemplo, un amigo

A Roberto Coria, por haberme brindado su amistad, además, agradeciéndole especialmente el interés que mostro en mi formación académica, por su apoyo, paciencia y enseñanza

A la Dra. Aurora Brunner L. por haberme permitido aprender, por sus enseñanzas, y en especial por su confianza y amistad; en especial mi admiración por haberme tolerado 2 años y medio

A los profesores sinodales de este trabajo

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo, y por haberme brindado una vega para sustenmtar mis gastos

PCCBNA0338  
53725-N-19467

A Gabriela con todo cariño, por empaparme de felicidad  
s.c.d.b.-5,t.a.e.t.q.c.

Y plagiando finalmente a una querida amiga , a los cuates, ellos saben quienes son.

# I N D I C E

	pagina
Introducción	4
La mitocondria, origen y función	4
El DNAmít	5
Tamaño y estructura del DNAmít	6
Información genética del DNAmít	7
El DNAmít y el código genético	8
Replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial	9
Aportaciones principales del estudio del DNAmít	10
Levaduras y DNAmít	10
Mutaciones extracromosómicas	11
Citocromos y cadena respiratoria	12
Complejo III "Coenzima Q-citocromo c reductasa "	12
Antimicina A, inhibidor del complejo III	15
DNA recombinante	18
Objetivo	20
METODOLOGIA	21
Medios de cultivo	21
Extracción de DNAmít	21
Maxipreparación de plásmidos	22
Minipreparación de plásmidos	22
Gradiente de cloruro de cesio	23
Análisis con endonucleasas de restricción	23
Electroforesis en gales	23
Rellenado	24
Defosforilación de extremos 5' terminales	24
Ligación	25
Preparación de células competentes	25
Transformación de células competentes	26
Identificación de Transformantes	26
Obtención de templados del plásmido pTZR18 para secuenciar	27
Secuenciación	28
RESULTADOS	29
DISCUSION	57
BIBLIOGRAFIA	68

ESTUDIO GENETICO DE UNA MUTANTE EXTRACROMOSOMICA RESISTENTE A ANTIMICINA A , DE LA CEPA WM27 DE LA LEVADURA Kluyveromyces lactis.

1.-INTRODUCCION

1.1.-LA MITOCONDRIA

1.1.1.-ORIGEN Y FUNCION

Las mitocondrias son estructuras subcelulares (organelos) que existen dentro del citoplasma de células eucariotas (1,2,3). Las mitocondrias tienen una doble membrana, la interna, presenta un gran número de invaginaciones rugosas denominadas crestas; la externa, es lisa y elástica. El compartimento interno se denomina matriz, fase gelatinosa formada casi en un 50% por proteínas. La mitocondria (mit.) varía considerablemente de tamaño y forma de una célula a otra, además, también puede variar dependiendo del estado fisiológico de la misma. Sin embargo, el tamaño estándar de la mit. de levadura es de unos 3µm de largo, y de 0.5 a 1µm de diámetro ( 22,23,24,25, 27). Hasta 1973, solamente se había reportado un organismo que contuviese una sola mitocondria por célula, las algas unicelulares Micromonas, y se pensaba que todas las células eucariotas poseían muchas mitocondrias por célula, sin embargo existe un reporte en el cual se cuestiona tal creencia, y se postula al menos para la levadura Saccharomyces cerevisiae un nuevo modelo en el cual a través de secciones seriadas de células enteras se reveló la existencia de una sola mitocondria, grande, ramificada y con crestas, dependiente del estado fisiológico de la célula ( 46,49 ).

Las mitocondrias llevan a cabo reacciones de oxidorreducción sobre los productos de la degradación de

alimentos, y usan la energía libre resultante para sintetizar adenosín trifosfato (ATP), una molécula de alta energía utilizada en el trabajo celular. Hace aproximadamente un siglo, algunos científicos pensaban que la mit. era una bacteria, viviendo dentro de las células, sin embargo, gracias a las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico, se desecharon estas ideas, siendo reemplazadas por la hipótesis del "ENDOSIMBIONTE", la cual propone que la mit. puede haber descendido de una bacteria aeróbica primitiva estableciendo una relación simbiótica con su hospedero, una célula fermentativa de mucho mayor tamaño, quedando atrapada y siendo modificada a través de muchas generaciones, manteniéndose un estrecho intercambio de metabolitos, recibiendo protección y nutrientes, a cambio de la energía elaborada por su eficiente maquinaria de oxidorreducción ( 1,4 ). En los últimos 5 años, se han logrado grandes avances en torno al tamaño, contenido y dinámica del genoma mitocondrial, a través de los cuales cada vez parece más certera la teoría del endosimbionte.

#### 1.1.2.-EL DNA MITOCONDRIAL

Las mit. contienen un genoma con relativamente pocos genes estructurales, que portan la información para subunidades de enzimas importantes; para expresar estos genes estructurales, las mit. poseen su propio sistema de síntesis de proteínas ( RNAs ribosomales, de transferencia y mensajeros ), empleando un código genético que varía un poco con respecto al sistema universal ( bacterias y citoplasma eucarionte ) ( 3 ).

La mayor parte de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear, posteriormente son sintetizadas en el citoplasma y finalmente son importadas al interior de la mitocondria. Así, se requiere el funcionamiento de cuando menos 100 genes nucleares, para permitir la expresión de unos cuantos genes mitocondriales vitales; además de los componentes predecibles de este sistema genético, algunos genes nucleares codifican para proteínas requeridas específicamente para la traducción de ARNs particulares codificados por la mit. cuando menos en la levadura Saccharomyces cerevisiae ( 2,46 ).

#### 1.1.2.A.- TAMAÑO Y ESTRUCTURA DEL DNAmít

El ADN mitocondrial (ADNmit) se parece al ADN bacteriano en que consiste en una sola doble hélice de ADN, algunos autores han sugerido que el ADNmit está asociado a proteínas, formando nucleoides, de los cuales no se han identificado plenamente su funcionamiento y constitución, sin embargo se han realizado estudios sobre su arreglo durante el ciclo de vida de la levadura Saccharomyces cerevisiae ( 47, 48 ), mientras que el ADN nuclear de eucariontes es un complejo fuertemente unido a proteínas ( nucleosomas ) en los cuales se han identificado dos grupos de proteínas, las histonas y las no histonas, además, está repartido en un número discreto de cromosomas. Excepto en algunos protozoarios ciliados, en el mixomiceto Physarum polycephalum y la levadura Hansenula mrakii, en los cuales el genoma mitocondrial es lineal, en todos los demás organismos estudiados, la doble helice de DNAmít se encuentra formando un círculo covalentemente cerrado (46). El

genoma mitocondrial de la mayoría de las especies, sin embargo, es mucho más simple que el de la bacteria más sencilla y se aproxima en talla al genoma de varios virus, su tamaño varía desde los 16 kilopares de bases (kb) en mamíferos como el hombre, hasta 100kb o más en levaduras(4). Los genomas mit de plantas superiores, por ejemplo, son mucho mayores que los genomas mit de otros grupos de organismos eucarióticos (4,50), se han reportado genomas mit de plantas superiores que van de 200 a 2400 kb, y aún dentro de una simple familia de plantas superiores es aparente una diferencia de 7 a 8 veces en tamaño (4,5,6,11). Las diferencias en los genomas mit humano y de levadura se han intentado explicar por la diferencia en organización del mismo número de genes, pero este criterio no parece ser válido para justificar el enorme tamaño y variedad del genoma mit de las plantas superiores partiendo de la información actual sobre este (4).

#### 1.1.2.B.-INFORMACION GENETICA DEL DNAmít

El DNAmít de muchos organismos ha sido secuenciado, y se ha encontrado un exceso de material genético comparado con los genes reportados para dicho genoma; es claro que existen pocos marcos de lectura abiertos adicionales. Así, la cantidad de DNA que no posee funciones codificantes alcanza proporciones muy altas con respecto al genoma mitocondrial ( por ejemplo, 50 a 80 % en hongos ) En muchos casos las regiones no codificantes están flanqueadas por miembros de las secuencias palindrómicas ricas en G C ( de 50 a 100 pares de bases (pb)), las cuales junto con las pequeñas secuencias palindrómicas repetidas directas o invertidas



reportadas en dicho genoma, seguramente participan en la dinámica molecular del mismo, la cual puede apreciarse tanto a través del polimorfismo intraespecífico, como por la elevada tasa de mutación que presenta ( 10 veces mayor que la del núcleo eucarionte )( 50,51 ).

Excluyendo al ADNmit de las plantas superiores, podemos decir que el ADNmit codifica para 12 proteínas cuando mucho, para 2 ARNs ribosomales (rARN) y para un número variable de ARNs de transferencia (tARN) (3,12,50). En todos los genomas mitocondriales estudiados se han encontrado las mismas proteínas estructurales ( subunidades I,II y III de la citocromo oxidasa, subunidades 6 y 8 de la ATPasa , el apocitocromo b, la codificación de la subunidad 9 de la ATPasa, la cual en algunas levaduras es mitocondrial, en Neurospora y en Aspergillus es nuclear a pesar de que hay un gen para esta subunidad en el genoma mitocondrial.

#### 1.1.2.C.-EL ADNmit Y EL CODIGO GENETICO

Se han encontrado en las mitocondrias de varias especies variaciones en el código genético universal. El único cambio común es el significado del codón UGA, el cual normalmente significa término, mientras que en las mitocondrias codifica para el aminoácido triptofano. Otros cambios son característicos de cada especie, en la tabla 1 aparecen algunos ejemplos.

TABLA 1.

---

Transgresiones al código genético universal en la mitocondria

---

ORGANISMO	CODON	PROBABLE SIGNIFICADO MITOCONDRIAL	SIGNIFICADO COMUN
TODOS	UGA	TRIFTOFANO	TERMINO
LEVADURA	CUA	TREONINA	LEUCINA
MOSCA	AGA	SERINA	ARGININA
MAMIFERO	AGG	TERMINO	ARGININA
MAMIFERO	AGA	TERMINO	ARGININA
MAMIFERO	AUA	METIONINA	ISOLEUCINA

---

#### 1.1.2.D.-REPLICACION, TRANSCRIPCION Y TRADUCCION DEL GENOMA mit

Se ha propuesto que el genoma mit de *S.cerevisiae* se replica por la presencia de varios orígenes de replicación que son empleados al azar. La replicación al parecer se lleva a cabo asincrónicamente con respecto a la división celular. En cuanto a la traducción, las mit. de levaduras poseen un juego completo de tARNs, suficientes para traducir un número discreto de RNAs mensajeros (mRNAs) (8). La polimerasa de RNA (RNAPol) mitocondrial de levaduras ya se ha purificado, y trabajos recientes sugieren que la enzima puede estar compuesta de 2 ó más subunidades separables, una de las cuales puede catalizar la polimerización de ribonucleótidos, pero no reconoce al promotor, ésta podría compararse con el "core" de la misma enzima en bacterias. La otra subunidad interactúa con el core para facilitar el reconocimiento

del promotor, este componente es análogo a la subunidad sigma de la ARNpol bacteriana. Parece ser un gen nuclear, el que codifica para el componente protéico correspondiente al core mitocondrial (9).

#### 1.1.2.E.-APORTACIONES PRINCIPALES DEL ESTUDIO DEL DNAmít.

El estudio del material genético mitocondrial de distintas especies ha sido de gran ayuda para identificar ligeras variaciones al código universal(1,3,8,10), para entender los procesos de maduración de ciertos mARNs mitocondriales (4,13,14) así como para comprender el significado evolutivo de los intrones y la elaboración con éstos, de árboles filogenéticos tentativos (15,16).

#### 1.2.-LEVADURAS Y ADNmit

Las vías metabólicas que se llevan a cabo en la mit, ya sea en su matriz o en su membrana interna, han sido dilucidadas en gran medida por su estudio en levaduras, que al ser aeróbicas facultativas, pueden sobrevivir obteniendo energía ya sea de la glucólisis o de las reacciones de oxidorreducción mitocondriales.

El genoma mit ha sido mapeado detalladamente en algunas levaduras gracias al gran número de mutaciones conocidas en éstas, permitiendo el uso de diferentes clases de métodos de mapeo, ya sean moleculares, análisis genéticos por excisiones, y por análisis de recombinación ( 26 ).

En este sistema cada genoma mitocondrial presenta a los genes en sitios fijos, ordenados linealmente en un mapa circular.

### 1.2.1.-MUTACIONES EXTRACROMOSOMALES

Se sabe que el genoma mit de S.cerevisiae, frecuentemente sufre deleciones, que dan lugar a la formación de mutantes "petite" (rho-), las cuales normalmente retienen un pequeño segmento reiterado del genoma mit silvestre, a esta levadura se le clasifica como "petite" positiva (17). Las mutantes rho- en levaduras "petite" positivas, se han estudiado ampliamente gracias a la simplicidad de estos genomas, y a que fácilmente pueden ser comparados con el genoma silvestre, sin la necesidad de aplicar técnicas de clonación. Sin embargo, desde mediados de la década de los sesentas, se describieron levaduras incapaces de originar mutantes petite viables, a las que se les denominó petite-negativas. También en esa década, se describieron mutantes caracterizadas por conferir resistencia a antibióticos que inhiben, ya sea la síntesis de proteínas ( Cloramfenicol, Eritromicina, etc. ) o funciones mitocondriales relacionadas con el transporte de electrones ( Antimicina A, HQONO ) o la síntesis de ATP ( Oligomicina y sus derivados ).

Las funciones mitocondriales pueden ser afectadas tanto por mutaciones mit. como nucleares. Las nucleares están representadas por un número mínimo de 200 a 300 grupos de complementación; de éstos una gran proporción afecta la expresión del gen discontinuo cob, el cual codifica para el apocitocromo b y modula la expresión del gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (19).

### 1.3.-CITOCROMOS Y CADENA RESPIRATORIA

Entre los componentes de la membrana interna mitocondrial se encuentran los citocromos, éstos son proteínas transportadoras de electrones que contienen un grupo prostético "hemo", el cual porta una molécula de hierro que pasa de una forma oxidada (FeIII) a una forma reducida (FeII) siempre que acepta un electrón. Los citocromos participan en la cadena respiratoria, entre la coenzima Q y el  $O_2$ , también aquí participan un número incierto de proteínas con grupo FeS (1 o 2 aparentemente). El papel fundamental de los citocromos en la respiración fue descubierto por D. Keilin en 1925 (23,25,27,29).

Tanto el grupo hemo como el FeS, son acarreadores de un electrón, contrastando con los acarreadores de 2 electrones: Flavinas,  $NADH+H^+$ , y la coenzima Q; así una molécula de  $QH_2$ , la forma reducida de la quinona, transfiere dos electrones a dos moléculas de citocromo b (el producto del gen cob, apocitocromo b, más el grupo hemo), el siguiente miembro de la cadena de transporte electrónico (25,29,27). En la figura 1 se muestra un perfil del transporte electrónico mitocondrial del sistema de fosforilación oxidativa.

#### 1.3.1.-COMPLEJO III, "COENZIMA Q-CITOCROMO C REDUCTASA"

Los citocromos b y  $c_1$ , además de la proteína FeS, son componentes del complejo "coenzima Q-citocromo c reductasa", el cual contiene 8 cadenas polipeptídicas diferentes, y se piensa que existe como un dímero de 500,000 daltones (d); el citocromo c

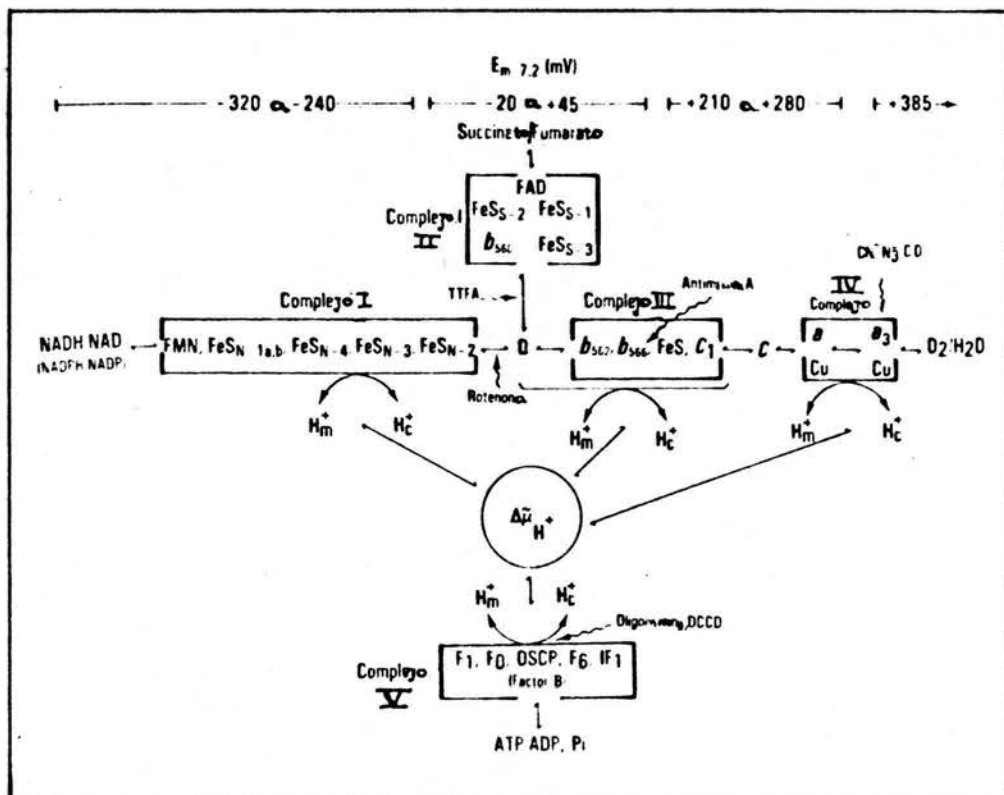
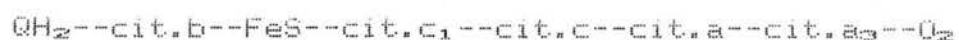


Figura 1. Perfil; del transporte electronico mitocondrial del sistema de fosforilación oxidativa, mostrando los componentes de los complejos I,II,III,IV, y V, así como la comunicación energética a través de un potencial de membrana. Además, se muestran los posibles sitios de acción de algunos inhibidores. Tomado de Martomosi (1984) "The Enzymes of Biological Membranes", 4: 5, Plenum Press, New York.

transfiere los electrones de este complejo al complejo de la citocromo c oxidasa, que contiene a los citocromos a y a<sub>3</sub>, este complejo es el mejor caracterizado, consiste de 7 cadenas polipeptídicas diferentes y ha sido aislado como un dímero de 250,000 d aproximadamente (27,29).

Los potenciales redox de los citocromos aumentan secuencialmente desde QH<sub>2</sub> hasta O<sub>2</sub>, en el siguiente orden:



El complejo Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, es parte de la cadena de transporte electrónico de mitocondrias, cloroplastos y algunas bacterias. Este complejo es conocido como citocromo bc<sub>1</sub> y b<sub>6</sub>f en mitocondria y cloroplasto respectivamente. Espectroscópicamente se han detectado en unidades monoméricas, dos componentes de citocromo b ( b-562 y b-566 ), con puntos medios de potencial diferentes. A partir de estudios detallados espectroscópicos y cinéticos, se ha propuesto que los 4 grupos hemo de citocromos b del complejo dimerico tienen propiedades diferentes. Un solo gen en el DNA mitocondrial o de cloroplasto codifica para el apocitocromo b, sin embargo, debido a la interacción de las subunidades que participan en el complejo, no se han podido dilucidar satisfactoriamente el papel específico de cada uno; recientemente se han reportado secuencias de ambos genes, a través de las cuales se propone los sitios de unión de esta proteína membranaral para los 2 grupos hemo con los que cuenta el citocromo b. Los sitios de unión propuestos, son 4 histidinas conservadas, en los segmentos intramembranales II y V,

ademas, se han detectado en diferentes organismos mutaciones puntuales en diferentes partes del gen, responsables de resistencias a inhibidores de la cadena respiratoria (28,36,52). En la figura 2 aparece un modelo esquematico del doblamiento del citocromo b en la membrana mitocondrial, y los probables sitios de union de los grupos hemo.

#### 1.3.1.A.-ANTIMICINA A, INHIBIDOR DEL COMPLEJO III

La Antimicina A es un inhibidor de la cadena respiratoria, que interrumpe el flujo de electrones a nivel del complejo coenzima Q citocromo c reductasa (25,29). Fue aislada como un fungicida de una especie de Streptomyces, y su poder inhibitorio fue observado por primera vez, por Ahmad et. al. (23,24). Por muchos años ha sido materia de discusión la posible interacción directa de la Antimicina A con el apocitocromo b, y en la levadura S.cerevisiae, se han mapeado mutaciones que dan resistencia al inhibidor en los exones 1 y 4 del gen mit que codifica para el apocitocromo b. Además, estas mutantes son en algunos casos resistentes al herbicida Diuron (Colson et.al. 1979).

El gen del apocitocromo b de la cepa WM27 de K.lactis ha sido caracterizado, y su secuencia de aminoacidos presenta un alto grado de homología (80%) con el de S.cerevisiae, pero a diferencia de este último, no es un gen discontinuo (A.Brunner, com. pers.). En la figura 3 se muestran los genes del apocitocromo b en ambas levaduras.



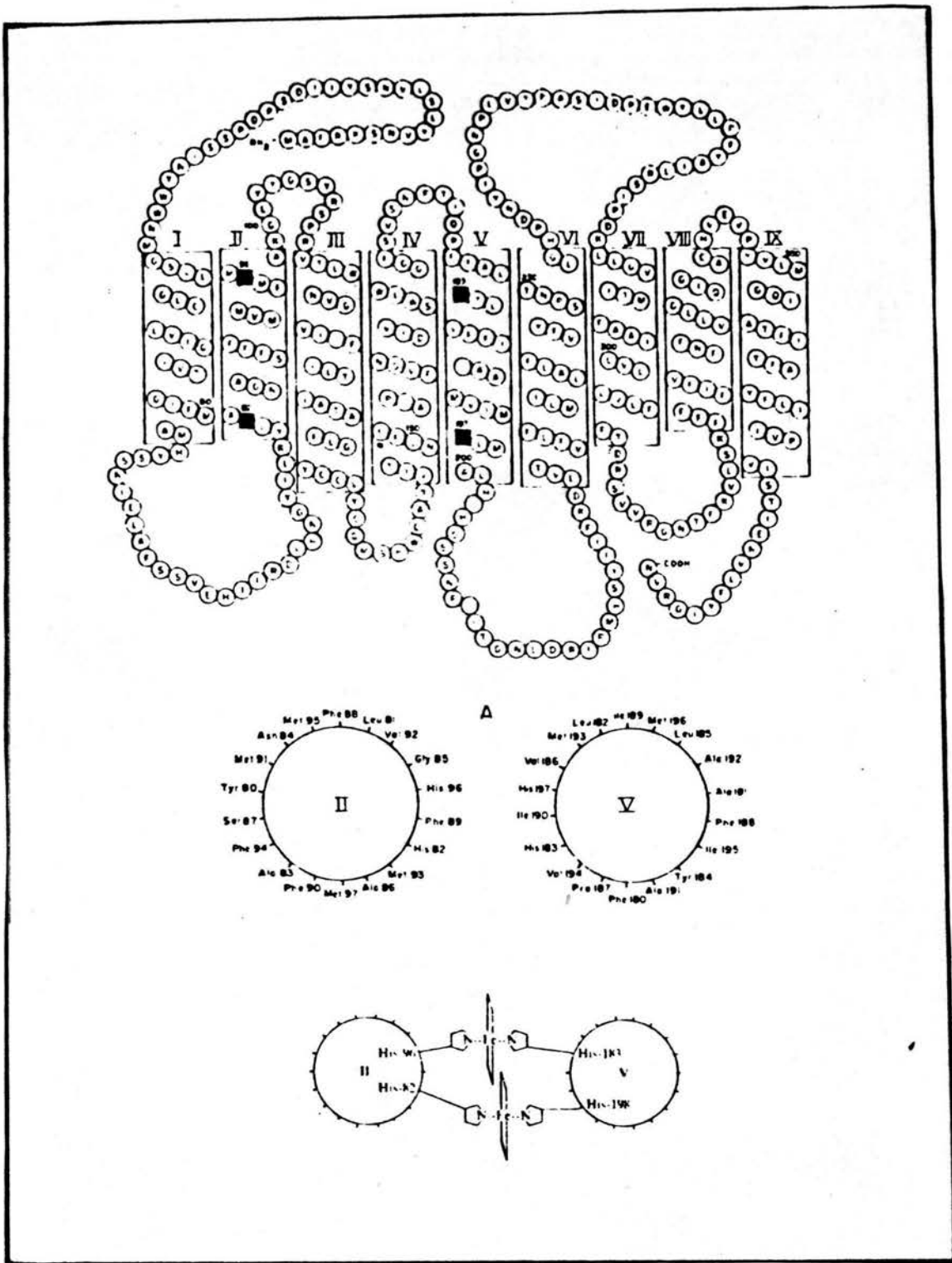
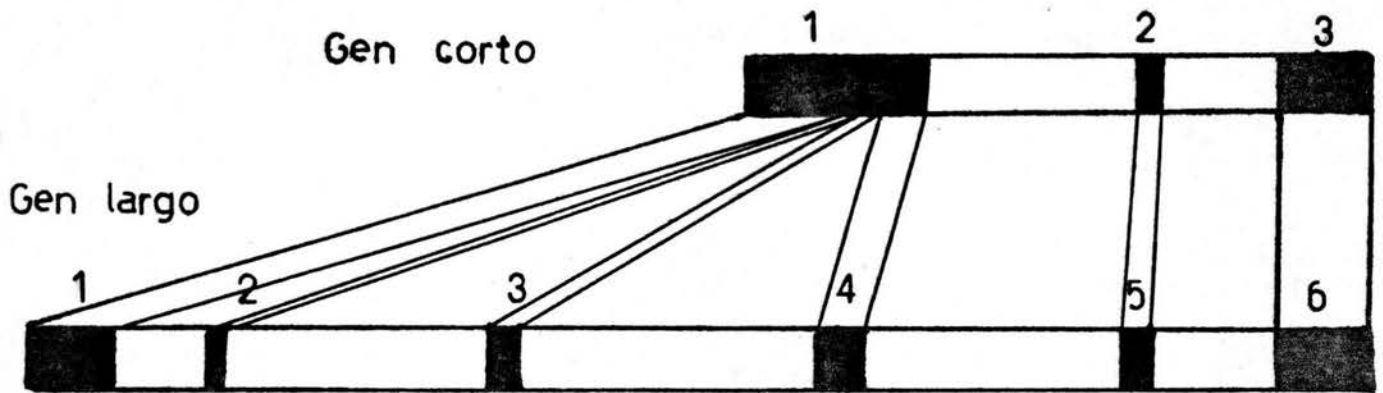


Fig.2.- Modelo esquemático del doblamiento del citocromo b en la membrana mitocondrial, mostrando IX segmentos intramembranales, y los posibles sitios de unión de los grupos hemo (28,36,52).

Apocitocromo b : en S. cerevisiae



80 %  
homologos en K lactis



Fig.3.- Comparación del gen del apocitocromo b en las levaduras S. cerevisiae y K. lactis. En el esquema aparecen las dos versiones del gen en S. cerevisiae, una larga y otra corta, con 6 y 3 exones respectivamente. Es interesante como aun cuando este gen en K. lactis no posee intrones, presente un alto grado de homología con respecto al de S. cerevisiae.

1.4.-DNA RECOMBINANTE

#### 1.4. -DNA RECOMBINANTE

A mediados de la década pasada, la tecnología de DNA recombinante revolucionó la biología molecular y la genética; esta metodología permite la clonación y secuenciación de genes específicos. Hasta cierto punto esta metodología resulta independiente de la utilizada anteriormente en genética, la cual se basaba en la obtención de mutantes y el mapeo genético clásico, sin embargo se ha dado la combinación de ambas metodologías en distintos campos. Actualmente casi cualquier segmento de DNA, el material genético de todas las células y de la mayoría de los virus, se puede aislar y replicar para proveer cantidades suficientes de éste, facilitando el estudio de su estructura y expresión. Estas metodologías han sido de gran ayuda no sólo en la investigación biológica científica, sino que también han aportado su utilidad en la medicina y la industria.

La clonación molecular se ha realizado principalmente en tres tipos diferentes de acarreadores de moléculas de DNA: fagos de cadena sencilla de DNA, fagos de doble cadena y plásmidos. Estos acarreadores, denominados vehículos o vectores de clonación, se utilizan para introducir fragmentos de DNA en células, para su replicación y amplificación.

El proceso de inserción en el cual se une una molécula de DNA al vehículo, se denomina ligación. La introducción y el establecimiento del vector híbrido en una célula es conocido como transformación; a ambos fenómenos se les da el nombre de clonación molecular o simplemente clonación.

Un elemento fundamental en la clonación es el vehículo utilizado, pues de este depende el éxito del trabajo. A continuación aparecen algunas de las características que debe poseer un buen vehículo molecular:

- Su mecanismo de replicación no debe competir con el de la bacteria hospedera, para que pueda rendir grandes cantidades del DNA insertado.

- Deben poseer marcadores genéticos que permitan su fácil identificación.

- Normalmente portan sitios únicos de restricción, y si éstos se encuentran dentro de las secuencias de marcadores genéticos, se facilita la identificación de moléculas recombinantes.

- Deben ser de bajo peso molecular para facilitar la separación del DNA del vehículo y el cromosomal, y favorecer el alto número de copias y la estabilidad del vehículo.

Las metodologías de DNA recombinante, también permiten la identificación y comparación de moléculas discretas a través de métodos físicos como la electroforesis.

Un paso fundamental en estas metodologías lo constituyó la secuenciación del DNA, es decir, la posibilidad de obtener una secuencia lineal de DNA ( el orden de los nucleótidos que lo constituyen ) y compararla con la secuencia de aminoácidos que conforman una proteína. Son dos las principales técnicas para secuenciar, la de Maxam y Gilbert, y la de Sanger. Aun cuando la última es aparentemente más fina por ser enzimática, ambas han sido ampliamente utilizadas.

Dos de los grandes avances que ofrecen las metodologías de DNA recombinante, son la mutagénesis *in vitro* y la expresión *in vivo* e *in vitro* de genes específicos.

#### 1.5.-OBJETIVO

Dos mutantes resistentes a Antimicina A (Am 13 y Am 34) derivadas de la cepa WM27 de la levadura K.lactis, fueron obtenidas y caracterizadas ( 40 ); estas mutantes muestran cinéticas de inhibición de la respiración muy similares, pertenecen a grupos de recombinación diferentes, y la cepa Am34 , pero no la Am13, es también resistente a Diurón. Esta mutante fué inducida con  $MnSO_4$  20 mM, mientras que la Am 13 surgió espontáneamente ( 40 ).

La localización e identificación de las modificaciones en el gen del apocitocromo b, de las cepas mutantes, muy probablemente nos acerque al conocimiento de las interacciones entre el apocitocromo b y la Antimicina A, si no, cuando menos entendamos el (o los) motivo (s) de la resistencia a este inhibidor, al comparar las supuestas modificaciones con el gen silvestre.

El objetivo del presente trabajo fué elaborar una genoteca del DNAm<sub>t</sub> de la cepa Am13, con el propósito ulterior de identificar y caracterizar al gen del apocitocromo b de esta mutante.

## METODOLOGIA

### Medios de cultivo :

Para la bacteria E. coli, se utilizó un medio de cultivo rico, el medio de Luria; para 1 litro de luria : 10g de NaCl , 10g de Triptona, 5g de Extracto de levadura; este fué empleado para crecer la cepa HB101, mientras que al trabajar con la cepa JM101, se empleó el medio rico YT: 8g/l triptona, 5g/l extracto de levadura, 5g/l de NaCl. Cuando se requirieron, se usaron los antibióticos apropiados (Ampicilina 50ug/ml y 80ug/ml, y Tetraciclina 15ug/ml).

Para levaduras se utilizó el medio YPD, Extracto de levadura 1%  
Peptona 1%  
Dextrosa 1%

En cualquiera de los dos medios anteriores, cuando se requiera de un medio solido, se usa agar al 2%

### Extracción de ADNmit:

Inocular 2 L de medio liquido YPD con 10ml de precultivo de la cepa deseada, dejar por 18hrs. a 30°,colectar centrifugando ,lavar 2 veces con agua y resuspender a razón de 50g de células en 60ml de: Sorbitol (sb) 0.6M, Tris HCl (THCl) 0.6M pH 7.5,EDTA 0.01M, Albumina serica bovina ( ASB) 0.1%.

Romper las levaduras con perlas de vidrio en el Braun, o mecánicamente, verificando en el microscopio por contraste de fases, la presencia de un mínimo de 50% de células rotas para seguir adelante, de este paso en adelante, se debe mantener una temperatura de 0°C en la preparacion , a menos que se especifique lo contrario.

Filtrar al vacío en fibra de vidrio, enjuagando las perlas de vidrio y la botella de rompimiento varias veces ( 2 a 3 ). Centrifugar el amortiguador de lavado y filtración a 4k por 15'.Centrifugar en otro tubo el sobrenadante a 16k por 15', desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en la solución siguiente: sb 0.9M,THCl 10mM pH 7.8, EDTA 1mM.

Repetir los pasos de las dos ultimas centrifugaciones, (4k y 16k), hasta que no se obtenga pastilla al centrifugar a 4k, entoces centrifugar a 16k por 15' y resuspender la pastilla de mitocondrias con mucho cuidado en la solución siguiente: sb 0.9M, THCl 10mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 10mM, usar 10ml por cada 15g de células. Añadir desoxirribonucleasa (ADNasa ) a una concentración final de 10ug/ml, de una solución de ADNasa 2mg/ml. Mezclar perfectamente con extremo cuidado para no romper las mitocondrias y dejar a T.A. por 15', añadir posteriormente 2 volúmenes de:sb 0.9M, THCl 10mM pH 7.5 EDTA 10mM, lavar 3 veces, centrifugando a 16k por 10', resuspender las mitocondrias con mucho cuidado, y juntar en un solo tubo, al cual se le añaden 15ml de la siguiente solución: Sarcosil 2%, THCl 0.1M pH 8, NaCl 0.1M, EDTA 10mM. Homogenizar

rapidamente y dejar de 10 a 15' para que actúe el detergente. Añadir un volumen de fenol destilado y frío, 20ml aprox., y mezclar invirtiendo, mantener en hielo por 15'. Centrifugar a 9k por 10' en tubos de propileno, dializar el sobrenadante claro, en agua por 30' y luego por toda la noche (t.n.).

El dializado se somete a gradiente de densidad en CsCl, y bromuro de etidio, el cual puede sustituirse por Bisbenzimid. Se ajusta la densidad con un refractómetro a 1.3970, o 1.3965, y se somete a centrifugación durante 40hrs. a 40k. La banda de ADNmit se extrae con una jeringa y se elimina, primero el colorante, con alcohol isoamilico y eter, y posteriormente el cloruro de cesio (30).

#### Maxipreparación de plasmidos:

##### Soluciones:

- 1.-Glucosa 50mM, EDTA 10mM, THCl 25mM pH 8, añadiendo antes de usarse, 2mg/ml de lisozima y 0.25mg/ml de ARNasa A.
- 2.-NaOH 0.2N, 1% SDS.
- 3.-NaCH<sub>3</sub>COO 3M pH 4.8.
- 4.-NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO 2M
- 5.-THCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM.

Inocular 500ml del medio apropiado con el antibiotico necesario Luria con Ampicilina (Amp) o Tetraciclina (Tet)), con un precultivo, 1:1000, y dejarlo t.n. a 37°C con agitación.

Colectar las células por centrifugación, 5k 5', juntando las células en una sola botella, resuspenderlas en 50ml de la solución 1, y mantener en hielo por 30'. Añadir 100ml de la solución 2, mezclar invirtiendo y mantener en hielo por 5', luego añadir 75ml de la solución 3, y mezclar invirtiendo delicadamente; mantener en hielo por 30' y centrifugar a 9k por 15'.

Filtrar en lana de vidrio sobre una probeta graduada; dividir el filtrado en dos botellas de plástico y añadir 2.5 volúmenes de Etanol absoluto (EtOH), someter por 30' a -70°C, centrifugar 10' a 9k. Resuspender la pastilla de cada botella en 5ml de la solución 4, y transferir a un tubo "corex" de 15ml, añadir 3 volúmenes de EtOH y dejar a -70°C por 30'. Centrifugar 10' 10k, y resuspender las pastillas en 5ml totales de la solución 5. Dializar 2 veces contra la misma solución o contra agua, primero por 30' y luego por t.n.. El dializado, someterlo a gradiente de CsCl (30).

#### Minipreparación:

Se utilizan las mismas soluciones de la maxipreparación, con la misma nomenclatura.

Resuspender una asada de células en 100ul de la solución 1, en un tubo Eppendorf de 1.5ml, mezclar manualmente y mantener a 0°C por 30', añadir 100ul de la solución 2 (se debe aclarar la solución), y adicionar 75ul de la solución 3, mezclar delicadamente ( se forma un precipitado grumoso ), mantener en hielo por 15'.

Centrifugar (en microfuga) 5', y remover 200ul del sobrenadante a

un tubo nuevo y añadir 800ul de ETOH, y congelar a -70° en un baño de hielo seco etanol por 15'; centrifugar 5' en frío. Disolver la pastilla en 100ul de la solución 4, y añadir 300ul de ETOH, congelar en hielo seco etanol por 15' y centrifugar 5' en frío. Lavar las pastillas 2 veces en alcohol al 80% centrifugando por 1' en cada ocasión, decantar y secar al vacío las pastillas. Resuspender en 10 o 20 ul de agua. Se utilizan de 1 a 6 ul para analizar con endonucleasas de restricción (28,30 ).

#### Gadiante de Cloruro de Cesio:

Al ADN dializado añadir 13g de CsCl y amortiguador de TE (solución 5 en la pagina anterior), hasta conseguir un peso de 25g, disolver con agitación y distribuir en 2 tubos de policarbonato con rosca para el rotor 50 titanio ( 50ti), añadir 170ul de bromuro de etidio a cada tubo, evitar la exposición a la luz, mezclar invirtiendo.

Centrifugue a 40k por 40hrs. a 20°. Visualizar las bandas de ADN con luz U.V, y extraer por separado las bandas observadas con una jeringa, y con un mandril. Eliminar el bromuro de etidio lavando con alcohol isoamílico saturado con CsCl, hasta que se aclare la solución ( 5 veces). Extraer 2 veces con éter , y dializar la fase acuosa en TE o en agua como en las ocasiones anteriores. Examinar el ADN obtenido en geles, después de precipitarlo con acetato de sodio , amonio , o ambos, secarlo al vacío y resuspenderlo. (28, 30 ).

#### Análisis con endonucleasas de restricción:

-Las digestiones de ADN se realizaron a 37°C, por tiempos variables , dependiendo de la actividad de la enzima y de las necesidades de digestión. Para los geles de Agarosa se usaron cantidades menores de ADN que la utilizada en los geles de Acrilamida. En ambos casos, se procuro tener volúmenes de 10ul por digestión , incluyendo la enzima y los amortiguadores pertinentes. Una vez finalizada la digestión se añadió a dicha mezcla, 2 ul de colorante , azul de bromofenol, que además de teñir el frente de corrimiento, y sedimentar el ADN en los pozos respectivos, detiene la reacción de digestión, ya que lleva SDS. Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñen en una solución de Bromuro de etidio ( 0.5ug/ml ), el cual se intercala en el ADN, haciendo evidentes las bandas al exponerlos a luz ultravioleta (U.V.).

#### Electroforesis en geles

-Agarosa; se hicieron de distintos porcentajes, de acuerdo al tamaño esperado de las bandas a analizar, desde 0.8% hasta 2%, en amortiguador de TBE para fragmentos entre 5 y 0.8 kb

TBE 5X:	Tris	54g	
	Ac.Bórico	27.5g	
	EDTA	4.2g,	aforar a 1 litro con agua.



Estos geles de 40 o 50 ml, se corrieron en cámaras de electroforesis a diferentes voltajes, desde 80v, hasta 150v, a temperatura ambiente (T.A.).

-Acrilamida; Se utilizarón geles de acrilamida al 0.7% para analizar bandas de tamaño inferior a 1kb

Acrilamida 9.28ml (Acrilamida/Bisacrilamida 29:1, en agua)  
TBE 5% 4ml  
Agua 27ml  
Persulfato de amonio 0.028g Mezclar y desaerear al vacío.  
Añadir 8ul de TEMED, mezclar y vaciar rápidamente.  
Estos geles se corrieron a 150v a T.A.

Para las reacciones de secuenciación se utilizó un gel de acrilamida al 5.5% ( bisacrilamida 1:19 ) y urea 8M en amortiguador de tris boratos EDTA. Las dimensiones de los geles empleados son: 50cm, 20cm, 0.04cm. La solución de este gel se preparo de la siguiente manera: 48g de Urea, 5.5g de Acrilamida, 0.289g de bisacrilamida, 20ml de TBE 5%, Agua a 80ml, añadir la punta de una espátula de la resina AG501 X 8G, calentar hasta disolver en agitación, filtrar al vacío en millipore 0.45um y aforar a 100ml con agua, añadir 0.063g de persulfato de amonio y 30ul de TMED antes de vaciar, agitar vigorosamente.

Estos geles fueron corridos a 1700volts por 3 horas por cada corrida.

#### Rellenado:

La tecnica de relleno consiste en la transformación de un extremo pegajoso ( generado por ejemplo con las endonucleasas Eco RI o Bam HI por ejemplo ) en un extremo raso. Para lograrlo, es necesario incorporar los nucleotidos complementarios al extremo pegajoso. La metodologia detallada se describe a continuación:

- 1ug DNA con extremos pegajosos
- 2ul de amortiguador de reacción de la DNA polimerasa
- 0.2-0.5 unidad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa
- 2ul de Ditiotreititol 10mM
- llevar a 20ul con agua

Se incuba por 5' a temperatura ambiente y posteriormente se añade:

- 2mM de cada uno de los dNTPs necesarios ( 1ul de una solución 2mM )

Mantener 30' a temperatura ambiente. Para utilizar el DNA relleno, se debe precipitar con acetato de sodio, como en las purificaciones de DNA.

#### Defosforilación de extremos 5'terminales

Para evitar que se autoligasen los vehiculos de clonación digeridos, se eliminaron los fosfatos terminales empleando la fosfatasa alcalina de ternera ( CIP ), 2.15

unidades/ul ( 0.01 unidades de esta enzima son suficientes para desfosforilar los extremos terminales de 1pmol de extremos 5' de DNA, lo cual equivale a 16ug de un DNA de 4kb ). En cada experimento se determino la cantidad de DNA empleada, de forma cualitativa al comparar una banda de tamaño y concentración conocidas con la banda generada por el DNA en cuestion al correr una electroforesis. Un ejemplo tipico de esta metodologia se describe a continuacion:

-1.6ug de DNA fueron resuspendidos en 20ul de amortiguador de TE, se añadieron 5ul del amortiguador CIP, y 0.5ul de la enzima CIP, 25ul de agua y se sometieron a 37°C por 15' y a 56°C por 15'. Se añadieron 0.5ul de CIP y se repitieron las incubaciones a las mismas temperaturas por tiempos iguales. Se agregaron 40ul de agua, 10ul de STE y 5ul de SDS al 10% para dar un tratamiento final de 68°C por 15'. El DNA desfosforilado debe ser lavado con fenol para extraer las proteinas residuales.

### Ligación:

Como ya se mencionó anteriormente, la clonación molecular consiste en la union in vitro de dos moleculas de DNA, un vehiculo y un inserto. Es la ligación, la reacción en la que se lleva a cabo tal union. En este trabajo se variaron un poco las condiciones de ligación a lo largo del mismo, intentando incrementar la eficiencia del método, se emplearon distintas temperaturas, amortiguadores y proporciones de los DNAs involucrados. Normalmente se recomienda realizar esta metodologia a temperaturas bajas ( 12°C ) sin embargo, realizamos ligaciones satisfactorias a temperaturas de 16 °C e inclusive a temperatura ambiente. Las proporciones empleadas de vehiculo-inserto dependen del proposito de la ligación, así como del tamaño de los DNAs utilizados.

Para realizar una ligación eficaz en este trabajo, se utilizaron los siguientes componentes:

- DNA inserto Natural o relleno
- DNA vehiculo siempre sin fosfatos 5' terminales, y cuando se dispuso, relleno.
- Amortiguador para la ligasa de T4 , 1ul/10ul de mezcla de reacción ( 10% ).
- ATP 10mM 10%
- DTT 100mM 10%
- Ligasa T4

Se procuro que las mezclas tuvieran volúmenes de 10 o 20 ul, y se incubaron por 8 a 12 horas a temperatura ambiente.

### Preparación de células competentes de E.coli:

En este trabajo se emplearon dos tipos de tecnicas para hacer competentes las células, uno para las cepas RRI y HB101, y otro para la cepa JM101. A continuación, se describen respectivamente:

### Células RRI y HB101

- inocular con una colonia de células, 10ml de medio líquido LB, como precultivo, dejar toda la noche a 37°C en agitación.
- inocular en 20ml de LB 1:100 del precultivo.
- agitar a 37°C hasta alcanzar 100 unidades Klett ( 3 hrs.aprox.)
- mantener en hielo por 10'
- centrifugar 5' a 4 K a 4°C
- lavar el precipitado celular con medio volumen de CaCl<sub>2</sub> 10mM
- centrifugar 5' a 4 K y a 4°C
- resuspender el precipitado celular en 10ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM y mantener a 0°C por 20'
- centrifugar 5' a 4K y a 4°C
- resuspender en 0.1 volúmenes de CaCl<sub>2</sub> 50mM el precipitado celular

Para las células de la cepa JM101 se utiliza un procedimiento mas sencillo:

- inocular 2 ml de medio YT con una colonia de células JM101 y dejar a 37°C por la noche con agitación, como precultivo
- inocular 1:100 en medio YT y agitar a 37°C hasta obtener una densidad optica de 0.3-0.4 a 660nm ( 2-3hrs. )
- centrifugar a 7K , 5' a 4°C
- resuspender el precipitado en 0.5 volúmenes de CaCl<sub>2</sub> y mantener a 0°C por 20'
- centrifugar a 7K 5' a 4°C
- resuspender el precipitado en 0.1 volúmenes de CaCl<sub>2</sub>

En ambos experimentos, se dejaron las células 24 horas en refrigeración antes de usarse.

### Transformación de células competentes

Para transformar las cepas RRI o HB101, así como la JM101, se empleó la siguiente metodología:

- 200ul de cél. competentes
- 0.2 a 1ug de DNA transformante
- 40' en hielo
- 2' a 42°C

### Identificación de transformantes ( y de recombinantes )

A continuación se describen las metodologías utilizadas para la detección de las células transformadas por cada vehículo y los productos de las ligaciones correspondientes a cada uno.

pBR322.- Las células transformadas se sembraron con triángulo en cajas de Petri de medio LB sólido con ampicilina 50ug/ml. Las clonas portadoras de vehículos recombinados se identificaron por su sensibilidad al antibiótico tetraciclina, en el cual fueron replicadas posteriormente.

M13mp18.- Las células transformadas se mezclaron con 10ul de IPTG, 35ul de X-Gal, 300ul de células JM101 en fase exponencial

de crecimiento, y 3ml de agar suave licuado ( temperatura menor de 40°C ), y se sembraron en cajas de Petri con medio solido YT. Las células transformadas son las colonias azules mientras que las portadoras de vehiculos recombinados son blancas.

pUC18.- Se utiliza el metodo anterior, solo que se siembra en YT con Ampicilina , 50ug/ml.

pTZR18.- Empleando el mismo método que para el pUC18, pero utilizando cajas de Petri con YT y 80ug de ampicilina/ml.

Las clonas transformadas con cualquiera de los dos vehiculos anteriores son capaces de crecer en medio con ampicilina, las clonas portadoras de vectores recombinantes se distinguen por su color blanco sobre las clonas azules no recombinadas.

#### Obtención de templados del plásmido pTZR18 para secuenciar

Despues de identificar y seleccionar las clonas portadoras de los fragmentos deseados, se procedio a la obtención de templados para su secuenciación, de acuerdo a la siguiente técnica:

-inocular 2ml LB amp ( 0.4ml de amp. 25mg/ml en 100ml de LB ) con una colonia de la clona deseada. agitar vigorosamente a 37°C por 2-3 hrs ( D.O. de 0.3-0.6 a 660nm ).

-añadir 10ul del fago "ayudador" M13K07 ( 10ul=  $2 \times 10^{10}$ /ml ), y mantener a 37°C en agitación vigorosa por 1 hora

-transferir 100ul a 3ml de LB Kanamicina ( 70ug/ml ), 37°C con agitación vigorosa por toda la noche.

-centrifugar por 5' en 2 tubos Ependorf ( 1.5ml c/u ) y repetir la misma operación una vez mas

-transferir 1.2ml del sobrenadante a otro tubo y añadir 300ul de PEG 6000 al 20%;NaCl 2.5M, mantener 30' a temperatura ambiente

-centrifugar 15', desechar el sobrenadante y secar perfectamente los residuos del PEG

-resuspender la pastilla en 200ul de amortiguador TE pH 8

-extraer proteínas con fenol-cloroformo 1:1 2 veces, 1 volumen cada vez ( vortex por 30", reposo 5', vortex 10", centrifugar 4' a temperatura ambiente )

-extraer con cloroformo, vortex 10", centrifugar 1'

-lavar con 1 vol. de eter, vortex 10", centrifugar 1', eliminar eter residual

-precipitar el DNA con 0.1vol. de acetato de sodio 3M pH 7 y de 2 a 5 vol. de etanol absoluto frio, 30' a -70°C

-centrifugar 20' en frio

-secar y resuspender en 100ul de TE

- verificar concentración y pureza del templado en un gel de agarosa al 1% ( 10ul )

-precipitar nuevamente con 0.1 vol. de acetato de sodio 3M pH7 y 3 vol. de etanol frio, 30' a -70°C

-centrifugar en frio 20'

-lavar con etanol al 80% dos veces, empleando el volumen anterior y dejando por 30' a -70°C, centrifugando por 10' en frio en cada caso

-secar al vacio y resuspender en 15ul de TE, guardar a -20°C

### Secuenciación:

- 7ul de templado
- 1ul amortiguador de la DNA polimerasa 10X
- 0.5ul "primero reversa"

Mantener 5' a 65°C y 10' a 37°C, dejar a temperatura ambiente hasta secuenciar.

Reacción de secuenciación. a los 8.5ul de templado-"primero", añadir la marca radioactiva deseada ( dATP alfa fosforo 32 ) de acuerdo a la concentración del desoxinucleótido, 1ul de Klenow 6unidades/ul, 12.5ul de amortiguador de polimerasa 1X y 1ul de DTT.

Esta mezcla se divide en 4 tubos, que llevan los desoxi y didesoxinucleotidos requeridos para poder sintetizar cadenas de DNA.

tubo A	-1ul mezcla A° + 1ulddATP + 5ul reacción de secuenciación
tubo C	-1ul mezcla C° + 1ulddCTP + " "
tubo G	-1ul mezcla G° + 1ulddGTP + " "
tubo T	-1ul mezcla T° + 1ulddTTP + " "

Mantener a 30°C por 15', y añadir 1ul de ATP 0.5mM, y dejar nuevamente a 30°C por 15'. Para parar la reacción añadir 5ul de colorante DYE con SDS.

Antes de depositar las muestras en el gel de secuenciación, esta son calentadas a 90°C por 5' para desnaturalizar el DNA, y se enfrían rápidamente en hielo por 5', para evitar que se reasocien las cadenas sencillas.

## RESULTADOS

El estudio de los genomas mitocondriales y de cloroplasto han tenido un gran auge desde su descubrimiento, ya que estos organelos son los responsables de la obtención de energía útil para las células que los poseen. Son por otra parte organelos de origen bigenómico y resulta interesante conocer la interacción de los dos genomas que codifican sus proteínas. Han sido muchos los intentos por dilucidar su origen, y especialmente se han desarrollado innumerables trabajos con el fin de entender su funcionamiento.

El DNA mitocondrial ( DNAm<sub>t</sub> ) presenta un polimorfismo inter e intraespecifico muy grande, el tamaño del DNAm<sub>t</sub> del hombre es de 16kb, mientras que el de algunas polantas superiores alcanza 2400kb ( 4,11 ). Variaciones intraespecificas han sido estudiadas en grupos tan divergentes como las cucurbitaceas ( 11) y en la levadura Saccharomyces cerevisiae ( 41 ).

A pesar del polimorfismo expuesto, se piensa que la mayoría de los genomas mitocondriales poseen la misma información genética, la cual no abarca mas que doce proteínas, dos RNAs ribosomales, un número variable de RNAs de transferencia y cuando menos en S.cerevisiae, se piensa que existen varios orígenes de replicación.

El estudio de las funciones mitocondriales en levaduras es especialmente practico, ya que al ser organismos facultativos, permiten la obtención y detección de mutantes mitocondriales.

Ademas, a través de estudios genéticos de segregaciones meioticas y mitoticas, se puede reconocer entre mutaciones nucleares y extracromosomales.

A través de patrones de restricción se han comparado genomas mitocondriales intra e interespecificamente; también se han estudiado las diferencias entre cepas silvestres y sus mutantes ( 4,6,41 ).

Recientemente se han comparado mutantes de de K.lactis obtenidas espontaneamente o por mutagénesis, resistentes a antibioticos, con mutante de S.cerevisiae ( 40 ), en las cuales se encontraron dos loci extracromosomales para la resistencia a antimicina A, A<sup>R</sup>I y A<sup>R</sup>II; el segundo locus, esta involucrado con la resistencia cruzada al herbicida Diurón.

En el presente trabajo se describe: 1º la obtención de una biblioteca del DNA mitocondrial de la cepa antimicina-resistente Am13 y 2º la localización, subclonación y secuenciación parcial del gen que codifica para el apocitocromo b en esta mutante, con el objeto de determinar la naturaleza de la mutación responsable de esta resistencia.

La mutante Am13 derivada de la cepa WM27 de la levadura K.lactis perteneciente al grupo A<sup>R</sup>I ( antimicina A resistente, diurón sensible ), fué ampliamente caracterizada ( 40 ). El mapeo en mutantes petite y A<sup>R</sup> en S.cerevisiae sugiere como gen mutado, al del apocitocromo b. La dificultad en la obtención de mutantes petite + estables en K.lactis, ha obstaculizado su mapeo, por lo tanto se han empleado tecnicas de clonación e hibridización para

estudiar este genoma. Aurora Brunner ( com. pers. ) identificó el gen del apocitocromo b en el patrón de restricción del DNAm<sub>t</sub> de la cepa WM27 obtenido con Sma I, utilizando sondas de hibridización pertenecientes a los exones 1 y 6 del mismo gen de S.cerevisiae.

Los patrones de restricción obtenidos con las endonucleasas Sma I, Eco RI del DNAm<sub>t</sub> de las cepas WM27 y Am13 ( fig. 4 ), no presentan diferencias, lo cual sugiere que la mutante no sufrió deleciones ó inserciones apreciables. Muchos trabajos han reportado mutaciones puntuales en el gen del apocitocromo b como responsables de resistencias a antibioticos que inhiben la cadena respiratoria ( 28, 36, 52 ). Por lo anterior, se penso que en el caso de la mutante Am13, la resistencia, muy probablemente fuese provocada por una mutación puntual.

La elaboración de una genoteca del DNAm<sub>t</sub> de la levadura K.lactis permitirá la identificación de genes y el estudio fino de estos, la elaboración de mapas de restricción y geneticos, así como la comparación de este genoma con el de otros organismos. Por lo tanto, se intentó clonar los fragmentos generados por la doble digestión Sma I-Eco RI del ADNmit AM13 en tres diferentes vehículos de clonación, M13mp18, pUC18 y pBR322. En la figura 5 se muestran el mapa del DNAm<sub>t</sub> WM27 (Am 13), y en la fig.6, se esquematizan los vehículos de clonación empleados. A continuación se enlistan las características de los vehículos de clonación utilizados en este trabajo, y sus cualidades respectivas:



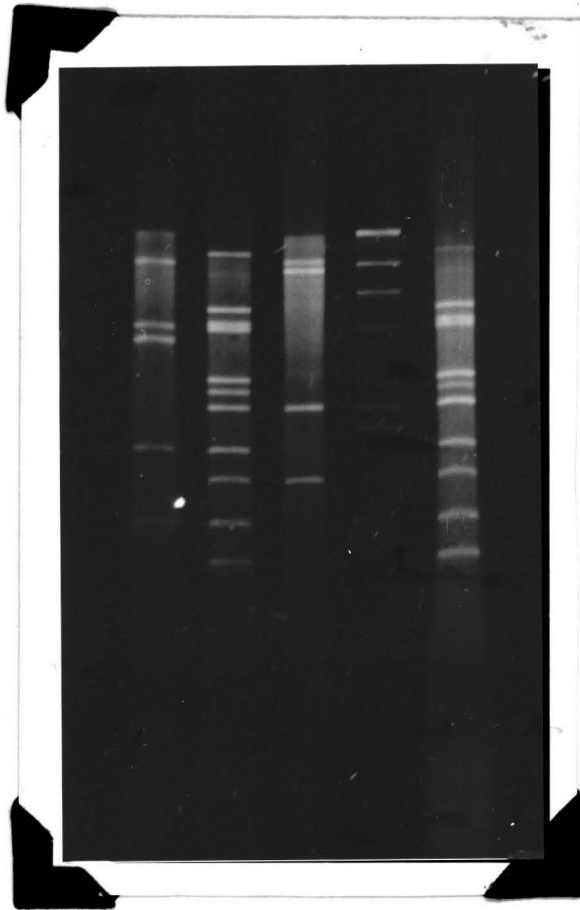


Fig.4.-Patron de restricci3n obtenido con la doble digesti3n Sma I-Eco RI del DNA mitocondrial de las cepas WM27 y Am13. en el gel aparecen de izquierda a derecha, Am13 con Sma I, doble, y con Eco RI, Lambda con Hind III y en el carril de la derecha, la doble digesti3n de la cepa WM27 con las misma enzimas. Aparentemente el patron de restricci3n de ambos genomas es igual, cuando menos para estas dos enzimas.

DNAmit WM27,  $\pm$  37,000pb.

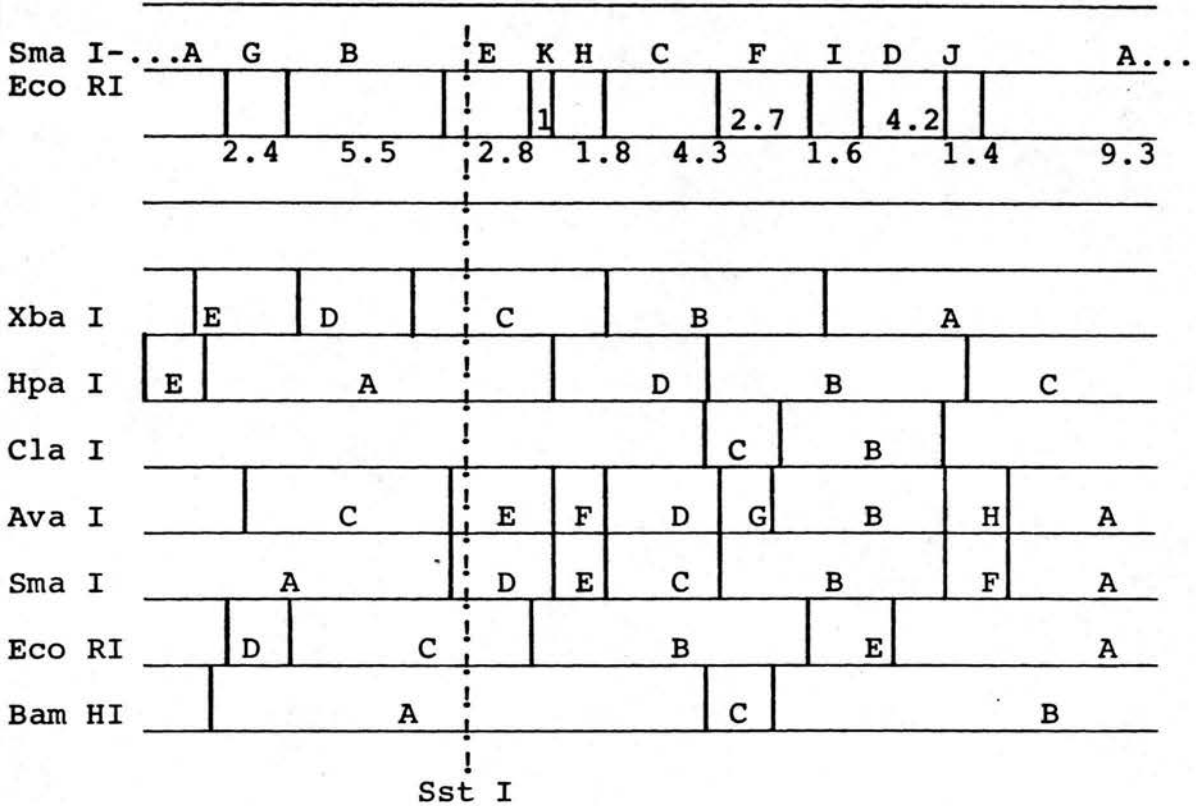
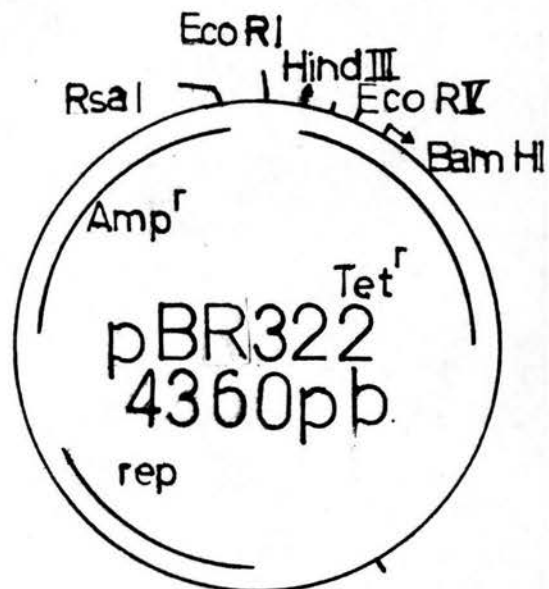


Fig.5.- Esquema del genoma mitocondrial de la cepa WM27 digerido con diferentes endonucleasas de restricción. Con la línea punteada se señala el sitio único de reconocimiento de la enzima Sst I. En el renglon marcado con asterisco, aparecen los productos de la doble digestión Sma I- Eco RI, que genera 11 fragmentos, a los cuales se les asignaron letras del mayor al menor en orden alfabético.



SMC:

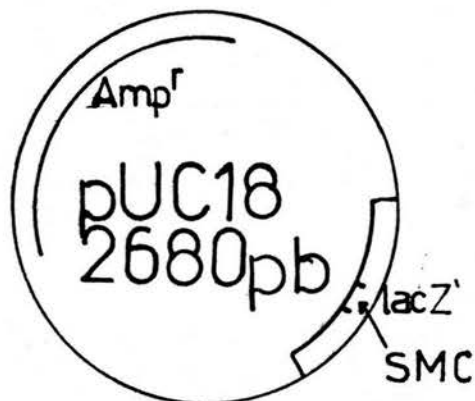


Fig.6.-Mapas de restricción de los vehículos empleados para obtener la genoteca mitocondrial de la cepa Am13. En el centro del esquema se presentan los sitios Únicos de restricción de los sitios múltiples de clonación ( SMC ) del M13mp18 y del pUC18 ( también del pTZ18 ). El M13mp18, y el pUC18 portan el SMC en el gen lac Z', el pBR322 y el pUC18 tienen el gen de resistencia a ampicilina, y el pBR322 también porta el gen que confiere resistencia a la tetraciclina

M13. EL M13 es un fago filamentososo que solo puede transmitirse en cepas de E. coli poseedoras del plásmido sexual F. La partícula del fago contiene una molécula circular cerrada de cadena sencilla de ADN, llamada cadena "+". Al llegar a la membrana de la célula hospedera, después de haber viajado a través del pili, el fago inyecta su genoma de cs, el cual es copiado para dar lugar a un intermediario, forma replicativa (fr), de doble cadena (cd +/-); varias de estas fr son hechas durante el ciclo de vida (aproximadamente 200 copias por cada célula). La fr dirige la síntesis de la progenie, genomas M13 de cs que son empacados y expulsados de la célula hospedera. La fr (que no es encapsulada) puede introducirse en una célula aplicando un procedimiento de transformación igual al utilizado en plásmidos. Un factor importante en el ciclo de vida del M13 es que las células infectadas no se lisan, es decir, no forman placas de lisis, sin embargo, las células infectadas crecen más lentamente que las no infectadas, formando placas turbias (30, 32, 39). en la figura 7 se esquematiza el ciclo de vida del M13 y se indica el cambio en la proteína exterior del fago, que ocurre cuando este es expulsado.

El fago M13mp18 difiere del M13 silvestre en que posee una parte del gene lac Z de E. coli (uno de los genes estructurales del operon de la lactosa) insertado entre los genes IV y II. Esta inserción incluye la secuencia del promotor-operador y los primeros 145 residuos de aminoácidos de la Beta-Galactosidasa. Además, esta secuencia posee un sitio múltiple de clonación (SMC) de aproximadamente 42pb que no altera la

transcripción ni la función de este gene. Estas 42pb incluyen varios sitios Únicos de restricción para las enzimas Eco RI, Sma I, Bam HI, Pst I, Hinc II, Sal I, y Acc I entre otras (31,32,33, 39 ).

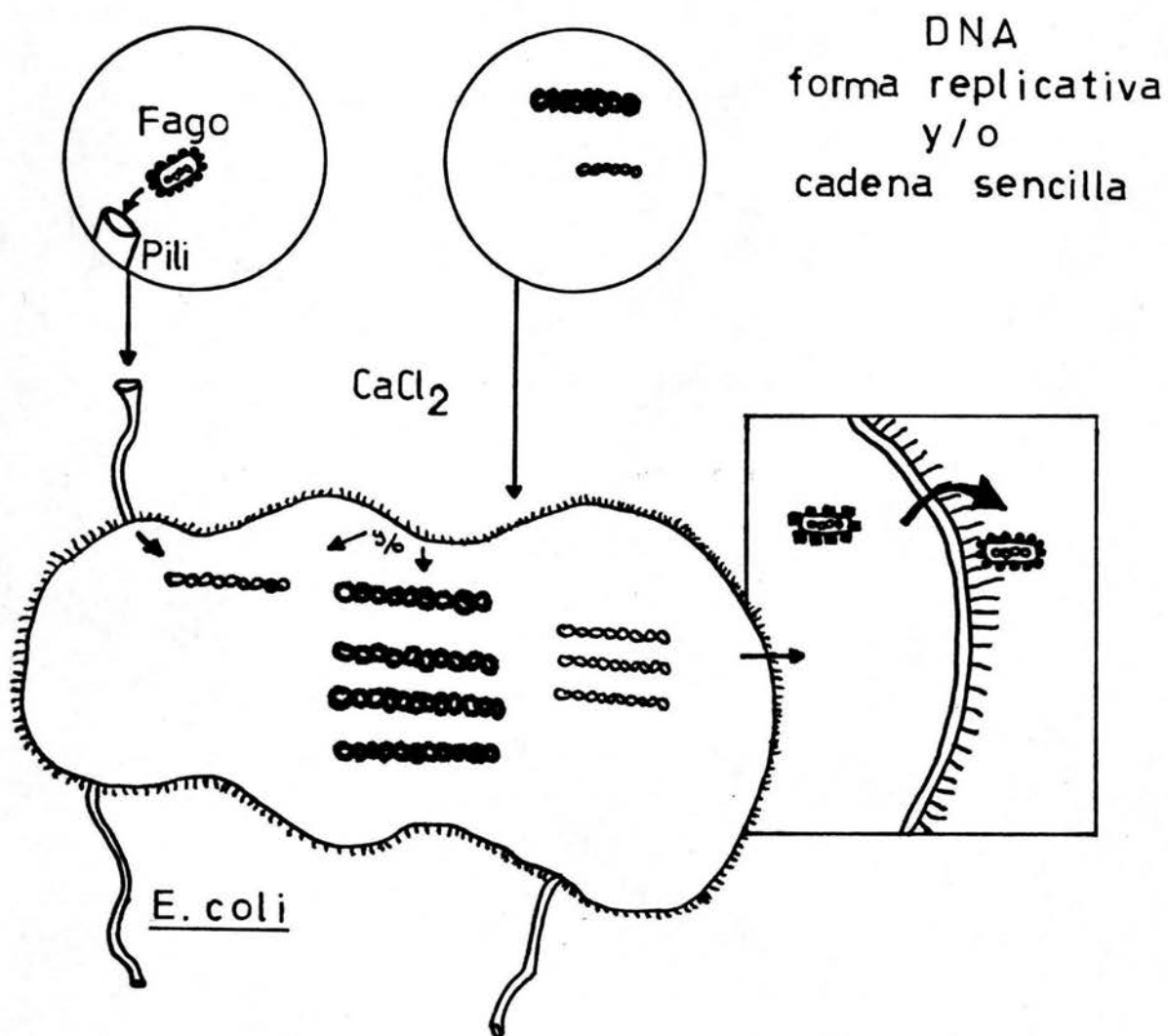


Fig.7.- Esquema grafico en el que se muestra el ciclo de vida del fago M13 y la posible transformación de células de *E. coli* ya sea por un pili ( fago ), o transformando células competentes ( con la forma replicativa del mismo ).

El sistema de clonación M13 tiene dos componentes, el fago M13 ( o sus derivados ) y la célula hospedera. E. coli K12 JM y sus diferentes cepas derivadas, son comunmente usadas en este sistema. La cepa JM101 tiene el siguiente genotipo : Dellac-pro, thi, StrA, endA, sbcB15, hsdR4,supE, F'traD36, proAB, lac I<sup>q</sup> Z<sup>-</sup> Del M15, r<sub>K</sub>+m<sub>K</sub>+. Al estar deletada la región lac-pro del cromosoma, se garantiza la permanencia del plásmido F, ya que este complementa para la deficiencia de pro. Además, posee la mutación traD36, que disminuye la eficiencia de conjugación drásticamente ( 31,32,39 ).

El episoma F posee el operón lac con dos mutaciones, una en el promotor del represor del operón lac, la cual reprime al operador lac existente en las copias de la fr del fago; y una deleción en el gene estructural Z ( Beta-Galactosidasa ), que incluye información para los residuos de aminoácidos 11-42 ( la proteína entera posee 1021 residuos de aminoácidos ). Por lo tanto el hospedero no infectado es lac-, produciendo una Beta-Galactosidasa defectuosa. Sin embargo los productos polipeptídicos de las regiones lac del episoma y del fago, forman un complejo proteínico en el cual la actividad de la Beta-Galactosidasa es recuperada y las células infectadas son lac+; este tipo de complementación se conoce como alfa complementación ( 31,32,39 ).

Los dos componentes de este sistema de clonación, permiten la detección de la inserción de ADN extraño por la pérdida de la actividad de la Beta-Galactosidasa, a través de la "inactivación insercional", es decir, al insertar un ADN en el

SMC es muy probable que se afecte el marco de lectura de los nucleótidos que codifican para los residuos de aminoácidos del lacZ del fago, dejando fuera de fase la lectura del mismo, perdiéndose así la complementación ( 31,39 ).

La actividad de la Beta-galactosidasa puede ser detectada por el corte enzimático de un compuesto incoloro, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-Beta-D-galactosido ( Xgal, un sustrato artificial ), para formar galactosa y una sustancia azul oscura, 5-bromo-4-cloroindigo. Esta reacción se puede realizar induciendo el operón de la lactosa con un inductor gratuito, el Isopropil tio galactosido ( IPTG ) (31,32 ).

El sistema de clonación M13 permite el estudio separado de las dos cadenas complementarias de una secuencia de ADN y la obtención de cadenas sencillas para ser secuenciadas a través del método descrito por Sanger (1977,1980) en el cual el fragmento largo de la DNA polimerasa I ( Klenow ) se utiliza para sintetizar cadenas complementarias, partiendo de un cebador sintético complementario al M13 cs + ( primero universal ) e incorporando una mezcla de nucleótidos que incluyen: un desoxinucleótido marcado radioactivamente, un nucleótido modificado ( didesoxinucleótido (ddNTP) el cual al no tener el oxhidrilo 3', no permite que se continúe la síntesis de la cadena en la cual sea incorporado ) y los desoxinucleótidos adecuados. Las proporciones adecuadas de cadenas sencillas, enzimas y reactivos, permiten bajo condiciones óptimas, que en cada reacción se termine la síntesis de cadena en cada uno de los nucleótidos de la cadena, lo que genera una serie de cadenas de

diferentes tamaños. Realizando cuatro reacciones simultaneas, una para cada nucleótido ( utilizando en cada una un ddNTP diferente), y la misma cadena a secuenciar, se pueden separar las cadenas sintetizadas, sometienolas a electroforesis en geles desnaturalizantes ( urea 8 M, acrilamida 5.5% ) de secuenciación en carriles contiguos. Una vez realizada la electroforesis se pueden identificar las bandas correspondientes a los distintos tamaños de las bandas de cada reacción, al revelar una placa autorradiográfica del gel (figura 8).

pUC18. La utilización de los plásmidos como vehículos moleculares ha sido ampliamente recomendada, no solo por ser moléculas de doble cadena, sino que normalmente no requieren de condiciones tan estrictas para su difusión ya que son heredables, mientras que en los fagos filamentosos, se requieren agitación vigorosa y temperatura estrictamente constante para mantener adecuadamente los pili por los que el fago puede infectar. Además, en algunos fagos, la estabilidad de los insertos no es muy buena, generando rearrreglos que dificultan su estudio ( 28,35 ). Por otra parte, si el plásmido posee un sistema tan fino de detección de inserciones como la inactivación insercional de la Beta galactosidasa, en el cual se detectan inserciones en un solo paso, se cuenta con un excelente vehiculo de clonación. Con este propósito Vieira y Messing ( 1982 ) produjeron una serie de plásmidos derivados del pBR322 y los fagos M13, dando origen a la serie de plásmidos llamados pUCn, que son plásmidos multicopia de doble cadena de tamaño pequeño ( 2.7Kb aprox. ) que confieren la resistencia a Ampicilina y poseen el fragmento Hae II-Hae II del



SECUENCIACION CON DIDESOXINUCLEOTIDOS COMO TERMINADORES DE CADENA.

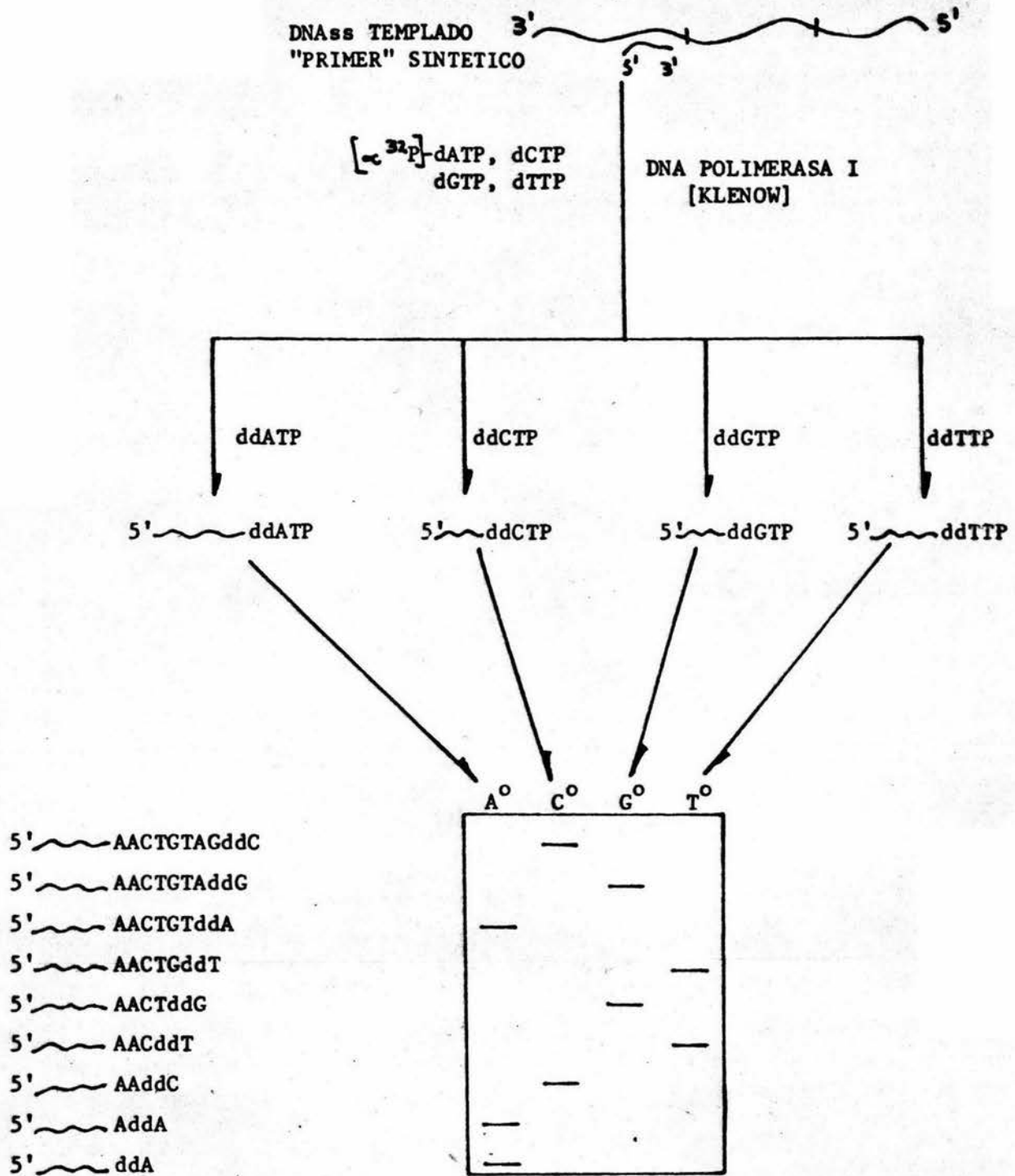


Fig. 8.- Secuenciación de DNA a partir del método descrito por Sanger.

M13mpn en el cual se encuentran tanto lac Z como el SMC, lo que permite detectar las inserciones prácticamente del mismo modo que en el sistema M13 ( 31,34,37 ).

pBR322. El pBR322 es un plásmido multicopia derivado del Col EI de doble cadena que mide 4,360pb construido por F. Bolivar et.al. , en 1977 con el propósito de obtener un vector de clonación con varios sitios únicos de restricción para varias enzimas, en puntos estratégicos, teniendo la opción de anular las resistencias que confiere ( Amp., Tet. ) por inactivación insercional, manteniendo una presión de selección para evitar la pérdida del plásmido ( 21, 30, 38 ).

Las estrategias básicas de clonación se muestran en la figura 9. Los vehículos M13mp18 fr y pUC18 se digirieron con Sma I, Eco RI y con ambas. El pUC18 además fué digerido con Hinc II y por la doble digestion Hinc II-Eco RI. El pBR322 fué digerido con las enzimas Eco RI-Eco RV simultaneamente, y con Eco RV exclusivamente. Cada vehículo fue utilizado para realizar una ligación al azar con los fragmentos generados por la doble digestion Sma I-Eco RI del DNAm<sub>t</sub> AM13. Solamente cuando se utilizo al pBR322 cortado con Eco RV se modificó el producto de la doble digestion del ADN<sub>mt</sub> AM13, rellenando los extremos pegajosos generados por Eco RI para obtener solamente extremos rasos ( figura 10 ) esperando poder ligar todos en este vehiculo.

Digestión de vehiculos sencillos	secuencia de reconocimiento y corte	extremos que genera y vehiculo empleado	fragmentos de la doble digestión del DNAm13 ligables
Sma I	<pre> C C C↓G G G G G G↑C C C                     </pre>	pUC18, M13mp18	C, H y J
Hinc II	<pre> G T C↓G A C C A G↑C T G                     </pre>	pUC18	
Eco RV.	<pre> G A T↓A T C C T A↑T A G                     </pre>	pBR322	
Eco RI	<pre> G↓A A T T C C T T A A↑G                     </pre>	pUC18, M13mp18	Pegajosos G e I
dobles			
Sma I-Eco RI		pUC18, M13mp18 pUC18 pBR322	Ambos
Hinc II-Eco RI			
Eco RV-Eco RI			

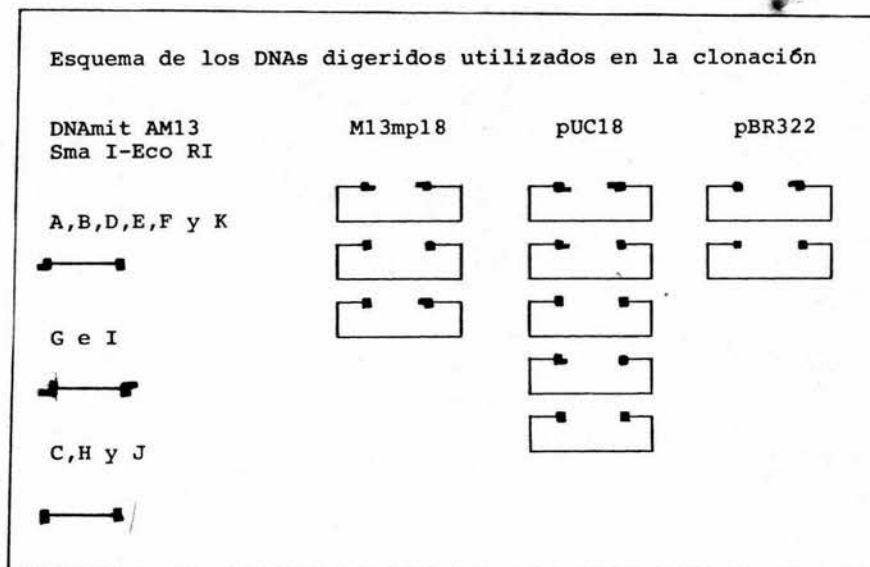


Fig.9.-En este esquema se muestran las estrategias básicas de clonación empleadas para obtener la genoteca del DNA mitocondrial Am13. En el cuadro superior aparecen las enzimas empleadas en los vehiculos respectivos, asi como las inserciones que en estos se esperaban; en el inferior se esquematizan los extremos de los DNAs involucrados.

Rellenado de los extremos pegajosos generados por Eco RI en la doble digestión Sma I- Eco RI del DNA mitocondrial

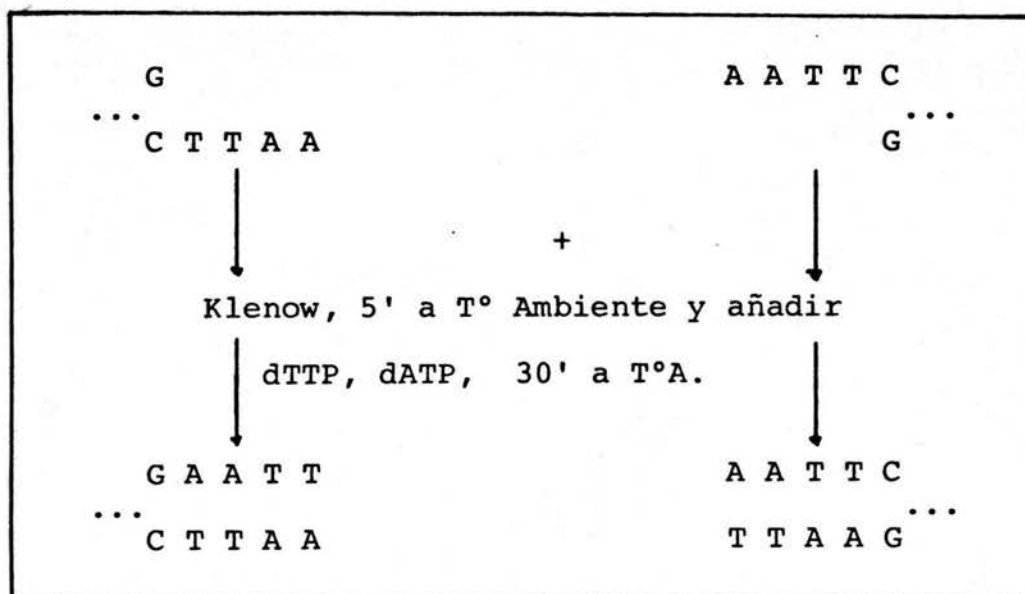


Fig.10.-Esquema de la reacción de rellenado de extremos pegajosos como el generado por la endonucleasa Eco RI, utilizando el fragmento largo de la DNA polimerasa I, el Klenow.

Con los productos de las ligaciones se transformaron las cepas adecuadas, se identificaron y se conservaron los plásmidos recombinantes. En la figura 11 se muestra un esquema del procedimiento seguido. Se transformaron células competentes (obtenidas por  $\text{CaCl}_2$ ) de la cepa JM101 de *E.coli* con los productos de ligación en las que se utilizaron el M13mp18 y el pUC18, aplicando el ensayo de inactivación insercional de la Beta-galactosidasa (añadiendo X-gal e IPTG). Los experimentos para detectar clones en M13 incluían células en fase logarítmica de crecimiento no transformadas como césped, mezcladas con las

# TRANSFORMACION

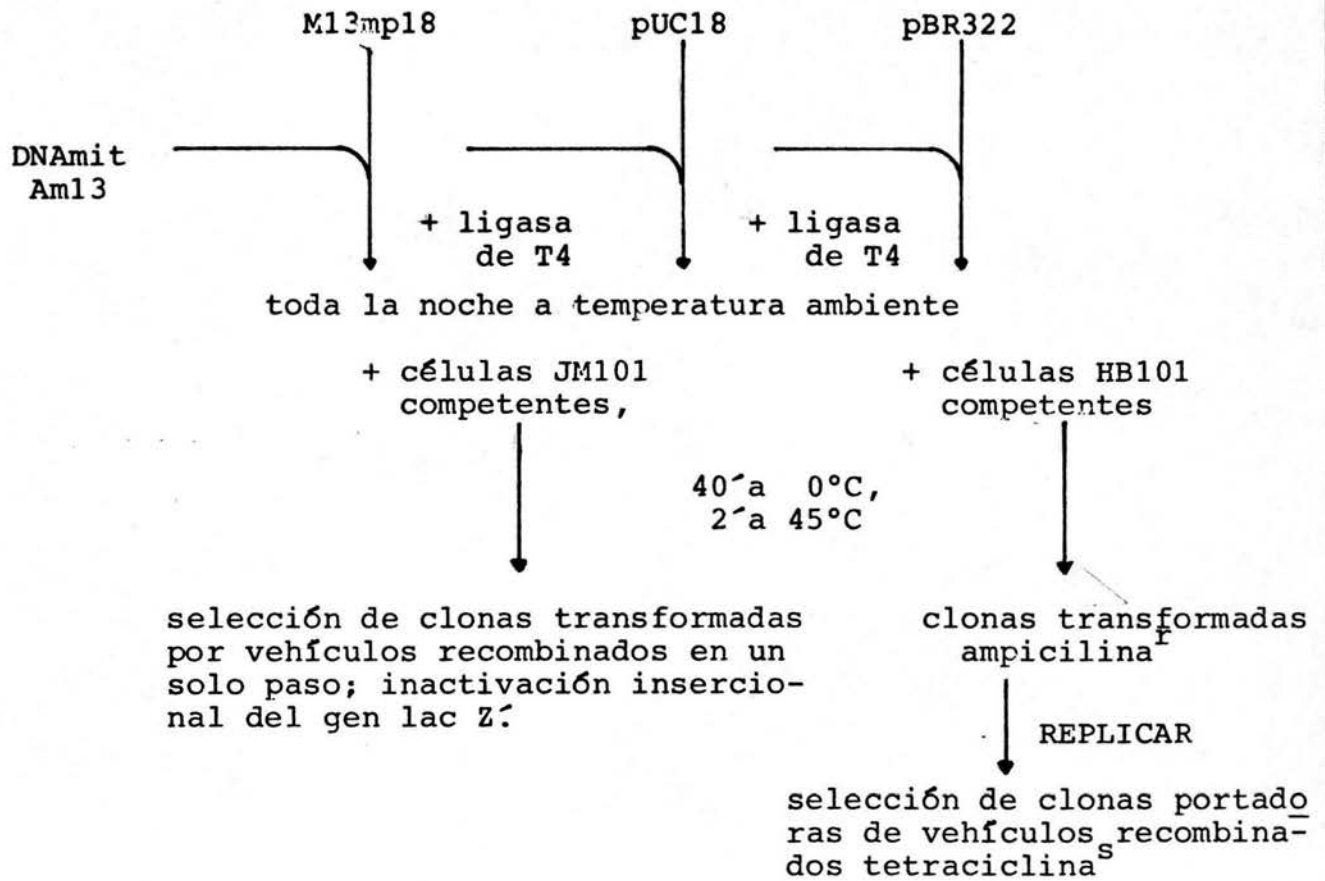


Fig.11.- Transformación y selección de clonas de la genoteca del DNAmi3.

células transformadas en agar suave, en el cual se detectaron placas de crecimiento más lento azules o blancas. Las células transformadas con los productos de ligación del pUC18, se sembraron en cajas de LB agar con ampicilina, permitiendo crecer, solo, a las células transformadas. Cuando se utilizó el pBR322 en las ligaciones, células competentes de la cepa HB101 de E.coli fueron transformadas; se sembraron en cajas de LB agar con ampicilina, donde crecieron todas las células transformadas, y de donde se rescataron las clonas que no crecieron en tetraciclina al ser replicadas.

Los plásmidos pUC18 y pBR322 dieron a primera instancia buenos resultados, obteniendo 42 y 103 clonas respectivamente. Se extrajo el DNA de los plásmidos por minipreparación, y se analizó digiriendo con una enzima que linearizara el plásmido, y posteriormente con dobles digestiones, usando enzimas cuyos sitios de reconocimiento estuviesen próximos al inserto; Los productos de las digestiones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa.

Las clonas obtenidas en pUC18 no se pudieron caracterizar a pesar de haberlas semipurificado (obteniendo más de 90%), y haber verificado en lo posible las condiciones de digestion.

En el pBR322 seleccionamos, al linearizar con Eco RI, 65 clonas las cuales fueron agrupadas por su tamaño aparente. 36 clonas fueron sometidas a la doble digestion Eco RI-Bam HI, de las cuales 6 fueron identificadas (figura 12).



Fig.12.- En esta fotografía aparecen 5 de las 6 clonas portadoras de fragmentos diferentes de la genoteca del DNAmi3, en los carriles 4,8,9,10, y 11, aparecen las clonas 35,60,78,84 y 74, las cuales portan las bandas de la doble digestión Sma I-Eco RI del DNAmi3 D, I, G, H e I respectivamente ( la nomenclatura de las bandas corresponde a la utilizada en las figuras 4 y 5 ). Con la y, se señala la banda correspondiente a las 4kb restantes del pBR322 al digerir las clonas con Eco RI y Bam HI.

CARACTERIZACION DEL GENE DEL APOCITOCROMO b DE LA CEPA Am13

DE LA LEVADURA Kluyveromyces lactis, RESPONSABLE DE  
LA RESISTENCIA A ANTIMICINA A.

La clona 24 porta el fragmento de 2.8 kb. en la cual se encuentra el gen del apocitocromo b. Lo anterior se verificó cortándola con Sst I, endonucleasa de restricción que no tiene sitio de reconocimiento en el pBR322, y solo uno en el DNAmi WM27, justamente en el gen del apocitocromo b ( figura 5 ).

Siguiendo un mapa de restricción fino, elaborado por A. Brunner del gen del apocitocromo b del DNAmi WM27 ( Fig.13 ), obtenido al secuenciar dicho gen clonado en pBR322 ( pAB-4 ), se verificó el patron de restricción del fragmento de 2.8kb del DNAmi Am13 utilizando Rsa I ( fig.14 ). Al comparar las bandas F, G y H en dicha figura, se aprecia la modificación cuando menos de la banda superior, la F.

La localización e identificación de la o las modificaciones en el gen del apocitocromo b de la mutante Am13, muy probablemente nos orienten en el conocimiento de las interacciones entre la antimicina A y el mismo, si no, cuando menos se tendrá una idea al comparar los cambios a nivel de la secuencia de aminoácidos del gen.

Para poder conocer la secuencia nucleotídica del gen del apocitocromo b de la cepa Am13, se obtuvieron subclonas del mismo, pretendiendo obtener insertos de tamaño adecuado para la secuenciación y en posiciones convenientes para este propósito. Con ese objetivo, se usaron tres vehiculos, el pTZ18R, el Mi3mp18 y el pBR322.



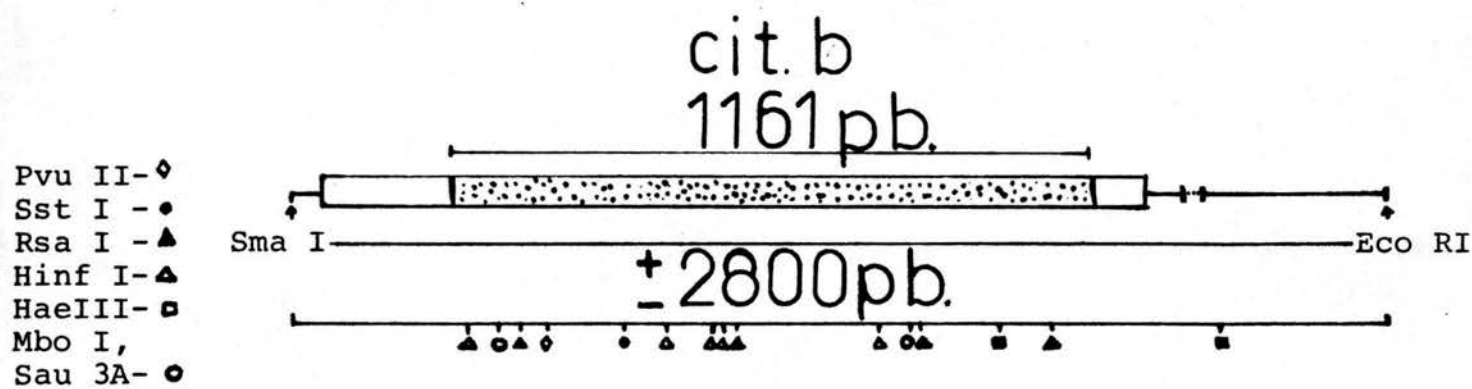


Fig.13.- Patron de restricci3n de la banda de 2.8kb ( E en las figs. 4 y 5 ) generada por la doble digesti3n Sma I-Eco RI del DNAmít de la cepa WM27, portadora del gen del apocitocromo b.

24 Rsa I

- A- 2510pb
- B- 1565pb
- C- 1223pb
- D- 684pb
- E- 421pb
- F- 253pb
- G- 247pb
- H- 235pb
- I- 44pb

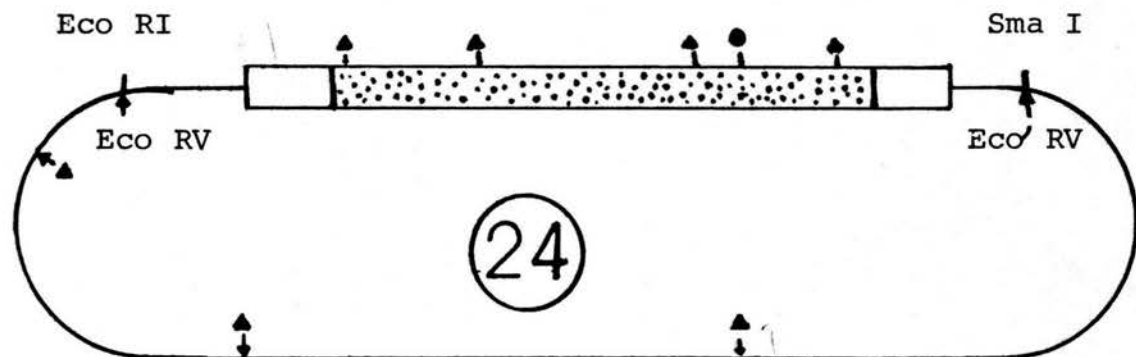


Fig.14.- Esquema de la clona 24 en el que se muestra la orientaci3n del inserto de 2.8kb SmaI-Eco RI, algunos de los sitios de restricci3n en este, y los sitios de reconocimiento de la enzima Rsa I en el pBR322. Abajo se muestran las bandas obtenidas al digerir la clona 24 con Rsa I.

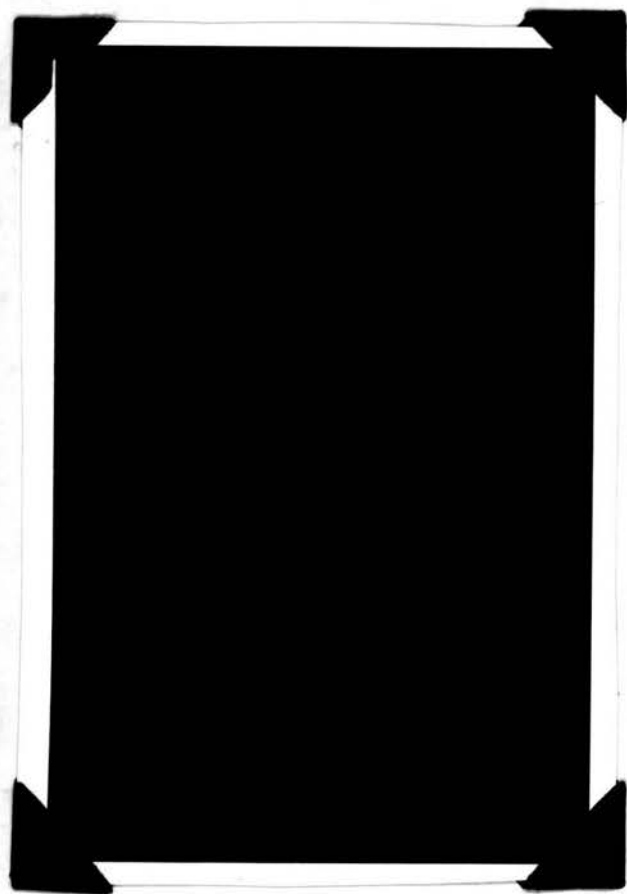


Fig.15.- Fotografía en la que se comparan los patrones de restricción obtenidos con la endonucleasa Rsa I en los plásmidos portadores del gen del apocitocromo b. En los carriles 1 y 5 aparece pBR322 digerido con Hae III y Hinf I respectivamente, como controles marcadores, en los carriles 2,3,4,6,7 y 8 aparecen los plásmidos pRC, pAB-4, 24, pUC, pBR322, y 24, respectivamente.

El pTZ18R es un plásmido multicopia derivado del

vehículo pUC18. A pesar de su reducido tamaño, el pTZ18R es un vector multipotencial, en el cual se puede clonar, secuenciar, mutagenizar *in vitro* y hasta transcribir *in vitro* ( fig. 16 ).

Como vehículo de clonación ofrece varias ventajas:

- Su alto rendimiento de DNA ( 150-200 copias por célula ).
- Posee el gen lac.Z y el SMC del pUC18, lo cual permite la fácil clonación de fragmentos de DNA y su identificación a través del ensayo de la Beta-galactosidasa.
- Tiene dos orígenes de replicación, uno para producir moléculas de doble cadena ( el del pBR322 ), y uno para originar cadenas sencillas ( F1 ), el cual es utilizado cuando células transformadas por el pTZR18 son superinfectadas con el fago ayudador M13K07 en presencia de kanamicina. Las cadenas sencillas son secretadas de la célula, empaquetadas en la cubierta del M13K07.
- La cadena sencilla del pTZR18 puede utilizarse para secuenciar de acuerdo con el método descrito por Sanger (39), utilizando un primero reversa comercial.
- Porta el gene de la Beta-lactamasa, confiriendo la resistencia a ampicilina a sus hospederos, lo que permite a través de una presión de selección artificial, asegurar su permanencia.

El M13mp18 como ya se menciono, ha sido ampliamente utilizado como vehículo de clonación-secuenciación.

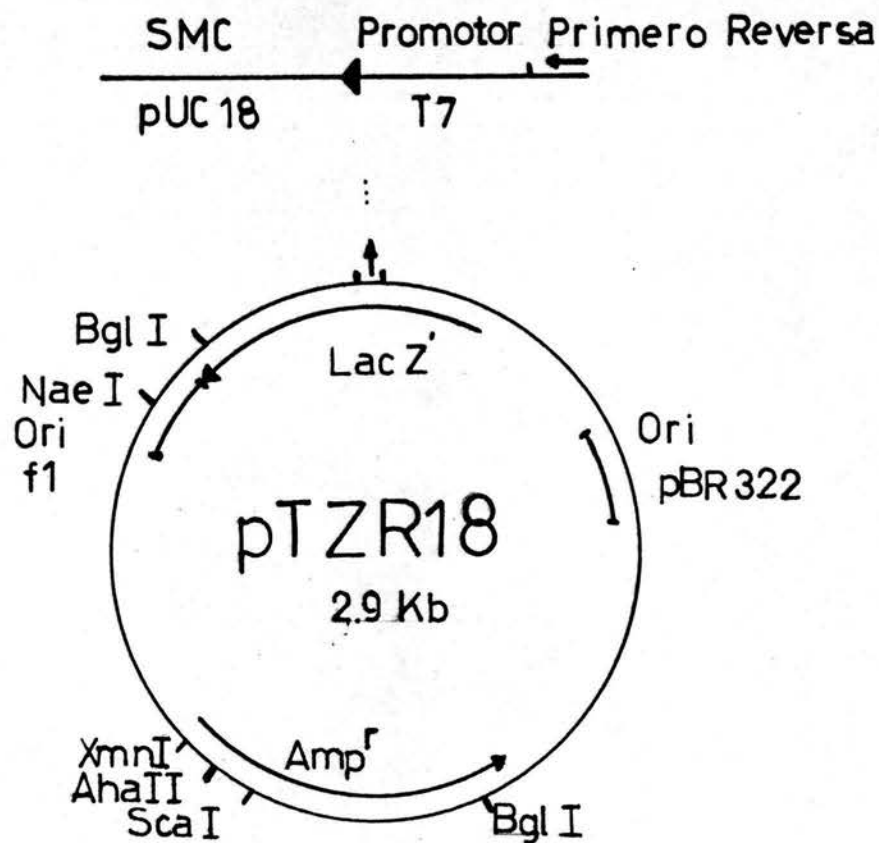


Fig.16.- Esquema del plásmido pTZR18, en el que se señalan varios sitios de restricción, el gen lac Z', el sitio múltiple de clonación y el gen que confiere la resistencia a la ampicilina.

El pBR322 así como otros plásmidos de doble cadena, han sido utilizados más comúnmente como vehículos para clonación que para secuenciación, sin embargo, últimamente se han reportado avances que facilitan su utilización para tal objetivo ( 42, 43 ). En el pBR322 se identificaron secuencias anteriores a sitios únicos de reconocimiento de endonucleasas de restricción, que pueden funcionar como cebadores de la DNA polimerasa I, al hibridizar primeros complementarios a estas secuencias con cadenas sencillas de las mismas ( X. Soberon com.pers. ).

En la figura 17 se muestran las estrategias de subclonación empleadas para secuenciar el gen del apocitocromo b. EL M13mp18 y el pTZR18 se digirieron con Sma I, el M13mp18 además

fué digerido con Hinc II. Los extremos pegajosos generados por Bam HI en el pBR322 fueron rellenados. En todos estos vehiculos se intentó ligar los productos de la digestión de la clona 24 con la enzima Rsa I. En otra estrategia, se trato de ligar en el pBR322 digerido con Bam HI los productos de la digestion con Sau 3AI de un fragmento de 2kb obtenido por electroelución, al cortar la clona 24 con Hpa II ( fig. 18 ).

M13mp18 ó pTZR18

24

pBR322

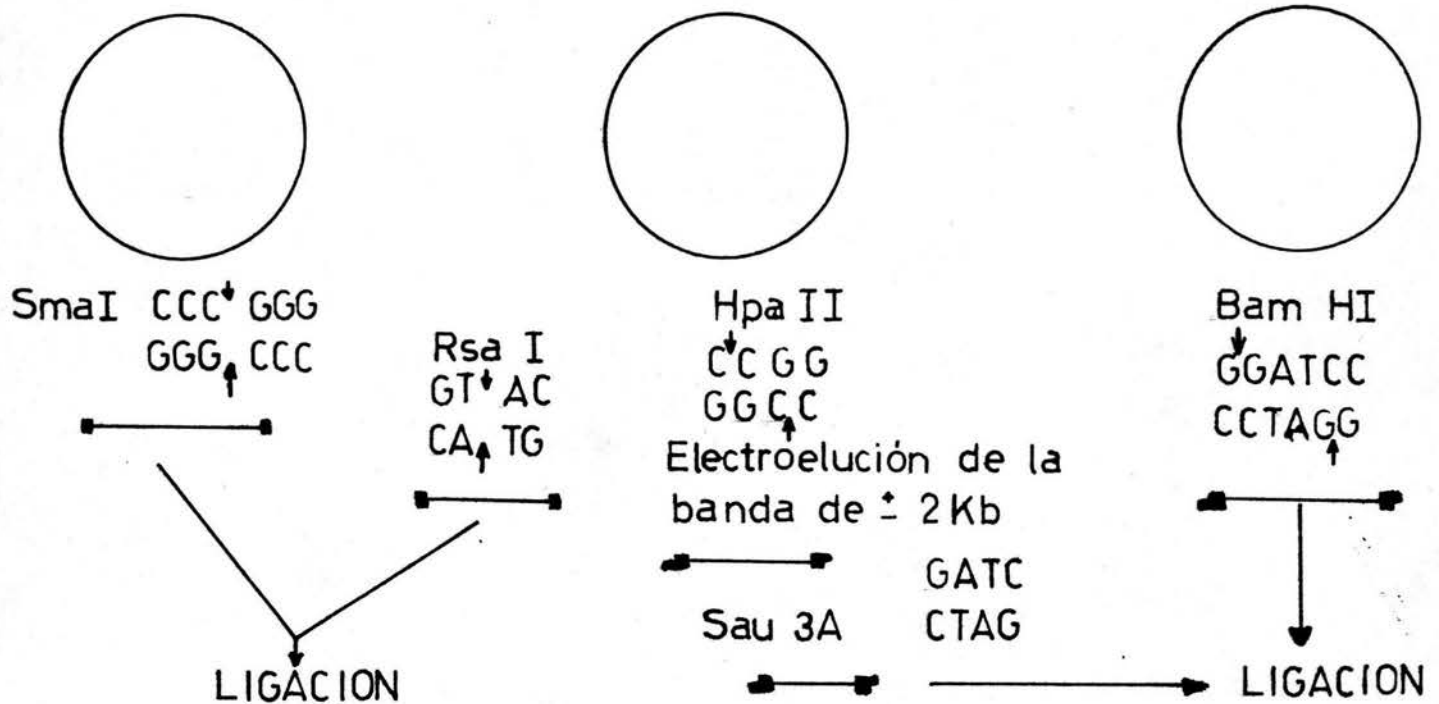


Fig.17.-Esquema de las estrategias de subclonación intentadas para poder secuenciar el gen del apocitocromo b de la mutante Am13.

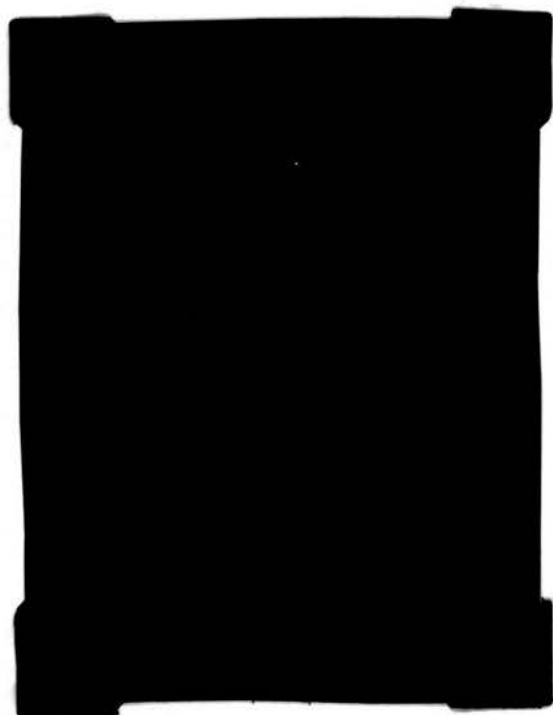


Fig.18.- Fotografía . que muestra el patron de restricción obtenido al cortar la clona 24 con la enzima Hpa II, junto a lambda digerido con Hind III y Eco RI como marcador, y la posterior extracción de la banda de 2kb portadora del gen del apocitocromo b, para poder electroeluirlo, y someterlo a digestiones ulteriores para subclonar el gen.

Al transformar las cepas de E.coli correspondientes

( JM101 para pTZR18 y M13mp18; HB101 para pBR322 ) se encontraron 520 clonas posibles en pBR322, 13 en el M13mp18 y 46 en el pTZR18.

Analizando las subclonas del M13mp18, no se obtuvieron linearizaciones que permitieran su estudio adecuado al cortar con la enzima Eco RI. Las subclonas de pBR322 fueron analizadas con Pst I, Eco RI, Sst I y Sau 3AI; los patrones de restricción digiriendo con las enzimas Eco RI-Hind III y Rsa I, se encontraron las subclonas esperadas en el pTZR18 ( fig. 19 ).

Las clonas 20,29 y 41 fueron identificadas como poseedoras del fragmento de 44pb, la 46 porta el de 235pb, las clonas 11 y 40 el fragmento de 247pb; en las clonas 15 y 34 no fue posible definir el tamaño del inserto, variando entre el de 247 y el de 253pb. La clona 38 porta el fragmento de 253pb, mientras que la 42, el de 421pb. Además, se identificaron clonas con insertos mayores ( la 21 y la 43 con más de 1200pb ) y clonas con dobles insertos ( 3,8,17,19 y 45 detectadas al cortar con Rsa I ).



Fig.19.-Fotografía que muestra las subclonas obtenidas en pTZR18 portadoras de los fragmentos del apocitocromo b. Como marcador se utilizó el pBR322 cortado con Hinf I, y el pRC portador del gen del apocitocromo b cortado con Rsa I y aparecen en los carriles 8, y 7 respectivamente. La clona 41, corrida en el carril 6, lleva el inserto de 44pb (la 41, (6) 44), la 46, (13) 235, la 11, (5) 247, la 38, (3) 253, la 42, (9) 421, la 43, (10) \*1200.

Se realizaron experimentos preliminares de



secuenciación, y la subclona 11 de pTZR18 fué secuenciada parcialmente; aun cuando no se pudieron secuenciar mas de 50 nucleotidos, estos se verificaron con la secuencias del gen silvestre obtenida por Aurora Brunner.

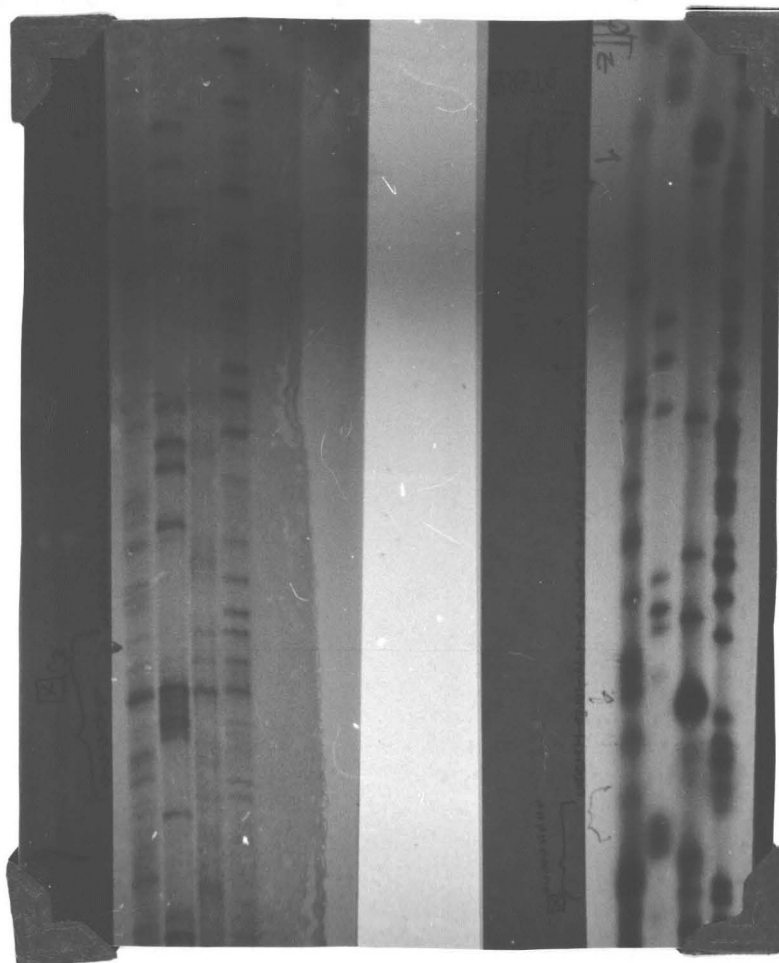


Fig.20.-Fotografía de 2 placas radiograficas de reacciones de secuenciación de la clona 11. En una de ellas se señala el sitio de inicio de la inserción, y se puede reconocer parte de la secuencia complementaria al pTZR18.

#### DISCUSION

La obtención de DNAm<sub>t</sub> es una técnica que ofrece resultados limitados. Las metodologías descritas proporcionan un grado de pureza, y cantidad de DNA, suficientes para poder realizar diversas digestiones sin inhibir la acción de las enzimas de restricción empleadas. Además, la cantidad de ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> obtenido por cada 60g de levaduras ( 2 litros de cultivo ) resulta insuficiente y de difícil manejo para su empleo en diversos propósitos de investigación, como la identificación de secuencias específicas a través de hibridizaciones y si no se cuenta con fragmentos discretos de un genoma, resulta complicado seguir fenotipos específicos; de igual manera, la elaboración de mapas de restricción finos, se dificulta conforme el tamaño del fragmento a estudiar aumenta, de tal forma que resulta mucho más práctico estudiar por separado distintos fragmentos discretos de un mismo genoma.

Es por estas razones, que la obtención de una genoteca aparece como un excelente inicio para el estudio del DNAm<sub>t</sub> de levaduras *petite-*, ya que una de las características fundamentales de los vehículos de clonación es la facilidad de obtención y alto rendimiento de DNA, el cual gracias a los sitios únicos de restricción con los que cuenta, permite la purificación del fragmento clonado. Así, se obtienen grandes cantidades de DNAm<sub>t</sub> a un costo en tiempo y esfuerzo mucho menor que al extraer DNAm<sub>t</sub> de levaduras directamente.

Las nociones básicas del DNAm<sub>t</sub> de la cepa Am13 solo se obtuvieron en parte por digestiones en este trabajo, y en gran

medida, gracias a un trabajo anterior en el cual se clonó y secuenció el gen del apocitocromo b de la cepa silvestre ( A.Brunner com.pers. ) y a estudios comparativos de distintos genomas mitocondriales en levaduras ( 22,40 ).

Para clonar el DNAm<sub>t</sub> de Am13, solo se emplearon 2 endonucleasas de restricción, Sma I y Eco RI. Pudiendo parecer arbitraria la utilización de dichas enzimas, es pertinente mencionar que el patrón de restricción que generan juntas, ofrece solamente 11 fragmentos discretos; los cuales varían en tamaño, de 9.5kb a 1kb. Estos teóricamente son compatibles con los vehículos de clonación seleccionados. Cabe mencionar la posible dificultad de clonación del fragmento de mayor tamaño en estos vehículos si se es realmente estricto.

En la sección de resultados se presentaron los 3 vehículos seleccionados para la obtención de la genoteca del DNAm<sub>t</sub> Am13 con sus respectivas cualidades. Es adecuado ahora considerar los posibles motivos que favorecieron al pBR322 sobre los otros vehículos.

Un problema de la utilización del fago M13mp18, es que este requiere una serie de cuidados estrictos para asegurar su difusión. La condición adecuada del pili, requisito indispensable en la infección del fago, depende de una temperatura estricta de 37°C, además es necesario mantener el cultivo en agitación vigorosa, de manera que se favorezca la expulsión de nuevos fagos una vez que han crecido dentro de un hospedero. En resumen, la manipulación de este fago no es sencilla. Otro factor que

desfavorece la utilización del M13 como vehículo de clonación, es la inestabilidad de ciertos insertos en algunos sitios de SMC ( 31, 35 ). Sin embargo, a pesar de dichas desventajas, este fago se utiliza comercialmente para clonar y secuenciar, así pues, si no se obtuvieron clonas, debemos considerar los factores que intervienen en la clonación como posibles responsables. El M13mp18 solo ( sin cortar ), usado como control, transformo eficientemente, cuando se utilizó linearizado sin fosfatos terminales, el rendimiento de transformantes disminuyo dramaticamente. Así que solo quedan por considerar dos aspectos como responsables, la utilización de proporciones inadecuadas vehículo-inserto, ó condiciones desfavorables de ligación (temperatura, amortiguadores, etc. ).

Cuando se intentó obtener la genoteca en el pUC18, sucedieron cosas muy interesantes, pues si bien en este vehículo se obtuvieron muchas transformantes aparentemente portadoras de plásmidos recombinados, por diversas razones, estos no pudieron ser caracterizados. Tal vez su calidad de plásmido multicopia ayudó en la eficiente transformación observada, además la manipulación adecuada de este vehículo no es difícil, de tal modo que se realizaron diversas ligaciones, en las cuales se verificó al transformar, la eficiencia del vehículo, comparando desde luego con los controles pertinentes ( uno con plásmido sin fosfatos terminales, el cual no transformó eficientemente, y uno con plásmido intacto, en el cual la transformación resultó en exceso satisfactoria ). Una cualidad que cabe destacar, tanto de este sistema como del anterior, es que la detección de clonas se

lleva a cabo en un solo paso, utilizando la inactivación incercial de la Beta-galactosidasa.

Al intentar caracterizar las clonas obtenidas en este vehículo, nos enfrentamos a un patrón de restricción no esperado, en el cual aparecieron demasiadas bandas cuando se intentaba obtener linearizaciones, además este no resultó estable; las cosas se complicaron aún más a medida que se intentaban nuevas digestiones con diversas endonucleasas. Probables explicaciones a los eventos ocurridos, se enlistan a continuación: Primero, se ha reportado en distintos manuales de reactivos comerciales, la baja eficiencia de algunas enzimas para cortar ciertos plásmidos como el pBR322 y sus derivados ( el pUC18 ). Si este hubiese sido el caso, se podría arguir que las bandas obtenidas solo eran los monómeros, dímeros, etc., que se encuentran normalmente cuando no se ha digerido el pUC18 y se somete a electroforesis. Es decir, nunca se obtuvieron digestiones completas, lo cual resulta poco probable, especialmente a la luz de la inestabilidad del patrón obtenido del mismo DNA recombinado. Segundo, en algunas ocasiones sucede que dos o mas plásmidos diferentes, productos de la misma reacción de ligación, transforman a la misma célula hospedera. Al cabo de algunas generaciones como es natural, en la herencia extracromosomal, los plásmidos habrían segregado de manera proporcional en la colonia derivada de aquella célula. Sólo si un plásmido fuese mucho mayor que el otro, lo suficiente como para representar una carga para el hospedero, entonces las proporciones cambiarían durante las divisiones celulares, pues las células portadoras de plásmidos pequeños, podrían dividirse

más rápido que las de plásmidos mayores, pues estas últimas emplearían más tiempo al replicar un genoma mayor. De cualquier forma, el DNA obtenido de dicha colonia presentaría moléculas de diversos tamaños, las cuales si en realidad hubiesen sido digeridas, seguirían presentando varias bandas, según los diferentes tamaños generados en la ligación. Sin embargo, a pesar de haber purificado por estrías dichas clonas, el patrón de restricción de difícil interpretación permaneció. Tercero, una opción más sería pensar que la cepa utilizada como hospedera de las ligaciones con pUC18, tuviera algún tipo de modificación que alterase los posibles eventos de recombinación que esta puede llevar a cabo, lo cual generaría una gama de plásmidos recombinados en una dinámica constante de cambio.

Al clonar en el pBR322 los fragmentos generados por la doble digestión Sma I-Eco RI del ADNmt Am13, los resultados fueron favorables, logrando obtener en éste, la genoteca deseada. El pBR322 es un vehículo de clonación ampliamente utilizado; la razón por la cual fue creado (producir un sitio único de reconocimiento para la endonucleasa Pst I en el gen de resistencia a ampicilina, además de 4 sitios de restricción únicos, Eco RI, Hind III, Bam HI y Sal I en un plásmido derivado del pBR313 ( 21 )), no es muy representativa de su amplia utilización. Se trata de un vehículo en el cual las recombinaciones no son muy frecuentes, y los eventos de conjugación en cruas bi y triparentales son despreciables en comparación con los registrados para el plásmido Col EI. Sin embargo como ya se mencionó, para digerirlo, es necesario emplear

mayor actividad de algunas endonucleasas que la requerida para cortar el fago lambda.

Los insertos esperados eran bastante adecuados para este vehiculo, aun cuando se ha reportado que los fragmentos mayores de 5kb deben ser clonados preferencialmente en fagos que en plásmidos ( 31 ). En este sentido, seria pertinente electrocluir el fragmento A de 9.5kb de la doble digestión Sma I-Eco RI del DNAm<sub>t</sub> Am13 y cortarlo con Hinc II, Ava I ó Hind III, las cuales generan fragmentos de menor talla.

A pesar de las ventajas antes mencionadas, al utilizar el pBR322, se considera de antemano, que la detección de clonas será realizada en más de 48 horas, ya que se debe realizar una selección de transformantes en primer término, utilizando un medio con ampicilina en el cual crecen todas las células portadoras de plásmidos, sin importar si éstos son recombinados o no, pues el gen responsable de dicha resistencia no fué intervenido en el pBR322; para detectar las clonas, se deben replicar en tetraciclina las colonias obtenidas en ampicilina, ya que se espera obtener clonas con un fenotipo Amp<sup>r</sup> y Tet<sup>s</sup>, se deben recuperar del primer medio aquellas colonias que no crezcan en el segundo.

El esfuerzo realizado para detectar clonas en el pBR322 fué bien recompensado al caracterizarlas, pues como se muestra en los resultados, su estudio no presentó mayores problemas. Los altos rendimientos de DNA de plásmido obtenidos por minipreparación fueron suficientes para realizar 9 digestiones

para resolverse en geles de agarosa ó 5 para geles de acrilamida, este DNA se extrae en buenas condiciones y resultó estable en subsecuentes verificaciones.

Al haber conseguido la biblioteca del DNA mt Am13, se procedio a subclonar el fragmento correspondiente a la banda "E", portadora del gen para el apocitocromo b. la clona 24 fué identificada como portadora de dicho fragmento. Al cortar la clona 24 con Rsa I y comparar su patron de restricci3n con el obtenido en las clonas pAB-4 y pRC portadoras del gen del apocitocromo b silvestre y de la mutante Am34 respectivamente, se puede identificar cuando menos una diferencia clara, en la banda correspondiente a 253pb ( F en la figura 15 ), la cual aparece en la clona 24 mas abajo que en las otras, al someter las digestiones con Rsa I de estas en una electroforesis. Este resultado cambia la idea original de la mutaci3n puntual que se habia sugerido, pues es aparente una deleción en este genoma.

Los resultados obtenidos al intentar subclonar dicha clona con el prop3sito de secuenciarla, presentaron nuevamente diversos problemas. Al utilizar el M13mp18, nuevamente se confrontaron los problemas de manipulaci3n e inestabilidad antes mencionados. En el pBR322 se logró obtener subclonas en el sitio para Bam HI, el cual con el "primero" adecuado funciona como cebador del Klenow, permitiendo la secuenciaci3n de ambas cadenas. Sin embargo, no se logró obtener a tiempo los "primeros" requeridos, por lo cual no se secuenció ninguna de las subclonas obtenidas en este vehiculo.



Al emplear el plásmido pTZR18, se consiguieron las subclonas deseadas para secuenciar el gen del apocitocromo b, estas fueron caracterizadas adecuadamente; un aspecto interesante resultó ser la aparición de clonas múltiples, es decir, se obtuvieron plásmidos recombinantes con más de un fragmento de la digestión de la clona 24 con la endonucleasa Rsa I, en primera instancia parecía ser simplemente la inserción de un fragmento digerido parcialmente de tal forma que portase aun un sitio para Rsa I, sin embargo en experimento similares, se localizaron clonas portadoras de 2 fragmentos no continuos en la clona 24. Esto sugiere la unión de varios fragmentos al azar en la mezcla de ligación, aun cuando teóricamente la ligación de extremos rasos como los generados por Rsa I, resulta difícil.

Los templados requeridos para secuenciar se extrajeron de acuerdo con las metodologías descritas, y algunas fueron sometidas a reacciones de secuenciación, pero la técnica no fué montada de forma satisfactoria, de tal forma que sólo la subclona 11 fué secuenciada parcialmente, resolviendo únicamente 50 nucleótidos. A pesar de no haber secuenciado completamente la clona 11, de los resultados obtenidos, cave mencionar con toda cautela, la posibilidad de un cambio en la secuencia; pues como se muestra en la figura 20, se debio haber obtenido el patron A A C A A A G G G G G, de acuerdo a la secuencia del gen del apocitocromo b silvestre de la cepa WM27. En la figura 20 no aparece claro dicho patron, sin embargo, se requiere de una secuenciación de mejor calidad y de la verificación de esta, leyendo la cadena complementaria, para poder afirmar

categoricamente, si a caso hubo algun cambio.

Los problemas enfrentados para secuenciar fueron : a) Templados en malas condiciones, es decir impuros o degradados, lo cual provocó manchas barridas a lo largo de los carriles. Este obstáculo fué superado medianamente al exagerar los cuidados en la obtención de los templados, y b) Mezclas inadecuadas de desoxi-didesoxinucleótidos. Al analizar la placa radiografica del gel se encontraron dos reacciones en proporciones adecuadas, que permitian la lectura de 200-300 nucleotidos ( T y C ) mientras que las dos reacciones restantes resolvian cuando mucho 50 nucleotidos ( G y A ). Estas mezclas fueron modificadas en distintas proporciones para intentar corregirlas.

Roberto coria, al secuenciar la clona 38, portadora de la banda de 253pb al digerir la clona 24 con Rsa I, encontro una deleción de 6 pb, una secuencia palindromica, T A A T T A. Una posible explicación para entender dicho fenómeno, seria pensar que en la doble helice, esta secuencia se plegara originando 2 estructuras de asa, las cuales pueden ser eliminadas al replicar el genoma mitocondrial. A continuación se muestra un esquema del posible mecanismo que origina esta deleción:

```

A A A G A T T T A A T T A C T G T A T T
T T T C T A A A T T A A T G A C A T A A

```

```

A-T
A-T
T-A
A A A G A T T C T G T A T T
T T T C T A A G T C A T A A
A-T
T-A
T-A

```

El cambio que origina dicha delección se muestra a continuación:

229 230 231 232 233  
Asp Leu Ile Thr Val  
GAT TTA ATT ACT GTA

T-----CT  
Ser.

Esta delección, al ser de un número múltiplo de 3, no altera la lectura de los demás aminoácidos de la proteína. Un factor interesante es que la delección se encuentra muy próxima, 2 aminoácidos de distancia, de un sitio registrado como de resistencia a HQNO. Al empalmar esta secuencia en cualquiera de los dos modelos existentes sobre la estructura en la membrana del citocromo b, se observa que la delección ocurre en la interfase de la membrana. Los aminoácidos Leucina e isoleucina eliminados son no polares, mientras que la treonina eliminada, tiene el mismo tipo de carga que la serina creada (polares sin carga), dando un balance general de pérdida de dos aminoácidos no polares en la interfase de la membrana, lo cual seguramente modifica la posición de esta proteína.

La secuenciación de esta mutante no se ha concluido, y se requiere del término de esta para poder asegurar que este cambio confiere la resistencia al antibiótico antimicina A. También sería recomendable realizar experimentos que nos permitieran observar biológicamente, que esta secuencia es la responsable del fenotipo, un experimento probable sería la transformación de mitocondrias de levaduras silvestres con las clonas obtenidas, utilizando como control plásmidos no

recombinados, y con estas mitocondrias transformar protoplastos de levaduras.

Resultaria interesante poder identificar este cambio en la secuencia con un cambio conformacional que pudiera explicar el fenotipo de esta mutante, la resistencia al antibiotico antimicina A; sin embargo, a pesar de poder reconocer los codones para los aminoácidos que se pierden y el que se genera, el conocimiento actual sobre la conformación tridimensional de las subunidades que forman el complejo III, no es suficiente como para poder elaborar un modelo al respecto.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- R.Reid ( 1980 ) New Scientist 85
- 2.-T.D. Fox ( 1986 ) TIGS Abril 97-100
- 3.-Heckman, Sarnoff, Alzner-Deweerd, Yin y Rajbhandary, 1980, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77 : 3159-3163
- 4.-L.A.Grivell ( 1983 ) Sci. Am. 248 ( 3 ) : 60-73
- 5.-Lonsdale, Hodge y Fauron,1984, Nucl. Acids Res. 12 ( 24 ):
- 4.-L.A.Grivell ( 1983 ) Sci. Am. 248 ( 3 ) : 60-73
- 5.-Lonsdale, Hodge y Fauron,1984, Nucl. Acids Res. 12 ( 24 ):
- 9249-9261
- 6.-Ch.S.Levings ( 1983 ) Cell, 32 : 659-661
- 7.-Zamaroczy, Marotta, Faugeron-Fonty, Goursot, Mangin, Baldacci y Bernardi ( 1981 ) Nature, 292 ( 5818 ): 75-78.
- 8.-Bonitz, Berlani, Coruzzi, Macino, Nobrega, Nobrega, Thalenfeld y Tzagoloff ( 1980 ) Proc.Natl.Acad.Sci. 77 ( 6 ): 3167-3170
- 9.-Greenleaf, Kelly, Lehman, 1986, Proc.Natl.Acad.Sci. 83 :3391-3394
- 10.-Barrell,Anderson, Bankier, Brujin, Chen, Coulson, Drouin, Eperon, Nierlich, Roe, Sanger, Schreier, Smith, Staden, y Young, ( 1980 ) Proc.Natl.Acad.Sci.77: 3164-3166
- 11.-Ward, Anderson y Bendich,1981, Cell, 25: 793-803
- 12.-Heyting, Talen, Weijers y Borst ( 1979 ) Molec. gen Genet. 168: 251-277
- 13.-Tabak y Grivell ( 1986 ) TIGS febrero, 51-54
- 14.-Colleaux, d'Auriol, Betermier, Cottarel, Jacquier, Galibert y Dujon ( 1986 ) Cell, 44: 521-533

- 15.-A.Jacquier y B.Dujon ( 1983 ) Mol.gen. Genet. 192: 487-499
- 16.-Gilbert, Marchionni y McKnight ( 1986 ) Cell, 46: 151-154
- 17.-Dobres, Gerbl-rieger, Schmelzer, Mueller y Schweyen ( 1985 )  
Curr.Genet. 10: 283-290
- 18.-A.Brunner, A.Tuena, D. Griffiths ( 1977 ) Molec. gen.Genet.,  
152: 183-191
- 19.-G.Rodel, Korte, Kaudewitz ( 1985 ) Curr.Genet. 9: 641-648
- 20.-R.P.Novick ( 1980 ) Sci. Am. Diciembre 76-89
- 21.-Bolivar, Rodriguez, Greene, Betlach, Heyneker y Boyer (1977)  
Gene 2: 95-113
- 22.-R. Coria ( 1983 ) Tesis UNAM
- 23.-A. Mejia A.( 1983 ) Tesis UNAM
- 24.-G.A.Gonzalez F.( 1983 ) Tesis UNAM
- 25.-A.L.Lehninger( 1980 ) "Bioquimica" Omega, Barcelona : 519-151
- 26.-Ch.J.Avers ( 1980 ) "Genetics"Van Nostrand Company, New York:  
451-488
- 27.-Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson (1983 )"Molecular  
Biology of the cell " Garland Publishing, Inc. New York 483-547
- 28.-Matti Saraste ( 1984 ) FEBS 166 (2): 367-372
- 29.-L.Stryer ( 1981 ) "Biochemistry" W.H.Freeman Company, San  
Francisco 307-332
- 30.-T.Maniatis ( 1982 ) "Molecular cloning" Cold Spring Harbor  
New York
- 31.-Hackett, Fuchs, Messing ( 1984 ) "An Introcuction to  
Recombinant DNA Techniques" University of Minnesota
- 32.- "M13 CLONING/DIDEOXY SEQUENCING" BRL 1980
- 33.-Watson, Tooze, Kurtz, "Recombinant DNA a short course"(1983 )  
Sci.Am. Books. W.H.Freeman and Co. San Francisco

- 34.-Dillon, Nasim, Nestmann, 1985, "Recombinant DNA Methodology"  
J.Wiley & Sons, New York
- 35.-Barnes ( 1980 ) Genetic engineering: principles and methods,  
vol II , Plenum, New York
- 36.-Howell, Appel, Cook, Hauswirth ( 1987 ) J.Biol.Chem. 262 (5):  
2411-2414.
- 37.-J.Vieira & J.Messing ( 1982 ) Gene 19: 259-268
- 38.-F.Bolivar K.Backman ( 1979 ) Meth.Enzymol. 68: 245-267.
- 39.-Sanger, Coulson, Barrell, Smith y Roe ( 1980 ) J.Mol.Biol.  
143: 161-178
- 40.-Brunner, Mendoza, Tuena ( 1987 ) Curr. Genet. 11: 475-482
- 41.-Borst, Sanders, Heyting, Verbeet y Meijlink ( 1977 ) Molec.  
gen Genet. 157: 239-261
- 42.-Zagursky, Baumeister, Lomax y Berman ( 1985 ) Gene Anal Techn  
2: 89-94
- 43.-P.Heinrich ( 1986 ) Mannheim Boehringer
- 44.-Fincham ( 1985 ) en "Gene manipulations in fungi" Bennett y  
Lasure eds. Academic Press, Inc. New York: 3-34
- 45.-Grossman y Hudspeth ( 1985 ) en "Gene manipulations in fungi"  
Bennett y Lasure eds. Academic Press, Inc. New York: 65-103
- 46.-Hoffmann y Avers ( 1973 ) Science 181: 749-751
- 47.-Sando, Miyakawa, Nishibayashi y Kuroiwa ( 1981 ) J. Gen Appl.  
Microbiol. 27: 511-516
- 48.-Rickwood y Chambers ( 1981 ) FEMS Microbiol Lett. 12: 187-190
- 49.-B.Dujon ( 1981 ) en "The molecular biology of the yeast  
Saccharomyces ,life cycle and inheritance" C.S.H.: 505-635
- 50.-D.A.Clayton ( 1982 ) Cell 28: 693-705

51.-Wallace, Ye, Neckelmann, Singh, Webster y Greenberg ( 1987 )

Curr. Genet. 12: 81-90

52.-Widger, Cramer, Herrmann, y Trebst ( 1984 ) Proc.Natl.Acad.  
Sci. 81: 677-678