



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de interacciones epistáticas en red de
desarrollo de *Myxococcus xanthus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

PRESENTA:

Héctor Arturo Hernández González

TUTORA

Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Ciudad Universitaria, D.F. Octubre, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno

Hernández
González
Héctor Arturo
56 31 19 76
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
307231990

2. Datos del tutor

Dra.
Ana Elena
Escalante
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Mariana
Benítez
Keinrad

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Enrique
Scheinvar
Gottdiener

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4

Lic. en C. G.
Juan Antonio
Arias
Del Ángel

7. Datos del trabajo escrito

Análisis de interacciones epistáticas
en red de desarrollo
de *Myxococcus xanthus*.
131 p.
2015

*A mi madre,
la culpable de mi amor a la ciencia.
¡Lo logramos ma!*

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi familia, por el amor y el apoyo que me ha brindado durante toda mi vida, los amo, este logro no hubiera sido posible sin ustedes.

A mis padres, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, los amo con toda mi alma. Muchas gracias por educarme y no permitirme vivir en el oscuro mundo de la ignorancia.

A Osmar y Ulises, mis dos increíbles hermanos. Gracias por todas esas memorias de la infancia, las recuerdo con mucho amor y las llevo en un lugar muy especial en mi corazón. También, muchas gracias por aguantarme, por todos sus consejos y enseñanzas.

A la Dra. Ana Escalante Hernández, agradezco que aceptara ser mi tutora de tesis, su conocimiento, experiencia, enseñanzas y consejos, todo me ha servido como guía e influenciado para bien mi formación como biólogo, muchas gracias en verdad. También, por apoyarme y aconsejarme en la continuación de mis estudios a nivel de posgrado.

A la Dra. Mariana Benítez Keinrad, por apoyarme gran cantidad de veces en la búsqueda de oportunidades académicas. Le agradezco que haya aceptado ser una de mis sinodales y las invitaciones a sus seminarios.

A Juan Arias, por todas esas charlas y horas de discusión; gracias por tu amistad, consejos y aceptar ser uno de mis sinodales.

A todos mis sinodales, por su amable paciencia y consejos que mejoraron la calidad de esta tesis.

A todos los profesores del taller de Biología Sintética, gracias por introducirme en ese maravilloso mundo; por las pláticas y la amistad.

A mis amigos: Bernardo, Alonso, Karla, Alfredo, Alberto, Daniel, Pamela, Jorge, Cecilia, Tetsuya, Saúl, Alejandro, Gabriela, Raiza, a Zaira y Chivis (aunque tenga tiempo sin verlas). A todos aquellos amigos que no nombré pero que me han apoyado no importando las circunstancias.

A la Facultad de Ciencias, por educarme y motivarme a “echar a volar la imaginación”. Nunca olvidaré mis años de estudiante en mi hermosa facultad.

A la biología, por salvar mi vida, desde ese día, cada día.

*Nada me ha dado mayor satisfacción en la vida
que arrebatarle sus secretos a la naturaleza.*

Resumen

El presente trabajo de tesis consiste en la identificación y análisis de interacciones epistáticas entre mutaciones *knockout* de cuatro proteínas Ser/Thr cinasas (PSTKs), que componen a una red génica involucrada en la regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *Myxococcus xanthus*.

El análisis de interacciones epistáticas fue llevado a cabo a través de 55 pruebas basadas en el modelo multiplicativo, el cual utiliza los valores de adecuación de diferentes cepas mutantes para medir desviaciones de los efectos independientes e interactuantes de las mutaciones. A partir de dichas pruebas, fue posible medir la magnitud de las interacciones ocurridas entre las mutaciones, así como relacionar cada interacción con un tipo de epistasis determinado. Entre los resultados más sobresalientes, se identificó que el tipo de epistasis predominante en la red de PSTKs es el antagonista, lo que podría estar generando un fenómeno de amortiguamiento que disminuya el efecto deletéreo de las mutaciones, permitiendo que el proceso de desarrollo de *M. xanthus* no se vea comprometido.

Por último, se contextualiza el papel que podría estar jugando la epistasis en la emergencia de nuevos fenotipos y, por lo tanto, en el proceso evolutivo.

Abstract

This thesis consists in the identification and analysis of epistatic interactions between *knockout* mutations of four Ser/Thr protein kinases (PSTK's), which compound a gene network involved in the regulation of the development of fruiting bodies and sporulation of *Myxococcus xanthus*.

The epistatic interactions analysis was accomplished through the implementation of 55 tests based on the multiplicative model, which use the fitness values of different mutant strains in order to measure deviations from the independent and interacting effects of the mutations. Using these tests, it was possible to measure the magnitude of the epistatic interactions occurred between the mutations, as well as relate each interaction with one specific type of epistasis.

Among the most outstanding results, it was possible to identify that the prevailing type of epistasis in the PSTK's network is the antagonistic, what could be buffering the deleterious effects of the mutations and allowing the developmental process of *M. xanthus* not to be jeopardized.

Finally, it was contextualized the role that epistasis could be playing in the emergence of new phenotypes and, therefore, in the evolutionary process.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Epistasis: antecedentes.	4
1.1.1. Fondo genético.	6
1.1.2. Epistasis, valor de adecuación y selección natural.	6
1.1.3. Tipos de interacciones epistáticas.	8
1.1.4. Presencia de epistasis en sistemas biológicos.	12
1.2. Análisis de interacciones epistáticas.	12
1.2.1. El modelo inicial.	12
1.2.1.1. Análisis de interacciones epistáticas hoy en día.	13
1.2.1.2. Modelo aditivo y modelo multiplicativo.	16
1.3. Justificación del uso del modelo multiplicativo.	19
1.4. Características generales de las mixobacterias.	21
1.4.1. <i>Myxococcus xanthus</i> , una mixobacteria muy especial.	22
1.5. Clasificación taxonómica.	24
1.6. Ciclo de vida de <i>Myxococcus xanthus</i>	26

1.6.1. Fase vegetativa.	27
1.6.2. Fase de desarrollo.	27
1.7. Mecanismos de señalización durante la fase de desarrollo de <i>M. xanthus</i>	30
1.7.1. Transducción de señales.	34
1.8. Proteínas cinasas en la regulación del desarrollo de <i>M. xanthus</i>	35
2. Objetivos	38
3. Hipótesis	39
4. Métodos	40
4.1. Obtención de las cepas mutantes de la red de PSTKs asociada con la regulación del desarrollo de <i>M. xanthus</i>	40
4.2. Determinación de los valores de adecuación de cada cepa mutante.	42
4.3. Análisis de interacciones epistáticas.	45
4.3.1. Descarga e instalación de los programas utilizados.	47
4.3.2. Funcionamiento general del programa <i>fitness.m2</i>	47
4.3.3. Codificación y procesamiento de datos.	48
4.3.4. Resultados obtenidos por el programa <i>fitness.m2</i>	49
4.3.5. Decodificación y clasificación de las pruebas propuestas.	51
4.3.6. Reordenamiento de variables.	52
4.3.7. Sustitución de los valores de adecuación y aplicación de operaciones. . .	54
4.3.8. Determinación de significancia estadística.	55

5. Resultados	57
5.1. Generación de pruebas y determinación del tipo de epistasis encontrado. . . .	57
5.2. Determinación de la significancia estadística de la epistasis encontrada. . . .	64
5.3. Análisis gráficos.	65
5.4. Interpretación de pruebas y emergencia de patrones.	70
6. Discusión	75
6.1. Recapitulación del proyecto y de los resultados.	75
6.2. Presencia de epistasis en la red génica de <i>Myxococcus xanthus</i>	76
6.3. Interpretación de la epistasis.	78
6.4. Papel del fondo genético en la determinación del fenotipo.	80
6.5. Patrones emergentes del análisis de interacciones epistáticas en la red de PSTKs y contextualización biológica.	84
6.6. Importancia de la epistasis en el proceso evolutivo.	87
6.7. Análisis de epistasis unidimensional.	91
6.8. Discusión del método.	93
6.9. Perspectivas.	96
7. Conclusiones	99
A. Sistemas de movilidad de <i>M. xanthus</i>	101
B. Tabla de comparación de pruebas	103

C. Patrones emergentes de las 55 pruebas	114
D. Análisis comparativo de las magnitudes de epistasis al utilizar medias o medianas	115
Bibliografía	119

Capítulo 1

Introducción

¿Por qué los seres vivos presentan diferentes características físicas, incluso entre aquellos de una misma especie?, ¿cuáles son las reglas de la naturaleza, en caso de haberlas, detrás de la determinación de estas características? Éstas han sido dos de las principales preguntas que se ha planteado la humanidad desde hace mucho tiempo, para las cuales aún no se tiene una respuesta absoluta.

En el siglo XIX, a partir de su investigación con plantas de chícharos, el monje Gregor Mendel postuló la existencia de factores hereditarios responsables de los rasgos que estaba estudiando. Hoy en día conocemos a estos factores hereditarios como genes. A través de sus experimentos con cruza monohíbridas, en las cuales se hereda un solo carácter (ej. altura del tallo de la planta de chícharo), se dio cuenta de que la herencia de cada gen puede asociarse con un rasgo específico (Snustad and Simmons, 2012).

La postulación del gen como base de la herencia biológica no fue la única gran aportación de Mendel. También, observó que cada gen puede tener dos formas alternativas, a las que denominó alelo dominante y alelo recesivo. Estas observaciones dieron lugar a las primeras reglas de la herencia, llamadas “Leyes de Mendel”, las cuales explican cómo y en qué proporciones se heredan ciertos caracteres en diferentes organismos (Snustad and Simmons, 2012). A principios del siglo XX, William Bateson y Reginald C. Punnett, fueron los primeros en

obtener evidencia de que un rasgo puede ser determinado por más de un gen, debido a la interacción entre éstos (Snustad and Simmons, 2012). También, se encontraron algunos casos en los que las proporciones de ciertos caracteres, al ser heredados, no coincidían con las proporciones propuestas por Mendel para cruza dihíbrida (cruza de organismos que se diferencian en dos rasgos); dichos casos fueron nombrados “extensiones de la herencia mendeliana”.

Posteriormente, en 1918, el biólogo evolutivo Ronald Fisher observó que no podía predecir fenotipos cuantitativos (rasgos o características que pueden ser medidos numéricamente (Snustad and Simmons, 2012)) de algunos dobles mutantes al simplemente sumar los valores fenotípicos de las respectivas mutantes simples (Fisher, 1918). A partir de esto, Fisher propuso que las interacciones entre los genes que dan lugar a fenotipos cuantitativos, y de éstos con el ambiente, debían de ser más complejas de lo que se creía.

Más adelante, en la segunda mitad del siglo XX, surgieron otras dos piedras angulares de la biología contemporánea: la dilucidación de las bases moleculares de la herencia, a través del descubrimiento de la estructura del DNA (Watson and Crick, 1953) y, posteriormente, la posibilidad de secuenciar todos los genes de un organismo, a través de lo que hoy conocemos como herramientas de la genómica (Kircher and Kelso, 2010).

No obstante que la secuenciación de genomas completos ha permitido conocer la materia informacional utilizada para la generación de diferentes fenotipos en la naturaleza, muchos de los secretos que guarda la relación entre el genotipo y el fenotipo permanecen sin ser develados (Venter et al., 2001).

Hoy en día, aún existen muchos factores que influyen en la determinación de los fenotipos de los seres vivos que van más allá del mero contenido genético y que no han sido estudiados a fondo. Uno de estos factores es la epistasis, un fenómeno que no ha sido comprendido del todo (Wolf et al., 2000).

A grandes rasgos, el término epistasis se refiere a la dependencia del efecto selectivo de una mutación con respecto al fondo genético en el que surge (Weinreich et al., 2005). A su vez, dicha dependencia generará desviaciones de los efectos mutacionales esperados (Cordell, 2002; Fisher, 1918; Phillips, 1998), como aquellas observadas por Ronald Fisher en 1918 (ver

Epistasia: antecedentes). Cabe señalar que el estudio de la epistasia es de suma importancia debido a su supuesta relación con diversos procesos biológicos, tales como la canalización de fenotipos (término acuñado por Conrad Waddington para referirse al amortiguamiento del genotipo contra variaciones en el ambiente o en la composición genética, permitiendo que el efecto de dicho genotipo en el desarrollo no se vea alterado (Futuyma, 2005; Waddington, 1942)), el origen y el mantenimiento de la reproducción sexual, la resistencia a antibióticos y el estudio de fenotipos complejos (Wolf et al., 2000), por mencionar algunos.

Los fenotipos complejos son aquellos cuya expresión es producto de interacciones complejas entre un gran número de factores genéticos y no genéticos (Marian, 2012). Por interacciones complejas debe entenderse que los componentes y factores que dan lugar a dichos fenotipos no interactúan uno a uno e incluso lo hacen de manera no lineal (Alberch, 1991). Debido a esto, es muy difícil predecir el efecto que un grupo de genes bien descritos puede tener en el fenotipo. De esta forma, con la finalidad de hacer predicciones más cercanas de los fenotipos de los individuos a partir de un conjunto determinado de genes, es de vital importancia tener un mayor entendimiento de la epistasia y los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo (Lehner, 2011).

El estudio del origen de fenotipos complejos se ha valido de modelos experimentales de fácil manipulación, entre ellos: *Arabidopsis thaliana* (Meinke, 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (Botstein and Fink, 2011), *Drosophila melanogaster* (Rubin, 1988), *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974), incluso, bacterias con fases de desarrollo en su ciclo de vida tales como la mixobacteria *Myxococcus xanthus* (Whitworth, 2008). Es importante hacer notar que una ventaja de trabajar con organismos modelo es que, en muchos de los casos, se conocen por completo sus secuencias genómicas. A su vez, esto permite que la manipulación de los genes de estos organismos (en caso de ser posible) sea rastreable y, por lo tanto, que sus efectos en las características fenotípicas puedan ser medidos (Păcurar, 2009). Tal es el caso de *M. xanthus*, organismo ampliamente estudiado, del cual existe vasta información de sus aspectos genéticos (Chen et al., 1990; Goldman et al., 2006; Müller et al., 2013; Whitworth, 2008), moleculares (Muñoz-Dorado et al., 1991; Ellehauge et al., 1998; Whitworth, 2008; Nariya and Inouye, 2006, 2002, 2003, 2005), fisiológicos (Sliusarenko et al., 2007; Lux and Shi, 2005;

McBride, 2001; Dworkin, 1962; Whitworth, 2008) y ecológicos (Dawid, 2000; Reichenbach, 1999; Shimkets et al., 2006; Whitworth, 2008; Wu et al., 2007). La vasta cantidad de información sobre *M. xanthus*, aunada al hecho de que es un organismo que presenta un ciclo de vida complejo (ciclo de vida que incluye cambios ontogenéticos abruptos en la morfología, fisiología y comportamiento de un individuo, usualmente asociado con cambios en el hábitat (Wilbur, 1980)), vuelve a esta bacteria un organismo ideal para el estudio de fenotipos complejos y los mecanismos que subyacen tras dichos fenotipos, tales como la epistasis.

1.1. Epistasis: antecedentes.

En 1909 William Bateson acuñó el término de epistasis (Bateson, 1909). A lo que Bateson se refería al hablar de epistasis era a un fenómeno de enmascaramiento del efecto de un gen en presencia de otro. Por esta razón, en presencia del gen enmascarador o epistático, el gen enmascarado o hipostático no es expresado en el fenotipo, provocando que, en algunos casos, las proporciones mendelianas no se cumplan (Snustad and Simmons, 2012).

Más adelante, en 1918, el biólogo evolutivo Ronald Fisher, introdujo otra definición de epistasis (Fisher, 1918). Fisher estaba interesado en el estudio de los rasgos cuantitativos de los organismos a través de la rama de la biología llamada genética cuantitativa. A partir de varios de sus experimentos, se percató de que no podía predecir fenotipos cuantitativos de algunos dobles mutantes al simplemente sumar los valores fenotípicos de las respectivas mutantes simples. Fisher llamó a estas desviaciones de los efectos aditivos de los genes “epistacias” (Fisher, 1918; Phillips, 2008). Por esta razón, se puede decir que la definición de Fisher se encuentra basada en las diferencias cuantitativas entre los fenotipos.

Debido a que las epistacias de Fisher se referían a alguna clase de interacción entre genes, al igual que la epistasis de Bateson, la palabra epistacia fue confundida y remplazada por la palabra epistasis. De esta forma, la palabra epistasis puede referirse a dos fenómenos completamente diferentes (Cordell, 2002), lo cual puede generar confusiones fácilmente.

Incluso hoy en día, la palabra “epistasis” puede significar cosas diferentes para personas di-

ferentes, tal y como Edmund E. Brodie III explica en el primer capítulo del libro “Epistasis and the evolutionary process” (Wolf et al., 2000).

A continuación se enlistan los tres principales usos que se le han dado a la palabra epistasis, según Phillips (Phillips, 2008):

1. Epistasis funcional. Se refiere a las interacciones entre proteínas u otras estructuras moleculares (loci) que componen a la misma o a diferentes rutas metabólicas. Phillips recomienda evitar el uso de epistasis en este sentido y sustituirlo por el concepto de interacciones proteína-proteína, con la finalidad de evitar mayores confusiones.

2. Epistasis composicional. Este término corresponde al uso tradicional de la palabra epistasis y se refiere al bloqueo del efecto de un alelo por un alelo de otro locus. Debido a este efecto supresor de un alelo sobre otro, la única forma de ver el efecto del alelo reprimido es sustituyendo combinatoriamente un alelo por otro bajo un fondo estándar. La epistasis composicional describe la forma en la que los genotipos son ensamblados, o conformados, y la influencia que determinado fondo genético tiene sobre los alelos de interés.

3. Epistasis estadística. Este término se refiere a la desviación promedio de combinaciones de alelos de diferentes loci estimada a partir de todos los genotipos de la población. La epistasis estadística utiliza medidas cuantitativas de los fenotipos.

Los términos de epistasis estadística y epistasis composicional son complementarios, ya que la epistasis composicional mide los efectos de la sustitución alélica bajo un determinado fondo genético, mientras que la epistasis estadística mide el efecto promedio de la sustitución alélica bajo el fondo genético promedio de la población (Phillips, 2008).

A lo largo del presente trabajo de tesis se utilizará el concepto fisheriano de epistasis y, específicamente, el término *interacciones epistáticas* (a pesar de ser redundante) para referirse a las interacciones ocurridas entre mutaciones deletéreas bajo determinados fondos genéticos. A la vez, debe entenderse por fondo o ambiente genético al conjunto de genes que pudieran estar interactuando con el locus o loci de interés y que potencialmente podrían tener influencia sobre un fenotipo específico (Yoshiki and Moriwaki, 2006). Cabe señalar que

debido a que las mutaciones utilizadas en este trabajo no generan ningún producto génico, la interacción entre loci será simbólica y no física, es decir, dicha interacción solamente se verá reflejada en los efectos que tengan las mutaciones sobre el fenotipo y no en una interacción inter-molécula.

1.1.1. Fondo genético.

En párrafos anteriores, fue dada una idea general del concepto de fondo genético. Debido a la importancia de este término para el presente análisis de interacciones epistáticas, es pertinente ahondar en su definición.

El fondo genético de cualquier organismo puede ser considerado como el conjunto de genes que componen su genoma (Yoshiki and Moriwaki, 2006), sin embargo, en las investigaciones que están enfocadas en el estudio de determinado número de genes, el “fondo genético” puede ser definido como el genotipo que incluye a todos los genes de un genoma que pueden interactuar con el gen o los genes de interés y potencialmente influenciar el fenotipo en estudio (Yoshiki and Moriwaki, 2006). Debido a que los genes de interés, en presente trabajo, son cuatro proteínas Ser/Thr cinasas de la red de regulación involucrada en el desarrollo de cuerpos fructíferos y esporas de *M. xanthus*, el fondo genético solamente estará constituido de genes que componen a dicha red, la cual será explicada más adelante.

1.1.2. Epistasis, valor de adecuación y selección natural.

Es importante aclarar que debido a que la definición fisheriana de epistasis, utilizada en este trabajo, está enfocada en los efectos que tienen las mutaciones sobre fenotipos cuantitativos, dicha definición utiliza los valores de adecuación de los fenotipos como medida de magnitud de dichos efectos mutacionales. Por esta razón también es importante definir adecuación (W) como la capacidad que tiene un fenotipo de sobrevivir y reproducirse en un ambiente de-

terminado (Wu et al., 2013).

Debido a que el concepto de valor de adecuación (*fitness*) es algo central para la teoría de la evolución por selección natural, es a su vez relevante mencionar cuál es la relación entre esta fuerza evolutiva primordial y la epistasis.

La epistasis no es ajena a las principales fuerzas evolutivas: selección natural, mutación, deriva génica y flujo génico (Futuyma, 2005). Esto se debe a que, aunque la epistasis ayuda a mantener la variación genotípica (Hansen, 2013) no tiene la capacidad de generar este tipo de variación dentro de las poblaciones. Por esta razón, la epistasis necesita de material genético (genes, mutaciones, etc.), previamente establecido por el flujo génico o la mutación, para que pueda surgir. Por otro lado, la selección natural estará actuando sobre todos los productos de la epistasis. Por ejemplo: debido a que uno de los principales efectos de la presencia de epistasis es la generación de variación fenotípica y de los valores de adecuación de la población (Wolf et al., 2000), la selección natural actuará sobre dicha variación y fenotipos, seleccionando las mejores combinaciones de mutaciones.

A su vez, la epistasis también puede tener efectos sobre la selección natural, por ejemplo: puede generar cambios en la dinámica de la selección (Hansen, 2013), así como potenciar el efectos de las mutaciones, permitiendo que la selección natural moldee la distribución de las mutaciones (arquitectura genética) (Jones et al., 2014). Se ha propuesto que la epistasis es un concepto importante para la explicación de varias teorías evolutivas, como el surgimiento de la reproducción sexual y la recombinación (Kondrashov, 1988), la evolución de la ploidía (Kondrashov and Crow, 1991), la dominancia (Omholt et al., 2000), la acumulación de mutaciones deletéreas en poblaciones pequeñas (Kimura and Maruyama, 1966), canalización de fenotipos (Wagner et al., 1997), trayectorias evolutivas (Weinreich et al., 2005), la especiación (Wolf et al., 2000), evolución de complejos genéticos coadaptados (Wolf et al., 2000; Jones et al., 2014), robustez genética (Azevedo et al., 2006) y, en general, evolución de la arquitectura genética (Wolf et al., 2000; Hansen, 2013; Jones et al., 2014). Debido a que, como se mencionó en párrafos anteriores, la epistasis no es un mecanismo independiente de la selección natural, el papel que juega la epistasis y sus respectivos productos, en cada una de las teorías anteriores, se encuentra regulado por la selección natural.

1.1.3. Tipos de interacciones epistáticas.

Una vez establecida la definición de epistasis que se usará a lo largo del presente trabajo y la razón del uso de valores de adecuación para realizar el análisis de interacciones epistáticas, del que es objeto este proyecto de tesis, es importante mencionar los tipos de epistasis que surgen a partir de dicha definición.

Como se muestra en la figura 1.1, la epistasis puede ser dividida en dos grupos principales: epistasis de magnitud y epistasis de signo.

a) Epistasis de magnitud.

La epistasis de magnitud se refiere a aquellas interacciones entre mutaciones donde el efecto combinado de éstas se desvía del efecto multiplicativo independiente (efecto esperado), sin provocar cambios en el signo de la interacción (Kouyos et al., 2007; Weinreich et al., 2005; Poelwijk et al., 2011; Lalić and Elena, 2012; De Visser et al., 2011; Wolf et al., 2000). La epistasis de magnitud se divide en epistasis positiva y negativa (Kouyos et al., 2007; De Visser et al., 2011; Wolf et al., 2000). A su vez, tanto la epistasis positiva como la negativa, pueden ser de tipo sinérgicas (potenciadoras) y antagonistas (atenuadoras) (ver figura 1.1). Los efectos que cada uno de estos subtipos de epistasis tenga sobre el valor de adecuación de los genotipos portadores de las mutaciones que están siendo evaluadas, dependerá de las características de las mutaciones que están siendo analizadas, es decir, si las mutaciones en cuestión son benéficas o deletéreas.

La **epistasis positiva** se refiere a aquellas interacciones entre mutaciones (o genes) que tienen efectos benéficos sobre los valores de adecuación de los genotipos que las presentan. En caso de que las mutaciones en estudio sean de tipo benéficas, la epistasis positiva a través de una acción sinérgica, provocará que las mutaciones aumenten más la magnitud del valor de adecuación (W), en comparación con el efecto que tienen las mutaciones sobre dicho valor al actuar de manera independiente. Por otro lado, en caso de que las mutaciones en estudio sean de tipo deletéreas, la epistasis positiva, a través de una acción antagonista, provocará que

las mutaciones disminuyan menos la magnitud del valor de adecuación (W), en comparación con el efecto que tienen las mutaciones sobre dicho valor al actuar de manera independiente. En cualquiera de los casos antes mencionados, el valor de adecuación asociado a la interacción epistática (W_{ab}) siempre será mayor que el valor de adecuación asociado a la acción independiente de las mismas mutaciones ($(W_a)(W_b)$). En términos generales, para mutaciones en dos loci (a, b), la epistasis positiva puede ser representada matemáticamente a través de la siguiente desigualdad:

$$(W_{ab}) > (W_a)(W_b) \quad (1.1)$$

De forma contraria a la epistasis positiva, la **epistasis negativa** se refiere a aquellas interacciones entre mutaciones (o genes) que tienen efectos deletéreos sobre los valores de adecuación de los genotipos que las presentan. En caso de que las mutaciones en estudio sean de tipo benéficas, la epistasis negativa a través de una acción antagonista, provocará que las mutaciones aumenten menos la magnitud del valor de adecuación (W), en comparación con el efecto que tienen las mutaciones sobre dicho valor al actuar de manera independiente. Por otro lado, en caso de que las mutaciones en estudio sean de tipo deletéreas, la epistasis negativa, a través de una acción sinérgica, provocará que las mutaciones disminuyan más la magnitud del valor de adecuación (W), en comparación con el efecto que tienen las mutaciones sobre dicho valor al actuar de manera independiente.

En cualquiera de los casos antes mencionados, el valor de adecuación asociado a la interacción epistática (W_{ab}) siempre será menor que el valor de adecuación asociado a la acción independiente de las mismas mutaciones ($(W_a)(W_b)$). En términos generales, para mutaciones en dos loci (a, b), la epistasis negativa puede ser representada matemáticamente a través de la siguiente desigualdad:

$$(W_{ab}) < (W_a)(W_b) \quad (1.2)$$

b) Epistasis de signo.

La epistasis de signo se refiere a la situación en la que el efecto de una mutación en el valor de adecuación dependerá del fondo genético en el que se encuentre (Poelwijk et al., 2011; Weinreich et al., 2005). De esta forma, bajo determinado fondo genético, la mutación en cuestión tendrá efectos benéficos en el fenotipo, o aumento de la adecuación, mientras que bajo otro fondo genético la misma mutación puede tener un efecto opuesto.

El caso más extremo de la epistasis de signo es la llamada epistasis recíproca de signo. Este tipo de epistasis ocurre cuando dos mutaciones tienen efectos deletéreos al estar separadas pero al juntarse mejoran el valor de adecuación (Poelwijk et al., 2011).

Como se puede apreciar, las definiciones de epistasis anteriores están basadas en los efectos que las interacciones entre mutaciones tienen sobre el valor de adecuación de los organismos. Este tipo de epistasis es conocido como epistasis para la adecuación (*epistasis for fitness*) (Weinreich et al., 2005; Mani et al., 2008).

A pesar de que el presente trabajo está enfocado en el análisis de epistasis para la adecuación, es importante mencionar que pueden existir interacciones epistáticas cuyos efectos pueden no verse reflejados en el valor de adecuación pero sí en el fenotipo de los individuos. Tal es el caso de las interacciones epistáticas ocurridas entre loci que están involucrados en la determinación de fenotipos cualitativos (ej. el color de las flores) (Snustad and Simmons, 2012).

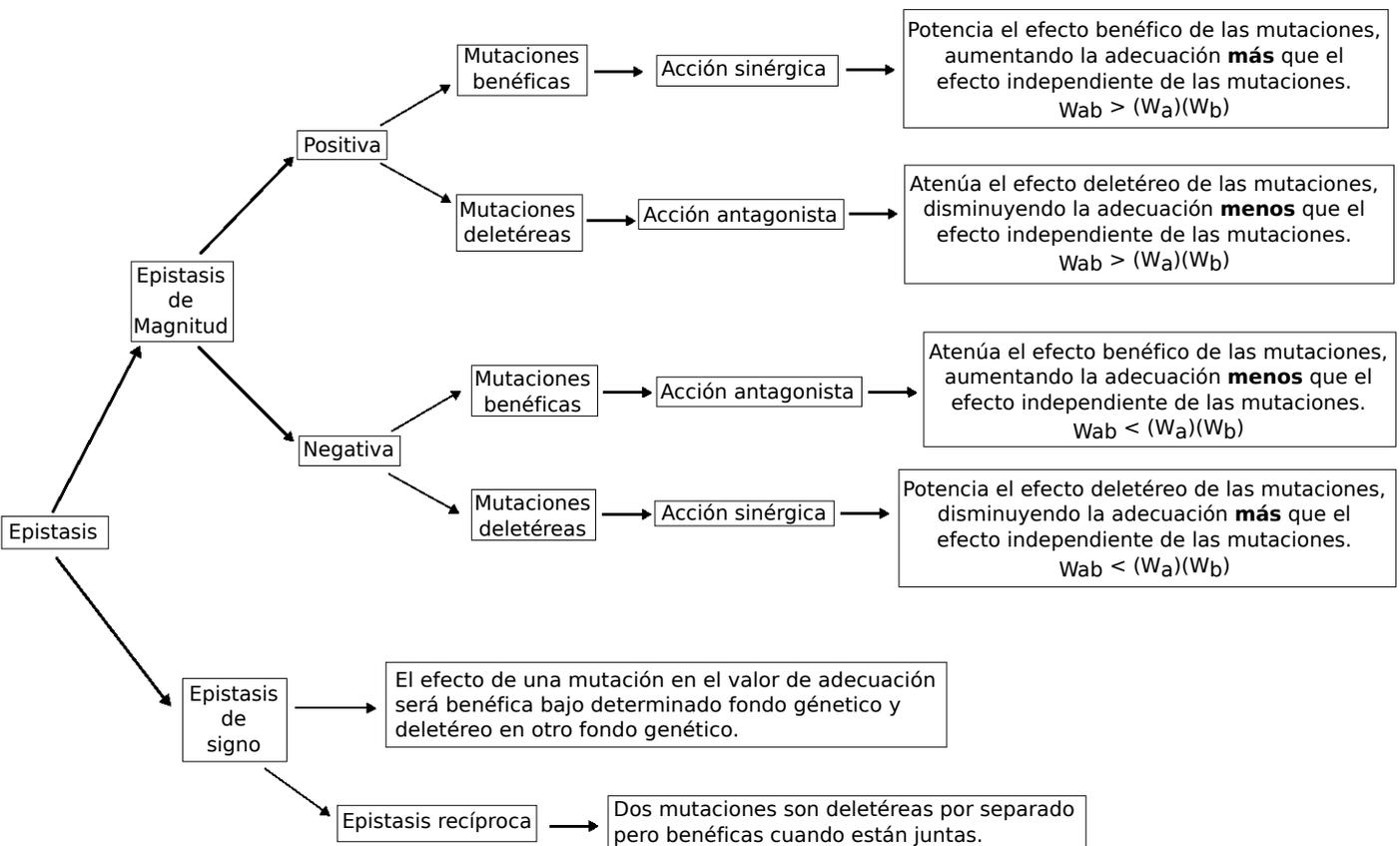


Figura 1.1: Tipos de epistasis (Lalic and Elena, 2012; Poelwijk et al., 2011; Weinreich et al., 2005; Wolf et al., 2000)

1.1.4. Presencia de epistasis en sistemas biológicos.

De acuerdo con algunos autores, la epistasis se presenta con frecuencia en sistemas biológicos y se encuentra ampliamente distribuida entre organismos de diferentes *phyla*, de hecho, sería extraño no encontrarla dada la naturaleza y complejidad de los procesos biológicos (Wolf et al., 2000; Whitlock et al., 1995). Por ejemplo, se ha identificado epistasis, a través de diferentes métodos (Kouyos et al., 2007) en organismos eucariontes como *Aspergillus niger* (De Visser et al., 1997) y *Chlamydomonas moewusii* (De Visser et al., 1997). Por otro lado, también se han identificado interacciones epistáticas en bacterias (Elena and Lenski, 1997; Maisnier-Patin et al., 2005; Zee et al., 2014) y virus (Bonhoeffer et al., 2004; Lalić and Elena, 2012; Sanjuán et al., 2004). Es importante destacar que solamente se encontró un estudio en la literatura que analiza el papel que juegan las interacciones epistáticas entre mutaciones adaptativas en la determinación de un rasgo fenotípico de *M. xanthus*, como es la formación de enjambres celulares (Zee et al., 2014).

1.2. Análisis de interacciones epistáticas.

1.2.1. El modelo inicial.

R. Fisher se refería al término epistasis desde un punto de vista de genética cuantitativa, como un concepto cercano a la interacción estadística, es decir, una desviación de un modelo lineal que describía la relación entre factores predictivos (Cordell, 2002). La relación de esos factores predictivos fue representada a través de un modelo donde los rasgos fenotípicos cuantitativos son generados por los efectos acumulados de muchos genes, más el efecto del ambiente.

El concepto cuantitativo de epistasis (utilizado en genética cuantitativa) es representado matemáticamente, a través del modelo aditivo lineal, de la siguiente forma (Wade et al.,

2001):

$$P = (b_x A + b_y B + b_{xy} AB) + e \quad (1.3)$$

Donde: b_x y b_y se refieren a los efectos promedio de los alelos en los loci A y B , en un fenotipo cuantitativo P ; b_{xy} se refiere al efecto de la interacción entre los loci x y y ; e representa la variación estocástica proveniente del ambiente o de loci no considerados.

Es importante señalar que el término P se refiere a cualquier fenotipo cuantitativo a partir del cual se quiera llevar a cabo el análisis de interacciones epistáticas, incluso, puede utilizarse la medida de adecuación (W) (Wade et al., 2001), como es el caso del presente trabajo.

1.2.1.1. Análisis de interacciones epistáticas hoy en día.

El concepto de adecuación ha sido central para el análisis de interacciones epistáticas. Dichos análisis han sido llevados a cabo con diferentes medidas de adecuación (Mani et al., 2008; Sanjuán et al., 2004). Por ejemplo, algunos estudios han utilizado como medida de adecuación la tasa de crecimiento exponencial en relación con la de la cepa silvestre (Elena and Lenski, 1997), incremento de la población mutante en relación con la población silvestre (Jasnos and Korona, 2007) y número de progenie por organismo mutante en relación con el número de progenie por organismo silvestre (Sanjuán and Elena, 2006).

Por otro lado, existen diferentes métodos para analizar las interacciones epistáticas entre loci utilizando la medida de adecuación como el fenotipo cuantitativo de interés. Kouyos et al. (2007) clasifican a los métodos básicos en tres categorías:

- I. Métodos que buscan epistasis determinando interacciones entre pares de loci a partir de la desviación del efecto independiente (multiplicativo o aditivo) de los loci o mutaciones involucradas.

II. Métodos que examinan grandes cantidades de mutaciones deletéreas en busca de una desviación de los valores lineales aditivos o multiplicativos de la adecuación en su forma logarítmica.

III. Métodos que comparan las distribuciones de adecuación parentales y de la progenie.

Como se puede ver en las gráficas de la figura 1.2, a pesar de que todos los métodos anteriores utilizan la medida de adecuación como el componente principal para el análisis de interacciones epistáticas, dichos análisis son llevados a cabo a diferentes niveles (multidimensional o entre loci, unidimensional o de adición de mutaciones simples y a través de las generaciones, respectivamente) y por lo tanto pueden tener diferentes interpretaciones. Por ejemplo, el primer método (figura 1.2 *a*) está enfocado en la búsqueda de epistasis a un nivel más fino, entre pares de mutaciones. Es importante mencionar que esta búsqueda puede extrapolarse a todas las interacciones posibles, es decir, $2n$ interacciones para un conjunto dado de n mutaciones, dando lugar a la llamada epistasis multidimensional (De Visser et al., 2011; Kondrashov and Kondrashov, 2001).

Por otro lado, el segundo método (figura 1.2 *b*) tiene como objetivo analizar cómo va disminuyendo el valor de adecuación al ir aumentando el número de mutaciones en el sistema, es decir, está más enfocado en el efecto acumulativo de las mutaciones sobre la adecuación. El tipo de epistasis analizada a través del segundo método recibe el nombre de epistasis unidimensional, direccional o epistasis promedio (De Visser et al., 2011; Kondrashov and Kondrashov, 2001). Por último, el tercer método (figura 1.2 *c*) compara distribuciones de adecuación parentales con las de la progenie. Para llevar a cabo este método es necesario cruzar organismos parentales que tengan un número diferente de mutaciones. Si la adecuación promedio de la progenie es menor o mayor que la adecuación promedio de los padres, entonces implica epistasis positiva o negativa (marcadas con flechas negras en la figura 1.2 *c*), respectivamente (Kouyos et al., 2007).

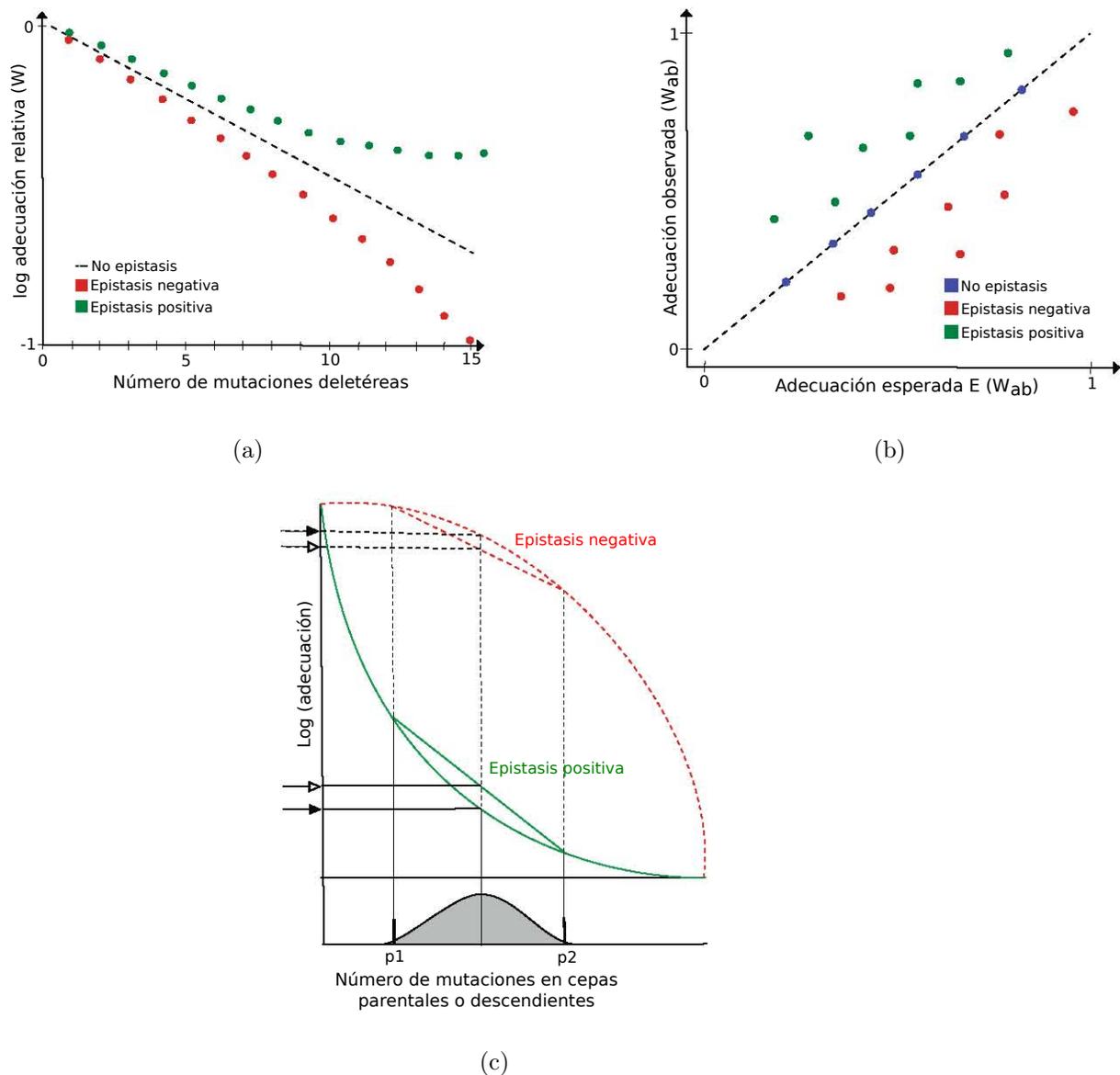


Figura 1.2: Representación gráfica de los métodos de análisis de interacciones epistáticas (modificado de (Kouyos et al., 2007)). a) Método 1: busca epistasis midiendo interacciones entre pares de loci a partir de la desviación del efecto independiente (multiplicativo o aditivo) de las mutaciones involucradas. b) Método 2: examina grandes cantidades de mutaciones deletéreas en busca de una desviación de los valores lineales aditivos o multiplicativos de la adecuación en su forma logarítmica. c) Método 3: compara las distribuciones de adecuación parentales (p_1 y p_2) y de la progenie (distribución en gris). Las flechas negras señalan los valores de adecuación correspondientes a casos de epistasis positiva y negativa, respectivamente, mientras que las flechas blancas señalan los valores de adecuación esperados.

Es importante mencionar que en el caso del primer método, la epistasis positiva y negativa se refieren a que el valor de adecuación de la doble mutante (W_{ab}) es más alto o más bajo que el valor de adecuación esperado, respectivamente (ver figura 1.2 *a*). En cambio, en los métodos dos y tres, los términos de epistasis positiva y negativa se refieren, respectivamente, a que la disminución del valor de adecuación se desacelera o acelera al ir aumentando el número de mutaciones (ver figuras 1.2 *b* y 1.2 *c*). Ambos conceptos de epistasis positiva y negativa son correctos y complementarios.

Debido a que el segundo método cuantifica sólo la epistasis promedio del sistema y el tercer método ha sido criticado por su falta de exactitud al determinar la significancia de la epistasis encontrada (West et al., 2006; Kouyos et al., 2007) en este trabajo se decidió utilizar el primer método para llevar a cabo los análisis de interacciones epistáticas (ver *Método*).

Es importante hacer énfasis en que todos los modelos descritos en esta sección consideran a las interacciones epistáticas como aquellas desviaciones a partir de un efecto esperado de las mutaciones involucradas pero a diferentes escalas, las cuales han sido mencionadas con anterioridad (Kouyos et al., 2007).

En este punto el lector probablemente se preguntará, ¿qué es el efecto esperado y cómo se representa? El efecto esperado representa al efecto de los genes cuando actúan de forma independiente, es decir, cuando no hay interacción epistática (líneas punteadas en las gráficas de la figura 1.2). Dicho efecto esperado puede ser representado a través de la suma de los efectos de las respectivas mutantes simples o a través de la multiplicación de los mismos, dando lugar al modelo aditivo y al modelo multiplicativo respectivamente (ver tabla 1.1).

De esta forma, las desviaciones a las cuales se refieren el primer y el segundo método pueden ser desviaciones a partir de un modelo multiplicativo o uno aditivo.

1.2.1.2. Modelo aditivo y modelo multiplicativo.

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo de tesis se utilizó el primer método presentado en la figura 1.3 para llevar a cabo los análisis de interacciones epistáticas, por lo que de aquí en adelante se hará referencia solamente a los modelos multiplicativo y

aditivo, correspondientes a dicho método.

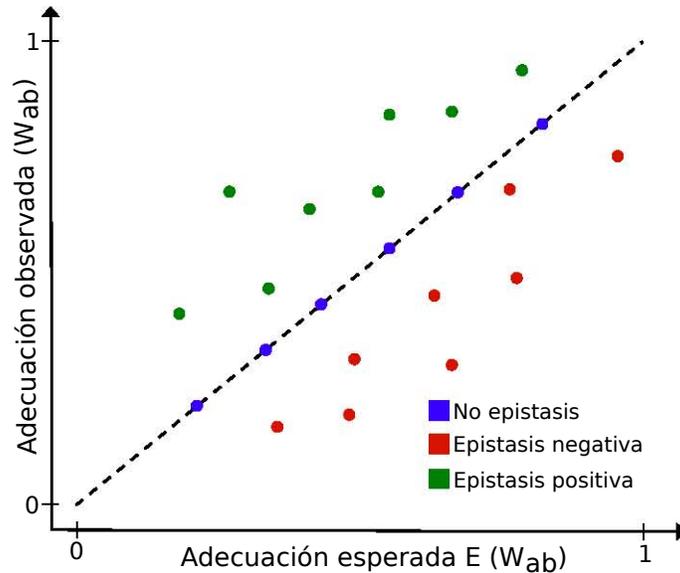


Figura 1.3: Representación gráfica del método de tipo 1 (modificado de Kouyos et al. (2007)), el cual busca epistasis determinando interacciones entre pares de loci. Los puntos azules, rojos y verdes representan no epistasis, epistasis negativa y epistasis positiva, respectivamente; la función $E(W_{ab})$ se refiere a la función de neutralidad, la cual puede adoptar la forma $W_a + W_b$ (forma aditiva) o $W_a \cdot W_b$ (forma multiplicativa), según sea el caso.

Tanto el modelo aditivo como el modelo multiplicativo se derivan del modelo inicial de análisis de interacciones epistáticas (Ec.1.3). Ambos modelos, así como sus diferencias son representados en la tabla 1.1.

Es importante mencionar que el modelo multiplicativo y aditivo son equivalentes en diferentes escalas. De esta forma, el uso del modelo multiplicativo con medidas de adecuación en escala lineal equivaldrá a utilizar el modelo aditivo con medidas de adecuación en escala logarítmica. Esto es posible debido a la propiedad del producto de los logaritmos, como se puede apreciar en la tabla 1.1.

Para reforzar la equivalencia de ambos modelos, Wolf et al. (2000) menciona que la epistasis multiplicativa puede ser definida como aquellas desviaciones a partir de un efecto aditivo de las mutaciones independientes en escala logarítmica (Cordell, 2002; Wolf et al., 2000; Szafraniec et al., 2003).

Tabla 1.1: Diferencias de los modelos básicos utilizados en el análisis de interacciones epistáticas (modelo aditivo y multiplicativo).

	Modelo aditivo	Modelo multiplicativo
Escala utilizada	Logarítmica	Lineal
Expresión matemática	$\epsilon = \log(W_{xy}) - (\log(W_x) + \log(W_y))$ <p style="text-align: center;">o</p> $\epsilon = \log(W_{xy}) - \log(W_x \cdot W_y)$	$\epsilon = W_{xy} - (W_x \cdot W_y)$
En ausencia de epistasis (modelo nulo)	$W_{xy} = (W_x + W_y)$	$W_{xy} = (W_x \cdot W_y)$

ϵ = epistasis, W_x = valor de adecuación de la mutante x, W_y = valor de adecuación de la mutante y, W_{xy} = valor de adecuación de la mutante xy.

Debido a la equivalencia matemática de ambos modelos, podemos decir que el modelo mediante el cual se llevará a cabo el análisis de interacciones epistáticas dependerá de la escala de medida del fenotipo que se utilice. En caso de que sea utilizada la medida de adecuación como el fenotipo a partir del cual se llevará a cabo el análisis de interacciones epistáticas, como es el caso del presente trabajo, deberá considerarse la escala del rasgo utilizado para la obtención de dicha medida de adecuación.

Por ejemplo, la mayoría de los análisis de interacciones epistáticas llevados a cabo en microorganismos han utilizado la tasa de crecimiento como medida de adecuación (Bohannan et al., 1999; Elena and Lenski, 1997; Jasnos and Korona, 2007; Kryazhimskiy et al., 2011; Segrè et al., 2005; St Onge et al., 2007; Szafraniec et al., 2003). Debido a que la tasa de crecimiento está basada en una función logarítmica, la suma de las medidas respectivas a través de la ecuación $\epsilon = W_{xy} - (W_x + W_y)$ equivaldrá a la multiplicación de las medidas transformadas en una escala lineal (Cordell, 2002; Szafraniec et al., 2003).

Se ha propuesto una ecuación general para representar la definición de epistasis a partir de los modelos multiplicativo y aditivo (Mani et al., 2008), la cual tiene como componentes el efecto de la doble mutante y el efecto de un fenotipo neutral (fenotipo resultante del efecto independiente de las dos mutaciones, también llamado efecto esperado), siendo este último representado a través de la función de neutralidad ($E(W_{xy})$) (ver figura 1.3). Esta definición

puede ser representada matemáticamente de la siguiente forma:

$$\epsilon = W_{xy} - E(W_{xy}) \quad (1.4)$$

Donde: ϵ es la desviación resultante de interacciones epistáticas entre los loci X y Y; W_{xy} se refiere al valor de adecuación de la doble mutante XY; $E(W_{xy})$ es la función de la neutralidad, la cual cambiará a partir de la medida de adecuación utilizada.

Las desviaciones a partir de un modelo multiplicativo en lugar de uno aditivo empezaron a ser utilizadas con mayor frecuencia a partir de 1960 por los genetistas de poblaciones, debido a que las trayectorias evolutivas de loci con valores de adecuación multiplicativos son independientes entre si (Phillips, 2008). Esta idea está basada en la definición de independencia probabilística (Wade et al., 2001), la cual favorece a los estudios de la reproducción sexual y recombinación.

A partir de todo lo anterior, podemos decir que el modelo matemático a través del cual se llevará a cabo la búsqueda de interacciones epistáticas deberá ser elegido principalmente en función del tipo de análisis que se quiera llevar a cabo y de la escala matemática de la medida de adecuación utilizada (Cordell, 2002; De Visser et al., 2011; Wolf et al., 2000; Kouyos et al., 2007; Mani et al., 2008; Phillips, 1998, 2008; Wade et al., 2001), o incluso, en la significancia estadística obtenida a partir del uso de cada modelo (Kouyos et al., 2007).

En el caso del presente trabajo, se utilizó el modelo multiplicativo para llevar a cabo los análisis de interacciones epistáticas usando como medida de adecuación la eficiencia de esporulación de las cepas, ya que esta medida se encuentra en escala lineal.

1.3. Justificación del uso del modelo multiplicativo.

Como se ha mencionado con anterioridad, para este trabajo se utilizó como medida de adecuación la eficiencia de esporulación. El uso de este rasgo como medida de adecuación

fue de principal importancia para la realización de los objetivos de este proyecto de tesis, ya que era necesaria la utilización de una medida de adecuación relacionada con la esporulación o la formación de cuerpos fructíferos. Esto debido a que la red génica en la que este proyecto está basado, está involucrada en el desarrollo de estos procesos (ver *Red de desarrollo de cuerpos fructíferos*).

Es importante mencionar que no se encontró ningún artículo en la literatura donde se llevara a cabo un análisis de interacciones epistáticas combinando el modelo multiplicativo con la eficiencia de esporulación como medida de adecuación. A pesar de esta falta de información, el uso del modelo multiplicativo en nuestro trabajo puede justificarse a través de los siguientes puntos:

1. Debido a que la medida de adecuación utilizada en el presente trabajo (eficiencia de esporulación) no está basada en una escala logarítmica, se debe utilizar el modelo multiplicativo.
2. De Visser et al. (2011) reportó que, de forma general, en los análisis de interacciones epistáticas llevados a cabo utilizando medidas de adecuación como fenotipo cuantitativo de interés, las desviaciones del efecto multiplicativo son estadísticamente significativas y por lo tanto relevantes. Debido a que la significancia estadística representa una gran limitante para el análisis de la epistasis a través de este tipo de métodos (Elena and Lenski, 1997; Kouyos et al., 2007; Sanjuán et al., 2004), el estudio llevado a cabo por De Visser et al. (2011) provee de cierto sustento empírico para la utilización del modelo multiplicativo en combinación con valores de adecuación para llevar a cabo el análisis de interacciones epistáticas, como es el caso de la presente tesis.
3. Es el modelo básico más utilizado para análisis de interacciones epistáticas, por lo que su uso podría ser lo más recomendable para analizar el comportamiento de los datos al utilizar dicha medida de adecuación (Bohannon et al., 1999; Collins et al., 2006; De Visser et al., 1997; Elena and Lenski, 1997; Kryazhimskiy et al., 2011; Lalić and Elena, 2012; Sanjuán and Elena, 2006; Sanjuán et al., 2004; St Onge et al., 2007).

4. Está basado en la definición de independencia probabilística, la cual sugiere que dos sucesos aleatorios son independientes cuando la probabilidad de ocurrencia de uno de ellos no afecta a la probabilidad de ocurrencia del otro (Spiegel, 1961). En lo que a esta tesis respecta, esta definición se refiere a la suposición de que determinado gen no afectará la presencia o expresión de otro gen del mismo sistema. De esta forma, esta definición podría aportar alguna ventaja al momento de llevar a cabo el análisis de fondo y la interpretación de los resultados.
5. Es equivalente a otros modelos al utilizar medidas de adecuación en diferentes escalas, lo que permite pensar que dicha equivalencia se mantendrá siempre y cuando se lleven a cabo las transformaciones pertinentes de la medida de adecuación. Por esta razón, en caso de que surgiera algún problema causado por la aplicación del modelo multiplicativo y/o la escala de adecuación utilizada, sería más fácil de solucionar.

1.4. Características generales de las mixobacterias.

Las mixobacterias son un grupo de bacterias Gram negativas que pertenecen al grupo de las delta proteobacterias (ver *Clasificación taxonómica*). La característica principal de este tipo de bacterias es que presentan un ciclo de vida compuesto por dos fases principales: una fase vegetativa y una fase de desarrollo. Bajo condiciones de estrés alimenticio, las células vegetativas se agregan y forman cuerpos fructíferos de entre 50 a 500 μm (Shimkets et al., 2006). A su vez, dentro de dichos cuerpos fructíferos se generan esporas resistentes a condiciones de estrés alimenticio, las cuales pueden ser dispersadas y podrán germinar una vez que las condiciones favorables se restablezcan. Las mixobacterias han sido el único grupo de procariontes identificado que posee la capacidad de formar cuerpos fructíferos y esporular (Bretschert and Kaiser, 1978; Madigan et al., 2009; Shimkets et al., 2006; Shimkets and Seale, 1975; Whitworth, 2008). La mayoría de las mixobacterias presentan estilos de vida aerobios estrictos, con excepción de la especie *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Whitworth, 2008), que como se puede inferir a partir de su nombre, crece en condiciones anaerobias.

Las células vegetativas de las mixobacterias presentan una forma de bacilo, típicamente de 3–15 μm de largo y de 0.6–1.2 μm de ancho (Reichenbach, 1999). Han sido identificados dos tipos morfológicos: 1) bacilos delgados y flexibles con extremos más o menos estrechos, 2) bacilos cilíndricos y rígidos con extremos abultados y redondeados (Shimkets et al., 2006). Diversas especies de mixobacterias han sido aisladas en diferentes partes del mundo pero la mayoría de ellas han sido encontradas en suelos de ambientes templados con temperaturas de entre 20 y 30 °C, pH neutro y altas concentraciones de materia orgánica (Shimkets et al., 2006; Whitworth, 2008). Algunas otras especies han sido aisladas a partir de muestras de agua dulce y de mar (Dawid, 2000), incluso de superficies rocosas (Reichenbach, 1999) y de áreas contaminadas con uranio (Petrie et al., 2003).

1.4.1. *Myxococcus xanthus*, una mixobacteria muy especial.

Debido a que *Myxococcus xanthus* es el organismo de estudio en el presente trabajo de tesis, de aquí en adelante nos adentraremos en la biología de este organismo.

Cabe señalar que *M. xanthus* es la mixobacteria que ha sido estudiada con mayor amplitud por lo que han sido bien descritas las características de su ciclo de vida (Shimkets et al., 2006), el conjunto de señales y mecanismos involucrados en la formación de cuerpos fructíferos y esporulación (García, 2007; Goldman et al., 2006; Hanlon et al., 1997; Higgs et al., 2008; Jain and Inouye, 1998; Jelsbak and Sogaard-Andersen, 2003; Kaiser, 2004; Nariya and Inouye, 2006, 2002, 2003, 2005; Singer and Kaiser, 1995; Sliusarenko et al., 2007; Stein et al., 2006; Tzeng and Singer, 2005; Udo et al., 2000; Whitworth, 2008; Zhang et al., 1992), los tipos de movilidad que presentan sus células (Hodgkin and Kaiser, 1979; Kaiser, 1979, 2000; McBride, 2001; Sliusarenko et al., 2007; Sun et al., 2000; Ward and Zusman, 1999; Whitworth, 2008), su genoma (Chen et al., 1990; Goldman et al., 2006; Müller et al., 2013), sus hábitos alimenticios (Bretschert and Kaiser, 1978; Dworkin, 1962, 1963), entre otras cosas. *M. xanthus* es una bacteria con dimensiones de 0.75 por 5.2 μm y una longitud de entre 3– 7.5 μm (Shimkets and Seale, 1975). Presenta forma de bacilo y habita en el suelo, generalmente en lugares donde la materia orgánica en proceso de descomposición es abundante.

Utiliza péptidos y aminoácidos como fuente principal de carbono y nitrógeno (Bretschert and Kaiser, 1978; Dworkin, 1962; Whitworth, 2008), los cuales obtiene a partir de la depredación de otras bacterias y hongos.

La forma en la que las células vegetativas de *M. xanthus* obtienen los nutrientes que necesitan para sobrevivir es muy particular. Las células de este microorganismo se agregan en “enjambres celulares” y cooperan entre sí para generar enzimas líticas que degradan las membranas celulares de los microorganismos presa (Singh, 1947). Por esta razón, algunos autores se refieren a *M. xanthus* como una bacteria depredadora (ver figura 1.4) (Singh, 1947).

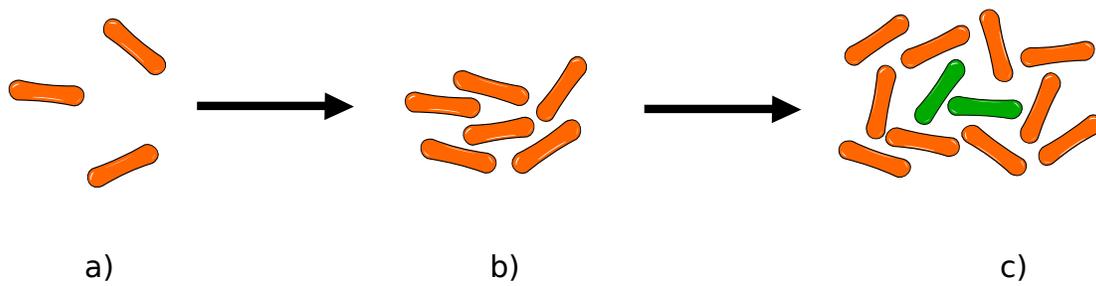


Figura 1.4: Modelo del posible comportamiento depredador utilizado por *M. xanthus*: a) agregación celular, b) formación de enjambres celulares y c) microdepredación de otras bacterias mostradas en color verde.

La cooperación de los “enjambres celulares” de *M. xanthus* durante el proceso de nutrición, así como la migración celular para la formación de cuerpos fructíferos durante la etapa de desarrollo, no serían posibles sin algún mecanismo de desplazamiento. *M. xanthus* presenta dos sistemas de movilidad por deslizamiento: A, involucrado en el movimiento de células individuales, y S, involucrado en el desplazamiento de conjuntos celulares a través de estructuras llamadas pili (Hodgkin and Kaiser, 1979). Ambos tipos de movilidad se encuentran descritos a detalle en el apéndice A.

1.5. Clasificación taxonómica.

Las mixobacterias forman parte del grupo de las proteobacterias, dentro del cual han sido clasificadas en el subgrupo de las delta proteobacterias a partir del análisis de la secuencia de DNA ribosómico 16S (Shimkets, 1999). Forman un grupo monofilético en el orden de los *Myxococcales* (Whitworth, 2008; Shimkets and Woese, 1992). A su vez, el orden de los *Myxococcales* ha sido tradicionalmente subdividido en dos subórdenes *Cystobacterineae* y *Sorangiiineae*. Dentro del suborden *Sorangiiineae* se encuentra la familia *Nannocystaceae* (género *Nannocystis*). Algunos han clasificado a *Nannocystaceae* como un tercer suborden (Shimkets et al., 2006). De esta forma, se pueden distinguir tres subórdenes, cinco familias, 17 géneros y cerca de 50 especies (Shimkets et al., 2006).

El suborden *Cystobacterineae* incluye a las familias *Myxococcaceae* y *Cystobacteriaceae*. La familia *Myxococcaceae* contiene a los géneros *Myxococcus*, *Archangium* y *Corallococcus*, mientras que la familia *Cystobacteriaceae* contiene a los géneros *Cystobacter*, *Hyalangium*, *Melittangium* y *Stigmatella* (ver figura 1.5).

De acuerdo a lo anterior, la clasificación taxonómica de *M. xanthus* es la siguiente (Whitworth, 2008):

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Filo:	<i>Proteobacteria</i>
Clase:	<i>Deltaproteobacteria</i>
Orden:	<i>Myxococcales</i>
Suborden:	<i>Cystobacterineae</i>
Familia:	<i>Myxococcaceae</i>
Género:	<i>Myxococcus</i>
Especie:	<i>Myxococcus xanthus</i>

1.6. Ciclo de vida de *Myxococcus xanthus*.

M. xanthus se caracteriza por tener uno de los ciclos de vida más complejos del dominio *Bacteria*, ya que a lo largo de éste puede presentar cambios ontogenéticos abruptos en la morfología, fisiología y comportamiento que serán dependientes de la disponibilidad de nutrientes en el medio. Su ciclo de vida se divide en dos fases: una fase vegetativa, llevada a cabo en presencia de nutrientes y una fase de desarrollo, inducida por la ausencia de nutrientes en el medio (ver figura 1.6).

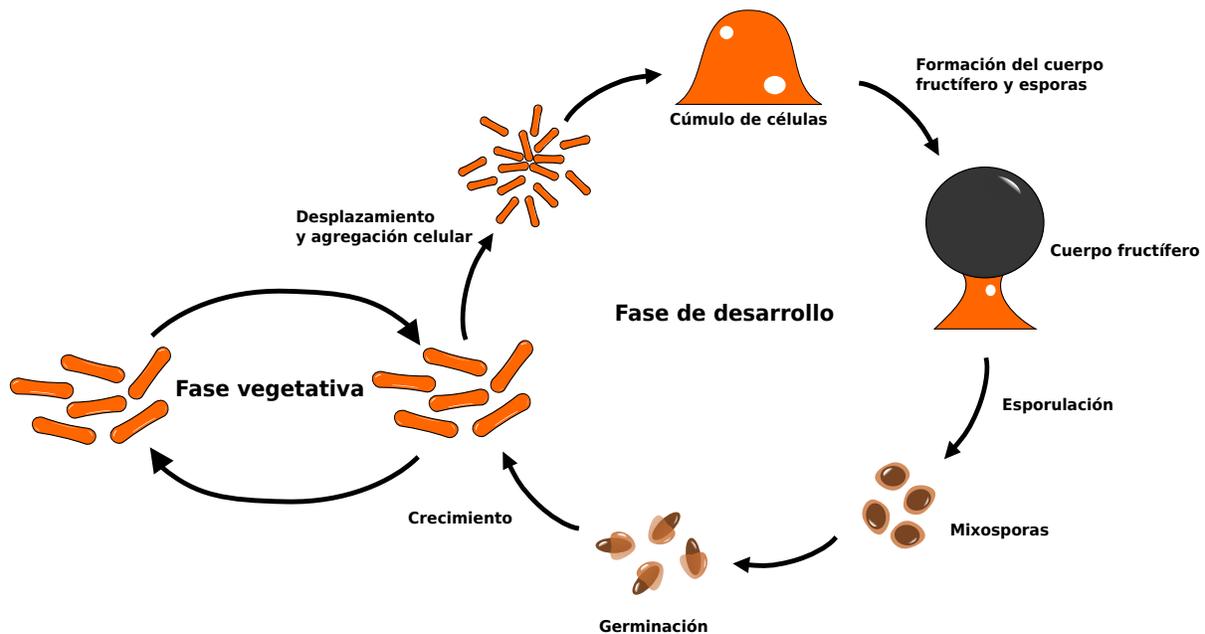


Figura 1.6: Ciclo de vida de *Myxococcus xanthus*; compuesto por dos fases: una vegetativa y una de desarrollo. Durante la fase vegetativa se llevan a cabo procesos de reproducción y de crecimiento celular. Durante la fase de desarrollo, además de los dos procesos antes mencionados, ocurre agregación celular en cúmulos celulares, formación de cuerpos fructíferos y esporas, así como la germinación de éstas (modificado de Madigan et al. (2009)).

1.6.1. Fase vegetativa.

La fase vegetativa de *M. xanthus* (ver figura 1.6) se lleva a cabo cuando el alimento es abundante en el medio y las células tienen buen aprovisionamiento de aminoácidos (Dworkin, 1963). Durante esta fase, las células presentan forma de bacilo y aprovechan la abundancia de nutrientes para la reproducción y crecimiento celular.

Se ha identificado que para el crecimiento exponencial de esta mixobacteria es necesario que el medio donde se encuentra contenga 17 aminoácidos y sales. Bajo condiciones abundantes de alimento, el tiempo generacional es de 3 a 4 horas (Hodgkin and Kaiser, 1979).

Durante la fase vegetativa, las células vegetativas de *M. xanthus* se desplazan individualmente, a través del mecanismo de movilidad tipo A, para formar estructuras celulares llamadas enjambres, compuestos por miles de células. Estos enjambres se mueven en conjunto a través del desplazamiento social (S), alimentándose en conjunto a través de lo que se ha denominado como microdepredación (ver figura 1.4) (Shimkets et al., 2006; Singh, 1947).

1.6.2. Fase de desarrollo.

La otra fase del ciclo de vida de *M. xanthus*, llamada fase de desarrollo, es provocada por el agotamiento de nutrientes en el medio (ver figura 1.6). La falta de alimento induce a las células de *M. xanthus* a migrar y agregarse en enjambres de mayor tamaño, para posteriormente formar estructuras multicelulares conocidas como cuerpos fructíferos. Los eventos de migración ocurridos durante esta fase también son producidos gracias al mecanismo de desplazamiento social (S) (ver Apéndice A). Otros factores necesarios para el desarrollo de *M. xanthus* son la alta densidad celular y la presencia de las células en una superficie sólida (Whitworth, 2008).

Una vez formados los cuerpos fructíferos, aproximadamente el 10% de las células del agregado inicial se diferencia en células con forma ovoide (Hodgkin and Kaiser, 1979; Whitworth, 2008). Posteriormente, estas células ovoides madurarán y darán lugar a esporas, mejor conocidas como mixoesporas, las cuales son resistentes a múltiples adversidades ambientales (ej.

deseccación, temperatura, etc.) (Whitworth, 2008).

A grandes rasgos, la fase de desarrollo de *M. xanthus* puede ser dividida en cuatro eventos principales:

i. Percepción de señales ambientales a nivel celular.

Debido a que la formación de cuerpos fructíferos y esporas, ocurrida durante el proceso de desarrollo de *M. xanthus*, debe de ser costosa en términos energéticos, se cree que la selección evolutiva debe favorecer la evaluación del estatus de nutrición en el que se encuentran las células (Singer and Kaiser, 1995). Para esto, Singer y Kaiser (1995) han propuesto un modelo de reconocimiento y evaluación de hambruna de dos niveles que podría estar siendo utilizado por las células de *M. xanthus* para evaluar las condiciones ambientales y reducir las pérdidas de energía, generadas por errores en falso del programa de desarrollo.

El primer nivel de reconocimiento del modelo de Singer y Kaiser se refiere al nivel celular individual. A este nivel, las células individuales perciben la ausencia de nutrientes a través de la activación de una respuesta estricta, un mecanismo que reduce la síntesis de rRNA, tRNA y por lo tanto de proteínas (Singer and Kaiser, 1995; Whitworth, 2008). Mediante este mecanismo, la ausencia de aminoácidos amino-acetilados en el medio provoca que el ribosoma comience a sintetizar nucleótidos altamente fosforilados de tipo *guanosina-tetra-(penta-) fosfato ((p)ppGpp)* (Singer and Kaiser, 1995; Kaiser, 2006, 2004). La molécula (p)ppGpp actúa como alarma y se ha comprobado experimentalmente que es suficiente para iniciar el programa de desarrollo de *M. xanthus* (Singer and Kaiser, 1995).

ii. Percepción del quórum y agregación celular.

Después de que las células de *M. xanthus* han percibido las condiciones de estrés alimenticio intracelularmente, llevan a cabo un segundo nivel de reconocimiento, ahora a nivel poblacional (Singer and Kaiser, 1995). La percepción de hambruna a este nivel es posible a través de la concentración de señal A en el medio, cuya producción es inducida por la acumulación intracelular de (p)ppGpp (Kaiser, 2004; Whitworth, 2008). Una vez llevado a cabo el reconocimiento de las condiciones de hambruna a nivel poblacional, las células de *M. xanthus* comienzan a formar agregados celulares. En este punto, cabe recordar que debido

a los hábitos y tácticas de nutrición que tienen las células de *M. xanthus* durante la fase vegetativa, durante dicha fase se encuentran agrupadas en enjambres celulares pequeños. Por otro lado, el proceso de agregación realizado durante la fase de desarrollo, consiste en formar agregados de mayor número de células. De esta forma, las células que integran los enjambres celulares preformados se desplazan conjuntamente hacia centros de agregación, a través del mecanismo de movilidad social (S) (ver Apéndice A).

A su vez, la migración hacia centros de agregación es un proceso dependiente de la densidad celular, conocido como percepción del quórum, también mediado por la concentración de señal A. Por esta razón, enjambres pequeños van a tender a migrar hacia donde haya enjambres o agregados celulares con mayor densidad celular y emitiendo mayores cantidades de señal A al medio (Whitworth, 2008). La migración hacia centros de agregación comienza de 4 a 6 horas a partir del establecimiento de las condiciones de falta de alimento y es el primer indicador de la formación de cuerpos fructíferos (Whitworth, 2008).

Al continuar el programa de desarrollo, el proceso de agregación celular también es mediado por otra molécula, conocida como señal C (Kaiser, 2004; Shimkets, 1999; Shimkets and Woese, 1992).

Las identidades y características moleculares de las señales A y C serán desarrolladas con mayor detalle en la sección *Mecanismos de señalización durante la fase de desarrollo de M. xanthus*.

iii. Formación de cuerpos fructíferos.

Una vez que las células de *M. xanthus* se encuentran agrupadas en enjambres celulares y han comenzado a migrar hacia los centros de agregación, estos agregados celulares empezarán a formar pequeños montículos celulares, que tras un proceso de maduración, se convertirán en cuerpos fructíferos.

De esta forma, los primeros cuerpos fructíferos serán formados a las 24 horas de haberse establecido las condiciones de hambruna y estarán compuestos por aproximadamente 10^5 células densamente empaquetadas (Whitworth, 2008).

Existen tres factores necesarios para la formación de cuerpos fructíferos: i) las células deben

estar en una superficie sólida, ii) las células deben encontrarse bajo estrés alimenticio, iii) debe haber alta densidad celular (Whitworth, 2008).

iv. Diferenciación celular y formación de esporas.

Alrededor del 10 al 12% de las células que se encuentran dentro de los cuerpos fructíferos se diferenciarán en esporas de resistencia (Whitworth, 2008). Durante este proceso de diferenciación, las células de *M. xanthus* pasan de ser células con forma de bacilo a ser células ovoides sin capacidad de movimiento. La maduración de las mixosporas termina después de las 72 horas a partir del establecimiento de las condiciones de hambruna (Whitworth, 2008). Una vez que esto sucede se dice que los cuerpos fructíferos han finalizado su maduración. Por otro lado, aproximadamente el 30% de las células agregadas permanece fuera de los cuerpos fructíferos. Estas células quedan con forma de bacilo y se diferencian en un tipo de células llamadas bacilos periféricos. El 60% de las células restantes entra al programa de muerte celular programada (Whitworth, 2008).

Se ha visto que para que se pueda llevar a cabo el proceso de esporulación adecuadamente en *M. xanthus*, es necesario que el glucógeno celular sea consumido por la enzima 6-fosfofructocinasa (PFK, por sus siglas en inglés) durante el proceso de formación de cuerpos fructíferos (Nariya and Inouye, 2003). A su vez, la enzima PFK necesita ser fosforilada post-traduccionalmente, en el residuo treonina 226, por la proteína cinasa PktD1. De esta forma, tanto PFK como PktD1 son indispensables para la glucólisis y un proceso eficiente de esporulación (Nariya and Inouye, 2003).

1.7. Mecanismos de señalización durante la fase de desarrollo de *M. xanthus*.

El intercambio de señales entre las células de *M. xanthus* es un factor *sine qua non* en la formación de cuerpos fructíferos y esporulación de esta mixobacteria. Desde hace

varios años, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de dilucidar los mecanismos celulares de señalización involucrados en la activación y regulación de la fase de desarrollo de *M. xanthus* (Kaiser, 2004; Shimkets, 1999; Singer and Kaiser, 1995). Se han identificado 5 tipos diferentes de señales que permiten la comunicación intercelular, que son: A, B, C, D y E. Es importante mencionar que todas estas señales están representadas por diferentes conjuntos de loci genéticos. De esta forma, aquellos loci relacionados con la señal A son denominados *asg*, mientras que aquellos relacionados con las señales B, C, D, y E son denominados *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*, respectivamente (Shimkets, 1999).

La señal A es generada desde las primeras dos horas de establecidas las condiciones de estrés alimenticio, alcanzando un pico de actividad a las 3 horas (Whitworth, 2008). Esta señal se encuentra codificada por cinco loci: *asgA* y *asgD* han sido relacionados con proteínas histidina cinasas, *asgB* con una proteína de unión a DNA, *asgC* con un factor sigma y *asgE* con una proteína homóloga a proteínas amidohidrolasa (Kaiser, 2004; Shimkets, 1999).

Como ya ha sido mencionado con anterioridad, la *guanosina-tetra-(penta-) fosfato* ((p)ppGpp), molécula generada por la respuesta estricta al ser establecidas las condiciones de hambruna, activa la producción de señal A.

Durante la fase de desarrollo de *M. xanthus*, la señal A funge como un sistema sensor de quórum que permite que las células entren en fase de desarrollo solamente si alcanzan la densidad celular adecuada. La respuesta a esta señal está mediada por la histidina quinasa SasS, la cual al identificar a la señal A en el medio activa la expresión de genes dependientes de señal A (ej. el gen Ω_{4521}) a través de su regulador de respuesta SasR (ver figura 1.7) (Kaiser, 2004).

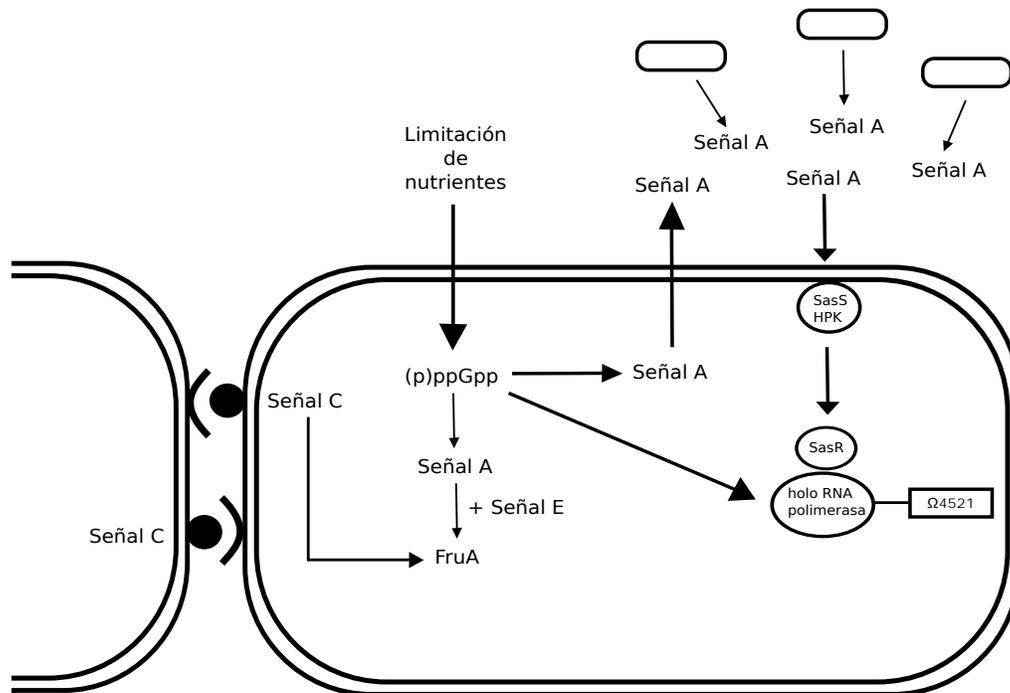


Figura 1.7: Ruta de señalización intra e intercelular en respuesta a la limitación de nutrientes en el medio (modificado de Kaiser (2004, 2006); Singer and Kaiser (1995)).

La señal B, activada aproximadamente a las 6 horas de iniciado el proceso de desarrollo (Whitworth, 2008), corresponde a una proteasa dependiente de ATP (Shimkets, 1999). Las mutantes que presentan pérdida de función para esta señal no se agregan y por lo tanto no forman cuerpos fructíferos ni esporulan (Kroos and Kaiser, 1987).

La señal C se encuentra codificada por el gen *csgA*, el cual comienza a expresarse hasta las 6 horas de haber sido establecida la condición de hambruna (Whitworth, 2008). Este factor existe en dos formas: la primera corresponde a una proteína de membrana de 24.6 kDa relacionada con la familia de proteínas alcohol deshidrogenasa (Shimkets, 1999); la segunda corresponde a una proteína de 17 KDa denominada p17 (Whitworth, 2008). La transmisión de esta señal requiere el contacto estrecho entre las células de *M. xanthus* (Kroos and Kaiser, 1987). A medida que el programa de desarrollo avanza, los niveles de señal C en las células aumentan. De esta forma, bajas concentraciones de señal C están asociadas con procesos de ondulación rítmica, las cuales son crestas separadas espacialmente formadas en etapas tempranas del desarrollo que se mueven en sincronía (Sager and Kaiser, 1994; Shimkets et al.,

1983); concentraciones intermedias se han asociado con la agregación celular, mientras que altas concentraciones de esta señal están relacionadas con la esporulación (Li et al., 1992; Shimkets, 1999). Debido a que la señal C alcanza su pico máximo de expresión durante el proceso de esporulación, se cree que es la responsable principal de que este evento se lleve a cabo (Kaiser, 2004).

Por otro lado, se ha identificado que la proteína FruA, parcialmente responsable de la expresión de los genes involucrados en el desarrollo en *M. xanthus*, es central para la ruta de transducción de la señal C. Esto se sabe debido a que las mutantes *fruA* no se agregan ni esporulan, además de ser deficientes en la expresión de varios genes que son dependientes de señal C (Whitworth, 2008).

FruA es una proteína reguladora de respuesta de unión a DNA, la cual consiste de un dominio receptor N-terminal y un dominio de unión a DNA C-terminal. La transcripción de *fruA* se lleva a cabo de 3 a 6 horas a partir del establecimiento de las condiciones de hambruna y una vez presente en la célula regula su propia expresión. A su vez, la regulación de la transcripción de esta proteína es llevada a cabo por tres factores principales (Whitworth, 2008): señal A, proteína DevT y la proteína MrpC, de la cual se hablará más a fondo en la siguiente sección debido a su relevancia para el presente trabajo de tesis. De esta forma, FruA no necesita de la señal C para ser expresada pero sí para ser activada, ya que se cree que la señal C modifica post-traduccionamente a FruA, fosforilando uno de sus aminoácidos (Ellehaug et al., 1998).

Con respecto a la señal D, ha sido asociada al factor de inicio de traducción IF3, el cual es codificado por el gen *dsgA*. DsgA presenta concentraciones uniformes a lo largo del proceso la fase de desarrollo (Shimkets, 1999).

Por último, la señal E parece consistir de ácidos grasos. Se cree que estos ácidos grasos están involucrados en la supresión de regresiones direccionales, permitiendo que las células lleven a cabo una migración dirigida y por lo tanto el desarrollo de cuerpos fructíferos (Shimkets, 1999).

1.7.1. Transducción de señales.

El monitoreo y la transducción de señales provenientes del medio en *M. xanthus* se lleva a cabo a través de dos mecanismos principales (Nariya and Inouye, 2005): a) sistema de dos componentes y b) sistema de proteínas Ser/Thr cinasas (PSTKs por sus siglas en inglés).

Los sistemas de dos componentes son sistemas que permiten al organismo generar una respuesta a partir de estímulos extracelulares, así como también a partir de estímulos intracelulares (Goldman et al., 2006). Estos sistemas están compuestos por una proteína histidina cinasa y una proteína reguladora de respuesta (Whitworth, 2008). Las histidina cinasas son proteínas que catalizan la fosforilación de residuos conservados de histidina ubicados en el dominio cinasa. Posteriormente, el grupo fosforilo es transferido a un residuo de aspartato conservado ubicado en el dominio receptor del regulador de respuesta, frecuentemente dando lugar a cambios en la expresión génica (Capra and Laub, 2012).

El segundo sistema de monitoreo y transducción de señales está compuesto por proteínas Ser/Thr cinasas (PSTKs) y proteínas fosfatasas. Ambos tipos de proteínas funcionan como interruptores biológicos que prenden y apagan rutas de transducción de señales, donde participan fosforilando y desfosforilando (Whitworth, 2008). Al igual que las proteínas histidina cinasas, las PSTKs regulan corriente abajo la actividad y expresión de proteínas efectoras, a través de la fosforilación de éstas (Stein et al., 2006). Debido a que algunas de las PSTKs de *M. xanthus* contienen dominios transmembranales, se ha sugerido que estas cinasas funcionan como sensores ambientales a este nivel (transmembranal) (Udo et al., 1995).

Es importante mencionar que, en un inicio, se creía que las proteínas Ser/Thr cinasas eran exclusivas de organismos eucariontes, sin embargo, diversos estudios han demostrado que no es así (Goldman et al., 2006; Muñoz-Dorado et al., 1991; Nariya and Inouye, 2005, 2006; Udo et al., 1995; Zhang et al., 1992). A su vez, la presencia de proteínas Ser/Thr cinasas en *M. xanthus* también ha sido corroborada con la secuenciación del genoma de esta mixobacteria (Goldman et al., 2006).

1.8. Proteínas cinasas en la regulación del desarrollo de *M. xanthus*.

A partir del estudio de las proteínas cinasas de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) (PSTKs) de *M. xanthus*, se ha visto que estas proteínas están involucradas directa o indirectamente en los eventos de agregación celular, formación de cuerpos fructíferos y esporulación llevados a cabo durante el desarrollo de esta mixobacteria (Hanlon et al., 1997; Muñoz-Dorado et al., 1991; Nariya and Inouye, 2002, 2003, 2006; Stein et al., 2006; Udo et al., 2000, 1995).

Nariya e Inouye caracterizaron por primera vez una cascada de señalización involucrada en el proceso de desarrollo de *M. xanthus*, sugiriendo que ciertas etapas del ciclo de vida de este organismo pueden estar siendo reguladas por redes complejas compuestas por diferentes PSTKs, como la mostrada en la figura 1.8 (Nariya and Inouye, 2005). La red de regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación propuesta por Nariya e Inouye, está compuesta por cinco proteínas Ser/Thr cinasas y tres proteínas asociadas a múltiples cinasas (Mkaps, por sus siglas en inglés).

A grandes rasgos, la red de PSTKs mostrada en la figura 1.8, regula postraduccionalmente a la proteína MrpC, impidiendo que dicha proteína sea procesada y convertida en su forma activa MrpC2. A su vez, la forma activa MrpC2 es el factor de transcripción de *fruA* y cuya expresión lleva inevitablemente a la formación de cuerpos fructíferos y a la esporulación de *M. xanthus* (ver sección *Mecanismos de señalización durante la fase de desarrollo de M. xanthus*) (Nariya and Inouye, 2006).

Debido a que la red de PSTKs regula negativa e indirectamente la expresión de *fruA*, la red se encontrará funcionando durante la fase vegetativa del ciclo de vida de *M. xanthus*, obstruyendo la entrada de las células al programa de desarrollo (Escalante et al., 2012; Whitworth, 2008). De forma contraria, es necesario que los efectos producto de la red disminuyan para que las células puedan iniciar el desarrollo. Esto ha sido corroborado a partir de mutaciones en diferentes cinasas de la red. De esta forma, se ha visto que la ausencia o modificación

de alguna de estas cinasas provoca un adelanto en los procesos de agregación, formación de cuerpos fructíferos y esporulación de las células de *M. xanthus*, generando baja producción de cuerpos fructíferos y esporas (Hanlon et al., 1997; Muñoz-Dorado et al., 1991; Udo et al., 1995).

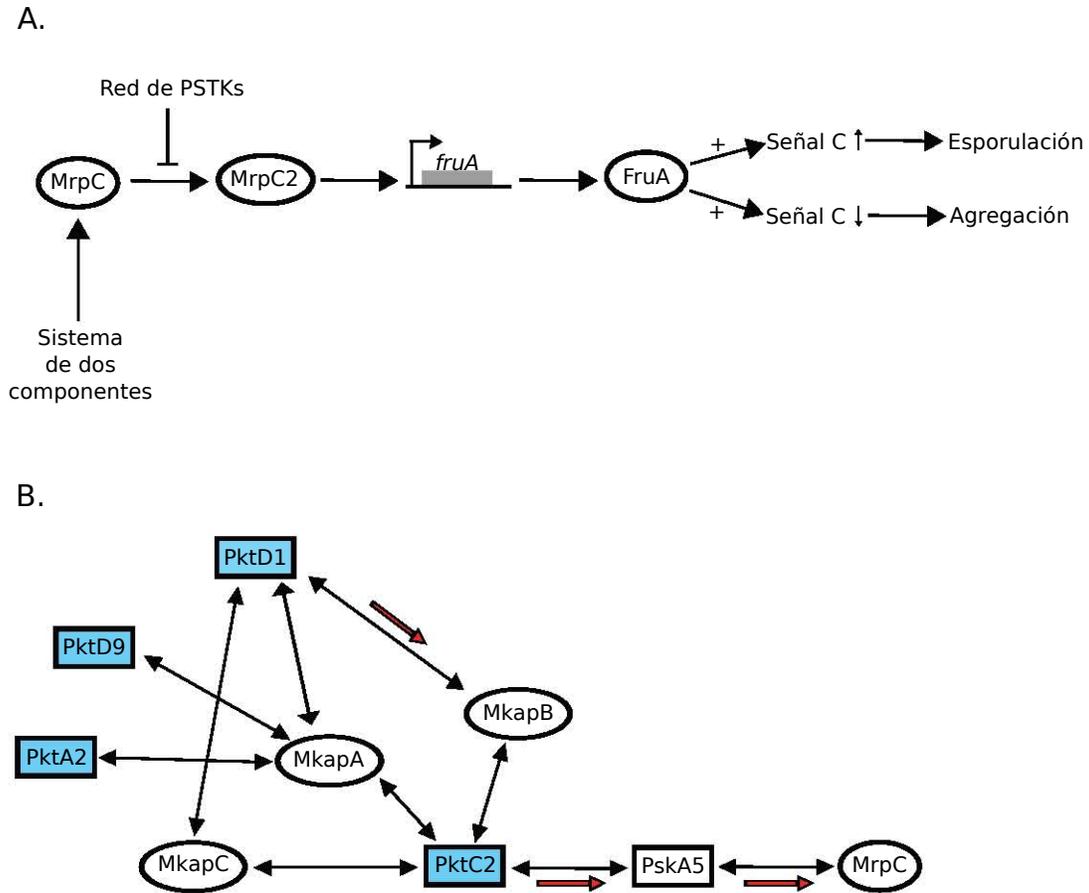


Figura 1.8: Modelo de la red de regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *Myxococcus xanthus*. A. Modelo de regulación de la expresión de *fruA*. Al encontrarse FruA y una baja concentración de señal C se lleva a cabo la agregación celular; al encontrarse FruA y una alta concentración de señal C se inicia el proceso de esporulación. B. Modelo de la red de proteínas Ser/Thr cinasas (PSTKs) que regulan negativamente la expresión de *fruA* a través de la modificación postraduccional a MrpC2 a partir de MrpC. Se muestran las cuatro proteínas cinasas cuyas interacciones epistáticas fueron analizadas en la presente tesis (en fondo azul), así como las proteínas asociadas a múltiples cinasas (Mkaps). Las flechas en color rojo representan eventos de fosforilación (figura modificada de Escalante et al. (2012)).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, a partir de las delecciones de las proteínas cinasas que componen la red de regulación del desarrollo de *M. xanthus*, se ha observado que los fenotipos cuantitativos (ej. número de esporas y número de cuerpos fructíferos formados, eficiencia de esporulación, etc.) de las cepas mutantes no guardan una correspondencia lineal con la presencia o ausencia de los genes que codifican para cinasas (Escalante et al., 2012; Hanlon et al., 1997; Muñoz-Dorado et al., 1991; Udo et al., 2000). Esta falta de correspondencia lineal entre los genes presentes que codifican para cinasas en la red del desarrollo de *M. xanthus* y los fenotipos observados, permite suponer la presencia de relaciones complejas entre dichos genes. Por esta razón, es relevante el análisis de esta red con la finalidad de identificar interacciones epistáticas que pudieran estar involucradas en la no linealidad de los fenotipos cuantitativos de *M. xanthus*.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivo general.

Determinar si existen interacciones epistáticas entre los genes que componen la cascada de PSTKs, involucrada en la regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *Myxococcus xanthus*, y los efectos que dichas interacciones producen en la adecuación de cepas mutantes.

Objetivos particulares.

1. Determinar el signo de las interacciones epistáticas en la red de desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *Myxococcus xanthus*.
2. Determinar la magnitud de las interacciones epistáticas en la red de desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *Myxococcus xanthus*.

Capítulo 3

Hipótesis

\mathbf{H}_0 : Si la red de desarrollo propuesta de *M. xanthus* no contiene interacciones epistáticas, entonces el efecto combinado de las mutaciones será igual que el efecto multiplicativo de las mutaciones simples independientes.

\mathbf{H}_1 : Si la red de desarrollo propuesta de *M. xanthus* contiene interacciones epistáticas, entonces el efecto combinado de las mutaciones será mayor o menor que el efecto multiplicativo de las mutaciones simples independientes.

Capítulo 4

Métodos

4.1. Obtención de las cepas mutantes de la red de PSTKs asociada con la regulación del desarrollo de *M. xanthus*.

Las cepas mutantes para PSTKs de *M. xanthus* fueron originalmente construidas en el laboratorio de la Dra. Sumiko Inouye. Por otro lado, sus respectivas medidas fenotípicas (ej. número de cuerpos fructíferos, número de esporas, etc.) fueron obtenidas a partir del proyecto postdoctoral de la Dra. Ana Elena Escalante Hernández y reportados en Escalante et al. (2012).

La construcción de las cepas mutantes consistió en generar deleciones (también llamadas mutaciones *knockout*) de cuatro genes codificantes para cinasas (*pktA2*, *pktD1*, *pktC2*, *pktD9*), que a su vez forman parte de la red de regulación involucrada en la formación de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*. Dichas deleciones fueron realizadas dentro del marco de lectura (*in-frame deletions*), utilizando el gen de resistencia a kanamicina (*kan*) y el gen de la galactocinasa (*galK*). Se generaron dos fragmentos de DNA con tamaños aproximados de 600 pb, los cuales contenían la región *corriente arriba* del codón de inicio de la traducción

y la región *corriente abajo* del codón de término de la traducción, más varios codones de aminoácidos, respectivamente. Ambos fragmentos fueron amplificados por PCR, utilizando el DNA genómico como templado, y clonados en el plásmido pKO1kmr, que contenía los genes *kan* y *galk*. Una vez introducido el plásmido pKO1kmr en las células silvestres (DZF1), el plásmido con el gen silvestre fue eliminado al añadir D-galactosa en el medio (Escalante et al., 2012; Ueki et al., 1996).

A través del método anterior, fueron generadas 15 cepas mutantes (cuatro mutantes simples, seis mutantes dobles, cuatro mutantes triples y una mutante cuádruple), por lo que tomando en cuenta a la cepa silvestre (DZF1), existen 16 cepas en total (ver tabla 4.1).

Por cuestiones de practicidad, a lo largo del presente trabajo de tesis se hará referencia a las 16 cepas como: DZF1 (cepa silvestre), A2, D1, C2, D9, A2/D1, D1/C2, D1/D9, A2/C2, A2/D9, C2/D9, A2/C2/D9, D1/C2/D9, A2/D1/D9, A2/D1/C2, A2/D1/C2/D9, respectivamente. Se debe tener presente que los términos anteriores se refieren a las respectivas mutaciones *knockout* de los genes que codifican para cinasas de la red de desarrollo de *M. xanthus*, y no a alguna operación aritmética. La tabla 4.1 enlista las 15 cepas mutantes antes referidas con sus respectivas abreviaturas.

Tabla 4.1: Cepas mutantes generadas por la Dra. Sumiko Inouye, utilizadas en el presente trabajo, con sus respectivas abreviaturas entre paréntesis.

Mutantes simples	Mutantes dobles	Mutantes triples	Mutante cuádruple
$\Delta pktA2$ (A2)	$\Delta pktA2/\Delta pktD1$ (A2/D1)	$\Delta pktA2/\Delta pktC2/\Delta pktD9$ (A2/C2/D9)	$\Delta pktA2/\Delta pktD1/\Delta pktC2/\Delta pktD9$ (A2/D1/C2/D9)
$\Delta pktD1$ (D1)	$\Delta pktD1/\Delta pktC2$ (D1/C2)	$\Delta pktD1/\Delta pktC2/\Delta pktD9$ (D1/C2/D9)	
$\Delta pktC2$ (C2)	$\Delta pktD1/\Delta pktD9$ (D1/D9)	$\Delta pktA2/\Delta pktD1/\Delta pktD9$ (A2/D1/D9)	
$\Delta pktD9$ (D9)	$\Delta pktA2/\Delta pktC2$ (A2/C2)	$\Delta pktA2/\Delta pktD1/\Delta pktC2$ (A2/D1/C2)	
	$\Delta pktA2/\Delta pktD9$ (A2/D9)		
	$\Delta pktC2/\Delta pktD9$ (C2/D9)		

Para cada una de las cepas mostradas en la tabla 4.1, así como para la cepa silvestre, fueron determinados por triplicado los valores de las siguientes características o rasgos fenotípicos Escalante et al. (2012) (datos no publicados):

a) Viabilidad de esporas.

- b) Número de cuerpos fructíferos después de siete días.
- c) Tamaño promedio final de los cuerpos fructíferos.
- d) Tasa de formación de cuerpos fructíferos.
- e) Curva de tamaño de cuerpos fructíferos.
- f) Curva de crecimiento.
- g) Número de esporas por mililitro.

Debido a que la viabilidad de las esporas sólo fue determinada para el caso de las cuatro mutantes simples, no fue utilizada para la determinación del valor de adecuación. Por otro lado, el número de esporas por mililitro sí se determinó para las 16 cepas mostradas en la tabla 4.1. Como se verá en la siguiente sección, el número de esporas por mililitro fue utilizado para determinar la eficiencia de esporulación de cada cepa, medida que, a su vez, fue utilizada para determinar los valores de adecuación, respectivamente. Por esta razón, es importante mencionar la manera en que fue determinado el número de esporas por mililitro producidas por cada cepa.

A grandes rasgos, la determinación del número de esporas por mililitro se llevó a cabo a través de citometría de flujo. Los conteos de esporas fueron obtenidos a partir de muestras de 200 μl , sometidas durante 15 segundos a un láser de argón 15 mW 488 nm. Para mayor detalle en la determinación del número de esporas por mililitro ver Escalante et al. (2012).

4.2. Determinación de los valores de adecuación de cada cepa mutante.

Un punto central en este trabajo fue la determinación de los valores de adecuación de cada cepa mutante y silvestre.

La determinación de los valores de adecuación en bacterias generalmente se lleva cabo a

partir de la tasa de crecimiento de poblaciones bacterianas (Elena and Lenski, 1997; Orr, 2009), o a través del número de esporas formadas y la viabilidad de las mismas (Orr, 2009). Tomando en cuenta los objetivos del presente trabajo de tesis y debido a que la red génica con la que se trabajó está involucrada en el desarrollo de cuerpos fructíferos y la esporulación de *M. xanthus* (Escalante et al., 2012), fue necesario que la medida de adecuación utilizada estuviera relacionada con al menos uno de esos dos procesos.

Debido a que la viabilidad de esporas solamente fue obtenida para las mutantes simples (Escalante et al., 2012), este dato no fue tomado en cuenta para la determinación de los valores de adecuación de las cepas, por lo que éstos fueron determinados a partir de sus respectivas eficiencias de esporulación (Smith et al., 2010; Wu et al., 2013). La eficiencia de esporulación se refiere a la proporción de células que se diferencian como esporas con respecto al número de células iniciales de una población (Smith et al., 2010; Wu et al., 2013). Debido a que se contaba con ambos datos para todas las réplicas (ver tabla 4.2), fueron utilizadas las eficiencias de esporulación promedio (\bar{E}) de las cepas mutantes y silvestre como valores de adecuación absolutos. La determinación de las eficiencias de esporulación promedio (\bar{E}) se llevó a cabo utilizando el promedio del número de esporas por mililitro obtenido en las réplicas de cada cepa y dividiéndolo entre el número aproximado de células utilizadas al comienzo de los experimentos llevados a cabo por la Dra. Escalante, es decir, 6×10^6 células (Escalante et al., 2012).

A continuación se presenta la ecuación general utilizada para la determinación de las eficiencias de esporulación promedio (\bar{E}) de cada una de las 16 cepas utilizadas en el presente trabajo:

$$\bar{E} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i}{n \cdot b} \quad (4.1)$$

Donde: n = número de réplicas de cada cepa ($n = 3$); a_i = número de esporas por mililitro producidas por la réplica i ; b = número de células utilizadas al comienzo de los experimentos (6×10^6 células).

La tabla 4.2 muestra las respectivas eficiencias de esporulación de las tres réplicas existentes para cada una de las 16 cepas utilizadas en el presente trabajo (ver tabla 4.1). En la tabla 4.2 también son presentadas las eficiencias de esporulación promedio (\bar{E}) de cada cepa, también llamadas valores de adecuación absolutos ($W_{absoluto}$).

Tabla 4.2: Eficiencias de esporulación de las 3 réplicas de cada cepa con sus respectivos valores de esporulación promedio (\bar{E}).

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	\bar{E}
DZF1	3.439583333	0.281854167	0.3920625	1.371166667
A2	0.366083333	0.735375	0.422520833	0.507993056
D1	0.1181875	0.540583333	0.514625	0.391131944
C2	0.376020833	0.72625	0.321541667	0.474604167
D9	0.295645833	0.70575	0.627916667	0.543104167
A2/D1	0.082729167	0.113520833	0.146270833	0.114173611
D1/C2	0.314145833	0.346666667	0.523166667	0.394659722
D1/D9	0.3770625	0.395625	0.43975	0.404145833
A2/C2	1.068333333	0.53875	0.265416667	0.624166667
A2/D9	0.226166667	0.9925	0.71625	0.644972222
C2/D9	0.886	0.444166667	0.268583333	0.532916667
A2/C2/D9	0.2925	0.257625	0.652833333	0.400986111
D1/C2/D9	0.933333333	0.62875	0.623416667	0.7285
A2/D1/D9	0.491958333	0.62475	0.539708333	0.552138889
A2/D1/C2	0.178541667	0.362875	0.401770833	0.314395833
A2/D1/C2/D9	0.2396875	0.316229167	0.392	0.315972222

Las eficiencias de esporulación promedio fueron determinadas tomando en cuenta las eficiencias de esporulación de las tres réplicas existentes para cada una de las 16 cepas antes mencionadas.

Una vez habiendo obtenido las eficiencias de esporulación promedio o valores de adecuación absoluta de todas las cepas (\bar{E}_i), a través de la ecuación 4.1, dichos valores absolutos fueron transformados en valores relativos. Para esto, los valores absolutos de cada cepa (\bar{E}_i) fueron estandarizados con relación al valor de adecuación absoluto de la cepa silvestre (\bar{E}_s), asignando a esta última el valor relativo máximo (igual a 1) (Orr, 2009). Dicha estandarización se llevó a cabo a través de la siguiente fórmula general:

$$W_{relativa(i)} = \frac{\bar{E}_i}{\bar{E}_s} \quad (4.2)$$

Donde: $W_{relativa(i)}$ es la adecuación relativa de la cepa i , \bar{E}_i es la eficiencia de esporulación promedio de la cepa i y \bar{E}_s es la eficiencia de esporulación promedio de la cepa silvestre (DZF1).

Como se verá más adelante, los valores de adecuación relativos de cada cepa son la base para llevar a cabo el análisis de interacciones epistáticas a través de la medición de la desviación del efecto independiente de las mutaciones involucradas y utilizando el marco teórico del modelo multiplicativo (ver *Modelo aditivo y modelo multiplicativo*).

Los valores de adecuación relativa de las 16 cepas (mutantes y silvestre) utilizadas en el presente trabajo de tesis se encuentran reportadas en la tabla 4.3.

4.3. Análisis de interacciones epistáticas.

A lo largo del presente trabajo nos referiremos a epistasis como aquellas diferencias o desviaciones del efecto combinado de un conjunto de mutaciones con respecto al producto de los efectos de sus respectivas mutantes simples (efecto esperado bajo un modelo multiplicativo nulo) (Kouyos et al., 2007).

Tomando en cuenta esta definición de epistasis, el análisis de interacciones epistáticas, del que es objeto este trabajo, se basó en la medición de las desviaciones de los efectos independientes de las mutaciones (efectos esperados) con respecto a los efectos generados por la

interacción de dichas mutaciones (Kouyos et al., 2007).

Para llevar a cabo la medición de dichas diferencias o desviaciones se utilizaron polinomios, basados en el modelo multiplicativo y generados a partir de la combinación de los genotipos de las cepas mutantes (ver tabla 4.1 y ecuación 4.3).

$$\epsilon_{xy} = (W_s \cdot W_{xy}) - (W_x \cdot W_y) \quad (4.3)$$

Donde: W_s , W_{xy} , W_x y W_y se refieren a los valores de adecuación de los genotipos silvestre, de la doble mutante xy y de las mutantes simples, respectivamente.

De esta forma, esta ecuación sirvió como molde para la generación de los polinomios en los cuales se basa el análisis de interacciones epistáticas realizado en esta tesis. Debido a la naturaleza y finalidad de estos polinomios, a lo largo del presente trabajo nos referiremos a ellos como pruebas (Beerenwinkel et al., 2007).

Con la finalidad de facilitar y evitar errores en la generación de las combinaciones genotípicas ya mencionadas, se utilizó el programa *fitness.m2*, reportado en Beerenwinkel et al. (2007) y utilizado en dicho artículo con el mismo objetivo.

Para que el lector tenga mayor claridad del uso y funcionamiento del programa *fitness.m2*, el proceso de generación de las combinaciones genotípicas, a través de dicho programa, puede ser subdividido en los siguientes módulos:

- 1) Descarga e instalación de los programas utilizados.
- 2) Funcionamiento general del programa *fitness.m2*.
- 3) Codificación y procesamiento de datos.
- 4) Resultados obtenidos por el programa *fitness.m2*.
- 5) Decodificación y clasificación de las pruebas propuestas.

4.3.1. Descarga e instalación de los programas utilizados.

Como se mencionó anteriormente, la generación de las pruebas en las cuales se basa el análisis de interacciones epistáticas puede llevarse a cabo utilizando el programa *fitness.m2*. Dicho programa se encuentra escrito en lenguaje de programación C++ y puede ser descargado de la siguiente página de internet: <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-7-60-S2.m2>. A su vez, el programa *fitness.m2* utiliza como plataforma al sistema Macaulay2, por lo que fue necesaria la instalación previa de éste último. El programa Macaulay2, desarrollado por Daniel Grayson y Michael Stillman en 1992, es un programa que sirve para la generación de sistemas algebraicos computacionales. Debido a esto, permite llevar a cabo investigación en geometría algebraica y álgebra conmutativa. Macaulay2 fue descargado desde la página madre <http://www.math.uiuc.edu/Macaulay2/>, donde se puede encontrar mayor información sobre las características del programa, todas las versiones del mismo, proyectos en curso, paquetes de programación, foros de ayuda, entre otras cosas.

4.3.2. Funcionamiento general del programa *fitness.m2*.

El programa *fitness.m2* utiliza como datos de entrada los genotipos codificados con sus respectivos fenotipos (ver *Codificación y procesamiento de datos*), en este caso, valores de adecuación relativa (ver tabla 4.3).

El programa toma los datos correspondientes a los genotipos y genera todas las combinaciones posibles compuestas por cuatro de éstos (ej. $(W_s)(W_{ab}) - (W_a)(W_b)$). De todas las combinaciones posibles, compuestas por cuatro variables o genotipos, solamente son reportadas las pruebas en las que dos de sus variables son producto de la recombinación de las otras dos. Dicho con otras palabras, genera todas las combinaciones posibles con significado biológico, mas no todas las posibles matemáticamente. La limitación del programa para la formación de combinaciones compuestas por cuatro variables se debe a que el objetivo de las pruebas es comparar los efectos esperados, representados por la multiplicación de dos de

los genotipos, contra los efectos observados, representados por la multiplicación de los dos genotipos restantes (ver *Tipos de epistasis*).

4.3.3. Codificación y procesamiento de datos.

Con la finalidad de que el programa *fitness.m2* reconociera los datos de entrada, los 16 genotipos utilizados en este trabajo (ver tabla 4.3) fueron codificados. Debido a que las cepas mutantes presentaban deleciones en cuatro loci correspondientes a los cuatro genes codificantes para las proteínas cinasas mencionadas anteriormente, los genotipos mutantes fueron representados a través de un código de cuatro dígitos, donde cada dígito corresponde a un locus. La posición asignada a cada locus fue determinada arbitrariamente pero mantenida para todas las cepas. De esta manera, el orden de codificación asignado a los loci fue el siguiente:

1^a posición – gen *PktA2*.

2^a posición – gen *PktD1*.

3^a posición – gen *PktC2*.

4^a posición – gen *PktD9*.

Tomando en cuenta lo anterior, el orden de los loci en el código de cuatro dígitos utilizado es el siguiente: A2, D1, C2, D9.

Además, el estado de cada locus fue codificado de manera *booleana*, por lo que a cada dígito se le asignó uno de dos valores posibles, cero o uno, dependiendo del estado del locus en cada genotipo. Es decir, a aquellos loci que se encontraban mutados les fue asignado un valor de 1, en cambio, a aquellos que no sufrieron ninguna deleción se les asignó un valor de 0.

De esta forma, el genotipo silvestre (carente de mutaciones) fue representado con la forma 0000, mientras que el genotipo con cuatro mutaciones fue representado con la forma 1111 (ver tabla 4.3).

Tabla 4.3: Lista de los fenotipos con sus respectivos genotipos codificados y valores de adecuación relativos ($W_{relativa}$).

Número de prueba	Fenotipo	Genotipo codificado	$W_{relativa}$
1	DZF1	0000	1.0000000000000000
2	A2	1000	0.370482354847859
3	D1	0100	0.285254851910376
4	C2	0010	0.346131639722864
5	D9	0001	0.396089096876140
6	A2/D1	1100	0.083267493213403
7	D1/C2	0110	0.287827681212269
8	D1/D9	0101	0.294745958429561
9	A2/C2	1010	0.455208459948949
10	A2/D9	1001	0.470382075280580
11	C2/D9	0011	0.388659292573234
12	A2/C2/D9	1011	0.292441554232000
13	D1/C2/D9	0111	0.531299380089948
14	A2/D1/D9	1101	0.402678173493781
15	A2/D1/C2	1110	0.229290749969612
16	A2/D1/C2/D9	1111	0.230440419756088

4.3.4. Resultados obtenidos por el programa *fitness.m2*.

Al procesar los genotipos codificados y sus respectivos valores de adecuación con el programa *fitness.m2* en Macaulay2, se obtuvieron tres datos:

- I. Genotipos de las cepas mutantes y valores de adecuación respectivos, utilizados como datos de entrada del programa.
- II. Pruebas propuestas basadas en las combinaciones de los genotipos (también llamadas

polinomios).

III. Simplejos.

El conjunto de genotipos de las cepas mutantes y sus valores de adecuación respectivos, también llamado paisaje adaptativo (Beerenwinkel et al., 2007), fue reportado por el programa por simple formalismo, ya que, como el lector podrá darse cuenta, son los mismos valores que fueron ingresados al programa para ser procesados.

Las pruebas propuestas, basadas en las combinaciones de los genotipos, son el eje a partir del cual se llevó a cabo el análisis de interacciones epistáticas. Con la finalidad de ejemplificar estos datos, en la tabla 4.4 se muestran cinco pruebas “en bruto” resultantes del procesamiento de nuestros datos con el programa *fitness.m2*.

Tabla 4.4: Ejemplo de pruebas “en bruto” generadas por el programa *fitness.m2* y compuestas por cuatro genotipos codificados. Las “x”, reportadas por el programa por simple formalismo, representan cada una de las variables que componen a las pruebas.

Pruebas propuestas por el programa <i>fitness.m2</i>
x x - x x
1101 1110 1100 1111
x x - x x
0111 1110 0110 1111
x x - x x
1011 1110 1010 1111
x x - x x
0011 1110 0010 1111
x x - x x
1001 1110 1000 1111

En la siguiente sección (*Decodificación y clasificación de las pruebas propuestas*) se presenta el proceso de decodificación de las pruebas generadas por el programa *fitness.m2*.

Por último, los simplejos son componentes de la teoría matemática de Niko Beerenwinkel necesarios para la generación de paisajes adaptativos a partir de una aproximación geométrica (Beerenwinkel et al., 2007). Debido a que el presente trabajo de tesis no tenía como objetivo la generación de un paisaje adaptativo, los simplejos no fueron utilizadas.

4.3.5. Decodificación y clasificación de las pruebas propuestas.

Una vez teniendo las pruebas generadas por el programa, se procedió a la decodificación de las mismas. Esta decodificación fue necesaria debido a que las pruebas fueron obtenidas en el lenguaje de codificación, descrito anteriormente en la subsección *Codificación y procesamiento de datos*; donde los genotipos son representados por conjuntos ordenados de ceros y unos.

Para llevar a cabo la decodificación se siguió el mismo orden de codificación mediante el cual fueron representados los 16 genotipos correspondientes a las cepas mutantes y silvestre. En la tabla 4.5 se ejemplifica el proceso de decodificación de dos pruebas.

Tabla 4.5: Ejemplo de la decodificación de dos pruebas, cada una compuesta por cuatro genotipos.

Prueba	Decodificación
1101 1110 - 1100 1111	(A2/D1/D9) (A2/D1/C2) - (A2/D1) (A2/D1/C2/D9)
0111 1110 - 0110 1111	(D1/C2/D9) (A2/D1/C2) - (D1/C2) (A2/D1/C2/D9)

De acuerdo a las características de las pruebas generadas, éstas fueron clasificadas en dos tipos:

- 1) Pruebas estándar.
- 2) Pruebas no estándar.

Fueron clasificadas como pruebas estándar aquellas pruebas que entre sus variables contenían al genotipo silvestre. Por otro lado, las pruebas que no contenían a dicho genotipo entre sus variables fueron clasificadas como pruebas no estándar. De esta forma, las pruebas estándar están compuestas por el valor de adecuación de la cepa silvestre, el valor de adecuación de una mutante que contenga dos o más mutaciones, es decir, una mutante de segundo orden o mayor, y de las mutantes de menor orden cuyas mutaciones conforman a la mutante de mayor orden (ver tabla 4.6).

Tabla 4.6: Ejemplos de pruebas estándar y no estándar.

Prueba	Tipo de prueba
$(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$	Estándar
$(DZF1)(D1/C2/D9) - (D1)(C2/D9)$	Estándar
$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D9)(A2/D1/C2)$	Estándar
$(A2/D9)(C2/D9) - (D9)(A2/C2/D9)$	No estándar
$(A2/C2)(A2/D1/D9) - (A2)(A2/D1/C2/D9)$	No estándar
$(D1/C2/D9)(A2/D1/D9) - (D1/D9)(A2/D1/C2/D9)$	No estándar

Por otro lado, las pruebas no estándar no contienen los valores de adecuación de la cepa silvestre, por lo que en ambos lados de las pruebas se presentan mutantes de varios órdenes. De igual forma que en las pruebas estándar, los genotipos representados del lado derecho del signo de resta de las pruebas corresponderán al producto de la recombinación de los genotipos representados del lado izquierdo de dicho signo (Beerenwinkel et al., 2007).

4.3.6. Reordenamiento de variables.

Después de realizar la decodificación de todas las pruebas obtenidas, se llevó a cabo un reordenamiento manual de las variables (genotipos) que componían a cada prueba; con la finalidad de estandarizar el orden de las variables de las pruebas. Dicho reordenamiento

consistió en colocar a los genotipos que representaban el fondo genético y a los genotipos que representaban la interacción de las mutaciones analizadas, del lado izquierdo del signo de resta de las pruebas. Esto con la finalidad de mantener el orden de las variables dado por la ecuación 4.3. Es importante mencionar que el fondo genético de las pruebas no estándar se encuentra representado por aquellas mutaciones que aparecen en todos los genotipos que componen a la prueba. En el caso de las mutaciones analizadas en pruebas estándar, todas se encuentran en un fondo genético silvestre.

En la tabla 4.7 se pueden observar dos ejemplos de reordenamiento, un ejemplo de reordenamiento de una prueba estándar y un ejemplo de reordenamiento de una prueba no estándar.

Tabla 4.7: Ejemplos de modificación en el orden de las variables de las pruebas.

Prueba	Genotipo correspondiente al fondo genético	Prueba reordenada	Orden de la prueba
(A2)(D1) - (DZF1)(A2/D1)	DZF1	(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)	2°
(D1/C2)(D1/D9) - (D1)(D1/C2/D9)	D1	(D1)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(D1/D9)	3°

En ambos casos, el cambio de posición del genotipo correspondiente al fondo genético se hizo en conjunto con el otro genotipo al que se encuentra asociado y multiplicando (ver tabla 4.7). Lo anterior se hizo para todas las pruebas cuyas variables (genotipos) fueron reordenadas.

Por último, a cada una de las pruebas le fue asignado un orden, el cual dependió del número de mutaciones analizadas por cada prueba, respectivamente. Por ejemplo, la prueba estándar (DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1) mide la epistasis entre las mutaciones A2 y D1, mientras que la prueba no estándar (D1)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(D1/D9) mide epistasis entre las mutaciones D9 y C2 en un fondo genético D1. De esta forma, las pruebas estándar y no estándar mencionadas anteriormente y mostradas en la tabla 4.7 son de orden dos y tres, respectivamente.

4.3.7. Sustitución de los valores de adecuación y aplicación de operaciones.

Una vez reordenados los genotipos de cada prueba, se llevó a cabo la sustitución de los genotipos codificados que componían a cada una de las pruebas, por sus respectivos valores de adecuación.

Tabla 4.8: Ejemplo de sustitución de valores de adecuación respectivos, realización de operaciones e interpretación del resultado de las pruebas.

Prueba decodificada	Sustitución de los valores de adecuación	Resultado	Interpretación
(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)	(1)(0.38)-(0.34)(0.39)	0.251560323995147	Epistasis positiva de tipo antagonista

Después de la sustitución de los genotipos de las cepas que componían a las pruebas por sus respectivos valores de adecuación, se realizaron las operaciones sugeridas en cada una de ellas.

Por último, los resultados de las pruebas fueron interpretados y, en caso de ser diferentes de cero, asociados con un tipo de epistasis (positiva, negativa, sinérgica o antagonista) a partir del signo de dichos resultados. Aquellos resultados con signos positivos fueron asociados con epistasis positiva; mientras que aquellos con signos negativos fueron asociados con epistasis negativa. Es importante hacer notar que tanto la epistasis positiva como la epistasis negativa pueden ser de tipo sinérgica y antagonista, dependiendo del tipo de mutaciones con las que se esté trabajando (ver *Tipos de interacciones epistáticas*). Debido a que en el presente trabajo de tesis fueron utilizadas mutaciones deletéreas, los resultados obtenidos a partir de las 55 pruebas solamente pueden ser clasificados en dos tipos de epistasis: epistasis positiva antagonista, para el caso de los resultados positivos; y epistasis negativa sinérgica, para el caso de los resultados negativos de este trabajo.

Por ejemplo, al sustituir los respectivos valores de adecuación en la prueba estándar

(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9) y hacer las respectivas operaciones, como se muestra en la tabla 4.8, obtenemos como resultado 0.251560323995147. Debido a que este valor es diferente de cero y positivo podemos decir que existe una interacción epistática positiva antagonista entre los genes involucrados; aunque es necesario corroborar esta aseveración a través de un análisis estadístico de significancia (ver *Determinación de significancias*).

Como se puede ver a partir del ejemplo anterior, la magnitud de los resultados de las pruebas permiten determinar la existencia de interacciones epistáticas entre las mutaciones cuyos valores de adecuación componen a dichas pruebas, así como también determinar la intensidad con la que éstas interacciones se llevan a cabo. Por su parte, el signo de los resultados permitió clasificar a las interacciones epistáticas encontradas en dos tipos: epistasis positiva antagonista y epistasis negativa sinérgica. También, los signos de los resultados pueden ayudar a discernir un tipo de epistasis más radical, la epistasis de signo.

La interpretación de los resultados de las pruebas, así como las implicaciones biológicas y evolutivas serán explicados con mayor detalle en la sección de discusión.

4.3.8. Determinación de significancia estadística.

Una vez teniendo los resultados de las 55 pruebas propuestas, los cuales se referían a las desviaciones encontradas entre los efectos esperados y los efectos observados de diferentes combinaciones de mutaciones, se determinó su significancia estadística. Es importante señalar que la determinación de la significancia de la epistasis fue llevada a cabo a dos niveles:

- a) Nivel de sistema. La determinación de significancias a este nivel permitió saber si, en términos generales, existen interacciones epistáticas significativas entre las Ser/Thr proteínas cinasas que componen la red de regulación involucrada en la formación de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*.
- b) Nivel de pruebas. La determinación de significancias a este nivel permitió saber entre qué mutaciones específicamente existen interacciones epistáticas significativas.

Para la determinación de la significancia de la epistasis a nivel de sistema se llevó a cabo un análisis de varianzas de una vía (*one-way ANOVA*) a través del programa estadístico *Stat Plus: mac LE* (ver tabla 5.2). Debido a que esta prueba estadística compara entre las medias de los grupos analizados (para el caso del presente trabajo: datos observados y datos esperados), solamente tuvo el poder de indicar si existe epistasis a nivel de sistema. Sin embargo, no permitió determinar si existían diferencias significativas entre los efectos observados y los efectos esperados, es decir, si los resultados que indican presencia de epistasis en cada prueba eran significativos.

Para la determinación de la significancia epistática a nivel de pruebas se utilizó el siguiente procedimiento: Debido a que era necesario tener un punto de referencia con el cual comparar los resultados de las pruebas y determinar si eran significativos o no, se utilizó la diferencia entre medias grupal de los valores observados y esperados como parámetro de referencia ($\tau = 0.082007$).

Es importante mencionar que esta comparación se llevó a cabo específicamente entre los valores absolutos de los resultados de las pruebas y las primeras dos posiciones decimales de la diferencia de medias grupal (0.082). El uso de los valores absolutos se debió a que, en algunos casos, los resultados presentaban signo negativo.

De esta forma, aquellas desviaciones cuyos valores absolutos fueron mayores a la diferencia de medias (0.082) fueron considerados significativos. De forma contraria, aquellas desviaciones cuyos valores absolutos fueron menores a la diferencia de medias (0.082) fueron considerados no significativos.

Por último, para llevar a cabo la comparación y determinación de diferencias significativas entre los efectos esperados y los efectos observados de cada prueba no estándar, en cada caso, se consideró como efecto observado a la parte de la prueba que contenía el valor de adecuación más alto (ver *Reordenamiento de variables y Sustitución de los valores de adecuación y realización de operaciones*).

Capítulo 5

Resultados

5.1. Generación de pruebas y determinación del tipo de epistasis encontrado.

A través del procesamiento de los genotipos ordenados de todas las cepas de *M. xanthus* utilizadas en el presente trabajo de tesis, el programa *fitness.m2* generó 55 pruebas, de las cuales 25 fueron clasificadas como pruebas estándar y 30 como pruebas no estándar. Como se mencionó en la sección de métodos, las pruebas clasificadas como pruebas estándar fueron aquellas pruebas que contenían al genotipo silvestre como una de sus variables, mientras que las pruebas que no contenían a dicho fenotipo fueron clasificadas como no estándar. Cabe señalar que la clasificación en pruebas estándar y no estándar permitió hacer referencia a las pruebas con mayor facilidad a lo largo de esta tesis, así como generar un par de gráficos de importancia.

Por otro lado, al agregar el orden de epistasis medido en cada prueba, fueron identificadas 6 pruebas estándar de segundo orden, 24 pruebas de tercer orden (12 estándar y 12 no estándar) y 25 pruebas de cuarto orden (7 pruebas estándar y 18 no estándar).

A su vez, la sustitución de los genotipos que componían a cada una de las 55 pruebas, por

sus respectivos valores de adecuación, permitió llevar a cabo las operaciones sugeridas en cada una de ellas. De esta forma, se obtuvieron los 55 resultados correspondientes a las magnitudes de la epistasis encontrada. Cada uno de estos resultados fueron relacionados con un tipo de epistasis a partir del signo de los resultados de las pruebas y de la información mostrada en la figura 1.1.

En la tabla 5.1 se encuentran enlistadas las 55 pruebas antes mencionadas con sus respectivas sustituciones numéricas, así como los órdenes respectivos, las mutaciones de los genes codificantes para cinasas que fueron analizadas en cada una de ellas, los fondos genéticos bajo los cuales se llevaron a cabo dichos análisis (mutaciones en color rosa y subrayadas), la magnitud de epistasis encontrada y el tipo de epistasis asignado a cada resultado.

De igual forma, en la tabla 5.1 se puede apreciar que los resultados de todas las pruebas son diferentes de cero, por lo que potencialmente presentan señales de epistasis.

Es importante resaltar que de las 55 pruebas propuestas, 19 de ellas fueron relacionadas con **epistasis negativa de tipo sinérgica**, mientras que las 36 restantes fueron relacionadas con **epistasis positiva de tipo antagonista** (ver tabla 5.1).

A su vez, de las 19 interacciones epistáticas sinérgicas encontradas, solamente una de ellas proviene de una prueba estándar, las 18 interacciones epistáticas sinérgicas restantes provienen de pruebas no estándar. Por otro lado, se encontraron 24 interacciones epistáticas antagonistas provenientes de pruebas estándar y 12 provenientes de pruebas no estándar.

Tabla 5.1: Lista de las pruebas generadas por el programa *fitness.m2* con sus respectivas sustituciones numéricas, órdenes, mutaciones de los genes codificantes para cinasas analizadas en cada una de las pruebas, magnitudes de epistasis y tipos de epistasis a los cuales fueron asociadas (**A**= epistasis antagonista, **S**= epistasis sinérgica). En color anaranjado y azul se encuentran representadas las pruebas estándar y no estándar respectivamente. Las mutaciones mostradas en color rosa y subrayadas representan el fondo genético bajo el cual se analizaron las mutantes restantes (todas las pruebas estándar fueron analizadas bajo un fondo genético silvestre). Aquellas pruebas que resultaron significativas tomando un umbral de 0.082, se muestran marcadas con un asterisco (*).

Número de prueba	Pruebas codificadas y valores numéricos	Mutaciones analizadas y orden de la prueba	Magnitud de epistasis	Tipo de epistasis
*1	(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9) (1)(0.38865) - (0.34613)(0.39608)	C2, D9 2°	0.25156	A
*2	(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9) (1)(0.29475) - (0.28525)(0.39609)	D1, D9 2°	0.18175	A
*3	(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9) (1)(0.47038) - (0.37048)(0.39609)	A2, D9 2°	0.32363	A
*4	(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2) (1)(0.28783) - (0.28525)(0.34613)	D1, C2 2°	0.18909	A
*5	(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2) (1)(0.45521) - (0.37048)(0.34613)	A2, C2 2°	0.32697	A
6	(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1) (1)(0.08327) - (0.37048)(0.28525)	A2, D1 2°	-0.0224	S
*7	(DZF1)(D1/C2/D9) - (D1)(C2/D9) (1)(0.53130) - (0.28525)(0.38866)	D1, C2, D9 3°	0.42043	A
*8	(DZF1)(A2/C2/D9) - (A2)(C2/D9) (1)(0.29244) - (0.37048)(0.38866)	A2, C2, D9 3°	0.14845	A
*9	(DZF1)(A2/C2/D9) - (C2)(A2/D9) (1)(0.29244) - (0.34613)(0.47038)	A2, C2, D9 3°	0.12962	A
*10	(DZF1)(A2/D1/D9) - (D1)(A2/D9) (1)(0.40268) - (0.28525)(0.47038)	A2, D1, D9 3°	0.26849	A
*11	(DZF1)(A2/C2/D9) - (D9)(A2/C2) (1)(0.29244) - (0.39609)(0.45521)	A2, C2, D9 3°	0.11213	A

Continuación de la tabla...

Número de prueba	Pruebas codificadas y valores numéricos	Mutaciones analizadas y orden de la prueba	Magnitud de epistasis	Tipo de epistasis
*12	(DZF1)(A2/D1/C2) - (D1)(A2/C2) (1)(0.22929) - (0.28525)(0.45521)	A2, D1, C2 3°	0.09944	A
*13	(DZF1)(D1/C2/D9) - (C2)(D1/D9) (1)(0.53130) - (0.34613)(0.29475)	D1, C2, D9 3°	0.42927	A
*14	(DZF1)(A2/D1/D9) - (A2)(D1/D9) (1)(0.40268) - (0.37048)(0.29475)	A2, D1, D9 3°	0.29347	A
*15	(DZF1)(D1/C2/D9) - (D9)(D1/C2) (1)(0.53130) - (0.39609)(0.28783)	D1, C2, D9 3°	0.41729	A
*16	(DZF1)(A2/D1/C2) - (A2)(D1/C2) (1)(0.22929) - (0.37048)(0.28783)	A2, D1, C2 3°	0.12265	A
*17	(DZF1)(A2/D1/D9) - (D9)(A2/D1) (1)(0.40268) - (0.39609)(0.08327)	A2, D1, D9 3°	0.36969	A
*18	(DZF1)(A2/D1/C2) - (C2)(A2/D1) (1)(0.22929) - (0.34613)(0.08327)	A2, D1, C2 3°	0.20046	A
*19	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D9)(A2/D1/C2) (1)(0.23044) - (0.39609)(0.22929)	A2, D1, C2, D9 4°	0.13962	A
*20	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (C2)(A2/D1/D9) (1)(0.23044) - (0.34613)(0.40268)	A2, D1, C2, D9 4°	0.09106	A
21	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (A2)(D1/C2/D9) (1)(0.23044) - (0.37048)(0.53130)	A2, D1, C2, D9 4°	0.03360	A
*22	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1)(A2/C2/D9) (1)(0.23044) - (0.28525)(0.29244)	A2, D1, C2, D9 4°	0.14702	A
*23	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1)(C2/D9) (1)(0.23044) - (0.08327)(0.38866)	A2, D1, C2, D9 4°	0.19807	A
*24	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2)(A2/D9) (1)(0.23044) - (0.28783)(0.47038)	A2, D1, C2, D9 4°	0.09505	A
*25	(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/D9)(A2/C2) (1)(0.23044) - (0.29475)(0.45521)	A2, D1, C2, D9 4°	0.09626	A
26	(D9)(A2/C2/D9) - (A2/D9)(C2/D9)	A2, C2, D9	-0.06698	S

Continuación de la tabla...

Número de prueba	Pruebas codificadas y valores numéricos	Mutaciones analizadas y orden de la prueba	Magnitud de epistasis	Tipo de epistasis
	(0.39609)(0.29244) - (0.47038)(0.38866)	3°		
27	(C2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(C2/D9) (0.34613)(0.29244) - (0.45521)(0.38866)	A2, C2 , D9 3°	-0.07569	S
*28	(D9)(D1/C2/D9) - (D1/D9)(C2/D9) (0.39609)(0.53130) - (0.29475)(0.38866)	D1, C2, D9 3°	0.09588	A
29	(C2)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(C2/D9) (0.34613)(0.53130) - (0.28783)(0.38866)	D1, C2 , D9 3°	0.07203	A
*30	(A2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(A2/D9) (0.37048)(0.29244) - (0.45521)(0.47038)	A2 , C2, D9 3°	-0.10577	S
31	(D9)(A2/D1/D9) - (D1/D9)(A2/D9) (0.39609)(0.40268) - (0.29475)(0.47038)	A2, D1, D9 3°	0.02085	A
*32	(A2)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(A2/D9) (0.37048)(0.40268) - (0.08327)(0.47038)	A2 , D1, D9 3°	0.11001	A
33	(C2)(A2/D1/C2) - (D1/C2)(A2/C2) (0.34613)(0.22929) - (0.28783)(0.45521)	A2, D1, C2 3°	-0.05165	S
34	(A2)(A2/D1/C2) - (A2/D1)(A2/C2) (0.37048)(0.22929) - (0.08327)(0.45521)	A2 , D1, C2 3°	0.04704	A
35	(D1)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(D1/D9) (0.28525)(0.53130) - (0.28783)(0.29475)	D1 , C2, D9 3°	0.06671	A
*36	(D1)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(D1/D9) (0.28525)(0.40268) - (0.08327)(0.29475)	A2, D1 , D9 3°	0.09032	A
37	(D1)(A2/D1/C2) - (A2/D1)(D1/C2) (0.08327)(0.28783) - (0.28525)(0.22929)	A2, D1 , C2 3°	0.04143	A
38	(C2)(A2/D1/C2/D9) - (C2/D9)(A2/D1/C2) (0.34613)(0.23044) - (0.38866)(0.22929)	A2, D1, C2 , D9 4°	-0.00935	S
39	(A2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D9)(A2/D1/C2) (0.37048)(0.23044) - (0.47038)(0.22929)	A2 , D1, C2, D9 4°	-0.02248	S
40	(D1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/D9)(A2/D1/C2) (0.28525)(0.23044) - (0.29475)(0.22929)	A2, D1 , C2, D9 4°	-0.00184	S

Continuación de la tabla...

Número de prueba	Pruebas codificadas y valores numéricos	Mutaciones analizadas y orden de la prueba	Magnitud de epistasis	Tipo de epistasis
41	(D9)(A2/D1/C2/D9) - (C2/D9)(A2/D1/D9) (0.39609)(0.23044) - (0.38866)(0.40268)	A2, D1, C2, D9 4º	-0.06522	S
*42	(A2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2)(A2/D1/D9) (0.37048)(0.23044) - (0.45521)(0.40268)	A2 , D1, C2, D9 4º	-0.09792	S
43	(D1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2)(A2/D1/D9) (0.28525)(0.23044) - (0.28783)(0.40268)	A2, D1 , C2, D9 4º	-0.05016	S
*44	(D9)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D9)(D1/C2/D9) (0.39609)(0.23044) - (0.47038)(0.53130)	A2, D1, C2, D9 4º	-0.15863	S
*45	(C2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2)(D1/C2/D9) (0.34613)(0.23044) - (0.45521)(0.53130)	A2, D1, C2 , D9 4º	-0.16208	S
46	(D1)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1)(D1/C2/D9) (0.28525)(0.23044) - (0.08327)(0.53130)	A2, D1 , C2, D9 4º	0.02149	A
47	(D9)(A2/D1/C2/D9) - (D1/D9)(A2/C2/D9) (0.39609)(0.23044) - (0.29475)(0.29244)	A2, D1, C2, D9 4º	0.00507	A
48	(C2)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2)(A2/C2/D9) (0.34613)(0.23044) - (0.28783)(0.29244)	A2, D1, C2 , D9 4º	-0.00441	S
49	(A2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1)(A2/C2/D9) (0.37048)(0.23044) - (0.08327)(0.29244)	A2 , D1, C2, D9 4º	0.06102	A
50	(A2/D1)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1/D9)(A2/D1/C2) (0.08327)(0.23044) - (0.40268)(0.22929)	A2 , D1 , C2, D9 4º	-0.07314	S
51	(D1/C2)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2/D9)(A2/D1/C2) (0.28783)(0.23044) - (0.53130)(0.22929)	A2, D1 , C2 , D9 4º	-0.05549	S
52	(A2/C2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2/D9)(A2/D1/C2) (0.45521)(0.23044) - (0.29244)(0.22929)	A2 , D1, C2 , D9 4º	0.03784	A
*53	(D1/D9)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2/D9)(A2/D1/D9) (0.29475)(0.23044) - (0.53130)(0.40268)	A2, D1 , C2, D9 4º	-0.14602	S
54	(A2/D9)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2/D9)(A2/D1/D9) (0.47038)(0.23044) - (0.29244)(0.40268)	A2 , D1, C2, D9 4º	-0.00936	S
55	(C2/D9)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2/D9)(D1/C2/D9)	A2, D1, C2 , D9	-0.06581	S

Continuación de la tabla...

Número de prueba	Pruebas codificadas y valores numéricos	Mutaciones analizadas y orden de la prueba	Magnitud de epistasis	Tipo de epistasis
	(0.38866)(0.23044)- (0.29244)(0.53130)	4°		

La distribución de los resultados de las 55 pruebas (estándar y no estándar), correspondientes a las magnitudes de la epistasis encontrada, se encuentra representada en la figura 5.1. La línea negra horizontal representa la ausencia de epistasis, mientras que las líneas rosas representan los umbrales de significancia (0.082) (ver *Determinación de significancias*).

Los puntos que se encuentran por debajo de la línea horizontal negra (ausencia de epistasis) corresponden a los 19 casos de epistasis sinérgica mencionados con anterioridad, mientras que los puntos que se encuentran por encima de dicha línea corresponden los 36 casos de epistasis antagonista. A su vez, las magnitudes de epistasis fueron clasificadas por colores de acuerdo al orden de epistasis analizado por sus respectivas pruebas de procedencia. De esta forma, en color rojo se muestran las magnitudes de epistasis procedentes de pruebas de 2° orden (pruebas que analizan la interacción de dos mutaciones), en azul las procedentes de pruebas de 3° orden (pruebas que analizan la interacción de tres mutaciones ordenadas de diferentes formas) y en verde las procedentes de pruebas de 4° orden (pruebas que analizan la interacción de cuatro mutaciones ordenadas de diferentes formas).

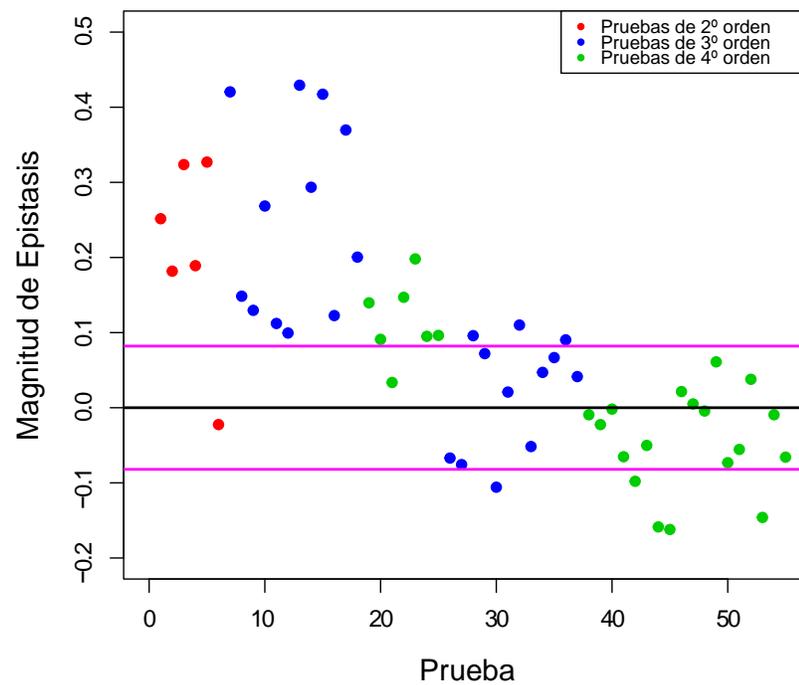


Figura 5.1: Distribución de las magnitudes de epistasis encontradas a partir de las 55 pruebas realizadas. En color rojo se muestran las pruebas de 2° orden, en azul las pruebas de 3° orden y en verde las pruebas de 4° orden. La línea negra horizontal representa la no epistasis y divide a los valores positivos (epistasis antagonista) y negativos (epistasis sinérgica). Las líneas en color rosa representan los umbrales de significancia (0.082).

5.2. Determinación de la significancia estadística de la epistasis encontrada.

A partir del análisis de varianza de una vía (*one-way ANOVA*), mostrado en la tabla 5.2, se determinó estadísticamente ($p = 0.0000912522$) la significancia de la epistasis encontrada a nivel de la red de desarrollo de cuerpos fructíferos de *M. xanthus* (determinación de significancia a nivel de sistema). Al realizar un segundo análisis con un método diseñado para la identificación de diferencias significativas entre los efectos observados y los

efectos esperados (determinación de significancia a nivel de prueba), se determinó que solamente 31 de los 55 casos analizados en el presente trabajo de tesis, presentaron diferencias significativas. Estos 31 casos se encuentran marcados con un asterisco (*) en la tabla 5.1.

Tabla 5.2: a) Resumen de los dos grupos comparados a través de la ANOVA de una vía, b) Tabla de análisis de varianza de una vía (*one-way ANOVA*) obtenida con el programa *StatPlus*.

	Grupos	Tamaño de muestra	Suma	Media	Varianza
(a)	Efectos observados	55	10.90759	0.19831	0.01937
	Efectos esperados	55	6.39716	0.11631	0.00299

ANOVA de una vía							
	Fuente de variación	SS	df	MS	F	Valor p	F crit
(b)	Entre grupos	0.18494	1	0.18494	16.52874	0.0000912522	3.92901
	Dentro de grupos	1.20844	108	0.01118			
	Total	1.39339	109				

SS= suma de cuadrados, df= grados de libertad, MS= media cuadrática, F= proporción F, Valor p= significancia, F crit= valor crítico de la distribución F.

5.3. Análisis gráficos.

A partir de los resultados de las pruebas y los respectivos tipos de epistasis con los que fueron relacionados, se generaron diferentes análisis gráficos. Cabe señalar que en todos los análisis gráficos realizados, fueron tomadas en cuenta todas las pruebas (estándar y no estándar) y sus respectivos resultados, de no ser así, será indicado.

La figura 5.2 muestra la distribución de las frecuencias de las magnitudes de epistasis encontradas. El número de clases del histograma presentado en la figura 5.2 fue determinado a través de la regla de Struges, cuya fórmula se presenta en la ecuación 5.1.

$$k = 1 + \log_2(n) \quad (5.1)$$

Donde: k = número de clases del histograma y n = tamaño de muestra.

Utilizando la fórmula anterior, los datos fueron divididos en 7 clases.

En la figura 5.2, se puede observar que los casos de epistasis positiva de tipo antagonista, correspondiente a los valores mayores a cero (barras en color verde), son más frecuentes entre las mutaciones de los genes que codifican para cinasas de la red de regulación de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*.

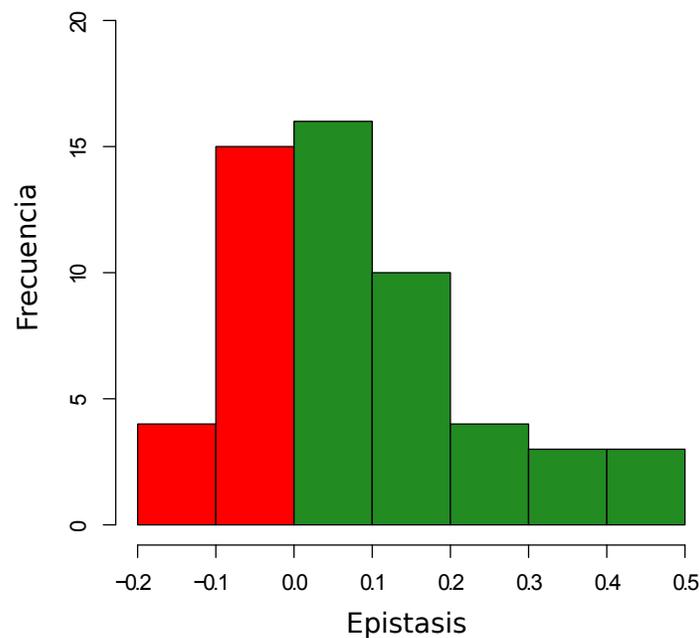


Figura 5.2: Distribución de la epistasis encontrada a partir de las 55 pruebas realizadas. Los resultados de las pruebas fueron clasificados en siete clases. En rojo se muestran los resultados correspondientes a interacciones epistáticas negativas sinérgicas, mientras que en verde se muestran aquellos resultados asociados a interacciones epistáticas positivas antagonistas.

La figura 5.3 está compuesta por dos histogramas que muestran las frecuencias de las magnitudes de epistasis provenientes de pruebas estándar (barras en color anaranjado) y pruebas no estándar (barras en color verde agua). De esta forma, se puede ver que un ma-

yor número de resultados asociados a epistasis antagonista (valores positivos de epistasis), provienen de pruebas estándar (en anaranjado), en comparación con aquellos que muestran epistasis antagonista y provienen de pruebas no estándar (en verde agua).

Por otro lado, la mayoría de los resultados asociados a epistasis sinérgica (valores negativos de epistasis) provienen de pruebas no estándar, con excepción de uno. Cabe señalar que sólo cinco de los resultados asociados con epistasis sinérgica, provenientes de pruebas no estándar, superaron el umbral de significancia (representado con las líneas de color rosa).

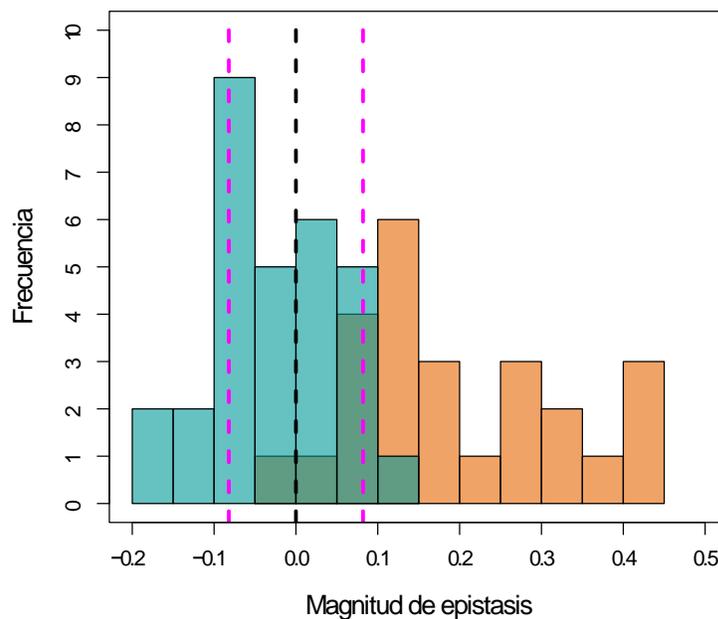


Figura 5.3: Histograma de magnitudes de epistasis. Las barras en color azul representan la frecuencia de las magnitudes de epistasis provenientes de pruebas no estándar, mientras que las barras en color anaranjado representan la frecuencia de aquellas magnitudes provenientes de pruebas estándar; las partes sombreadas corresponden al solapamiento de ambas barras. La línea punteada negra indica la ausencia de epistasis; las líneas color rosa indican los umbrales de significancia (0.082).

Las figuras 5.4 *a* y *b* muestran la relación entre los valores de adecuación observados y esperados para el conjunto de 55 pruebas (estándar y no estándar) y las 31 pruebas que resultaron significativas, respectivamente. Los cinco puntos rojos que se encuentran en

la parte inferior de la gráfica 5.4 *b* representan las únicas interacciones epistáticas de tipo sinérgica encontradas que resultaron significativas. La línea recta, en ambas figuras, representa el efecto esperado a partir de un modelo nulo multiplicativo, es decir, ausencia de epistasis. En este punto es importante recordar que los efectos observados corresponden a las partes de las pruebas donde se representan los efectos conjuntos de las mutaciones. Para el caso de las pruebas estándar, los efectos observados coinciden con la parte de la prueba donde se encuentra el genotipo silvestre (DZF1) (ej. $(W_s)(W_{xy})$). Por otro lado, debido a que las pruebas no estándar no contaban con el genotipo silvestre como guía y la mayoría de genotipos presentaban efectos conjuntos de las mutaciones involucradas (ej. $(W_{D9})(W_{A2/C2/D9}) - (W_{A2/D9})(W_{C2/D9})$), se consideraron como efectos observados las partes de las pruebas donde se encontraba el fondo genético mutante (D9 en el ejemplo anterior).

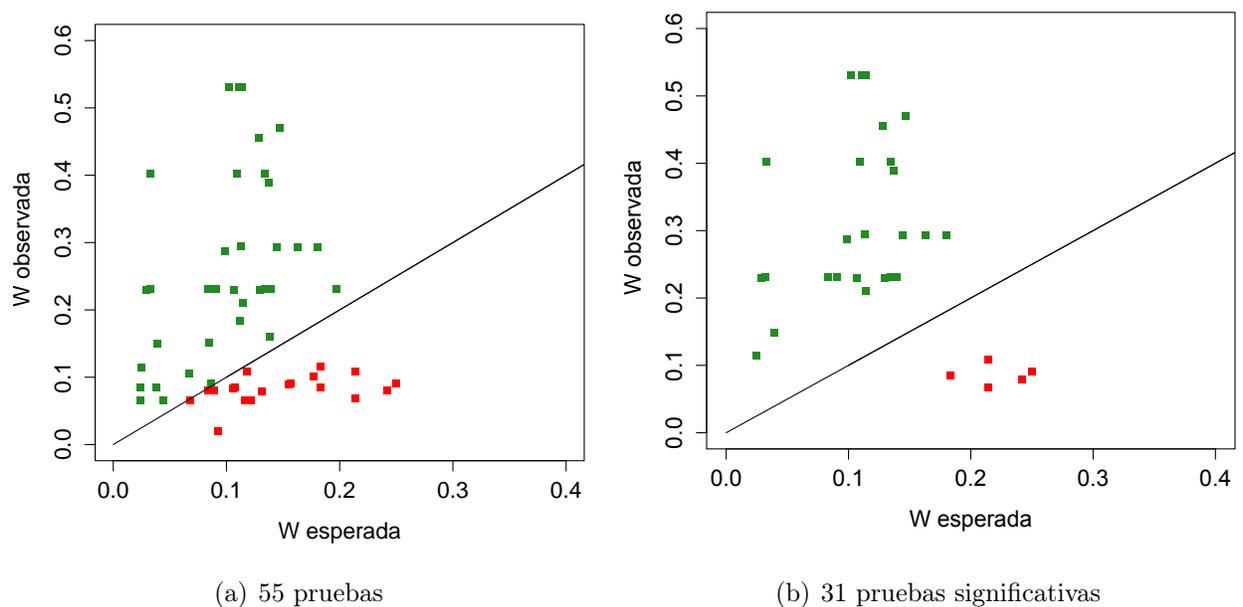


Figura 5.4: Relación entre los efectos observados y los efectos esperados: a) de las 55 pruebas obtenidas; b) de las 31 pruebas cuyas magnitudes de epistasis resultaron significativas. Las líneas que cruzan ambas gráficas representan los efectos esperados a partir del modelo multiplicativo nulo ($W_x \cdot W_y$), es decir, ausencia de epistasis. Los puntos verdes y rojos en ambas gráficas representan epistasis antagonista y sinérgica, respectivamente.

Como se mencionó en la sección de introducción, existen varios métodos a través

de los cuales se pueden llevar a cabo análisis de interacciones epistáticas. La figura 5.5 corresponde a un método diferente de análisis de interacciones epistáticas, denominado por De Visser et al. (2011) como análisis de epistasis unidimensional.

En la figura 5.5 se examina el comportamiento de determinado número de mutaciones deletéreas (cuatro para el caso de este trabajo) en busca de desviaciones a partir de la disminución lineal del valor de adecuación en escala logarítmica.

La curva generada por la unión de los puntos rojos, los cuales representan los promedios de los valores de adecuación en escala logarítmica de los genotipos con 1, 2, 3 y 4 mutaciones respectivamente, concuerda con la representación teórica de epistasis positiva (Kouyos et al., 2007).

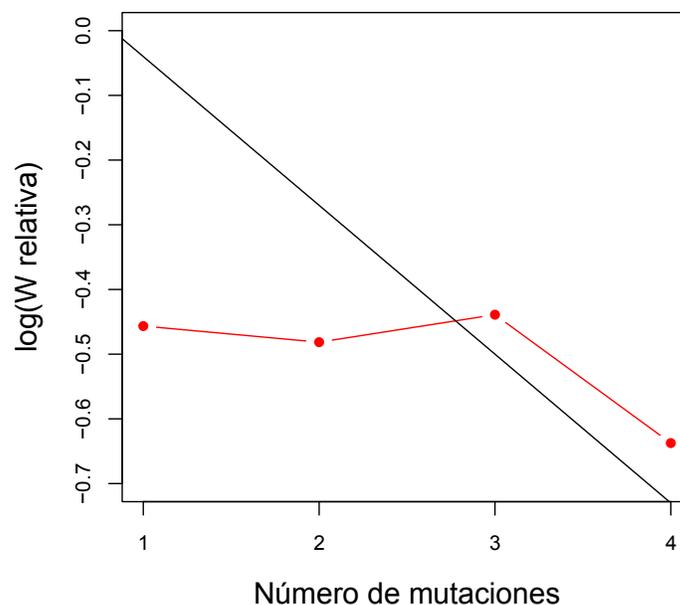


Figura 5.5: Cambio en el valor de adecuación al ir acumulando mutaciones. Los puntos rojos muestran el promedio de los valores de adecuación (mostrados en la tabla 4.2 de la sección de métodos) en escala logarítmica de las cepas mutantes compuestas por el mismo número de mutaciones, es decir, por 1, 2, 3 y 4 mutaciones respectivamente. La línea recta representa la ausencia de epistasis.

5.4. Interpretación de pruebas y emergencia de patrones.

Solamente las 31 pruebas que resultaron significativas (marcadas con asteriscos en la tabla 5.1) fueron consideradas para un análisis más detallado. El análisis detallado de dichas pruebas consistió en interpretarlas, compararlas con otras pruebas de relevancia y buscar patrones en los tipos de epistasis resultantes de cada una de ellas. La interpretación y comparación de las 31 pruebas significativas puede ser consultada en la tabla B.1.

La interpretación de las pruebas dependió de sus respectivos órdenes y de la o las mutaciones que constituían su fondo genético. Por ejemplo, la prueba no estándar (D1/D9)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2/D9)(A2/D1/D9) permitió predecir el comportamiento y la magnitud de la epistasis entre las mutaciones A2 y C2 bajo un fondo genético mutante D1/D9. Como el lector podrá corroborar, tanto la mutación D1 como la mutación D9 se encuentran en todos los genotipos que componen la prueba, por lo que las mutaciones D1 y D9 constituyen, en este ejemplo, el fondo genético mutante bajo el cual se analizó la interacción epistática de las mutaciones A2 y C2. De esta forma, se analizaron interacciones epistáticas de cuarto orden entre las mutaciones que la constituyen.

En los siguientes párrafos se presentan los resultados más sobresalientes de las comparaciones de las pruebas que resultaron significativas con otras pruebas relevantes (ver tabla B.1), las cuales permitieron evaluar y predecir el comportamiento de las mutaciones de los genes codificantes para cinasas de la red de regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*, bajo diferentes contextos genéticos.

Como se puede ver en la tabla B.1, las pruebas estándar que miden epistasis de tercer orden fueron comparadas con pruebas que miden epistasis de segundo orden. Dichas comparaciones permitieron conocer el efecto que tiene la interacción de una mutación simple con una mutación doble.

Al comparar las pruebas 1, 3, 5, 19, 21, 28, 29, 30 y 31 de la tabla B.1, con sus respectivas pruebas relacionadas, se logró identificar que el signo de la epistasis puede cambiar al cambiar el fondo genético, dando lugar a una variante de un fenómeno conocido como epistasis de signo. Dichos casos de epistasis de signo son discernibles solamente cuando las

comparaciones realizadas involucran a las interacciones A2/C2/D9 y A2/D1/C2/D9, analizadas bajo diferentes fondos genéticos. Por esta razón, se podría decir que solamente estas dos interacciones dan lugar a fenómenos de epistasis de signo al ser modificado su fondo genético. De estos nueve casos identificados como epistasis de signo, solamente seis de ellos presentaron magnitudes de epistasis significativas (pruebas 1, 19, 28, 29, 30 y 31 de la tabla B.1).

Las respectivas comparaciones de las pruebas no estándar, con epistasis sinérgica significativa (ver tabla B.1), permitieron observar cómo varía el signo y la intensidad de la epistasis al cambiar el fondo genético y en qué proporción este cambio depende del fondo genético. Como resultado de dicha comparación, se puede ver que al quitar el fondo genético las interacciones analizadas se vuelven antagonistas. Por otro lado, al simplemente cambiar las mutaciones que constituyen el fondo genético, el estado sinérgico se mantiene.

También, se observó que la presencia de fondos genéticos mutantes (de cualquier orden) provoca que la magnitud de epistasis disminuya. La figura 5.6 ilustra la disminución de la magnitud de la epistasis, a medida que aumenta el número de mutaciones en el sistema genético en estudio. Cabe señalar que dicha disminución puede deberse al aumento del número de mutaciones que conforman el fondo genético mutante o a las mutaciones introducidas en sistemas en donde no existe un fondo genético mutante, como es el caso para pruebas estándar que analizan epistasis de 2º, 3º y 4º orden.

Al comparar las pruebas (DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D9)(A2/D1/C2) y (DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1)(A2/C2/D9), que miden epistasis de cuarto orden entre una mutación simple y una mutación triple, con pruebas que miden epistasis de tercer orden entre una mutación simple y una mutación doble, se puede ver que las pruebas de cuarto orden muestran una magnitud de epistasis mayor solamente cuando las pruebas de tercer orden presentan interacción de una mutación simple con la mutación doble A2/C2. A partir de lo anterior, es importante recordar que la mutación A2/C2 bajo un fondo genético D1, comparada con la prueba (DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2), que mide la epistasis entre las mutaciones A2 y C2, presenta una disminución en la magnitud de epistasis.

Por otro lado, la prueba (DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1)(C2/D9) presenta una magnitud

de epistasis intermedia a la de las pruebas con las cuales fue comparada. Esto es un claro ejemplo de que la magnitud de la interacción de determinadas mutaciones puede aumentar o disminuir, dependiendo del contexto génico en el que se encuentren.

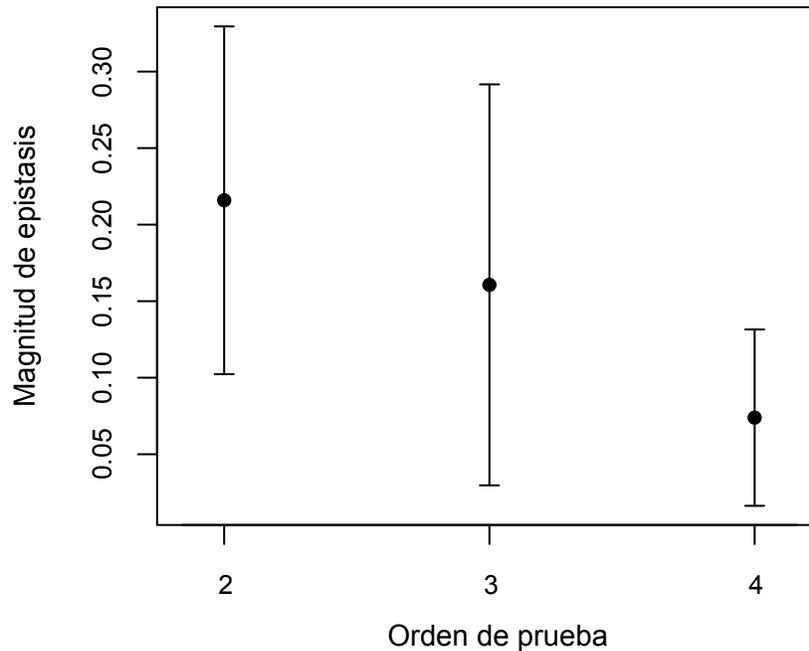


Figura 5.6: Disminución de la magnitud de la epistasis a medida que aumenta el número de mutaciones analizadas u orden de las pruebas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de cada grupo de datos.

Al comparar las interacciones A2/C2/D9 y A2/D1/C2/D9 bajo fondos genético silvestres y bajo fondos genéticos mutantes, se logró discernir que el signo de la epistasis puede cambiar al cambiar el fondo genético, dando lugar a una variante de un fenómeno conocido como epistasis de signo. Estos dos casos de epistasis de signo fueron los únicos significativos; pueden ser visualizados en la figura 5.7.

Todas las comparaciones con la prueba $(D1/D9)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2/D9)(A2/D1/D9)$, corroboran que el fondo genético puede ser un factor de gran importancia en la disminución de la magnitud de epistasis.

Con la finalidad de facilitar la identificación de posibles patrones emergentes de los datos correspondientes a los tipos de epistasis de las 31 pruebas significativas (ver tabla 5.1), éstos

son mostrados de manera ordenada en la figura 5.7. En dicha figura (5.7), la primer columna y la primera fila representan la interacción que se está analizando y el fondo genético en el que se lleva a cabo dicha interacción, respectivamente. Cabe señalar que debido a la existencia de pruebas redundantes (pruebas que analizan interacciones entre las mismas mutaciones), el tipo de epistasis representado en algunas de las casillas de la figura 5.7 corresponde al tipo de epistasis encontrado en todas las pruebas que son significativas y redundantes entre sí. Por ejemplo, la interacción A2/D1/C2/D9, en un fondo genético silvestre, fue asociada con epistasis antagonista (marcada con color verde). Esto se debió a que las 6 pruebas significativas que analizan la interacción A2/D1/C2/D9 en un fondo genético silvestre (pruebas 19, 20, 22, 23, 24 y 25 de la tabla 5.1), presentaron el mismo tipo de epistasis (antagonista).

	Fondo genético										
	DZF1	A2	D1	C2	D9	A2/D1	D1/C2	D1/D9	A2/C2	A2/D9	C2/D9
A2/D1											
D1/C2											
D1/D9											
A2/C2											
A2/D9											
C2/D9											
A2/C2/D9											
D1/C2/D9											
A2/D1/D9											
A2/D1/C2											
A2/D1/C2/D9											

 Epistasis antagonista
 Epistasis sinérgica

Figura 5.7: Tipo de epistasis encontrada a partir de la interacción significativa de diferentes mutaciones en distintos fondos genéticos. En color rojo son representados casos de epistasis negativa sinérgica; en color verde son representados casos de epistasis positiva antagonista.

A partir de la figura 5.7 se puede apreciar que la epistasis antagonista predomina en las pruebas estándar que miden epistasis de segundo, tercer y cuarto orden bajo fondos genéticos silvestres (ver figura 5.7), siendo encontrado sólo un caso, no significativo y por

lo tanto no mostrado en la tabla 5.7, de epistasis sinérgica; correspondiente a la prueba (DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1). Cabe señalar que, como se muestra en el la red de desarrollo de la figura 1.8, ninguna de las proteínas cinasas en estudio se encuentran interactuando directamente, sin embargo lo hacen a través de proteínas asociadas a múltiples cinasas (Mkaps). En cuanto a la epistasis sinérgica significativa se refiere, ésta fue predominante en pruebas no estándar.

En la figura 5.7 también es posible visualizar los únicos dos casos (A2/C2/D9 y A2/D1/C2/D9 al cambiar pasar de un fondo genético silvestre a uno mutante) de epistasis de signo significativa.

Por último, al llevar a cabo un análisis como el mostrado en la figura 5.7, utilizando los tipos de epistasis de las 55 pruebas (significativas y no significativas), se dieron tres casos en los que no coincidieron los tipos de epistasis de las pruebas redundantes, es decir, algunas pruebas redundantes presentaron epistasis sinérgica, mientras que otras presentaron epistasis antagonista. Estos casos fueron marcados con color azul y clasificados como inconsistentes en la figura C.1.

Capítulo 6

Discusión

6.1. Recapitulación del proyecto y de los resultados.

El presente trabajo de tesis consistió en identificar, cuantificar y analizar interacciones epistáticas ocurridas entre mutaciones *knockout* o deleciones de las cuatro Ser/Thr proteínas cinasas que componen a la red genética involucrada en la formación de cuerpos fructíferos y esporas durante la fase de desarrollo de la mixobacteria *M. xanthus* (ver figura 1.8) (Nariya and Inouye, 2005).

El análisis de interacciones epistáticas fue llevado a cabo a partir de las 55 pruebas generadas por el programa *fitness.m2*, que utiliza como base el modelo multiplicativo (ver tabla 5.1). Cada una de las 55 pruebas está constituida por cuatro genotipos correspondientes a las 16 cepas utilizadas en esta tesis, por lo que, en total, estas 55 pruebas corresponden a todas las combinaciones posibles compuestas por cuatro variables que presentan significado biológico. De acuerdo a la definición “fisheriana” de epistasis (utilizada en esta tesis), la cual se refiere a una desviación de los efectos esperados debido a las interacciones de determinados genes o mutaciones (Wolf et al., 2000; Kouyos et al., 2007; Phillips, 2008), las desviaciones de los efectos esperados indicarán presencia de epistasis. Por esta razón, el resultado de cada una de las 55 pruebas mostradas en la tabla 5.1, corresponde a la magnitud de epistasis encontrada

entre las mutaciones que componen a cada prueba.

Tomando en cuenta que en este trabajo se utilizaron solamente mutaciones deletéreas (mutaciones que disminuyen el valor de adecuación en relación a la cepa silvestre), los resultados con signo positivo corresponden a interacciones epistáticas positivas de tipo antagonista. Por otro lado, resultados negativos son asociados con epistasis negativa de tipo sinérgica (ver figura 1.1).

Como se puede ver en la tabla 5.1, todos los resultados de las pruebas fueron diferentes a cero, por lo que se podría decir que todas las pruebas presentan señales de epistasis. En términos del comportamiento de las mutaciones (independiente o interactuante), este resultado indica que las mutaciones están interactuando entre sí, incluso, bajo diferentes fondos o ambientes genéticos. La presencia de epistasis en todas las pruebas puede deberse a que los loci con efectos más severos, como aquellos que se encuentran eliminados en este trabajo, son más propensos a mostrar epistasis, a diferencia de aquellos loci cuyos efectos genéticos son más sutiles. Esto puede deberse a que perturbaciones más grandes son más propensas a quebrantar la estructura del sistema genético (Phillips, 2008). Por último, cabe señalar que los resultados diferentes de cero, los cuales indican presencia de epistasis, pueden ser producto de errores en la medición de la eficiencia de esporulación de las cepas. Con respecto a esto, la determinación de la significancia de la epistasis encontrada es algo que podría estar ayudando a disminuir la consideración de casos falsos positivos.

6.2. Presencia de epistasis en la red génica de *Myxococcus xanthus*.

En la tabla 5.1 y la figura 5.2, se muestra la frecuencia de los tipos de epistasis encontrados a partir de las 55 pruebas realizadas. En la tabla y la figura antes mencionadas, se puede ver que en la red de PSTKs involucrada en el desarrollo de *M. xanthus*, la epistasis positiva de tipo antagonista es más abundante que la epistasis de tipo sinérgica. Estos resultados no se asemejan a lo encontrado por Elena y Lenski (1997), que reportaron que

la frecuencia de epistasis sinérgica es prácticamente la misma que la frecuencia de epistasis antagonista, al insertar mutaciones aleatorias en *Escherichia coli* (Elena and Lenski, 1997). Por otro lado, Lalić et al. (2012) reportó que, al menos en virus de RNA, la epistasis de tipo positiva es más abundante que la de tipo negativa. De igual forma, a partir de la revisión bibliográfica de análisis de interacciones epistáticas llevados a cabo en diferentes organismos, Sanjuán et al. (2004) concluyeron que en organismos con genomas simples (genomas compuestos por pocos genes y con bajos niveles de redundancia genética), como los genomas de virus y bacterias, la presencia de epistasis antagonista es más común. Esto último puede deberse a que múltiples mutaciones afectarán más frecuentemente partes esenciales de los módulos funcionales (Sanjuán and Elena, 2006).

En párrafos anteriores se mencionó que las interacciones epistáticas encontradas en la red de PSTKs (involucrada en el desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*) fueron predominantemente de tipo antagonista (ver figuras 5.1, 5.2 y 5.3). Debido a que la epistasis antagonista se refiere a que los efectos de las mutaciones utilizadas van a ser menores a lo esperado, la presencia de epistasis positiva de tipo antagonista en la red de PSTKs reducirá los efectos de las mutaciones *knockout* realizadas sobre cuatro genes codificantes para cinasas de dicha red.

La posible atenuación de los efectos deletéreos de las mutaciones realizadas en la red de desarrollo de *M. xanthus* podría estar permitiendo que organismos que tienen la mayoría de los genes que codifican para cinasas eliminados, como es el caso de las mutantes cúadruples, sigan produciendo esporas con una tasa similar a la de aquellas mutantes con dos o tres de estos genes mutados (ver tabla D.1).

Como el lector recordará, la red de PSTKs en la cual se basa este trabajo está involucrada en la regulación negativa del desarrollo de *M. xanthus*, es decir, la función de esta red es frenar o retardar el programa de desarrollo de este organismo. Por esta razón, la presencia de mutaciones en la red de PSTKs va a provocar que el programa de desarrollo se adelante, impidiendo la adecuada generación, diferenciación y maduración de cuerpos fructíferos y esporas, con respecto a la cepa silvestre DZF1. Debido a esto, el carácter atenuante de las interacciones epistáticas encontradas en el presente trabajo permitirá que el desarrollo

de *M. xanthus* no se vea comprometido. Sin embargo, a pesar de que la epistasis podría estar atenuando los efectos negativos de las mutaciones con respecto al número de cuerpos fructíferos generados y esporas producidas, la viabilidad de estas esporas podría estar siendo fuertemente afectada. Lamentablemente, para este trabajo no se contó con los datos de viabilidad de esporas de todas las cepas mutantes, por lo que no fue posible analizar los efectos epistáticos con respecto a este rasgo.

6.3. Interpretación de la epistasis.

La palabra epistasis puede referirse a diferentes cosas (Phillips, 2008), por esta razón, la interpretación y contextualización biológica de la presencia o ausencia de epistasis en sistemas génicos va a depender de a qué nos estamos refiriendo con el término epistasis. A su vez, el término de epistasis al cual nos refiramos estará íntimamente ligado al tipo de mutaciones que se estén utilizando. Con respecto a esto, es pertinente recordar que las mutaciones utilizadas en el presente trabajo son deleciones (también conocidas como mutaciones *knockout*) que no generan ningún producto (ej. proteínas), por lo que no es posible su interacción física *per se*. En el caso de este proyecto, y como se ha señalado anteriormente, el término interacciones se refiere a la dependencia del efecto que tienen las mutaciones con respecto al fondo genético en el que se encuentran y no a la interacción física directa. De esta forma, la interpretación de las interacciones epistáticas entre deleciones de los genes que codifican para cinasas de la red de desarrollo de *M. xanthus*, se basa en los diferentes efectos que pueden tener estas mutaciones en la eficiencia de esporulación de los organismos, al presentarse diferentes contextos genéticos. Por esta razón, las interacciones epistáticas entre las PSTKs no se refieren a lo mismo y podrían, incluso, no ser consecuencia de las interacciones (representadas a través de aristas o conectores) mostradas en la red de regulación en estudio (figura 1.8). Esta diferencia entre interacciones epistáticas e interacciones de una red de regulación da lugar a que estos dos tipos de interacciones sean representadas a través de redes con topologías diferentes. La red correspondiente a las interacciones epistáticas es

llamada red de interacciones génicas (Baryshnikova et al., 2013; Mackay, 2014).

Por otro lado, en el caso de aquellas mutaciones que no impiden la formación de un producto proteico o de cualquier otro tipo, el término epistasis también podría hacer referencia a las interacciones físicas entre las moléculas resultantes de dichas mutaciones. Phillips (2008) se refiere a este tipo de epistasis como epistasis funcional. Con respecto a este tipo de epistasis, Lehner (2011) ha propuesto varios mecanismos moleculares que podrían estar dando lugar a interacciones epistáticas entre mutaciones. A grandes rasgos, los mecanismos propuestos por Lehner (Lehner, 2011) se dividen en dos tipos: intramoleculares (dentro de la misma molécula pero entre diferentes loci) o intermoleculares (entre diferentes loci de diferentes moléculas). Lamentablemente, aún no se cuenta con estudios experimentales que indiquen los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo las interacciones entre mutaciones a nivel molecular (Lehner, 2011).

Al considerar la epistasis como las interacciones físicas entre las moléculas, lo más lógico sería pensar que mientras más genes hubiera en el sistema habría mayor cantidad de interacciones epistáticas, aunque posiblemente la magnitud de éstas disminuiría. Esto puede ser explicado de la siguiente forma:

Suponiendo que las mutaciones de los genes que codifican para las cuatro proteínas cinasas utilizadas en este trabajo generaran algún producto mutante, a partir de la similitud de los dominios catalíticos de dichas proteínas cinasas, teóricamente es factible pensar que si estas proteínas regulan su actividad catalítica entre sí mismas (fungiendo como ligandos naturales unas de otras como es el caso de algunas cinasas), pueden competir entre ellas por los sitios de unión disponibles de proteínas cinasas vecinas.

De esta forma, esta competencia por los sitios de unión, podría provocar que a mayor cantidad de genes o mutaciones de proteínas cinasas en el sistema, aumente el número de interacciones epistáticas pero disminuya la magnitud de las mismas.

Por otro lado, tomando en cuenta que la función de la gran mayoría de las proteínas depende de sus interacciones con otras moléculas y que estas interacciones están relacionadas con la estructura dinámica de la proteína (Nelson and Cox, 2008), podríamos suponer que el fondo genético tiene una fuerte influencia sobre la presencia y la forma en la que se llevan

a cabo las interacciones epistáticas en un sistema génico. De esta forma, el fondo genético podría afectar la afinidad que tienen los loci o productos mutantes entre sí, ya que podría estar interactuando directamente con las mutaciones y por lo tanto, compitiendo con otras mutaciones por los sitios de interacción de determinada mutación.

Es importante recalcar que todo lo anterior es mera especulación y que es necesario realizar más investigación, principalmente experimental, para dilucidar la esencia molecular de la relación entre el fondo genético mutante y las interacciones entre mutaciones.

6.4. Papel del fondo genético en la determinación del fenotipo.

Otro punto que es muy importante discutir es el hecho de que es muy difícil discernir si el efecto sobre el fenotipo se debe simplemente a la interacción entre las mutaciones o a la interacción de éstas con el fondo genético (Gerlai, 1996). Las comparaciones de las pruebas estándar, que miden epistasis entre ciertas mutaciones, con pruebas no estándar, que analizan respectivamente las mismas interacciones pero bajo diferentes fondos genéticos (ver tabla B.1), proporcionan una idea del papel que juega el fondo genético con respecto a las interacciones epistáticas. Tomando en cuenta el análisis de aquellas pruebas que presentan las mismas mutaciones pero ordenadas de diferentes formas, se esperaría que al estar involucradas las mismas mutaciones se obtuviera la misma o una magnitud de epistasis aproximada, pero esto no es así. Por esta razón, algo que es de suma importancia discutir es el papel que está jugando el ordenamiento en el que se presentan las mutaciones y cuáles de éstas conforman al fondo genético.

Con la finalidad de ilustrar el problema de la desigualdad provocada por el ordenamiento de las mutaciones, se presenta el siguiente ejemplo:

Considerando tres loci (A, B y C), se pueden generar cuatro combinaciones donde

se encuentren dichos loci en diferente orden: $(A/B)(C)$ que representa la interacción entre los genes A y B bajo un fondo genético C; $(B/C)(A)$ que representa la interacción entre los genes B y C bajo un fondo genético A; $(A/C)(B)$ que representa la interacción entre los genes A y C bajo un fondo genético B; $(A/B/C)$ que representa la interacción entre los genes A, B y C bajo un fondo genético silvestre.

Si las combinaciones anteriores presentan diferentes magnitudes de epistasis, aún estando compuestas por las mismas mutaciones surge la pregunta ¿a qué se debe la diferencia de sus magnitudes y qué mecanismos se encuentran detrás de esto?.

No es claro por qué se generan diferencias en la magnitud de epistasis de las interacciones mostradas en el ejemplo anterior, siendo que todas involucran mutaciones en los mismos loci (A, B y C). Para poder dilucidar de dónde proviene dicha diferencia, es de suma importancia tener una definición sólida de fondo genético mutante y de la diferencia de éste con una mutación normal. Como el lector recordará, en las primeras secciones del presente trabajo de tesis, se dio una definición de fondo genético, lamentablemente no se encontró en la bibliografía consultada una definición de fondo genético mutante.

Dada la naturaleza y definición del fondo genético (Yoshiki and Moriwaki, 2006), la existencia de un fondo genético mutante solamente sería posible si se cumplieran la siguiente condición:

- Que las mutaciones se hicieran siguiendo una secuencia temporal, es decir, que primero se realizara la delección de un gen, dando oportunidad a que el sistema reaccione a esta primera mutación, y posteriormente hacer la delección de otro(s) gene(s). De esta forma, al hacer la segunda delección se estaría trabajando con un fondo genético mutante previamente generado.

La idea expuesta en el punto anterior presenta mucha similitud con el término de contingencia histórica propuesto por el biólogo evolutivo Stephen Jay Gould (Blount et al., 2008). Dicho término se refiere a que el efecto que tenga una mutación surgida por azar sobre el fenotipo de un organismo, va a depender de las mutaciones que hayan surgido previamente y de cómo dichas mutaciones interactúen entre sí. De esta forma, se ha propuesto que la

contingencia histórica y la epistasia están relacionadas intrínsecamente (Blount et al., 2008; Zee et al., 2014).

Por otro lado, tomando como referencia el protocolo de la técnica más común para la generación de mutaciones *knockout* o deleciones (Snustad and Simmons, 2012; Hutchings and Key, 2008), se podría pensar que las mutaciones de los genes que codifican para cinasas de la red de desarrollo de *M. xanthus*, fueron generadas en una secuencia temporal como la descrita en el punto anterior (Escalante et al., 2012; Nariya and Inouye, 2003, 2005, 2006), dando lugar a la posibilidad de generar fondos genéticos mutantes. De no ser así, las pruebas que involucran un fondo genético mutante en su análisis (pruebas no estándar), serían meras predicciones del posible comportamiento de las interacciones de determinadas mutaciones, bajo diferentes fondos genéticos mutantes.

Con la finalidad de ilustrar mejor la condición desarrollada en el punto uno, a continuación se muestra un ejemplo:

La prueba $(D1/D9)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2/D9)(A2/D1/D9)$ analiza la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético mutante D1/D9. Si se realizaran las mutaciones de los genes A2, D1, C2 y D9 al mismo tiempo, se estaría generando una mutación cuádruple bajo un fondo genético silvestre. Por esta razón, para este ejemplo, el fondo genético mutante D1/D9 existirá sólo si esta mutación doble se hace primero y después las mutaciones simples A2 y C2. Si esto sucede, se podrá hacer distinción entre la interacción de las mutaciones A2 y C2, bajo un fondo genético mutante D1/D9, de una mutación cuádruple A2/D1/C2/D9.

En caso de que estas suposiciones no se cumplieran, el término de fondo genético mutante carecería de sentido, ya que no podría discernirse entre dicho término y el concepto de interacción entre dos mutaciones.

De esta forma, la secuencia en la que se van realizando las mutaciones en el sistema también podría jugar un papel muy importante en la determinación del fenotipo, ya que la primera mutación realizada podría interactuar con el fondo genético silvestre y generar un efecto que podría afectar el comportamiento de la segunda mutación realizada.

La condición del punto uno, descrita en párrafos anteriores, podría ser extrapolada a interacciones o existencia de fondos genéticos compuestos por las mismas mutaciones. Para

esto, los genes cuyas mutaciones se están analizando deberían de tener más de una copia en el genoma del organismo en estudio (como es el caso en organismos diploides). Si esta condición se cumpliera, sería posible analizar la interacción entre las mutaciones del mismo gen o el comportamiento de determinada mutación bajo un fondo genético compuesto por la mutación del mismo gen.

Dejando a un lado la redundancia que presentan las pruebas y los aspectos técnicos para lograr un fondo genético mutante, los resultados de los análisis realizados (mostrados en la tabla 5.1) sugieren que la presencia del fondo genético disminuye la magnitud de la epistasis encontrada, por lo que es un factor determinante de la magnitud con la que se lleva a cabo la epistasis entre ciertas mutaciones. La disminución de la magnitud con la que se presenta la epistasis, provocada por la presencia de fondo genético, y en general por el aumento de mutaciones en el sistema, es representada en la figura 5.3 y 5.6 de la sección de resultados. Como se puede ver a partir de lo discutido en esta sección, el fondo genético podría estar jugando un papel muy importante en la generación de interacciones epistáticas y por lo tanto en la determinación de los fenotipos de los organismos. Tomando como ejemplo el fenotipo cuantitativo utilizado en este trabajo (eficiencia de esporulación) y a partir de los resultados obtenidos, se puede ver que la determinación del número de esporas producidas durante la etapa de desarrollo de *M. xanthus* va más allá de la simple presencia o ausencia de algunos de los genes involucrados en la generación de este rasgo. De esta forma, y a partir de la identificación de interacciones epistáticas en la red de desarrollo ya mencionada, es muy factible pensar que la interacción entre mutaciones y de éstas con diferentes fondos genéticos va a tener efectos no lineales en la determinación de diferentes tipos de fenotipos.

6.5. Patrones emergentes del análisis de interacciones epistáticas en la red de PSTKs y contextualización biológica.

A partir de las interpretaciones de las 31 pruebas que resultaron significativas, y de sus respectivas comparaciones con otras pruebas de relevancia (ver tabla B.1), se encontraron algunos patrones que pueden ser visualizados con mayor facilidad en la figura 5.7. En los siguientes párrafos se presenta un breve resumen de dichos patrones, tratándolos de colocar en un contexto biológico.

El primer patrón que se abordará es el comportamiento constante que pueden tener ciertas mutaciones. Por ejemplo, todas las interacciones estándar de segundo orden donde aparecía la mutación D9 o la mutación C2, mostraron epistasis antagonista (ver tabla 5.1 y figura 5.7). Cabe señalar que, como se puede ver en la figura 1.8, estos genes no se encuentran interactuando directamente, sino a través de una proteína asociada a múltiples cinasas (Mkap). Lo anterior permite pensar que algunas mutaciones o genes de un sistema, en este caso D9 y C2, pueden tener comportamientos bien definidos y constantes, no importando la mutación con la que interactúen.

No obstante que algunas mutaciones parecen tener comportamientos constantes al interactuar con otras mutaciones simples, este comportamiento puede cambiar al aumentar el número de mutaciones en el sistema, como se puede ver que sucede al ir aumentando el orden de algunas pruebas mostradas en la tabla 5.1. Con respecto a esto, el análisis de las pruebas parece indicar que el comportamiento constante de ciertas mutaciones puede generarse y eliminarse al pasar de un orden de prueba a otro. Dicho con otras palabras, al analizar pruebas de segundo orden pueden saltar a la vista genes con comportamientos aparentemente constantes pero, al pasar a pruebas de tercer orden los genes que habían sido asociados con un comportamiento constante pueden ya no serlo en este nuevo nivel. De igual forma, es posible que al ir aumentando el número de mutaciones, vayan surgiendo nuevos genes o interacciones de genes con comportamientos constantes. Debido a esto, cada nivel u

orden de prueba podría tener interacciones o loci con comportamientos constantes que sean característicos de cada uno.

El surgimiento de mutaciones o genes con comportamientos constantes puede tener gran impacto a diferentes niveles biológicos. Por ejemplo, en la organización de módulos génicos cuyos comportamientos también se encuentren bien definidos. Con respecto a esto, Segrè et al. (2005) propusieron el término *interacciones monocromáticas*, que se refiere a que módulos funcionales de genes pueden mostrar un tipo de epistasis determinado al interactuar con cualquier otro módulo génico. Incluso, sería posible que el tipo de epistasis mostrado por cierto módulo génico pudiera estar ligado a la función que tiene dicho módulo en el organismo. Por ejemplo, que los genes y módulos que componen cierta ruta metabólica o involucrados en la regulación de cierto rasgo, siempre presenten el mismo tipo de epistasis.

Desde un punto de vista de mapeo genotipo-fenotipo (Alberch, 1991; Pigliucci, 2010), la identificación de loci o interacciones con comportamientos constantes podría ser de vital importancia para la predicción de fenotipos complejos, ya que al tener bien definidos los efectos de ciertas mutaciones, la presencia de éstas en un sistema génico compuesto por gran cantidad de genes podría servir cómo guía para la determinación del fenotipo resultante, al menos de forma general.

Así, la emergencia de comportamientos constantes y rastreables de interacciones entre mutaciones podría ser considerada una ventana de orden dentro de la complejidad inherente a los sistemas biológicos.

Por otro lado, fueron identificados nueve casos de epistasis de signo, de los cuales, solamente seis de ellos fueron significativos. Este tipo de epistasis se refiere a que el efecto de una mutación en el valor de adecuación será benéfica bajo determinado fondo genético y deletérea bajo otro (ver figura 1.1). La presencia de epistasis de signo en la red de PSTKs sugiere que determinadas mutaciones en el sistema pueden revertir los efectos negativos de otras mutaciones e incluso beneficiar al valor de adecuación.

A grandes rasgos, lo anterior permite suponer que la presencia de epistasis podría estar jugando un papel muy importante en la robustez de los sistemas génicos, de tal forma que bajo determinadas circunstancias genéticas se tenga la capacidad de atenuar los efectos de

mutaciones deletéreas. Con respecto a este punto, sería interesante analizar la presencia y el tipo de epistasis en redes génicas muy centralizadas y con bajos niveles de robustez, donde se esperaría encontrar altos niveles de epistasis positiva antagonista que contrarrestara la falta de estas propiedades en la red.

Por último, al comparar las pruebas no estándar significativas, relacionadas con epistasis sinérgica, con pruebas que analizaban las mismas mutaciones bajo fondos genéticos silvestres, se observó que cuando las mutaciones se encontraban bajo fondos genéticos silvestres el carácter de sus interacciones cambian de sinérgico a antagonista. Al cambiar los fondos genéticos bajo los cuales se analizaban las mutaciones, se observó que este cambio no altera el carácter sinérgico de dichas interacciones. Estos patrones pueden ser corroborados en la figura 5.7.

Como conclusión de esta sección, a partir de los patrones mencionados anteriormente, se podrían sugerir las siguientes predicciones:

- Las mutaciones D9 y C2 van a provocar efectos amortiguadores siempre que sus interacciones con otras mutaciones se lleven a cabo bajo fondos genéticos silvestres.
- Al agregar fondos genéticos mutantes a la red de PSTKs, la epistasis predominante en dicha red será de tipo negativa y sinérgica. A su vez, esto provocaría que el proceso de formación de esporas de *M. xanthus*, a través de este mecanismo, se vea comprometido y no sea viable evolutivamente. Para probar esta predicción, sería pertinente corroborar la presencia de fondos genéticos mutantes a través de los métodos experimentales sugeridos en la sección *Papel del fondo genético en la determinación del fenotipo*.
- Redes análogas, involucradas en procesos de desarrollo similares de otros microorganismos, también podrían presentar predominantemente epistasis positiva (antagonista o sinérgica, dependiendo del tipo de mutaciones). Para esto, se debe hacer una revisión en la literatura para buscar si estos datos ya han sido reportados. En caso de no encontrarse dichos datos, sería pertinente desarrollar experimentalmente las respectivas mutantes y llevar a cabo un análisis de interacciones epistáticas, como el realizado en

el presente trabajo.

Cabe señalar que debido a que los patrones mencionados en esta sección pueden ser específicos para esta red y las condiciones bajo las cuales fueron generadas las mutaciones, cualquier predicción general con respecto a epistasis es muy aventurada debido a la naturaleza no lineal de este fenómeno.

6.6. Importancia de la epistasis en el proceso evolutivo.

Como se ha visto hasta este punto, la epistasis tiene gran influencia en la determinación de los valores de adecuación de las cepas, ya que el efecto que tengan los genes, o sus mutaciones, dependerá en muchos casos de cómo se encuentren interactuando entre sí. El valor de adecuación es un componente fundamental de la teoría evolutiva (Matthen and Ariew, 2002; Orr, 2009), tiene gran relevancia para la dinámica de las poblaciones y, por lo tanto, para la evolución de las mismas.

Algunos autores (Beerenwinkel et al., 2006, 2007; Poelwijk et al., 2011; Weinreich et al., 2013) han estudiado la relación de la epistasis con la dinámica evolutiva de las poblaciones, determinado que la epistasis es un factor que moldea y define el paisaje adaptativo de los organismos.

En términos evolutivos, la epistasis podría servir como un mecanismo que le permita a las poblaciones acceder a fenotipos con valores de adecuación a los que no podrían llegar tan rápidamente por simple selección natural. La figura 6.1 ilustra la suposición anterior. En dicha figura se muestra una población que ha alcanzado un fenotipo ubicado en un óptimo local de adecuación (punto en color rojo) y cuyo movimiento evolutivo a través del paisaje adaptativo se encuentra restringido (flechas en color rojo) debido a que la selección natural siempre va a tender a llevar a las poblaciones hacia estados de mayor adecuación y nunca hacia aquellos con menor adecuación (Futuyma, 2005). Tomando este ejemplo en cuenta y debido a que las interacciones epistáticas tienen la capacidad de provocar desviaciones del efecto esperado que tienen las mutaciones sobre los fenotipos y sus respectivos valores de

adecuación, al surgir una nueva mutación en el sistema que interactuara con el fondo genético, teóricamente se podrían generar efectos que provocaran “brincos adaptativos” de un valor de adecuación a otro. A su vez, esto podría permitir el surgimiento de nuevos fenotipos con valores de adecuación más altos, los cuales después de varias generaciones podrían proliferar en la población. Es importante mencionar que otros mecanismos evolutivos, tales como la recombinación (en algunos organismos eucariontes) y la transferencia horizontal de genes (en organismos procariontes), también podrían provocar los “brincos adaptativos” antes mencionados.

Un ejemplo de la influencia que tiene la epistasis en el movimiento evolutivo de las poblaciones hacia nuevos valores óptimos de adecuación, ha sido reportado por Blount et al. (2008). A grandes rasgos, dicho estudio consistió en la generación de cepas de *E. coli* con la capacidad de utilizar citrato como fuente de energía en presencia de oxígeno. La incapacidad de utilizar el citrato como fuente de energía en dichas condiciones, es una característica de las especies de *E. coli*. Por esta razón, el surgimiento de este rasgo, a partir de la evolución de varias generaciones de *E. coli*, sugiere que el camino que tome la evolución va a depender de determinadas mutaciones y del orden en el que vayan surgiendo, es decir, de un efecto de contingencia histórica (Blount et al., 2008). En dicho estudio, se rastrearon las mutaciones surgidas en diferentes tiempos de la historia evolutiva de la población. Como resultado, se observó que a partir del surgimiento de cierta mutación aumentó drásticamente el número de colonias de *E. coli* que utilizaban citrato como fuente de energía en presencia de oxígeno, por lo que le atribuyeron a esta última mutación un efecto potenciador de los efectos mutacionales sobre el valor de adecuación. Como Blount et al. (2008) mencionan, dicho efecto potenciador puede ser producto de interacciones epistáticas entre las mutaciones adaptativas, surgidas a lo largo de la historia evolutiva de las cepas de *E. coli* que evolucionaron la capacidad de utilizar citrato como fuente de energía bajo condiciones de presencia de oxígeno.

Por otro lado, así como la epistasis tiene la capacidad de abrir nuevas rutas de adaptación, también puede limitarlas al disminuir el valor de adecuación de las poblaciones tras eventos de regresiones génicas, tal y como se muestra en el único análisis de interacciones epistáticas

en *M. xanthus* encontrado en la literatura hasta el momento (Zee et al., 2014). En dicho estudio eliminaron el gen *pilA*, que codifica para una subunidad de los pili de tipo IV de *M. xanthus*, a su vez encargados del movimiento social y de la formación de enjambres celulares. A partir de varias mutaciones adaptativas originadas naturalmente en estas cepas mutantes y de varios ciclos de selección, dichas cepas aumentaron su tasa de formación de enjambres celulares con respecto a la cepa mutante inicial ($\Delta pilA$). Posteriormente, el gen *pilA* fue reintroducido en el sistema ya evolucionado y cuya tasa de formación de enjambres era mejor que la mutante inicial. Como resultado de esta reintroducción del gen *pilA*, se observó que después de una acumulación considerable de mutaciones, dicho gen en lugar de restablecer la tasa de formación de enjambres celulares perdida tras su delección, tuvo efectos deletéreos sobre dicho rasgo.

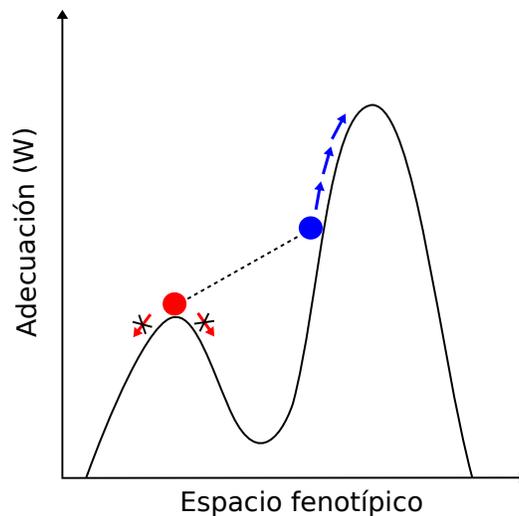


Figura 6.1: Posible efecto evolutivo de la presencia de epistasis en un sistema génico. El punto rojo representa un fenotipo ubicado en un óptimo local, cuya movilidad por selección natural se encuentra restringida. El punto azul representa un fenotipo ubicado en un óptimo general. La línea punteada representa el posible efecto que podría tener la presencia de epistasis en el sistema, provocando que un fenotipo alcance un valor de adecuación al que no podría acceder tan rápidamente por simple selección natural y sin el surgimiento de nuevas mutaciones.

Debido a que la epistasis es un mecanismo que tiene la capacidad de generar variación fenotípica dentro de las poblaciones (Phillips, 2008; Routman and Cheverud, 1995), parece ser un factor fundamental para la dinámica y evolución de las mismas, incluso po-

dría ser relevante a nivel de ecosistema. Cabe mencionar que se han llevado a cabo estudios sobre la generación de variabilidad genotípica y fenotípica dentro y entre poblaciones de *M. xanthus* (Kraemer et al., 2010; Kraemer and Velicer, 2011; Rendueles et al., 2015; Vos and Velicer, 2006, 2009). Se han identificado varios rasgos cuantitativos que presentan mucha variación en poblaciones naturales de *M. xanthus*, como es el caso de la tasa de agregación celular durante el desarrollo, eficiencia de depredación de diferentes presas, tasas de expansión de enjambres celulares, tasas de producción de metabolitos secundarios y eficiencia de esporulación (Kraemer et al., 2010).

La importancia de estudiar cómo se genera la variabilidad dentro y entre poblaciones relacionadas y no relacionadas espacialmente, durante la etapa de desarrollo de *M. xanthus*, es de suma importancia para el estudio de la emergencia de comportamientos sociales, tales como la cooperación y la competencia (Kraemer et al., 2010; Velicer et al., 2013; Vos and Velicer, 2009, 2006). A su vez, dichos estudios podrían ser determinantes para la dilucidar cómo surge la diversidad bacteriana que conlleva a la resistencia a antibióticos (Vos and Velicer, 2006). Por otro lado, Vos et al. (2006) propusieron la posibilidad de que la adquisición de genes por transferencia horizontal y conjugación podría ser un factor fundamental para la generación de variación fenotípica. Sin embargo, debido a que se desconoce la frecuencia con la que las células de *M. xanthus* llevan a cabo los dos procesos antes mencionados, podría considerarse a la epistasis como uno de los mecanismos involucrados en la generación de variabilidad fenotípica a nivel poblacional. Esto es posible debido a que la epistasis no requiere de nuevos genes o mutaciones para generar nuevos fenotipos, o bien, una gama más amplia de éstos. El ejemplo más inmediato de esto podría ser la gran variación que presentaron las réplicas de la cepa silvestre (DZF1) en sus eficiencias de esporulación (ver tabla 4.2 y la figura D.1), pudiendo ser la misma epistasis la razón por la que las barras indicadoras de la desviación media de dicha cepa son las que abarcan un rango de valores más amplio. De esta forma, esta variación en la eficiencia de esporulación podría ser producto de interacciones epistáticas entre mutaciones puntuales generadas naturalmente, tal y como se ha propuesto con anterioridad para *M. xanthus* (Kraemer et al., 2010; Velicer et al., 2013; Vos and Velicer, 2006, 2009).

Bohannan et al. (1999) han sugerido que la epistasis puede tener un papel muy importante en la reducción del “costo” que conlleva generar resistencia a depredadores y por lo tanto en la evolución de este tipo de estrategias de sobrevivencia. En relación a lo anterior, es posible suponer que la epistasis también podría estar jugando un papel central en el surgimiento de fenotipos complejos y transiciones evolutivas, como es el caso del surgimiento de la reproducción sexual. Para explicar esto es necesario tomar como ejemplo la explicación teórica del surgimiento de la reproducción sexual, la cual propone que la epistasis incrementa los efectos deletéreos de las mutaciones, provocando que sea favorecido en gran medida el surgimiento de un mecanismo (reproducción sexual) que purgue dichas mutaciones del sistema (Wolf et al., 2000; Kouyos et al., 2007; Kondrashov, 1988). De igual forma, al colocar el origen del desarrollo en *M. xanthus* en un contexto similar, se podría llegar a la conclusión de que para el origen del desarrollo de *M. xanthus*, o de otras transiciones evolutivas, el gasto de energía y de materia que dicha transición implica, debe ser compensado con alguna ganancia en el valor de adecuación con respecto al fenotipo predecesor. De esta forma, la epistasis podría estar involucrada en la determinación de la ganancia necesaria para que el fenotipo persista. Por último, debido a que uno de los efectos principales de la epistasis es la generación de módulos genéticos, la epistasis podría ser una fuerza evolutiva a este nivel, es decir, a nivel de interacciones y formación de comportamientos emergentes que tuvieran repercusiones en los fenotipos y en la estructura de las poblaciones.

6.7. Análisis de epistasis unidimensional.

Como se mencionó en la introducción y en la sección de resultados, la figura 5.5 corresponde a otro tipo de análisis de interacciones epistáticas (Kouyos et al., 2007). Esta gráfica permite ver el comportamiento del valor de adecuación al ir aumentando el número de mutaciones en el sistema génico en estudio.

De Visser et al. (2011) llaman a la epistasis encontrada a través de este método epistasis unidimensional, mientras que a la epistasis encontrada a través del modelo multiplicativo le

llama epistasis multidimensional.

En la gráfica 5.5, se debe prestar atención a la velocidad con la que disminuye el valor de adecuación al ir aumentando el número de mutaciones, la cual es representada por la pendiente de las líneas entre los puntos.

En este tipo de análisis, la prominente disminución del valor de adecuación es asociada con epistasis de tipo negativa. De forma contraria, la disminución desacelerada del valor de adecuación es asociada con epistasis de tipo positiva, mientras que la disminución con tasa constante se asocia con ausencia de epistasis (ver figura 5.5)(Kouyos et al., 2007).

A partir de lo anterior, se puede ver que la curva presentada en la gráfica 5.5 (en color rojo) corresponde a la representación teórica de epistasis positiva para este tipo de análisis (Kouyos et al., 2007), ya que los valores de adecuación promedio disminuyen menos abruptamente de lo esperado.

Es importante mencionar que la definición de epistasis positiva, dada para los análisis de interacciones epistáticas a través de modelo multiplicativo (epistasis multidimensional), no concuerda con la epistasis positiva representada en la gráfica 5.5.

Como el lector podrá apreciar, en la gráfica 5.5, los puntos correspondientes a los valores de adecuación promedio de los genotipos, con una y dos mutaciones respectivamente, se encuentran por debajo de la línea de efectos esperados o ausencia de epistasis. Esto sugiere que, en promedio, los genotipos con una y dos mutaciones tienen un valor de adecuación menor a lo esperado, a diferencia de lo que sucede con los genotipos con tres y cuatro mutaciones.

Por definición, los puntos uno y dos deberían ser asociados con epistasis negativa de tipo sinérgica, mientras que los puntos correspondientes a los genotipos con tres y cuatro mutaciones se les debería asociar con epistasis positiva de tipo antagonista. Sin embargo, es importante recordar que en la gráfica 5.5 se están tomando en cuenta solamente los promedios de los valores de adecuación de los genotipos con 1, 2, 3 y 4 mutaciones, respectivamente, y que esta gráfica debe ser analizada en términos de las pendientes o velocidades de disminución de los valores de adecuación, a menos que se indique otra cosa (De Visser et al., 2011). De esta forma, la gráfica 5.5 solamente indica que hay epistasis cuando los puntos se desvían de lo esperado pero, debido a que se están utilizando los promedios, a través de dicha gráfica

no se puede saber específicamente entre qué mutaciones y bajo qué fondos genéticos se está dando dicha epistasis, a diferencia de lo que muestra la gráfica 5.4 *b*.

Es interesante observar el efecto del aumento del número de mutaciones sobre el valor de adecuación de las cepas en la gráfica anterior. Al analizar esta gráfica, lo más congruente sería pensar que conforme va aumentando el número de mutaciones en el sistema, el valor de adecuación de los individuos irá disminuyendo cada vez más rápidamente. Contrario a esta suposición está el hecho de que, en promedio, las cepas con tres mutaciones tienen un valor de adecuación mayor que las cepas que contienen una y dos mutaciones, tal y como se muestra en la gráfica 5.5.

Hablando en términos de las pendientes de las líneas entre punto y punto, se puede ver que dichas pendientes son menores a la pendiente de la línea que representa la ausencia de epistasis. Como ya se mencionó anteriormente, este comportamiento se asocia con epistasis positiva para todos los puntos mostrados en esta gráfica.

De esta forma, la gráfica 5.5 se vuelve un ejemplo perfecto de la complejidad que se encuentra detrás de la epistasis.

Por otro lado, no hay que olvidar que cada punto representa el promedio de los valores de adecuación de las cepas con 1, 2, 3 y 4 mutaciones. Esta medida de tendencia central podría esconder los efectos puntuales de cada mutación en cada una de las cepas bajo diferentes fondos genéticos, provocando que, aún en ausencia de epistasis unidimensional, pueda haber presencia de epistasis multidimensional (De Visser et al., 2011).

6.8. Discusión del método.

Debido a que existen diferentes métodos a través de los cuales se pueden llevar a cabo análisis de interacciones epistáticas, tiene relevancia discutir las ventajas y desventajas que conlleva analizar epistasis como las diferencias entre los efectos esperados y los efectos observados a través del modelo multiplicativo, como se realizó en el presente trabajo de tesis. Una de las desventajas que puede tener el realizar análisis de interacciones epistáticas a tra-

vés del modelo multiplicativo es la necesidad de la generación experimental de mutantes de varios órdenes. Esto puede ser todo un reto al trabajar con ciertos organismos.

Otra desventaja es que si la magnitud de epistasis es débil será difícil ganar poder estadístico al determinar la significancia de las pruebas (Kouyos et al., 2007). Este punto será abordado con mayor detalle en párrafos posteriores.

Por otro lado, este método tiene la ventaja de permitir examinar la distribución de los efectos epistáticos, así como la inclusión de mutaciones letales sintéticas (Kouyos et al., 2007).

A su vez, el modelo multiplicativo permite integrar, fácilmente, al análisis pruebas no estándar e incluir fondos genéticos de mayor complejidad. La importancia de estos dos factores radica en que permiten analizar epistasis de orden mayor.

Cabe señalar que las pruebas no estándar solamente habían sido consideradas en un estudio previo llevado a cabo por Beerenwinkel et al. (2007). Por su parte, Weinreich et al. (2013) reportaron presencia de epistasis de mayor orden en la mayoría de los conjuntos de datos publicados relacionados con epistasis, por lo que todo parece indicar que el análisis de pruebas no estándar y en general de epistasis de mayor orden es de gran importancia evolutiva (Weinreich et al., 2013). De esta forma, la inclusión de pruebas no estándar a través del modelo multiplicativo es una ventaja sustancial frente a otros métodos (Beerenwinkel et al., 2007; Lehner, 2011; Weinreich et al., 2013).

Como el lector se habrá percatado, el tipo de análisis, como el que se llevó a cabo en la presente tesis, está centrado en los valores de adecuación de las cepas o poblaciones utilizadas. Debido a esto, el uso de una medida de adecuación incorrecto o el cálculo incorrecto de ésta generará muchos errores en el análisis. A continuación, se mencionan tres ejemplos inmediatos de los problemas que puede generar el uso de un valor de adecuación incorrecto. En este trabajo se utilizó como medida de adecuación (W) la eficiencia de esporulación (Smith et al., 2010; Wu et al., 2013), sin embargo, si en lugar de la eficiencia de esporulación se utilizara el número de esporas (u otra medida), la magnitud y el signo de la epistasis resultante cambiarían. El mismo problema podría surgir al simplemente utilizar otra medida de tendencia central para determinar el valor de adecuación, en caso de que se cuente con más de una réplica de cada cepa. Con la finalidad de indagar en la robustez que presenta

el modelo multiplicativo ante cambios en el valor de adecuación provocados por el uso de diferentes medidas de tendencia central, se llevó a cabo la comparación de los resultados de las 55 pruebas, obtenidos a partir del uso de medias y medianas, respectivamente (análisis mostrado en el apéndice D). A grandes rasgos, dicha comparación sugiere que los resultados provenientes de pruebas no estándar presentan mayor robustez en sus signos, manteniéndolos independientemente de la medida utilizada. Por otro lado, los resultados provenientes de pruebas estándar presentan mayor robustez en sus magnitudes, manteniendo sus significancias al utilizar una u otra medida (ver figura D.2).

Por otro lado, un amplio rango de valores de adecuación absolutos dará lugar a errores en la determinación de los valores de adecuación relativos de las cepas en estudio y, por lo tanto, al llevar a cabo las operaciones propuestas en las pruebas. Un claro ejemplo de un amplio rango de valores de adecuación absolutos son los valores de eficiencia de esporulación de las réplicas correspondientes a la cepa silvestre utilizada en este trabajo (DZF1) (ver tabla 4.2 y figura D.1).

Otro problema que es provocado por el uso de un valor de adecuación incorrecto es la determinación errónea del modelo que se utiliza para llevar a cabo el análisis, la cual podría provocar diferencias drásticas en las magnitudes de epistasis resultantes. En la sección de introducción se mencionó que el análisis de las diferencias entre los efectos esperados y los efectos observados de las mutaciones (epistasis) se podía realizar a través de un modelo aditivo o de uno multiplicativo y que la elección de uno u otro dependerá de la escala en la que se encuentre la medida de adecuación utilizada (Cordell, 2002; Wolf et al., 2000; Mani et al., 2008; Phillips, 1998, 2008; Wade et al., 2001).

Es importante mencionar no se encontraron reportes en la literatura donde se hayan llevado a cabo análisis de interacciones epistáticas utilizando la eficiencia de esporulación como medida de adecuación, por lo que la decisión de utilizar el modelo multiplicativo se basó en que la eficiencia de esporulación no es una medida que se encuentre en escala logarítmica.

Por otro parte, al comparar la gráfica 5.4 *a* y 5.4 *b* se puede ver que el número de pruebas, cuyos resultados fueron significativos, se reduce a poco más de la mitad del número de pruebas generadas en un inicio por el programa *fitness.m2*. Por esta razón, el método a través

del cual se lleva a cabo la determinación de la significancia de las interacciones epistáticas es otro punto de gran importancia en este tipo de estudios, ya que la cantidad de interacciones epistáticas identificadas como significativas en determinado sistema génico dependerá de dicho método.

Debido a que la determinación incorrecta de la significancia de las pruebas puede acarrear muchos problemas y generar falsos negativos y falsos positivos, se propone generar o calibrar un método adaptado al tipo de datos con los que se trabaja en epistasis. Para esto, sería necesario que los análisis de interacciones epistáticas, al menos aquellos realizados en sistemas génicos microbianos, utilizaran la misma medida de adecuación. Esto es de suma importancia y un paso central para el estudio de epistasis.

Como método alternativo al modelo multiplicativo, en esta tesis se pudo haber utilizado el método reportado por Daniel Weinreich para llevar a cabo el análisis de interacciones epistáticas (Weinreich et al., 2013). A grandes rasgos, dicho método consiste en el análisis de los efectos de las mutaciones en relación al valor de adecuación de cada genotipo mutante y al coeficiente de interacción, a través de un método basado en álgebra lineal (Weinreich et al., 2013).

6.9. Perspectivas.

Debido a que no es completamente claro si los fondos genéticos mutantes (utilizados en las pruebas no estándar para analizar el comportamiento de las interacciones epistáticas bajo diferentes contextos genéticos) fueron generados experimentalmente, la principal perspectiva del presente trabajo de tesis sería corroborar la presencia de dichos fondos genéticos mutantes a través de los métodos experimentales sugeridos en la sección *Papel del fondo genético en la determinación del fenotipo*.

Otra perspectiva importante de este trabajo es buscar epistasis en otras redes génicas de *M. xanthus*, no necesariamente involucradas en la fase de desarrollo de este organismo. A partir de estos estudios, se podría determinar si el carácter antagonista de las interacciones,

prevalece, incluso en redes con orígenes evolutivos muy diferentes, o si el tipo de epistasis de un módulo genético es determinado por la función que éste lleve a cabo.

Como se ha visto a lo largo de este trabajo, la epistasis tiene gran relevancia a diferentes niveles y en distintos procesos biológicos. Por esta razón, los alcances que puede tener la investigación en este campo pueden ser enormes. Un ejemplo de la aplicación que puede tener la investigación en epistasis, específicamente el estudio de interacciones epistáticas con comportamientos constantes (ver *Patrones emergentes del análisis de interacciones epistáticas en la red de PSTKs y contextualización biológica*), podría ser en el campo de la biomedicina (Phillips, 2008) y la terapia génica (Misra, 2013), ya que en lugar de tratar de erradicar una enfermedad compleja o multigénica (provocada por la acción de varios genes), podría simplemente atenuársele hasta un mínimo a través de otras mutaciones, donde los daños perjudiciales al organismo fueran nulos.

De forma paralela, el estudio de interacciones epistáticas con comportamientos constantes podría mejorar la caracterización de “partes biológicas”, utilizadas para la construcción de circuitos génicos *de novo* en Biología Sintética (Endy, 2005). De esta forma, una mejor caracterización de la interacción de los componentes genéticos de un sistema permitiría clarificar la incertidumbre existente en la predicción de fenotipos complejos y por lo tanto, de la construcción sintética de nuevos circuitos y funciones biológicas.

Por otro lado, con la finalidad de evitar los problemas que pueden surgir en la estandarización de los valores de adecuación, la elección de un modelo aditivo, multiplicativo u otro tipo de método para llevar a cabo el análisis de interacciones epistáticas y la determinación de significancias, se propone generar una teoría general para llevar a cabo este tipo de análisis utilizando como herramienta principal la teoría de juegos.

Debido a las características y objetivos de la teoría de juegos (Osborne, 1994), se considera que sería una herramienta ideal para desarrollar una teoría general de interacciones epistáticas.

Con la finalidad de estudiar la relación del tipo de epistasis encontrada en un sistema génico con determinados factores evolutivos y biológicos (mencionada anteriormente en esta sección), sería muy importante analizar si la presencia y el tipo de epistasis encontrada en

determinado sistema génico se encuentran asociados a la funcionalidad y, posiblemente, a la historia evolutiva del sistema génico en cuestión. De esta forma, podría encontrarse un patrón que ligara la presencia y/o el tipo de epistasis con la función del sistema génico que se está analizando.

Con respecto a este último punto, se propone que se lleven a cabo análisis de interacciones epistáticas en sistemas génicos análogos de diferentes organismos a los que se han estudiado hasta la fecha. Por ejemplo, debido a que en el presente trabajo de tesis fue utilizada la red de regulación involucrada en el desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*, se sugiere que se lleve a cabo el mismo tipo de análisis en el sistema génico análogo de *Dictyostelium discoideum* y otros organismos que presenten patrones similares de reproducción (formación de cuerpos fructíferos y esporulación) durante alguna fase de su ciclo de vida.

Capítulo 7

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo un análisis de interacciones epistáticas entre las mutaciones *knockout* de cuatro genes que codifican para cinasas de la red de regulación del desarrollo de cuerpos fructíferos y esporulación de *M. xanthus*.

A partir de este análisis, llevado a cabo a través de 55 pruebas basadas en el modelo multiplicativo, fueron identificadas interacciones epistáticas de diferentes magnitudes entre las mutaciones de los cuatro genes antes mencionados. Debido a que en todas las pruebas analizadas el efecto combinado de las mutaciones resultó mayor, y, en pocos casos, menor que el efecto multiplicativo de las mutaciones simples independientes, la hipótesis alternativa planteada fue aceptada. Por esta razón, es posible decir contundentemente que la red de desarrollo de *M. xanthus* contiene interacciones epistáticas. *Cabe señalar que las interacciones epistáticas encontradas en la red de desarrollo de M. xanthus fueron predominantemente de tipo positiva y antagonista, lo que permite suponer que dichas interacciones se encuentran amortiguando los efectos que tienen las mutaciones knockout* de los genes en estudio, sobre la eficiencia de esporulación de las cepas mutantes, permitiendo que incluso las mutantes cuádruples sigan produciendo esporas.

A partir de lo mencionado en párrafos anteriores, se puede decir que se cumplieron todos los objetivos generales y particulares del presente trabajo de tesis.

A su vez, fueron identificadas algunas deficiencias en la terminología utilizada en este tipo de análisis, así como problemas relacionados con el método utilizado. Para ambos casos fueron propuestas soluciones puntuales.

Por último, debido a la gran importancia que tienen las interacciones epistáticas en el comportamiento de sistemas génicos y la determinación de fenotipos complejos, se considera necesario llevar a cabo más investigación teórica y experimental sobre epistasis con la finalidad de unificar el campo de estudio y generar una teoría sólida que sea aplicable en diferentes áreas de la Biología.

Apéndice A

Sistemas de movilidad de *M. xanthus*

A continuación se describen los dos sistemas de movilidad por deslizamiento de *Myxococcus xanthus* (Hodgkin and Kaiser, 1979):

a) Movilidad aventurera (A). La movilidad aventurera es la responsable del movimiento de células individuales. A pesar de que el mecanismo por el cual se lleva a cabo este tipo de movilidad en *M. xanthus* no ha sido descubierto (McBride, 2001; Ward and Zusman, 1999; Wolgemuth et al., 2002), se ha sugerido que podría llevarse a cabo por la acción de complejos porosos en los extremos celulares que propulsan a las células a través de secreciones de sustancias mucilaginosas, similar al mecanismo de propulsión de las cianobacterias (ver figura A.1) (Wolgemuth et al., 2002). Este tipo de movilidad se presenta principalmente durante la fase vegetativa, permitiendo que las células exploren individualmente áreas circundantes al aglomerado celular principal. También se le atribuye ser el mecanismo a través del cual las células individuales comienzan a migrar con dirección a otras células para formar los primeros enjambres celulares (Ward and Zusman, 1999).

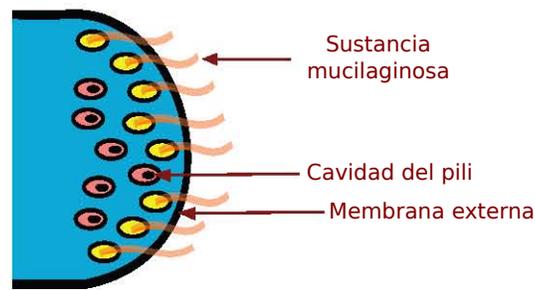


Figura A.1: Posible mecanismo de movilidad aventurera (imagen basada y modificada de McBride (2001); Wolgemuth et al. (2002), respectivamente).

a) Movilidad social (S). Consiste en la contracción y extensión del pili tipo IV de cada bacteria para generar la movilidad celular a través de ataduras de sus respectivos extremos celulares *a* y *b* (ver figura A.2). Debido a que este tipo de movilidad está involucrado en el movimiento de grupos celulares, requiere de interacciones célula-célula. Puede ocurrir en la fase vegetativa, durante la formación de enjambres celulares de mayor tamaño y la cooperación entre células para la obtención de nutrientes, así como también en la fase de desarrollo, durante la agregación celular y la formación de cuerpos fructíferos (Hodgkin and Kaiser, 1979).

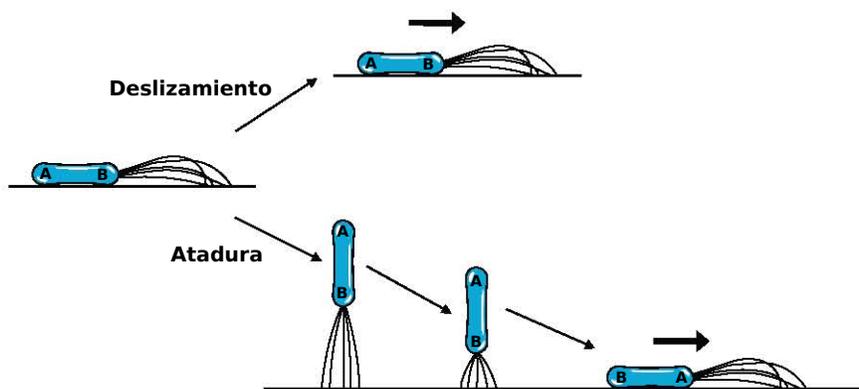


Figura A.2: Modelo de desplazamiento mediado por pili de tipo IV, involucrado en la movilidad social. Las letras *a* y *b* representan los extremos de las células en forma de bacilo (imagen modificada de Sun et al. (2000)).

Apéndice B

Tabla de comparación de pruebas

Tabla B.1: Lista de las 31 pruebas que resultaron significativas al tomar en cuenta un umbral de tres posiciones decimales (0.082). También se enlistan sus respectivas interpretaciones, magnitudes de epistasis y las pruebas con las cuales fueron comparadas. En color rojo se muestran las pruebas relacionadas con epistasis sinérgica.

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
1	$(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156 Mide epistasis de segundo orden entre las mutaciones C2 y D9.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético A2: $(A2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(A2/D9)$ -0.10577
		b) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético D1: $(D1)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(D1/D9)$ 0.06671
2	$(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175 Mide epistasis de segundo orden entre las mutaciones D1 y D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético C2: $(C2)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(C2/D9)$ 0.07203

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		b) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético A2: $(A2)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(A2/D9)$ 0.11001
3	$(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363 Mide epistasis de segundo orden entre las mutaciones A2 y D9.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético C2: $(C2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(C2/D9)$ -0.07569
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético D1: $(D1)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(D1/D9)$ 0.09032
4	$(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909 Mide epistasis de segundo orden entre las mutaciones D1 y C2.	a) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético D9: $(D9)(D1/C2/D9) - (D1/D9)(C2/D9)$ 0.09588
		b) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético A2: $(A2)(A2/D1/C2) - (A2/D1)(A2/C2)$ 0.04704
5	$(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697 Mide epistasis de segundo orden entre las mutaciones A2 y C2.	a) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético D9: $(D9)(A2/C2/D9) - (A2/D9)(C2/D9)$ -0.06698

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		b) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético D1: $(D1)(A2/D1/C2) - (A2/D1)(D1/C2)$ 0.04143
6	$(DZF1)(D1/C2/D9) - (D1)(C2/D9)$ 0.42043 Mide epistasis de tercer orden entre D1 y la doble mutante C2/D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175 b) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
7	$(DZF1)(A2/C2/D9) - (A2)(C2/D9)$ 0.14845 Mide epistasis de tercer orden entre A2 y la doble mutante C2/D9.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363 b) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697
8	$(DZF1)(A2/C2/D9) - (C2)(A2/D9)$ 0.12962 Mide epistasis de tercer orden entre C2 y la doble mutante A2/D9.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156 b) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
9	$(DZF1)(A2/D1/D9) - (D1)(A2/D9)$ 0.26849 Mide epistasis de tercer orden entre D1 y la doble mutante A2/D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)$ -0.02241
10	$(DZF1)(A2/C2/D9) - (D9)(A2/C2)$ 0.11213 Mide epistasis de tercer orden entre D9 y la doble mutante A2/C2.	a) Se compara con la interacción entre D9 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363
11	$(DZF1)(A2/D1/C2) - (D1)(A2/C2)$ 0.09944 Mide epistasis de tercer orden entre D1 y la doble mutante A2/C2.	a) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)$ -0.02241
12	$(DZF1)(D1/C2/D9) - (C2)(D1/D9)$ 0.42927 Mide epistasis de tercer orden entre C2 y la doble mutante D1/D9.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		b) Se compara con la interacción entre de D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
13	$(DZF1)(A2/D1/D9) - (A2)(D1/D9)$ 0.29347 Mide epistasis de tercer orden entre A2 y la doble mutante D1/D9.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363 b) Se compara con la interacción entre A2 y D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)$ -0.02241
14	$(DZF1)(D1/C2/D9) - (D9)(D1/C2)$ 0.41729 Mide epistasis de tercer orden entre D9 y la doble mutante D1/C2.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156 b) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175
15	$(DZF1)(A2/D1/C2) - (A2)(D1/C2)$ 0.12265 Mide epistasis de tercer orden entre A2 y la doble mutante D1/C2.	a) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697 b) Se compara con la interacción entre A2 y D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)$ -0.02241

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
16	$(DZF1)(A2/D1/D9) - (D9)(A2/D1)$ 0.36969 Mide epistasis de tercer orden entre D9 y la doble mutante A2/D1.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363
		b) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175
17	$(DZF1)(A2/D1/C2) - (C2)(A2/D1)$ 0.20046 Mide epistasis de tercer orden entre C2 y la doble mutante A2/D1.	a) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697
		b) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
18	$(D9)(D1/C2/D9) - (D1/D9)(C2/D9)$ 0.09588 Mide epistasis de tercer orden entre mutaciones D1 y C2 bajo un fondo genético D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
		b) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético A2: $(A2)(A2/D1/C2) - (A2/D1)(A2/C2)$ 0.04704
19	$(A2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(A2/D9)$ -0.10577 Mide epistasis de tercer orden entre mutaciones C2 y D9 bajo un fondo genético A2.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		b) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético D1: $(D1)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(D1/D9)$ 0.06671
20	$(A2)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(A2/D9)$ 0.11001 Mide epistasis de tercer orden entre mutaciones D1 y D9 bajo un fondo genético A2.	a) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175
		b) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético C2: $(C2)(D1/C2/D9) - (D1/C2)(C2/D9)$ 0.07203
21	$(D1)(A2/D1/D9) - (A2/D1)(D1/D9)$ 0.09032 Mide epistasis de tercer orden entre mutaciones A2 y D9 bajo un fondo genético D1.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético C2: $(C2)(A2/C2/D9) - (A2/C2)(C2/D9)$ -0.07569
22	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D9)(A2/D1/C2)$ 0.13962 Mide epistasis de cuarto orden entre D9 y la triple mutante A2/D1/C2.	a) Se compara con la interacción entre D9 y A2/C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2/D9) - (D9)(A2/C2)$ 0.11213
		b) Se compara con la interacción entre D9 y D1/C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2/D9) - (D9)(D1/C2)$ 0.41729

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		c) Se compara con la interacción entre D9 y A2/D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/D9) - (D9)(A2/D1)$ 0.36969
23	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (C2)(A2/D1/D9)$ 0.09106 Mide epistasis de cuarto orden entre C2 y la triple mutante A2/D1/D9.	a) Se compara con la interacción entre C2 y A2/D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/C2) - (C2)(A2/D1)$ 0.20046
		b) Se compara con la interacción entre C2 y A2/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2/D9) - (C2)(A2/D9)$ 0.12962
		c) Se compara con la interacción entre C2 y D1/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2/D9) - (C2)(D1/D9)$ 0.42927
24	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1)(A2/C2/D9)$ 0.14702 Mide epistasis de cuarto orden entre D1 y la triple mutante A2/C2/D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y C2/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2/D9) - (D1)(C2/D9)$ 0.42043
		b) Se compara con la interacción entre D1 y A2/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/D9) - (D1)(A2/D9)$ 0.26849
		c) Se compara con la interacción entre D1 y A2/C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/C2) - (D1)(A2/C2)$ 0.09944

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
25	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D1)(C2/D9)$ 0.19807 Mide epistasis de cuarto orden entre A2/D1 y la doble mutante C2/D9.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(C2/D9) - (C2)(D9)$ 0.25156
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D1 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1) - (A2)(D1)$ -0.02241
26	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/C2)(A2/D9)$ 0.09505 Mide epistasis de cuarto orden entre D1/C2 y la doble mutante A2/D9.	a) Se compara con la interacción entre D1 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2) - (D1)(C2)$ 0.18909
		b) Se compara con la interacción entre A2 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D9) - (A2)(D9)$ 0.32363
27	$(DZF1)(A2/D1/C2/D9) - (D1/D9)(A2/C2)$ 0.09626 Mide epistasis de cuarto orden entre D1/D9 y la doble mutante A2/C2.	a) Se compara con la interacción entre D1 y D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/D9) - (D1)(D9)$ 0.18175
		b) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697
28	$(A2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2)(A2/D1/D9)$ -0.09792 Mide epistasis de cuarto orden entre C2 y la doble mutante D1/D9 bajo un fondo genético A2.	a) Se compara con la interacción entre C2 y D1/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2/D9) - (C2)(D1/D9)$ 0.42927

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
29	$(D9)(A2/D1/C2/D9) - (A2/D9)(D1/C2/D9)$ -0.15863 Mide epistasis de cuarto orden entre A2 y la doble mutante D1/C2 bajo un fondo genético D9.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D1/C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/C2) - (A2)(D1/C2)$ 0.12265
30	$(C2)(A2/D1/C2/D9) - (A2/C2)(D1/C2/D9)$ -0.16208 Mide epistasis de cuarto orden entre A2 y la doble mutante D1/D9 bajo un fondo genético C2.	a) Se compara con la interacción entre A2 y D1/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/D9) - (A2)(D1/D9)$ 0.29347
31	$(D1/D9)(A2/D1/C2/D9)-(D1/C2/D9)(A2/D1/D9)$ -0.14602 Mide epistasis de cuarto orden entre A2 y C2 bajo un fondo genético D1/D9.	a) Se compara con la interacción entre A2 y C2 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/C2) - (A2)(C2)$ 0.32697
		b) Se compara con la interacción entre C2 y D1/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(D1/C2/D9)-(C2)(D1/D9)$ 0.42927
		c) Se compara con la interacción entre A2 y D1/D9 bajo un fondo genético silvestre: $(DZF1)(A2/D1/D9)-(A2)(D1/D9)$ 0.29347

Continuación de la tabla...

Índice	Prueba e interpretación	Pruebas con las cuales comparar
		d) Se compara con la interacción entre C2 y D1/D9 bajo el fondo A2: $(A2)(A2/D1/C2/D9)-(A2/C2)(A2/D1/D9)$ -0.09792
		e) Se compara con la interacción entre A2 y D1/D9 bajo el fondo C2: $(C2)(A2/D1/C2/D9)-(A2/C2)(D1/C2/D9)$ -0.16208

Apéndice C

Patrones emergentes de las 55 pruebas

	Fondo genético										
	DZF1	A2	D1	C2	D9	A2/D1	D1/C2	D1/D9	A2/C2	A2/D9	C2/D9
A2/D1	Red			Red	Green						Red
D1/C2	Green	Green			Green					Red	
D1/D9	Green	Green		Green					Green		
A2/C2	Green		Green		Red			Red			
A2/D9	Green		Green	Red			Red				
C2/D9	Green	Red	Green			Red					
A2/C2/D9	Green		Blue								
D1/C2/D9	Green	Blue									
A2/D1/D9	Green			Red							
A2/D1/C2	Green				Blue						
A2/D1/C2/D9	Green										

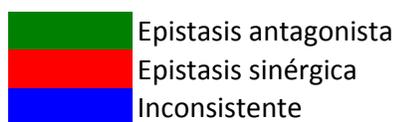


Figura C.1: Tipo de epistasis encontrada a partir de la interacción de diferentes mutaciones en distintos fondos genéticos. En color rojo son representados casos de epistasis negativa sinérgica; en color verde son representados casos de epistasis positiva antagonista; en color azul son representados dos casos de epistasis inconsistentes, es decir, casos en los que las pruebas que analizan interacciones entre las mismas mutaciones presentan diferentes tipos de epistasis.

Apéndice D

Análisis comparativo de las magnitudes de epistasis al utilizar medias o medianas

Se ha mencionado que un problema del modelo multiplicativo (utilizado en el presente trabajo para determinar la magnitud de interacciones epistáticas) es la medida de adecuación utilizada. También, al existir más de una réplica para cada cepa, surge la pregunta de qué medida de tendencia central (media o mediana) utilizar para determinar el valor de adecuación absoluto de cada cepa. En el presente trabajo, la medida de adecuación absoluta de cada cepa fue determinada a través de la media (promedio) de la eficiencia de esporulación de tres réplicas. Dichas eficiencias de esporulación promedio se encuentran graficadas en la figura D.1, con sus respectivas desviaciones medias; en color azul se muestran las medianas de cada conjunto de réplicas de las 16 cepas, respectivamente.

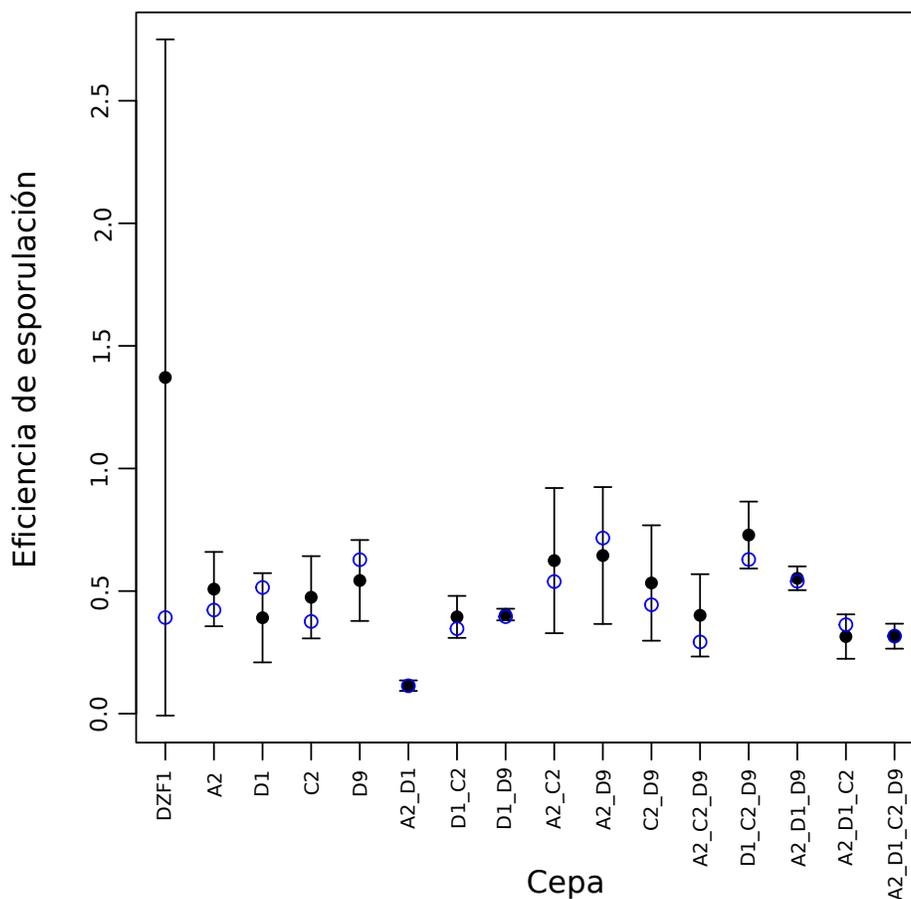


Figura D.1: Distribución de las eficiencias de esporulación de las 16 cepas utilizadas en este trabajo. Los puntos en color negro representan las eficiencias de esporulación promedio, con sus respectivas desviaciones medias. Los puntos en color azul representan las eficiencias de esporulación determinadas a través de las medianas. En ambos casos, fueron considerados los datos correspondientes a las tres réplicas de cada cepa (ver tabla 4.2).

A partir de la figura D.1, se puede ver que las medias y medianas, correspondientes a cada cepa, difieren en la mayoría de los casos. Por esta razón, el uso de una u otra medida de tendencia central para determinar los valores de adecuación y, por lo tanto, los resultados de las pruebas utilizadas en esta tesis, podrían variar dependiendo de la medida utilizada. Con la finalidad de esclarecer el efecto que tiene el uso de medias o medianas sobre la magnitud de epistasis encontrada, se presenta la gráfica D.2. En dicha gráfica, cada par ordenado de la forma (x, y) corresponde a una prueba, donde todos los valores que puede tomar x son las magnitudes de epistasis de las 55 pruebas, determinadas utilizando medianas.

Por otro lado, los valores que puede tomar y son las magnitudes de epistasis de las mismas 55 pruebas, determinadas a través de medias (promedios). De esta forma, cada par ordenado está constituido por dos magnitudes de epistasis de la misma prueba, una obtenida a través de la media y la otra obtenida a través de la mediana.

Si los valores de magnitud de cada prueba fueran iguales (o muy parecidos), al utilizar medias o medianas, se formaría una línea recta que pasaría por el origen y que cruzaría los cuadrantes I y III. En la figura D.2 se puede ver que éste no es el caso y que, en cambio, los puntos marcados se encuentran dispersos. Por otro lado, aquellos puntos que quedan en los cuadrantes I (+, +) o III (-, -) indican que en esas pruebas se mantiene el signo de la epistasis al utilizar la media o la mediana. De forma contraria, aquellos puntos que quedan en el cuadrante II (-, +) o IV (+, -) son valores que cambian de signo al usar media o mediana.

A partir de lo anterior y de acuerdo con la figura D.2, las pruebas no estándar son más robustas en su signo al cambiar la medida, es decir, el signo se mantiene no importando si se usa la media o la mediana. Por otro lado, las pruebas estándar son más robustas en su significancia al cambiar la medida, ya que ésta se mantiene no importando si se usa la media o la mediana.

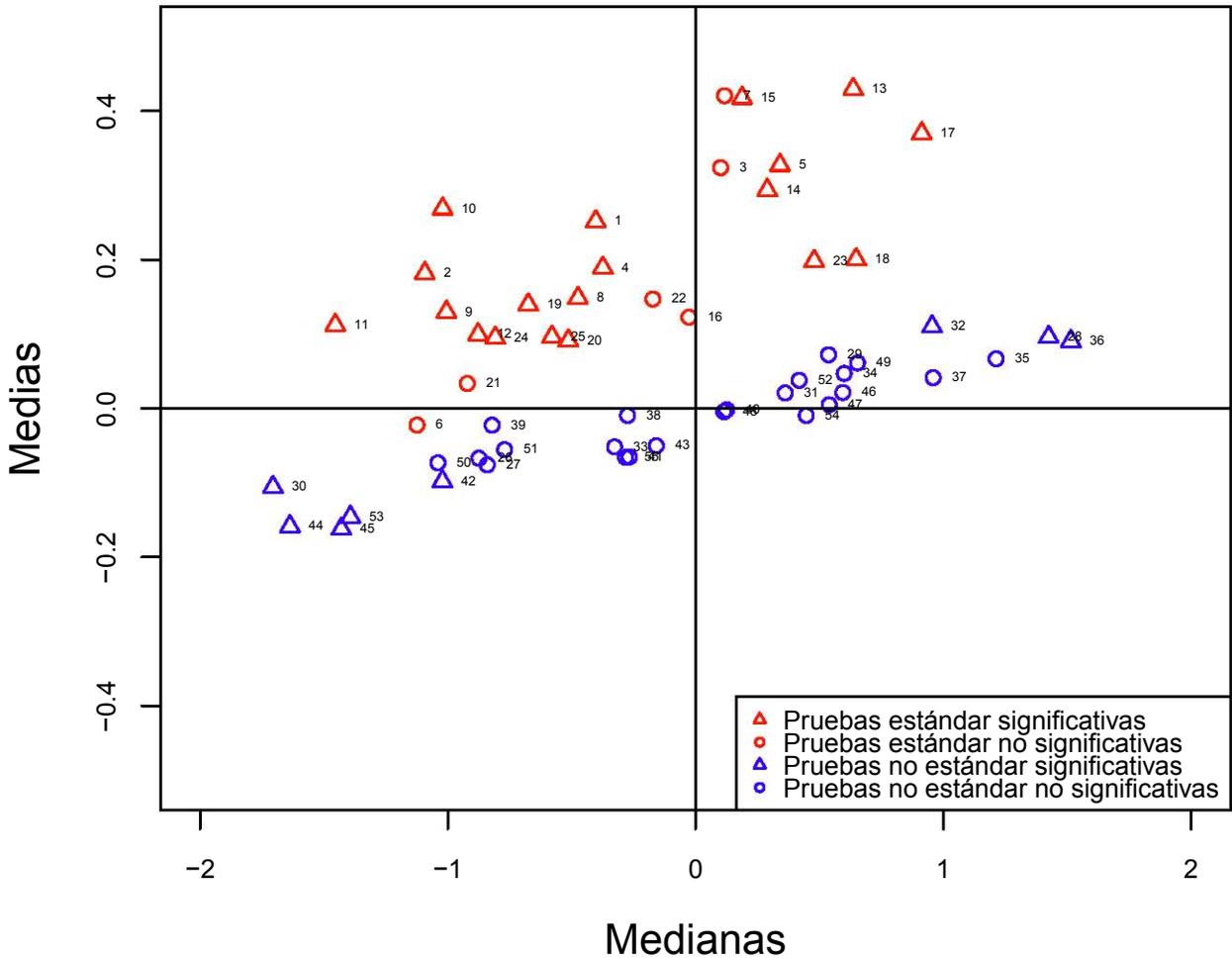


Figura D.2: Gráfica comparativa de las magnitudes de epistasis utilizando medias o medianas. Todos los valores de x corresponden a las magnitudes obtenidas a través de medianas, mientras que todos los valores de y corresponden a las magnitudes obtenidas a través de medias. Cada coordenada representa una prueba.

Bibliografía

- Alberch, P. (1991). From genes to phenotype: dynamical systems and evolvability. *Genetica*, 84(1):5–11.
- Azevedo, R. B. R., Lohaus, R., Srinivasan, S., Dang, K. K., and Burch, C. L. (2006). Sexual reproduction selects for robustness and negative epistasis in artificial gene networks. *Nature*, (440):87–90.
- Baryshnikova, A., Costanzo, M., Myers, C. L., Andrews, B., and Boone, C. (2013). Genetic interaction networks: toward an understanding of heritability. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14(1):111–133.
- Bateson, W. (1909). *Mendel's Principles of Heredity*. Cambridge: at the University Press, New York.
- Beerenwinkel, N., Pachter, L., and Sturmfels, B. (2006). Epistasis and shapes of fitness landscapes. *Department of Mathematics, University of California Berkeley*, pages 1–32.
- Beerenwinkel, N., Pachter, L., Sturmfels, B., Elena, S. F., and Lenski, R. E. (2007). Analysis of epistatic interactions and fitness landscapes using a new geometric approach. *BMC evolutionary biology*, 7:60.
- Blount, Z. D., Borland, C. Z., and Lenski, R. E. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23):7899–7906.

- Bohannan, B., Travisano, M., and Lenski, R. (1999). Epistatic interactions can lower the cost of resistance to multiple consumers. *Evolution*, 53(1):292–295.
- Bonhoeffer, S., Chappey, C., Parkin, N. T., Whitcomb, J. M., and Petropoulos, C. J. (2004). Evidence for positive epistasis in HIV-1. *Science*, 306:1547–1550.
- Botstein, D. and Fink, G. R. (2011). Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3):695–704.
- Brenner, S. (1974). *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1):71–94.
- Bretschert, A. P. and Kaiser, D. (1978). Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting Myxobacterium. *Journal of Bacteriology*, 133(2):763–768.
- Capra, E. J. and Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66:325–347.
- Chen, H., Keseler, I. M., and Shimkets, L. J. (1990). Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 172(8):4206–4213.
- Collins, S. R., Schuldiner, M., Krogan, N. J., and Weissman, J. S. (2006). A strategy for extracting and analyzing large-scale quantitative epistatic interaction data. *Genome biology*, 7:R63.
- Cordell, H. J. (2002). Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Human molecular genetics*, 11(20):2463–2468.
- Dawid, W. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4):403–427.
- De Visser, J. A. G. M., Cooper, T. F., and Elena, S. F. (2011). The causes of epistasis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278:3617–3624.
- De Visser, J. A. G. M., Hoekstra, R. F., and van den Ende, H. (1997). An experimental test for synergistic epistasis and its application in *Chlamydomonas*. *Genetics*, 145(3):815–819.

- Dworkin, M. (1962). Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 86:67–72.
- Dworkin, M. (1963). Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 84:250–257.
- Elena, S. F. and Lenski, R. E. (1997). Test of synergistic interactions among deleterious mutations in bacteria. *Nature*, 390(1979):395–398.
- Ellehaug, E., Norregaard, M., and Sogaard-Andersen, L. (1998). The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Molecular Microbiology*, 30(4):807–817.
- Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067):449–53.
- Escalante, A. E., Inouye, S., and Travisano, M. (2012). A spectrum of pleiotropic consequences in development due to changes in a regulatory pathway. *PloS one*, 7(8):e43413.
- Fisher, R. a. (1918). The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52:399–433.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- García, A. C. n. (2007). *Análisis de las proteínas quinasas de tipo eucariota de Myxococcus xanthus: caracterización molecular de la proteína PksA(Mxan5696)*. Tesis doctoral.
- Gerlai, R. (1996). Gene-targeting studies of mammalian behavior: Is it the mutation or the background genotype? *Trends in Neurosciences*, 19(5):177–181.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J. A., Ronning, C., Barbazuk, W., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk,

- O., Kim, H., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., and Sullivan, H. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *PNAS*, 103(41):15200–15205.
- Hanlon, W. A., Inouye, M., and Inouye, S. (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology*, 23:459–471.
- Hansen, T. F. (2013). Why epistasis is important for selection and adaptation. *Evolution*, 67(12):3501–3511.
- Higgs, P. I., Jagadeesan, S., Mann, P., and Zusman, D. R. (2008). EspA, an orphan hybrid histidine protein kinase, regulates the timing of expression of key developmental proteins of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 190:4416–4426.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*Myxobacteriales*): Two gene systems control movement. *MGG Molecular & General Genetics*, 171(2):177–191.
- Hutchings, G. and Key, S. C. S. (2008). Gene knockout/gene therapy in yeast using homologous recombination. *Association for Biology Laboratory Education*, 30:49–62.
- Jain, R. and Inouye, S. (1998). Inhibition of development of *Myxococcus xanthus* by eukaryotic protein kinase inhibitors. *Journal of bacteriology*, 180(24):6544–6550.
- Janos, L. and Korona, R. (2007). Epistatic buffering of fitness loss in yeast double deletion strains. *Nature genetics*, 39(4):550–554.
- Jelsbak, L. and Søgaard-Andersen, L. (2003). Cell behavior and cell-cell communication during fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Microbiological Methods*, 55:829–839.
- Jones, A. G., Bürger, R., and Arnold, S. J. (2014). Epistasis and natural selection shape the mutational architecture of complex traits. *Nature communications*, 5(May):3709.

- Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11):5952–5956.
- Kaiser, D. (2000). Bacterial motility: How do pili pull? *Current Biology*, 10(21):777–780.
- Kaiser, D. (2004). Signaling in myxobacteria. *Annual review of microbiology*, 58:75–98.
- Kaiser, D. (2006). A microbial genetic journey. *Annual review of microbiology*, 60:1–25.
- Kimura, M. and Maruyama, T. (1966). The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics*, (54):1337—1351.
- Kircher, M. and Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6):524–536.
- Kondrashov, A. S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, (336):435—440.
- Kondrashov, A. S. and Crow, J. F. (1991). Haploidy or diploidy: which is better? *Nature*, (351):314–315.
- Kondrashov, F. A. and Kondrashov, A. S. (2001). Multidimensional epistasis and the disadvantage of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21):12089–12092.
- Kouyos, R. D., Silander, O. K., and Bonhoeffer, S. (2007). Epistasis between deleterious mutations and the evolution of recombination. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(6):308–315.
- Kraemer, S. A., Toups, M. A., and Velicer, G. J. (2010). Natural variation in developmental life-history traits of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Ecol*, 73:226–233.
- Kraemer, S. A. and Velicer, G. J. (2011). Endemic social diversity within natural kin groups of a cooperative bacterium. *PNAS*, 108:10823–10830.

- Kroos, L. and Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes & development*, 1(8):840–854.
- Kryazhimskiy, S., Draghi, J. A., and Plotkin, J. B. (2011). Evolution. In evolution, the sum is less than its parts. *Science*, 332:1160–1161.
- Lalić, J. and Elena, S. F. (2012). Magnitude and sign epistasis among deleterious mutations in a positive-sense plant RNA virus. *Heredity*, 109:71–77.
- Lehner, B. (2011). Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends in Genetics*, 27(8):323–331.
- Li, S., Lee, B. U., and Shimkets, L. J. (1992). *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes and Development*, 6(3):401–410.
- Lux, R. and Shi, W. (2005). A novel bacterial signalling system with a combination of a Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp two-component system. *Molecular microbiology*, 58(2):345–8.
- Mackay, T. F. C. (2014). Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nat Rev Genet.*, 15(1):22–33.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., and Clark, D. P. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, 12^a edition.
- Maisnier-Patin, S., Roth, J. R., Fredriksson, A., Nyström, T., Berg, O. G., and Andersson, D. I. (2005). Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in bacteria. *Nature genetics*, 37(12):1376–1379.
- Mani, R., St Onge, R. P., Hartman, J. L., Giaever, G., and Roth, F. P. (2008). Defining genetic interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9):3461–3466.

- Marian, A. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 159(2):64–79.
- Matthen, M. and Ariew, A. (2002). Two ways of thinking about fitness and natural selection. *The Journal of Philosophy*, 99(2):55.
- McBride, M. J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual review of microbiology*, 55:49–75.
- Meinke, D. W. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389):662–682.
- Misra, S. (2013). Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 61(2):127–133.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, 67:995–1006.
- Müller, S., Willett, J. W., Bahr, S. M., Darnell, C. L., Hummels, K. R., Dong, C. K., Vlamiakis, H. C., and Kirby, J. R. (2013). Draft genome sequence of *Myxococcus xanthus* wild-type strain DZ2, a model organism for predation and development. *Genome Announcements*, 1(3):3–4.
- Nariya, H. and Inouye, S. (2002). Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 46:1353–1366.
- Nariya, H. and Inouye, S. (2003). An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Molecular Microbiology*, 49:517–528.
- Nariya, H. and Inouye, S. (2005). Modulating factors for the Pkn4 kinase cascade in

- regulating 6-phosphofructokinase in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 56:1314–1328.
- Nariya, H. and Inouye, S. (2006). A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Molecular Microbiology*, 60:1205–1217.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2008). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. W.H Freeman and Company, New York, 5th edition.
- Omholt, S. W., Plahte, E., Ø yehaug, L., and Xiang, K. (2000). Gene regulatory networks generating the phenomena of additivity, dominance and epistasis. *Genetics*, (155):969—980.
- Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature reviews. Genetics*, 10(8):531–9.
- Osborne, M. J. (1994). *A course in game theory*. The MIT Press.
- Păcurar, D. I. (2009). Model organisms - A journey from the dawn of biological research to the post-genomic era. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1):4087–4094.
- Petrie, L., North, N. N., Dollhopf, S. L., Balkwill, D. L., and Kostka, J. E. (2003). Enumeration and characterization of iron (III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium (VI). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12):7467–7479.
- Phillips, P. (2008). Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics*, 9(11):855–867.
- Phillips, P. C. (1998). The Language of Gene Interactions. *Genetics*, 149:1167–1171.
- Pigliucci, M. (2010). Genotype-phenotype mapping and the end of the ‘genes as blueprint’ metaphor. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1540):557–566.

- Poelwijk, F. J., Tănase-Nicola, S., Kiviet, D. J., and Tans, S. J. (2011). Reciprocal sign epistasis is a necessary condition for multi-peaked fitness landscapes. *Journal of Theoretical Biology*, 272:141–144.
- Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environmental microbiology*, 1(1):15–21.
- Rendueles, O., Amherd, M., Velicer, G. J., Rendueles, O., Amherd, M., and Velicer, G. J. (2015). Positively frequency-dependent interference competition maintains diversity and pervades a natural population of cooperative microbes. *Current Biology*, 25:1–9.
- Routman, E. J. and Cheverud, J. M. (1995). Epistasis and its contribution to genetic variance components. *Genetics*, 139:1455–1461.
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science*, 240(4858):1453–1459.
- Sager, B. and Kaiser, D. (1994). Intercellular C-signaling and the traveling waves of *Myxococcus*. *Genes and Development*, 8(23):2793–2804.
- Sanjuán, R. and Elena, S. F. (2006). Epistasis correlates to genomic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(Track II):14402–14405.
- Sanjuán, R., Moya, A., and Elena, S. F. (2004). The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(Track II):15376–15379.
- Segrè, D., Deluna, A., Church, G. M., and Kishony, R. (2005). Modular epistasis in yeast metabolism. *Nature genetics*, 37(1):77–83.
- Shimkets, L. and Seale, T. W. (1975). Fruiting body formation and myxospore differentiation and germination in *Myxococcus xanthus* viewed by scanning electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 121(2):711–720.

- Shimkets, L. and Woese, C. R. (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20):9459–9463.
- Shimkets, L. J. (1999). Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annual review of Microbiology*, 53:525–49.
- Shimkets, L. J., Dworkin, M., and Reichenbach, H. (2006). The Myxobacteria. *Prokaryotes*, pages 31–115.
- Shimkets, L. J., Gill, R. E., and Kaiser, D. (1983). Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(5):1406–1410.
- Singer, M. and Kaiser, D. (1995). Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes & development*, 9(13):1633–1644.
- Singh, B. (1947). Number and lytic action on bacteria. *J Gene Microbiol*, 1:1–10.
- Sliusarenko, O., Zusman, D. R., and Oster, G. (2007). Aggregation during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* is driven by reducing cell movement. *Journal of Bacteriology*, 189(2):611–619.
- Smith, J., Van Dyken, J. D., and Zee, P. C. (2010). A generalization of Hamilton’s rule for the evolution of microbial cooperation. *Science*, 328(5986):1700–3.
- Snustad, D. and Simmons, M. J. (2012). *Genetics*. John Wiley & Sons, Inc., 6th edition.
- Spiegel, M. R. (1961). *Estadística*. Mc Graw Hill, 1^a edition.
- Spröer, C., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E. (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International journal of systematic bacteriology*, 49:1255–1262.

- St Onge, R. P., Mani, R., Oh, J., Proctor, M., Fung, E., Davis, R. W., Nislow, C., Roth, F. P., and Giaever, G. (2007). Systematic pathway analysis using high-resolution fitness profiling of combinatorial gene deletions. *Nature genetics*, 39(2):199–206.
- Stein, E. a., Cho, K., Higgs, P. I., and Zusman, D. R. (2006). Two Ser/Thr protein kinases essential for efficient aggregation and spore morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 60:1414–1431.
- Sun, H., Zusman, D. R., and Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current Biology*, 10(18):1143–1146.
- Szafraniec, K., Wloch, D. M., Sliwa, P., Borts, R. H., and Korona, R. (2003). Small fitness effects and weak genetic interactions between deleterious mutations in heterozygous loci of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetical research*, 82:19–31.
- Tzeng, L. and Singer, M. (2005). DNA replication during sporulation in *Myxococcus xanthus* fruiting bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:14428–14433.
- Udo, H., Lam, C. K., Mori, S., Inouye, M., and Inouye, S. (2000). Identification of a substrate for Pkn2, a protein Ser/Thr kinase from *Myxococcus xanthus* by a novel method for substrate identification. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2:557–563.
- Udo, H., Munoz-Dorado, J., Inouye, M., and Inouye, S. (1995). *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes & Development*, 9(8):972–983.
- Ueki, T., Inouye, S., and Inouye, M. (1996). Positive-negative kg cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene*, 67(12):153–157.
- Velicer, G. J., Mendes-Soares, H., and Wielgoss, S. (2013). Whence comes social Diversity? Ecological and Evolutionary Analysis of the Myxobacteria. 1(July):1–30.

- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., and et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507):1304–1351.
- Vos, M. and Velicer, G. (2006). Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5):3615.
- Vos, M. and Velicer, G. (2009). Evolution of social conflict in the bacterium *Myxococcus xanthus*: centimeter vs global scale populations. *Current biology: CB*, 19(20):1763.
- Waddington, C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 3811:563–565.
- Wade, M., Winther, R., Agrawal, A., and Goodnight, C. (2001). Alternative definitions of epistasis: dependence and interaction. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(9):498–504.
- Wagner, G. P., Booth, G., and Bagheri-Chaichian, H. (1997). A population genetic theory of canalization. *Evolution*, (51):329—347.
- Ward, M. J. and Zusman, D. R. (1999). Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation. *Current Opinion in Microbiology*, 2:624–629.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356):737–738.
- Weinreich, D. M., Lan, Y., Wylie, C. S., and Heckendorn, R. B. (2013). Should evolutionary geneticists worry about higher-order epistasis? *Current opinion in genetics & development*, 23(6):700–7.
- Weinreich, D. M., Watson, R. a., and Chao, L. (2005). Perspective: Sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories. *Evolution; international journal of organic evolution*, 59:1165–1174.
- West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A., and Diggle, S. P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nature reviews. Microbiology*, 4(8):597–607.

- Whitlock, M. C., Phillips, P. C., Moore, F. B., and Tonsor, S. J. (1995). Multiple fitness peaks and epistasis. *Annual Review Ecological Systems*, (26):601–29.
- Whitworth, D. E. (2008). *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. America Society of Microbiology, Washington, DC.
- Wilbur, H. M. (1980). Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:67–93.
- Wolf, J. B., Brodie, E. D., and Wade, M. J. (2000). *Epistasis and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, 1st edition.
- Wolgemuth, C., Hoiczyk, E., Kaiser, D., and Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Current Biology*, 12(5):369–377.
- Wu, B., Gokhale, C. S., van Veelen, M., Wang, L., and Traulsen, A. (2013). Interpretations arising from Wrightian and Malthusian fitness under strong frequency dependent selection. *Ecology and evolution*, 3(5):1276–80.
- Wu, Y., Jiang, Y., Kaiser, D., and Alber, M. (2007). Social interactions in myxobacterial swarming. *PLoS Computational Biology*, 3(12):2546–2558.
- Yoshiki, A. and Moriwaki, K. (2006). Mouse phenome research: implications of genetic background. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 47(2):94–102.
- Zee, P. C., Mendes-Soares, H., Yu, Y. T. N., Kraemer, S. A., Keller, H., Ossowski, S., Schneeberger, K., and Velicer, G. J. (2014). A shift from magnitude to sign epistasis during adaptive evolution of a bacterial social trait. *Evolution*, pages 2701–2708.
- Zhang, W., Munoz-Dorado, J., Inouye, M., and Inouye, S. (1992). Identification of a putative eukaryotic-like protein kinase family in the developmental bacterium *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 174(16):5450–5453.