

13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El efecto adaptativo de la redundancia génica en las vías relacionadas al ciclo del citrato en *Saccharomyces cerevisiae*: una aproximación experimental desde la genética de poblaciones.



Tesis

Para obtener el título de Biólogo

Presenta

Víctor Hugo Anaya Muñoz

TESIS CON FALTA DE ORIGEN

Director de Tesis: Dr. Alexander de Luna Fors



Ciudad Universitaria

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2002

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Víctor Hugo Anaya Muñoz

FECHA: 27-Ago-02

FIRMA: [Firma manuscrita]

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "El efecto adaptativo de la redundancia génica en las vías relacionadas al ciclo del citrato en Saccharomyces cerevisiae: una aproximación experimental desde la genética de poblaciones"

realizado por Víctor Hugo Anaya Muñoz

con número de cuenta 9650399-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Alexander de Luna Fors

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario

Dra. María Alicia González Manjarrez

Suplente

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Suplente

Biol. Luis José Delaye Arredondo

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma manuscrita]

Dr. Eberto Novelo Maldonado.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el Laboratorio a cargo de la Dra. Ma. Alicia González Manjarrez y bajo la dirección del Dr. Alexander de Luna Fors.

El financiamiento para esta investigación provino del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 31774) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN212898). Además se contó con una beca para realización de tesis de licenciatura (PROBETEL), durante el periodo 2001-2002.

La QFB Cristina Aranda colaboró en la puesta a punto de las hibridaciones en membrana, la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular sintetizó parte de los oligonucleótidos utilizados para el trabajo experimental y permitió el uso de su equipo para el análisis de las membranas de hibridación y las electroforesis en gel.

Los Doctores Alexander de Luna Fors, Alicia González Manjarrez, Luisa Alba Lois, Luis Felipe Jiménez García y el Biólogo Luis José Delaye Arredondo leyeron críticamente este manuscrito e hicieron sugerencias importantes para mejorarlo. Así mismo, conformaron el sínodo para el examen de titulación.

A Edna y Mateo

"¿Me podrías indicar, por favor, hacia dónde tengo que ir desde aquí?"
"Eso depende de a dónde quieras llegar", contestó el Gato.
"A mí no me importa demasiado a dónde...", empezó a explicar Alicia
"En ese caso, da igual hacia dónde vayas", interrumpió el Gato.
"... siempre que llegue al alguna parte", terminó Alicia a modo de explicación.
"¡Oh! Siempre llegarás a alguna parte", dijo el Gato, "si caminas lo bastante"

LEWIS CARROLL, *Alicia en el País de las Maravillas*.

En este camino mezcla de Sartre y Humpty Dumpty he contado con el cariño, compañía y consejo de mucha gente. Todos ellos han contribuido de una forma u otra a que ahora sea lo que soy, no por ello deben sentirse culpables.

Los primeros que tuvieron influencia sobre mí fueron los miembros de la poco ortodoxa familia en la que crecí. Primero los padres, Ruth que siempre me ha apoyado en lo anímico, moral y económico, me ha dado confianza en lo que haga no importa lo que sea, apapachado cuando lo he necesitado y cuando no también, acompañado y aconsejado en todos los caminos difíciles, por ser más amiga que mamá. Carlos que me enseñó que cuando menos hay veintemil cosas que no importan y que se la debe uno tomar con calma, por ser un gran amigo y un buen oído cuando uno tira su rollo. Los abuelos y abuelas, Velia, que más que abuela es mamá, con todo lo que eso quiere decir, por cuidarme siempre, y darme de comer rico y en exceso, por enseñarme tantas cosas. A la Iaiá, por el cariño, la complicidad, por estar ahí cuando la necesitamos y aguantar toda la guerra que damos. A Mario por mantenerme entretenido de niño aún a costa de lastimarse en el intento. A Jesús, por las únicas tres notas que se tocar en guitarra y por la guitarra para tocarlas.

Las parejas de los padres no son menos importantes. En primera por ellos mismos, en segunda porque mantienen entretenidos a Ruth y a Carlos. A Américo, por el cariño, la transferencia horizontal de manías, el paraboloides hiperbólico, los libros y por ser un ejemplo vivo de que uno debe renovarse constantemente, más de una vez cada vez si se puede. A Alma, por adoptarme tan rápido, abrirme las puertas su casa, su familia, su cariño, sus consejos, y las divertidas chambas compartidas.

A Tavo, que siempre me aderezado mi vida con sus viajes y composiciones artísticas, por las parrandas juntos donde el regañado era yo. A Rafa que me cuidó, paseó y mal educó, por la influencia que me llevó a querer ver que tienen dentro las cosas y desarmarlo todo. A Jesús, quien procuraba que tuviera algo fresco para leer. A mi queridísima Anaí, el mejor tipo de hemana que uno puede tener (vivíamos en casas separadas, no compartíamos papás y por muchas otras cosas) por la infancia compartida, las peleas, por las pláticas adolecentes y adultas. A Jose, por los cuidados maternos no importa dónde estuviéramos ni la edad que tengamos.

Los amigos han marcado etapas muy importantes en mi vida, a todos ellos les agradezco el apoyo que me han brindado.

Al trío de inmortales por seguir por acá. A Nico por compartir esos momentos huelguísticos, el chafísima curso de Francés y hacer ambas cosas mucho, mucho más llevaderas, por los profesores corridos. A Ale por la risa constante, las burlas, por el mechón decolorado que afortunadamente desapareció y por las gritonisas que nos dábamos. A Xavier López, por la valiosísima asesoría técnica brindada para el desarrollo del trabajo experimental.

A Misha la compañía durante los momentos de soledad, las rifas de fin de año, la música. A Lorena la inacabable capacidad de decir leperadas y animarle a uno la tarde, sus ganas de estar "haciendo siempre amigos", el reconocimiento de que no podríamos vivir juntos sin matarnos.

Al Tuinky por la oportunidad de compartir la vida, los viajes, las fiestas, las pláticas, las terapias, por los murciélagos, en fin por todos los momentos gratos y los no tan gratos en los que nos ha tocado estar juntos. A Daniela, por las pláticas por aguantar al TW y a ambos cuando nos juntamos.

A Barb, la hermanita que nunca quise tener pero que me encanta que haya llegado, por estar ahí siempre, por lo lúdico, por compartir los azotes, por el cariño y las horas de plática por computadora. A Lule, por los cines, las pláticas grilleras y no grilleras, el cariño, el apoyo, la siempre grata compañía y la forma de escuchar. A Kim, el compañero de crímenes, por la pasión puesta en todo, la inagotable dosis de optimismo y de idealismo, por la depresión compartida y por el descubrimiento conjunto de que la ignorancia de algunas cosas en esta vida son la fuente de la felicidad.

A Solc Funes quien me dejó robarle largas horas de su tiempo para que me explayara dándole lata *in vivo e in silico*, por la muy agradable compañía hacia la tortura matutina de los viernes, por el partido Corea - Alemania que casi ví, y por la dulce hostilidad que la caracteriza.

A Lina, por el rápido entendimiento y complicidad dados, los correos transatlánticos (en dimensión y distancia), por su manera discreta de siempre estar ahí y saber como por magia que uno la necesita, por darlo todo sin esperar nada, por dejarme compartir parte de su vida. A Alex por la amistad dada a través de los amigos mutuos y la chamba compartida, por el fondo musical para el trabajo diario, por la ayuda.

A Danae por el tiempo que compartimos, por la paciencia, por el cariño y por la precencia más allá de la distancia; a Jorge por todo lo que compartimos los primeros semestres, por granamex, el MEM, y todo. A Xoxo por el cariño, los viajes, los sueños, la compañía.

Del laboratorio quiero agradecer a Alicia por permitir que nos desarrollemos en completa libertad, por dejarnos hacer lo que creamos más adecuado, por apoyar las locuras de Alexander que me permitieron llegar a este punto. A Amaranta, por las risas y las primeras extracciones de ADN, A Lina por la compañía física y anímica en el trabajo, los trámites, las pláticas, los consejos y medio regaños, por todo lo que nos ha tocado juntos. A Cris Aranda por los interrogatorios y por las palabras de aliento cuando los experimentos se ven afectados por duendes malignos. A Lalo por lo que toca de la amistad aderezada con lata

constante. A Ceci por las pláticas matutinas, los corajes y neurosis compartidas, y la carrilla acumulada. A Claudia y a Carlos por las pláticas que hacen fluir más fácilmente en mientras se experimenta. A Cris Martínez por la lata dada uno al otro y la compartida ambición de un equipo de cómputo para el negocio de la reproducción de material auditivo y de video. Al Sol Guevara por el ejemplo que nos da a diario a todos, por recordarme que a veces los jóvenes hacemos las cosas con demasiada fuerza y así no salen las cosas. Al ya no miembro del laboratorio Martín, el hermano incómodo de horario aun más incómodo por las bromas y la música. Finalmente, a mi querido patrón el Dr. De Luna, por la amistad, por permitir que me inmiscuyera en su proyecto, por la experiencia de aprender, regarla y acertar juntos, por los horarios extremos que compartimos para terminar este episodio.

A Carlos Larralde por guiar mis primeros pasos en esta carrera, sin esa plática antes de entrar a la UNAM quien sabe por donde andaría ahora. A Edda Sciutto por abrimme las puertas de su laboratorio y su casa, por permitirme hacer mis pininos, por ser un ejemplo a seguir, por el cariño, por la interminable paciencia durante mis cambios de proyecto y dudas académicas.

A Marcel.li per las aventuras compatits, la exposició en el WTC, las discussions per arranjar el món, el Allende, per posar em en el meu lloc, per ensenyer me lo necessari per escriu aquestas palauras. A Mercedes por la amistad franca, el cariño y el apoyo en la chamba.

A Mario Suárez, por el ejemplo de trabajo y rectitud permanentes, a Rafael Suárez, por el cariño, el apoyo, las pláticas dominicales acompañadas de buenos licores, A Carlos Suárez por permitirme compartir su familia.

A Edna Díaz por el cariño, las invitaciones acapulqueñas, los cuadros, y la interminable guerra que nos cargamos, a Javi por aguantarme y estar siempre al pendiente.

A las fresiamigas Vivette y Gisela por las bromas, los paseos a Tlayacapan, por mantenerme a Edna ocupada, por querernos a los tres.

A Edna por todo el apoyo que me ha brindado en este tiempo que llevamos juntos, por el amor que nos da a Mateo y a mi, por aguantar mis cambios de humor, por estar ahí siempre que la he necesitado, por reorientarme en la dirección adecuada cuando así fue necesario, por darme a Mateo.

A todos ustedes de nuevo muchas gracias, el camino que me ha traído hasta este punto hubiera sido muy distinto o inexistente sino hubieran estado.

Contenido

Resumen	1
Introducción	
1) La levadura como modelo experimental	
a) Características biológicas generales	2
b) Estructura general del genoma de levadura	4
2) Redundancia génica en la levadura y otros eucariontes	
a) Redundancia génica en eucariontes	7
b) Redundancia génica en la levadura: origen y significado	10
3) Metabolismo de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	
a) Metabolismo del carbono	13
b) Metabolismo del nitrógeno	18
4) La levadura como modelo para la genética de poblaciones	20
Objetivos	25
Planteamiento del problema	26
Estrategia experimental	
1) Estrategia general	28
2) Protocolos	
a) Cultivos seriales	33
b) Conteo por réplica de placa	34
c) Cuantificación por hibridación	35
d) Cuantificación por PCR cuantitativo	44
Resultados y discusión	
1) Curvas de crecimiento	47
2) Cuantificación por réplica de placa	51
3) Cuantificación por hibridación en membrana	56
4) Cuantificación por PCR	65
Conclusiones y perspectivas	77
Bibliografía citada	79

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Ciclo de vida de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	3
Figura 2. Clasificación de los genes de <i>S. cerevisiae</i> según su función en la célula	6
Figura 3. Organización del genoma de <i>S. cerevisiae</i> tras una duplicación genómica ancestral	11
Figura 4. Metabolismo central del carbono	15
Figura 5. Ciclo del citrato y del glioxilato	17
Figura 6. Metabolismo central del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 7. Redundancia en las vías del ciclo del citrato y vías relacionadas	30
Figura 8. Estrategia utilizada para la interrupción de genes	31
Figura 9. Curvas de crecimiento en tres condiciones de cultivo	48
Figura 10. Réplicas de placa de cultivos en medio sólido con o sin genética	52
Figura 11. Cuantificación de dos cepas mutantes mediante la técnica de réplica de placa	54
Figura 12. Calibración de la cantidad de ADN a fijar en la membrana y de la sonda	57
Figura 13. Calibración para medir el efecto del fondo en la hibridación	59
Figura 14. Resolución en la cuantificación de proporciones de ADN genómico	61
Figura 15. Resolución en la cuantificación de proporciones conocidas de ADN genómico	62
Figura 16. Calibraciones para evaluar la hibridación cruzada de 12 Tags	64
Figura 17. Separación electroforética de los productos de PCR en gel de agarosa	67
Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos de las mezclas de ADN genómicos	69
Figura 19. Cuantificación de los productos de PCR amplificados sobre una mezcla de ADN genómicos de <i>hoΔ adh1Δ</i>	71
Figura 20. Electroforesis de los productos de PCR amplificados sobre una mezcla de ADN genómicos de <i>hoΔ cox5aΔ</i>	72
Figura 21. Electroforesis de los productos de PCR amplificados sobre una mezcla de ADN genómicos de <i>hoΔ idp2Δ</i>	74

Figura 22. Electroforesis del producto de una mezcla de cinco
ADN genómicos

75

Tabla 1. Conteo de colonias en placas

53

Resumen:

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un porcentaje alto de genes duplicados; parte de esta redundancia puede explicarse por un evento de duplicación genómica ancestral. Los genes duplicados en este microorganismo se concentran en ciertas funciones, lo que hace suponer que la conservación de genes por duplicado no responde a un proceso azaroso. Una de las vías en las que se puede encontrar un número alto de isoenzimas codificadas por genes duplicados aparentemente redundantes es en el ciclo del citrato. Si la conservación de estos genes responde a un proceso adaptativo, creemos que al mutar alguno de las copias podremos observar un cambio en la adecuación de la población mutante examinada a lo largo de al menos 100 generaciones. En este trabajo se han estudiado tres metodologías con las cuales se pretende medir la adecuación de varias cepas interrumpidas en diferentes genes duplicados que codifican enzimas del ciclo del citrato y vías relacionadas. Los resultados preliminares presentados en este trabajo apuntan hacia la utilización de la técnica de cuantificación de productos específicos de PCR amplificados sobre ADN genómico obtenido de células de levadura crecidas en cultivos mixtos.

Introducción:

1) LA LEVADURA COMO MODELO EXPERIMENTAL

a) Características biológicas generales

La levaduras son hongos unicelulares cuya reproducción asexual ocurre por gemación. En sí, el término "levadura" no tiene ningún significado taxonómico, sino que se refiere a una forma de vida que comparten muchas especies y puede o no caracterizar su ciclo de vida (Alexopoulos, 1996). Sin embargo, el vocablo se utiliza coloquialmente para referirse a un tipo particular de hongo, la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*. La clasificación biológica de este organismo lo agrupa junto con otras levaduras filogenéticamente relacionadas, dentro de la clase Hemiascomycetes.

Como otras levaduras, *S. cerevisiae* tiene la capacidad de vivir y reproducirse tanto en estado diploide como haploide; este último se caracteriza por presentar dos tipos sexuales (*mating types*), el α y el a (Figura 1). Al aparearse ambos tipos de esporas se produce una célula diploide (α/a); bajo un régimen rico en alimentación ésta se mantiene como diploide y se multiplica por gemación. En caso de que exista un régimen pobre en alimentación, la levadura realiza meiosis y genera cuatro esporas haploides que se agrupan en una cápsula de pared gruesa llamada asca. Al madurar, ésta se rompe y da paso a la germinación de las esporas que pueden reproducirse mediante gemación, manteniéndose en el estado haploide, o bien aparearse y formar nuevamente un diploide (Watson *et al.*, 1987).

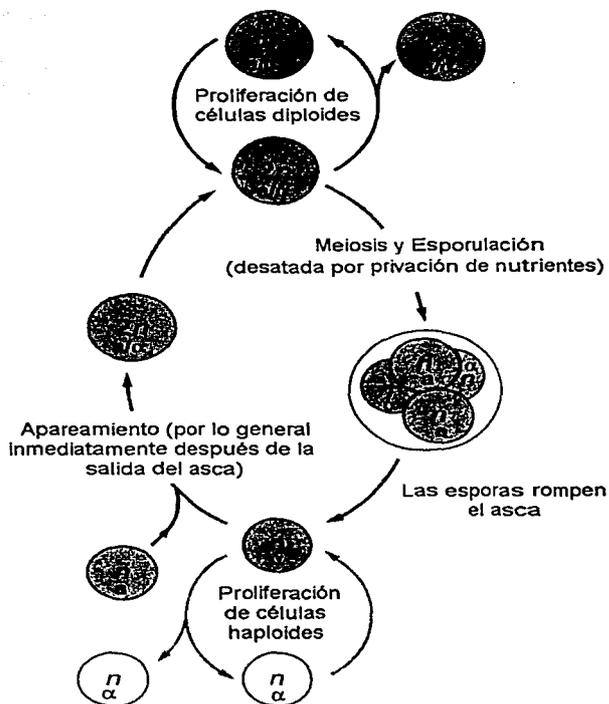


Figura 1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una célula haploide puede proliferar asexualmente y mantenerse en estado de haploidía o bien aparearse con otra célula haploide de un tipo sexual distinto (α/a). Al unirse, estas forman una célula diploide que puede mantenerse en este estado y proliferar por gemación; o bien realizar meiosis y formar cuatro células que se agrupan en una estructura llamada asca. Al madurar, esta estructura se rompe liberando las cuatro células que pueden aparearse o mantenerse como haploides (modificado de Alexopoulos *et al.*, 1996).

El uso de la levadura *S. cerevisiae* para la fabricación de cerveza en Sumeria y Babilonia se tiene documentado desde el año 6000 a.C. (Feldman, 2000). También fue utilizada como un elemento que permitía la conservación de los alimentos, pues la fermentación del azúcar presente en los alimentos baja el pH de los mismos y en ocasiones genera alcohol, lo que impide el crecimiento de otros microorganismos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Además de los usos en las industrias alcohólicas y panificadoras que la levadura ha tenido a lo largo de la historia del hombre, también representa un excelente modelo experimental para el estudio de la célula eucariote. Esto se debe a que es un organismo unicelular que presenta tiempos de duplicación cortos (90 minutos), no es patógeno, y es posible mantenerlo de manera controlada en el estado haploide o en el diploide. Todo lo anterior permite realizar análisis genéticos clásicos con facilidad (Watson *et al.*, 1987). Por otra parte, su genoma es muy compacto, de menos de una centésima parte del de un mamífero, lo que permite analizar la función génica fácilmente y sólo tres y media veces más ADN que *Escherichia coli*, la célula procarionte más estudiada (Alberts *et al.*, 2002). Por todo lo anterior se ha alcanzado un nivel de conocimiento muy detallado de su regulación génica y metabolismo (Zeyl, 2000). Desde 1996, con la publicación de la secuencia del genoma completo de la levadura, se cuenta con una nueva herramienta para el estudio aún más profundo de su fisiología celular (Mewes *et al.*, 1996).

b) Estructura general del genoma de levadura

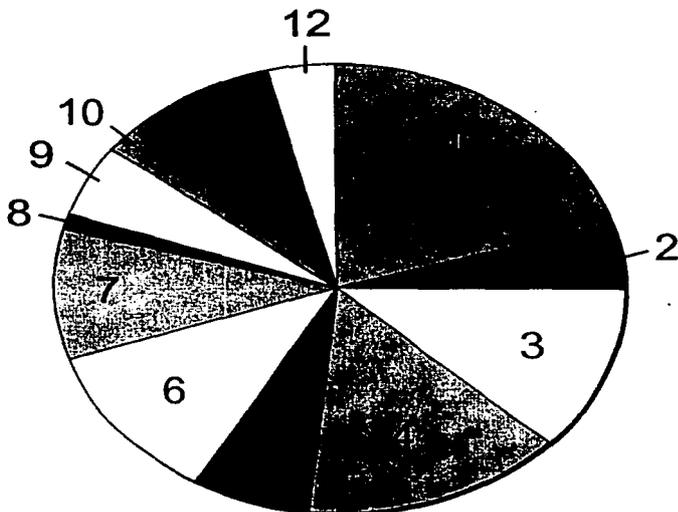
Tras la secuenciación total del genoma de la levadura y los datos publicados en 1996, se sabe que éste se conforma de 13,478 Kb contenidas en 16 cromosomas. En este genoma existen alrededor de 6,000 genes que codifican para aproximadamente 5,800 proteínas

(Mewes *et al.*, 1996) (Figura 2). Resulta interesante que en el momento en que se contó con la secuencia completa, más de la mitad de las proteínas codificadas en este genoma tenían funciones desconocidas por los investigadores (Dujon, 1996).

El genoma de la levadura tiene como característica peculiar ser muy compacto, pues presenta muy pocos pseudogenes, poco ADN espaciador y muy pocos intrones en sus genes. Esto permite que cerca del 80% del ADN sea transcrito. De hecho, no ha sido observado más de un intrón por gen y, en caso de existir, presentan un tamaño que oscila entre los 200 y 500 pb y se localizan en el extremo 5' del gen en cuestión, lo que los hace muy pequeños en comparación con los de otros organismos eucariontes (Olson, 1991). La poca presencia de intrones en el genoma de la levadura fue explicada por Fink aludiendo a la función de una transcriptasa inversa de ARNm libre de intrones. Esta enzima habría producido copias de ADNc de doble cadena que recombinaron con las copias genómicas, ya fuera por entrecruzamiento mutuo o por recombinación mediante la ruptura de las dos hebras (Kaback, 1995).

Otros elementos genéticos que se pueden encontrar en el genoma de *S. cerevisiae* son los retrotransposones. Se sabe que se presentan entre 2 y treinta copias de al menos cinco retrotransposones (Ty1- Ty5), el número de cada uno de ellos depende de la cepa particular con la que se esté trabajando (Kaback, 1995).

Una característica importante del genoma de la levadura de cerveza es la presencia de genes duplicados. Éstos se presentan en tres formas principales: como genes ordenados en *tandem*, como genes dispersos en el genoma, o bien en las regiones teloméricas o



- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Metabolismo (21%) | 7. Transporte celular (9%) |
| 2. Generación de energía (5%) | 8. Transducción de señales (1%) |
| 3. Ciclo celular (12%) | 9. Respuesta a estrés (5%) |
| 4. Transcripción (15%) | 10. Homeostasis (2%) |
| 5. Síntesis de proteínas (9%) | 11. Crecimiento y diferenciación (8%) |
| 6. Destino proteico (10%) | 12. Biogénesis (4%) |

Figura 2. Clasificación de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* según su función en la célula. De los 6,450 genes que se han identificado en el genoma de la levadura, 3,936 han sido caracterizados experimentalmente o por homología. Es este 61% del genoma el que ha sido considerado para el catálogo funcional que se muestra en la figura. Datos tomados de la base de datos MIPS (Mewes *et al.*, 2000), actualizada en enero del 2002.

subteloméricas (Olson, 1991; Kaback, 1995). Sin tomar en cuenta las regiones teloméricas y subteloméricas, se han localizado 56 bloques de genes duplicados a lo largo del genoma completo de la levadura (Mewes *et al.*, 1996).

2) REDUNDANCIA GÉNICA EN LA LEVADURA Y OTROS EUCARIONTES

a) Redundancia génica en eucariontes

Los genomas de los eucariontes presentan niveles importantes de redundancia. De hecho al menos la tercera parte de cualquier genoma eucarionte está constituido por genes duplicados que forman familias de genes (Wagner, 2001). Haldane y Muller sugirieron, en la primera mitad del siglo XX, que un gen duplicado puede divergir para dar origen a un gen con diferente función a la original (Li y Graur, 1991; Wagner, 1998). Para 1970, Ohno propuso que la principal forma en la que un organismo puede generar nuevos genes es la duplicación de genes preexistentes (citado en: Li y Graur, 1991; Wolfe y Shields, 1997; Friedman y Hughes, 2001; Wagner, 2001). Hoy se sabe que existen otros mecanismos para la adquisición de genes nuevos, tales como la transferencia horizontal.

La duplicación de genes puede darse por varios mecanismos: 1) duplicación parcial o interna de un gen, 2) duplicación completa de un gen, 3) duplicación parcial de un cromosoma, 4) aneuploidía o duplicación cromosómica, y 5) poliploidía o duplicación completa del genoma (Li y Graur, 1991).

Los eventos de duplicación génica y genómica se han registrado en varios momentos durante la evolución de distintos linajes. Los casos más notables de duplicación genómica son los de las plantas, los peces óseos y los anfibios (Li y Graur, 1991). Se ha sugerido, hasta el momento sin pruebas definitivas, que también los mamíferos experimentaron uno o más eventos de duplicación masiva de éste tipo (Skrabanek y Wolfe, 1998; Wolfe *et al.*, 2001).

Las duplicaciones genómicas pueden tener dos orígenes: la autoploidía y la halopoliploidía. En el primer caso se trata de una duplicación de la información genética de la misma especie, en el segundo ocurre la fusión de dos especies parentales distintas que forman un híbrido cuyo genoma es la suma de los dos genomas parentales. En ambos casos debe darse un proceso de decaimiento del material genómico redundante, que lleva a la recuperación del estado diploide (Wolfe, 2001).

Para determinar si una especie ha experimentado una duplicación total de su genoma seguida por un evento de diploidización, es necesario considerar tres criterios: 1) conservación del orden de los genes en las regiones cromosómicas duplicadas, 2) que estas regiones no se traslapen, 3) soporte filogenético para una relación ortológica de 2:1 con una especie relacionada cuya divergencia haya ocurrido después del presunto evento de duplicación genómica (Skrabanek y Wolfe, 1998).

Una vez que se ha tenido lugar un proceso de duplicación, los genes pueden transitar por una de tres rutas distintas: la conservación de la función por convergencia génica, la pérdida de la función de una de las dos copias, lo que la llevará a convertirse en un

pseudogen, o bien la adquisición de una nueva función (Li y Graur, 1991; Wagner, 1998; 2001). Dado que las mutaciones no neutrales tienden a ser degenerativas, la gran mayoría de los genes duplicados se perderán en un lapso que se estima entre 3 y 7 millones de años (Lynch y Conery, 2000).

El significado de las porciones duplicadas de los genomas eucariontes ha sido motivo de diversos debates. Sin embargo, las posturas a este respecto se pueden dividir en dos grupos: quienes sostienen que su función es realmente redundante y que sólo están ocupando espacio como ADN parásito, y quienes sostienen que la redundancia es producto de la obtención de funciones especializadas por parte de los genes duplicados (Petrov, 2001).

Entre las explicaciones que atribuyen una función a la información redundante, figura la dada por Gould y Vrba en 1982 (Gould y Vrba, 1998). Ésta se refiere a un proceso exaptacionista, es decir, los genes duplicados pueden tener durante algún tiempo la misma función y, por un proceso selectivo, ser cooptadas para realizar una nueva función. También ha sido propuesto que el papel de las duplicaciones podría ser el de permitir la modificación de una de las copias sin perturbar las funciones vitales de la otra, o sea, funcionan como amortiguadores mutacionales (Mewes *et al.*, 1996; Petrov, 2001).

Otras hipótesis le otorgan a la información redundante una función en los términos de la cantidad de ADN, más que en los del contenido de la misma; por ejemplo aquella que sostiene que la totalidad del ADN de un organismo tiene *per se* una función autoregulatoria en lo que a su expresión se refiere (Zuckerkindl, 1997). Por otro lado, en la misma línea de pensamiento se ha propuesto que el gran tamaño del genoma eucarionte requiere un núcleo

celular de mayor tamaño para contenerlo, y que dicho núcleo necesita a su vez de un aparato de sostén que podría estar dado por el mismo ADN, formando una especie de núcleo esqueleto (Li y Graur, 1991).

b) La redundancia génica en la levadura: origen y significado

El análisis del genoma de la levadura ha llevado a encontrar la existencia de entre 39 (Friedman y Huges, 2001) y 55 (Wolfe y Shields, 1997) bloques, que contienen entre 240 y 376 pares de genes duplicados, respectivamente (Figura 3). Los 240 bloques reportados por Friedman y su grupo están incluidos en los 376 reportados por Wolfe y su equipo. Este nivel de redundancia se refiere a entre el 8 y el 13% del genoma del organismo. Además de los bloques de genes duplicados, en *S. cerevisiae* se encuentran una serie de duplicaciones dispersas en todo el genoma que, junto con las anteriores comprenden cerca del 25% del genoma (Friedman y Huges, 2001).

En un análisis de secuencia tipo BLAST se determinó que estos genes duplicados presentan niveles de identidad que va desde el 24 al 100% en la secuencia de aminoácidos, con un promedio de 63% (Wolfe y Shields, 1997). Además, se ha observado que estos bloques duplicados exhiben las tres condiciones que se plantean en el apartado anterior, junto con una adicional: un grupo filogenético externo cuyos genes únicos están en un orden similar al inferido para el de un organismo cuyo linaje divergió antes de la duplicación (Skrabanek y Wolfe, 1998).

Considerando la estructura del genoma de *S. cerevisiae*, se ha planteado que esta levadura es el ejemplo de un tetraploide degenerado que perdió el 85% de los genes duplicados

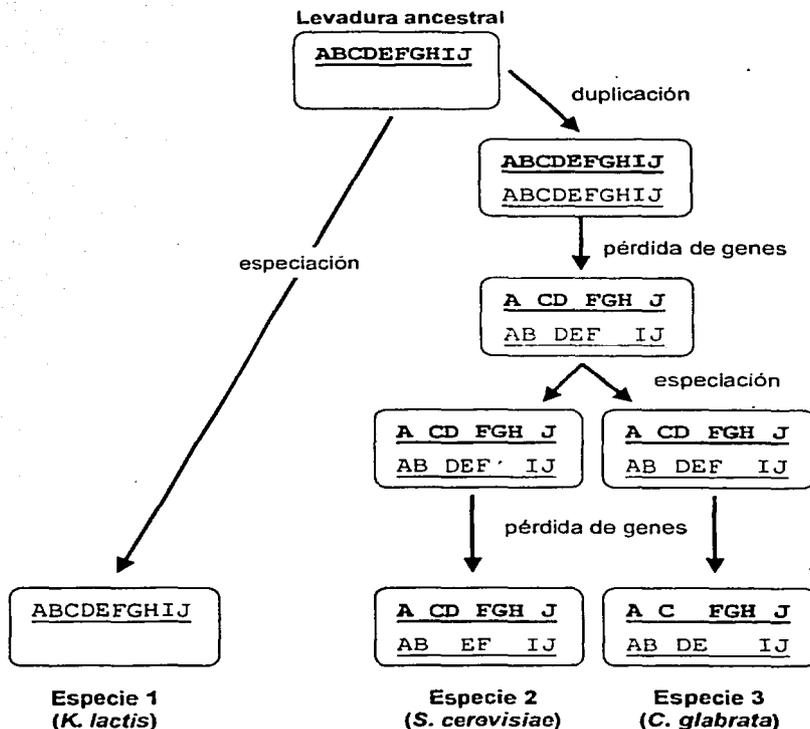


Figura 3. Organización del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* tras un evento de duplicación genómica ancestral. Antes del evento de duplicación total la especie 1 diverge de las especies 2 y 3; estas últimas comparten la duplicación, pero pierden genes y divergen nuevamente. Aparentemente, *Candida glabrata* y *S. cerevisiae* descienden del mismo evento de duplicación, de acuerdo a su número cromosómico, orden de genes y comparación de secuencias de ortólogos. Esquema tomado de Seoighe y Wolfe (1999).

(Wolfe y Shields, 1997; Friedman y Hughes, 2001; Seoighe y Wolfe, 1999). Esta duplicación es posterior a la separación de la línea de *Kluyveromyces lactis*, en algún momento que oscila entre los 100 y 300 millones de años (Figura 3) (Wolfe y Shields, 1997; Friedman, 2001; Seoighe y Wolfe, 1999; Piškur 2001).

Otra hipótesis que intenta explicar el origen de la redundancia en la levadura es la propuesta por Dujon y su grupo (Llorente *et al.*, 2000), en la que no es necesaria una duplicación genómica total. Esta hipótesis sugiere una serie de eventos reiterados de duplicación de segmentos de los cromosomas que son trasladados a otro sitio en la misma orientación, o bien invertidos con respecto al centrómero. El aumento en el tamaño del genoma y en el nivel de redundancia es revertido mediante eventos independientes de delección. En un intento conciliador, Piškur (2001) propone que ambas posibilidades son compatibles.

En cuanto al significado funcional de la conservación de genes duplicados en el genoma de *S. cerevisiae*, es interesante analizar el sentido funcional de éstos, pues se ha privilegiado la conservación de genes duplicados que codifican para proteínas de estrés calórico, proteínas ribosomales citosólicas y del metabolismo de glucosa. En este sentido se ha propuesto que en algunos casos la conservación de genes duplicados se explica por un fenómeno relacionado la dosis que cada copia del gen pudiera aportar a una ruta metabólica o función celular (Seoighe y Wolfe 1999). En otros casos se ha documentado la regulación diferencial en condiciones anaeróbica o aeróbicas de genes como *CYC1/ CYC7*, *COX5A/ COX5B* (Kuast *et al.*, 1998), *GDH1/ GDH3* (DeLuna *et al.*, 2001). Esto último ha llevado a pensar que la duplicación del genoma de la levadura contribuyó en gran medida a la

diferenciación fisiológica entre *S. cerevisiae* y los grupos no facultativos (Wolfe y Shields, 1997). La duplicación pudo haber tenido un papel fundamental para la modificación del metabolismo de la levadura, a través de la especialización de las proteínas redundantes codificadas en su genoma (Piškur, 2001).

3) METABOLISMO DE LA LEVADURA *S. cerevisiae*

a) Metabolismo del carbono

Uno de los aspectos sobresalientes de la levadura *S. cerevisiae* es su capacidad para metabolizar distintas fuentes de carbono, ya sea por la vía aerobia (respiración), o bien por la anaerobia (fermentación). Esta levadura es un aerobio facultativo que lo mismo metaboliza mono, di u oligosacáridos fermentables, que respira etanol, acetato, glicerol, piruvato o lactato. Sin embargo, existe una clara preferencia por la fermentación de glucosa por la vía Embden-Meyerhof que arroja etanol como producto final (Dickinson, 1999a).

La mayoría de las levaduras de la clase Hemiascomycetes son aerobias estrictas y no pueden ser propagadas a bajos niveles de oxígeno. *S. cerevisiae*, es generalmente considerada como capaz de crecer bajo condiciones anaerobias; sin embargo, no es completamente independiente del oxígeno, pues algunas vías biosintéticas dependen de la presencia de microconcentraciones de este elemento (Møller *et al.*, 2001).

El cambio de metabolismo fermentativo a respiratorio está regulado por dos factores: la concentración de oxígeno y, más importante que éste, la concentración de glucosa en el

medio. El periodo que marca el cambio metabólico durante una curva de crecimiento se conoce como "cambio diáuxico" (*diauxic shift*), y está caracterizado por la desrepresión de la expresión de muchas proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, así como de proteínas de la cadena respiratoria y enzimas del ciclo del citrato (Dickinson, 1999a; Liu y Butow, 1999).

El metabolismo de carbono se ha dividido tradicionalmente en tres partes: 1) glucólisis, 2) gluconeogénesis, y, 3), ciclo del citrato. La glucólisis y el ciclo del citrato proveen de precursores que se utilizan para la síntesis de varias moléculas de importancia biológica como los aminoácidos, nucleótidos, lípidos y azúcares (Figura 4) (Alberts *et al.*, 2002).

La glucólisis corresponde estrictamente a la conversión de la glucosa en piruvato, sin embargo comúnmente se incluye la generación de etanol como producto final. Esta vía está regulada a nivel genético y por la actividad misma de las enzimas que participan en el proceso. Lo último resulta importante, ya que existe evidencia sobre el efecto de variaciones en la concentración de algunos intermediarios que dan como resultado la activación o inhibición de algún paso de la glucólisis, por lo que actúan como limitantes para toda la ruta (Dickinson, 1999a).

La gluconeogénesis es aparentemente una glucólisis inversa, sin embargo, existen dos diferencias. La primera es la interconversión entre la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-difosfato, que en la dirección gluconeogénica es catalizada por la fructosa 1,6-bifosfatasa mientras que en el sentido contrario actúa la fosfofructocinasa. La segunda diferencia ocurre al final de proceso, donde fosfoenol piruvato carboxicinas descarboxila al oxaloa-

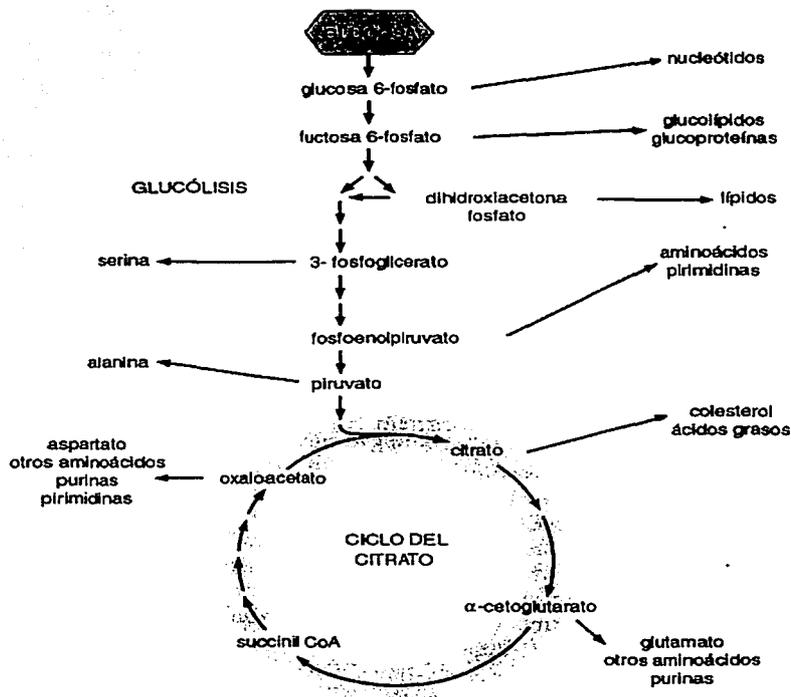


Figura 4. Metabolismo central del carbono y las rutas metabólicas a las que aporta esqueletos de carbono (esquema general). Los diferentes intermediarios del metabolismo central del carbono que pueden aportar los compuestos que se utilizan en diversas rutas anabólicas como las de síntesis de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos. Tomada de Dickinson (1999a).

acetato para dar piruvato, actividad contraria a la dada por la piruvato cinasa en la glucólisis (Alberts *et al.*, 2002; Dickinson, 1999a).

Con el ciclo del citrato, también llamado ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, se inicia la parte aerobia de la respiración (Figura 5). Durante este ciclo se realiza alrededor de dos tercios de la oxidación total del carbono en casi todas las células; como resultados finales se obtienen CO_2 y electrones de alta energía en forma de NADH. En sí, el ciclo del citrato no utiliza oxígeno, pero lo requiere para funcionar pues es el aceptor final de electrones más eficiente, con éste se regenera el NAD^+ necesario para que el ciclo siga funcionando (Alberts *et al.*, 2002).

El ciclo del citrato funciona mediante el consumo de dos unidades de carbono del acetil CoA bajo condiciones oxidativas (Dickinson, 1999a), mismas que son convertidas en CO_2 . El grupo acetil no es oxidado directamente del acetil CoA, sino que es transferido a una molécula de cuatro carbonos (oxaloacetato) para formar la molécula citrato que tiene seis carbonos. Esta molécula es oxidada gradualmente con la consecuente liberación de energía, CO_2 y oxaloacetato, con lo que inicia otra vuelta del ciclo (Alberts *et al.*, 2002). Por su parte el ciclo del glioxilato comparte algunos pasos con el ciclo del citrato y es esencial para el crecimiento en sustratos de dos carbonos como el etanol o el acetato (Figura 5) (Dickinson, 1999a).

El ciclo del citrato de *S. cerevisiae* posee una amplia gama de isoenzimas codificadas por genes redundantes para todos sus pasos (Dickinson, 1999a). La existencia de estas duplicaciones en una ruta tan localizada, así como en el caso de la glucólisis, ha llevado a

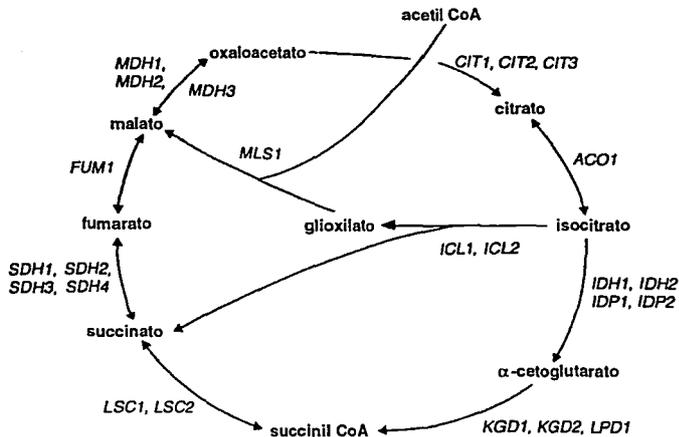


Figura 5. Ciclo del citrato y del glioxilato. El ciclo del citrato consume dos unidades de carbono del acetil CoA, bajo condiciones no represivas (oxidación). El ciclo del glioxilato es esencial para crecer en etanol y acetato. Nótese la existencia de isoenzimas para la mayoría de los pasos del ciclo. Modificado de Dickinson (1999a).

pensar que este fenómeno de redundancia aparente puede ser uno de los factores que permitan el metabolismo facultativo de la levadura (Wolfe *et al.*, 1997; Kwast *et al.*, 1998; Piškur, 2001)

b) Metabolismo del nitrógeno

S. cerevisiae tiene la capacidad de utilizar varias fuentes de nitrógeno: la mayor parte de los aminoácidos pueden fungir como tal, aunque no todos permiten una proliferación igualmente exitosa. Existe sin embargo, una preferencia del organismo por la utilización de amonio como fuente de nitrógeno, y su presencia reprime la acción de las enzimas encargadas del catabolismo de algunos aminoácidos; lo mismo sucede en presencia de asparagina o glutamina (Dickinson, 1999b).

Alrededor del 88% del nitrógeno que se encuentra en las células de la mayoría de los microorganismos proviene de la utilización del grupo amino del glutamato, mientras que el resto proviene de la glutamina. Esto hace pensar que la síntesis y catabolismo de glutamato y glutamina constituye la parte central del metabolismo de nitrógeno. Hay dos vías mediante las cuales el amonio se puede asimilar; en una de ellas la glutamato deshidrogenasa cataliza la biosíntesis de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato en una reacción reversible. En la otra ruta, la glutamina se sintetiza a partir de glutamato y amonio, mientras que la enzima glutamato sintasa cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato para formar glutamato (De Luna, 2002) (Figura 6).

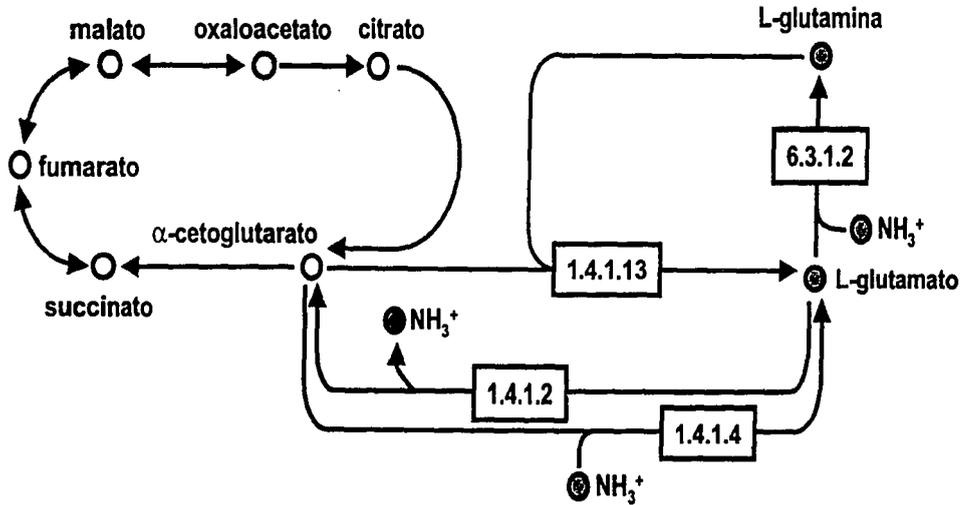


Figura 6. Metabolismo central del nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*. Las vías de asimilación de amonio y de biosíntesis de glutamato y glutamina constituyen el metabolismo central de nitrógeno. El α -cetoglutarato juega un papel como punto de conexión con el metabolismo del carbono. En *S. cerevisiae*, las enzimas y los genes que las codifican corresponden a: 1.4.1.4, NADP-GDH (*GDH1* y *GDH3*); 1.4.1.2, NAD-GDH (*GDH2*); 6.3.1.2, GS (*GLN1*); 1.4.1.3, GOGAT (*GLT1*) (Tomado de DeLuna, 2002).

El metabolismo de los aminoácidos está regulado por alrededor de 40 genes; en todas las vías estudiadas que llevan a la síntesis de algún aminoácido existe al menos un gen que está regulado por el control general que requiere de la desrepresión de *GCN4*, un activador transcripcional. La falta de arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, triptofano o valina, desata un incremento en la transcripción de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de aminoácidos (Dickinson, 1999b).

El metabolismo de nitrógeno y carbono son fundamentales para todo ser vivo, y se encuentran estrechamente relacionados principalmente por la utilización del α -cetoglutarato que funge como puente entre ambos metabolismos. Así, el metabolismo central aporta esqueletos de carbono a las rutas de biosíntesis de compuestos nitrogenados (Dickinson, 1999a; 1999b).

4) LA LEVADURA Y EL ESTUDIO DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES

S. cerevisiae ha representado un modelo muy práctico para el trabajo experimental en la genética clásica (Barganz *et al.*, 1998; Zeyl, 2000). Tradicionalmente se ha trabajado asumiendo que la mayoría de las mutaciones provocarán una baja en la adecuación promedio de una población, por lo que eventualmente serán removidas mediante selección purificadora. Por lo tanto a cada mutación resulta relativamente simple atribuirle un fenotipo particular (Li y Graus, 1991). Sin embargo, actualmente se sabe que la mayoría de las mutaciones puntuales son neutras o prácticamente neutras (Li y Graus, 1991; Zeyl,

2000), por lo que resulta complejo relacionar fenotipos a estos casos por métodos convencionales y es necesario utilizar otro tipo de estrategias que permitan abordar este problema (Delnieri *et al.*, 2001).

La levadura *S. cerevisiae* representa un excelente modelo para el trabajo en genética de poblaciones porque dado lo corto de su tiempo de duplicación (90 minutos), es posible seguir a una población por cientos o miles de generaciones y observar el papel que juegan la selección y la adaptación a lo largo del tiempo. Además, es posible utilizarlo como modelo experimental para poner a prueba los modelos teóricos sobre el comportamiento de los genes en las poblaciones naturales (Zeyl, 2000).

Una de las estrategias que se han planteado para abordar este problema afronta el conflicto desde un punto de vista cualitativo, no cuantitativo como se ha hecho hasta el momento (Baganz *et al.*, 1997; 1998). Este enfoque permite estudiar el efecto de una mutación en genes individuales en términos de cambios en la adecuación, pudiendo así determinar su efecto a largo plazo (Baganz *et al.*, 1997; 1998; Zeyl, 2000).

El término adecuación ha sido definido en términos evolutivos como la tasa de crecimiento de un genotipo en relación a otros genotipos (Futuyma, 1986). En organismos cuyos ciclos de vida son largos, la adecuación puede ser un factor difícil de determinar, sin embargo, en organismos como la levadura este parámetro puede ser estimado simplemente como su tasa de crecimiento (Baganz *et al.*, 1998; Zeyl, 2000). La adecuación no es una medida absoluta sino relativa a la comparación con el éxito que otros genotipos presenten (Li y Graus, 1991). La adecuación es también un reflejo de la adaptación, puesto que al existir

variaciones en los genomas de una población, ya sea por mutaciones espontáneas o inducidas, se puede estar modificando un sistema cuya regulación fina no es del todo conocido (Zeyl, 2000; Futuyma, 1986).

En biología la adaptación evolutiva se define como el proceso de modificación evolutiva de un carácter que, bajo selección, permite una función más eficiente o ventajosa, incrementando la adecuación dentro de un contexto o serie de contextos particulares (West-Eberhard, 1998). Medir el efecto adecuacional de un cambio en un sólo gen bajo un mismo fondo genético puede ser complicado, dado los efectos que un cambio puede generar en el sistema completo (Thatcher *et al.*, 1998; Zeyl, 2000). En general, se propone que la medida del efecto adecuacional de una mutación se lleve a cabo mediante experimentos que sometan a la población a procesos de competencia, lo cual permite observar el fenómeno a la largo de cientos o de miles de generaciones bajo condiciones idénticas (Baganz, 1997; 1998; Thatcher, 1998; West-Eberhard, 1998; Zeyl 2000).

Ahora bien, se sabe que sólo una pequeña parte de los genes de la levadura son esenciales, al menos en condiciones de laboratorio (Thatcher *et al.*, 1998). A ellos es fácil atribuirles un valor de adecuación; sin embargo, para el resto de los genes no resulta tan simple. Thatcher y colaboradores (1998) proponen, que el resto de los genes están contribuyendo en pequeñas dosis a la eficiencia o a la confiabilidad del funcionamiento del sistema genético de los organismos. Actúan por ejemplo, ejecutando "ajustes finos" al funcionamiento de la maquinaria génica lo que se traduciría en un beneficio marginal a la adecuación del organismo. La hipótesis del beneficio marginal es posible aplicarla al caso

de las mutaciones semi-neutrales, cuyos efectos sumados podrían dar como resultado alguna ventaja adaptativa en un medio determinado (Thatcher *et al.*, 1998).

Hasta este momento se han hecho ya algunos experimentos que van dirigidos hacia la determinación del efecto de ciertas mutaciones en términos de adecuación en distintas mutaciones. Destacan los experimentos de Shoemaker y su grupo (1996), Oliver y su grupo (Barganz, 1997; 1998) y los de Dickinson y su grupo (Thatcher *et al.*, 1998).

Los experimentos de competencia se realizan utilizando uno de dos métodos distintos de cultivo, ambos con ventajas y desventajas. El primero es el de cultivos seriales en bache que, de acuerdo a Zeyl (2000), permite una mayor replicabilidad dentro de un tratamiento experimental. El segundo es el cultivo continuo en fermentador, que tiene la ventaja de que en éste se mantienen niveles constantes de oxígeno, nutrientes y pH, permitiendo así seguir una condición particular de forma controlada por un tiempo tan prolongado como se desee (Barganz *et al.*, 1997; 1998; Thatcher *et al.*, 1998; Zeyl, 2000).

También es necesario contar con un método de identificación, al menos dos han sido ensayados. El primero consiste en la identificación y cuantificación de cada una de las cepas sujetas a tratamiento experimental. Para ello se ha utilizado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que da como resultado un producto de un tamaño predeterminado para cada cepa. La cuantificación de cada cepa se realiza al contabilizar el producto final de cada reacción de PCR (Barganz, 1997; 1998). La segunda estrategia consiste en la sustitución del marco de lectura deseado por el módulo *kanR* que brinda resistencia a antibióticos, flanqueado por un par de secuencias únicas amplificables por PCR y

cuantificables por diversos métodos de hibridación (Shoemaker *et al.*, 1996; Barganz *et al.*, 1998, Thatcher *et al.*, 1998; Kumar y Snyder, 2001). Ambos métodos han sido comparados brindando resultados muy similares (Barganz *et al.*, 1998).

Así pues, la levadura *S. cerevisiae* representa un modelo eucarionte idóneo para el estudio de los efectos adaptativos de la redundancia génica, ya sea desde la perspectiva de la genética de poblaciones o desde la perspectiva funcional. En la actualidad se han planteado ya varias metodologías dirigidas en ambos sentidos. En éste trabajo se evaluarán algunos métodos que nos permitan medir el efecto adecuacional de las mutaciones de genes redundantes del ciclo del citrato.

Objetivos:

El objetivo general de éste trabajo fue proponer una metodología con el fin de medir experimentalmente el valor adaptativo de una serie de genes redundantes que codifican para enzimas del ciclo del citrato en *S. cerevisiae*, bajo condiciones controladas en el laboratorio. Para lograr esto se fijaron los siguientes objetivos particulares:

- a) Establecer el protocolo a utilizar para realizar cultivos de competencia y elegir las mutantes que serán sometidas a experimentación.
- b) Evaluar una metodología para cuantificar las diferencias poblacionales de dos cepas de levaduras en competencia mediante el uso de la réplica de placas.
- c) Evaluar una metodología para cuantificar las diferencias poblacionales de doce cepas de levaduras en competencia mediante el uso de hibridaciones en membranas tipo Hybond N⁺.
- d) Evaluar una metodología para cuantificar las diferencias poblacionales de cinco cepas de levaduras en competencia mediante el uso de PCR con oligonucleótidos específicos para cada cepa.

Planteamiento del Problema

Alrededor del 16% del genoma de *S. cerevisiae* se presenta en forma de bloques de genes duplicados que junto con a las duplicaciones que se encuentran dispersas a lo largo del genoma suman hasta un 25% (Wolfe y Shields, 1997; Friedman y Hughes, 2001; Seoighe y Wolfe 1999). Gran parte de estos genes no han experimentado una diferenciación en su función bioquímica. Es notable que las duplicaciones no se encuentran distribuidas de forma azarosa entre las diferentes categorías funcionales en el genoma de la levadura, sino que se encuentran concentradas en ciertas funciones tales como las proteínas de respuesta a estrés o las enzimas de ciertas rutas metabólicas como el ciclo del citrato (Wolfe y Shields 1997; Kwast *et al.*, 1998).

Piškur (2001) propone que este fenómeno de redundancia aparente pudo haber facilitado el desarrollo del metabolismo facultativo que caracteriza a *S. cerevisiae*, y existe evidencia de que algunas isoenzimas relacionadas al uso α -cetoglutarato tienen funciones diferentes en distintas condiciones metabólicas (DeLuna *et al.*, 2001). El caso del α -cetoglutarato es importante porque representa el punto de unión entre los metabolismos del carbono y nitrógeno (Dickinson, 1999a). Existen otros casos de genes regulados diferencialmente en condiciones respiratorias o fermentativas, tal es el caso de *CYC1/ CYC7* y *COX5A/ COX5B* (Kwast *et al.*, 1998).

Muchos de los genes que codifican para enzimas del ciclo del citrato se encuentran duplicados (Dickinson, 1999a). Considerando que esta vía tiene diferentes funciones

metabólicas en condiciones de respiración o de fermentación, se puede pensar que este cúmulo de duplicaciones podría tener un significado como parte de la adaptación al metabolismo facultativo.

Para evaluar lo anterior, hemos diseñado una serie de experimentos para medir, en términos de adecuación de las mutantes, el valor adaptativo de la redundancia génica en vías metabólicas relacionadas al ciclo del citrato. En estos trabajos se diseñaron y evaluaron tres técnicas con las que se pretende cuantificar los cambios en las proporciones de una cepa mutante con relación a la silvestre, en experimentos de competencia.

Estrategia experimental

1) ESTRATEGIA GENERAL

Se realizó una búsqueda en la base de datos del catálogo KEGG (www.genome.ad.jp; Kanehisa *et al.*, 2002), de los genes duplicados codificantes para enzimas que participan en el ciclo del citrato y vías relacionadas, es decir, que utilizan intermediarios del ciclo tales como oxaloacetato o α -cetoglutarato. Se localizaron 18 isoenzimas codificadas por genes redundantes, mismas que se enlistan a continuación.

Gen	Enzima codificada
<i>CIT1, CIT2, CIT3</i>	citrato sintasa
<i>IDP1, IDP2, IDP3</i>	NADP-isocitrato deshidrogenasa
<i>LPD1, YPL017C</i>	dihidrolipoamida deshidrogenasa
<i>MDH1, MDH2, MDH3</i>	malato deshidrogenasa
<i>PYC1, PYC2</i>	piruvato carboxilasa
<i>AAT1, AAT2</i>	aspartato aminotransferasa
<i>GDH1, GDH3</i>	NADP-glutamato deshidrogenasa
<i>LYS20, LYS21</i>	homocitrato sintasa
<i>YDR111C, YLR089C</i>	alanino transaminasa (hipotética)

Una vez identificados los genes redundantes de esta vía metabólica se obtuvieron 19 cepas de *S. cerevisiae* con interrupciones sencillas en algunos de estos genes. Las cepas fueron adquiridas del banco "Euroscarf" (*Yeast deletion project*, www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project; Shoemaker *et al.*, 1996) y se muestran en la Figura 7.

Estas mutantes han sido previamente generadas mediante la amplificación por PCR y recombinación homóloga insertando un módulo *KanR* que confiere resistencia a geneticina. Este módulo está flanqueado por dos secuencias de 20 pb (Tag) únicas para cada cepa (Figura 8). Las secuencias únicas permiten identificar a la cepa deseada en un cultivo en el que se encuentre creciendo junto con otras cepas (Shoemaker *et al.*, 1996).

Para los experimentos de competencia, se corrieron por triplicado cultivos seriales en medio rico con glucosa al 2% (YPD) en aerobiosis, como prueba piloto. Posteriormente se realizarán los experimentos en medio rico con etanol al 2% (YPE) en aerobiosis y YPD en condiciones de microaerofilia. En cada cultivo se pusieron a crecer al menos dos cepas diferentes, una silvestre y otra cuya adecuación relativa a ésta se midió. Los cultivos se mantuvieron a lo largo de 175 generaciones (24 días), haciendo reinóculos cada 24hrs y tomando muestras de la población cada 3 reinóculos. La muestra se procesa de dos formas: sembrándose en una caja de Petri para el conteo de colonias por réplica de placa, o bien haciendo una extracción de ADN genómico del cultivo para la cuantificación de cada cepa por hibridación o por amplificación por PCR.

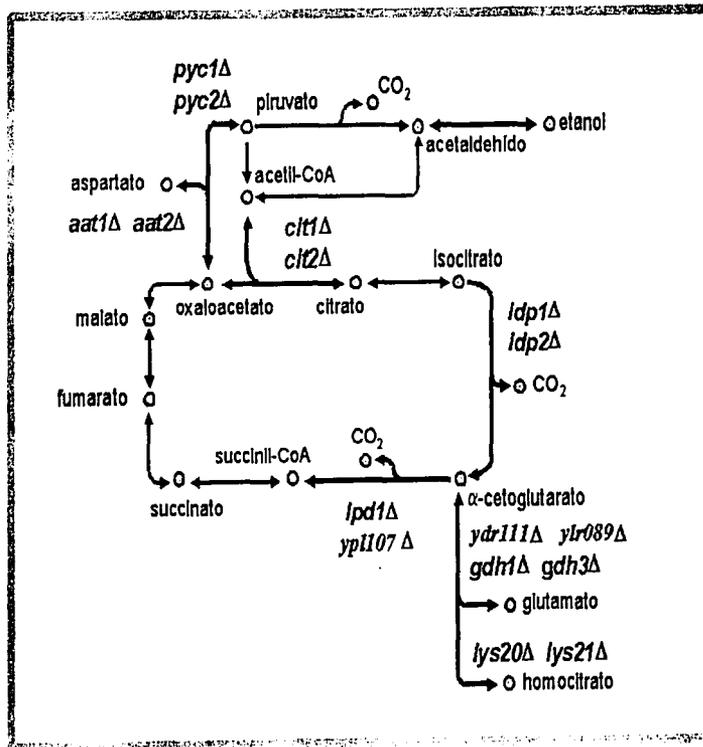


Figura 7. Redundancia en las enzimas del ciclo del citrato y vías relacionadas. Mutantes obtenidas de la colección Euroscarf (Yeast Deletion Project; Shoemaker *et al.*, 1996) de las que se muestran, se trabajó con las cepas *hoxΔ* (silvestre), *cox5aΔ* (control positivo para crecimiento lento en respiración) *adh1Δ* (control positivo para crecimiento lento en fermentación).

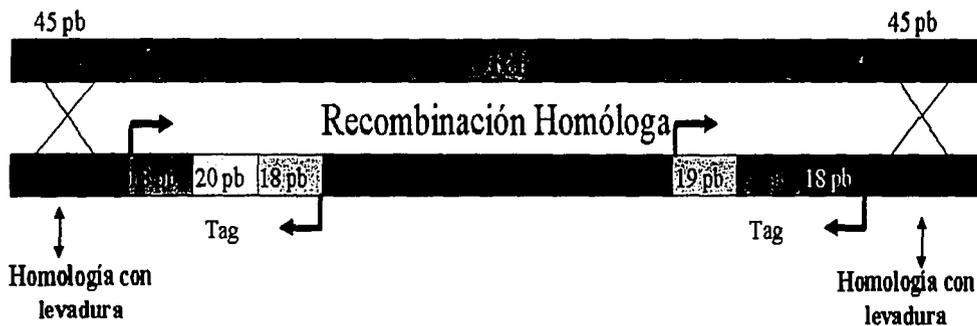


Figura 8. Estrategia utilizada para la interrupción de genes. Un módulo de resistencia a geneticina (*KanR*) flanqueado por dos secuencias identificadoras únicas (Tag) es insertado por recombinación homóloga sustituyendo al ORF que se desee. Cada Tag está a su vez flanqueado por dos secuencias universales que permiten amplificar por PCR cualquiera de los dos Tags y así identificar la cepa mutante en cuestión (Shoemaker *et al.*, 1996).

Para la cuantificación de colonias por réplica de placa se adaptó el protocolo de Thatcher, *et al.* (1998), se tomó la muestra del cultivo y se diluyó en agua destilada estéril, de modo tal que se sembraran entre 100 y 200 células por caja. Las células se dejaron crecer por 48 hrs y se hicieron dos réplicas de esta placa, una en YPD y otra en YPD con geneticina, dejándolas crecer nuevamente por 48 hrs. Se contaron las células en cada caja, considerando como el total de la población el número de células que crecieron en la caja con YPD y como el total de mutantes el número de células crecieron en YPD con antibiótico. De esta manera se obtuvo la proporción de células mutantes relativa a las silvestres en cada uno de los cinco tiempos en los que se tomó una muestra de la población.

Cuando la cuantificación se hizo por hibridación en membrana, primero se amplificaron por PCR los Tags únicos de cada cepa, marcándolos con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Para ello se utilizó como molde el ADN extraído de la muestra del cultivo mixto. El producto de PCR marcado radiactivamente se hibridó en una membrana a la que previamente se habían fijado oligonucleótidos sintéticos de 20 bases correspondientes a cada una de las secuencias Tag amplificadas por PCR. La cuantificación de la marca radiactiva hibridada se realizó en un *Phosfoimager*, (Storm, Molecular Dynamycs).

Otra forma en que se cuantificó la proporción relativa de las cepas en competencia fue la utilización de un gel de agarosa al 2% para separar por peso molecular una serie de productos de PCR que identificaban a cada cepa. Estos productos de PCR no coinciden con los *Tags* que flanquean el módulo *KanR* de las cepas de Euroscarf, pues difieren no

sólo en secuencia sino también en tamaño. Para realizar estas PCR, se diseñaron 16 oligonucleótidos de entre 18 y 24 bases, complementarios a la región 5' de inserción del módulo de interrupción, a demás, se utilizó para la PCR un oligonucleótido reverso universal sobre la secuencia de dicho módulo. El producto de esta reacción consiste en moléculas de diferentes tamaños que identificaban a cada cepa. Una vez que se realizó el PCR sobre la muestra de ADN genómico obtenida del cultivo, se corrió en gel de agarosa al 2% y se cuantificó la intensidad de fluorescencia cada banda teñida con bromuro de etidio con un *Phosphorimager*, (Typhoon, Molecular Dynamics).

2) PROTOCOLOS:

a) Cultivos seriales:

La mezcla deseada de cepas de levadura fue inoculada, comenzando con proporciones similares de cada cepa calculadas con base en su densidad óptica. Las células fueron crecidas durante 24 horas, tiempo en el cual se midió la densidad óptica del cultivo y se utilizaron 100 μ l de éste como inóculo para un nuevo cultivo en medio fresco. En cada reinóculo, el cultivo fue diluido 100 veces, de modo tal que la densidad óptica inicial se encontrara alrededor de 0.05.

Todos los cultivos se llevaron a cabo en tubos de tipo *Falcon* con capacidad de 50 ml, a 30°C. Como medio de cultivo se usó medio rico con extracto de levadura (2%) y peptona de caseína (2%), suplementado con 2% glucosa (YPD) o etanol (YPE) como fuente de

carbono. Para los cultivos en aerobiosis, las células fueron crecidas en 10 ml de medio líquido con agitación a 250 rpm, mientras que para los cultivos en microaerofilia se usaron 50 ml de medio YPD en reposo.

b) Conteo por réplica de placa

Protocolo basado en la técnica de Sambrook y Russell (2001). Todo se hace en condiciones de esterilidad

- 1) Hacer una dilución 1×10^{-5} del cultivo en fase estacionaria.
- 2) Colocar 100 μ l del cultivo diluido en una caja de Petri con medio YPD sólido y espatular hasta que se seque. Hacer por triplicado.
- 3) Se dejan crecer las colonias durante 36-48 hrs a 30°C
- 4) Una vez crecidas las colonias, hacer dos réplicas de la caja original, una en YPD sólido y la otra en YPD sólido con geneticina.
- 5) Dejar crecer las colonias durante 36-48 hrs a 30°C y contar las colonias. Las de la caja de YPD corresponden al total de la población. Las colonias de la caja con YPD con geneticina corresponden a la proporción de mutantes del total de la población.
- 6) Comparar con los resultados de otros puntos del experimento y graficar los datos del comportamiento de la población utilizando el programa Origin (versión .6.0).

c) Cuantificación por hibridación.

Se hicieron cultivos secuenciales como se indica en el protocolo anterior y al punto en que se desee cuantificar la población, se tomó una muestra del cultivo se indica a continuación:

• Extracción de ADN genómico

- 1) Colectar las células por centrifugación a 3,000 rpm durante 5 min. Desechar el sobrenadante (sbn) y resuspender las células en 500 μ l de H₂O bidestilada (bd) estéril, utilizando tubos tipo *Eppendorf* de 1.5 ml.
- 2) Colectar las células nuevamente por centrifugación durante 10 seg. Decantar el sbn y dar *vortex* al sedimento para homogenizar.
- 3) Agregar 200 μ l de una solución de:
 - Tritón X-100 2%
 - SDS 1%
 - NaCL 100 mM
 - Tris-HCL 10mM, pH 8
 - EDTA -Na 1 mM
- 4) Agregar 200 μ l de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) y añadir 0.3 gr de perlas de vidrio

- 5) Dar *vortex* a la máxima velocidad durante 5 min, agregar 200 μ l de amortiguador TE pH 8.0 (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)) (Sambrook y Russell, 2001).
- 6) Centrifugar durante 5 minutos en la microcentrifuga (14,000 rpm), recoger la fase acuosa en un tubo nuevo sin tocar las otras fases.
- 7) Repetir dos veces más los pasos d - f, sin perlas de vidrio, para un total de 2 lavados.
- 8) Agregar 1 ml de etanol al 100%, mezclar 5 veces por inversión.
- 9) Centrifugar durante 4 minutos en la microcentrifuga (14,000 rpm), desechar el sobn, resuspender el precipitado en 400 μ l de TE y agregar 6 μ l de RNAasa (10mg/ml). Incubar durante 15 min a 37 °C, agregar 10 μ l de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol al 100%, mezclar por inversión.
- 10) Centrifugar a 14,000 rpm durante dos minutos, desechar el sobrenadante y dejar secar el precipitado durante aproximadamente 30 minutos. Resuspender el ADN con 50 μ l de H₂O bd estéril utilizando la punta desechable de la pipeta.

- 11) Cargar 8 μ l de muestra en un gel de agarosa al 1% con 2 μ l de azul de bromotimol. Correr durante 30 minutos a 100 voltios y analizar en el transiluminador con luz ultravioleta.

La extracción de ADN se realizó cada tres resiembras, y se utilizaron 10 μ l del cultivo después de haber tomado los 100 ml necesarios para el nuevo inóculo. Con el ADN extraído se hace una PCR radiactiva (Sambrook y Russell 2001).

- PCR radiactiva

- 1) Hacer dos mezclas para evitar que la Taq polimerasa degrade los oligonucleótidos a utilizar. Por tratarse una PCR radiactiva, la mezcla de nucleótidos trifosfatados (dNTP) se elabora con las tres bases no marcadas (dATP, dGTP, dTTP), a una dilución de 30 μ M de cada uno y al final. Colocar 5 μ l de marca radioactiva (dCTP³²) al final. Correr al mismo tiempo un control en el que no se incluya marca radioactiva y que sí contenga la mezcla de las cuatro bases. Utilizar un volumen final de 50 μ l.

Solución A:

- H ₂ O bd	19μl
- dNTP's (10 mM)	3μl
- Oligonucleótido 3' (U1) (100 ng/μl)	1μl
- Oligonucleótido 5' (U2) (100 ng/μl)	1μl
- muestra de ADN genómico (100 ng/ml)	<u>1μl</u>
	25μl

Solución B:

- H ₂ O bd	19μl
- Taq Polimerasa (10 U/μl)	1μl
- Amortiguador para Taq polimerasa con MgCl ² (10 X)	<u>5μl</u>
	25μl

2) Para correr las reacciones, seguir el programa:

- a) 94°C, 180 seg
- b) 94°C, 30 seg
- c) 60°C, 30 seg
- d) 72°C, 45 seg
- e) Repetir 34 veces del paso 2 al 4
- f) 72°C, 5 min
- g) Mantener a 4°C hasta ser utilizado.

• **Estimación del porcentaje de incorporación al producto de PCR (Sambrook y Russell, 2001).**

1. Tomar 1 μ l de PCR radiactivo y agregar a 99 μ l de amortiguador TE (1:100).
2. De la dilución del paso "a", tomar 2 μ l y colocarlos en un papel filtro con carga iónica (DE81-watman). Marcar el filtro con un lápiz con el nombre de la sonda y una "L" de "lavado" al filtro que se vaya a lavar, tomar otros 2 μ l y colocarlos en otro filtro del mismo tipo.
3. Dejar secar ambos filtros durante 10 minutos.
4. Lavar el filtro de la siguiente forma:
 - i) 5 min en 25ml de amortiguador Na_2HPO_4 0.5 M
 - ii) Repetir paso "i" dos veces, para un total de 3 lavados.
 - iii) 1 min en 25 ml de H_2O destilada.
 - iv) Repetir el lavado.
 - v) 1 min en 25 ml de etanol al 100%
 - vi) Repetir el lavado.
5. Dejar secar el filtro durante 10 min
6. Colocar los filtros (lavados y no lavados) en viales de vidrio con 5 ml de líquido de centelleo.

7. Cuantificar en el contador de centelleo, midiendo ^{32}P , durante un minuto.
8. Calcular el porcentaje de incorporación con al siguiente fórmula:

Nº de cuentas del filtro no lavado ----- 100%

Nº de cuentas del filtro lavado ----- X% de incorporación.

Se considera un buen porcentaje de incorporación cuando el resultado del cálculo se encuentra por arriba del 50%.

- **Fijación de ADN (Tag de 20 bases) a la membrana** (Sambrook y Russell, 2001).

- 1) Cortar un trozo de membrana (Hybond N⁺) del tamaño requerido, usando tijeras limpias. Marcar con un lápiz la orientación y remojar durante 10 minutos en SSC 10X a temperatura ambiente.
- 2) Limpiar el dispositivo para *slot slot* (Bio-dot apparatus, Biorad), con NaOH 0.1N, enjuagar con H₂O bd, dejar secar.
- 3) Mojar tres trozos de papel filtro grueso en SSC 10X, colocar sobre la parte baja del aparato, cuidando que sea la placa para *slot blot*.

- 4) Colocar la membrana Hybond N⁺ sobre los filtros, cuidando que no queden burbujas.
- 5) Colocar la parte superior del aparato cuidando que sea la tapa para *slot blot*. Se fija con los tornillos y se aprietan bien para que no existan fugas, conectar la bomba de vacío.
- 6) Se llenan los pozos con 1 ml de SSC 10 X. Se aplica vacío hasta que pase todo el líquido. Repetir el lavado una vez más.
- 7) Llenar los pozos con 200 μ l de SSC 10 X.
- 8) Agregar 10 μ l de ADN (100 ng/ μ l), a cada pozo, el ADN debe diluirse previamente en SSC 2 X.
- 9) Aplicar vacío hasta que salga todo el líquido de los pozos.
- 10) Llenar los pozos con 500 μ l de SSC 10 X y aplicar vacío. Repetir el lavado una vez
- 11) Desarmar el aparato. Se extrae la membrana del aparato con pinzas y se dejar secar colgada.
- 12) Se fija el ADN a la membrana por "Entrecruzamiento de ADN", utilizando un "*UV Stratalinker*" (Modelo 2400, stratagene) Aplicar radiación durante 1 min.

- **Hibridación, lavados y revelado** (Sambrook y Russell, 2001).

- 1) Incubar la membrana durante 2 hrs. en solución de prehibridación a 41 °C

Solución de prehibridación:

- SSC
- Solución Denhart's (1% ficol, 1% polivinilpirrolidona, 1% albúmina bovina) (Sambrook y Rusell, 2001)
- SDS 5%

Se preparan 12 ml para una membrana completa. de 10 x 15 cm.

- 2) Agregar a la solución de prehibridación 10 µl de la sonda radioactiva (producto de PCR marcado con dCTP³²). Dejar toda la noche a 41°C.
- 3) Para lavar, se utiliza una charola por cada lavado.
 - i. Se coloca la membrana en 40 ml de SSC2x, SDS1% por 5 min. a 42°C
 - ii. Repetir 1 paso "a" para un total de 2 lavados
 - iii. Colocar la membrana en 40 ml de SSC2X, SDS1% durante 30 min a 42°C
 - iv. Envolver, aun húmedo, en *Kleenpack*.

Las hibridaciones se hicieron con la intención de cuantificar la cantidad del sonda radiactiva producida por PCR sobre el ADN genómico de los cultivos secuenciales, y así determinar la cantidad de ADN de cada cepa en competencia que se encontraba en el cultivo del que se extrajo el ADN genómico. Una vez que se ha completado el proceso de hibridación procede a la cuantificación de la señal como ahora se describe:

- **Cuantificación de la hibridación con marca radiactiva**

- 1) Se envuelve la membrana aún húmeda en *Kleenpack* y se expone en la pantalla dentro del cassette para *Phosphoimager* durante 24 Hrs.
- 2) Revelar en el *Phosphoimager* (*Storm*, Molecular Dynamics), ajustando los parámetros de sensibilidad entre 0 y 999.99.
- 3) Obtener la tabla de datos correspondiente mediante el uso de los programas ImageQuant v. 5.0 y Microsoft Excel. Normalizar todos los datos respecto al control y comparar con los tiempo previos y siguientes del experimento utilizando Microcal™ Origin™ V.6.0, haciendo las gráficas correspondientes.

d) Cuantificación por PCR cuantitativo.

Se prepararon los cultivos y la extracción del ADN genómico como se indica en los apartados correspondientes como se indica en el apartado correspondiente.

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de dos mezclas para evitar que la Taq polimerasa degradara los oligonucleótidos a utilizar. Los dNTP's se emplearon a una concentración de 200 μ M de cada uno, El oligonucleótido 3' (U2-Re) se utilizó a una concentración de 10 pm / 50 μ l, y los oligonucleótidos 5' se utilizaron en una concentración en exceso de 25 pmol / 50 μ l de cada uno. El ADN genómico fue usado a una concentración de 5 ng / 50 μ l. El volumen final de la reacción de PCR fue de 50 μ l.

- PCR sobre mezcla de ADN genómico (*ho* Δ /*adh1* Δ)

Solución A:

- H ₂ O bd	1 μ l
- dNTP's (10mM)	1 μ l
- Oligonucleótido 3' (U2 Re) (10 pm/ μ l)	1 μ l
- Oligonucleótido 5' (HO Fw) (25 pm/ μ l)	1 μ l
- Oligonucleótido 5' (ADH1 Fw) (25 pm/ μ l)	1 μ l
- ADN genómico <i>ho</i> Δ (2 ng/ μ l)	10 μ l
-ADN genómico <i>adh1</i> Δ (2 ng/ μ l)	<u>10 μl</u>
	25 μ l

Solución B:

- H ₂ O bd	9µl
- Taq polimerasa (10 u/µl	1µl
- Amortiguador Q (Qiagen)(5X)	10µl
- Amortiguador para Taq polimerasa con MgCl ² (10 X)	<u>5µl</u> 25µl

Programa:

- a) 95°C, 180 seg
 - b) 95°C, 30 seg
 - c) 60°C, 60 seg
 - d) 72°C , 120 seg
 - e) Repetir 34 veces del paso 2 al 4 durante
 - f) 72°C, 10 min
 - g) Mantener a 4°C hasta ser utilizado.
- **Cuantificación del producto de PCR teñido con bromuro de etidio**

- 1) Una vez realizada la PCR, elaborar un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio al 0.1%

- 2) Colocar en cada pozo del gel 10 μ l una mezcla 1:4 de producto de PCR y xilencianol como colorante. Utilizar escalera de 250 pb como referencia. Correr durante 2.5 hrs a 85 volts.
- 3) Para cuantificar, se sumerge el gel en H₂O bd (no estéril) durante 3 min. Colocar el gel en la pantalla del lector *Typhoon* (Molecular Dynamics) configurado para leer Fluorescencia con filtro ROX610BP30 green (532 nm), utilizando entre 500 y 550 voltios con sensibilidad media y midiendo a + 3 mm de la superficie, sin aplicar presión sobre la muestra.
- 4) Tras completar la lectura se obtiene la gráfica de las intensidades de cada carril y la tabla de datos correspondiente al gel, mediante el uso de los programas ImageQuant v 5.2 y Microsoft Excel. Normalizar todos los datos respecto al control y comparar con los tiempo previos y siguientes del experimento utilizando Microcal™ Origin™ V.6.0, haciendo las gráficas correspondientes.

Resultados y discusión

1) CURVAS DE CRECIMIENTO

La primera fase de trabajo experimental consistió en realizar curvas de crecimiento en tres condiciones de cultivo que reflejaran tres situaciones metabólicas distintas. Éstas fueron: a) medio rico con glucosa al 2% (YPD), b) medio rico con etanol al 2% (YPE), y c) YPD en condiciones de microaerofilia

La curva de crecimiento de la cepa *hoΔ* en YPD (Figura 9) se realizó por triplicado en matraces de 100 ml, colocando 25 ml de medio de cultivo y el inóculo de un precultivo de levadura necesario para alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.05, y se mantuvo en agitación constante a 2,500 rpm a 30 °C durante un lapso de 56 horas.

Los resultados obtenidos de esta curva de crecimiento nos permitieron conocer el tiempo de duplicación de esta cepa bajo condiciones de metabolismo fermentativo en presencia de oxígeno. Por otra parte el experimento permite conocer la densidad óptica a la que se encontraban los cultivos en experimentos siguientes. El tiempo de duplicación para esta cepa fue de 1.95 horas, es decir 117 minutos. La velocidad de crecimiento de la cepa *hoΔ* es igual a la de una cepa silvestre isogénica, ya que ésta mutación no tiene efecto sobre el crecimiento (Baganz *et al.*, 1997).

La curva de crecimiento en YPE (Figura 9), se realizó por triplicado en matraces de 100 ml, colocando 25 ml de medio de cultivo y el inóculo de un precultivo de levadura necesario para alcanzar una D.O. de 0.05, y se mantuvo en agitación constante a 2,500 rpm a 30 °C

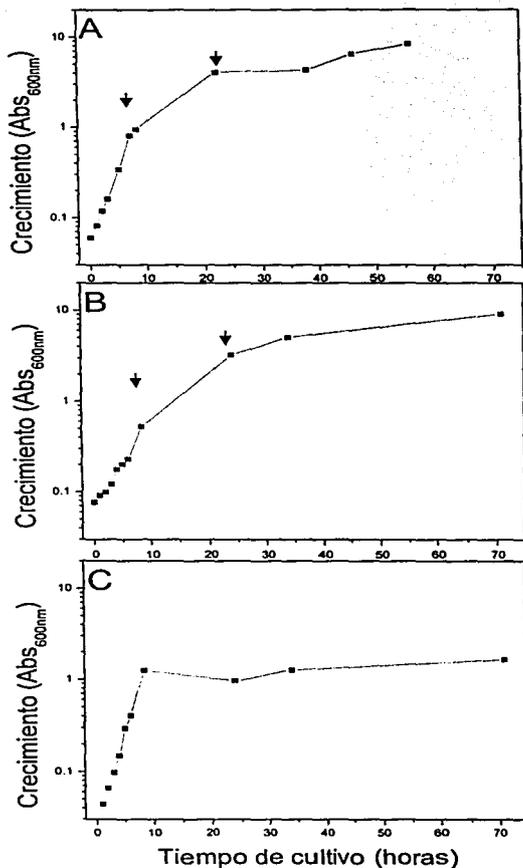


Figura 9. Curvas de crecimiento en tres condiciones de cultivo. La gráfica A muestra la velocidad de crecimiento en medio rico con glucosa al 2%(YPD) en agitación a 30°C. La gráfica B se refiere a la curva de crecimiento en medio rico con etanol al 2% (YPE) en agitación a 30°C. La gráfica C muestra la velocidad de crecimiento en YPD en condiciones de microaerofilia a 30°C. La densidad óptica del cultivo se midió en el espectrofotómetro a una λ de 600 nm a los tiempos indicados.

durante un lapso de 71 horas. Esta curva de crecimiento también nos permitió obtener la velocidad de duplicación del cultivo y determinar los puntos de saturación para futuros experimentos. La velocidad de duplicación obtenida fue de 3.3 horas es decir 198 minutos. La diferencia de estos cultivos radica en que el etanol es una fuente de carbón no fermentable y, por lo tanto, las células crecen en condiciones de respiración.

La curva de crecimiento en YPD en condiciones de microaerofilia (Figura 9) se hizo como experimento sencillo utilizando nueve tubos para centrifuga tipo *Falcon* de 50 ml llenados a su máxima capacidad. Ésto se inoculó con células *hoΔ* a una D.O. de 0.05, cerrándolos y cubriendo la tapa con parafilm, evitando cualquier tipo de agitación. La densidad óptica del cultivo fue tomada durante 71 horas, para un total de nueve puntos. Para evitar que el cultivo se oxigenara, cada ocasión en que se obtenía un punto para la gráfica, se desechaba el tubo y se utilizaba uno nuevo para la siguiente muestra. Con esta curva de crecimiento se estudió el metabolismo fermentativo de la levadura en condiciones de muy baja oxigenación. Se sabe que ciertos genes activan o reprimen su expresión en condiciones de microaerofilia (Kwast *et al.*, 1998). En estas condiciones se obtuvo una velocidad de duplicación de 1.51, es decir 90 minutos.

Al comparar las tres curvas de crecimiento, se puede observar que las curvas representadas en A y C de la Figura 9 crecen prácticamente a la misma velocidad durante la parte de crecimiento exponencial. Sin embargo, al llegar al punto donde se da el cambio diauxico el comportamiento de las curvas cambia radicalmente. Para la curva A, el crecimiento corresponde al de una curva típica, mostrando tres fases de crecimiento: una exponencial,

una de crecimiento lento postdiáuxico y una fase estacionaria. Esto no es así para la curva C; al llegar al cambio diáuxico el crecimiento se detiene casi por completo. Lo anterior se explica por que el etanol no es una fuente fermentable de carbono y al agotarse la glucosa la levadura no tiene otra fuente a la cual recurrir. Las células en YPD (Figura 9A) disminuyen su crecimiento al llegar al cambio diáuxico, aumenta su tiempo de duplicación, pero no dejan de crecer. Esto debido a que puede metabolizar de forma respiratoria el etanol acumulado en el medio durante las fases anteriores. Esto habla de la eficiencia en la utilización de la fuente de carbono, siendo claro que las levaduras "prefieren" fermentar el sustrato a respirarlo, aunque ello implique una menor ganancia energética. Por otro lado, el metabolismo facultativo de este organismo le permite llevar a cabo un proceso de fermentación muy eficiente, que arroja como producto final etanol, mismo que puede ser metabolizado cuando el sustrato fermentable se agota en el medio.

En el caso de la curva del bloque B, hablamos de una típica curva de crecimiento en medio rico con etanol, que sigue una dinámica similar a la de YPD, pero con una menor velocidad de duplicación y sólo dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria).

Lo anterior permite definir el tiempo al cual se harán los reinóculos de los cultivos seriales en diferentes condiciones de crecimiento. Para el caso de YPD en agitación, un tiempo de 24 hrs equivale a casi siete generaciones de modo tal que en 30 días de cultivo en estas condiciones puede observarse el comportamiento de las células durante aproximadamente 200 generaciones.

2) CUANTIFICACIÓN POR RÉPLICA DE PLACA

Se realizaron de forma simultánea dos experimentos de cultivos de competencia en YPD en aerobiosis utilizando para uno de ellos las cepas *gdh1Δ* y silvestre, para el otro cultivo se utilizaron *gdh3Δ* y la silvestre. Cada experimento se llevó a cabo a partir de tres cultivos independientes. Los experimentos se mantuvieron por 24 días, durante los cuales crecieron aproximadamente 175 generaciones de la cepa silvestre. Para realizar el conteo de cada cepa en la población mixta a los tiempo indicados, se sembraba una muestra diluida del cultivo en una caja Petri con YPD sólido. Las células se dejaron crecer durante 48 horas y se hicieron dos réplicas de la caja, una en YPD y otra en YPD con geneticina (Figura 10). El conteo se realizó una vez cada siete días (cinco muestreos) y por triplicado, como se muestra en la Tabla 1.

Los resultados de los conteos muestran el comportamiento de las poblaciones *gdh1Δ/Wt* (Figura 11A) y *gdh3Δ/Wt* (Figura 11B) que se siguieron a lo largo de 175 generaciones. En ambos casos se puede apreciar que la proporción de mutantes en la población aumenta, lo que indica que la falta de cualquiera de los dos genes brinda una pequeña ventaja adaptativa para esta condición particular. En ambas gráficas se presenta un recuadro que representa el promedio de las mediciones hechas y mostradas como curvas independientes descritas en los paneles A y B. Puede observarse que en ambos experimentos el comportamiento de las mutantes es bastante similar. Es a partir de esta pendiente que se puede calcular el coeficiente de selección positivo o negativo de cada cepa relativo a la silvestre. Respecto a las desviaciones estándar, vale la pena hacer énfasis en que su valor no

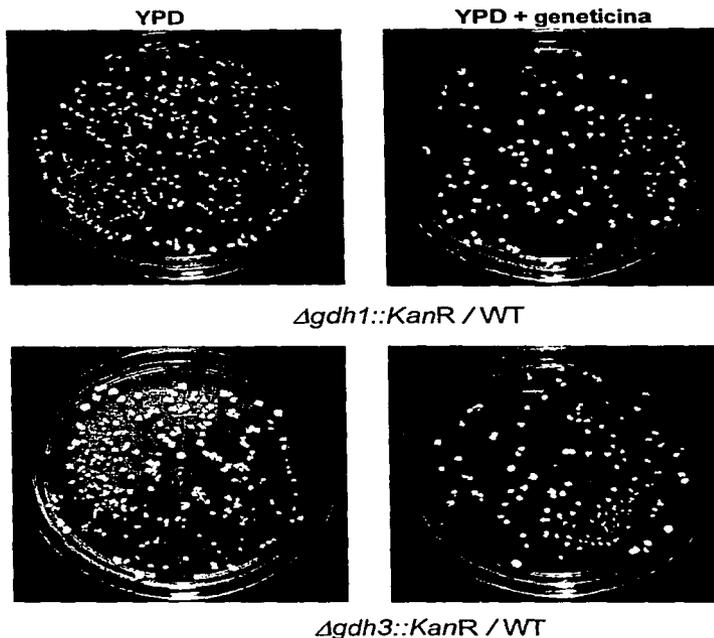


Figura 10. Réplicas de placa de cultivos de *gdh1* Δ / WT y *gdh3* Δ / WT en medio sólido con o sin geneticina. Se muestra como ejemplo una de las cajas utilizadas para la cuantificación por réplica de placas de colonias mutantes en un cultivo mixto de células silvestres y mutantes. La columna de la izquierda muestra una réplica en YPD que representa el 100% de la población sometida a competencia; la columna de la derecha muestra la proporción de mutantes (*gdh1* Δ o *gdh3* Δ) en la población de la caja con YPD.

Experimento 1	<i>gdh1Δ</i> /WT	Muestra 0 (7 generaciones)		
Cultivo	Caja original	Réplica YPD	Réplica YPD + genética	Proporción mutantes/total
		(colonias)		
1	160.67 ± 31.01	138.33 ± 20.6	67 ± 3.61	0.489 ± .058
2	131 ± 17.06	119 ± 18	63.33 ± 9.29	0.534 ± .019
3	143 ± 18.52	119.67 ± 27.02	64.67 ± 18.01	0.538 ± .086
Experimento 1	<i>gdh1Δ</i> /WT	Muestra 2 (42 generaciones)		
Cultivo	Caja original	Réplica YPD	Réplica YPD + genética	Proporción mutantes/total
		(colonias)		
1	155.67 ± 30.66	131.33 ± 15.14	59 ± 3.61	0.4533 ± .025
2	153.33 ± 12.34	141.67 ± 10.21	76 ± 10.82	0.537 ± .069
3	152.33 ± 22.9	116 ± 18.03	65 ± 8.89	0.5746 ± .034

Experimento 2	<i>gdh3Δ</i> /WT	Tiempo 0		
Cultivo	Caja original	Réplica YPD	Réplica YPD + genética	Proporción mutantes/total
		(colonias)		
1	129 ± 24.33	114.67 ± 19.3	57 ± 8.89	0.4997 ± .0477
2	153.33 ± 9.71	144.33 ± 13.65	76.33 ± 10.12	0.5276 ± .0195
3	155.33 ± 8.02	129 ± 14.42	65.33 ± 16.26	0.5049 ± .0112
Experimento 2	<i>gdh3Δ</i> /WT	Muestra 2 (42 generaciones)		
Cultivo	Caja original	Réplica YPD	Réplica YPD + genética	Proporción mutantes/total
		(colonias)		
1	Perdido por contaminación			
2	660.67 ± 8.71	122.67 ± 4.93	59.67 ± 7.23	0.5059 ± 0.819
3	149 ± 2.65	120.33 ± 10.02	44.67 ± 9.07	0.3693 ± 0.538

Tabla 1. Conteo de colonias en placas. El experimento 1 se refiere al cultivo que incluye a *gdh1Δ*/WT, y el experimento 2 a *gdh3Δ*/WT. Se muestran los promedios de los conteos de cada cultivo, que fueron hechos por triplicado y su desviación estándar. La columna llamada "caja original" se refiere a la placa en la que se sembró una alícuota del cultivo; la columna "réplica YPD" es la que se considera como el conteo total de células de la población.

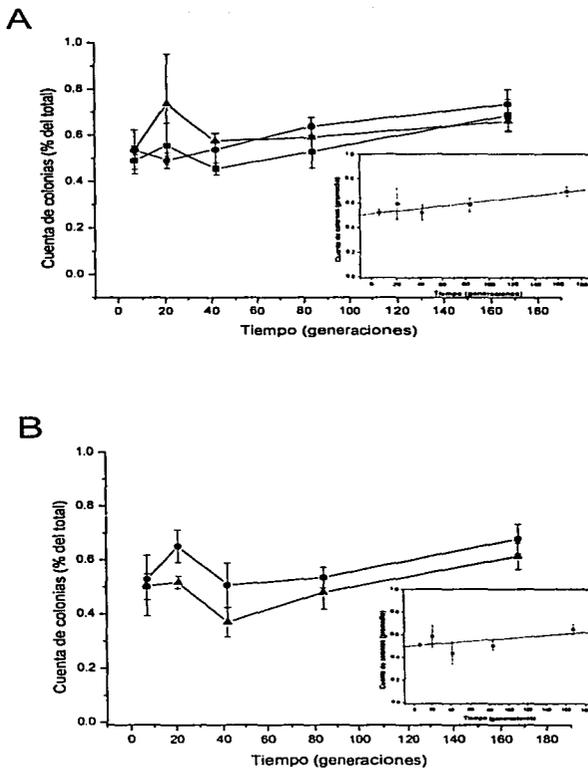


Figura 11. Gráfico donde se compara la cuantificación de dos cepas mutantes mediante la técnica de réplica de placa. En la gráfica A se muestra el comportamiento de tres poblaciones de la levadura mutante *gdh1Δ* interrumpida con un módulo de resistencia a geneticina en comparación con una levadura silvestre. El experimento se siguió durante 175 generaciones. El inserto en la gráfica muestra el promedio de las tres curvas mostradas en la gráfica original. En la gráfica B se muestra el mismo experimento para dos poblaciones de la levadura mutante *gdh3Δ* en comparación con la silvestre.

es necesariamente un resultado directo del comportamiento poblacional, sino un producto del error experimental durante los conteos y en el proceso de aprendizaje de la técnica.

La utilización de ésta técnica no nos permite tener resultados concluyentes respecto al comportamiento poblacional, puesto que se trata sólo de un experimento piloto. En este sentido, sería necesario seguir las poblaciones durante más generaciones y determinar si se mantiene la tendencia de crecimiento de la mutante. Pese a ello, en los experimentos se replica con bastante fidelidad el comportamiento general de las poblaciones en competencia. Los resultados son más robustos mientras más repeticiones se hagan del experimento. En la literatura se reporta un mayor éxito al utilizar cinco repeticiones (Thatcher *et al.*, 1998), en nuestros experimentos sólo se utilizaron dos o tres.

Si bien la técnica de cuantificación por réplica de placas nos brinda un grado bastante alto de confiabilidad ($\pm 7\%$) (Thatcher *et al.*, 1998), ésta es poco escalable pues permite únicamente la comparación de una cepa mutante contra una silvestre, o contra otra mutante que tenga otro marcador de selección (nuestras mutantes poseen como marcador un modulo de resistencia a geneticina). Por otro lado, si se desean comparar más de dos cepas de levadura, el trabajo se multiplica en la misma medida, lo que lo hace poco práctico.

La cuantificación del valor adaptativo de una mutación en comparación con una cepa sepa silvestre de *S. cerevisiae* es posible mediante la utilización de la réplica de placas. Los resultados que se obtienen son confiables y reproducibles. Sin embargo, la escalabilidad representa una limitante importante para el trabajo que se pretende realizar.

3) CUANTIFICACIÓN POR HIBRIDACIÓN EN MEMBRANA

Este método consiste en arreglar por triplicado en una membrana tipo Hybond N⁺ una serie de Tags de 20 bases que son complementarias a las regiones que flanquean al modulo *KanR* que caracteriza a cada cepa con las que se está trabajando (veáse Estrategia Experimental). Sobre la membrana se hibrida una sonda radiactiva que es el producto de PCR obtenido a partir del ADN genómico extraído de los cultivos secuenciales. La cantidad de sonda hibridada contra el ADN fijo a la membrana se cuantifica mediante el uso de un *Phosphoimager* (*Storm*, Molecular Dynamics).

Durante la evaluación de está técnica se llevaron a cabo cuatro fases de calibración. Cada una de ellas estuvo encaminada a determinar las cantidades de ADN fijo en la membrana y de sonda a usar para la hibridación. Así mismo, las calibraciones permitieron determinar cual es el nivel de resolución que se alcanza con este método de cuantificación.

Durante la primera fase de calibración (Figura 12), se ensayaron dos curvas de saturación en una membrana. La primera consistía en fijar diferentes concentraciones de ADN sobre el eje *y* de la membrana mientras sobre el eje *x* se usaron cantidades crecientes de sonda (producto de PCR) para la hibridación (Figura 12A). El sentido de este experimento fue determinar cuáles son las cantidades de ADN que deben de fijarse a la membrana y cuánta sonda radiactiva es necesario usar de forma que no se sature la señal y que ésta siga siendo confiable.

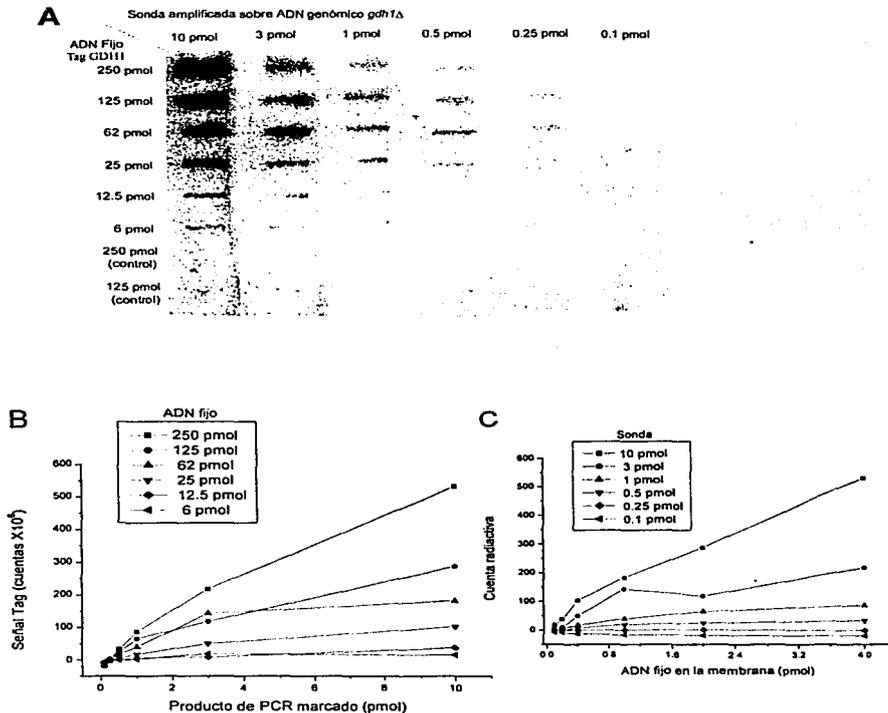


Figura 12. Calibración de la cantidad de ADN a fijar en la membrana y de producto de PCR a usar como sonda. El panel A muestra la imagen de una membrana en la que se fijó un gradiente de ADN y se hibridó contra un gradiente de sonda radiactiva. La gráfica B muestra el comportamiento de la señal radiactiva en función de la cantidad de sonda utilizada a diferentes cantidades de ADN fijo a la membrana. El punto que se tomó fue entre 250 y 125 pmol de ADN fijo. La gráfica C muestra el comportamiento de la señal radiactiva en función de la cantidad de sonda utilizada a diferentes cantidades de ADN fijo a la membrana. La cantidad de sonda a colocar se fijó en 0.5 pmol.

A partir de los resultados de la señal de la sonda hibridada (cuentas radiactivas) contra la concentración de sonda usada para hibridar, se determinó que la cantidad de ADN que se debe fijar está entre los 125 y 250 pmol. Lo anterior se concluye debido a que en este punto la curva se encuentra en la fase lineal, lo cual implica que no se ha saturado el ADN fijo y que por lo tanto puede cuantificarse la sonda hibridada (Figura 12B). La gráfica que relaciona la señal radiactiva contra la cantidad de ADN fijo en la membrana nos permitió determinar que la cantidad apropiada de sonda radiactiva que debe usarse para la hibridación es de 0.5 pmol. Esto debido a que la gráfica indica que toda la sonda radiactiva colocada se ha agotado, sin llegar a saturar al ADN fijo, permitiendo así cuantificar la sonda hibridada (Figura 12C).

La segunda etapa de calibración consistió en evaluar si, al colocar cantidades crecientes de sonda a hibridar, es posible observar un comportamiento lineal de la señal como función de la cantidad de sonda usada para la hibridación (Figura 13). En el experimento se fijaron dos cantidades de ADN a la membrana; 125 y 250 pmol, y se hibridaron con 0.3, 0.4, 0.6 y 0.8 pmol de PCR marcado radiactivamente. La curva de este experimento sigue una línea prácticamente recta para cantidades mayores a 0.4 pmol totales de sonda colocada; las cantidades menores no provocan un aumento lineal en la concentración de la sonda. En la Figura 13A, puede apreciarse que si bien ambas sondas hibridan con el ADN fijo, no lo hacen con la misma eficiencia o bien la señal radiactiva que emiten es de distinta intensidad. Con este experimento se concluye que, para los dos Tags probadas, la cantidad de PCR radiactivo debe ser mayor a 0.2 pmol (0.4/2) por cada marca, con el fin de observar una respuesta con comportamiento lineal.

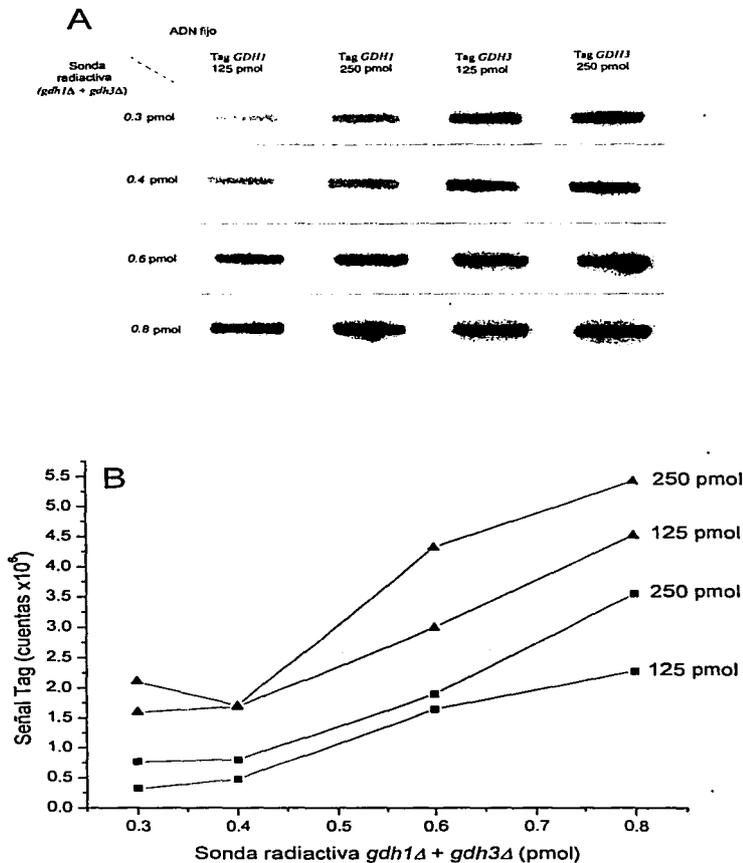


Figura 13: Calibración para medir el efecto del fondo en la hibridación. En el panel A se muestra una membrana en la que se fijaron dos concentraciones de oligonucleótidos (125 y 250 pmol), y se hibridaron contra una concentración creciente de sonda radiactiva. El panel B muestra la gráfica de la curva de saturación de la sonda hibridada, los cuadros representan a la señal que se observa sobre el Tag *GDH1* los triángulos a los Tag *GDH3*.

Una vez determinado el umbral de detección de la técnica, se procedió a determinar el nivel de resolución que con ésta se puede alcanzar. Para ello se realizó un experimento por duplicado en que se hicieron mezclas a diferentes proporciones de los ADN genómicos de las cepas *gdh1Δ/gdh3Δ* para usarlos como molde para una sonda radiactiva (0.3/0.7, 0.4/0.6, 0.5/0.5, 0.6/0.4 y 0.7/0.3). En la membrana se fijaron 250 pmol de los Tag *GDH1* y Tag *GDH3*, así como un Tag control (*COX5a*) con el fin de verificar si existía hibridación cruzada. En la misma Figura 14A puede apreciarse que no existe hibridación cruzada, y que nuevamente las señales emitidas por las marcas radiactiva hibridadas difieren. La Figura 14B muestra el resultado de ambos experimentos; en ésta puede observarse que existe una tendencia lineal en ambas curvas, indicando que las diferencias entre las proporciones de ADN genómico usado como molde son cuantificables como señal radiactiva hibridada con el Tag correspondiente. Si bien los experimentos no replican exactamente, los datos siguen una misma tendencia y pueden ser tomados como válidos. En este experimento se lograron cuantificar diferencias del 10% entre las concentraciones de ADN genómico de dos cepas.

Para seguir explorando la resolución que se puede alcanzar con esta técnica, se montó un experimento de características similares al anterior, pero con diferencias entre las mezclas de genómicos de sólo 2.5%. La Figura 15A muestra la imagen digitalizada de la membrana de hibridación donde puede verse que se repiten las diferencias entre las intensidades de las marcas radiactivas y que no existe hibridación cruzada. La Figura 15 B muestra el gráfico comparativo de ambos experimentos. Nuevamente puede apreciarse que la tendencia lineal se conserva, pudiéndose distinguir diferencias de 2.5% entre concentraciones de ADN genómicos usados como molde para amplificar la sonda. Las curvas no son idénticas, pero

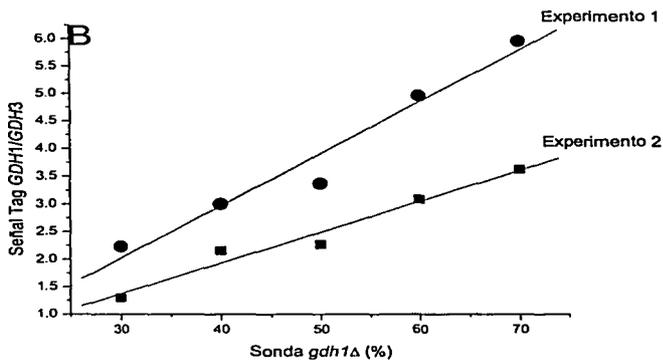
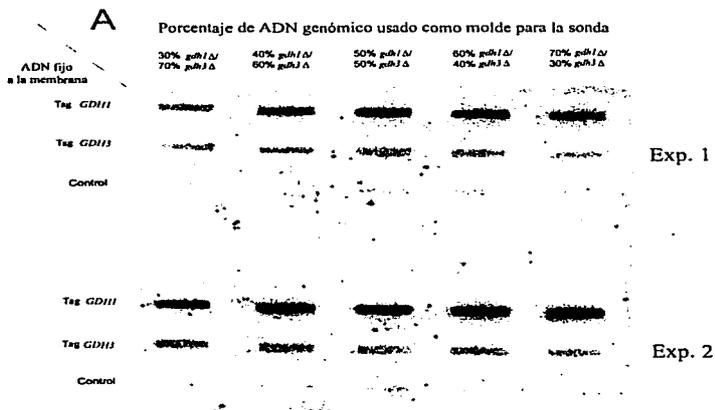


Figura 14. Calibración para determinar la resolución en la cuantificación de diferencias entre proporciones conocidas de ADN genómico de *gdh1Δ* / *gdh3Δ*. El panel A muestra una membrana en la que se fijaron 250 pmol de ADN correspondientes a los Tags *GDH1* y *GDH3*. La membrana se hibridó con cinco productos de PCR radiactivos cuyo molde era una mezcla de proporciones conocidas de ADN genómico de las cepas *gdh1Δ* / *gdh3Δ*, que fue aumentado en 10% de sonda a sonda. En cada caso se usó al rededor de 1 pmol de producto de PCR como sonda

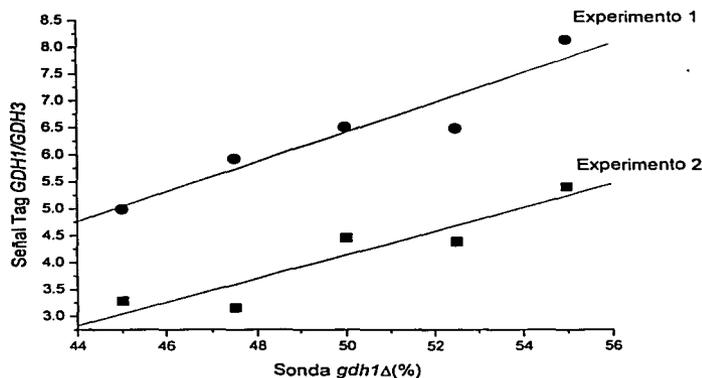
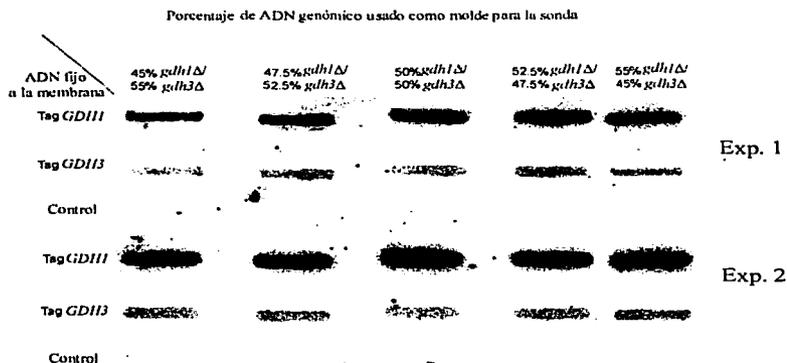


Figura 15. Calibración para determinar la resolución para la cuantificación de diferencias entre proporciones conocidas de ADN genómico de *gdh1Δ* / *gdh3Δ*. El panel A muestra una membrana en la que se fijaron 250 pmol de ADN correspondientes a los Tags *GDH1* y *GDH3*. La membrana se hibridó con cinco sondas cuyo molde era una mezcla en proporciones conocidas de ADN genómico de las cepas *gdh1Δ* / *gdh3Δ* fue aumentado en 2.5% de sonda a sonda.

siguen una misma tendencia con pendientes muy similares. Con los resultados mostrados hasta este punto, se puede decir que el nivel de resolución de la técnica es suficiente para nuestros fines cuantitativos.

La Figura 16 muestra un experimento en el que se realizaron tres hibridaciones con el fin de verificar si existe hibridación cruzada entre las cepas a trabajar (véase tabla en Estrategia Experimental). Se fijaron por triplicado todos los Tags en las membranas de hibridación, conservando el mismo orden en cada caso (Figura 16). Para hibridar las membranas, se hicieron tres sondas distintas, cada una amplificada a partir de una mezcla particular de ADN genómicos como molde que se muestra en el panel C. La forma en que se hicieron las mezclas permitía que cada ADN genómico fuera utilizado como molde para amplificar una sonda en dos ocasiones.

La figura 16A muestra los lugares donde se esperaba que la sonda hibridara ya que en estos puntos se encuentran fijos sus Tags complementarios. En las membranas (panel B) puede apreciarse que no existe hibridación cruzada. Sin embargo, las diferencias en intensidad de las marcas son muy evidentes. Esto dificulta profundamente la cuantificación de un número mayor de cepas crecidas simultáneamente, ya que mientras existen Tags con señal muy intensa (*PYC1*, *ADH1*, *GHD1*) existen otros cuya señal es casi indetectable (*COX5A*, *CIT1*, *CIT2*, *LYS20*, *LYS21*). En estos últimos casos es difícil distinguir la señal de la hibridación de el ruido de fondo producido por la membrana. Debido a los resultados del experimento descrito en la Figura 13, esta baja señal hace que la sonda no sea cuantificable por este medio.

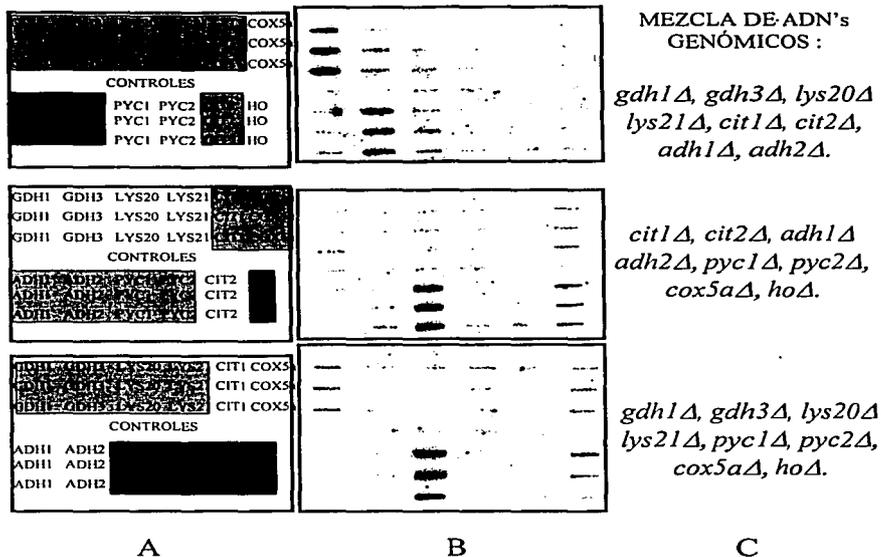


Figura 16. Calibración para evaluar la hibridación cruzada de 12 Tags. En el panel A se muestra el orden de los oligonucleótidos fijos a la membrana. Esto permite observar el comportamiento de cada oligonucleótido al hibridarse con sondas que son producto de distintas mezclas de ADN genómicos. El panel B muestra las imágenes que fueron resultado del experimento de tres membranas hibridadas con las sondas compuestas por las mezclas de genómicos indicadas en el panel C.

Los resultados obtenidos hasta el experimento mostrado en la Figura 15 daban muy buenas perspectivas para la técnica. Se habían encontrado pequeños problemas respecto a la intensidad de la emisión radiactiva para diferentes hibridaciones, sin embargo estas diferencias no afectaban a los resultados en gran medida. Tras los experimentos mostrados en la Figura 16, es claro que la diferencia en la intensidad de la emisión sí es un factor a considerar para experimentos, y que de hecho puede resultar muy difícil cuantificar El ADN genómico de cada cepa por medio de la sonda hibridada en estas membranas

4) CUANTIFICACIÓN POR PCR.

Este método funciona mediante la extracción del ADN genómico de un cultivo mixto. Sobre este ADN se corre una PCR en la que se utiliza un oligonucleótido reveso universal (U2 Re) en dirección 3'->5', complementario al extremo 5' del módulo *KanR* con el que se han interrumpido los genes deseados (véase Estrategia Experimental). Junto con éste se usa una batería de oligonucleótidos específicos para cada mutante 5'->3' complementarios a la región 5' del gen sustituido por el módulo *KanR*. Estos oligonucleótidos específicos están diseñados de modo que den productos de PCR de diferentes tamaños, distintos para cada. La cuantificación mediante el uso de este método es posible por que el oligonucleótido U2-Re está funcionando como factor limitante lo que hace que cada banda sea amplificada en las proporciones en que se encontraba al momento de la extracción de ADN y por lo tanto en el cultivo de células. Los oligonucleótidos utilizados para este experimento son los siguientes.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia: 5' → 3'	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)
U2-Re	GTCGACCTGCAGCGTACG	61	
HO-Fw	TACCCAATCGCTGCGTGCTG	63	1,486
COX5A-Fw	ATAGCGCAGGAGCGGAAGG	62	2,097
2ADH1-Fw	CGAAGTCGAAGAAGTCTCAGCC	64	1,844
GDH1-Fw	TCGGCTCCAATCGCGTAAGTG	63	1,136
GDH3-Fw	TGTGCAGAAGGTCTTCAGAGTG	62	886
IDP1-Fw	GTTCACTCAAGGTCTGCCTGTC	64	969
IDP2-Fw	AATCCGATCACGATTCTGGAG	62	1,305
LYS20-Fw	CGTGTAAGGTTGAGTATCGAC	62	2,146
LYS21-Fw	TGGCACTTCAACATCAGCAGAAG	63	1,676
AAT1-Fw	GAAAACCACGAAGACGACTTTGG	64	2,243
AAT2-Fw	GGTGACAAGACGGACAACCTGG	63	1,876
LDP1-Fw	GTTTAGCAACCGCAGGCGTGG	62	954
YPL107-Fw	TTGGGGAGACTGTTCTGAATG	62	1,264
YDR111-Fw	TCCCAACCATGGAGTTAGTGATC	63	861
YLR089-Fw	GTTTCCAGCCAGAACCCTG	63	1,250

Una vez realizada la reacción de PCR (ver Protocolos), se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio 0.1%. La electroforesis permite separar en bandas discretas los productos de PCR generados con cada oligonucleótido. Para lograr una separación adecuada, en la reacción de PCR no pueden usarse más de cinco oligonucleótidos específicos, cuidando su diseño para lograr dicha separación.

En la Figura 17 se muestra la imagen digitalizada de un gel de agarosa en el que se corrió el producto de PCR obtenido a partir de los ADN genómicos de las cepas *hoΔ*, *gdh1Δ*, *cox5aΔ*, *adh1Δ*, *idp1Δ*, *idp2Δ*, *aat1Δ*, *aat2Δ*, *ydr111Δ* y *ydr089cΔ*; cada uno de estas muestras de ADN usada en una PCR independiente. El panel A muestra la imagen en el transiluminador, mientras que el panel B muestra la imagen digitalizada después de su

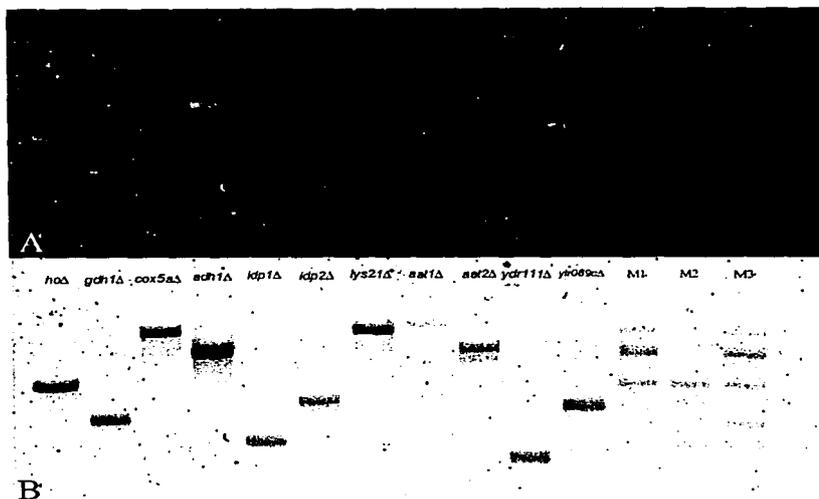


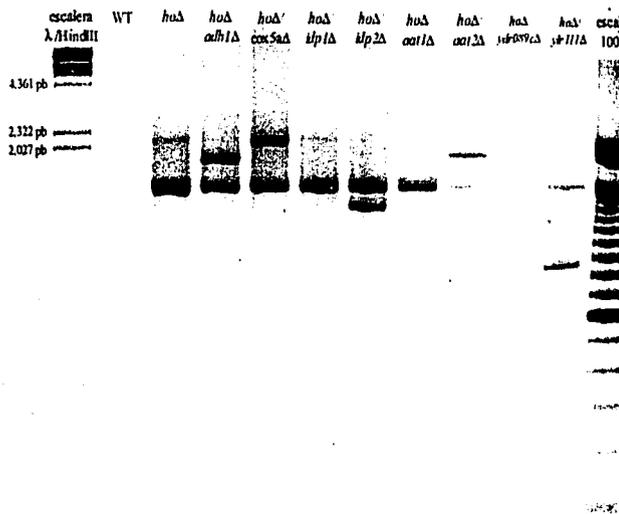
Figura 17. Separación electroforética de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio al 0.1% en el que se corrieron los productos de PCR que identifican a cada mutante. Las bandas en cada carril corresponden al producto de PCR amplificado con el ADN genómico y el oligonucleótido 3' - 5' pertinentes. En los carriles M1, M2 y M3 se corrió una mezcla de los productos de PCR de *cox5aΔ-adh1Δ-ydr111Δ-yf089cΔ-hoΔ*; *idp1Δ-idp2Δ-aat1Δ-aat2Δ-ho*; *gdh1Δ-lys20Δ-adh1Δ-idp1Δ-hoΔ*, respectivamente amplificado por separado. El panel A muestra la imagen digitalizada del gel como se ve en un transiluminador de luz UV. El panel B muestra la imagen digitalizada del gel como se observa en el *phosphorimager* (*Typhoon*, Molecular Dynamics).

lectura en el *Phosphoimager* (*Typhoon*, Molecular Dynamics). En los carriles marcados como M1, M2 y M3 se muestran tres mezclas distintas de productos de PCR de las cepas *cox5aΔ/adh1Δ/ydr111Δ/ylr089cΔ/hoΔ*; *idp1Δ/idp2Δ/aat1Δ/aat2Δ/ho* y *gdh1Δ/lys20Δ/adhΔ/idp/Δ/hoΔ* respectivamente, amplificadas de manera independiente. Aquellas cepas que no se observan en este experimento pero que se mencionan en el apartado de la Estrategia Experimental fueron eliminadas por no haberse logrado su amplificación por PRC o dar productos inespecíficos.

Una vez obtenidos los productos de PCR en cantidades semejantes para cada una de las cepas, se realizó una calibración en la que se hizo una mezcla de ADN genómico de la cepa *hoΔ* (que será utilizada como referencia silvestre) con el resto de las cepas en proporciones semejantes, sobre la que se corrió una reacción de PCR con los oligonucleótidos pertinentes (Figura 18). En el panel A se aprecia la imagen digitalizada del gel donde se corrieron los productos de PCR, se puede observar que no se obtuvieron productos para todas las reacciones aún cuando en el experimento anterior sí se obtenían productos para todas las reacciones. Lo anterior indica que la amplificación no es igual de eficiente cuando se usa una mezcla de oligonucleótidos para amplificar más de una secuencia de manera simultánea. Por otro lado, se observa que los productos de PCR corresponden a los tamaños esperados, por lo que resulta simple identificarlos.

Para cuantificar las diferencias entre cada producto de PCR se recurrió al tipo de gráfica mostrado en la Figura 18B, donde se observa el perfil de corrimiento de cada carril del gel; cuantificar cada producto de PCR se obtiene el área bajo cada una de las curvas. Es claro

A



B

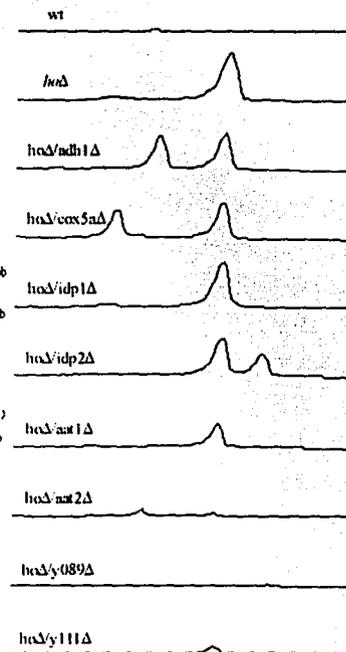


Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos a partir de las mezclas de ADN genómicos que se indican. Para la amplificación se usó una mezcla proporcional de ADN genómico de las cepas que se indican, junto con el oligonucleótido U2 (3' → 5' universal) limitante y el 5' → 3' específico para amplificar sobre los ADN genómicos en cuestión. Las gráficas del panel B muestran el perfil de corrimiento de cada carril del gel. La forma de cuantificar el producto de cada reacción es mediante el cálculo del área bajo la curva de cada pozo.

que las combinaciones que involucran ADN genómicos de las cepas *idp1Δ*, *aat1Δ*, *aat2Δ*, *ydr111Δ* y *ylr089cΔ* no permiten cuantificar diferencias entre ellas y la referencia (cepa *hoΔ*) ya sea porque los productos de PCR son muy escasos y no permiten separarlos del fondo o bien porque la reacción sólo produce uno de los dos productos esperados.

A partir de este punto los experimentos que se realizaron estuvieron enfocados a determinar si con este método es posible cuantificar diferencias en las proporciones de ADN genómico. Para ello, se corrieron reacciones de PCR sobre mezclas de ADN genómicos (*hoΔadh1Δ*, *hoΔcox5aΔ*, *hoΔidp2Δ*) en las proporciones crecientes hacia *hoΔ* y se hicieron electroforesis en gel por triplicado de los productos obtenidos.

La Figura 19A muestra la electroforesis de los productos del PCR realizado sobre los genómicos *hoΔadh1Δ*, en donde puede verse que se presentan las dos bandas esperadas y que éstas se separan adecuadamente. El panel B muestra la gráfica de los datos obtenidos con el perfil de corrimiento del gel; existe una tendencia lineal de los datos observados con respecto a los esperados, con desviaciones estándar pequeñas. De los datos obtenidos en este experimento se puede deducir que las diferencias entre los ADN genómicos de esta mezcla son cuantificables perdiéndose un poco la resolución a proporciones mayores de *hoΔadh1Δ*.

El la Figura 20 se observa la electroforesis de los productos del PCR realizado sobre los genómicos *hoΔcox5aΔ*. En este caso, también se observa un comportamineto lineal entre los valores observados y los esperados. Sin embargo, a bajas proporciones de *hoΔ* con res-

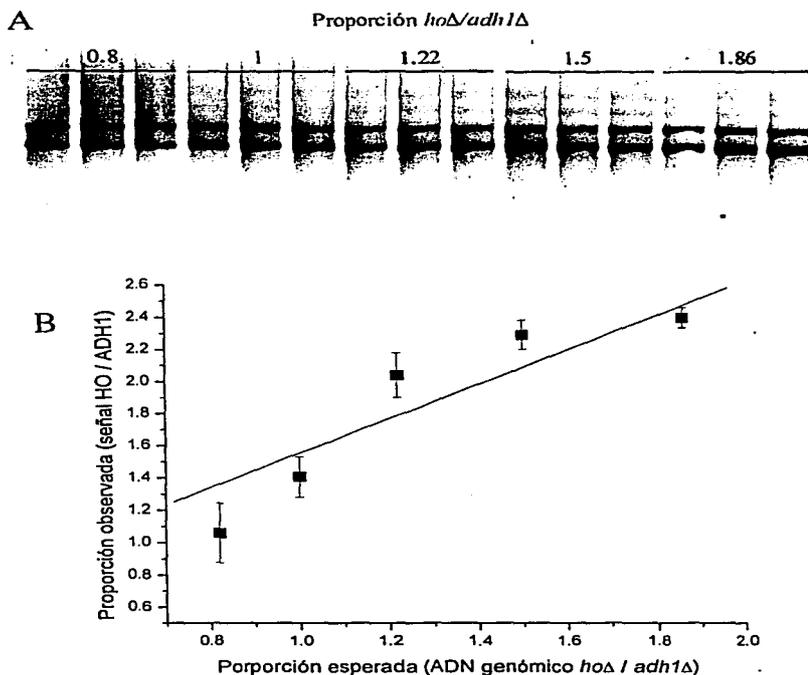


Figura 19. Cuantificación de los productos de PCR amplificados sobre una mezcla de ADN genómicos de *hoΔadh1Δ*. El ADN molde para todos las PCR fue una mezcla en distintas proporciones (indicada en el panel A) de ADN genómicos de *hoΔadh1Δ*. La gráfica del panel B muestra la relación entre las proporciones esperadas por la mezcla de ADN genómico y la obtenida en el PCR.

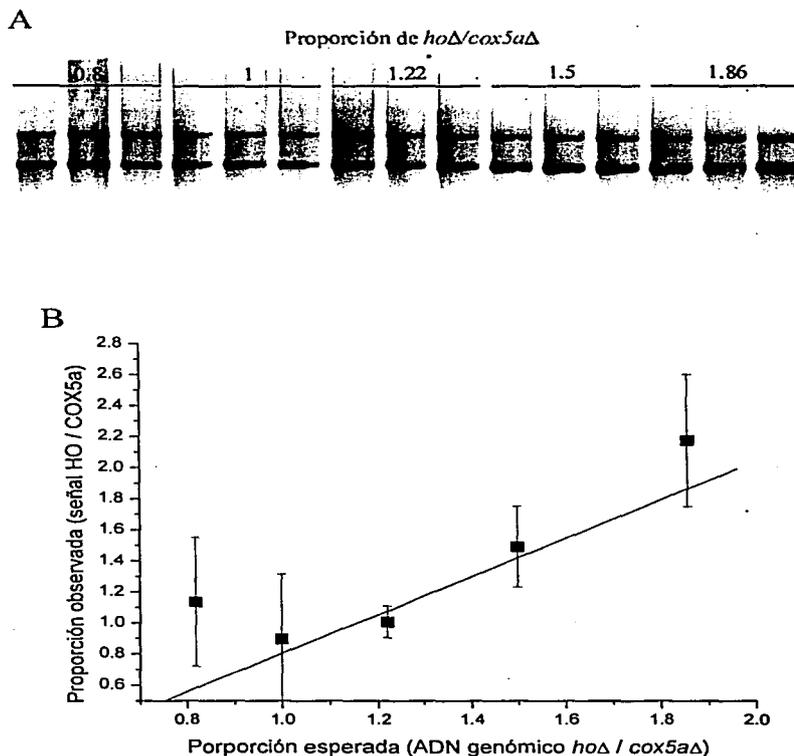


Figura 20. La imagen superior muestra un gel en el que se corrieron por triplicado 5 productos de PCR. El ADN molde para todos las PCR fue una mezcla en distintas proporciones (indicada en la figura) de *hoΔ/cox5aΔ*. La gráfica muestra la relación entre las proporciones esperadas por la mezcla de ADN genómico y la obtenida en el PCR.

pecto a *cox5aΔ*, la linealidad se pierde. Este error puede atribuirse a que la señal de *cox5aΔ* es menor que la *hoΔ* en cantidades similares (proporción = 1).

El tercero de los experimentos de calibración mencionados se realizó utilizando como molde para el PCR los ADN genómicos de *hoΔ/idp2Δ* (Figura 21). Los datos obtenidos no permiten observar una correlación lineal entre las cepas, situación atribuible a la baja señal en algunos carriles. Un segundo problema presentado por este experimento fue la poca separación que alcanzaron las bandas, lo que dificulta su cuantificación pues en el perfil de corrimiento ambas curvas se llegan a traslapar. El caso del dato correspondiente a la proporción 1.22 de *hoΔ/idp2Δ* se explica por un error en el PCR pues la banda correspondiente a *idp2Δ* (Panel A) es muy baja en intensidad. El error en la proporción 0.8 es probablemente una combinación entre una reacción de PCR defectuosa y un efecto donde la señal se separa de la tendencia lineal que se espera. En este caso, el error probablemente se debe a que se está llegando al límite de resolución de la técnica, como en el experimento anterior (Figura 20).

Finalmente se llevó a cabo un experimento en que se preparó una reacción de PCR sobre la combinación de los ADN genómicos de las cinco cepas correspondientes a la mezcla 1 (*hoΔcox5aΔadh1Δ/idp1Δ/idp2Δ*). Para lograr un mejor reflejo de las condiciones experimentales, esta prueba se realizó mezclando cantidades equivalentes de células correspondientes a cada cepa, obteniéndose el ADN genómico en una sola extracción. La Figura 22 muestra la imagen digitalizada del gel de agarosa al 2% donde se corrió por triplicado una muestra de dicho producto de PCR. El perfil de corrimiento mostrado en el

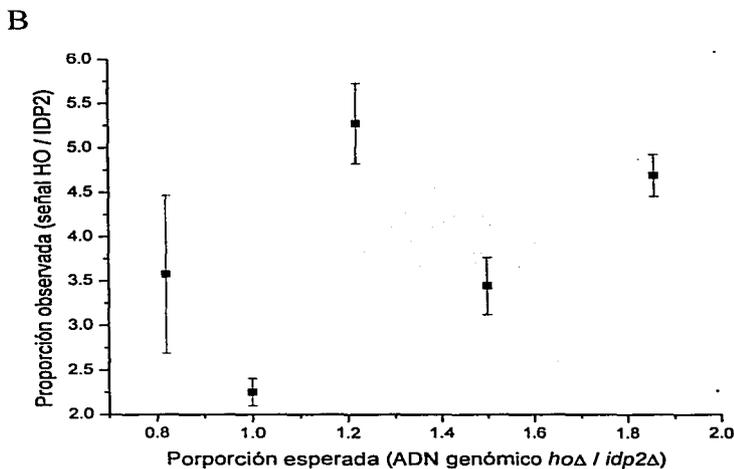
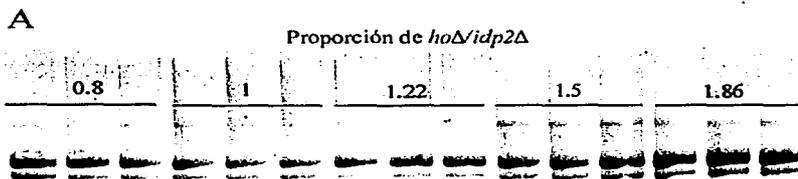


Figura 21. La imagen superior muestra un gel en el que se corrieron por triplicado 5 productos de PCR. El ADN molde para todos las PCR fue una mezcla en distintas proporciones (indicada en la figura) de *hoΔ/idp2Δ*. La gráfica muestra la relación entre las proporciones esperadas por la mezcla de ADN genómico y la obtenida en el PCR.

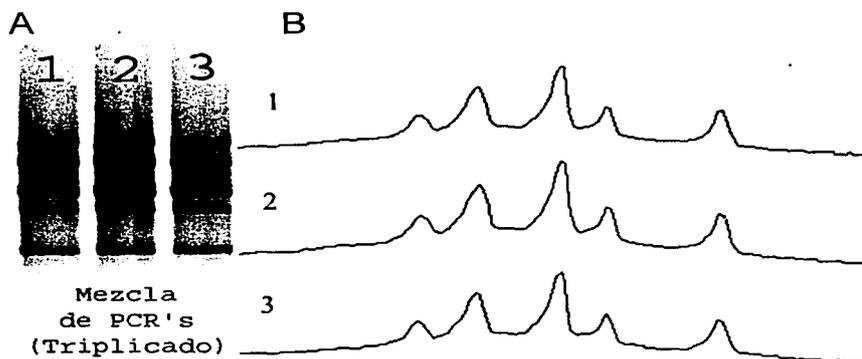


Figura 22. Imagen de la electroforesis del producto de PCR de una mezcla de ADN genómicos. La imagen del panel A muestra el corrimiento por triplicado de producto de PCR amplificado sobre una mezcla compuesta por ADN genómico de *hoΔ-cox5aΔ-adh1Δ-idp1Δ-ldp2Δ* en las mismas proporciones. La gráfica del panel B muestra el perfil de corrimiento de cada carril del gel. Puede observarse que los cinco productos se amplifican simultáneamente y se separan adecuadamente.

panel B de la misma figura sugiere que es posible identificar las marcas identificar las marcas de las cinco cepas de levadura mediante este método.

Este método de cuantificación es funcional y confiable; refleja diferencias en porciones de ADN genómico mayores a 0.8 y menores a 1.5 con referencia a la cepa *hoΔ*. Esta resolución es suficiente para seguir el comportamiento de una mutante, es decir, si aumenta o disminuye su presencia relativa a la silvestre. Sin embargo, la técnica presenta una limitante principal: no permite observar el comportamiento de más de cinco cepas por reacción de PCR. Ahora bien, esto no limita en ningún sentido la cantidad de cepas que se coloquen a competir en un experimento que involucre cultivos mixtos.

Como se muestra hasta ahora, la cuantificación por PCR presenta varias ventajas sobre la hibridación en membrana para conocer las proporciones de las cepas que componen a un cultivo mixto. Además es importante considerar que para este método no hay necesidad de manejar radiactividad, y que éste involucra menos pasos de manipulación del ADN genómico y, por lo tanto, menos puntos críticos para la cuantificación.

Conclusiones y perspectivas :

1. Los cultivos seriales en medio YPD son una manera de observar el comportamiento de mutantes *S. cerevisiae* crecidas durante varias cientos de generaciones. Esto permite amplificar el posible efecto de dichas mutaciones y, por lo tanto, conocer fenotipos que de otra forma no serían reconocibles.
2. La técnica de réplica de placas permite cuantificar de forma reproducible las diferencias entre dos cepas en competencia en un cultivo mixto. Presenta, sin embargo, una limitación principal: no es posible seguir el comportamiento de más de dos cepas de levadura, debido a que una de ellas debe tener una de seleccionarse. La confiabilidad estadística de la técnica se incrementa conforme se hagan repeticiones de los experimentos.
3. No es recomendable utilizar el método de hibridación en membrana para la cuantificación de diferencias entre cepas de levadura en cultivos mixtos. La naturaleza del método no permite dar información confiable acerca del comportamiento de las poblaciones, debido principalmente a las diferencias de hibridación de los Tags moleculares de 20 bases. Sin embargo el método funciona para algunos Tags, como aquellos de las mutantes *gdh1Δ* y *gdh3Δ*.

4. El PCR con oligonucleótidos individualizados es una técnica confiable para la detección de diferencias entre las poblaciones de levaduras en experimentos de competencia, sobre todo las proporciones se encuentran abajo de 1.5 entre ellas. La principal limitante de la técnica es que no se pueden cuantificar más de cinco cepas por reacción de PCR, aunque esto no limita el número de cepas que pueden crearse en un cultivo mixto.

Es necesario continuar con los trabajos que lleven a terminar de poner a punto esta metodología con el fin de cuantificar diferencias en ADN genómico de todas las mutantes cuya adecuación se pretende estudiar.

Como perspectiva inmediata de este trabajo se plantea realizar los experimentos de PCR cuantitativo aprovechando la porción 3' del modulo *KanR*, para tener un duplicado interno al experimento e intentar solucionar los problemas que se presentaron al realizar el experimento sobre el extremo 5' del mismo.

Bibliografía citada

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., Garland Science, USA.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. 4th ed, John Wiley & Sons, USA.
- Baganz, F., Hayes, A., Marren, D. Gardner, D.C.J., and Oliver, S. (1997) Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**:1563-1573.
- Baganz, F., Hayes, A., Farquhar, R., Butler, P.R., Gardner, D.C.J., and Oliver, S. (1998) Quantitative analysis of yeast gene function using competition experiments in continuous culture. *Yeast*, **14**:1417-1427.
- Delnieri, D. Brancia, F.L., and Oliver, G.S. (2001) Towards a truly integrative biology through the functional genomics of yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**:87-91.
- DeLuna A., Avendaño A., Riego L. and González, A. (2001) NADP-Glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **276**:43775 - 43783.
- De Luna A. (2002) Redundancia génica en *Saccharomyces cerevisiae*: Estudio bioquímico y fisiológico de las glutamato deshidrogenasas anabólicas. Tesis doctoral, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México.
- Dickinson, J.R. (1999a) Carbon metabolism. In: *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson, J.R., and Schweizer, M., eds.), Taylor and Francis, Londres.
- Dickinson, J.R. (1999b) Nitrogen metabolism. In: *The Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson, J.R and Schweizer, M., eds.), Taylor and Francis, Londres.
- Dujon, B. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.*, **12**:263-270.
- Feldmann, H. (2000) Génolevures – a novel approach to “evolutionary genomics” (Editorial), *FEBS Lett.*, **487**:1-2.
- Friedman, R. and Hughes, A.L. (2001) Gene duplication and the structure of eukaryotic genomes. *Genome Res.*, **11**: 373-381.
- Futuyma, D. J. (1986) *Evolutionary biology*. 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., USA.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Gould, S.J., y Vrba, E.S. (1998) Exaptation- a missing term in the science of form. *In: Philosophy of Biology* (Hull, D.L. and Ruse M., eds.), Oxford University Press, New York, USA.
- Kaback, D. (1991) Yeast genome structure, *In: The Yeasts*, Vol. 6 (Rose A.H., Wheals, A.S., and Harrison, J.S., eds.), Academic Press.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., and Nakaya, A. (2002) The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.*, **30**:42-46
- Kumar, A., and Snyder, M. (2001) Emerging technologies in yeast genomics. *Nat. Genet.*, **2**:302-312
- Kwast, K., Burke, P. and Poyon R. (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.*, **201**:1177-1195.
- Li, W.-H and Graur, D. (1991) *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Liu, Z. and Butow, R., (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.*, **19**:6720-6728.
- Llorente, B., Durrens, P., Malpertuy, A., Aigle, M., *et al.* (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **487**:122-133.
- Lynch, M. J., and Conery, S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicated genes. *Science*, **290**: 1151-1155.
- Mewes, H.W., Albermann, M., Bähr, D., Frishman, A., Gleissner, J., Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S.G. Oliver, F. Pfeiffer and Zollner, A. (1997) Overview of the yeast genome, *Nature*, **387**(suppl):7-8.
- Møller K., Olsson, L., and Piškur, J. (2001) Ability for anaerobic growth is no sufficient for development of the petite phenotype in *Saccharomyces kluyveri*. *J. Bacteriol.*, **183**:2485-2489.
- Olson, M.V. (1991) Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Vol. 1 (Broach, J., Pringle J.R. and Jones, E.W., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Petrov, D. (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.*, **17**:23-28.
- Piškur, J. (2001) Origin of duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.*, **17**: 302-303.

- Sambrook, J., and Russell, D. (2001), *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Segoighe, C., and Wolfe K. (1999) Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opin. Microbiol.*, 2:548-554.
- Shoemaker, D.D., Devla, A.L., Morris, D., Mittmann, M., and Davis, R.W. (1996) Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat. Genet.*, 14:450-456.
- Skrabeneck, L., and Wolfe K. (1998) Eukaryote genome duplication – where's the evidence? *Current Opin. Genet. Develop.*, 8: 694-700.
- Thatcher, J., Janet S., and Dickinson, W. (1998) Marginal fitness contributions of nonessential genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:253-257.
- Wagner A. (1998) The fate of duplicated genes: loss or new function? *BioEssays*, 20: 785-788.
- Wagner A. (2001) Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eukaryotes. *Trends Genet.*, 17:237-239.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, S.W. Argetsinger, J., and Mciner, A. (1987) *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., USA.
- West-Eberhard, M.J. (1998) Adaptation: current usages. In: *Philosophy of Biology* (Hull, D.L. and Ruse M., eds.), Oxford University Press, New York, USA.
- Wolfe, K., and Shields, D. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387:708-713.
- Wolfe, K. (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 333-341.
- Zeyl, C. (2000) Budding yeast as a model organism for population genetics. *Yeast*, 16:773-776.
- Zuckerandl, E. (1997) Junk DNA and sectorial gene repression. *Gene*, 204: 323-343.