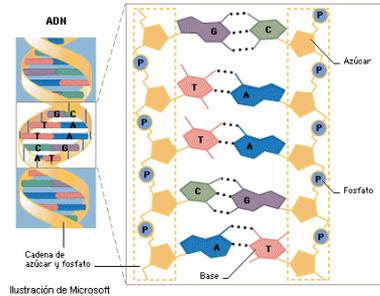


# GENÉTICA MOLECULAR



## TEMA 7 (4 horas)

**INTRODUCCION A LA GENÉTICA MOLECULAR.** Mutación. Recombinación y Manipulación genética.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Al finalizar el tema el estudiante podrá:

1. Resumir los procesos de replicación, transcripción y traducción de los ácidos nucleicos en las bacterias.
2. Definir mutación. Tipos de mutaciones.
3. Dar ejemplos de diferentes tipos de mutantes (catabólicas, anabólicas, resistentes a drogas, y a fagos)
4. Analizar las consecuencias de las diferentes categorías de mutaciones.
5. Describir los métodos utilizados para el aislamiento de mutantes nutricionales.
6. Dar ejemplos de agentes mutagénicos, señalando su mecanismo de acción.
7. Explicar los mecanismos de reparación del ADN bacteriano.
8. Señalar las aplicaciones prácticas de la mutagénesis.

9. Señalar la importancia de los procesos de regulación de la expresión genética de las bacterias.
10. Comparar los mecanismos de regulación de operones inducibles y represibles y sujetos a represión por catabolito.
11. Analizar el efecto de mutaciones en algunos de los constituyentes de un operón, sobre la expresión del mismo.
12. Distinguir entre transformación, conjugación y transducción como formas de recombinación en los microorganismos.
13. Explicar resumidamente en qué consiste la manipulación genética, contrastar los beneficios y peligros potenciales de la misma.

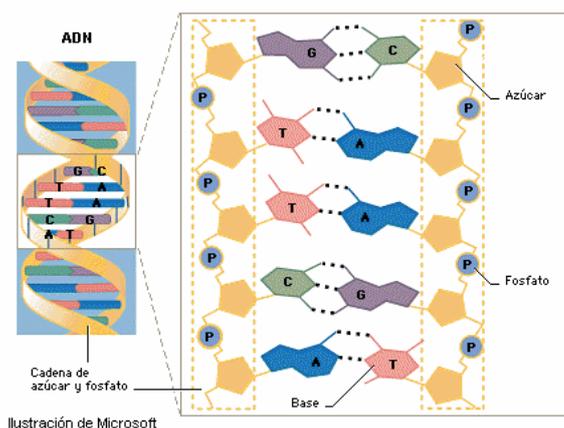
## GENÉTICA

La Genética es la ciencia que estudia lo relacionado con la herencia, esto incluye qué son los genes, cómo ellos llevan esa información, cómo se replican y pasan a las generaciones posteriores y cómo la expresión de su información dentro de un organismo determina sus características particulares. En este capítulo de Introducción a la Genética Bacteriana, revisaremos, a un nivel básico, los aspectos de la genética de los microorganismos que son importantes para la comprensión de otros temas que son contemplados en ésta o en otras asignaturas, sin profundizar en los detalles que ya fueron cubiertos en la asignatura Bioquímica, la cual es prelación de Microbiología.

### NATURALEZA DEL MATERIAL GENÉTICO

Los cromosomas son estructuras celulares que llevan la información hereditaria; en estos cromosomas están contenidos los genes. En las bacterias el cromosoma está constituido por una sola molécula de ADN circular con unas proteínas asociadas. Los genes son segmentos de ADN (excepto en algunos virus en que son ARN) que codifican por productos funcionales.

Recordemos entonces que el ADN es una macromolécula constituida por unidades repetitivas de nucleótidos. Cada nucleótido consta de una base nitrogenada (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)), una pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato. El ADN es una molécula de doble cadena de nucleótidos, las dos cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre sus bases nitrogenadas. El apareamiento de las bases ocurre siempre en una forma específica: la adenina siempre se aparea con la timina y la citosina siempre se aparea con la guanina, debido a esto la secuencia de bases de una cadena determina la secuencia de la otra, a esto se le denomina complementariedad. Esta propiedad es importante porque permite la **replicación** de la molécula de ADN conservando fielmente la información. Para que este apareamiento sea posible ambas cadenas están orientadas en dirección opuesta, una con respecto a la otra, a eso se le dice que son antiparalelas.

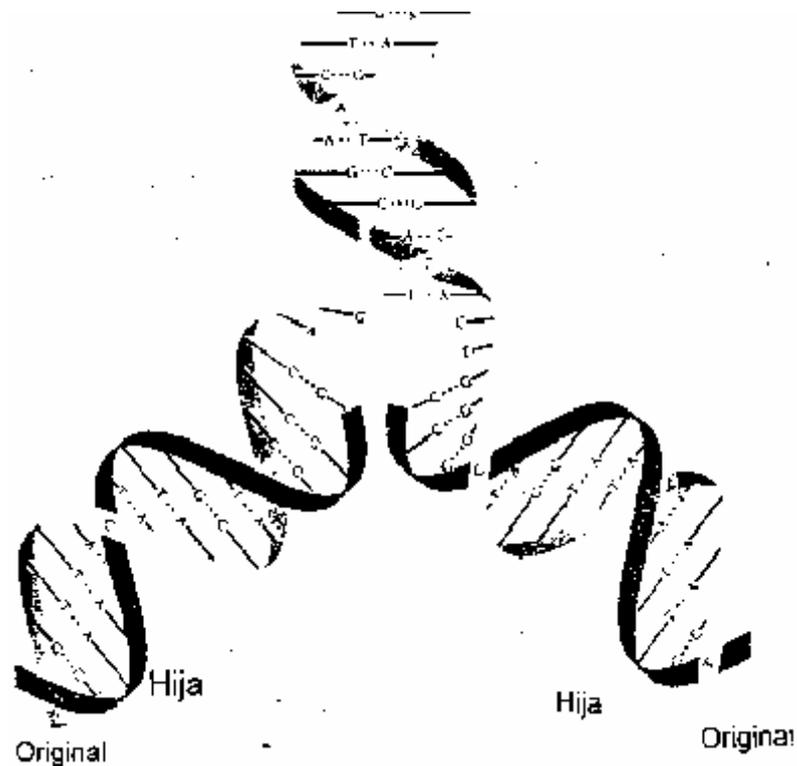


De la misma manera la información contenida en el ADN puede ser copiada por partes, en moléculas específicas de ARN denominadas ARN mensajeros (ARNm), este proceso se denomina **transcripción**. La información codificada en el ARNm es luego traducida en una secuencia específica de aminoácidos que forman una proteína. Este último proceso se denomina **traducción**.



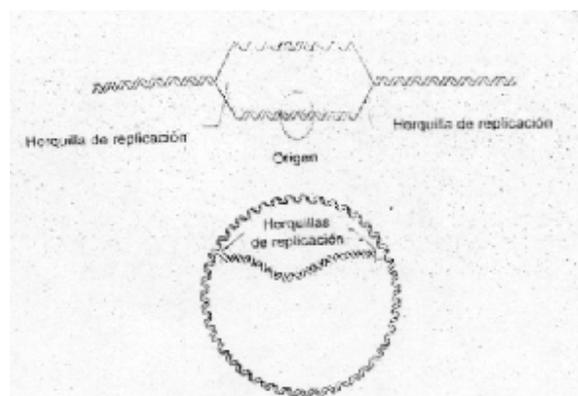
## REPLICACIÓN DEL ADN

En la replicación del ADN, una molécula original de ADN de doble cadena es convertida en dos moléculas hijas de ADN idénticas. La clave para entender esta replicación del ADN es la estructura complementaria de las secuencias de los pares de bases en las dos cadenas del ADN, una cadena sirve de molde para la producción de la otra.



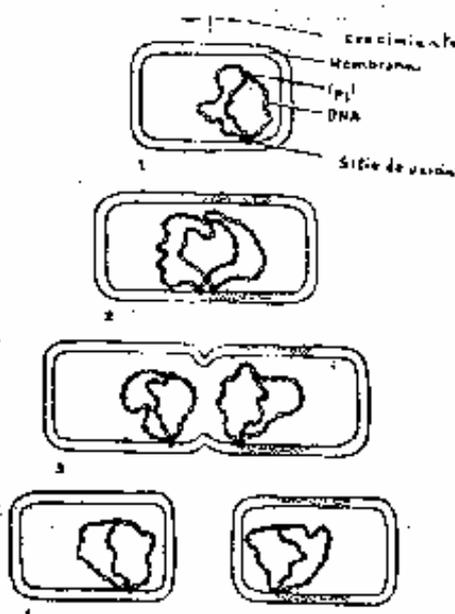
La replicación del ADN requiere la presencia de proteínas celulares complejas que dirigen una secuencia particular de eventos. Cuando comienza la replicación, las dos cadenas se desenrollan y se separan una de otra en un pequeño segmento de la molécula. Los nucleótidos libres presentes en el citoplasma de la célula se unen a las bases expuestas del fragmento de ADN de cadena simple expuesto de la molécula original. Donde hay T en la cadena original se incorporará una A, y donde hay G se incorporará una C.

La replicación del ADN comienza siempre en el mismo punto llamado de iniciación u origen. En este punto de iniciación y zonas cercanas a él, se unen a las cadenas de ADN moléculas de proteínas desenrolladoras, las cuales hacen que el ADN en esa zona se abra formando una especie de burbuja, en este momento una ARN polimerasa ADN dependiente se une al punto de iniciación mediante la ayuda de una o más proteínas iniciadoras específicas, las cuales son las que reconocen el punto de iniciación. Aparentemente este punto de iniciación está anclado a la membrana celular y dicho anclaje parece ser necesario para ayudar a compensar las fuerzas de torsión que se originan cuando el cromosoma se desenrolla para ser copiado.



El desenrollamiento de la doble hélice y el que las dos cadenas se mantengan separadas es posible por varias proteínas especializadas. Enzimas conocidas como helicasas desenrollan fragmentos cortos de ADN por delante de la horquilla de replicación. El desenrollamiento del ADN requiere energía que es aportada por la hidrólisis de dos moléculas de ATP. Tan pronto como una secuencia corta se ha desenrollado, varias moléculas de unas proteínas que se unen al ADN de cadena simple (se conocen en inglés como DBA por DNA binding proteins) se unen fuertemente a cada una de las cadenas simples manteniéndolas separadas para que puedan actuar las enzimas de la replicación.

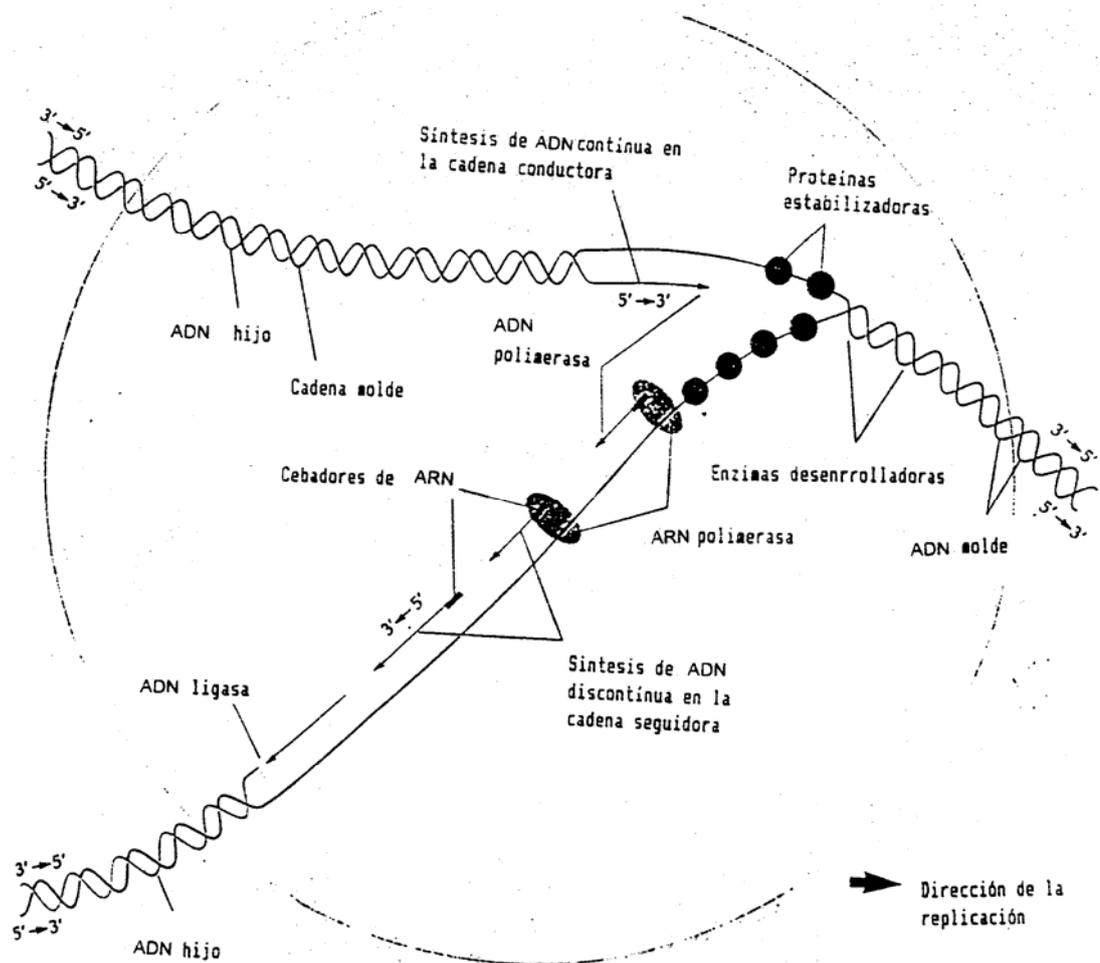
En 1 de la figura siguiente puede observarse una célula joven recién formada y en fase de crecimiento activo, por lo que su cromosoma ya ha iniciado la replicación. En 2 ya el cromosoma se ha duplicado y en 3 comienza la división para dar origen a dos nuevas células. Igualmente comienza la replicación del cromosoma, de manera que en el momento de separarse las dos células en 4, ya la duplicación está bastante avanzada. De igual manera se continuará repitiendo el mismo ciclo para dar origen a nuevas células.



En la tabla siguiente se resume el papel de las principales proteínas que participan en la replicación del ADN señalando el sustrato y la función.

<b>Proteína</b>	<b>Sustrato(s)</b>	<b>Función</b>
Proteínas que se unen al ADN de cadena simple	ADN de cadena simple	Mantiene separadas las cadenas
Topoisomerasas (girasas)	ADN de cadena doble, requiere ATP	Superenrollamiento negativo del ADN
Helicasa	ADN de cadena doble	Desenrolla el ADN en la horquilla de replicación
Primasa (ARN polimerasa dependiente)	ADN de cadena doble, trifosfato-5-ribonucleótidos	Forma el ARN cebador (primer)
ADN polimerasa III (1) sintetasa	ARN cebador en el extremo 3' , trifosfato-5-desoxirribonucleótidos	Forma las nuevas cadenas del ADN
(2) ADN exonucleasa	Bases apareadas en forma incorrecta	Corrige errores
ADN polimerasa I (1) ARN exonucleasa (2) ADN exonucleasa (3) sintetasa	ARN cebador (5' <sup>TM</sup> 3' ) Bases apareadas en forma incorrecta ADN de cadena simple	Remueve el ARN cebador Corrige errores Reemplaza el ARN cebador con ADN
ADN ligasa	Fragmentos de ADN de cadena simple	Une los extremos

Para entender el papel de esas enzimas debemos ver lo que sucede en la horquilla de replicación. Ya dijimos que a partir del origen o punto de iniciación la replicación ocurre sobre las dos cadenas originales simultáneamente, pero este crecimiento es ligeramente diferente en las dos cadenas de ADN. La cadena 3' <sup>TM</sup> 5' del ADN que sirve de molde para la cadena nueva de ADN que se forma en sentido 5' <sup>TM</sup> 3', es sintetizada continuamente por la ADN polimerasa III y se le llama cadena conductora. En contraste la otra cadena (cadena seguidora) se sintetiza en forma discontinua en pequeños segmentos de 1000 a 2000 nucleótidos. Para que la ADN polimerasa pueda copiar en este sentido, requiere de unos fragmentos de ARN cebadores (primers) sintetizados por una ARN polimerasa ADN dependiente, a la cual se le ha denominado primasa. En el extremo 3' de este ARN cebador se añaden luego las unidades de desoxirribonucleótidos complementarios a la cadena original de ADN que sirve de molde. Una vez que se ha sintetizado un corto fragmento de ADN, el ARN cebador es degradado nucleótido a nucleótido, por la actividad ARN exonucleasa de la ADN polimerasa I, a medida que cada ribonucleótido es removido, es reemplazado por el desoxirribonucleótido correspondiente por la ADN polimerasa I y los extremos 5' y 3' son unidos por la acción de la ADN ligasa.



## TRANSCRIPCIÓN

El paso de la información genética contenida en el ADN al ARN se denomina transcripción. Se conocen tres tipos fundamentales de ARN, el ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosómico (ARNr), todos ellos productos de la transcripción del ADN.

Es importante señalar que el ARN actúa a dos niveles: el genético y el funcional. A nivel genético el ARNm es portador de la información genética contenida en el ADN. A nivel funcional el ARNr forma parte de los ribosomas y el ARNt interviene en el reconocimiento de los aminoácidos para ser incorporados en la síntesis de las proteínas codificadas en el ARNm.

La transcripción de la información genética del ADN al ARN es llevada a cabo por una enzima llamada ARN-POLIMERASA o TRANSCRIPTASA. Una de las ARN polimerasas mejor estudiadas es la de la *Escherichia coli*; esta enzima está constituida por cinco sub-

unidades polipeptídicas denominadas:  $\beta$ ,  $\beta'$ , dos péptidos  $\alpha$ , y  $\sigma$ . La subunidad sigma ( $\sigma$ ) no está fuertemente unida y se disocia con facilidad, originándose lo que se denomina el núcleo de la enzima mínima.

El lugar del ADN en el cual se inicia la síntesis del ARNm, no es un lugar cualquiera seleccionado al azar por la enzima, para cada GEN (conjunto de tripletes del ADN que codifican por la síntesis de una determinada proteína) o grupo de genes relacionados (OPERÓN), hay un lugar específico para la iniciación de la síntesis del ARNm, este lugar se denomina PROMOTOR.

La ARN polimerasa puede unirse reversiblemente al ADN en varios sitios, pero cuando esta unión se hace en el promotor, la subunidad  $\sigma$  reconoce a la secuencia nucleotídica, estabilizando el complejo ADN-ARN POLIMERASA, lo cual permite que la enzima inicie la separación de las cadenas de la doble hélice del ADN, comenzando la transcripción.

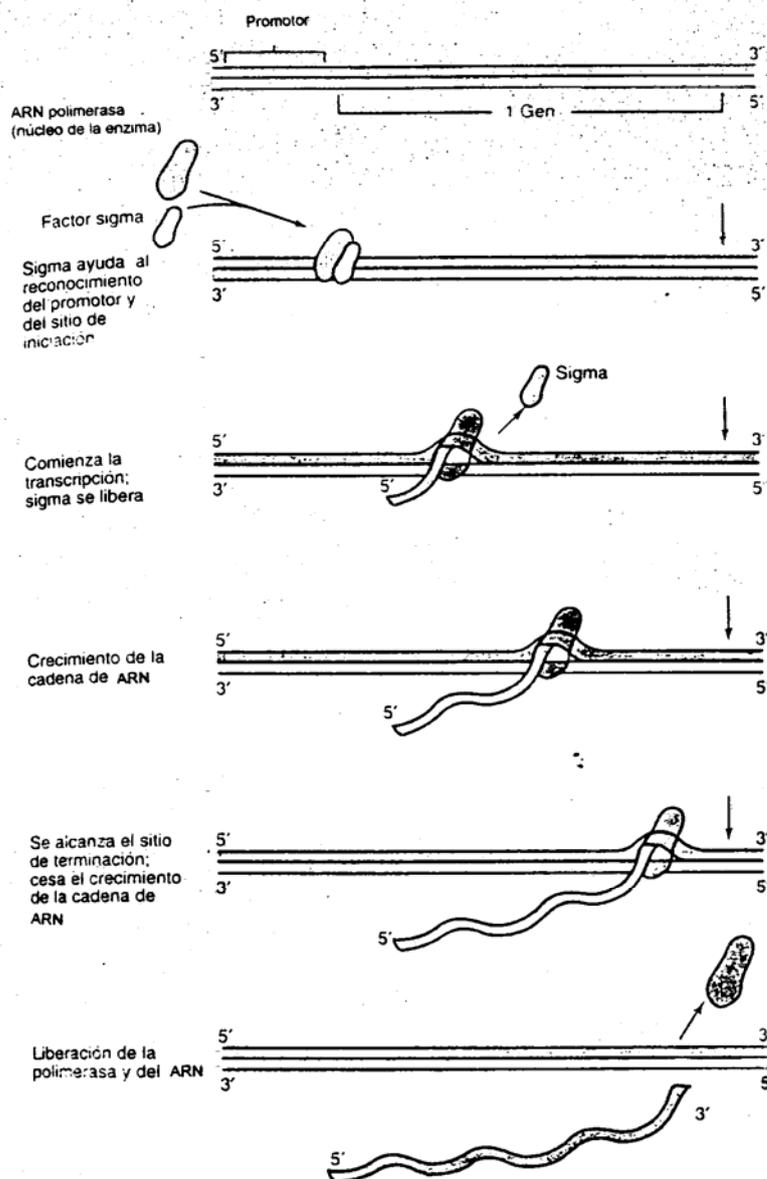
La transcripción se inicia mediante la unión de dos nucleósidos trifosfato a la enzima, siendo las bases de estos nucleósidos complementarias a las del ADN. Luego de reaccionar estos nucleósidos se origina el correspondiente dinucleósido trifosfato y pirofosfato; la ARN polimerasa se va desplazando progresivamente a lo largo del ADN incorporando nuevas bases, y a medida que ella abandona una región del ADN, la doble hélice de éste se cierra nuevamente. Una vez que se ha formado una pequeña porción de ARN, el factor  $\sigma$  se disocia; y la transcripción sigue siendo catalizada por el núcleo mínimo de la enzima.

Normalmente, en el proceso de transcripción, sólo la información contenida en una de las dos cadenas del ADN es transcrita.

La terminación de la síntesis del ARNm también ocurre en lugares específicos del ADN, mediante uno de estos mecanismos de terminación:

1. Terminación codificada por una secuencia del ADN que es reconocida por la ARN polimerasa como una señal de fin del mensaje.
2. Terminación que además de una secuencia de ADN que indica el fin del mensaje requiere factores proteicos adicionales. Por ejemplo, en la *E. coli*, un tipo de terminador de la transcripción requiere de una proteína llamada rho ( $\rho$ ), esta proteína no se une al ADN ni a la ARN polimerasa sino que se une al ARN que se está sintetizando y se mueve hacia el complejo ARN polimerasa-ADN. Cuando la ARN polimerasa se detiene en la señal de terminación dependiente de  $\rho$ , éste puede hacer que el ARN y la polimerasa se separen del ADN, terminando así la transcripción.

La transcripción del ADN se efectúa en dirección 5' <sup>TM</sup> 3', y usualmente una molécula de este ácido ribonucleico mensajero contiene la información para la síntesis de una sola molécula proteica, pero en muchas oportunidades un ARNm puede codificar la síntesis de varias proteínas, esto generalmente ocurre cuando es el producto de la transcripción de un operón.



## SÍNTESIS DE PROTEÍNAS (TRADUCCIÓN)

El ARNm va a los ribosomas de la célula, los cuales leen el mensaje que éste trae y proceden a la síntesis de la correspondiente proteína. Este proceso se denomina **TRADUCCIÓN**; con frecuencia y erróneamente, el término **TRANSLATION** con el cual se denomina este proceso en inglés, es traducido **TRASLACIÓN**, lo cual en castellano tiene un significado que no guarda relación con el proceso que se pretende describir.

Para proceder a esa traducción la lectura del mensaje contenido en el ARNm se lee por grupos de tres bases denominados **CODONES**, y cada codón codifica por un determinado aminoácido. El conjunto de codones se conoce como **CÓDIGO GENÉTICO**. Hay 64 posibles combinaciones de las cuatro bases en secuencias de tres, y como hay sólo 20 ami-

noácidos, más de un codón codifica por un mismo aminoácido, por lo que se dice que el código genético es DEGENERADO. Hay tres codones que no codifican por ningún aminoácido, ellos se denominan CODONES SIN SENTIDO, los cuales actúan como signos de puntuación señalando la terminación de la síntesis de la proteína codificada por un determinado gen.

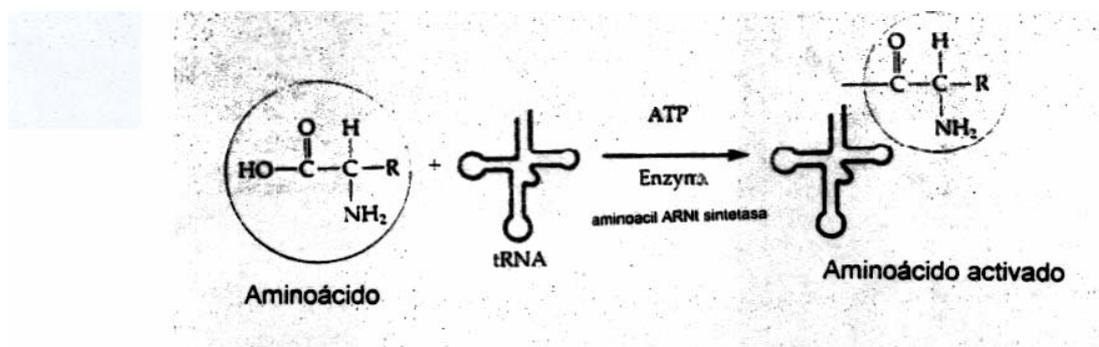
		SEGUNDA LETRA				
		T	C	A	G	
PRIMERA LETRA	T	TTT } Fen TTC } TTA } Leu TTG }	TCT } Ser TCC } TCA } TCG }	TAT } Tyr TAC } TAA - term TAG - term	TGT } Cys TGC } TGA - term TGG - Trp	T C A G
	C	CTT } Leu CTC } CTA } CTG }	CCT } Pro CCC } CCA } CCG }	CAT } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGT } Arg CGC } CGA } CGG }	T C A G
	A	ATT } Ile ATC } ATA } ATG - Met	ACT } Trp ACC } ACA } ACG }	AAT } Asn AAC } AAA } AAG } Lis	AAT } Ser AGC } AGA } AGG } Arg	T C A G
	G	GTT } Val GTC } GTA } GTG }	GCT } Ala GCC } GCA } GCG }	GAT } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGT } Gln GGC } GGA } GGG }	T C A G

Nucleótidos	Aminoácidos	
G = guanina	Ala = alanina	Ile = isoleucina
A = adenina	Asn = asparagina	Leu = leucina
T = timina	Asp = ácido aspártico	Lis = lisina
C = citosina	Arg = arginina	Met = metionina
	Cys = cisteína	Pro = prolina
	Fen = fenilalanina	Ser = serina
	Gli = glicina	Tir = tirocina
	Gln = glutamina	Trp = triptófano
	Glu = ácido glutámico	Val = valina
	His = histidina	
	term = terminación de la traducción	

Los aminoácidos no son capaces de reconocer la información contenida en los codones, por consiguiente ellos se unen a un ARN que tiene una secuencia de bases denominada ANTICODÓN, la cual es capaz de reconocer los codones del ARNm que codifican por los distintos aminoácidos. Este ARN es denominado ARN de TRANSFERENCIA o ARNt y los aminoácidos se unen a él mediante la energía aportada por el ATP para formar un aminoacil-ARNt.

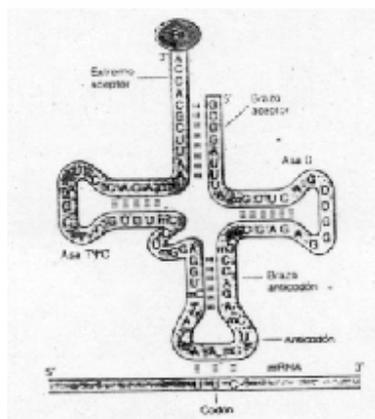
Para cada aminoácido existe un ARNt y en algunos casos existe más de un ARNt para el

mismo aminoácido. Cada aminoácido se une a su ARNt por mediación de enzimas altamente específicas, denominadas aminoacil ARNt sintetasa.



Aunque la molécula del ARNt está constituida por una sola cadena, debido al plegamiento de la misma, hay grandes zonas de doble cadena, originadas por la complementación de las bases al quedar adyacentes por el citado plegamiento.

Varias partes de la molécula de ARNt tiene funciones específicas en el proceso de traducción, estas partes se señalan en la figura siguiente:



Una de las partes variables de la molécula de ARNt contiene el anticodón, otra región llamada asa TψC (ψ es el símbolo de la pseudouridina) es la que se une al ribosoma, mientras que el asa D está involucrada en la unión a la enzima activadora (aminoacil ARNt sintetasa). Como puede observarse en la figura, en el extremo 3' de la molécula de ARNt, hay una secuencia de tres nucleótidos (CCA) que es igual para todos los ARNt; es con la ribosa unida a la base A terminal, que va a reaccionar el aminoácido, uniéndose mediante un enlace éster.

El ARNm no puede comenzar a ser traducido en cualquier punto de su cadena, ya que habría una alteración de la información en él contenida. Hay puntos específicos para la iniciación de la traducción, estos puntos son los codones que codifican por la incorporación de formil metionina en la proteína (GUG y AUG), y para los que existen los ARNt correspondientes. Por tal razón las proteínas tienen como primer aminoácido formil metionina o metionina, sin embargo, en ciertos organismos existen enzimas capaces de eliminar la formil metionina inicial de la proteína, quedando entonces como primer aminoácido el que ocupaba el segundo

lugar.

En el proceso de traducción podemos distinguir las siguientes fases:

1. INICIACIÓN
2. ELONGACIÓN
3. TERMINACIÓN Y LIBERACIÓN

### INICIACIÓN

Los ribosomas de las bacterias constan de dos subunidades con constantes de sedimentación de 30 S y 50 S respectivamente, el ribosoma es activo cuando sus dos subunidades están asociadas, y en el proceso de asociación y disociación de las mismas tiene gran importancia la concentración de  $Mg^{++}$  (5 mM óptima).

Cuando los ribosomas no están sintetizando proteínas, se encuentran disociados en sus dos subunidades. El proceso de iniciación de la síntesis de proteínas requiere de la participación de tres proteínas específicas denominadas FACTORES DE INICIACIÓN (IF-1, IF-2 e IF-3).

Para iniciarse la síntesis de las proteínas, la subunidad 30 S del ribosoma forma un complejo con IF-3 y a este complejo se une el ARNm, luego de unido el ARNm se combina a este complejo IF-1. Por otra parte IF-2, la formil metionina-ARNt y un GTP, se unen para dar otro complejo, el cual se une con el antes formado para dar origen a un gran complejo denominado COMPLEJO DE INICIACIÓN, constituido por: la subunidad 30 S, el ARNm, el formil metionina-ARNt, los tres factores de iniciación y GTP.

El complejo de iniciación se une a la subunidad 50 S del ribosoma para formar el ribosoma completo, 70 S, el cual es activo. En este proceso el GTP es hidrolizado a GDP y fosfato, y los tres factores de iniciación se disocian del ribosoma.

### ELONGACIÓN

En los ribosomas existen dos regiones denominadas A y P respectivamente, la región A es el sitio para el aminoácido, el cual recibe al ARNt con su correspondiente aminoácido, y el sitio P lugar peptídico, el cual recibe el ARNt con la cadena peptídica en formación.

En el proceso de elongación ya tenemos la formil metionina-ARNt correspondiente al primer codón en el sitio P. Para que el aminoacil-ARNt correspondiente al segundo codón del ARNm se fije en el sitio A del ribosoma es necesario que reaccione con una proteína denominada FACTOR DE ELONGACIÓN T (EF-T) el cual está constituido por dos subunidades: EF-T<sub>s</sub> y EF-T<sub>v</sub>. En primer lugar EF-T reacciona con GTP para formar el complejo EF-T<sub>v</sub>-GTP con liberación de EF-T, este complejo se une al aminoacil-ARNt para formar el complejo EF-T<sub>v</sub>-GTP-aminoacil-ARNt. Este complejo se une al ribosoma de forma tal que el aminoacil-ARNt queda colocado en el lugar A con su anticodón unido mediante puentes de hidrógeno al codón correspondiente en el ARNm. Simultáneamente el GTP del complejo es hidrolizado a GDP y fosfato, abandonando el ribosoma en la forma del complejo EF-T<sub>v</sub>-GDP.

La energía producida por la hidrólisis del GTP parece ser requerida para colocar el aminoacil-ARNt en la posición correcta. Al estar unidos a los sitios P y A del ribosoma la formil metionina y el aminoacil-ARNt respectivamente, la reacción entre el grupo amino del aminoacil-ARNt y el carboxilo de la formil metionina-ARNt para formar el primer enlace

peptídico, es catalizada por la enzima PEPTIDIL TRANSFERASA, la cual se encuentra en la subunidad 50 S del ribosoma. El producto de la reacción es un dipeptidil-ARNt unido al sitio A, en el lugar P se encuentra ahora un ARNt vacío, sin ningún aminoácido unido a él.

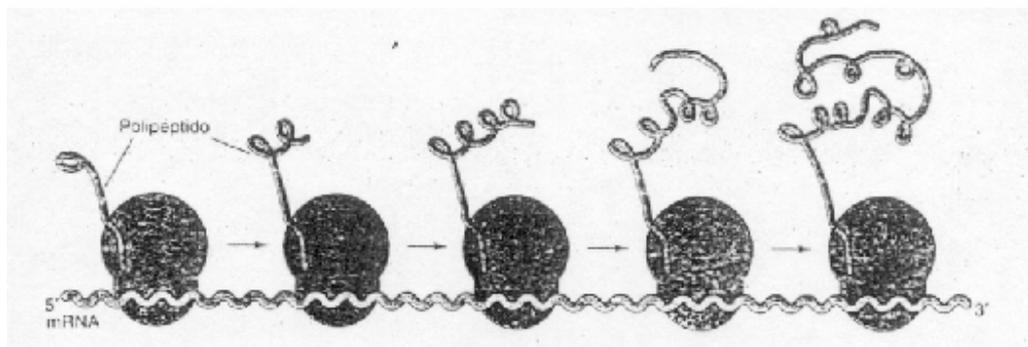
Para lograr que el ribosoma se desplace a lo largo el ARNm para que pueda leer el siguiente codón, y para que el dipeptidil-ARNt pase del lugar A al lugar P, se requiere de una proteína llamada FACTOR DE ELONGACIÓN G (EF-G). EF-G reacciona con GTP para originar un complejo que se une al ribosoma, una vez unido, el GTP se hidroliza a GDP y fosfato. Esta hidrólisis produce la energía necesaria para desplazar el ribosoma al próximo codón y el peptidil-ARNt al sitio P; este proceso se denomina TRANSLOCACIÓN. Todo el proceso se repite hasta que haya sido incorporado a la cadena peptídica, el último aminoácido codificado por el ARNm para esa proteína en particular.

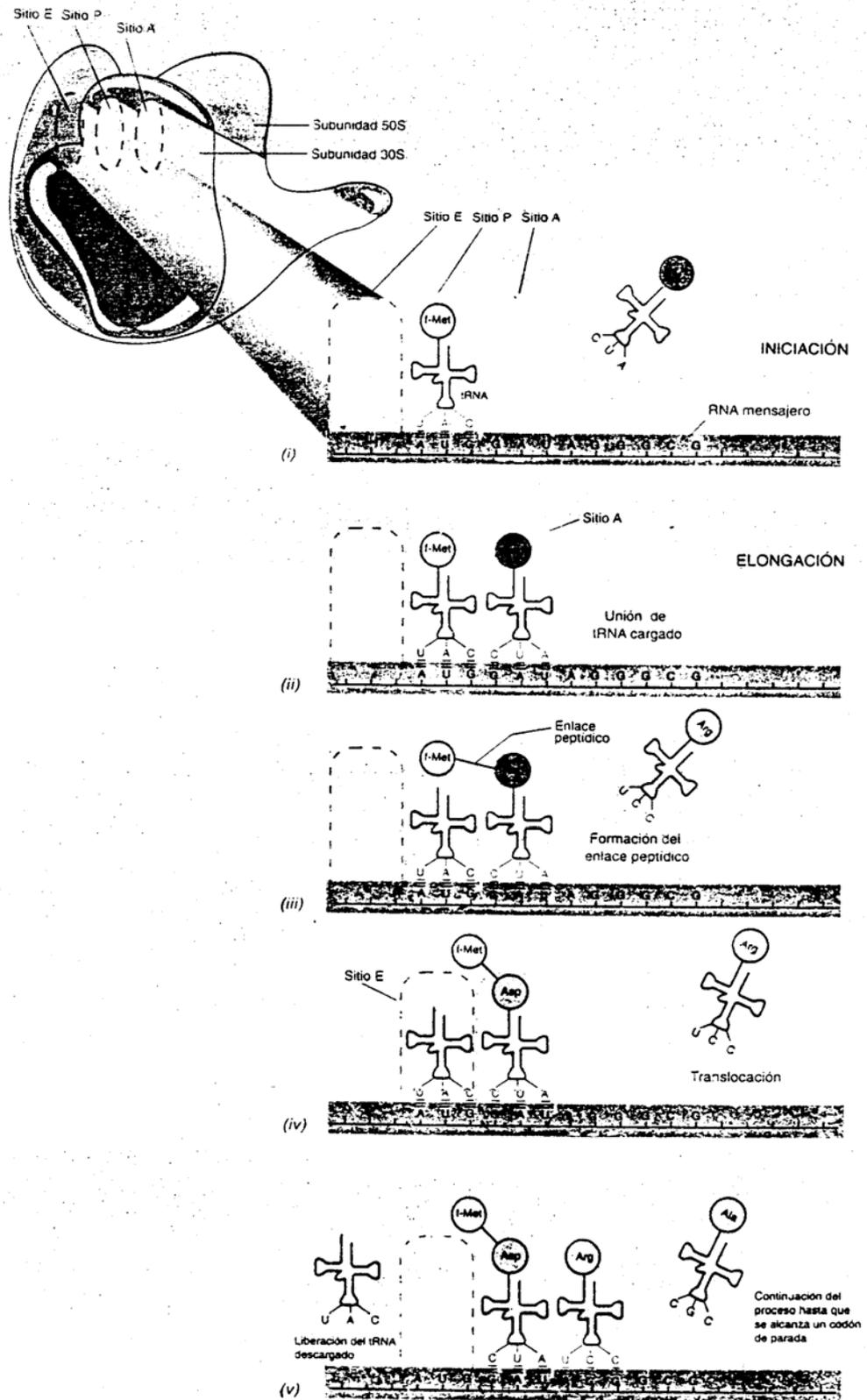
### TERMINACIÓN Y LIBERACIÓN

Después de ser añadido el último aminoácido a la cadena peptídica, ésta se encuentra unida covalentemente por su grupo carboxilo terminal al ARNt, el cual se encuentra situado en el lugar A del ribosoma. La liberación del polipeptidil-ARNt del ribosoma es promovida por tres proteínas llamadas FACTORES DE LIBERACIÓN ( $R_1$ - $R_2$ - $R_3$ ). Los factores de liberación se unen al ribosoma ocasionando que el peptidil-ARNt se desplace del lugar A al P, y el enlace entre el ARNt y la cadena peptídica es hidrolizado aparentemente por la peptidil transferasa, cuya especificidad y acción catalítica parecen haber sido alteradas por la unión con los factores de liberación.

Una vez que la proteína es liberada, el último ARNt y el ARNm se separan del ribosoma, el cual entonces se disocia en sus dos sub-unidades, quedando en condiciones de iniciar el proceso de nuevo.

Usualmente un mismo ARNm es traducido por varios ribosomas al mismo tiempo, y mientras más cercano al final del ARNm se encuentre un ribosoma, mayor será la longitud de la cadena peptídica ya que en ella se habrán incorporado la casi totalidad de los aminoácidos de su secuencia. Esta asociación de un ARNm con varios ribosomas es denominada POLISOMA o POLIRIBOSOMA.





## MUTACIÓN

En los últimos años se han hecho grandes progresos en el conocimiento de la manera cómo los seres vivos transmiten sus características a sus descendientes. Muchos de los experimentos que han permitido lograr este conocimiento, han sido efectuados utilizando microorganismos, por presentar ellos un conjunto de ventajas para el estudio de los fenómenos de la herencia. Algunas de esas ventajas son:

- Tienen un tiempo de generación corto, lo que permite estudiar muchas generaciones y los efectos que sobre ellas tienen diversos factores, en un muy corto tiempo.
- Son genéticamente simples, tienen un solo cromosoma, son haploides.

Antes de proseguir definiremos algunos términos utilizados frecuentemente en genética de microorganismos.

## CEPA O CLÓN

Es una población de células en la cual todas son descendientes de una sola célula, y por tal razón deben ser genéticamente idénticas.

## GENOMA

Es la totalidad de los genes presentes en un organismo. Este término es equivalente al de GENOTIPO.

## FENOTIPO

Son todas las características del organismo observables por el investigador. Debido a que no todos los genes son expresados al mismo momento y en todo momento, el medio ambiente ejerce notable influencia sobre los caracteres de un organismo que son expresados, es decir influye marcadamente sobre el fenotipo. Por ejemplo está el muy conocido caso de bacterias que producen  $\beta$ -galactosidasa, pero que sólo lo hacen cuando hay lactosa presente en el medio de cultivo. La *Serratia marcescens* produce un pigmento rojo a temperatura ambiente mientras que a 37°C no lo produce. Como puede apreciarse las modificaciones fenotípicas son transitorias, dependen del medio ambiente y tan pronto como éste es cambiado, se recuperan las propiedades originales.

Los microorganismos pueden experimentar cambios permanentes en sus propiedades y estos cambios son transmitidos a su descendencia. Este tipo de cambio permanente y hereditario, implica una modificación del genotipo y puede ocurrir por **MUTACIÓN** o por **RECOMBINACIÓN**.

## MUTACIÓN

Se puede definir mutación, como cualquier alteración permanente en la secuencia de bases del ADN del genoma de un organismo. Esta alteración trae como consecuencia la pérdida de alguna de las propiedades que poseía el organismo mutado y/o la aparición de alguna nueva propiedad que él no poseía.

Las mutaciones pueden producirse espontáneamente, pero éste es un fenómeno que ocurre con poca frecuencia, frecuencia que puede aumentarse sometiendo los microorganismos a la acción de ciertos agentes tales como los rayos X, la radiación ultravioleta, peróxidos orgánicos, gas mostaza, óxido nitroso, etc. Las mutantes obtenidas mediante este procedimiento se denominan MUTANTES INDUCIDAS y el agente inductor se llama MUTÁGENO.

El número de mutantes que se originan en una población bacteriana se expresa por la TASA o VELOCIDAD DE MUTACIÓN, la cual puede definirse como la posibilidad de mutación de una célula en un tiempo determinado, habitualmente el tiempo elegido es una generación o ciclo de división de la célula.

Así una tasa de mutación de  $1 \times 10^{-8}$  significa que cuando  $10^8$  células se dividen para dar origen a  $2 \times 10^8$  células, se originará una célula mutante, y cuando estas  $2 \times 10^8$  células se dividen nuevamente para dar origen a  $4 \times 10^8$  células, se originan dos nuevas células mutantes.

Generaciones	No. células	No. mutantes	Total mutantes
n	$10^8$	0	0
n+1	$2 \times 10^8$	2	2
n+2	$4 \times 10^8$	2 2	4
n+3	$8 \times 10^8$	4 4 4	12
n+4	$16 \times 10^8$	8 8 8 8	32
n+5	$32 \times 10^8$	16 16 16 16 16	80

y así sucesivamente.

Prácticamente cualquier propiedad de un microorganismo puede ser alterada por mutación. Entre los tipos de mutantes más frecuentemente estudiados están:

- Mutantes cuya resistencia a agentes inhibidores está aumentada, principalmente su resistencia a los antibióticos.
- Mutantes que presentan alterada alguna propiedad fermentativa, como es el caso de algunas bacterias que eran capaces de fermentar un determinado carbohidrato y dejan de hacerlo.
- Mutantes cuyas vías anabólicas son alteradas perdiendo la capacidad de sintetizar algún nutriente que les es esencial, requiriendo un medio de cultivo al cual hay que añadirle dicho nutriente.
- Mutantes que pierden la motilidad por incapacidad para sintetizar la proteína flagelar. etc.

Entre las mutaciones podemos distinguir dos clases, las MUTACIONES NO SELECTIVAS y las MUTACIONES SELECTIVAS. Las no selectivas son aquellas en las cuales el carácter que ha mutado no les representa ventaja o desventaja alguna, por ejemplo un cambio en la capacidad para producir un pigmento.

Una mutación selectiva le confiere a la mutante ventajas sobre ciertas condiciones ambientales, de manera que la descendencia de esa mutante puede crecer en un determinado medio mientras que las no mutantes no lo pueden hacer. Por ejemplo si una bacteria muta hacién-

dose resistente a una droga, esta mutante resistente puede crecer en presencia de la droga mientras que la no mutada no puede crecer, transformándose de esta manera toda la población en resistente.

En algunas oportunidades la mutación produce una alteración tal que el microorganismo no puede multiplicarse y muere, este tipo de mutaciones se llaman **MUTACIONES LETALES**. Existen además las llamadas **MUTACIONES LETALES CONDICIONADAS**, por ejemplo cuando por mutación una bacteria pierde la capacidad de sintetizar un nutriente imprescindible para poder vivir, si la bacteria es cultivada en un medio que carece de ese nutriente, ella no puede crecer y muere, pero si se le suministra este nutriente ella puede crecer.

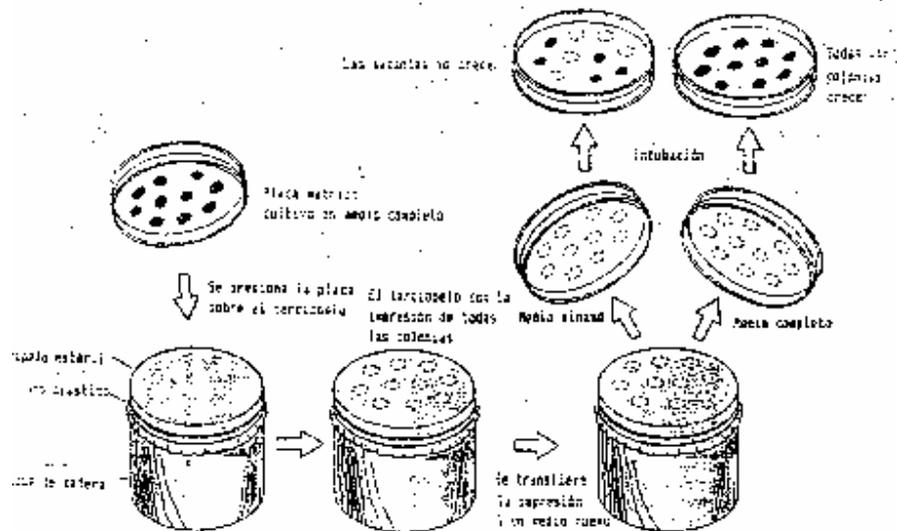
### **AISLAMIENTO DE MUTANTES**

El procedimiento utilizado para aislar las mutantes dependerá de la propiedad alterada por la mutación, así tenemos que una bacteria cuya resistencia a una droga haya sido desarrollada por mutación, puede ser aislada cultivándola en un medio de cultivo que contenga dicha droga, la cual impedirá que las bacterias que no han mutado puedan crecer, permitiendo el desarrollo de las que han mutado.

En el caso de las mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar algún nutriente que les es indispensable, ellas pueden ser aisladas aprovechando la propiedad que tiene la penicilina de actuar sólo sobre las bacterias que están creciendo y multiplicándose.

El procedimiento consiste en colocar la población bacteriana que contiene las mutantes en un medio de cultivo que carece del nutriente necesario para ellas; a este medio de cultivo se le ha añadido penicilina en concentración bactericida. Las mutantes no crecerán por carecer del nutriente y por consiguiente no son afectadas por la penicilina. Por el contrario las células no mutadas crecerán y serán destruidas por la penicilina. Luego se añade penicilinasas para destruir la penicilina y se siembran las células sobrevivientes en un medio completo, que contenga el nutriente que no puede sintetizar la mutante, con lo cual se logra que estas crezcan. Por supuesto, es necesario comprobar que las células obtenidas no son capaces de sintetizar el nutriente al cual nos hemos venido refiriendo.

Las mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar un nutriente que les es imprescindible, pueden también ser aisladas mediante el método de la **REPLICA EN PLACA** el cual consiste en lo siguiente: La población bacteriana que contiene las mutantes es sembrada en un medio de cultivo completo que contiene el nutriente que las mutantes no pueden sintetizar. El medio usado es sólido y las bacterias se diseminan sobre su superficie de manera de obtener colonias aisladas. Lógicamente en este medio crecerán tanto las células mutadas como las no mutadas. Una vez obtenidas las colonias, se usa un disco cubierto con tela, el cual se pone en contacto con la superficie del medio de cultivo donde han crecido las colonias, quedando porciones de ellas adheridas a la tela, luego el disco se oprime sobre la superficie de una placa que contiene medio de cultivo al cual le falta el nutriente (medio mínimo) que las mutantes no pueden sintetizar, las mutantes no crecerán y las colonias que aparezcan en este medio corresponderán a las bacterias no mutadas. Por comparación con la placa original se podrá determinar cuáles de las colonias que aparecen en ellas no se multiplicaron en la placa de medio de cultivo mínimo. Esas colonias corresponderán a las células mutadas.



## NOMENCLATURA DE LAS MUTANTES

Habitualmente se designan con la característica fenotípica que ha sido alterada, por ejemplo las mutantes incapaces de usar la lactosa como fuente de energía se llaman  $lac^-$  y las que si pueden usarla se llaman  $lac^+$ , las que no sintetizan triptófano se denominarán  $trp^-$  y las que si lo sintetizan  $trp^+$ .

A cada mutante para un mismo carácter se le asigna un número, así por ejemplo  $trp^{-12}$ , significa que es la mutante No. 12 aislada y que requiere triptófano.

## BASES MOLECULARES DE LA MUTACIÓN

Hay varias clases de alteraciones en el ADN que dan origen a mutaciones, entre ellas podemos distinguir las siguientes:

### MUTACIONES PUNTUALES

Implican un cambio o supresión de un solo nucleótido. Estas mutantes pueden subdividirse en cuatro clases de acuerdo al cambio sufrido por el ADN; estas clases son:

- Transición
- Transversión
- Inserción
- Eliminación

### Transición

En este tipo de mutación puntual, un par de bases es cambiado por otro, sustituyendo una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina, por ejemplo un par A-T es cambiado por un G-C o un G-C por un A-T. Estas mutantes ocurren espontáneamente, pero pueden ser inducidas por análogos de las bases, particularmente por el 5 Bromo uracilo y la 2 amino purina. Dado que el bromouracilo (BU) posee una notable semejanza estructural con la Timina, durante el proceso de replicación del ADN se inserta en éste reemplazando a la Timina. La forma cetónica del BU, que se aparearía con la Adenina tal como lo hace la Timina, experimenta tautomerización transformándose en la forma enólica, la cual se aparearía aún más fácilmente con la Guanina, por consiguiente la sustitución de T por BU conduce a la incorporación de G con preferencia a A, y cuando ésta cadena se replica, G se aparearía con C en la nueva cadena.

### **Transversión**

En este tipo de mutaciones, al igual que en el anterior, un par de bases es cambiado por otro pero sustituyendo una purina por una pirimidina y una pirimidina por una purina. Este tipo de mutación ocurre comúnmente en las mutaciones espontáneas.

### **Inserción**

Este tipo de mutaciones involucran la inserción de un par extra de bases, y son fácilmente inducidas por derivados de la acridina, los cuales se intercalan entre dos bases sucesivas del ADN, separándolas; cuando la cadena de ADN se replica, una base extra se inserta en la cadena complementaria en un lugar opuesto a la acridina. Cuando esta cadena se replica, la nueva cadena también contendrá una base extra complementaria a la que se había insertado por efecto de la acridina.

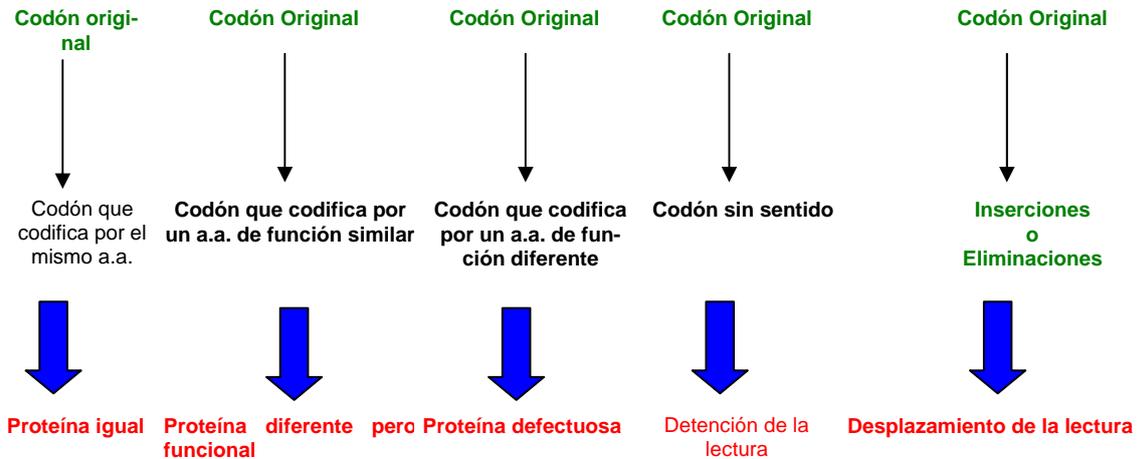
### **Eliminación**

Este tipo de mutación consiste en la eliminación de una o más bases del ADN, lo cual puede ser inducido por reactivos deaminantes o alquilantes que originan la formación de bases que no pueden aparearse, también puede ocurrir esta mutación por pérdida hidrolítica de una base púrica a bajo pH. Lógicamente sólo serán puntuales si la eliminación es de una sola base.

Las mutaciones puntuales no son siempre letales, las transiciones y transversiones son relativamente benignas porque inducen la sustitución de un solo aminoácido en la cadena peptídica que es codificada por el gen mutado, y en muchas oportunidades la proteína, aunque defectuosa, es todavía funcional, pasando inadvertida la mutación, por lo que se denomina **MUTACIÓN SILENCIOSA**. Sin embargo, en algunas oportunidades cuando un aminoácido como la glicina es reemplazado por otro de los aminoácidos que poseen más de un grupo amino o más de un carboxilo, los cuales conferirán a la proteína, cargas eléctricas mayores que las que le confiere la glicina, estas cargas tendrán marcado efecto sobre el plegamiento de la molécula proteica con la consiguiente alteración de su estructura y actividad.

Las mutaciones de inserción o de eliminación son más graves porque provocan una lectura errónea del ADN más allá del punto de la mutación, y generalmente son letales.

## **CONSECUENCIAS DE LAS MUTACIONES**



## REPARACIÓN DEL ADN

Los seres vivos están sometidos constantemente a la acción de agentes mutagénicos que se encuentran en el ambiente donde ellos se desarrollan, con la consiguiente alteración de su material genético. Igualmente ocurren alteraciones espontáneas de dicho material genético, considerándose espontáneas en el sentido de que no se conoce que algún mutágeno haya sido introducido en su ambiente. Es lógico asumir que los seres vivos deben poseer algún mecanismo que les permita reparar los daños causados a su material genético, ya que de lo contrario la frecuencia de las mutaciones sería mucho mayor.

Uno de los agentes mutagénicos más ampliamente estudiado es la radiación ultravioleta (UV), y se conoce que ella ejerce su efecto provocando la asociación de dos moléculas de timina adyacentes en el cromosoma para formar un dímero, el cual causa una distorsión del cromosoma e impide su normal duplicación, y así tenemos, que una bacteria con unos pocos dímeros de timina en su cromosoma, no puede multiplicarse.

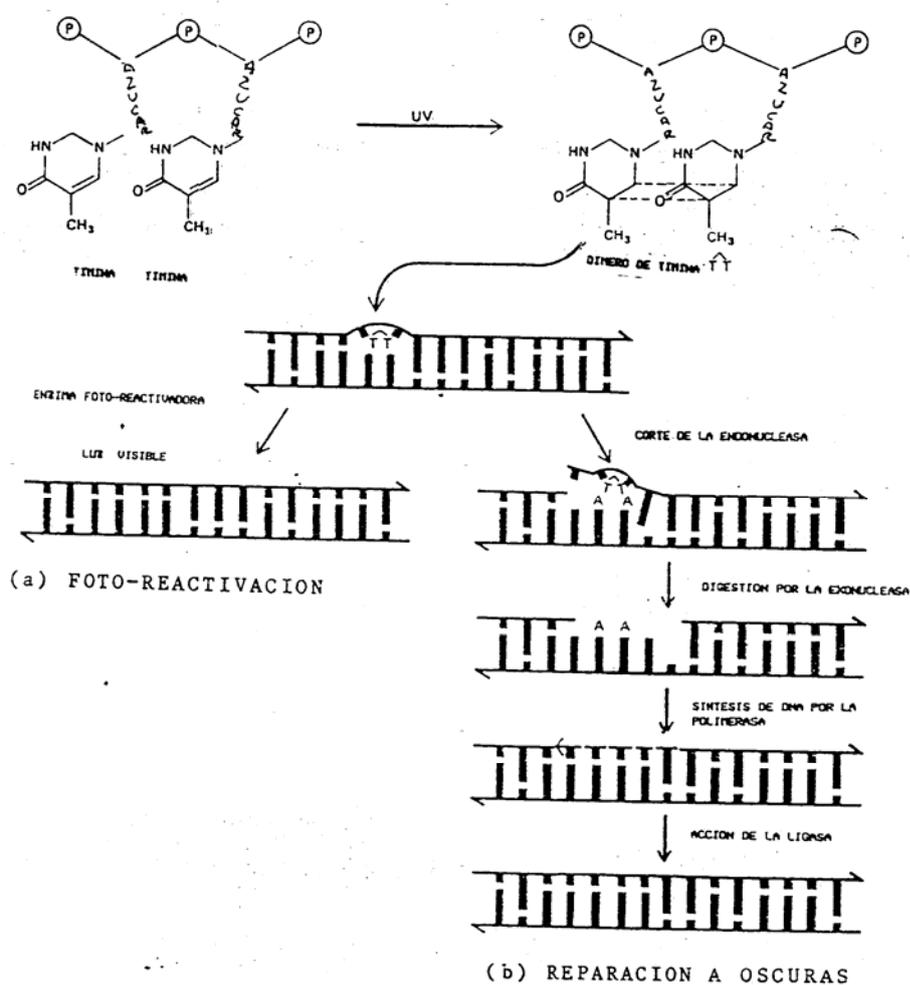
Se ha encontrado que el efecto letal de la radiación UV sobre las bacterias puede ser revertido por exposición a la luz visible ordinaria. Este fenómeno se denomina FOTO-REACTIVACIÓN, y se ha determinado que él ocurre cuando una enzima, que poseen las bacterias en las que se produce este tipo de mecanismo de reparación del ADN, es activada por la absorción de un fotón de la luz visible, y actúa sobre el dímero de timina transformándolo en los correspondientes monómeros.

Otro tipo de mecanismo de reparación del ADN, ha sido identificado en la *E. coli*, y por no requerir de la luz visible ha sido denominado REACTIVACIÓN A OSCURAS; también ha sido llamado REPARACIÓN POR EXCISIÓN.

Para la realización de este mecanismo de reparación se requiere de varias enzimas que actúan secuencialmente.

Primero actúa una endonucleasa que aparentemente reconoce la ubicación del dímero de timina por la distorsión que éste causa en la doble hélice del ADN, esta endonucleasa

rompe la cadena del ADN donde se encuentra el dímero de timina, luego una exonucleasa entra en la apertura originada por esta rotura y digiere una porción de la cadena de ADN, incluyendo al dímero; por último una polimerasa sintetiza el fragmento de cadena de ADN necesario para reemplazar la porción digerida y una ligasa la une al cromosoma.



### APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA MUTAGÉNESIS

La inducción y selección de mutantes tiene grandes aplicaciones, tanto de índole comercial, científico, de salud pública, e incluso aplicaciones bélicas.

En la actualidad muchas sustancias son obtenidas por procesos en los que intervienen microorganismos, como es el caso de los antibióticos, vitaminas, aminoácidos, y muchas otras, y mediante los métodos descritos se pueden inducir y seleccionar mutantes que produzcan estas sustancias con mayor eficiencia, lo que permite su obtención en mayor cantidad y a más bajo costo. También pueden obtenerse mutantes que manteniendo su capacidad inmunogénica tengan reducida su virulencia natural, con las cuales se pueden lograr vacunas más eficientes para proteger contra las enfermedades, como es el caso de las vacunas contra la poliomielitis y el sarampión, para citar sólo dos casos.

De manera opuesta a la antes señalada, se pueden obtener mutantes con una virulencia mayor, para ser utilizadas con fines bélicos.

### **REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS**

En las células, todos los genes no son expresados en todo momento, sería un derroche de energía y de nutrientes sintetizar una enzima en ausencia de su sustrato, o continuar sintetizando un producto después que se han satisfecho las necesidades de la célula.

Normalmente lo que hacen las células es sintetizar las enzimas sólo en presencia de su sustrato, a estas enzimas se las denomina ENZIMAS INDUCIBLES. Por otra parte, cuando un conjunto de enzimas son las responsables de la síntesis de un determinado compuesto, y la concentración de éste alcanza un determinado nivel, las enzimas responsables de su producción son reprimidas (ENZIMAS REPRESIBLES).

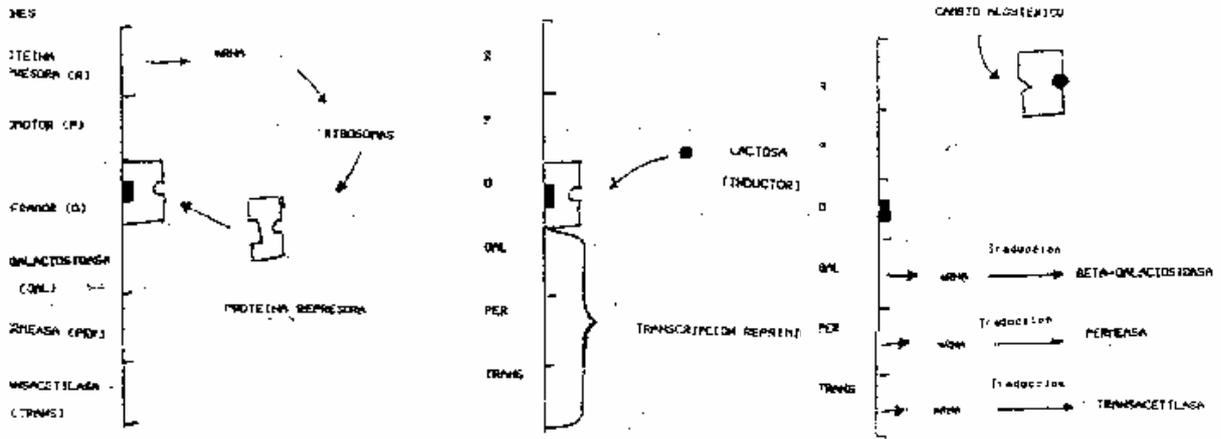
Sin embargo, no siempre las células se comportan de la manera descrita, hay casos en que una enzima es sintetizada continuamente durante el crecimiento, y no está sujeta a represión o inducción (ENZIMAS CONSTITUTIVAS).

Una de las enzimas inducibles mejor estudiadas es la responsable de la fermentación de la lactosa, la cual se denomina  $\beta$ -galactosidasa. La inducción de esta enzima es explicada mediante el modelo de Jacob y Monod, quienes mediante estudios en la *E. coli* demostraron que en la fermentación de la lactosa participan tres enzimas, la  $\beta$ -galactosidasa responsable de la hidrólisis de la lactosa, la  $\beta$ -galactósido permeasa que es la responsable de la entrada de la lactosa a la célula, y la  $\beta$ -galactósido transacetilasa que permite la utilización de ciertos disacáridos diferentes a la lactosa.

La síntesis de estas tres enzimas está codificada por tres genes que se encuentran adyacentes en el ADN de la célula, entre el gen inicial de esta secuencia y el promotor, existe una región del ADN denominada OPERADOR, la cual actúa como una especie de interruptor en el proceso de transcripción. Anterior al promotor existe un gen denominado REPRESOR el cual codifica la síntesis de una proteína represora que por su interacción con el operador, permitirá o inhibirá la transcripción de los genes que codifican por las enzimas responsables del proceso de fermentación de la lactosa. El gen que codifica por la proteína represora también es denominado REGULADOR.

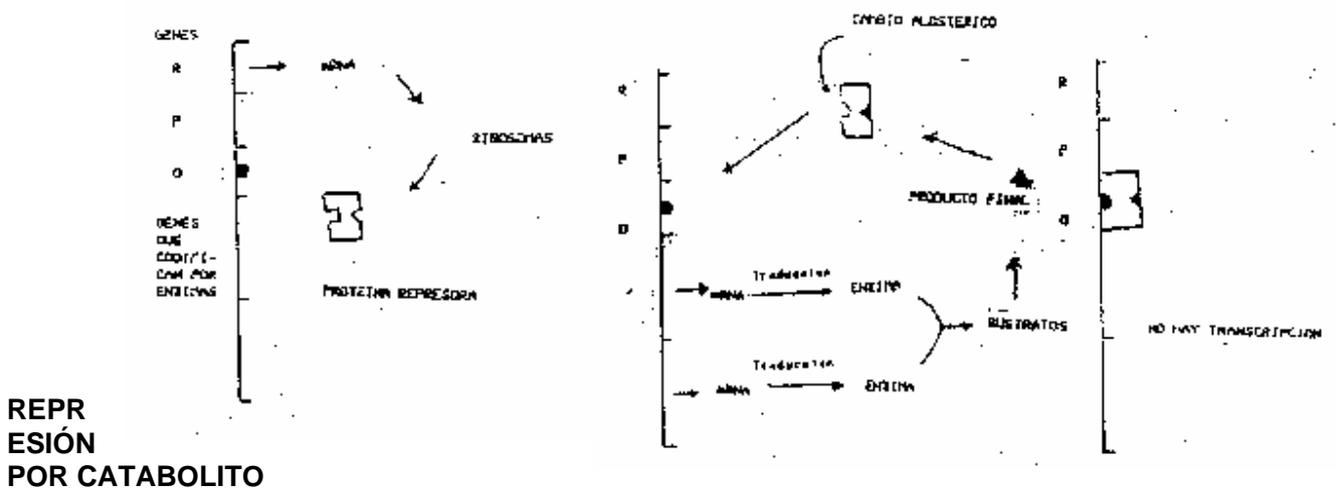
El represor codifica por una proteína alostérica, esta información es transcrita a un ARNm, el cual es traducido en los ribosomas y la proteína resultante tiene una configuración complementaria a la del operador, al cual se une impidiendo la transcripción de los genes que codifican las enzimas fermentadoras de la lactosa.

En presencia de lactosa, la proteína represora se une a ésta, con lo cual se origina un cambio en la conformación de la proteína represora, la cual ya no será capaz de unirse al operador y los genes que este controla podrán expresarse.



El esquema de Jacob y Monod también permite explicar el mecanismo de represión de enzimas por el producto final de la reacción de estas con sus substratos.

En este caso la proteína represora no tiene una configuración complementaria a la del operador, por lo que no puede unirse a este y los genes que codifican por las enzimas pueden expresarse. Cuando la concentración del producto de la reacción de las enzimas ha alcanzado un cierto nivel, hay suficiente cantidad de él para combinarse con la proteína represora la cual sufre un cambio en su configuración, esta nueva configuración si es complementaria a la del operador, por lo cual ella se une al operador impidiendo la transcripción de los genes con lo cual se inhibe la síntesis del producto de la reacción de las enzimas por las cuales codifican esos genes.



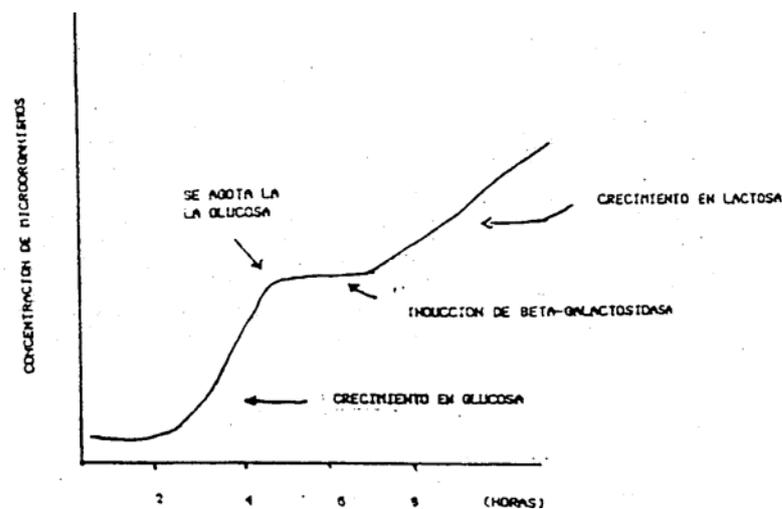
**REPR  
ESIÓN  
POR CATABOLITO**

Este es un tipo de control de la síntesis de proteínas menos específico que los ya descri-

tos. En este tipo de represión, la síntesis de diversas enzimas no relacionadas, es inhibida cuando las células crecen en un medio que contiene glucosa. La represión por catabolito ha sido también llamada EFECTO GLUCOSA, por haber sido la glucosa la primera sustancia con la cual se observó este tipo de represión.

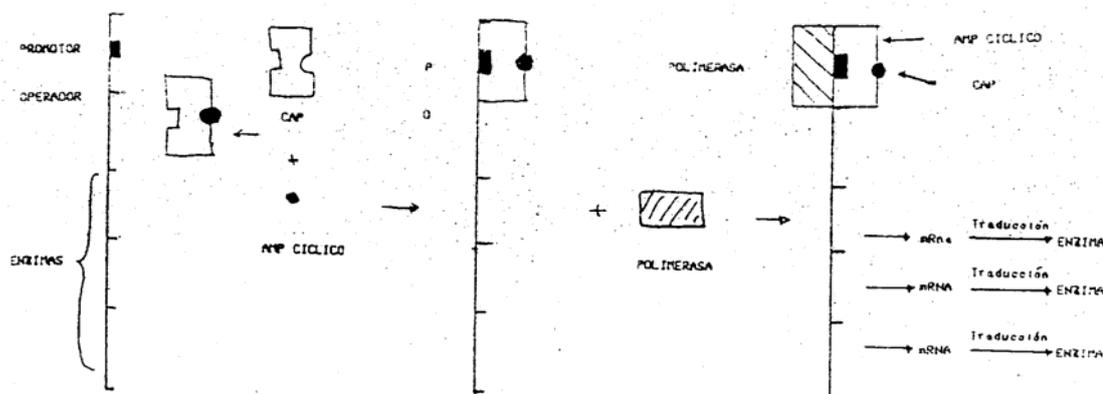
El crecimiento DIÁUXICO en los microorganismos es una consecuencia de la represión por catabolito; en este tipo de crecimiento, cuando al microorganismo se le proporcionan dos fuentes de energía en el medio de cultivo, él utiliza primero una de ellas hasta agotarla, una vez agotada esta primera fuente de energía cesa temporalmente el crecimiento y luego continúa creciendo utilizando la otra fuente de energía.

Este fenómeno es ilustrado en la figura siguiente, la cual representa el crecimiento de un microorganismo en un medio que contiene dos fuentes de energía: glucosa y lactosa. La enzima  $\beta$ -galactosidasa, responsable de la fermentación de la lactosa, es inducible, pero su síntesis está sometida a la represión por catabolito. De esta manera, cuando hay glucosa en el medio, la  $\beta$ -galactosidasa no es sintetizada y el organismo crece sólo a expensas de la glucosa. Cuando se agota la glucosa, cesa la represión por catabolito y después de un período de latencia, se sintetiza la  $\beta$ -galactosidasa y el microorganismo puede continuar creciendo, utilizando la lactosa como fuente de energía.



La represión por catabolito ha sido explicada de la siguiente manera:

La ARN polimerasa inicia la transcripción del ADN uniéndose al promotor, sin embargo en el caso de las enzimas represibles por catabolito, esta unión es estable sólo cuando otra proteína llamada PROTEÍNA ACTIVADORA DE CATABOLITO (CAP) o PROTEÍNA ACTIVADORA DEL GEN (CAP), se une también al promotor. Esta proteína es alostérica, y aparentemente lo que le confiere a ella la configuración complementaria a la del promotor para que se pueda unir a él, es su reacción con el monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico).



El AMP cíclico es sintetizado a partir del ATP por una enzima denominada adenil ciclasa. Cuando hay glucosa presente, la concentración de AMP cíclico en la célula es muy baja y la ARN polimerasa no puede formar una unión estable con el promotor, por lo cual la CAP no adquiere la configuración complementaria a la del promotor, no pudiendo unírsele y al no estar unida la CAP al promotor, la polimerasa tampoco puede unirse a éste y no hay transcripción.

## RECOMBINACIÓN

La recombinación consiste en la transferencia de un segmento de genoma de una célula a otra, y este segmento es incorporado en el genoma de la célula receptora cambiando sus características.

La recombinación puede producirse mediante tres procedimientos diferentes:

1. TRANSFORMACIÓN
2. TRANSDUCCIÓN
3. CONJUGACIÓN

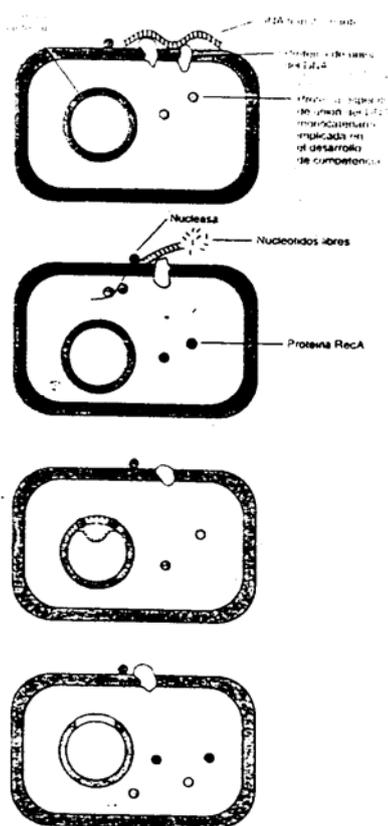
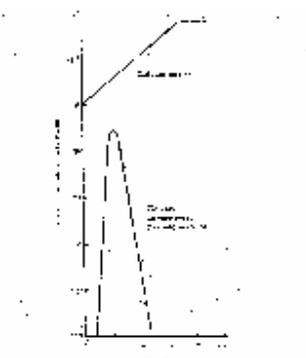
### TRANSFORMACIÓN

Este proceso de recombinación fue descubierto por Griffith en 1928 utilizando cepas de neumococos, y consiste en la transferencia de un segmento de ADN de una célula a otra sin requerir el contacto entre dichas células ni de ningún mediador.

Se ha demostrado experimentalmente que, además de los neumococos, otros microorganismos son también transformables, por ejemplo, *Escherichia coli* y miembros de los géneros *Haemophilus*, *Bacillus*, *Neisseria*, y *Pseudomonas*; sin embargo es muy probable que a medida que se profundicen los estudios, se encontrarán muchas otras especies capaces de sufrir transformación.

Incluso dentro de los géneros que hemos dicho que son transformables, no todas las especies lo son, sólo ciertas cepas denominadas COMPETENTES son capaces de ser transformadas; esta competencia para la transformación parece ser una característica hereditaria de los microorganismos.

La competencia es afectada por el estado fisiológico de las células y el medio en el cual ellas crecen, y según la fase de crecimiento en la cual ellas se encuentran. Hay un corto período, aproximadamente en la mitad de la fase de crecimiento exponencial, durante el cual la competencia de las células se eleva a un máximo y luego cae bruscamente.



Para que el proceso de transformación ocurra es necesario que el ADN de la bacteria donante se fije a la superficie de la receptora, al principio el ADN se fija de manera reversible a la superficie de las células competentes, luego la unión se hace irreversible. Las células competentes son capaces de fijar hasta 1000 veces más ADN que el que pueden fijar las células no competentes.

Las células competentes no pueden diferenciar entre el ADN de su propia especie y el de otras especies, aunque el único que es activo en el proceso de transformación es el proveniente de especies genéticamente relacionadas. El ADN de una sola cadena es pobremente fijado por las células competentes, por lo que tiene escasa capacidad para transformar.

Una vez fijado el ADN en la célula receptora, una de sus cadenas es degradada y la otra es incorporada en el genoma de la célula receptora. Cuando la célula se divide, se duplica este ADN híbrido, transmitiéndose de esta manera la o las nuevas características adquiridas a las células hijas.

**TRANSDUCCION**

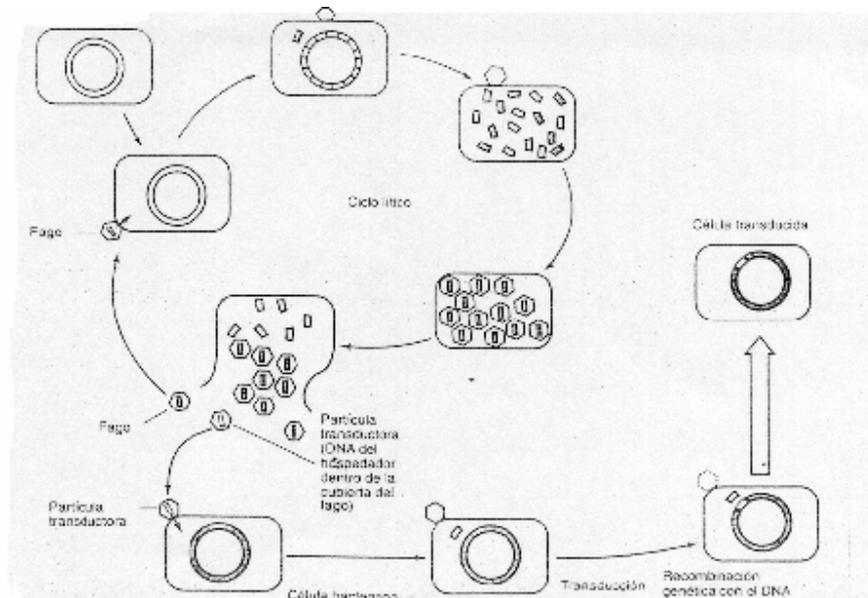
En la transducción el ADN es transferido de la célula donante a la célula receptora mediante un virus bacteriano (bacteriófago). La transducción se presenta en una gran variedad de bacterias y puede ser de dos tipos, la transducción generalizada y la transducción especializada.

### Transducción generalizada

En esta transducción casi cualquier gen puede ser transferido del donante al receptor. Los bacteriófagos transductores se forman de la siguiente manera: Cuando un fago infecta una bacteria, el ADN de ésta es degradado y la bacteria comienza a sintetizar ADN, proteína y otros componentes del fago. Una vez sintetizados todos los componentes del fago, estos comienzan a ser ensamblados para dar origen a nuevos fagos, luego la bacteria es lisada dejando en libertad estos fagos, los cuales pueden iniciar un nuevo ciclo. En algunas oportunidades, cuando los nuevos fagos están siendo ensamblados, en lugar de colocar dentro de su cubierta proteica, ADN del fago, es colocado un fragmento del ADN de la célula huésped. Estos fagos así ensamblados son defectuosos, ellos son capaces de fijarse sobre una célula huésped e inyectarle el ADN que contienen, pero no pueden producir nuevos fagos ya que ese ADN pertenece a la célula que lo hospedó anteriormente y no codifica por los componentes del fago. Este ADN así transferido a la nueva célula huésped es recombinado con el genoma de ésta, confiriéndole los nuevos caracteres por los cuales codifica el fragmento de ADN que se ha recombinado. Como el fragmento de ADN incorporado en los fagos puede ser cualquiera y no un fragmento específico, cualquiera de los caracteres de la célula huésped original, puede ser transducido.

Como puede observarse, el fenómeno es semejante a la transformación, la diferencia reside en que el ADN es transferido de la célula donante a la receptora, mediante un bacteriófago.

Célula bacteriana



### Trans- ducción especializada

En este caso hay una transferencia eficiente de un grupo restringido de genes mediante

ciertos bacteriófagos denominados **FAGOS ATENUADOS** (FAGOS TEMPERADOS). Por ejemplo, la transducción de los genes que controlan la utilización de la galactosa (Gal) por el fago  $\lambda$  en la *E. coli*.

Cuando un fago  $\lambda$  infecta a una célula bacteriana, usualmente lo que ocurre es la formación de nuevos fagos y la lisis de la bacteria, tal como se señaló anteriormente, pero en algunas oportunidades, con poca frecuencia, el genoma del fago en lugar de dirigir la degradación del genoma bacteriano y la síntesis de componentes fágicos, se incorpora al genoma bacteriano dando origen a lo que se denomina **CELULA LISOGÉNICA**, y al genoma del fago incorporado en el genoma bacteriano se le denomina **PROFAGO**.

A los fagos que tienen la capacidad de incorporar su genoma al genoma bacteriano (es decir de convertirse en profagos), se les denomina **FAGOS ATENUADOS** (TEMPERADOS). En esta célula lisogénica, cuando se duplica el cromosoma bacteriano se duplica también el cromosoma fágico que tienen incorporado.

En algunas oportunidades, bajo la influencia de algunos factores como la radiación UV, se produce la **INDUCCIÓN**, que consiste en que el genoma del fago se desincorpora del genoma bacteriano, y toma el control de la célula bacteriana, procediendo a la degradación de su genoma y a la síntesis de componentes fágicos, los cuales son ensamblados para formar nuevos fagos, y éstos son liberados al lisarse la célula bacteriana, es decir, ocurre el ciclo lítico habitual.

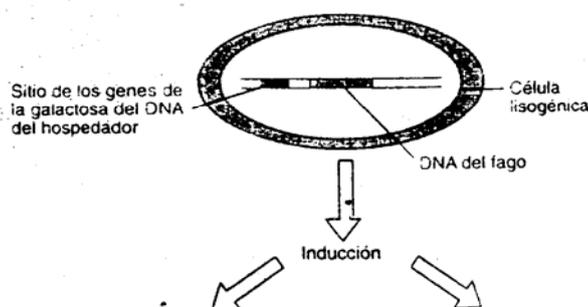
En otras oportunidades, muy poco frecuentes, cuando la célula lisogénica es inducida, el ADN del virus se separa del genoma bacteriano llevándose una porción de éste y dejándole incorporado un fragmento del suyo.

En el caso el fago  $\lambda$ , que usualmente se incorpora al genoma de la *E. coli* en la zona adyacente a los genes que codifican por las enzimas responsables de la utilización de la galactosa, cuando el genoma fágico se desincorpora del genoma bacteriano, se lleva consigo dichos genes, dejando una porción de los suyos.

Las partículas fágicas que contienen este genoma, son defectuosas, y no pueden iniciar el proceso lítico de las bacterias, pero pueden transducir los genes de la galactosa, y son denominados  $\lambda$  dg (fagos  $\lambda$  defectuosos, transductores de galactosa).

Si se infecta una *E. coli* galactosa negativa con esos fagos  $\lambda$  dg, ellos no pueden iniciar un ciclo lítico que conduciría a la formación de nuevos fagos, porque ellos son defectuosos y no pueden codificar por todos los componentes necesarios para constituir una partícula fágica completa, pero si se pueden integrar al genoma bacteriano, haciendo que la bacteria se convierta en galactosa positiva.

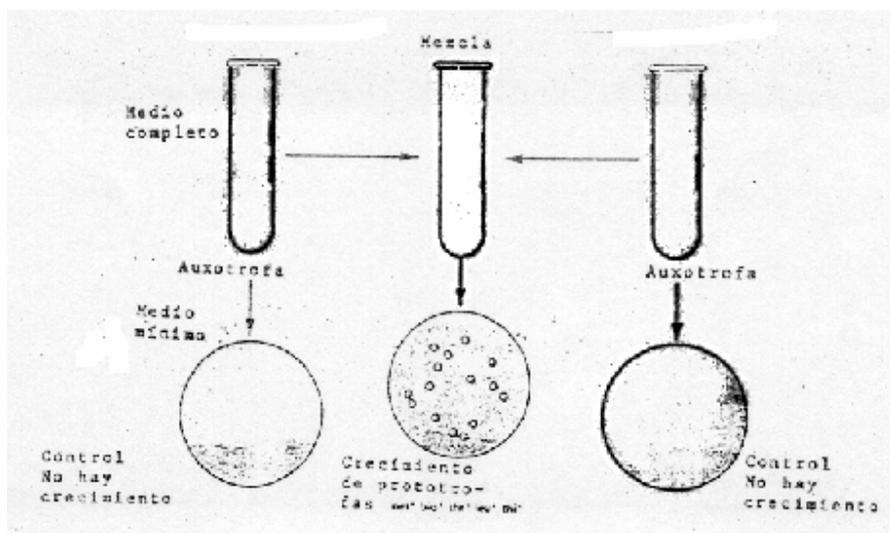
Esta transducción se llama **especializada** porque siempre se transducen los mismos genes, los que se encuentran vecinos al lugar de inserción del genoma fágico en el genoma bacteriano.



## CONJUGACIÓN

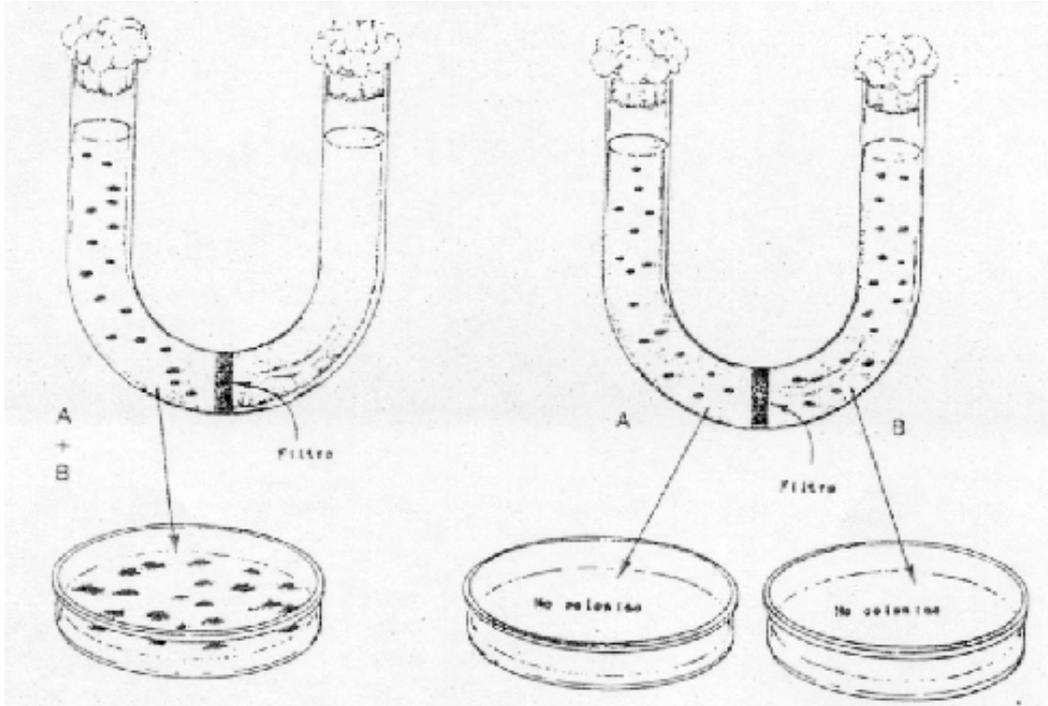
Es el proceso de recombinación que implica la transferencia de material genético mediante el contacto célula a célula. Se ha descrito en *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y para que ocurra debe haber una elevada densidad de población para aumentar la posibilidad de que las células entren en contacto.

En 1946, Lederberg y Tatum, trabajando con dos mutantes dobles auxotrofas cada una, obtuvieron evidencia de la existencia de este proceso de recombinación. Una de las dos cepas podía sintetizar biotina y metionina, pero no treonina y leucina, mientras que la otra cepa podía sintetizar treonina y leucina pero no biotina y metionina. Si estas cepas se inoculaban por separado en medio mínimo, no crecían, porque cada una de ellas requería la adición al medio de los dos nutrientes que no podían sintetizar. Pero si se mezclaban las cepas y luego esta mezcla se inoculaba en medio mínimo, sí aparecían colonias, en número muy inferior al de las bacterias inoculadas, y estas colonias estaban constituidas por células bacterianas que podían sintetizar biotina, metionina, treonina, y leucina.



Es decir, en las cepas originales habían ocurrido transferencias de información genética, y la cepa resultante era capaz de sintetizar todos sus requerimientos nutricionales. Posteriormente se demostró que esta transferencia era unidireccional, es decir, no había intercambio de material genético sino que una cepa actuaba como donante y otra como receptora. Igualmente se demostró que las recombinantes originadas, requerían para su formación del contacto directo entre las células, y que no eran consecuencia de un proceso de transformación o de transducción. Esto fue logrado mediante el siguiente experimento de B.D. Davis. En un tubo de vidrio en forma de U, cuyas dos ramas están separadas por un filtro de vidrio poroso, que impide el paso de las bacterias pero no el de los virus ni el ADN, se colocó en una de las ramas de dicho tubo una de las cepas auxotrofas, la otra en la otra rama. Se observó que no se obtenían recombinantes, a diferencia de cuando las dos cepas se mezclaban, lo que indicaba que se requería del contacto directo de las células, para que se produzca la transferencia de material genético. Si se hubiesen obtenido recombinantes, éstas podrían ser la consecuencia de un proceso de transformación o de transducción. Para determinar cuál de los dos procesos es responsable de la formación de recombinantes, se añade desoxirribonucleasa a la mezcla de células bacterianas; si en esta oportunidad no se obtienen recombinantes, puede asumirse que se trata de un proceso de transfor-

mación, que ha sido inhibido por la destrucción del ADN transformante mediante la ADNasa.



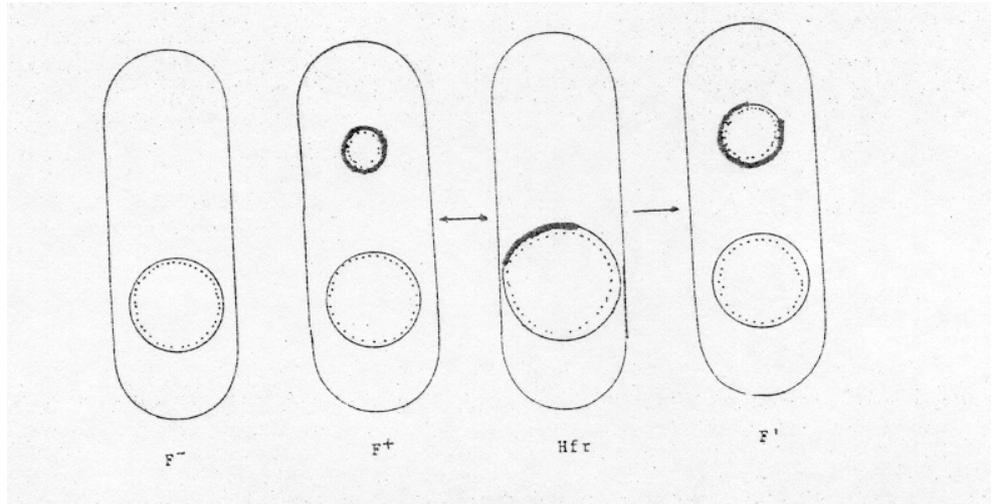
### Tipos de células que participan en la conjugación

Ya dijimos anteriormente que en la conjugación participan células donantes y células receptoras.

La propiedad de ser donantes se debe a un PLASMIDIO (elemento genético extracromosómico capaz de reproducirse independientemente del cromosoma bacteriano) conocido como factor F (fertility factor). Este factor porta la información genética necesaria para su propia replicación y además codifica para que la bacteria que los posee tenga sobre su superficie ciertos apéndices especiales conocidos como pelos sexuales que son los que van a permitir el contacto entre las células donantes y receptoras en la conjugación.

Las células que llevan el factor F se llaman  $F^+$ , y las que no lo llevan se llaman  $F^-$ .

Eventualmente el factor F puede integrarse en el cromosoma de la bacteria (por un proceso similar al ya citado en la transducción especializada donde el fago se integra al cromosoma de la *E. coli*) de allí resultará entonces una célula Hfr (High frequency of recombination). Este proceso de integración es reversible y de una célula Hfr podría originarse nuevamente una célula  $F^+$ . Durante la desincorporación del factor F del genoma bacteriano, algunos genes podrían quedar unidos a él, resultando entonces una célula  $F'$ .

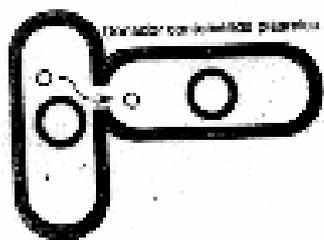


### MECANISMO DE LA CONJUGACIÓN

Cuando se mezclan poblaciones de células donantes y receptoras, las células donantes se unen a las receptoras mediante los pelos sexuales, éstos se retraen, las células entran en contacto y se forman los puentes a través de los cuales se realiza la transferencia de material genético. Los resultados de estos cruces variarán de acuerdo con el tipo de célula donante involucrado en el cruce:

Así, si se mezcla una cepa  $F^+$  con una cepa  $F^-$ , usualmente ocurre que las células  $F^+$  le transfieren a las  $F^-$  una copia del factor  $F$ , transformándolas en  $F^+$ .

Si se mezcla una cepa  $Hfr$  con una cepa  $F^-$ , como el factor  $F$  se ha integrado al cromosoma bacteriano, al ser transferido a la célula receptora lleva consigo genes del cromosoma bacteriano.



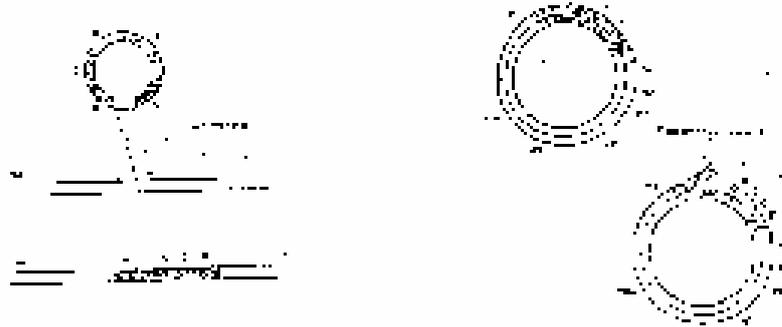
Cruce  $F^+$  con  $F^-$



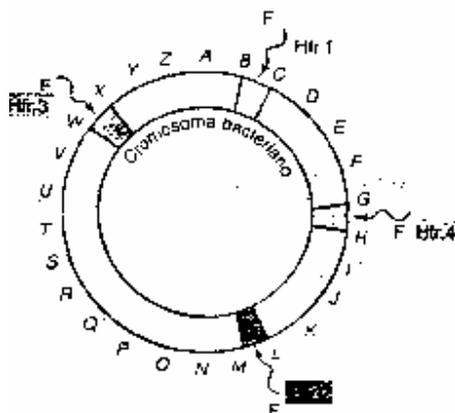
Cruce  $Hfr$  con  $F^-$

Si vemos la figura siguiente, el factor  $F$  lleva unos genes que hemos llamado  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$  y  $E$  y la ruptura que inicia la replicación del plasmidio ocurre entre los genes  $A$  y  $E$ . Esto sig-

nifica que el factor F se rompe durante la transferencia, y solamente algunos de sus genes entran a la célula F<sup>-</sup> al comienzo de la conjugación. El resto de los genes del factor F serán transferidos a la célula receptora sólo después que haya pasado todo el cromosoma bacteriano. Generalmente esto no es factible ya que el puente de conjugación se rompe durante la transferencia, por lo tanto la célula receptora usualmente recibe una copia incompleta del factor F y las células receptoras permanecen entonces como F<sup>-</sup>. Los genes, de la bacteria donante transferidos a la receptora pueden recombinar originándose así células recombinantes con características de ambos participantes en el cruce.



Este tipo de cruce es muy utilizado para hacer mapas genéticos, es decir para ubicar los diferentes genes sobre el cromosoma bacteriano y para ello se interrumpe el proceso de conjugación, por agitación vigorosa, a diferentes tiempos después de su inicio y se analiza la frecuencia de los recombinantes para los diferentes marcadores genéticos (sitios el cromosoma asociados con características fenotípicas particulares, por ejemplo producción de una enzima), como cada Hfr comienza a transferir su cromosoma en un punto determinado en una forma lineal, se observa que a medida que aumenta el tiempo de contacto mayor número de características de la cepa Hfr aparecen en los recombinantes y que la mayor proporción de recombinantes corresponde a los genes que son transferidos primero.

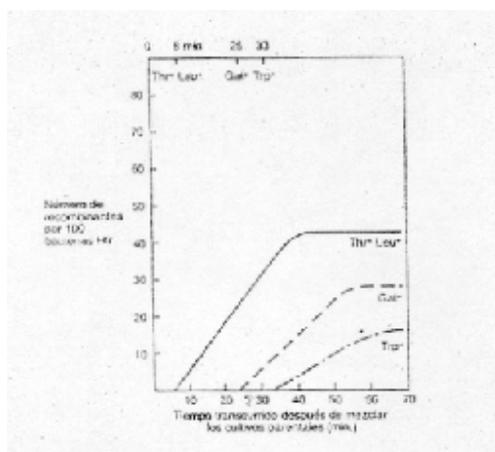


Hfr 1	GDE	XYZAB	Gen C donado primero; dirección de las agujas del reloj
Hfr 2	LKO	SAZYX	Gen L donado primero; dirección contraria a las agujas del reloj
Hfr 3	XYZAB	UVW	Gen X donado primero; dirección de las agujas del reloj
Hfr 4	GFE	BAZYX	Gen G donado primero; dirección contraria a las agujas del reloj

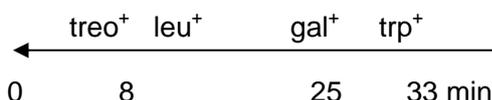
(b) Formación de diferentes cepas Hfr, que donan genes en orden diferente y a partir de diferente origen. El cromosoma bacteriano es un círculo (a) que puede abrirse en varias secuencias de inserción en las que se fijan los plásmidos F. En (b) se muestra en parte el orden de los genes.

En el experimento señalado en la figura siguiente vemos que los primeros recombinantes en aparecer son los de los marcadores treonina (treo) y leucina (leu) luego los del marcador

galactosa (gal) y por último los del triptófano (trp).



Es decir el orden de entrada sería:



Si se cruza una cepa  $F^-$  con una cepa  $F^-$ , conjuntamente con el factor F serán transferidos los genes bacterianos que él porta y las células receptoras que reciban el factor F serán convertidas en donantes y además serán recombinantes para un solo carácter, el portador por el factor F. Por ejemplo si se cruza una cepa  $F^- lac^+$  con una cepa  $F^- lac^-$ , de este cruce resultarán células recombinantes para el carácter  $lac^+$  y las receptoras se convertirán en donantes al recibir el factor F.

## MANIPULACIÓN GENÉTICA

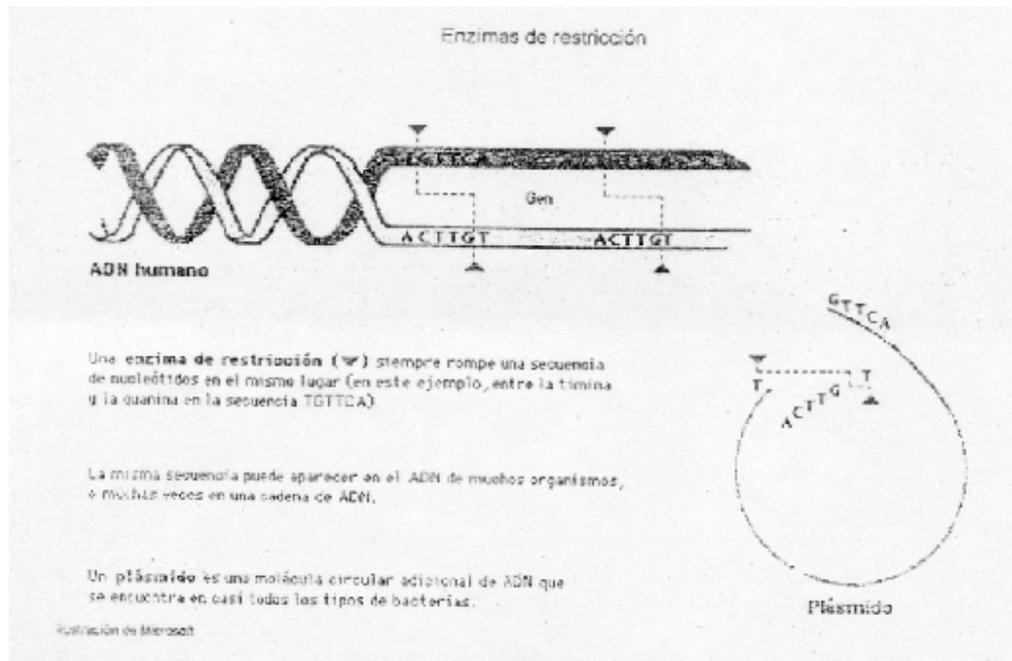
La transformación, transducción, y conjugación son formas naturales por medio de las cuales los microorganismos producen recombinaciones de ADN similares a las de los organismos con reproducción sexual. Cuando estos procesos se realizan en el laboratorio constituyen lo que se ha llamado manipulación genética y de esta manera se puede lograr reunir en el interior de un microorganismo su propio ADN con ADN proveniente de otros organismos no relacionados, haciendo que estos genes se expresen y el microorganismo sintetice proteínas para las cuales no poseía la codificación genética antes de la manipulación.

Hay en la actualidad, técnicas disponibles para que de una manera relativamente sencilla se manipulen los genes y se construyan en el laboratorio moléculas de ADN recombinante que probablemente nunca habrían aparecido en la naturaleza en el transcurso de la evolución.

El uso de plasmidios, junto con enzimas de restricción, y ADN ligasas, permite la construcción de esos ADN híbridos que contienen genes de diversas fuentes.

Las enzimas de restricción tienen la propiedad de reconocer ciertas secuencias específicas en las moléculas de ADN cortándolas en varios segmentos. Algunas de las

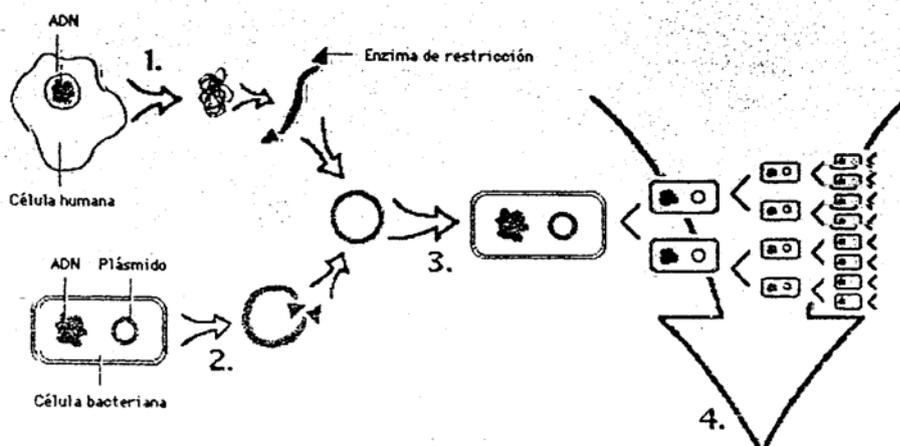
enzimas de restricción hacen sus cortes de manera que los fragmentos de ADN obtenidos son de doble cadena pero en los extremos tienen unas cortas secuencias de una sola cadena que son complementarias y se han llamado extremos cohesivos.



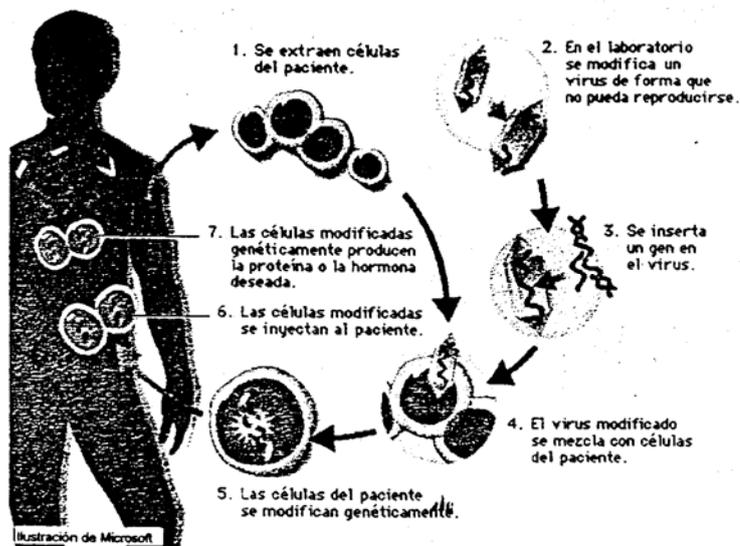
Si se mezclan dos preparaciones de ADN de diferente origen pero tratados con la misma enzima de restricción, los extremos cohesivos así producidos hacen posible la formación de híbridos por un apareamiento por complementariedad de bases de los extremos cohesivos de cada molécula.

Una vez que las dos moléculas se han apareado, se tratan con otra enzima, la ADN ligasa que une los dos fragmentos en una sola molécula de ADN de doble cadena híbrido.

Como ya hemos dicho, los plásmidos tienen la capacidad de replicarse en forma independiente en la célula, la incorporación de los fragmentos de ADN en un plásmido permite la replicación de este ADN conjuntamente con los genes del plásmido y de esta manera se logra obtener grandes cantidades de ADN que llevan el fragmento de interés.



Corrección de enfermedades genéticas



Entre los muchos beneficios potenciales de esta manipulación tenemos el desarrollo de bacterias capaces de producir por ejemplo insulina u otras hormonas de origen humano o animal. De esta misma forma se pueden lograr seres que podrían constituir verdaderos peligros si se les introduce en sus genes la capacidad de producir toxinas u otras sustancias dañinas para el hombre, animales o plantas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Clavell L y Pedrique de A. M. (1990) Introducción a la Genética Bacteriana (Segunda Edición). Facultad de Farmacia UCV.

Davis, Dulbecco, Eisen and Ginsberg. Microbiology. Fourth Edition. J. B. Lippincott Company 1990.

Madigan M.T, Martingo J. M. y Jack Parker. 2004. Décima Edición. Brock Biología de los Microorganismos Prentice Hall

Microsoft 1998 Enciclopedia Encarta 98

Pelczar, Reid and Chan. Microbiology. Fourth edition. 1977. Mcgraw-Hill.

Stanier, Adelberg and Ingraham. General Microbiology. 4th Edition. 1977. The MacMillan Press Ltd.

Tortora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case 2007. Introducción a la Microbiología 9<sup>na</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana.

Weistreich and Lechtman. Microbiology. Fifth Edition. 1988. Macmillan Publishing Co.

Magaly Pedrique de Aulacio  
Enero 1999  
Revisión 2008

## **ACTIVIDADES ADICIONALES**

- Buscar y leer un artículo o noticia de prensa relacionado con genética, subrayar 5 términos que aparezcan en ese artículo, buscar su significado y elaborar un glosario que facilite la comprensión de tal artículo.
- Investigar qué es la terapia génica o terapia de genes y hacer una lista de las enfermedades en que se está experimentando.
- Investigar qué es una secuencia palindrómica y dar un ejemplo

- Buscar en un diccionario de inglés técnico la traducción al español de las palabras siguientes:

Dark repair	
Deletion	
DNA repair	
Double-stranded DNA	
Environment	
Frameshift mutation	
Gene	
Genetic code	
Genetic engineering	
Heredity	
Lagging strand	
Leading strand	
Messenger RNA	
Nonsense codon	
Plasmid	
Point mutation	
Replica plating	
Replication fork	
Translation	
Wild type	