

24
189



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSMISION DE CARACTERES EXTRACROMO-
SOMICOS POR FUSION DE MITOCONDRIAS CON
PROTOPLASTOS EN LEVADURA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ERIK PATRICIA RENDON HUERTA

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO.

Resumen.	
1.0	Introducción 1
1.1	Generalidades 1
2.0	Antecedentes 17
2.1	Transformación con ADN nuclear 17
2.2	Transformación con ADN mitocondrial 18
3.0	Objetivos 22
4.0	Materiales y Métodos 23
4.1	Cepas 23
4.2	Medios de cultivo 23
4.3	Soluciones amortiguadoras 24
4.4	Formación de protoplastos 27
4.5	Obtención de mitocondrias 28
4.6	Fusión de mitocondrias con protoplastos 29
4.7	Análisis de los productos de fusión 30
4.8	Purificación del ADN mitocondrial 31
4.9	Análisis de restricción de los ADNs mitocondriales 33
4.10	Digestiones 33
4.11	Clonación 34
4.11.1	Ligación 34
4.11.2	Formación de células competentes 34
4.11.3	Transformación 35

4.11.4	Mini-preparaciones de plásmidos recombinantes	35
4.11.5	Subclonación	36
4.11.6	Preparación de moldes	37
4.11.7	Secuenciación	38
5.0	Resultados y Discusión	39
5.1	Selección	39
5.2	Factores de compatibilidad	41
5.3	Tiempo de fusión	43
5.4	Fusión	43
5.5	Curvas de crecimiento	46
5.6	Resistencia cruzada a Diurón	50
5.7	Segregación meiótica	52
5.8	Pruebas de alelismo	52
5.9	Patrones de restricción	54
5.10	Clonación	59
5.11	Secuenciación	59
6.0	Conclusiones y Perspectivas	66
7.0	Bibliografía	67

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Pláemido pTZ 1BR en el cual se muestra su origen múltiple de clonación, su origen de duplicación, su promotor y la región que le confiere resistencia a ampicilina 14
- Figura 2. Curvas de crecimiento de las transformantes obtenidas por la fusión de W500B x AM34 47
- Figura 3. Curvas de crecimiento de las transformantes obtenidas por la fusión de W600B x AM13 48
- Figura 4. Patrones de restricción obtenidos a partir de diversas digestiones con endonucleasas de restricción de las cepas transformantes comparadas con las cepas donadora y receptora 58
- Figura 5. Estrategia de clonación y subclonación del fragmento que contiene al gen que codifica para el apocitocromo b y que posee la mutación que da resistencia a antimicina A 61
- Figura 6. Secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el apocitocromo b en la cepa silvestre (WT) y secuencia de nucleótidos para el mismo gen en la cepa transformante (TC) donde se muestra la delección ... 62
- Figura 7. Secuencia de bases en la cual se muestran los codones para los aminoácidos correspondientes a la cepa silvestre (WT) y en la cepa transformante (TC) 63

INDICE DE TABLAS.

Tabla I.	Número de colonias transformantes obtenidas en cada experimento de fusión con WM37 x AM34, W600B x AM34 y W600B x AM13	40
Tabla II.	Experimentos controles para la realización de las fusiones con WM37 x AM34, W600B x AM34 y W600B x AM13	42
Tabla III.	TMG de las transformantes obtenidas de la fusión de W600B x AM34.....	47
Tabla IV.	TMG de las transformantes obtenidas de la fusión de W600 x AM13	48
Tabla V.	Resistencia a Diurón (50 a 200 µg/ml) y Antimicina A (5 µg/ml) de los productos de fusión	51
Tabla VI.	Porcentaje de colonias diploides resistentes a Antimicina A	54

RESUMEN.

La transmisión de caracteres citoplásmicos así como las interacciones núcleo-organelares se han estudiado en varias especies, por medio de la fusión de protoplastos con organelos.

Basados en la observación de que la resistencia a ciertos antibióticos como el cloranfenicol (CAP^r) y efrapeptina (EF^r) en células de mamífero, está dada por una herencia citoplásmica, Clark y Shay (1982) demostraron que las mitocondrias obtenidas a partir de células CAP^r y EF^r podían transferir su resistencia a células sensibles por medio de endocitosis, con una alta frecuencia.

En *Saccharomyces cerevisiae*, Gunge (1979) indujo la fusión de mitocondrias con protoplastos preparados a partir de una cepa mutante petite neutral, con ayuda de polietilenglicol (PEG), se obtuvieron células respiratorio competentes. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se lleve a cabo tal proceso, son hasta ahora desconocidos; no obstante se han propuesto dos posibilidades: la primera hipótesis es que la membrana mitocondrial externa se fusiona con la membrana de la célula receptora y el ADN mitocondrial sea liberado dentro de la célula por algún proceso de pinocitosis y la segunda, propone la entrada del organelo intacto (en este caso la mitocondria) a la célula receptora por algún proceso de fagocitosis.

Los trabajos mencionados, al igual que muchos otros, se basan en las características fenotípicas de los productos de fusión obtenidos, para demostrar la transferencia genética.

Nuestro estudio tiene la finalidad de demostrar, a nivel molecular, que la transmisión de caracteres extracromosómicos -en este caso mitocondriales- hacia células receptoras, ocurre por medio de la fusión de mitocondrias resistentes a antimicina A con protoplastos obtenidos a partir de una cepa de levadura sensible.

Para tal fin, se realizaron tres fusiones entre diferentes cepas de *Kluyveromyces lactis* y se obtuvieron varios productos de fusión que se seleccionaron por su resistencia a la antimicina y por marcadores de auxotrofia. Dichos productos de fusión mostraron resistencia cruzada a diurón -como es el caso de la cepa donadora- lo que hizo suponer que se trataba de la misma mutación.

Posteriormente, se aisló el ADN mitocondrial (ADN mit) de cada producto de fusión y se cortó con diversas enzimas de restricción aprovechando el polimorfismo del ADN mit (de las cepas donadora y receptora), y se encontró que el patrón mitocondrial de cada transformante, corresponde al de la cepa receptora.

De acuerdo a los resultados anteriores, se clonó el fragmento de ADN mit de uno de los productos de fusión (la

transformante C) que contiene al gen que codifica para el apocitocromo b, el cual lleva la mutación para la resistencia a antimicina A correspondiente al de la cepa donadora, observando que la mutación dada por una delección de 6 nucleótidos, está presente en la cepa TC con lo cual se concluye que dicha transformante es un producto de fusión verdadero.

1.0 INTRODUCCION.

1.1 Generalidades.

Las levaduras son microorganismos eucariontes unicelulares que de acuerdo a su morfología, se consideran como un "estado" en el ciclo de vida de los hongos hifales. Se han clasificado en tres grupos: A) Levaduras ascosporógenas, B) Levaduras basidiosporógenas y C) Levaduras imperfectas (20).

La célula de levadura está constituida por la envoltura celular que consiste de la membrana plasmática, el espacio periplasmático, la pared celular y en algunas especies una capa viscosa; la pared celular confiere estabilidad mecánica a la célula, mientras que la membrana plasmática constituye el sitio primario para la regulación del intercambio de solutos entre el citoplasma y el medio; el espacio periplasmático, es una región de la envoltura la cual está definida por la membrana plasmática y la parte interna de la pared celular; la capa viscosa es una región periférica de la envoltura, la cual está asociada más o menos con la parte externa de la pared celular (2,3).

Las levaduras pueden crecer como células haploides y diploides y normalmente se reproducen asexualmente por gemación -mitosis asimétrica- o por fisión binaria como es el caso de *Schizosaccharomyces pombe*, aunque algunas también pueden reproducirse sexualmente; en este último caso, dos células haploides de factor sexual o de compatibilidad contrarios, se fusionan para así formar un cigoto diploide el cual puede

multiplicarse mitóticamente o experimentar una meiosis para producir nuevas células haploides (1).

Las levaduras han sido utilizadas en diversos estudios como un modelo de organismos eucariontes, con los cuales se pueden investigar los fenómenos celulares, ya que poseen características, como:

- Muestran un crecimiento fácil y rápido, por lo que proveen una biomasa microbiana adecuada para su estudio.
- Tienen alternancia entre la reproducción sexual y asexual.
- Algunas de ellas son anaeróbicas facultativas, por lo cual pueden derivar su energía de glucólisis únicamente.
- Presentan organelos con material genético propio, tales como la mitocondria.
- Crecen en colonias lo que facilita el aislamiento y caracterización de mutantes.

Como ya se mencionó, algunas levaduras son aeróbicas facultativas lo que ha facilitado mucho el estudio de las fusiones mitocondriales en ellas.

Las mitocondrias generalmente se describen como estructuras cilíndricas rígidas y alargadas con un diámetro de 0.5 a 1 μm . Sin embargo, se ha observado que poseen cierta plasticidad y movilidad de acuerdo a la especie y al estado fisiológico de la célula, y que están asociadas con los microtúbulos del citoesqueleto en las células eucariontes (16). Las levaduras

poseen de 2 a 50 mitocondrias por célula. Las mitocondrias están constituidas de diferentes regiones que son:

A) Membrana externa, que contiene muchas copias de las proteínas transportadoras, las cuales forman grandes poros acuosos a través de la membrana lipídica, y permiten la entrada de moléculas de 10,000 Daltones o menos.

B) Membrana interna, la cual está plegada en numerosas crestas y posee grandes cantidades de cardiolipina, un fosfolípido que llega a constituir un 10% del contenido de lípidos en la membrana y que le ayuda a ser impermeable a los iones. También posee: i) una variedad de proteínas transportadoras que le otorgan una permeabilidad selectiva a moléculas pequeñas, que serán metabolizadas por enzimas mitocondriales concentradas en la matriz, ii) un complejo enzimático llamado ATP-sintasa que produce ATP en la matriz y iii) proteínas que llevan a cabo las reacciones de oxidación y reducción de la cadena respiratoria.

C) La matriz posee una mezcla altamente concentrada de miles de enzimas diferentes, incluyendo las requeridas para la oxidación del piruvato y los ácidos grasos. Posee también algunas copias idénticas del genoma mitocondrial, ribosomas mitocondriales, ARNt y varias enzimas que se requieren para la expresión de los genes mitocondriales.

D) Espacio intermembranal, tiene diversas enzimas que permiten pasar al ATP al exterior de la matriz donde puede fosforilar otros nucleótidos y sustratos.

Hay tres clases de funciones mitocondriales:

1) Las funciones ligadas a la producción de energía, que emplean el gradiente de protones formado por el paso de los electrones a través de la cadena respiratoria en la fosforilación de ADP a ATP (fosforilación oxidativa), transhidrogenación entre los nucleótidos de piridina y la translocación de solutos y iones.

2) Las funciones catabólicas y anabólicas, que incluyen la oxidación de los ácidos grasos y piruvato, así como la síntesis de porfirinas, fosfolípidos y otros.

3) Las funciones de biogénesis (24): división en algunas levaduras, en las cuales dos células haploides de diferente factor de compatibilidad (α y α) y que son iguales en tamaño se fusionan y otorgan iguales cantidades de ADN mitocondrial al cigoto. La herencia mitocondrial es por lo tanto "biparental", ambas células contribuyen igualmente a la pona genética mitocondrial de la progenie, sin embargo, después de varias generaciones de crecimiento vegetativo, el genoma mitocondrial se estabiliza.

Las observaciones de células vivas indican que la mitocondria no solo se divide, sino que ocasionalmente también se fusiona con otras. Asimismo, en muchas células la duplicación del ADN del organelo no está limitada a la fase de síntesis del ADN nuclear -fase S- sino que ocurre a través del ciclo celular (1).

La genética de la mitocondria se ve complicada por el hecho

de que existen muchas copias del genoma mitocondrial, que tiene aproximadamente de 2 a 50 moléculas de ADN por organelo, lo que constituye el 15% del ADN celular total, aunque el número exacto de copias en una célula es todavía incierto.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el ADN mitocondrial es una molécula duplex circular cerrada, con una masa aproximada de 20 a 50 x 10⁶ Daltones. Ahora es conocido como el centro de un sistema genético semiautónomo, el cual posee un contenido genético único que es expresado a través de la maquinaria de la transcripción y traducción, dentro de las cuales se incluye a los ribosomas mitocondriales, ARNt, aminoacil sintetetasas y muchas otras enzimas. El tamaño del genoma mitocondrial y la organización de la secuencia varían entre los diferentes eucariontes. Los genes mitocondriales codifican esencialmente para pocos polipéptidos de los complejos respiratorio y de fosforilación de la membrana interna, además de componentes del sistema de traducción mitocondrial. Aproximadamente el 75% de las proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citoplasma e incorporadas a la mitocondria (24, 25).

El ADN mit varía en forma, tamaño y composición de bases. En las levaduras oscila entre 12.8 Megadaltones : 6µm, 18.9 Kb en *Torulopsis glabrata* (O'Connor et al., 1976, tomado de 20), a 71 Megadaltones (34 µm, 108 Kb) en *Debaryomyces hansenii* (Clark-Walker et al, 1981, tomado de 20).

El ADN mit de *Saccharomyces cerevisiae* consiste de círculos de 50 Megadaltones (25 μ m, 75 Kb). (Hollenberg et al 1970, tomado de 20) y el de *Kluyveromyces lactis*, la levadura aquí estudiada, es de 24 Md, (11.4 μ m y 37 Kb) (23).

El ADN mit puede ser separado del ADN nuclear aprovechando que posee comparativamente un menor contenido de G + C y que su estructura es circular cerrada, con diferentes técnicas, como gradientes de densidad de cloruro de cesio o cromatografía en hidroxapatita.

Entre los genes mitocondriales se encuentran los genes mit y los genes *syn*. Los genes *syn* codifican para componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales. Esta clase incluye los genes de los ARNs ribosomales y un conjunto completo de genes de ARNs de transferencia. Proteínas esenciales para la traducción en la mitocondria pueden también ser codificadas en este genoma, como el gen *var* de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para una proteína ribosomal.

Los genes *mit*, codifican para proteínas que forman parte de la cadena respiratoria. Esta clase de genes estructurales están involucrados en la biosíntesis de tres subunidades de la citocromo oxidasa, el apocitocromo b, que forma parte del complejo coenzima QH₂-citocromo c oxido-reductasa y de dos o tres subunidades de la ATPasa sensible a oligomicina (25).

La maquinaria de transcripción y traducción de la mitocondria, todavía está siendo investigada, ya que posee diversos componentes con diferentes funciones cada uno. Enzimas de origen bigenómico como la citocromo oxidasa y la ATP sintasa, requieren la acción concertada de genes nucleares y mitocondriales, para producir cantidades estequiométricas de las subunidades que la conforman. Esta coordinación podría llevarse a cabo a través de señales celulares, que aseguren una síntesis proporcional y ordenada de las proteínas.

Hay evidencia de que existen mutaciones nucleares, que apagan la síntesis de productos genéticos mitocondriales simples. Sin embargo, existen genes mitocondriales tales como los genes para el citocromo b y la subunidad I de la citocromo oxidasa, que ofrecen medidas alternativas para el control nuclear como son la presencia de intrones en su genoma y el auto-procesamiento (auto-splicing). La mayoría de los polipéptidos mitocondriales son codificados en el núcleo. La duplicación y expresión de los genes mitocondriales son también procesos dependientes del núcleo, ya que la polimerasa del ADN mit, la polimerasa del ARN y las proteínas mitorribosomales son especificadas por genes nucleares.

En algunas ocasiones, puede ocurrir que los genes nucleares sufran mutaciones que afecten al compartimento mitocondrial lo cual provoca un mal funcionamiento del organelo, lo que se manifiesta por la incapacidad de las células para crecer en

medios no fermentables (mutaciones "pet"). Las mutaciones que afectan a los genes reguladores pueden tener consecuencias simples o complejas. Por otra parte, existen muchas mutaciones que confieren resistencia a drogas y antibióticos, que afectan al sistema mitocondrial en forma específica.

La basta mayoría de las proteínas mitocondriales, sintetizadas sobre los ribosomas citoplásmicos, necesita ser transportada del citoplasma a los compartimentos internos del organelo. Este proceso probablemente involucra dos eventos: a) el reconocimiento de una membrana blanco y b) la translocación de la proteína a través de las membranas. El hecho de que cada membrana contenga como parte de su constitución un conjunto de proteínas, podría ser la existencia de receptores membranales capaces de unirse a solamente un subconjunto de proteínas citoplásmicas; sin embargo, el transporte de proteínas mitocondriales difiere de acuerdo a cada proteína. En el caso de la mitocondria, algunos de los receptores -proteínas, lípidos o una combinación de ambos- residen en la membrana externa. Los procesos utilizados para su transporte, pueden ser la difusión pasiva a través de la membrana externa y/o un mecanismo facilitado en el cual hay una interacción directa de la proteína con algún componente de la membrana. La membrana interna funciona como una segunda barrera y actúa distribución de las proteínas entre la matriz, el espacio intermembranal o la membrana interna misma (20, 25).

Ya que la mitocondria tiene su propio ADN, es posible hablar de mutaciones mitocondriales. El ejemplo clásico de este tipo ha sido la llamada mutación "petite" en *S. cerevisiae*, la cual fue descrita primeramente por Ephrussi hace más de 30 años. En estas mutantes hay deleciones más o menos grandes del ADN mit y el fragmento que subsiste es reiterado, hasta llegar a tener un tamaño similar al del ADN que lo originó. Después de varias generaciones, este genoma adquiere características fijas y es transmitido a la progenie. Por ser una deleción, la mutación "petite" es muy estable. Las mutantes petite son capaces de crecer en medios con glucosa como fuente de carbono, ya que derivan su energía de la glucólisis.

En cualquier fase de su ciclo de vida, las colonias provenientes de las mutantes, son mucho más pequeñas que las formadas por células normales, de ahí el nombre de mutantes "petite-colonie". Cuando son transferidas a medios no fermentables como el glicerol, el etanol o el lactato, las mutantes petite no son capaces de crecer ya que carecen de una mitocondria funcional.

Hay diferentes tipos de mutantes petite: aquéllas que no tienen ADN mit y que son llamadas mutantes Rho^0 y las llamadas mutantes Rho^- , las cuales se presentan con alta frecuencia y que son el resultado de deleciones grandes del ADN mit; como ya dijimos, en este caso los residuos de ADN que quedan son reiterados.

Las mutantes Rho⁻ tienen una buena viabilidad y crecimiento en medios de glucosa; en cambio, las mutante Rho⁺ muestran un crecimiento pobre y una baja viabilidad (24, 25).

Un gran número de antibióticos y drogas inhiben el crecimiento de las levaduras en medios respirables, pero no en un medio fermentable. Estos agentes actúan como inhibidores selectivos de la síntesis de proteínas mitocondriales, de la cadena respiratoria terminal, o de la ATP sintasa sensible a oligomicina. Estos tienen concentraciones mínimas inhibitorias que son significativamente bajas en medios no fermentables, en comparación con medios con glucosa. Algunos ejemplos son: acriflavina, bromuro de etidio, 5-fluorouracilo y benzidina, entre otros, los cuales inducen la mutación petite y además bloquean selectivamente la transcripción del ADN mit. Otros compuestos como el cloranfenicol, la oligomicina y la antimicina A, inhiben la subunidad ribosomal grande, la ATP sintasa y la coenzima QH₂-citocromo c reductasa, respectivamente, a concentraciones estequiométricas. Sin embargo, se han aislado cepas resistentes a eritromicina, cloranfenicol, antimicina y oligomicina. Las cepas resistentes a antibióticos, probablemente tienen mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en los genes mit o syn, los cuales disminuyen la afinidad de unión del componente afectado por el antibiótico (20, 25).

El sistema genético mitocondrial es un blanco primario para una gran variedad de mutágenos químicos. Sin embargo, la

mitocondria es también susceptible a efectos inhibitorios producidos por agentes que reaccionan con la membrana mitocondrial. Estos afectan las características funcionales de la mitocondria y entre ellos se incluyen compuestos como drogas tricíclicas, fenil butazona, ácido azelaico dicarboxílico y ácido dodecadióico, vitamina A y aspirina. Estas drogas pueden mostrar una inhibición de la respiración, pero en pruebas realizadas con ácidos dicarboxílicos, vitamina A y aspirina, se observó que podían también estabilizar el efecto producido sobre el sistema membranar, si eran usadas a bajas concentraciones, dando como resultado el incremento de la actividad respiratoria, lo cual proporcionó una medida de protección en contra de los efectos del bromuro de etidio, de la adriamicina y de la oligomicina, siendo ésta una característica particular de la aspirina (20).

1.2 Estudios en *K. lactis*.

Los estudios realizados con la levadura *K. lactis* son muy pocos. El ADN mitocondrial de ésta consiste de moléculas circulares con una longitud de unos 11.4 μ m y contiene aproximadamente 37,000 pb. La mitad del tamaño del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* el cual es de 75,000 pb (21).

Los experimentos de hibridación realizados con fragmentos de ADN mitocondrial de *S. cerevisiae*, proveniente de una serie de mutantes "petite" como monitores, con ADN mitocondrial de *K. lactis*, revelaron la aparición de secuencias homólogas en el gen

que codifica para la subunidades 6 y 9 de la ATP sintasa, ARN ribosomales y ARN de transferencia (26), así como para el gen que codifica para el apocitocromo "b".

La levadura *K. lactis*, puede utilizar la lactosa, un disacárido que consiste de glucosa y unidades de galactosa. El mecanismo de toma es muy similar al realizado con la maltosa. La lactosa es transportada a través de la membrana celular por medio de un sistema de permeasas.

K. lactis posee también cepas productoras de la toxina "Killer", una proteína con peso molecular de 11,470 D, y plásmidos de ADN lineales, los cuales están asociados con este carácter.

1.3 Plásmidos como vectores de clonación.

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que son acarreados en cada generación celular. Se encuentran en muchas especies de bacterias y confieren características fenotípicas a la célula hospedera, tales como resistencia a antibióticos y metales pesados y capacidad para producir proteínas particulares.

La duplicación de un plásmido requiere de que éste posea un origen de duplicación y de que las enzimas de la duplicación estén disponibles. Dichas enzimas son generalmente dadas por la célula hospedero, pero el origen de duplicación es activado por proteínas codificadas por el propio plásmido. La duplicación del plásmido es controlada por un represor codificado por él mismo y

la interacción de esta proteína con sitios sobre el ADN del plásmido, determina el número de copias de éste por célula.

Existen dos tipos de plásmidos: a) los plásmidos unicopia y b) los plásmidos multicopia, con los cuales se puede obtener una gran cantidad del fragmento de ADN a clonar deseado.

Las ventajas que ofrecen los plásmidos como vectores de clonación, son las siguientes:

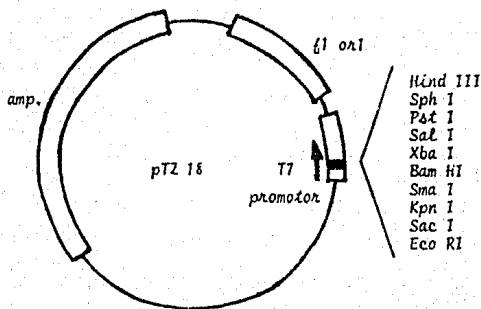
- Proveen grandes cantidades del ADN insertado, en el caso de los plásmidos multicopia.
- Son fácilmente seleccionables.
- Son de fácil manejo por sus sitios múltiples de clonación.
- Los plásmidos de bajo peso molecular facilitan su separación a partir del ADN cromosómico, además de que incrementan el número de copias y la estabilidad del plásmido.

El plásmido utilizado en este trabajo, el pTZ 19R, es un derivado del plásmido M13 (17). En la figura 1 se muestra un diagrama de éste.

Las características del pTZ 19R son las siguientes:

- Posee un sitio múltiple de clonación lo que facilita el uso de diversas enzimas de restricción.
- Posee el gen lac Z, el cual permite seleccionar a las clonas cuyo inserto de interés se encuentre en el plásmido que son aquellas colonias que presenten un color blanco en la cual el gen

FIGURA 1. PLASMIDO pTZ 18R EN EL CUAL SE MUESTRA SU ORIGEN MULTIPLE DE CLONACION, SU ORIGEN DE DUPLICACION, SU PROMOTOR Y LA REGION QUE LE CONFIERE RESISTENCIA A AMPICILINA.



lac Z ya no puede expresarse. Las clonas en las que si se exprese el gen lac Z se observarán de color azul.

- Posee una región fl, la cual permite la producción rápida de cantidades de ADN del plásmido de cadena simple.

- Posee un promotor para la ARN polimerasa de 2 a 4 bases a partir del sitio de clonación.

- Posee un marcador de selección que es la resistencia a ampicilina v.

- Posee un espacio de aproximadamente 2.9 Kb para el acomodo de insertos largos.

De acuerdo a las características anteriores, se deduce que el pTZ 1BR es una buena opción como sistema de clonación.

La cepa recipiente utilizada para la clonación, es una cepa de E. coli K12 (JM 103). Esta cepa posee diversas mutaciones entre las que se encuentran Δ lacpro, lac I y Z M15.

La mutación Z M15 proporciona las características de restricción menos, es decir, que no hay enzimas de restricción presentes en esta bacteria, como es el caso de la enzima Eco RI y otras, las cuales puedan degradar el ADN de plásmidos extraños. En cambio, las funciones de modificación, como la metilación de bases, si son funcionales.

La región Δ lacpro del cromosoma está deletada. La complementación de la deficiencia de prolina por el episoma F es usada como una selección en contra de la pérdida del episoma. La

pérdida del episoma previene la infección por el fago y lleva a una producción pobre de formas duplicativas, debido al crecimiento de células no infectadas.

El episoma también acarrea el operón *lac* con las siguientes mutaciones: a) una mutación en el promotor represor *lac*, que causa una sobreproducción del represor *lac* lo que evita la titulación del represor *lac* por el ADN operado *lac*, y con lo cual se encuentra en muchas copias sobre la forma duplicativa del fago; b) una deleción en el gen estructural para la β -galactosidasa, espaciando la información a partir del residuo de aminoácido 11 hasta el 41. La célula hospedera no infectada es entonces *lac*⁻ y produce una β -galactosidasa defectuosa. El producto polipeptídico de la región *lac* del episoma y el fago, forman un complejo de proteína en el cual la actividad de la β -galactosidasa es restaurada y las células infectadas vienen a ser *lac*⁺ (17)

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 Transformación con ADN nuclear.

Han sido utilizadas diversas técnicas para introducir secuencias de ADN en una célula determinada, con lo que se obtiene el proceso llamado "transformación", que conlleva a la aparición de un cambio heredable, que se expresa en las generaciones subsiguientes.

La importancia del estudio de la transformación celular, es la posibilidad de enlazar los conocimientos del comportamiento del ADN "in vivo" e "in vitro" lo más directamente posible, además de obtener células con la información genética deseada para utilizarla en el estudio de diversos procesos celulares.

En las levaduras se han realizado diversos estudios de transformación celular. En uno de los primeros, se empleó a una cepa de levadura (leu2-) la cual fue transformada con un plásmido (ColEI) que llevaba secuencias del gen que codifica para leu2. En este estudio se demostró, con técnicas de mapeo con endonucleasas de restricción e hibridaciones, que las secuencias del ADN acarreadas en el plásmido, se integraban al cromosoma de la levadura en forma editiva o sustitutiva (1).

Paralelamente a estos estudios, se realizaron experimentos para lograr una transformación más eficiente. Uno de éstos, se realizó con células intactas de *S. cerevisiae*, las cuales fueron

tratadas con Li^+ y 2-mercaptoetanol, además de la utilización de enzimas proteolíticas. Las células se incubaron con el ADN del plásmido y se transformaron en presencia de polietilenglicol. Se observó que los tratamientos utilizados, facilitaron el paso del ADN transformante a través de la pared celular (4).

Se han realizado también estudios en los cuales se han acarreado genes del virus SV40 en un plásmido bacterial el cual fué transferido directamente a células de mamífero en cultivo después de un tratamiento con polietilenglicol. Los resultados observados demostraron que después de 48 horas de la fusión las células expresaban las proteínas virales introducidas (17).

2.2 Transformación con ADN mitocondrial.

Por otra parte, se ha logrado la transformación de levaduras con mitocondrias, e han descrito los siguientes experimentos:

a) La transformación de una cepa haploide, petite neutral (Pht^+), por medio de la fusión de sus protoplastos con mitocondrias obtenidas a partir de una cepa respiratorio-competente, resistente a clionomicina, y se seleccionaron aquellas colonias transformantes respiratorio-competentes resistentes a clionomicina y con las características de eumotrofia de la cepa receptora. La fusión fue realizada en presencia de polietilenglicol (30%) y CaCl_2 10 mM (9).

b) Se fusionaron protoplastos de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* respiratorio-deficiente, con mitocondrias contenidas

en los llamados "mini-protoplastos" -protoplastos que carecen de núcleo- de una cepa respiratorio-competente, y se obtuvieron células respiratorio competentes en diversos medios selectivos. Se cuantificó el contenido de ADN de cada transformante (8).

Por otra parte, se demostró que los extremos del ADN nuclear son altamente recombinogénicos y que interactúan con secuencias homólogas, además de que la digestión con enzimas de restricción, dentro de una región homóloga al ADN cromosómico de la levadura, amplifica la eficiencia de integración (18).

Las células de mamífero han sido también utilizadas en pruebas de transformación celular con mitocondrias. Con los antecedentes de que la resistencia a ciertos antibióticos como el cloranfenicol (CAP) y la efrapeptina (EF) en células de mamífero, es heredada en forma citoplásmica, se demostró que mitocondrias provenientes de células resistentes a CAP y EF son tomadas por un proceso de endocitosis y transforman células sensibles en resistentes. Las células resistentes fueron obtenidas con una alta frecuencia y fueron estables (5).

Por otra parte, se han realizado experimentos para probar la posibilidad de usar el método de transformación de levaduras que produzca una alta frecuencia de transformación, como un medio de selección de secuencias de ADN mit. que confieran autónomamente una función duplicativa. El genoma mitocondrial de la levadura petite *Saccharomyces cerevisiae*, fue insertado en el vector YIp5 y

un plásmido híbrido (YRMP1) fue utilizado para transformar a la levadura. El plásmido YRMP1 promovió la transformación, con una alta frecuencia, de levaduras silvestres y de mutantes petite carentes de ADN mit (13).

Otro de los trabajos realizados, es el de la transformación de dos líneas celulares sensibles a cloranfenicol por medio de la microinyección de mitocondrias de humanos aisladas, las cuales llevan resistencia a cloranfenicol en su genoma. Dichas líneas celulares carecían de ADN mitocondrial porque fueron sometidas previamente a un tratamiento con bromuro de etidio el cual se intercala entre los pares de bases provocando una distorsión conformacional de la hélice produciendo moléculas de ADN más pequeñas.

La frecuencia de transformación estimada fué de 2 a 3×10^{-6} , se encontró que después de 7 a 10 semanas a partir de la microinyección, el reemplazamiento del ADN mit endógeno por el ADN mit exógeno fué total, lo que sugiere que la selección del ADN mit intracelular, juega un papel crucial en el reemplazamiento del mismo (15).

Más recientemente se han realizado experimentos de fusión en campos eléctricos y la electroporación. La electrofusión de células vivas tuvo un impacto significativo en el estudio bioquímico, inmunológico, genético y microbiológico. Los campos eléctricos y los iones Ca^{2+} inducen la fusión de membranas mitocondriales, pero un estudio que implicara la fusión de

mitocondrias no se había realizado todavía. Uno de ellos fue el realizado con mitocondrias de hepatocitos de rata, en que la fusión mitocondrial ocurre en un campo eléctrico de 1.56 a 1.58 kV/cm, a temperatura ambiente. Sin embargo, se observó que un incremento en el campo eléctrico mayor a 1.8 kV/cm, traía como consecuencia el rompimiento del organelo (10).

Otros métodos que se han desarrollado, son los llamados de "balística biológica". Estos son utilizados para acarrear ADN dentro de células de levadura y transformar de manera estable a las mitocondrias. Una cepa no revertante, la cual es respiratorio-deficiente (posee una delección en el gen mitocondrial *oxi3*), fue "bombardeada" con microproyectiles de tungsteno cubiertos con secuencias de ADN que podían corregir la delección *oxi3*. Se obtuvieron transformantes respiratorio-competentes, en las cuales el ADN con la secuencia del gen *oxi3*, fue introducido e integrado en un sitio homólogo en el genoma mitocondrial (14).

3.0 OBJETIVOS.

- 1) Transformar células de la levadura Kluyveromyces lactis, sensibles a antimicina A con mitocondrias provenientes de cepas resistentes en las que se conoce la mutación que otorga dicha resistencia.
- 2) Estudiar si existe algún cambio en el genoma mitocondrial de las colonias transformadas.

4.0. MATERIALES Y METODOS.

4.1 Cepas.

Las cepas de *K. lactis* utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Cepa	Fenotipo
W 600 B	α , ade ₁ , ade ₂ , leu
AM-34	α , his, A ^h ₂₇₃₄
WM-37	a, his
AM-13	α , his, A ^h ₂₇₁₃

4.2 Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo fueron los siguientes:

a) Medio mínimo SD:	Base nitrogenada de levadura	0.67 %
	Glucosa	2 %
	Agar	2 %
b) Medio mínimo SB:	Base nitrogenada de levadura	0.67 %
	Glicerol	3 %
	Agar	2 %
c) Medio completo YPAD:	Extracto de levadura	1 %
	Peptona de gelatina	1 %
	Glucosa	2 %
	Agar	2 %
	Sulfato de adenina	80 µg/ml
d) Medio completo YPAG:	Extracto de levadura	1 %
	Peptona de gelatina	1 %
	Glicerol	3 %
	Agar	2 %
	Sulfato de adenina	80 µg/ml
e) Medio de Extracto de Malta:	Extracto de malta	5 %
	Agar	3 %

f) Medio de agar suave:	Base nitrogenada de levadura	0.67 %
	sin aminoácidos	
	Glucosa	3.0 %
	Agar	0.8 %

g) Medios selectivos SG:	Base nitrogenada de levadura	
	sin aminoácidos	0.67 %
	Glicerol	3.00 %
	Agar	2.00 %
	+ aminoácidos:	
	Adenina	20 µg/ml
	Leucina	30 µg/ml
	o Histidina	20 µg/ml
	+ Antimicina A	5 µg/ml

h) Medios con antibiótico:

- a) YPAG + Antimicina A (5µg/ml)
- b) YPAG + Diurón (de 50 a 200 µg/ml)

i) Medio LB:	Cloruro de Sodio	1 %
	Bactotripton	1 %
	Extracto de levadura	1 %
	Agar	2 %

4.3 Soluciones amortiguadoras.

a) Solución SEM:	Sorbitol	1.2	M
	EDTA	25	mM
	β-mercaptoetanol	0.2	M
	pH 8		

b) Solución SEC:	Sorbitol	1.2	M
	EDTA	10	mM
	Citrato de Sodio	0.1	M
	pH 5.8		

c) Solución SCC:	Sorbitol	1.2	M
	Cloruro de Calcio	10	mM

d) Solución TEM:	Tris	10	mM
	EDTA	1	mM
	β -mercapto etanol	50	mM
e) Solución TES:	Tris	10	mM
	EDTA	1	mM
	Sorbitol	1	M
f) Solución MTE:	Manitol	0.6	M
	Tris	20	mM
	EDTA	5	mM
	pH 7.4		
g) Solución PSC:	Polietilenglicol	30	%
	Sorbitol	0.8	M
	Cloruro de Calcio	10	mM
h) Solución EM :	EDTA	50	mM
	β -mercapto etanol	0.35	M
i) Solución SET:	Sorbitol	1.35	M
	EDTA	0.1	M
	Tris	0.01	M
j) Solución TEN:	Tris	10	mM
	EDTA	10	mM
	Cloruro de Sodio	100	mM
	pH 8		
k) Solución TE :	Tris-HCl	10	mM
	EDTA	1	mM
	pH 7.5		
l) Solución EAS:	Etanol absoluto (3 volúmenes)		
	Acetato de Sodio (0.1 " " ")	3	M
	tARN	2	μ l
	pH 4.8		
m) Mezcla de liqación:	ATP	25	mM
	ligasa T4	2	u/rl
	Solución amortiguadora de ligasa	10	%

n) Solución STET:	Sacarosa	8	%
	Tritón X 100	5	%
	EDTA	50	mM
	Tris	50	mM
	pH 8		
o) Lisozima STET:	En la solución STET	10	mg/ml
p) Mezcla EtOH/Acetato de sodio:			
	EtOH (50 ml)	100	%
	Acetato de sodio (8 ml)	3	M
q) Solución PEG/NaCl:	Poli(etilenglicol)	20	%
	NaCl	2.5	M

4.4 Formación de Protoplastos.

Se llevó a cabo de dos maneras:

- A) El primer procedimiento fue una modificación de la técnica de Duell y colaboradores (7) que consiste en lo siguiente:

Se crecen las células en medio YPAD a 30°C con agitación constante, hasta la fase estacionaria temprana.

Las células se colectan por centrifugación a 3,440 x g durante 5 min, se lavan con agua y se resuspenden en Sorbitol 1.2 M, pH 7.5.

Se resuspenden en la solución amortiguadora SEM y se incuban 10 min a 30°C. Se lavan dos veces con sorbitol 1.2 M y se resuspenden en la solución amortiguadora SEC, se agregan 1.5 mg/g de células de Zimoliasa (73,400 u/g) a una concentración de 1.5 mg/g de células (peso húmedo) y se incuban hasta la formación de protoplastos. Esto toma aproximadamente de 30 a 40 min.

Se verifica la formación de protoplastos con una alícuota de la suspensión celular, la cual se resuspende en agua para provocar un choque osmótico y se observa al microscopio en contraste de fases. Cuando se obtiene una lisis de aproximadamente 80 a 90 %, los protoplastos se colectan por centrifugación a 860 x g durante 5 min.

Los protoplastos se lavan dos veces con sorbitol 1.2 M y una

vez con la solución amortiguadora SCC. Finalmente se resuspenden en 0.3 ml de la misma solución amortiguadora y se transfieren a un tubo Eppendorf.

B) El segundo procedimiento es una modificación del descrito por Brätislav y colaboradores (4), el cual emplea células intactas en lugar de protoplastos. Para ello, se resuspenden las células en la solución amortiguadora TEM y se incuban 90 minutos en un baño de agua a 30°C con agitación suave.

Se verifica de igual manera la formación de células competentes en el microscopio de contraste de fases observando la aparición de células oscuras producto del choque osmótico y se lavan con la solución amortiguadora TES.

Se resuspenden en 0.3 ml de la solución SCC y se transfieren a un tubo Eppendorf.

4.5 Obtención de mitocondrias.

La técnica que se utilizó es una modificación de la descrita por Hollenberg y colaboradores (12) y consiste en lo siguiente:

Se crecen las células en medio YPAD a 30°C con agitación constante, hasta la fase estacionaria temprana. Las células se colectan por centrifugación a 3,440 x g durante 5 min y se lavan dos veces con agua destilada fría.

Posteriormente, se resuspenden en la solución amortiguadora

MTE y se vacían en un frasco de vidrio que tiene un volumen de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro, se agitan manualmente durante varios periodos de 3 min, y se enfrían en hielo durante 5 min, hasta la aparición del 80 a 90 % de células rotas, y se decantan posteriormente, lavando las perlas de vidrio 2 o 3 veces con la solución amortiguadora MTE.

Se colectan las células enteras y los restos celulares a $1,680 \times g$ durante 5 min (BAJA) y el sobrenadante se centrifuga a $12,000 \times g$ durante 10 min (ALTA), para bajar las mitocondrias. El paquete resultante se resuspende en la solución amortiguadora MTE, y se centrifuga a alta y baja velocidad varias veces para limpiar las mitocondrias de restos celulares. Las mitocondrias se resuspenden finalmente en la solución SCC durante 5 min y se colectan en un tubo Eppendorf con 0.3 ml de la solución SCC.

4.6 Fusión de mitocondrias con protoplastos.

Para realizar la fusión de mitocondrias con protoplastos, obtenidos por cualquiera de los dos métodos descritos, se utilizó la técnica de Gungé (9) modificada y que consiste en lo siguiente:

Las mitocondrias y los protoplastos contenidos en la solución SCC de cada tubo Eppendorf, se centrifugan a $13,000 \times g$ en una microcentrifuga Beckman tipo B y cada uno de éstos se resuspenden en 500 μ l de la solución PSC.

Se mezclan los protoplastos y las mitocondrias en un solo tubo y se incuban a diferentes tiempos, entre 20 y 120 min de acuerdo a cada tratamiento, a temperatura ambiente.

Se toman alicuotas de la suspensión resultante, se mezclan en 10 ml de medio agar suave, se siembra en medios selectivos SG + antimicina 5 µg/ml + los aminoácidos correspondientes y se incuban de 15 a 20 días a 30°C.

4.7 Análisis de los productos de fusión.

Las colonias crecidas en los medios selectivos, se aíslan y se crecen en medios de YPAG + Antimicina, y se incuban a 30°C durante toda la noche. Posteriormente, se prueban los marcadores de auxotrofia y se verifica su fenotipo.

Se determina la segregación meiótica y mitótica del gen que confiere la resistencia a Antimicina, de la siguiente manera:

a) Segregación meiótica: Se cruzan en medio de extracto de malta las colonias transformantes, con una cepa sensible a Antimicina y con marcadores de auxotrofia complementarios, se seleccionan clones diploides en medio mínimo SD y se induce la meiosis en medio de extracto de malta, se realiza la disección de tétradas. Los segregantes se crecen en medios YPAG, medios selectivos y en medios de YPAG + Antimicina.

b) Segregación mitótica: Se realiza la cruce como en "a", se seleccionan clones diploides en medio mínimo SD, se crecen en

medios YFAG y se replican en YFAG + antimicina. Las placas se incuban a 30°C toda la noche.

4.8 Purificación del ADN mitocondrial.

La técnica utilizada en esta etapa es una modificación de la descrita por Sanders y colaboradores (19) de la siguiente manera:

Se crecen las células en medio YPAD y se incuban a 30°C con agitación constante hasta la fase estacionaria temprana.

Las células se colectan por centrifugación a 3,440 x g durante 5 min y se lavan con agua fría. Se resuspenden a razón de 4 ml/g de células (peso húmedo), en la solución amortiguadora EM y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min.

Se colectan por centrifugación a 3,440 x g durante 5 min y cada gramo de células se resuspende en 2.5 ml de la solución SET y se lavan dos veces con la misma solución.

Para formar protoplastos, las células se incuban con zimolasa (1.5 mg/g de células), en la solución SET. Una vez formados, se colectan por centrifugación a 860 x g durante 5 min y se resuspenden a razón de 6 ml/g de células de la solución amortiguadora SEAT, y se licúan 4 veces durante 1 min enfriando 3 min cada vez.

Posteriormente, se aíslan las mitocondrias como se describió anteriormente.

Las mitocondrias se resuspenden en 9.8 ml de la solución amortiguadora TEM, se agrega 0.2 ml de L-lauroilsarcosino (sarkosyl) al 2 %, y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min.

Se adiciona cloruro de cesio al 55 % (p/v) y se incuba a 4°C durante toda la noche.

Se centrifuga a 12,000 x g durante 30 min y se decanta la muestra, quedando una nata de proteínas adherida a las paredes del tubo. Se ajusta el índice de refracción en un refractómetro American Optical a una lectura de 1.3740 a 1.3760, se agrega bisbenzimidá (200 µg/ml) como colorante, se coloca la muestra en un rotor vertical Beckman VT1 50 y se centrifuga en la centrifuga Beckman L5-50 B a 104,000 x g durante 24 hrs.

Se aísla el ADN mit obtenido del gradiente (banda superior) y se le extrae el colorante con alcohol isoamílico saturado con cloruro de cesio. Posteriormente, se diluye el ADN mit con 3 volúmenes de la solución amortiguadora TE y después se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto y se incuba a - 4°C durante 2 hrs.

Posteriormente, se centrifuga a 5,900 x g durante 15 min, y se resuspende el precipitado en 250 µl de la solución TE. Se añaden 3 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y se incuba a - 70°C durante 20 min.

Se seca la muestra en una microfuga Speed vac Concentrator SAVANT y se resuspende en 150 µl de la solución TE.

4.9 Análisis de restricción de los ADNs mitocondriales.

El ADN mit de cada colonia transformante, se analizó con endonucleasas de restricción del tipo II, las cuales reconocen secuencias palindrómicas de 4 a 6 pares de bases.

ENZIMA	SOLUCION AMORTIGUADORA DE RESTRICCIÓN 10 X	
Eco R I, Hae III y Hind III	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	NaCl	50 mM
Hinc II y Sma I	Tris-HCl (pH 7.4)	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	KCl	50 mM
Rsa I	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	MgCl ₂	10 mM

4.10 Digestiones.

Se realizaron digestiones sencillas de los ADN mitocondriales con las enzimas indicadas anteriormente, incubando a 37°C hasta obtener una digestión total. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.5 % (p/v) que se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 15 min y los patrones de restricción obtenidos fueron analizados.

4.11 Clonación.

4.11.1 Ligación.

Se electroeluyó el fragmento de ADN mit que contiene, desde la región 5' hasta el sitio único de restricción para la enzima Hae III (aproximadamente 1.1 Kb), del gen que codifica para el apocitocromo b, y se precipitó con la solución EAS, incubando 20 min a -70 °C. Se lavó posteriormente con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en 10 µl del amortiguador TE.

Se realizó la reacción de "ligación" con el plásmido pTZ 18, digerido con la endonucleasa Sma I, y se utilizó la mezcla de ligación con la cual se incubó a 20 °C durante toda la noche.

4.11.2 Formación de células competentes.

Se sembraron células de *E. coli* (cepa JM 103) en 100 ml de medio LB y se incubaron a 37 °C con agitación constante, hasta obtener una densidad de 55 unidades Klett.

Se colectan las células a 4,000 x g durante 10 min, se resuspenden en 20 ml de CaCl₂ 50 mM y se incuban en hielo 20 min. Se colectan las células por centrifugación y se resuspenden en 2.5 ml de la misma solución.

4.11.3 Transformación.

Se mezclan las células competentes con la medio de ligación

y se incuban en hielo 20 min, después de lo cual se da un choque térmico y las células se colocan en una bañõ a 45 °C durante 3 min.

Posteriormente, se recuperan las células agregando 1 ml de medio LB incubando 1 hora a 37°C.

Se colectan las células y se resuspenden en 140 µl de medio LB al cual se le agregan 50 µl de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (XGAL) como sustrato sintético de la galactosidasa y 10 µl de un inductor para la expresión de la misma, el isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Se mezcla bien y se siembra en placas de LB + Ampicilina (50 µg/ml) y se incuban toda la noche a 37 °C.

4.11.4 Mini-preparaciones de plásmidos recombinantes.

La selección de las cepas que contienen a los plásmidos recombinantes, es decir, aquéllas que llevan insertos de ADN mit, se realiza por crecimiento en parche a las colonias blancas en medios LB + Ampicilina (50 µg/ml).

Una vez crecidas, se realiza una mini-preparación del plásmido de acuerdo con la técnica siguiente:

Se crece a la cepa en medio LB + Ampicilina por una noche, y se resuspende en 350 µl de la solución STET calentando posteriormente en un bañõ a 100 °C durante 5 min.

Se centrifugan a 13,000 x g en una microcentrifuga Beckman durante 15 min en frío y se remueve el precipitado. Se añaden 350 μ l de isopropanol y se incuba a -70°C durante 15 min.

Posteriormente se centrifuga durante 10 min para remover el isopropanol, y el precipitado se resuspende después en 200 μ l de la solución TE, se le añaden 600 μ l de la solución EtOH/Acetato de Sodio y se incuban a -70°C durante 15 min.

Se colectan en frío durante 10 min y se decanta el sobrenadante, y el precipitado se lava con EtOH al 70 %. Se seca el precipitado con vacío en un "Speed vac Concentrator", Savant y se resuspende en 100 μ l de la solución TE.

Finalmente las preparaciones del plásmido son analizadas por cortes con endonucleasas para verificar la presencia del inserto de ADN mit por medio de electroforesis en geles de agarosa.

4.11.5 Subclonación.

El fragmento de 1.1 Kb clonado en pTZ 19R se corta con la enzima Rsa I, se electroeluye el fragmento de 250 pb y se liga de nuevo en pTZ 19R, cortado con Sma I bajo las condiciones ya descritas.

De las clones que llevan consigo el fragmento de 251 pb, se obtienen moldes para la secuenciación.

4.11.6 Preparación de Moldes.

De las cepas obtenidas en la subclonación, se toman moldes de la siguiente manera:

Se inoculan las cepas en 2 ml de medio LB + Ampicilina (50 µg/ml), y se incuban a 37 °C durante 2 horas. Se agregan 10 µl de una suspensión del fago M13 K07 y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se toman 100 µl de este cultivo y se inoculan 3 ml de medio LB + Kanamicina (70 µg/ml) incubando toda la noche a 37 °C.

Las células se colectan por centrifugación durante 5 min, se agregan 0.3 ml de la solución PEG/NaCl y se incuba 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colecta durante 10 min y se decanta el sobrenadante. Se lava el precipitado con EtOH al 70 % y se seca. Se resuspende en 200 µl de la solución TE y se le añaden 100 µl de una mezcla de fenol neutralizado con y cloroformo en igual proporción, se mezcla durante 40 segundos y se colectan por centrifugación durante 4 min.

Posteriormente se extrae el cloroformo con un volumen de éter saturado con agua, se desecha la fase de éter y se precipita el fago con la solución EAS sin ARNt, y se incuba a -70 °C durante 30 min.

El fago se colecta durante 15 min y se seca el precipitado y se resuspende en 100 µl de la solución TE, verificando la presencia del molde de ADN con enzimas de restricción.

4.11.7 Secuenciación.

El protocolo de la reacción de secuenciación fue realizado de acuerdo al método descrito en "Sequenase" Version 2, United States Biochemical Corporation (22).

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 Selección.

Se realizaron tres experimentos de fusión en los cuales las cepas WM37 y W600B sensibles a antimicina A se convirtieron en protoplastos y se emplearon como células receptoras. Las mitocondrias fueron obtenidas a partir de las mutantes resistentes a antimicina A AM13 y AM34. Los resultados de las fusiones realizadas se observan en la Tabla I.

Ya que las levaduras crecidas en medios completos con antibióticos, pueden sufrir mutaciones espontáneas y manifestarse por la aparición de colonias en los medios con antibiótico, la mezcla de fusión se sembró en medio mínimo SG suplementado con los aminoácidos requeridos por las cepas receptoras + Antimicina y se utilizaron cepas receptoras con varios requerimientos de auxotrofia, para así aumentar la efectividad del sistema de detección de mutantes espontáneos, a células de la cepa donadora que pudieran estar contaminando la preparación de mitocondrias.

Así pues, se utilizaron medios SG + Antimicina + Ade + Leu para W600B y SG + Antimicina + His para WM37, por lo que, aunque cabe la posibilidad, sería muy difícil encontrar colonias de células que hubieran perdido marcadores de auxotrofia y que hubieran adquirido a su vez, un marcador mitocondrial como lo es la resistencia a antimicina y que crecieran en estos medios como producto de una mutación espontánea.

TABLA I. NÚMERO DE COLONIAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS EN CADA EXPERIMENTO
 DE FUSIÓN CON WM37 x AM34, W600B x AM34 y W600B x AM13

Fusión	Prot/Mitoc WM37 x AM34	No. de colonias transformantes obtenidas	Prot/Mitoc W600B x AM34	No. de colonias transformantes obtenidas	Prot/Mitoc W600B x AM13	No. de colonias transformantes obtenidas
Tiempo de fusión (hrs)	1	1	2		2	
Tratamiento para la obtención de protoplastos	Con Zinollasa		Con Zinollasa (a) Con β mercapto-etanol (b)	(a) 1 (b) 2	Con Zinollasa (a) Con β mercapto-etanol (b)	(a) 1 (b) 3
Medios de selección	SG + aa Antimicina		SG+ade+leu+ Antimicina		SG+ade+leu+ Antimicina	
Volumenes de células sembradas en medios selectivos (μl)	350		350		350	
Denominación de las colonias transformantes	T1		(a) T1 (b) T2 (c) T3		(a) TA TB (b) TC TD	

Además esto es verificado por la ausencia de crecimiento de colonias en las placas de medio mínimo con aminoácidos, sorbitol y antimicina A, utilizadas como controles de mitocondrias y protoplastos, estos resultados se observan en la Tabla II.

5.2 Factores de compatibilidad.

Otro aspecto que se tomó en cuenta como control de falsas transformantes, fue el factor de compatibilidad de cada cepa, esto porque en la fusión realizada con WM37 x AM34, las dos cepas tenían diferente factor de compatibilidad α y α' respectivamente, por lo que se pudo haber pensado que, ya que la obtención de mitocondrias no es 100 % pura, las células que hubieran quedado en el lote de mitocondrias pudieran regenerar y producir un cigoto producto de la fusión de dos protoplastos el donador y el receptor de mitocondrias, aunque esto era en parte descartado en las placas controles para mitocondrias. Por lo tanto, se utilizó posteriormente la cepa W600B la cual es del mismo factor de compatibilidad que la AM34 y AM13 (α y α') por lo que la probabilidad de que ocurra una fusión de protoplastos es menor (Tabla I).

Se utilizó la cepa AM13, ya que además de ser resistente a antimicina A como lo es la cepa AM34, tiene una delección de 6 nucleótidos que ocasiona un cambio en la movilidad electroforética de un fragmento generado con la endonucleasa Rsa I y que permite su fácil detección.

TABLA II. EXPERIMENTOS CONTROLES PARA LA REALIZACION DE LAS FUSIONES
 CON WM37 x AM34, W600B x AM34 y W600B x AM13

	PROTOPLASTOS (WM 37 x W 600 B)	No. de colonias obtenidas	MITOCONDRIAS (AM 34 x AM 13)	No. de colonias obtenidas
Vol. de células sebradas en SG+aa+Sorbitol(A)	50-100 µl	S/D = Ninguna D = Ninguna	-----	S/D = Ninguna
Vol. de células y mitocondrias sebradas en - YPAG (B)	50-100 µl	S/D = * D = 2000 a 2500	50 µl	S/D = 6
Vol. de células sebradas en (A) tomadas de una dilución 1:100 del amortiguador SEC	100 µl		-----	
Vol. de células sebradas en (B) tomadas de una dilución 1:100 en agua	100 µl		-----	

SEC: Sorbitol 1.2 M
 EDTA 10 mM
 Citrato de Sodio 0.1 M
 pH 5.8

S/D: Sin dilución

D: Dilución

*: incontables

5.3 Tiempo de Fusión.

En lo que se refiere al tiempo de incubación de las mezclas de protoplastos y mitocondrias en cada experimento de fusión, éste se varió de 1 a 2 horas para verificar si influía en la obtención de más o menos cepas transformantes, con lo cual se observó que el tiempo no es un factor que pueda variar la producción de cepas transformantes, o bien, que no se puede decir nada con respecto al tiempo, hasta realizar un experimento en donde el tiempo de incubación de la fusión sea mayor de 2 horas, lo cual todavía no ha sido probado (Tabla I).

5.4 Fusión.

Otro aspecto que se tomó como variable, fue el del método para la obtención de protoplastos, ya que se había observado que la transformación con plásmidos de células, tratadas con β -mercaptoetanol, tenía una mayor eficiencia de transformación (4), por lo que se probó este método además del que utiliza zimoliasa como enzima que digiere la pared celular.

Como se observa en la Tabla I, si bien no hubo un incremento significativo en el experimento con β -mercaptoetanol, sí crecieron de 2 a 3 cepas transformantes más, que en el experimento con zimoliasa.

Los resultados presentados aquí, comparados con los obtenidos en el trabajo de transformación con plásmidos (13) fueron muy bajos, ya que en estos últimos la eficiencia de

transformación con el tratamiento de β -mercaptoetanol fue incrementada aproximadamente en 25 veces, comparado con la eficiencia original. Sin embargo, en los resultados de este trabajo, la amplificación de la eficiencia de transformación no fue tan alta, aunque esto puede deberse a que la probabilidad de que suceda una fusión protoplasto-mitocondria es muy baja (Tabla I).

La explicación para la observación del aumento de cepas transformantes en el tratamiento con β -mercaptoetanol podría ser que la zimolasa, al digerir casi el total de la pared celular, hace que esta célula invierta más tiempo, y tenga por tanto más dificultad, para regenerar su pared en comparación con la célula a la que se le digirió solamente alguna región de la misma, por la acción del β -mercaptoetanol y entonces, aunque existieran más células sin casi la totalidad de su pared fusionadas con mitocondrias, estas células tendrían menor probabilidad de sobrevivir y en el caso de que lo logaran, éste les llevaría más tiempo comparadas con aquellas que tienen que regenerar menor cantidad de pared.

Por lo que se refiere al tiempo de incubación, se considera que éste fue suficiente para que las células regeneraran su pared celular, ya que se mantuvieron de 15 a 20 días a 30 °C. De acuerdo a esto es más factible pensar que probablemente el factor que influyó en los tratamientos fue la baja viabilidad de las células.

Por otra parte, como se observa en la Tabla I, el número de copas transformantes obtenidas fue bajo en los tres experimentos, por lo que se comprueba que el evento de fusión tiene una baja frecuencia. Esto está apoyado por la observación de la ausencia de crecimiento de colonias en los medios controles para protoplastos (Tabla II), lo cual quiere decir que las colonias transformantes que crecieron en los medios selectivos no son falsas. Estos resultados verifican los ya reportados, en los que se observa que la frecuencia para obtener productos de fusión protoplasto-mitocondria en levadura es de 1×10^{-8} (8), por lo que se considera que los resultados obtenidos en cada experimento de fusión fueron positivos.

El efecto producido por el polietilenglicol todavía es desconocido, sin embargo, se ha probado que la eficiencia de transformación depende en gran parte de la presencia de este compuesto (4, 7). En este trabajo la concentración de polietilenglicol se mantuvo fija (30 %), por lo que no se sabe si en otras concentraciones pudiera o no aumentar la eficiencia de transformación.

Cabe hacer notar que en lo posterior no se realizaron experimentos con la cepa obtenida de la fusión de WM37 x AM34, ya que el medio de selección carecía de sorbitol, lo cual seguramente hizo difícil la regeneración de los protoplastos como productos de fusión. Esto comprueba a su vez, la función del sorbitol como un reactivo que mantiene las condiciones isotónicas

del medio en el cual las células se regenerarían, de no existir el sorbitol la viabilidad celular decrecía.

5.5 Curvas de crecimiento.

Se hicieron curvas de crecimiento de las cepas transformantes obtenidas de las cruces de W600B :: AM34 y W600B :: AM12, para los tiempos medios de generación correspondientes, los cuales fueron calculados a partir de una regresión lineal de cada curva.

Se realizó este experimento, ya que se había observado que el crecimiento de las cepas transformantes en las placas de medios YPAG con y sin antimicina A, era un poco más lento comparado con el crecimiento de la cepa receptora de mitocondrias (W600B), por lo que se quiso observar si había una diferencia significativa entre el crecimiento de las colonias transformantes con respecto a la cepa receptora.

La Figura 2 muestra las curvas de crecimiento de las cepas transformantes obtenidas de la fusión de W600B :: AM34. Los valores de tiempo medio de generación (TMG) se muestran en la Tabla III, y se observa que con respecto a la cepa W600B, la cepa T1 creció en 1:55 horas más lenta; la cepa T2 creció en 55 min más lenta y la cepa T3 creció en 1:05 h más lenta.

Por otra parte, comparando los TMG con la cepa donadora de mitocondrias, AM34, se observa que la variación fue menor, ya que la cepa T1 creció en 1:30 horas más lenta; la cepa T2 creció en

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS
TRANSFORMANTES OBTENIDAS POR
LA FUSION DE W 600 B x AM 34**

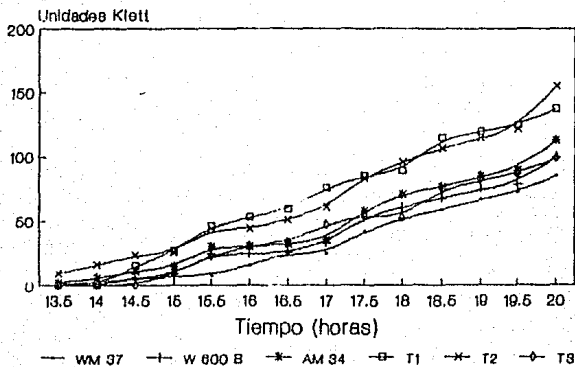


Figura 2

**TMG DE LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS DE
LA FUSION DE W600B x AM34**

<u>CEPAS</u>	<u>TIEMPO (hrs)</u>
W 600 B	1:00
AM 34	1:25
WM 37	1:00
T1	2:55
T2	1:05
T3	2:05

TMG = TIEMPO MEDIO DE GENERACION

TABLA III

**CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS
TRANSFORMANTES OBTENIDAS POR
LA FUSION DE W 600 B x AM 13**

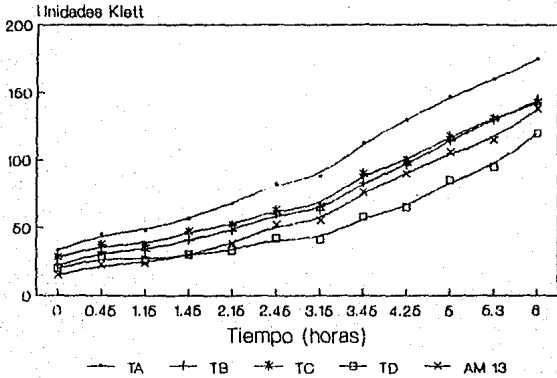


Figure 3

**TMG DE LAS TRANSFORMANTES OBTENIDAS DE
LA FUSION DE W600B x AM13**

<u>CEPAS</u>	<u>TIEMPO (hrs)</u>
AM 13	2:15
TA	2:15
TB	2:04
TC	2:30
TD	2:30

TMG = TIEMPO MEDIO DE GENERACION

TABLA IV

30 min mas lenta y la cepa T3 creció en 40 min mas lenta.

La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento de las cepas transformantes obtenidas de la fusión de W600B x AM13. En la Tabla IV se dan los tiempos medios de generación, y se observa una variación del doble de tiempo con respecto a la cepa receptora W600B ya que la cepa TA creció en 1:15 hora mas lenta; la cepa TB en 1:04 hora mas lenta y las cepas TC y TD crecieron en 1:30 horas mas lentas que la cepa W600B. Sin embargo, comparando los TMG calculados con respecto a la cepa AM 13, se observa que la cepa TA no crece a la misma velocidad; la cepa TB completa su TMG 10 min antes que la cepa AM 13 y las cepas TC y TD tienen una variación de 15 min más que la cepa donadora de mitocondrias.

Los datos de cada curva de crecimiento fueron sometidos a la prueba estadística de "t" de student en donde se demostró que con respecto a la variación que existe entre los datos de cada curva, éstos son estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos a partir de las Figuras 2 y 3 mostraron en cualquiera de las dos fusiones, que las cepas transformantes tienen una velocidad de crecimiento muy parecida a la de las cepas donadoras de mitocondrias (AN34 y AM13), ya que varían en aproximadamente 1 hora más que la de la cepa receptora de mitocondrias (W600B).

Estos resultados pueden ser discutidos basados en

Experimentos (20) en los que se demostró que cuando se crecen aeróbicamente células de levadura normales en medios de cultivo que contengan fuentes de carbono no fermentables, tales como glicerol, etanol y lactato, la mitocondria con los componentes de la cadena respiratoria, incluyendo citocromos y la síntesis de proteínas, se encuentran en condiciones normales y favorables para su funcionamiento. Por el contrario, cuando se crecen aeróbicamente en medios que contengan glucosa como fuente de energía entonces en la mitocondria se reprime la respiración.

Existen otros trabajos (27) en los que se ha visto que las cepas resistentes a antibióticos como la eritromicina o el cloranfenicol, tienen un crecimiento más lento ya que se ha demostrado que estos antibióticos han actuado a nivel de citocromos inhibiendo diferentes sitios de la cadena transportadora de electrones.

Los resultados encontrados en este trabajo no son muy claros, ya que las cepas aunque son crecidas en presencia de glicerol como fuente de carbono, en ausencia de antibióticos, tienen un tiempo medio de generación más lento que la cepa receptora, por lo que puede decirse que si estas cepas antes no poseían la resistencia a antimicina A y ahora que la poseen son más lentas, entonces se deduce que la presencia de tal resistencia está afectando de alguna manera a la cadena respiratoria. No se puede saber todavía a qué nivel porque aún no hemos realizado mediciones a nivel de citocromos, sin embargo,

la presencia de tal retraso es evidente.

5.6 Resistencia cruzada a Diurón.

Basados en el conocimiento de que las cepas donadoras de mitocondrias, poseen resistencia a antimicina A y resistencia cruzada a Diurón (herbicida que funciona como inhibidor de la cadena respiratoria), ambas ubicadas en el genoma mitocondrial, se verificó si las cepas transformantes presentaban tal resistencia como una evidencia más del evento de fusión.

Los resultados del crecimiento obtenido a diferentes concentraciones de Diurón y por otro lado en presencia de antimicina A son mostrados en la Tabla V.

TABLA V. RESISTENCIA A DIURON (50 a 200 µg/ml) Y ANTIMICINA A (5 µg/ml) DE LOS PRODUCTOS DE FUSION.

	N600B	AM34	AM13	W 600 B x AM 34			W 600 B x AM 13			
				T1	T2	T3	TA	TB	TC	TD
Diurón	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Antim.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Estos resultados muestran que las cepas transformantes, productos de la fusión de N600B x AM34, tienen resistencia a las mismas concentraciones de diurón y antimicina A que la cepa AM34.

Igualmente, las cepas transformantes producto de la fusión de W600B x AM13 tienen resistencia a antimicina A y sensibilidad a diurón respectivamente, como en el caso de la cepa AM13, por lo que estos resultados son una evidencia más que apoyan el hecho de que las cepas transformantes, son productos de fusiones reales, ya que la resistencia sólo pudo haber sido conferida por las mitocondrias presentes en la cepa W600B, la cual era en un principio sensible a los dos antibióticos.

5.7 Segregación meiótica.

Además de lo anterior, se estudió la herencia de la resistencia a antimicina, haciendo cruces de cada transformante con una cepa sensible al antibiótico, se indujo la esporulación y se realizaron disecciones de tétradas, de cuyo análisis resultó una segregación en proporción 4:0, es decir, no Mendeliana y esta prueba indicó, al igual que las anteriores, que se trataba de productos de fusión verdaderos, en los que la resistencia al antibiótico es proporcionada por las mitocondrias de las cepas donadoras.

5.8 Pruebas de alelismo.

Una vez obtenidos los resultados anteriores, y ya que se sabe que las mutantes AM34 y AM13 mapean en dos loci diferentes, se identificó el locus dentro del gen en el cual se encuentra la mutación a antimicina en las colonias transformantes, el cual teóricamente, se esperaba que fuera el mismo de la cepa donadora correspondiente.

Los resultados de las cruces de cada cepa transformante, con una cepa que posee la resistencia a antimicina en el mismo o en diferente locus son presentados en la tabla VI.

Las transformantes de cada producto de fusión fueron cruzadas con las siguientes cepas: 1) la KG-77-10D cuyo fenotipo es a, his, Araxia y 2) la KG-90-3B cuyo fenotipo es a, arg, Araxia.

De estos resultados se observó que las cepas transformantes producto de la fusión de H600B x AM34, las cuales poseen el fenotipo a, ade, leu, Ar al ser cruzadas con la cepa KG-77-10D, produjeron colonias que presentaron un 100 % de crecimiento en medios YPAG y YPAG + Ant respectivamente. También se observó el mismo resultado para estas cepas transformantes al ser cruzadas con la cepa KG-90-3B, ya que produjeron colonias diploides que crecieron un 100 % en ambos medios.

Los resultados obtenidos en las cruces de las transformantes de H600B x AM34 con la cepa KG-90-3B fueron positivos, ya que se esperaba observar un 100 % de crecimiento en medios sin y con antibiótico. Esto puede ser discutido basados en el hecho de que la cepa con la cual fue cruzada cada una de las cepas transformantes, poseía la mutación de antimicina A en el mismo locus que la cepa donadora de mitocondrias, por lo que la probabilidad de que exista una recombinación que dé como resultado una colonia sensible al antibiótico es nula.

TABLA VI. NUMERO Y PORCENTAJE DE COLONIAS DIPLOIDES
 RESISTENTES A ANTIMICINA A OBTENIDAS DE LAS CRUZAS DE CADA
 TRANSFORMANTE CON LAS CEPAS KG-77-10D Y KG-90-3B.

CRUZAS	SD	YPAG	YPAG + Ant	% Resist.
1 x KG-77-10D	1252	1252	1252	100
2 x KG-77-10D	1497	1497	1497	100
3 x KG-77-10D	1369	1369	1369	100
1 x KG-90-3B	1190	1190	1190	100
2 x KG-90-3B	1039	1039	1039	100
3 x KG-90-3B	1530	1530	1530	100
A x KG-77-10D	5642	5642	5642	100
B x KG-77-10D	3263	3263	3263	100
C x KG-77-10D	4293	4293	4293	100
D x KG-77-10D	6825	6825	6825	100
A x KG-90-3B	3015	3015	3015	100
B x KG-90-3B	2120	2120	2120	100
C x KG-90-3B	1090	1090	1089	99.99
D x KG-90-3B	1399	1399	1399	100

KG-77-10D: a, his, A⁺₂₇₁₉

KG-90-3B: a, arg, A⁺₂₇₂₄

Con respecto a las cepas transformantes cruzadas con la cepa KG-77-100 se observó una ausencia de colonias sensibles, lo cual puede ser demostrado con base en el hecho de que la distancia entre un locus y otro -nucleótidos 93 y 288/295 respectivamente- es muy corta, por lo que la probabilidad de que exista una recombinación que dé como resultado una colonia sensible es muy baja.

Tomando en cuenta lo anterior, se aislaron colonias diploides a partir de la cruce de las cepas transformantes U6008 y AM13, con las mismas cepas.

Las colonias diploides resultantes de la cruce con la cepa KG-77-100 tuvieron un 100 % de crecimiento en presencia y en ausencia del antibiótico y esto fue observado en todas las transformantes. Sin embargo, las colonias resultantes de la cruce con la cepa KG-90-3B, tuvieron un 100 % de crecimiento excepto por la cepa TC la cual en medio de YFAG + Antimicina, presentó una ligera disminución que, aunque estadísticamente no es considerada como significativa, es un resultado positivo, ya que al ser una cepa que posee la mutación localizada en diferente locus, la probabilidad de que se realice una recombinación, aunque es muy baja, por la cercanía de los loci, es factible que se presente y esto puede dar una evidencia de que la mutación en las colonias transformantes, está localizada en el mismo locus de la cepa donadora de mitocondrias. Las otras tres cepas transformantes dieron un 100 % de crecimiento en presencia y en

ausencia del antibiótico. Esto pudo haber sido quizá por el número de colonias sembradas en nuestra técnica, ya que es probable que con un número mayor de células sembradas se pueda detectar un evento de recombinación, aunque se considera como significativo un número de 1.000 colonias o más. El hecho de que no se observaran recombinantes pudiera igualmente deberse a la cercanía de los loci.

5.9 Patrones de restricción.

De acuerdo a los objetivos planteados al inicio del trabajo, se realizó un estudio a nivel molecular de todas las cepas transformantes, en las cuales se obtuvo y se digirió sus respectivos ADNs mitocondriales con enzimas de restricción, y debido a que los patrones de corte visualizados en geles de agarosa con bromuro de etidio son diferentes en cada cepa, se procedió a realizar un estudio comparativo de éstos.

La justificación para la realización de este estudio fue porque se planteó la hipótesis de que si una mitocondria, o varias, resistentes a antimicina y con un determinado patrón de restricción en su genoma, penetraba a una célula que poseía mitocondrias con diferente patrón de restricción y la mitocondria podía funcionar en el interior, entonces tuvo que haber sucedido cualquiera de los siguientes hechos:

- 1) Que una vez dentro de la célula, la mitocondria se multiplicara junto con las mitocondrias originales, sin tener

lugar una recombinación genética, con lo cual la nueva mitocondria permanecería en la célula por un periodo de tiempo por la presión de selección que ejercería el antibiótico y posteriormente se perdería, ó

2) Que las mitocondrias originales de la célula, se fusionaran con la nueva mitocondria, de tal forma que adquirieran la resistencia al antibiótico por medio de una recombinación gruesa del genoma o una por una recombinación sitio-específica.

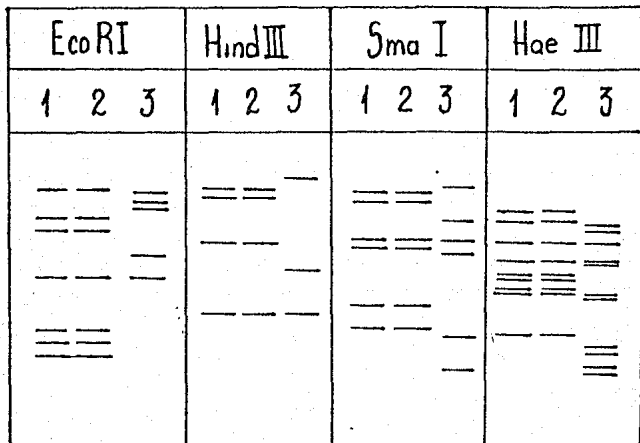
La primera opción se descartó por que la resistencia a antimicina no se perdió a través del tiempo por lo que se pensó en la posibilidad de que quizá se podría observar una recombinación, por la generación de un nuevo patrón de restricción producto, de la recombinación del ADN de la mitocondria resistente con el de la sensible.

De aquí la utilidad de la cepa AM13, en la cual se sabe que el noveno fragmento en tamaño obtenido por digestión con la endonucleasa Hae III, posee parte del gen que codifica para el citocromo b, el cual lleva la mutación que da resistencia a Antimicina (6), por lo que aquí sería fácilmente identificable alguna variación.

Los patrones de restricción de las cepas donadoras y receptoras, así como de las cepas transformantes, son mostrados en la Figura 4.

Los resultados obtenidos anteriormente, no muestran ninguna

FIGURA 4. PATRONES DE RESTRICCIÓN OBTENIDOS A PARTIR DE DIVERSAS DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE LAS CEPAS TRANSFORMANTES COMPARADAS CON LAS CEPAS DONADORA Y RECEPTORA.



1: Cepa receptora W400B.
 2: Cepas transformantes: T1, T2, T3, TA, TB, TC.
 3: Cepas donadoras AM34 y AM13.

diferencia en el patrón de restricción, con respecto al de las cepas receptoras de mitocondrias, por lo que se podría pensar que no hubo una recombinación genética tan grande, que pudiera modificar el orden de los fragmentos de restricción. Sin embargo, la posibilidad de que haya sucedido tal recombinación, no puede ser eliminada del todo, ya que pudo haberse dado pero a un nivel tan fino, que sólo una lectura de la secuencia del gen correspondiente, podría detectarlo. Esto se realizó ya que se tiene la secuencia del gen que codifica para el apocitocromo b en las cepas receptoras y donadoras.

5.10 Clonación.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis con enzimas de restricción de las cepas transformantes, se procedió a caracterizar una de éstas, la cepa TC, de la cual se clonó el fragmento que posee al gen que codifica para el apocitocromo b (fragmento de 1.1 kb) en células de *E. coli* (cepa JM 103), y se utilizó como vector al plásmido pTZ 19R.

Ya que se tenía la ubicación de la mutación a antimicina A en este gen en la cepa AM 13, se realizó la subclonación del fragmento de 1.1 kb, que consiste en reducir el tamaño del gen con el fin de acortar la distancia que recorrerá la ADN polimerasa a partir del iniciador ("primer") hasta el sitio donde se encuentra la mutación para facilitar la secuenciación, y se obtuvo un inserto de aproximadamente 250 pb del ADN mit de la transformante TC.

La Figura 5 muestra la estrategia de clonación y subclonación que se siguió en este trabajo.

5.11 Secuenciación.

El experimento de secuenciación realizado según el método de Sanger et al (20), fue hecho a partir de dos clones diferentes que contenían el fragmento de 250 pb.

Los resultados obtenidos de la secuenciación son presentados en la Figura 6, en la cual se observa la presencia de la delección de 6 nucleótidos en el ADN de las clones obtenidas de la cepa TC la cual resultó ser idéntica a la de la cepa donadora AM13 previamente reportada (6).

Esta delección produce un cambio en la síntesis de aminoácidos ya que en la cepa silvestre (UT) se producen los aminoácidos leucina, isoleucina y triptofano, comparado con la cepa donadora AM13 así como en la cepa TC, en la que se obtiene un sólo aminoácido, serina. Esto es ilustrado en la Figura 7.

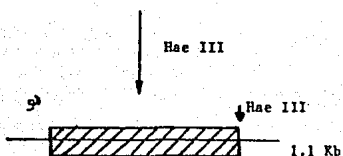
La presencia de tal delección indica que existen eventos de recombinación del ADN mit exógeno, con el ADN mit de la cepa receptora ya que este último no poseía inicialmente la delección.

Al parecer, cabe la posibilidad de que la recombinación efectuada en estos genomas haya sido sitio específica. Esto quiere decir que la recombinación fue el resultado de un doble entrecruzamiento entre el ADN mit exógeno y el propio de la cepa

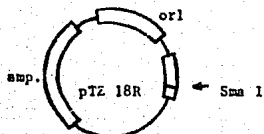
FIGURA 5. ESTRATEGIA DE CLONACION Y SUBCLONACION DEL FRAGMENTO QUE CONTIENE AL GEN QUE CODIFICA PARA EL APOCITOCROMO B Y QUE POSEE LA MUTACION QUE DA RESISTENCIA A ANTIMICINA A.

A. CLONACION.

ADN mitocondrial



+



+

E. coli (JM 103)

LB + Ampicilina

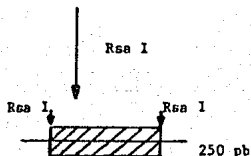
Selección de plásmidos recombinantes.

Minipreparación

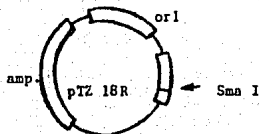
CLONA.

B. SUBCLONACION.

ADN de la clona



+



+

E. coli (JM 103)

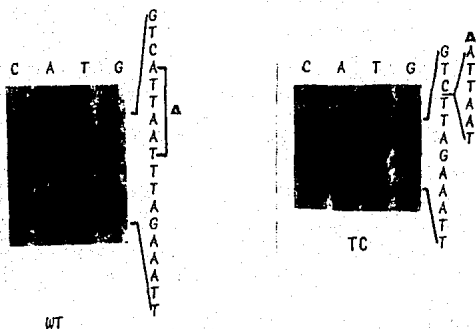
LB + Ampicilina

Selección de plásmidos recombinantes.

Minipreparación

SUBCLONA.

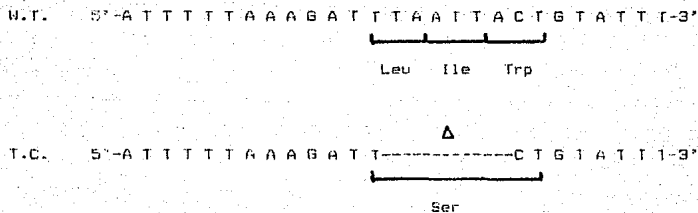
Figura 6. Secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el apocitocromo b en la cepa silvestre (WT) y secuencia de nucleótidos para el mismo gen en la cepa transformante (TC), donde se muestra la delección.



Δ: Delección en la cepa TC.

Esta delección es la misma que se reportó para la cepa donadora AM13.

FIGURA 7. SECUENCIA DE BASES EN LA CUAL SE MUESTRAN LOS CODONES PARA LOS AMINOACIDOS CORRESPONDIENTES EN LA CEPA SILVESTRE (WT) Y EN LA CEPA TRANSFORMANTE (TC).



△: Delección en la cepa TC.
 Esta delección es la misma que se reportó (6) para la cepa donadora AM13.

en el cual se llevó a cabo la integración del fragmento que lleva la mutación para la resistencia a antimicina. Esto está basado en el hecho de que algunos sitios fácilmente identificables cercanos al gen, como lo es un sitio de restricción para la enzima Hae III, presente en el gen de la cepa receptora, se conservan en el genoma mitocondrial de las dos clonas. De no haber sido una recombinación sitio-específica, habría una alta probabilidad de que estos sitios se hubieran perdido. Sin embargo, el hecho de que solo la región que llevaba consigo la mutación para la resistencia a antimicina hubiera recombinado, sería muy discutible. Se considera la posibilidad de que al encontrarse en un medio con antibiótico como presión selectiva, se iba a favorecer el crecimiento de las células en las cuales el ADN mit. proveniente de las cepas resistentes, recombinó con el ADN mit. de las cepas receptoras lo cual fue comprobado con los experimentos de secuenciación del gen que codifica para el citocromo b y que posee la mutación que da resistencia a antimicina A. El resto del genoma mitocondrial de estas clones no ha sido analizado todavía pero existe la probabilidad de que no se encuentren cambios importantes después de la recombinación.

Nuestro trabajo, al igual que el trabajo reportado por Gunge (9), no revela la forma en la cual se realizó el evento de fusión por lo que no se puede decir si la mitocondria penetra a la célula en forma intacta o si solamente el ADN mit. es liberado en su interior.

En este trabajo se encontraron resultados nuevos en los análisis a nivel molecular del ADN mit de cada cepa transformante, en los que se observa que una vez que se encuentra en el interior de la célula el ADN mit exógeno, no se detectan al menos con este procedimiento, eventos de recombinación tales que provoquen diferencias tan grandes como para poder ser observadas en electroforesis con geles de agarosa.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la secuenciación, se observa que muy probablemente hay eventos de recombinación sitio-específica, los cuales permiten que el ADN mit endógeno adquiera la característica de la resistencia a antimicina A.

Con lo anterior, se puede decir que este análisis no da una explicación completa de la forma en la cual se da la fusión mitocondria-protoplasto, pero sin embargo, provee una evidencia de que tal evento de fusión sucede en *K. lactis*.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

- 1) La fusión de organelos, en este caso mitocondrias, con células de levadura puede ser realizada.
- 2) Existe transferencia de material genético entre ambos genomas.
- 3) Existen eventos de recombinación sitio-específica entre el ADN mit provenientes de cepas resistentes a antimicina A y los de la cepa receptora.

Dentro de las perspectivas que se derivan de este trabajo, es el de elucidar el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la fusión entre la mitocondria y la célula de levadura. Este puede ser abordado mediante el marcaje fluorescente de las membranas celular y mitocondrial externa con reactivos como el bromuro de etidio (EBR) y/o 4,6-Diamino-2-fenilindol-dihidroclicloridrato (DAPI) en las condiciones adecuadas, las cuales podrían ser la utilización de estos reactivos unidos a anticuerpos específicos para cada membrana siendo observados por microscopía de fluorescencia para comprobar la entrada de mitocondrias enteras a la célula receptora.

La transformación interespecifica es otro de los trabajos que se pueden derivar a partir de éste. Especificamente el de la transferencia de caracteres extracromosómicos por medio de la transformación de mitocondrias de la levadura *S. lactis*, que llevan un marcador determinado, con células receptoras de *S. cerevisiae* las cuales tienen la totalidad de su ADN mitocondrial deletado, es decir son Rho^0 , probando si tal transformación interespecifica se puede llevar a cabo.

Por otra parte, la transformación puede ser utilizada como una técnica que permita introducir información específica que complemente algunas deficiencias en la célula receptora y de esta manera conocer dichas funciones.

7.0 BIBLIOGRAFIA

- 1) Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. 1983. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. U.S.A.
- 2) Arnold J. N. 1981. Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure. CRC Press Inc. U.S.A. Vol 1.
- 3) Berkaloff A., Bourquet J., Favard P. y Lacroix J. C. 1982. Biología y Fisiología Celular. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. Vol 11.
- 4) Bretislav B. y Kovac L. 1986. Factors Enhancing Genetic Transformation of Intact Yeast Cells Modify Cell Wall Porosity. J. Gen. Microbiol. 132: 3089-3093.
- 5) Clark M. A. y Shay J. W. 1982. Mitochondrial Transformation of Mammalian Cells. Nature. 295: 605-607.
- 6) Coria F., García M. y Brunner A. 1989. Cytochrome b genes with six nucleotide deletion or single nucleotide substitution confer tetracycline-resistance in *Kluyveromyces fragilis*. Molecular Microbiology. en Prensa.
- 7) Duell E.A., Inoue S. y Utter M.F. 1964. Isolation and properties of intact mitochondria from spheroplast of yeast. J. Bacteriol. 89: 1762-1773.
- 8) Fukuda H. y Kimura A. 1980. Transfer of mitochondria into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* by mini-protoplasts fusion. FEBS letters. 113(1): 56-60.
- 9) Cunda H. 1979. Fusion of Mitochondria with Protoplasts in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. Gen. Genet. 170: 243-247.

- 10) Guveli D.E. 1987. Fusion of Mitochondria. *J. Biochem.* **102**: 1329-1332.
- 11) Hinnen A., Hicks J.B. y Fink G.P. 1972. Transforming of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**(4): 1929-1933.
- 12) Hollenberg D.F., Borst P. y VanBruggen E.F. 1970. Mitochondrial DNA. A 25 μ closed circular duplex DNA molecule in wild-type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity. *Biochim. Biophys. Acta.* **209**: 1-15.
- 13) Hyman G.C., Cramer J.H. y Round R.H. 1982. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA segment conferring high-frequency yeast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 1578-1582.
- 14) Johnston S.A., Anziano P.G., Shork K., Sanford J.C. y Butow F.A. 1988. Mitochondrial Transformation in yeast by Bombardment with Microprojectiles. *Science.* **240**: 1538-1541.
- 15) King N.F. y Attardi G. 1988. Injection of Mitochondria into Human Cells leads to a Rapid Replacement of the Endogenous Mitochondrial DNA. *Cell.* **52**: 811-819.
- 16) Lehninger A.L. 1980. *Bioquímica*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- 17) *M13 Cloning/Dideoxy Sequencing*. 1980. BRL, Inc. Instruction Manual. Copyright.
- 18) Orr-Heaver T.L., Szostak J.W. y Rothstein R.J. 1981. Yeast Transformation: A model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**(10): 6354-6358.
- 19) Rassoulzadegan M., Binetruy B. y Cuzin F. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and

eukaryotic cells. *Nature*, 295: 257-259.

20) Rose A. H. y Harrison J. S. 1987. *The Yeast: Biology of Yeasts*. Acad. Press Inc. 2nd Ed. Vol 1. U.S.A. pp 1-407.

21) Sanders J.P.M., P.J. Hejers, G.S.P. Groot y P. Borst. 1974. Properties of mitochondrial DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 374: 136-144.

22) Sequenase. Version 2.0. Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing with Sequenase. 1st. Edition. United States Biochemical Corporation.

23) Schowen R.J., Wolf K. y Faudewitz F. 1983. *Mitochondria 1983: Nucleo-Mitochondrial Interactions*. Walter de Gruyter. Berlin, Germany.

24) Spencer J.F.T., Spencer D.M. y Smith A.R.W. 1983. *Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects*. Springer-Verlag. New York Inc. U.S.A. pp 1-531

25) Traqoleff A. 1982. *Mitochondria*. Plenum Press. New York, U.S.A. pp 1-333.

26) Usolowski M., Algeri A. y Fukuhara H. 1981. Gene Organization of the Mitochondrial DNA of Yeast: *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces lipolytica*. *Curr. Genet.* 9: 157-162.

27) Wilkie, D., Saunders, G., y Linnane, A.W. 1967. Inhibition of respiratory enzyme synthesis in yeast by chloramphenicol: Relationship between chloramphenicol tolerance and resistance to other antibacterial antibiotics. *Genet. Res. (Camb.)*, 10: 199-203.