

Contents

Declaración de apoyos	5
List of Tables	9
List of Figures	10
Resumen	11
Abstract	12
1 Introduction	13
1.1 Overview	14
1.1.1 Motivation	14
1.1.2 Objectives	16
1.2 Fitness, selection and environment	17
1.2.1 Fitness and selection	17
1.2.2 Estimating gene's contribution to fitness	17
1.2.3 Gene-environment interactions	18
1.3 Beneficial mutations, pleiotropy, and optimality	20
1.3.1 Phenotype and the fitness landscape model	20
1.3.2 Pleiotropy	21
1.3.3 Trade-offs and antagonistic pleiotropy	22
1.3.4 Mutations and optimality	23
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> as a model	25
1.5 Large scale genetic analysis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.6 Corollary	26
2 General strategy	27
2.1 General strategy	28
2.2 Strategy diagram	29
3 Results and Discussion	30
3.1 Improving a recently-developed competition assay based on fluorescent-labeled yeast deletion strains in order to make it amenable for fitness assays under different environments.	31
3.1.1 Fluorescent protein expression module	31
3.1.2 Suitable genes for fusion	31

Contents

3.1.3	Construction of the module	32
3.1.4	Fluorescent module evaluation	34
3.1.4.1	Sensitivity range of FP-tagged reference strains	35
3.2	Generating a collection of 480 metabolic knockout gene-deletions, each tagged with one of two fluorescent proteins for the competitions assay.	36
3.2.1	Tagged deletion mutant array construction	36
3.2.2	Metabolic Deletion Mutant Array	39
3.2.3	Reference strain	39
3.3	Defining a set of environmental stresses to test the performance of the collection of metabolic knockouts under different conditions.	39
3.3.1	Environmental condition adjustments	39
3.3.2	Environmental condition evaluation	39
3.3.3	Environmental stress condition definition	42
3.4	Accurately measuring the fitness effects of each of the metabolic-gene deletion mutations under six different environmental conditions.	43
3.4.1	Competition assay	43
3.4.2	Data Analysis and fitness measurements	45
3.4.3	Sensitivity scoring method	45
3.4.4	Additional datasets from the literature	46
3.5	Implementing a robotic platform for automating all experimental procedures.	46
3.5.1	Automation and competition experiment escalation	46
3.5.2	Size of the competition	46
3.5.3	Programming a flexible interface to control the robotic platform	47
3.6	Accurately measuring the fitness effects of each of the metabolic-gene deletion mutations under six different environmental conditions. (continued)	50
3.6.1	Fitness measurements for each metabolic gene-knockout are scored in high-resolution	50
3.7	Describing the aggravating and alleviating genetic interactions in metabolism, indentifying known and novel genes that allow or prevent optimal yeast growth under different environmental stresses.	56
3.7.1	Some environmental stresses elicit a change in the distribution of fitness effects	56
3.7.2	Changes in the mean selection and the environmental effect in selection	57
3.7.3	This methodology helps to identify gene-environment interactions	60
3.7.4	Caffeine	61
3.7.5	Salt	62
3.7.6	Peroxide	62
3.7.7	Hydroxyurea	63
3.7.8	Methyl methanesulfonate	63
3.8	Describing the distribution of beneficial effects of the complete collection of metabolic deletions across environments.	64
3.8.1	Beneficial gene deletions behave like neutral mutations	64

Contents

3.8.2	The prevalence of beneficial mutations throughout conditions and an insight into antagonistic pleiotropy	65
3.8.3	Functional association of pleiotropic beneficial mutations	67
4	Discussion and concluding remarks	71
	Bibliography	73
	Appendix A	80
	Experimental estimation of the selection coefficient	80
	Appendix B	83
	Strains and medium	83
	Synthetic Genetic Array	84
	Primers	85
	PCR settings for gene-fusion insert amplification	85
	Stress Competition Media	86
	Appendix C	

Resumen

Los organismos vivos se caracterizan por ser altamente robustos a las perturbaciones genéticas. En una serie de organismos modelo se ha determinado experimentalmente que la pérdida completa de función de la gran mayoría de los genes (70-90%) no tiene un efecto sobre la viabilidad del organismo —al menos, bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, el uso de métodos convencionales no ha permitido medir con exactitud las contribuciones pequeñas, pero significativas, a la adecuación del organismo. Asimismo, la distribución de las mutaciones adaptativas a nivel del genoma sigue siendo un fenómeno poco explorado debido a las mismas limitaciones técnicas. En este trabajo se presenta una metodología de fenotipificación con la capacidad de evaluar con gran precisión los efectos marginales de la carencia de un gen. Esta aproximación de gran escala está basada en ensayos de competencia para el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*. El procedimiento experimental nos permitió cuantificar sistemáticamente la adecuación relativa para un gran número de genes de manera simultánea. Mediante la integración de una plataforma robótica, se evaluó el desempeño en competencia de una colección de 480 mutantes-*knockout* de genes metabólicos sometida a 6 condiciones ambientales distintas. Los datos generados nos permitieron describir: 1) la distribución global de las mutaciones benéficas —es decir, pérdidas de función genética que hacen que el desempeño de una cepa mutante rebase al de la cepa silvestre— y 2) la distribución de las interacciones gen-ambiente —es decir, del efecto agravante o de amortiguación que una perturbación ambiental tiene sobre el efecto adecuacional de una mutación genética. Nuestros resultados muestran el alcance del método desarrollado y marcan la pauta para el uso de métodos similares en otros organismos, incluyendo cultivos celulares de plantas y mamíferos.