

2

PATRONES DE HERENCIA



Pequeño jardín del monasterio en el que Mendel realizó sus experimentos con guisantes.

Una estatua de Mendel es visible al fondo. Actualmente, esta parte del monasterio es un museo, cuyos conservadores han plantado begonias rojas y blancas con una disposición que representa gráficamente algunos de los resultados de Mendel.

(Anthony Griffiths.)

Ideas fundamentales

La existencia de genes puede inferirse observando ciertas proporciones fijas en la descendencia de cruzamientos entre variantes fenotípicas.

La diferencia fenotípica discreta en un carácter está determinada a menudo por una diferencia en un solo gen.

En plantas y animales, cada gen está presente en dos copias por célula, una en cada miembro de un par cromosómico.

Los patrones hereditarios se basan en la conducta de los cromosomas durante la meiosis.

Durante la formación de los gametos, cada miembro de un par génico segrega (se distribuye) a la mitad de los gametos.

Durante la formación de los gametos, dos genes situados en pares cromosómicos distintos se comportan de manera independiente.

Los genes de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia especiales.

El gen, la unidad funcional básica de la herencia, es el foco de atención de la Genética moderna. En todas las líneas de investigación genética, el gen constituye el hilo unificador común de una gran variedad de estudios experimentales. En este capítulo, analizaremos los patrones según los cuales se heredan los fenotipos en plantas y animales, y veremos que estos patrones son regulares y predecibles. Precisamente, fueron estos patrones hereditarios regulares los que primero llevaron al concepto de gen, y por aquí es por donde comenzaremos nuestra historia.

El concepto de gen (aunque no la palabra) fue propuesto por primera vez en 1865 por Gregor Mendel. Hasta entonces, se habían realizado pocos avances en el entendimiento de los mecanismos de la herencia. La noción que prevalecía era que el espermatozoide y el óvulo contenían un conjunto de esencias originadas en las distintas partes del cuerpo del organismo parental; durante la concepción, estas esencias se mezclaban de alguna forma para influir en el desarrollo del nuevo descendiente. Esta idea de **herencia mezclada** surgió para explicar el hecho de que la descendencia muestra normalmente características que son similares a las de ambos progenitores. Sin embargo, había problemas obvios asociados con esta idea, uno de los cuales es que la descendencia no es siempre una mezcla intermedia de las características de los padres. Los intentos para mejorar y extender esta teoría, originalmente concebida por Aristóteles, no llevaron a un mejor entendimiento de la herencia.

Como resultado de su investigación con plantas de guisante, Mendel propuso una teoría de **herencia particulada**. De acuerdo con esta teoría, los caracteres están determinados por unidades discretas que se heredan intactas a lo largo de las generaciones. Este modelo explicaba muchas observaciones que no eran explicadas por la hipótesis de la herencia mezclada. También sirvió como marco para un posterior y más detallado entendimiento de los mecanismos de la herencia.

La importancia de las ideas de Mendel no se reconoció hasta cerca de 1900 (después de su muerte). Su trabajo escrito fue entonces descubierto de nuevo por tres científicos, después de que cada uno de ellos hubiera obtenido de forma independiente el mismo tipo de resultados. El trabajo de Mendel constituye el prototipo del análisis genético. Estableció una forma de enfoque lógico y experimental al estudio de la herencia que todavía se emplea hoy en día. Por ello, aunque la siguiente descripción es histórica, la secuencia experimental es la misma que utilizan actualmente los genetistas.

Los experimentos de Mendel

Gregor Mendel nació en la región de Moravia, que en aquella época formaba parte del Imperio Austrohúngaro. Al final de sus estudios superiores, se incorporó al monasterio agustino de Santo Tomás en la ciudad de Brünn, la actual Brno de la República Checa. Su monasterio estaba dedicado a la enseñanza de la ciencia y a la investigación científica, de modo que Mendel fue enviado a la universidad de Viena con el fin de obtener su título docente. Sin embargo, suspendió los exámenes y volvió al monasterio de Brünn. Allí se embarcó en un programa de investiga-

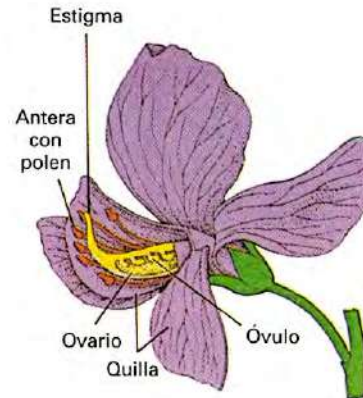


Figura 2-1. Esquema de una flor de guisante con la quilla cortada y abierta para exponer los órganos reproductores. También se muestra un corte del ovario. (Según J. B. Hill, H. W. Popp y A. R. Grove, Jr., *Botany*. Copyright © 1967, McGraw-Hill.)

ción sobre la hibridación de plantas que le llevó póstumamente a ser reconocido como el fundador de la ciencia de la Genética.

Los estudios de Mendel constituyen un ejemplo sobresaliente de la correcta utilización del método científico. Eligió un material de investigación muy adecuado para el estudio que quería realizar, diseñó sus experimentos muy cuidadosamente, recogió gran cantidad de datos y utilizó el análisis matemático para demostrar que los resultados obtenidos eran coherentes con su hipótesis. Las predicciones de la hipótesis se comprobaron otra vez en una nueva serie de experimentos.

Mendel estudió el guisante de jardín (*Pisum sativum*) por dos razones principales. En primer lugar, disponía en el mercado de una amplia variedad de guisantes de distintas formas y colores, que podían identificarse y analizarse fácilmente. En segundo lugar, los guisantes pueden **autopolinizarse** o cruzarse mediante polinización cruzada. El guisante se autopoliniza porque las partes masculinas (anteras) y las femeninas (ovarios) de la flor (que producen, respectivamente, el polen y los óvulos) están encerradas por dos pétalos fusionados que forman un compartimiento denominado quilla (Fig. 2-1). El jardinero, o el investigador, puede **cruzar** dos plantas de guisante a voluntad (polinización cruzada). Para ello, se eliminan las anteras de una planta antes de que éstas se hayan abierto para soltar el polen, operación que se denomina emasculación y que se hace para prevenir la autopolinización. El polen de la otra planta se transfiere al estigma receptor con la ayuda de un pincel o con la propia antera (Fig. 2-2). De esta forma, el investigador puede elegir entre la autopolinización o la polinización cruzada de las plantas de guisante.

Otras razones prácticas para la elección de Mendel fueron que los guisantes eran baratos y fáciles de obtener, que ocupaban poco espacio, que tenían un tiempo de generación corto y que producían muchos descendientes.

Plantas que difieren en un solo carácter

Mendel eligió siete *caracteres* para su estudio. En este contexto, la palabra **carácter** significa una propiedad específica de un or-

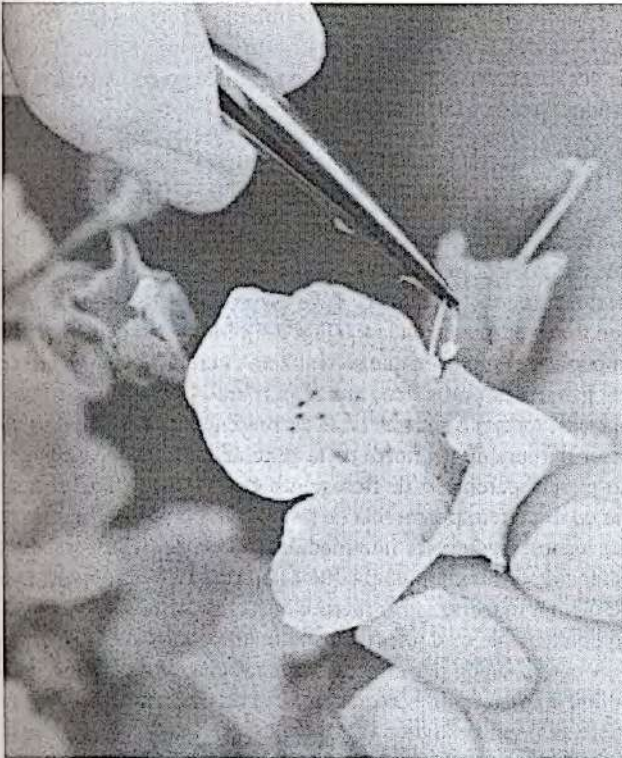


Figura 2-2. Una de las técnicas de polinización cruzada artificial, realizada con *Mimulus gattatus*, la llamada flor del mono amarillo. Para transferir el polen, el experimentador aplica anteras del parental masculino sobre el estigma de una flor emasculada, que actúa como parental femenino. (Anthony Griffiths.)

organismo; los genetistas usan este término como sinónimo de característica o rasgo.

Para cada uno de los caracteres escogidos, Mendel obtuvo líneas de plantas que había cultivado durante dos años, para asegurar que fueran líneas puras. Una **línea pura** es una población que produce descendencia homogénea para el carácter específico en estudio; todos los descendientes obtenidos por autopolinización o fecundación cruzada entre los individuos de la población son idénticos para dicho carácter. Asegurándose de la pureza de las líneas, Mendel dio un primer paso inteligente: había establecido una situación fija de partida para sus experimentos futuros, de forma que cualquier variación observada en su investigación tras una manipulación deliberada sería científicamente significativa; había establecido, de hecho, un experimento control.

Dos de las líneas de guisantes estudiadas por Mendel demostraron ser homogéneas para el carácter color de la flor. Una línea presentaba flores púrpuras y la otra flores blancas. Cualquier planta de la línea de flores púrpuras (ya fuera autopolinizada o cruzada con otra de la misma línea) producía semillas que, en todos los casos, daban lugar a plantas con flores púrpuras. Si, a su vez, estas plantas eran autopolinizadas o cruzadas con la misma línea, sus descendientes también presentaban flores púrpuras, y así sucesivamente. De la misma forma, la línea de flores blancas sólo producía flores blancas de generación en generación. Mendel obtuvo siete parejas de líneas puras para siete caracteres, diferenciándose cada pareja sólo respecto de un carácter (Fig. 2-3).

Puede decirse que cada pareja de las líneas de plantas de Mendel muestra **diferencia en un carácter**: una distinción clara entre dos líneas de organismos (o entre dos organismos) con respecto a un carácter determinado. Contrastar fenotipos para un determinado carácter constituye el punto de partida del análisis genético. Las diferentes líneas (o individuos) representan las di-

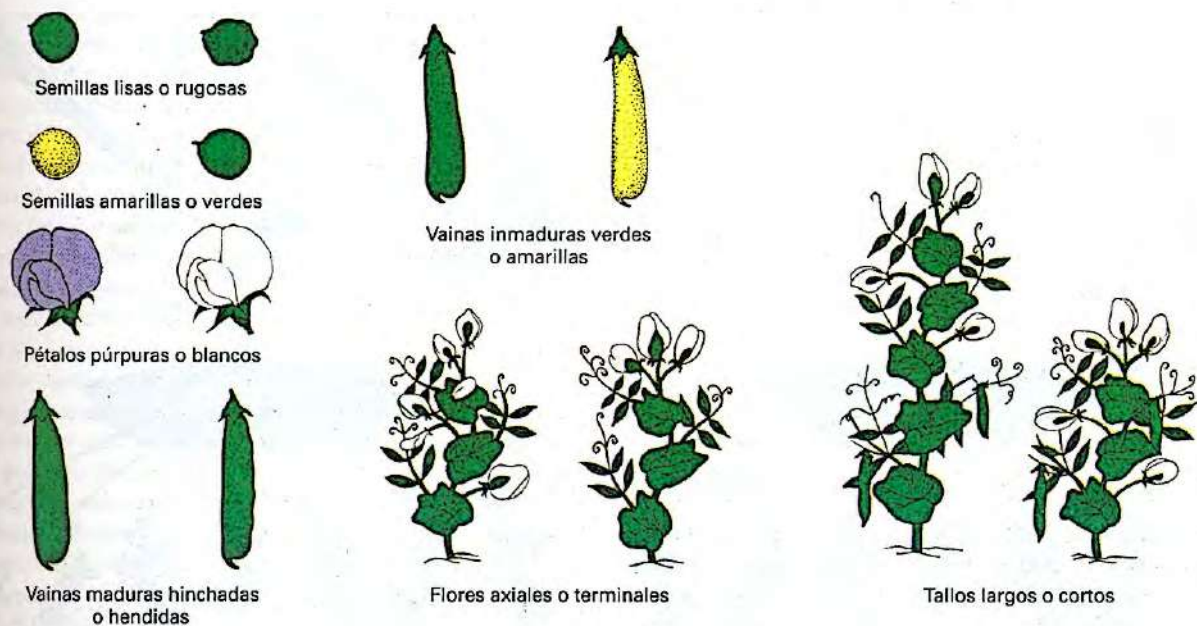


Figura 2-3. Las siete diferencias en los caracteres estudiados por Mendel. (Según S. Singer y H. Hilgard, *The Biology of People*. Copyright © 1978, W. H. Freeman and Company).

ferentes formas que el carácter puede tomar; pueden denominarse *formas del carácter*, *variantes del carácter* o **fenotipos**. El término *fenotipo* (que proviene del griego) significa literalmente «la forma que se muestra», y es el término utilizado actualmente por los genetistas. Aunque palabras como gen y fenotipo no fueran acuñadas ni utilizadas por Mendel, las usaremos aquí al describir sus resultados e hipótesis.

La Figura 2-3 muestra los siete caracteres del guisante estudiados por Mendel, cada uno representado por dos fenotipos diferentes. La descripción de los caracteres es algo arbitraria. Por ejemplo, podemos tratar las diferencias en el carácter *color* al menos de tres formas:

Carácter	Fenotipos
Color de la flor	Púrpura o blanco
Flores púrpuras	Presentes o ausentes
Flores blancas	Presentes o ausentes

Afortunadamente, la forma en que describamos los caracteres no altera los resultados finales del análisis, excepto en cuanto a las palabras empleadas.

Volvamos ahora al trabajo de Mendel sobre las líneas puras para el color de las flores. En uno de sus primeros experimentos, Mendel polinizó una planta de flores púrpuras con polen obtenido a partir de una planta de flores blancas. Estas plantas de líneas puras constituyen la **generación parental (P)**. Todas las plantas resultantes de este cruzamiento presentaron flores de color púrpura (Fig. 2-4). Esta generación de descendientes se denomina **primera generación filial (F₁)**. Las generaciones subsiguientes obtenidas por autopolinización se denominan F₂, F₃ y así sucesivamente.

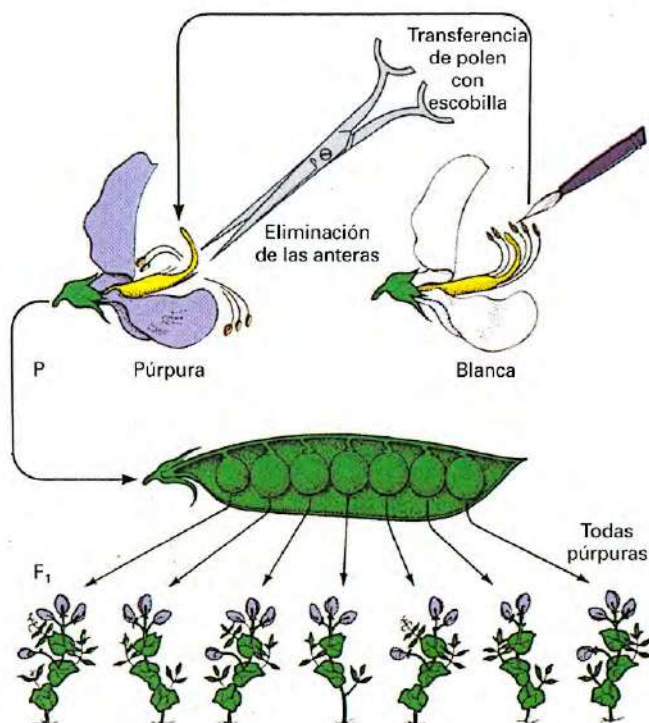


Figura 2-4. Cruzamiento de Mendel de flores púrpuras ♀ × flores blancas ♂.

Mendel realizó también **cruzamientos recíprocos**. Para la mayoría de las plantas, cualquier cruzamiento puede realizarse de dos formas, según qué fenotipo se utilice como masculino (♂) o femenino (♀). Por ejemplo, los cruzamientos

fenotipo A ♀ × fenotipo B ♂
fenotipo B ♀ × fenotipo A ♂

son cruzamientos recíprocos. El cruzamiento recíproco de Mendel, en el que polinizó una flor blanca con polen de una planta de flores púrpuras, produjo el mismo resultado (todas las plantas con flores púrpuras) en la F₁ (Fig. 2-5). Mendel concluyó que no importaba el modo en que se realizara el cruzamiento. Si uno de los parentales puros tiene flores púrpuras y el otro tiene flores blancas, todas las plantas de la F₁ presentan flores púrpuras. El color púrpura de las flores de la generación F₁ es idéntico al de las plantas parentales de flores púrpuras. En este caso, la herencia *no* es una simple mezcla de los colores púrpura y blanco para dar lugar a algún color intermedio. Para mantener la teoría de la herencia por mezcla, habría que asumir que el color púrpura es, de alguna manera, «más fuerte» que el color blanco y elimina completamente cualquier traza del fenotipo blanco en la mezcla.

A continuación, Mendel dejó que las plantas de la F₁ se autopolinizaran, permitiendo que el polen de cada flor se depositara sobre su propio estigma. Obtuvo 929 semillas (individuos de la F₂) y las sembró para obtener plantas de ellas. Curiosamente, algunas de las plantas resultantes tenían flores blancas; el fenotipo blanco había reaparecido. Entonces Mendel hizo algo que marca, mejor que ninguna otra cosa, el nacimiento de la Genética moderna: *contó* el número de plantas de cada fenotipo. Este procedimiento había sido usado rara vez, o nunca, en los estu-

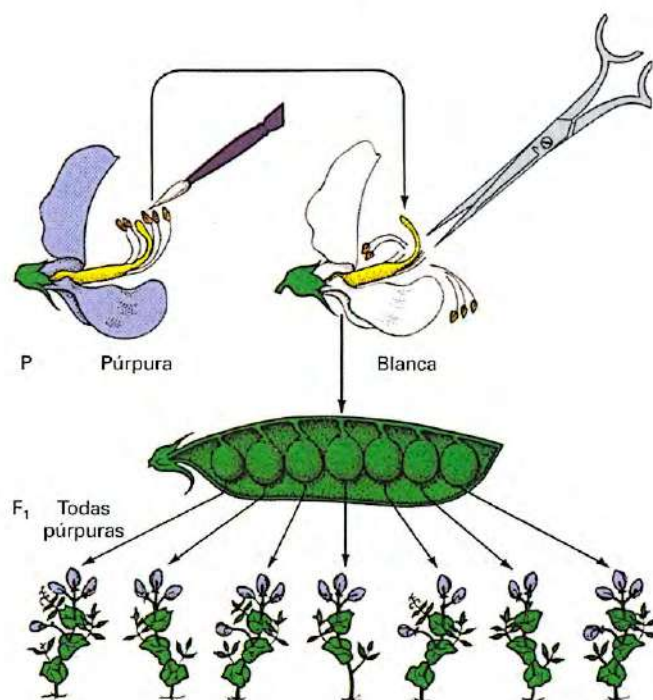


Figura 2-5. Cruzamiento de Mendel de flores blancas ♀ × flores púrpuras ♂.

CUADRO 2-1. Resultados de todos los cruzamientos de Mendel en los que los parentales diferían en un solo carácter

Fenotipo parental	F ₁	F ₂	Proporción F ₂
1. Semilla lisa × rugosa	Todas lisas	5474 lisas; 1850 rugosas	2.96:1
2. Semilla amarilla × verde	Todas amarillas	6022 amarillas; 2001 verdes	3.01:1
3. Pétalos púrpuras × blancos	Todos púrpuras	705 púrpuras; 224 blancos	3.15:1
4. Vaina hinchada × hendida	Todas hinchadas	882 hinchadas; 299 hendidas	2.95:1
5. Vaina verde × amarilla	Todas verdes	428 verdes; 152 amarillas	2.82:1
6. Flores axiales × terminales	Todas axiales	651 axiales; 207 terminales	3.14:1
7. Tallo largo × corto	Todos largos	787 largos; 277 cortos	2.84:1

dios sobre herencia anteriores al trabajo de Mendel. De hecho, otros habían obtenido resultados extraordinariamente similares en estudios sobre cruzamientos, pero no contaron los individuos de cada clase. Mendel anotó 705 plantas de flores púrpuras y 224 de flores blancas, y se dio cuenta de que la proporción 705:224 es casi igual a la proporción 3:1 (de hecho, es 3.1:1).

Mendel repitió los mismos cruzamientos con las otras seis parejas de plantas de guisante que se diferenciaban en un solo carácter. Encontró la misma proporción 3:1 en la generación F₂ para cada una de las parejas (Cuadro 2-1). Para entonces, Mendel había empezado a tener pocas dudas sobre la importancia de la proporción 3:1 y trató de buscar una explicación para ella. En todos los casos, uno de los fenotipos parentales desaparecía en la F₁ para volver a manifestarse en la cuarta parte de los individuos de la F₂. Por ejemplo, el fenotipo blanco faltaba por completo en la generación F₁ pero volvía a aparecer (en su forma original) en la cuarta parte de las plantas de la F₂.

Resulta muy difícil explicar estos resultados en términos de herencia mezclada. Aun cuando las flores de la generación F₁ presentaban color púrpura, era evidente que las plantas mantenían el *potencial* para producir descendientes de flores blancas. Mendel infirió que las plantas de la F₁ reciben de sus progenitores la capacidad para producir tanto el fenotipo púrpura como el blanco y que, más que mezclarse, estas capacidades se mantienen y transmiten a las generaciones siguientes. ¿Por qué, entonces, no se expresa el fenotipo blanco en las plantas de la F₁? Mendel utilizó los términos **dominante** y **recesivo** para describir este fenómeno, aunque sin explicar su mecanismo. El fenotipo púrpura es dominante sobre el blanco, y el fenotipo blanco es recesivo frente al púrpura. Así, la definición operativa de dominancia se establece por el fenotipo de la F₁ tras el cruzamiento entre dos líneas puras. El fenotipo parental que aparece en tales individuos de la F₁ es, por definición, el fenotipo dominante.

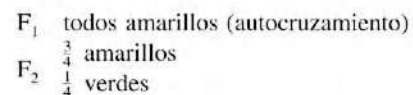
Mendel avanzó un paso más para demostrar que la clase de individuos de la F₂ que manifestaba el fenotipo dominante estaba compuesta en realidad por dos subclases genéticamente distintas. En este caso, él estaba analizando el color de la semilla. En el guisante, el color de la semilla está determinado por la constitución genética de la propia semilla, y no por la del parental femenino, como ocurre en algunas otras especies vegetales. Esta autonomía resulta muy útil, porque el investigador puede considerar cada guisante como un individuo y observar directamente el fenotipo, sin necesidad de hacerlo crecer hasta dar una nueva planta, como ocurre en el caso del color de la flor. También significa que pueden analizarse muchos más individuos y

que los estudios pueden extenderse a las generaciones posteriores. Los colores de las semillas utilizados por Mendel fueron el amarillo y el verde. Cruzó una línea pura de semillas amarillas con otra de semillas verdes y observó que todos los guisantes de la F₁ eran amarillos. Simbólicamente:

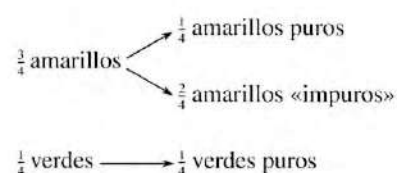


Así, por definición, amarillo es el fenotipo dominante y verde es el recesivo.

Mendel desarrolló plantas F₁ a partir de estos guisantes de la F₁ y dejó que se autopolinizaran. Los guisantes que se desarrollaron en las plantas de la F₁ constituían la generación F₂. Observó que en las vainas de las plantas de la F₁, tres cuartas partes de los guisantes F₂ eran amarillos y una cuarta parte eran verdes:



De nuevo, encontramos aquí una proporción fenotípica 3:1 en la F₂. Mendel tomó una muestra de 519 guisantes amarillos de la F₂ y los sembró para obtener plantas a partir de ellos. Cada una de estas plantas de la F₂ se autopolinizó, anotándose el tipo de guisantes que desarrollaron. Mendel comprobó que 166 de las plantas produjeron sólo guisantes amarillos, mientras que las restantes 353 plantas produjeron una mezcla de guisantes amarillos y verdes en proporción 3:1. También hizo crecer plantas a partir de guisantes verdes de la F₂ que, tras la autopolinización, dieron lugar sólo a guisantes verdes. En resumen, todos los guisantes verdes de la F₂ eran evidentemente líneas puras, igual que la línea parental verde. Pero de los guisantes amarillos de la F₂, dos tercios eran como los amarillos de la F₁ (que producían semillas amarillas y verdes en proporción 3:1) y un tercio eran como la línea pura parental amarilla. Así pues, el análisis de estas autofecundaciones reveló que bajo la aparente proporción fenotípica 3:1 de la generación F₂ existía una proporción 1:2:1 subyacente:



Estudios posteriores demostraron que la proporción 1:2:1 está presente en todas las proporciones fenotípicas observadas por Mendel. Así, el problema consistía realmente en explicar la proporción 1:2:1. La explicación de Mendel constituye un ejemplo clásico de formulación, a partir de una observación, de un modelo creativo o hipótesis, susceptible de comprobación mediante nuevos experimentos. Mendel dedujo la siguiente explicación:

1. *La existencia de los genes.* Existen determinantes hereditarios de naturaleza particulada. A estos determinantes los llamamos hoy día *genes*.
2. *Los genes van en parejas.* Los fenotipos alternativos para un carácter están determinados por formas distintas de un solo tipo de gen. Las diferentes formas de un gen se denominan **alelos**. En las plantas adultas de guisante, cada tipo de gen está presente por duplicado en cada célula, constituyendo un **par génico**. En plantas distintas, el par génico puede estar constituido por los mismos alelos o por alelos distintos de ese gen. Aquí, el razonamiento de Mendel fue obvio: por ejemplo, las plantas de la F_1 debían contener un alelo responsable del fenotipo dominante y otro alelo responsable del fenotipo recesivo, que sólo se manifestaría en generaciones posteriores.
3. *Principio de la segregación.* Los miembros del par génico segregan (se separan) de forma igualitaria entre los gametos (óvulos y espermatozoides).
4. *Contenido gamético.* Como consecuencia de lo anterior, cada gameto contiene un solo miembro de cada par génico.
5. *Fecundación al azar.* La unión de un gameto de cada parental para formar la primera célula (**cigoto**) de un nuevo individuo descendiente ocurre al azar, es decir, los gametos se combinan independientemente de cuál sea el miembro (alelo) del par génico que contengan.

Estas conclusiones pueden ilustrarse esquemáticamente, para un caso general, usando A para representar al alelo que determina el fenotipo dominante y a para representar al alelo del fenotipo recesivo (como hizo Mendel). El uso de A y a es similar al que hacen los matemáticos de los símbolos para representar entidades abstractas de varios tipos. En la Figura 2-6, se utilizan estos símbolos para ilustrar cómo las cinco conclusiones citadas anteriormente explican la proporción 1:2:1. Como se ha mencionado en el Capítulo 1, los miembros de un par génico se separan por una barra inclinada (/), que se usa para indicar que, de hecho, forman una pareja. La barra inclinada también sirve como un cromosoma simbólico para recordarnos que el par génico se encuentra situado en un lugar concreto de un par cromosómico.

El modelo completo da un sentido lógico a los datos. Sin embargo, se han desechado muchos hermosos modelos una vez que se les ha sometido a comprobación. La siguiente tarea de Mendel consistió en comprobar su modelo. La llevó a cabo realizando cruzamientos en los que estudiaba el color de las semillas, tomando una planta de la F_1 formada a partir de una semilla amarilla y cruzándola con una planta formada a partir de una semilla verde. El modelo predice una proporción 1:1 de guisantes amarillos y verdes en la siguiente generación. Si llamamos Y

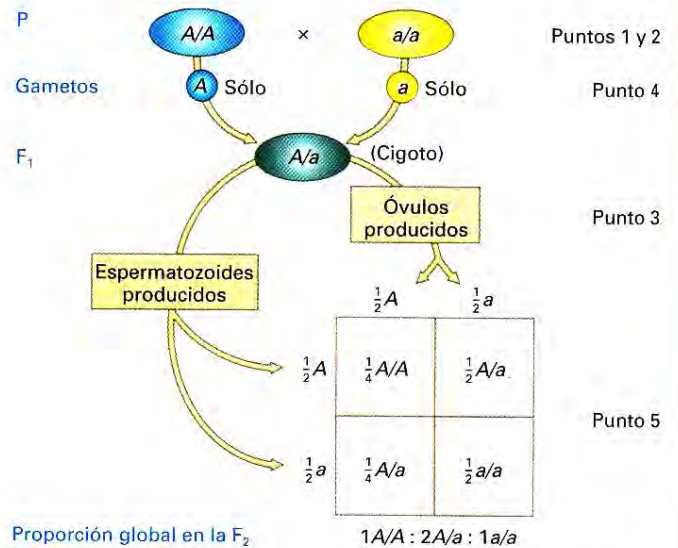


Figura 2-6. Modelo de Mendel de los determinantes hereditarios de una diferencia en un carácter en las generaciones P , F_1 y F_2 . Los cinco puntos son los que aparecen en el texto.

al alelo que determina el fenotipo dominante (semillas amarillas) e y al alelo que determina el fenotipo recesivo (semillas verdes), podemos representar las predicciones de Mendel de la forma en que se muestra en la Figura 2-7. En este experimento, Mendel obtuvo 58 semillas amarillas (Y/y) y 52 verdes (y/y), valores que se aproximan mucho a la proporción 1:1 predicha, y que confirman la segregación igualitaria de Y e y en el individuo de la F_1 . Este concepto de **segregación igualitaria** se conoce formalmente como la **primera Ley de Mendel**: los dos miembros (alelos) de un par génico se distribuyen separadamente (segregan) entre los gametos; así, la mitad de los gametos contiene un miembro del par y la otra mitad contiene el otro miembro.

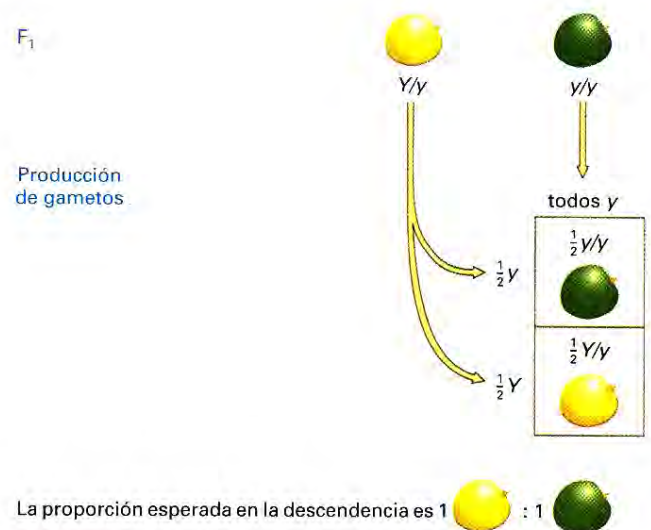


Figura 2-7. Utilización de líneas puras para deducir genotipos y relaciones de dominancia y recesividad.

Es conveniente introducir ahora algunos términos nuevos. Los individuos representados como *A/A* se denominan **heterocigotos** o, a veces, **híbridos**, mientras que los individuos de una línea pura se denominan **homocigotos**. En tales vocablos, *hetero-* significa «diferente» y *homo-* significa «idéntico». Así, de una planta *A/A* se dice que es **homocigótica dominante**, y una planta *a/a* es homocigótica para el alelo recesivo, u **homocigótica recesiva**. Como se vio en el Capítulo 1, la constitución genética respecto a uno o varios caracteres en estudio se denomina **genotipo**. Por ejemplo, *Y/Y* e *Y/y* son genotipos diferentes, aunque ambos tipos de semillas presenten el mismo fenotipo (amarillo). En tal situación, puede pensarse en el fenotipo simplemente como la manifestación externa del genotipo subyacente. Observe que en la proporción fenotípica 3:1 de la F_2 subyace una proporción genotípica 1:2:1 de *Y/Y:Y/y:y/y*.

Es conveniente hacer notar que, en términos estrictos, las expresiones **dominante** y **recesivo** deben aplicarse al fenotipo. El fenotipo dominante se establece por la apariencia de la F_1 . Sin embargo, un fenotipo (que es una mera descripción) no puede en realidad ejercer dominancia. Mendel demostró que la dominancia de un fenotipo sobre otro se debe realmente a la dominancia de un miembro del par génico sobre el otro.

Hagamos una pausa para profundizar en la importancia de este trabajo. Lo que Mendel hizo fue desarrollar un esquema analítico para la identificación de genes que regulan cualquier carácter o función biológica. Tomemos como ejemplo el color de los pétalos. Comenzando con dos fenotipos diferentes (púrpura y blanco) de un carácter (color del pétalo), Mendel fue capaz de demostrar que la diferencia estaba causada por un par génico. Los genetistas modernos dirían que el análisis de Mendel había identificado un gen para el color del pétalo. ¿Qué significa esto? Significa que, en estos organismos, hay un gen que ejerce un efecto profundo sobre el color de los pétalos. Éste puede existir en diferentes formas: una forma dominante (representada por *C*), que determina pétalos púrpuras, y una forma recesiva (representada por *c*), que determina pétalos blancos. Las formas *C* y *c* son **alelos** (formas alternativas) de ese gen responsable del color de los pétalos. Se les asigna la misma letra para indicar que los alelos son formas de un gen. En otras palabras, podemos decir que hay un gen, llamado fonéticamente «ce», con los alelos *C* y *c*. Cualquier planta individual de guisante tendrá siempre dos

copias del gen «ce», que forman un par génico, y los miembros reales del par génico pueden ser *C/C*, *C/c* o *c/c*. Observe que, aunque los dos alelos de un gen pueden producir efectos distintos, ambos afectan al mismo carácter. La ruta básica del análisis mendeliano para un carácter se resume en el Cuadro 2-2.

COROLARIO

La existencia de genes se infirió originalmente (y todavía se infiere hoy día) observando proporciones matemáticas precisas en la descendencia de dos individuos parentales genéticamente diferentes.

Bases moleculares de la Genética mendeliana

Consideremos algunos de los términos de Mendel en el contexto de la célula. Primero, ¿cuál es la naturaleza molecular de los alelos? Cuando alelos como *A* y *a* se analizan a nivel de DNA empleando técnicas modernas, generalmente se descubre que éstos son idénticos en gran parte de su secuencia y que sólo se diferencian en uno o pocos nucleótidos de los millares que los conforman. Vemos, por tanto, que los alelos son realmente versiones diferentes del mismo gen básico. Visto de otra forma, gen es un término genérico, y alelo un término específico (el gen para el color del guisante tiene dos alelos, responsables de los colores amarillo y verde). El siguiente esquema representa el DNA de dos alelos de un gen. La letra «x» representa una diferencia en la secuencia de nucleótidos.

Alelo 1 
Alelo 2 

¿Qué hay acerca de la dominancia? Hemos visto que, aunque los términos dominante y recesivo se definen en función del fenotipo, los fenotipos reflejan claramente las diferentes acciones de los alelos. Por tanto, podemos usar legítimamente los términos **alelo dominante** y **alelo recesivo** para designar a los determinantes de los fenotipos dominante y recesivo. Existen varios factores moleculares distintos que pueden hacer que un alelo sea dominante o recesivo. Una situación común es que el alelo dominante determine una proteína funcional y que el alelo recesivo provoque la ausencia de la proteína o dé lugar a una forma

CUADRO 2-2. Resumen del *modus operandi* para establecer un modo de herencia mendeliana simple

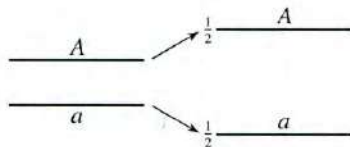
Procedimiento experimental	1. Elegir líneas puras que se diferencien en un carácter (flores púrpura y flores blancas). 2. Cruzar ambas líneas. 3. Autopolinizar los individuos de la F ₁ .			
Resultados:	La F ₁ es toda púrpura; en la F ₂ , $\frac{3}{4}$ púrpuras y $\frac{1}{4}$ blancas.			
Inferencias:	1. La diferencia en el carácter está controlada por un gen principal para el color de la flor. 2. El alelo dominante de este gen determina pétalos púrpuras; el alelo recesivo, pétalos blancos.			
Interpretación simbólica:				
Carácter	Fenotipo	Genotipo	Alelo	Gen
Color de la flor	Púrpura (dominante)	C/C (homocigoto dominante) C/c (heterocigoto)	C (dominante) c (recesivo)	Gen para el color de la flor
	Blanco (recesivo)	c/c (homocigoto recesivo)		

no funcional de la proteína. En el heterocigoto, la proteína producida por el alelo funcional es suficiente para las necesidades normales de la célula; así, el alelo funcional actúa como dominante. Un ejemplo de la dominancia de un alelo funcional en un heterocigoto se presentó al tratar el caso del albinismo en el Capítulo 1. La idea general puede presentarse como una fórmula:

$$\begin{array}{ccccc} A & & \text{más} & & a \\ (\text{proteína funcional}) & & & & (\text{proteína no funcional}) \end{array} = A/a$$

función

¿Cuál es la base celular de primera Ley de Mendel, la segregación igualitaria de los alelos durante la formación de los gametos? En un organismo diploide como el guisante, todas las células del organismo contienen dos dotaciones cromosómicas. Los gametos, sin embargo, son haploides y contienen una sola dotación. Los gametos se forman como consecuencia de divisiones celulares especializadas de células diploides del tejido reproductor (ovarios y anteras). Estas divisiones celulares especializadas están acompañadas por divisiones de los núcleos que reciben la denominación de **meiosis**. Los movimientos cromosómicos estrictamente programados que ocurren durante la meiosis provocan la distribución igualitaria de los alelos a los gametos. En la meiosis de un heterocigoto A/a , el cromosoma portador de A es empujado en la dirección contraria a la del cromosoma portador de a ; por tanto, la mitad de los gametos resultantes llevan A y la otra mitad, a . Esta situación puede representarse simplificada de la siguiente manera (la meiosis se detallará en el Capítulo 3):



La fuerza que empuja a los cromosomas hacia los polos celulares está generada por el huso acromático, una serie de microtúbulos constituidos por la proteína tubulina. Los microtúbulos se unen a los centrómeros de los cromosomas mediante interacción con una serie específica de proteínas localizadas en el propio centrómero. La coordinación de estas interacciones moleculares es compleja, pero constituye la base de las leyes de la transmisión hereditaria en los eucariotas.

Plantas que difieren en dos caracteres

Los experimentos de Mendel descritos hasta el momento son el resultado de cruzamientos entre dos líneas puras parentales que difieren en un solo carácter. Como hemos visto, tales líneas producen descendientes F_1 heterocigotos para un gen (genotipo A/a). Estos heterocigotos se denominan a veces **monohíbridos**. La autopolinización o el cruzamiento cruzado entre individuos de la F_1 heterocigotos idénticos (simbólicamente $A/a \times A/a$) se denomina **cruzamiento monohíbrido**, y fue este tipo de cruzamiento el que produjo en la descendencia las interesantes proporciones 3:1 que sugirieron el principio de la segregación igualitaria. Mendel continuó su trabajo analizando la descendencia de líneas puras que diferían en *dos* caracteres. Ahora necesita-

mos una simbología más general que nos permita representar genotipos que incluyan dos genes. Si dos genes están en diferentes cromosomas, los pares génicos se separan por un punto y coma, por ejemplo, $A/a ; B/b$. Si están en el mismo cromosoma, los alelos de uno de los cromosomas se escriben juntos y se separan de los alelos del otro cromosoma con una barra inclinada, por ejemplo, AB/ab o Ab/aB . No existe un símbolo aceptado para la situación en la cual se desconoce si los genes están en el mismo o en distintos cromosomas. Para esta situación, separaremos los genes con un punto, por ejemplo, $A/a \cdot B/b$. Al doble heterocigoto $A/a \cdot B/b$ se le conoce como **dihíbrido**. Estudiando **cruzamientos dihíbridos** ($A/a \cdot B/b \times A/a \cdot B/b$), Mendel descubrió otro principio importante de la herencia.

Los dos caracteres concretos con los que Mendel comenzó este análisis fueron la forma y el color de las semillas. Ya hemos tratado sobre el cruzamiento monohíbrido para el color de la semilla ($Y/y \times Y/y$), que produjo una proporción de 3 amarillos:1 verde entre la descendencia. Los fenotipos de la forma de la semilla eran liso (determinado por el alelo R) y rugoso (determinado por el alelo r). El cruzamiento monohíbrido $R/r \times R/r$ produjo una proporción en la descendencia de 3 lisos:1 rugoso (Cuadro 2-1 y Fig. 2-8). Para realizar un cruzamiento dihíbrido, Mendel partió de dos líneas parentales puras. Una de ellas tenía semillas rugosas y amarillas. Como Mendel carecía del concepto de localización cromosómica de los genes, debemos usar el pun-



Figura 2-8. Guisantes lisos (R/R o R/r) y rugosos (r/r) en la vaina de una planta heterocigótica (R/r) autopolinizada. En esta vaina, las proporciones fenotípicas resultan ser exactamente 3:1, precisamente las esperadas como media entre los descendientes de una autopolinización como ésta. (Estudios moleculares recientes han demostrado que el alelo para el fenotipo rugoso empleado por Mendel se debe a la inserción en el gen de un fragmento de DNA móvil, del tipo que trataremos en el Capítulo 20.) (Madan K. Bhattacharyya.)

to para representar este genotipo como $YY \cdot rr$. La otra línea tenía semillas lisas y verdes, de genotipo $yy \cdot RR$. El cruzamiento entre estas dos líneas produjo semillas F_1 dihíbridas de genotipo $Rr \cdot Yy$ que, según Mendel descubrió, eran lisas y amarillas. Este resultado demostró que la dominancia de R sobre r y la de Y sobre y no se veían afectadas por la heterocigosidad en cualquiera de los genes del dihíbrido $Rr \cdot Yy$. A continuación, Mendel realizó el cruzamiento dihíbrido permitiendo que se autopolinizara el dihíbrido de la F_1 para obtener la generación F_2 . Las semillas de la F_2 eran de cuatro tipos distintos, apareciendo en las siguientes proporciones:

$\frac{9}{16}$	lisas amarillas
$\frac{3}{16}$	lisas verdes
$\frac{3}{16}$	rugosas amarillas
$\frac{1}{16}$	rugosas verdes

como se muestra en la Figura 2-9. Esta proporción 9:3:3:1, algo inesperada, parece mucho más compleja que las simples proporciones 3:1 de los cruzamientos monohíbridos. ¿Cuál podía ser la explicación? Antes de intentar explicar la proporción 9:3:3:1, Mendel realizó cruzamientos dihíbridos que afectaban a otras combinaciones de caracteres y encontró que *todos* los individuos dihíbridos de la F_1 producían descendientes en proporciones 9:3:3:1 similares a las encontradas para el color y la forma de la semilla. La proporción 9:3:3:1 era otro patrón hereditario constante que necesitaba ser convertido en una idea.

Mendel sumó el número de individuos pertenecientes a ciertas clases fenotípicas de la F_2 (los números se muestran en la Figura

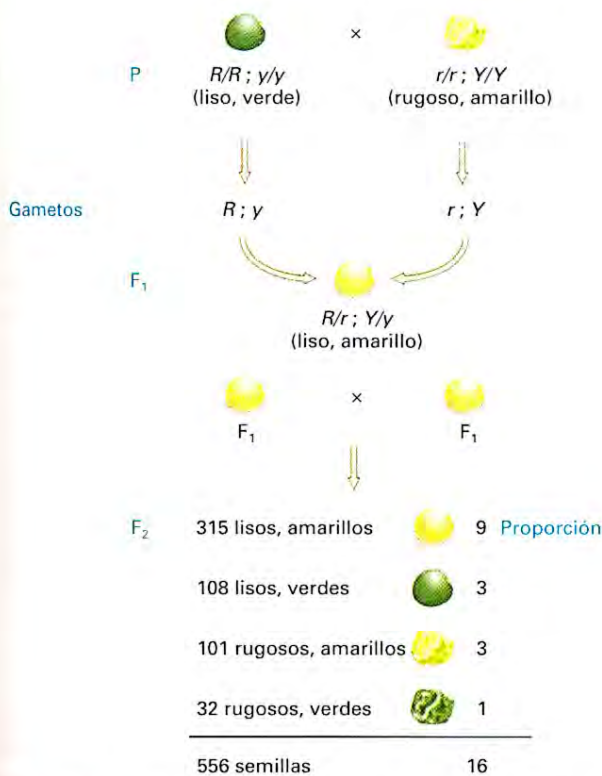
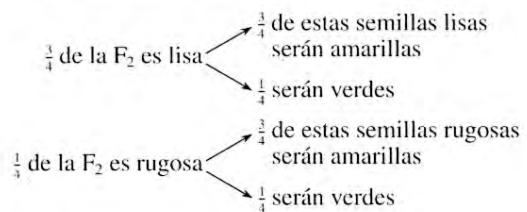


Figura 2-9. La generación F_2 resultante de un cruzamiento dihíbrido.

2-9) para determinar si las proporciones 3:1 monohíbridas de la F_2 todavía se mantenían. Se dio cuenta de que, con respecto a la forma de la semilla, había 423 lisas (315 + 108) y 133 rugosas (101 + 32). Este resultado se aproxima a la proporción 3:1. Con respecto al color de la semilla, había 416 amarillas (315 + 101) y 140 verdes (108 + 32), también una proporción muy cercana a 3:1. La presencia de estas dos proporciones 3:1 escondidas en la proporción 9:3:3:1 era, indudablemente, lo que la perspicacia de Mendel necesitaba para explicar la proporción 9:3:3:1, porque se dio cuenta de que ésta no era más que la combinación aleatoria de dos proporciones 3:1 independientes. Una forma de visualizar la combinación aleatoria de estas dos proporciones es utilizar un diagrama ramificado, de la siguiente forma:



Las proporciones combinadas se calculan multiplicando a lo largo de las ramas del diagrama porque, por ejemplo, $\frac{3}{4}$ de $\frac{3}{4}$ se calcula como $\frac{3}{4} \times \frac{3}{4}$, que es igual a $\frac{9}{16}$. Estas multiplicaciones nos dan las siguientes proporciones:

$$\begin{aligned} \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} &= \frac{9}{16} \text{ lisas amarillas} \\ \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} &= \frac{3}{16} \text{ lisas verdes} \\ \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} &= \frac{3}{16} \text{ rugosas amarillas} \\ \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} &= \frac{1}{16} \text{ rugosas verdes} \end{aligned}$$

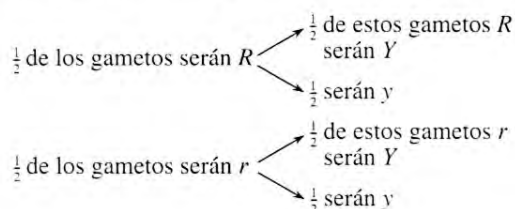
Estas fracciones constituyen la proporción 9:3:3:1 que estamos tratando de explicar. Sin embargo, ¿no es todo ello un simple juego de números? ¿Cuál es el significado biológico de la combinación de dos proporciones 3:1? El modo en que Mendel enunció su explicación aporta de hecho un mecanismo biológico. En lo que se conoce como la **segunda Ley de Mendel**, concluyó que *los miembros (alelos) de genes distintos segregan independientemente durante la formación de los gametos*. Con nuestro conocimiento actual sobre la localización cromosómica de los genes, sabemos que esta «ley» sólo es válida en algunos casos. La mayor parte de los casos de independencia se observa al analizar genes situados en cromosomas diferentes. Generalmente, genes situados en un mismo cromosoma no segregan independientemente, porque tienden a mantenerse juntos en el mismo cromosoma. Por tanto, la versión moderna de la segunda Ley de Mendel se enuncia como en el siguiente corolario.

COROLARIO

Los alelos de genes situados en cromosomas distintos segregan de forma independiente durante la meiosis.

Hemos explicado la proporción 9:3:3:1 como la combinación de dos proporciones fenotípicas 3:1. Pero la segunda Ley de Mendel está relacionada con la distribución de los alelos a los gametos. ¿Puede explicarse la proporción 9:3:3:1 basándose en

los genotipos de los gametos? Consideremos los gametos producidos por el dihíbrido de la F_1 $R/r ; Y/y$ (el punto y coma indica que ahora estamos asumiendo que los genes están en cromosomas distintos). Comenzaremos usando, de nuevo, un diagrama ramificado, porque ilustra visualmente la independencia. Combinando las leyes de Mendel de la segregación igualitaria y la distribución independiente, podemos predecir que



La multiplicación a lo largo de las ramas nos da las proporciones de gametos:

$\frac{1}{4} R ; Y$
 $\frac{1}{4} R ; y$
 $\frac{1}{4} r ; Y$
 $\frac{1}{4} r ; y$

Estas proporciones son un resultado directo de la aplicación de las dos Leyes de Mendel. Sin embargo, todavía no hemos llegado a la proporción 9:3:3:1. El siguiente paso es reconocer que tanto los gametos masculinos como los femeninos mostrarán las mismas proporciones que acaban de presentarse, porque Mendel no especificó reglas diferentes para la formación de los gametos masculinos y femeninos. Los cuatro tipos de gametos femeninos serán fecundados al azar por los cuatro tipos de gametos masculinos para obtener la F_2 , y el mejor modo de presentar esto gráficamente es utilizar una cuadrícula 4×4 , llamada *diagrama de Punnett*, como se muestra en la Figura 2-10. Estas cuadrículas son útiles en Genética porque sus proporciones pueden dibujarse de acuerdo con las proporciones genéticas en estudio, y así se obtiene una representación visual de los datos. En el diagrama de Punnett de la Figura 2-10, por ejemplo, vemos que las áreas de los compartimientos que representan las posibles fusiones gaméticas son, en cada caso, la dieciseisava parte del área total de la cuadrícula, simplemente porque las filas y las columnas se dibujaron de manera que correspondieran a las proporciones gaméticas. Como muestra el diagrama de Punnett, la F_2 contiene varios genotipos, pero sólo hay cuatro fenotipos, con proporciones 9:3:3:1. Vemos así que cuando trabajamos a nivel de la formación de los gametos, las Leyes de Mendel explican tanto los fenotipos de la F_2 como los genotipos que subyacen en ellos.

Mendel fue un científico minucioso: siguió comprobando su principio de la segregación independiente de otras formas. El modo más directo apuntaba a la proporción gamética 1:1:1:1 que debía producir el dihíbrido de la F_1 $R/r ; Y/y$, porque esta proporción surgía de su principio de la segregación independiente y constituía la base biológica de la razón 9:3:3:1 de la F_2 , como hemos demostrado con el diagrama de Punnett. Mendel razonó que, si de hecho había una proporción 1:1:1:1 de gametos $R ; Y$,

$R ; y$, $r ; Y$, y $r ; y$, entonces, si cruzaba el dihíbrido de la F_1 con una planta de genotipo $r/r ; y/y$, que produce gametos que sólo contienen alelos recesivos (genotipo $r ; y$), las proporciones de la descendencia de este cruzamiento debían ser una manifestación directa de las proporciones gaméticas del dihíbrido; en otras palabras,

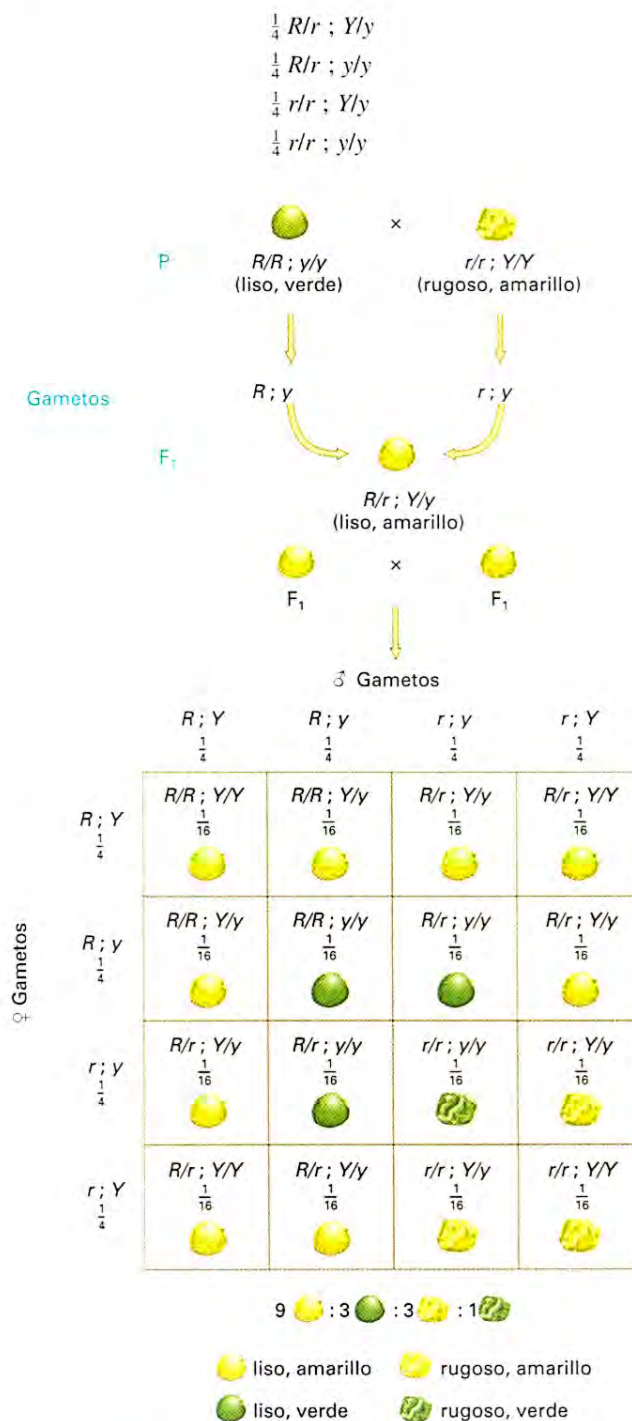


Figura 2-10. Diagrama de Punnett, que muestra las constituciones genotípica y fenotípica predichas para la generación F_2 de un cruzamiento dihíbrido.

Éstas fueron las proporciones que Mendel obtuvo, perfectamente coherentes con sus predicciones. Se obtuvieron resultados similares en todos los cruzamientos dihíbridos, y éstos y todos los otros tipos de pruebas que realizó, demostraron que había concebido un modelo sólido, que explicaba los patrones de herencia observados en sus cruzamientos con el guisante.

El tipo de cruzamiento que acabamos de considerar, de un individuo de genotipo desconocido con un homocigoto recesivo completo, se denomina actualmente **cruzamiento de prueba**. El individuo recesivo se denomina **individuo de prueba**. Puesto que este individuo sólo aporta alelos recesivos, el genotipo de los gametos producidos por el individuo desconocido puede deducirse a partir de los fenotipos de la descendencia.

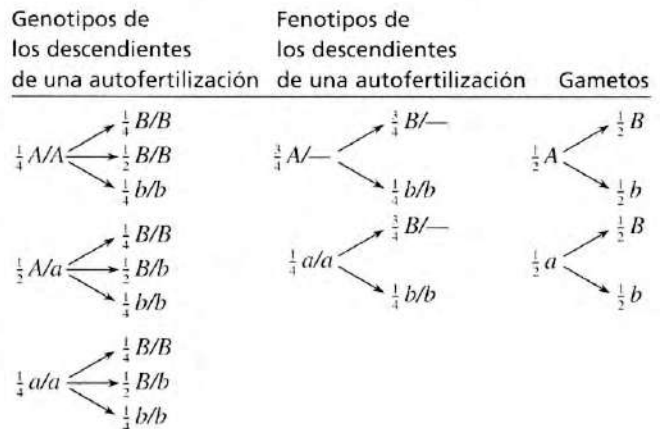
Cuando se redescubrieron los resultados de Mendel en 1900, sus principios se analizaron en un amplio espectro de organismos eucarióticos (organismos cuyas células contienen núcleo). Los resultados de estas pruebas demostraron que los principios mendelianos eran de aplicación general. Las proporciones mendelianas (como 3:1, 1:1, 9:3:3:1 y 1:1:1:1) fueron exhaustivamente comprobadas, sugiriendo que la segregación igualitaria y la segregación independiente son procesos hereditarios fundamentales observados, de forma general, en la naturaleza. Las leyes de Mendel no son meramente leyes sobre los guisantes, sino leyes generales sobre la genética de los organismos eucarióticos. La estrategia experimental utilizada por Mendel se puede aplicar de forma general a las plantas. Sin embargo, en algunas plantas y en la mayoría de los animales, resulta imposible emplear la autofertilización. Este problema puede evitarse cruzando genotipos idénticos. Por ejemplo, un animal F_1 resultante del cruzamiento entre parentales de diferentes líneas puras puede cruzarse con sus hermanos (o hermanas) para producir una F_2 . Los individuos de la F_1 son idénticos para los genes en estudio, de modo que el cruzamiento F_1 es equivalente a una autofertilización.

Métodos para el cálculo de proporciones genéticas

Una parte importante de la Genética actual se ocupa de la predicción de los tipos de descendientes producidos tras un cruzamiento y del cálculo de sus frecuencias esperadas, en otras palabras, de su probabilidad. Ya hemos examinado dos métodos para hacer esto: los diagramas de Punnett y los diagramas ramificados. Los diagramas de Punnett pueden emplearse para demostrar la existencia de patrones hereditarios basados en un gen, dos genes (como en la Fig. 2-10) o más. Tales diagramas constituyen una buena herramienta gráfica para representar a la descendencia, pero realizarlos consume mucho tiempo. Incluso la ejecución del diagrama de Punnett de 16 compartimientos mostrado en la Figura 2-10 lleva tiempo, pero para un trihíbrido hay 2^3 , es decir, 8 tipos gaméticos diferentes, y el diagrama de Punnett tendría 64 compartimientos en este caso. El diagrama ramificado (parte superior derecha de la página) es más fácil, y puede adaptarse a la determinación de proporciones gaméticas, fenotípicas o genotípicas, como se ilustra para un dihíbrido $A/a ; B/b$ (en el diagrama, el guión significa que el

alelo puede estar presente en cualquiera de sus formas, dominante o recesivo).

Observe que el «árbol» de ramas de los genotipos es bastante difícil de manejar incluso en este caso, que usa dos genes, porque hay $3^2 = 9$ genotipos. Para tres genes, hay $3^3 = 27$ genotipos posibles.



La aplicación de reglas estadísticas simples es el tercer método para calcular las probabilidades (frecuencias esperadas) de los fenotipos o los genotipos específicos resultantes de un cruzamiento. Las dos reglas de probabilidad que se necesitan son la **regla del producto** y la **regla de la suma**, que consideraremos en este orden.

COROLARIO

La regla del producto establece que la probabilidad de que ocurran a la vez dos hechos independientes es el producto de sus probabilidades independientes.

Los posibles resultados de tirar los dados siguen las reglas del producto, porque el resultado obtenido en un dado es independiente del resultado de los otros dados. Consideremos como ejemplo dos dados y calculemos la probabilidad de que tras tirarlos, nos salgan dos cuatros. La probabilidad de que nos salga un cuatro en un dado es $\frac{1}{6}$ porque el dado tiene seis caras, sólo una de las cuales es un cuatro. Esta probabilidad se representa de la siguiente forma:

$$p \text{ (de que salga un cuatro)} = \frac{1}{6}$$

Así, mediante el uso de la regla del producto, la probabilidad de que nos salga un cuatro en ambos dados es $\frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$, que se escribe

$$p \text{ (de que salgan dos cuatros)} = \frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$$

COROLARIO

La regla de la suma establece que la probabilidad de que ocurra uno de dos posibles sucesos excluyentes es la suma de sus probabilidades independientes.

La regla del producto se refiere a la probabilidad de que ocurran los resultados A y B. La regla de la suma se refiere a la

probabilidad de que ocurran los resultados A o B. También podemos emplear el ejemplo de los dados para explicar la regla de la suma. Ya hemos calculado que la probabilidad de que salgan dos cuatros es $\frac{1}{36}$, y haciendo el mismo tipo de cálculo, resulta obvio que la probabilidad de que salgan dos cincos será la misma, $\frac{1}{36}$. Ahora podemos calcular la probabilidad de que nos salgan dos cuatros o dos cincos. Como los resultados son mutuamente excluyentes, la regla de la suma nos dice que la respuesta es $\frac{1}{36} + \frac{1}{36} = \frac{1}{18}$. Esta probabilidad se representa de la siguiente forma:

$$p(\text{de que salgan dos cuatros o dos cincos}) = \frac{1}{36} + \frac{1}{36} = \frac{1}{18}$$

Consideremos ahora un ejemplo genético. Supongamos que tenemos dos plantas, una de genotipo *A/a*; *b/b*; *C/c*; *D/d*; *E/e* y otra de genotipo *A/a*; *B/b*; *C/c*; *d/d*; *E/e*. Supongamos también que, tras el cruzamiento entre estas dos plantas, queremos recuperar una planta de genotipo *a/a*; *b/b*; *c/c*; *d/d*; *e/e* (quizás para utilizarla en un cruzamiento de prueba). Para calcular cuántos descendientes debemos sembrar para tener una probabilidad razonable de obtener el genotipo deseado, necesitamos calcular la proporción de descendientes que esperamos que tengan dicho genotipo. Si suponemos que todos los genes segregan independientemente podemos hacer este cálculo fácilmente utilizando la regla del producto. Consideraremos las cinco parejas independientemente, como si realizáramos cinco cruzamientos distintos, y multiplicaremos las probabilidades obtenidas para llegar a la respuesta final.

De *A/a* × *A/a*, la cuarta parte de los descendientes será *a/a* (véanse los cruzamientos de Mendel); de *b/b* × *B/b*, la mitad de los descendientes será *b/b*; de *C/c* × *C/c*, la cuarta parte de los descendientes será *c/c*; de *D/d* × *d/d*, la mitad será *d/d*; de *E/e* × *E/e*, la cuarta parte será *e/e*. Así, la probabilidad total (o frecuencia esperada) del genotipo *a/a*; *b/b*; *c/c*; *d/d*; *e/e* será $\frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{256}$. Sabremos así que necesitaremos analizar cientos de descendientes para contar con la probabilidad de obtener al menos una planta del genotipo deseado. Este cálculo de probabilidades se puede emplear también para predecir frecuencias fenotípicas o gaméticas. De hecho, hay miles de usos de este método en el análisis genético, muchos de los cuales los encontraremos en capítulos posteriores.

Cromosomas sexuales y herencia ligada al sexo

La mayoría de los animales y muchas plantas muestran dimorfismo sexual; en otras palabras, un individuo puede ser macho o hembra. En la mayoría de estos casos, el sexo está determinado por cromosomas sexuales especiales. En estos organismos hay dos clases de cromosomas, los **cromosomas sexuales** y los **autosomas** (los cromosomas que no son los sexuales). Las reglas de la herencia consideradas hasta ahora, con el análisis de Mendel como ejemplo, son las reglas de los autosomas. La mayoría de los cromosomas de un genoma son autosomas. Los cromosomas sexuales se presentan en un número menor y, generalmente, sólo hay un par en los organismos diploides.

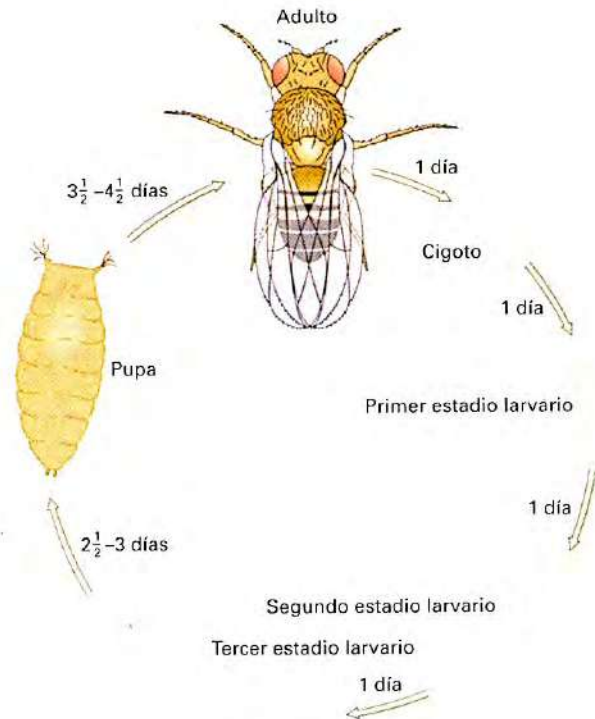


Figura 2-11. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, la mosca común del vinagre.

Veamos como ejemplo la situación en la especie humana. Las células corporales humanas tienen 46 cromosomas: 22 pares de autosomas homólogos más 2 cromosomas sexuales. En las mujeres hay un par de cromosomas sexuales idénticos, cada uno de los cuales se denomina **cromosoma X**. En los varones hay un par no idéntico, formado por los cromosomas X e Y. El **cromosoma Y** es considerablemente menor que el X. Durante la meiosis en las mujeres, los cromosomas X se emparejan y segregan como si fueran autosomas, de manera que cada óvulo recibe un cromosoma X. Se dice, por tanto, que el femenino es el **sexo homógamético**. Durante la meiosis en los varones, los cromosomas X e Y se emparejan a lo largo de una pequeña región, lo cual asegura que ambos cromosomas segreguen igualmente, de forma que la mitad de las células espermáticas recibirán el cromosoma X y la otra mitad el cromosoma Y. Se dice, por tanto, que el masculino es el **sexo heterógamético**.

CUADRO 2-3. Determinación cromosómica del sexo en *Drosophila* y en la especie humana

Especie	CROMOSOMAS SEXUALES			
	XX	XY	XXY	XO
<i>Drosophila</i>	♀	♂	♀	♂
Hombre	♀	♂	♂	♀

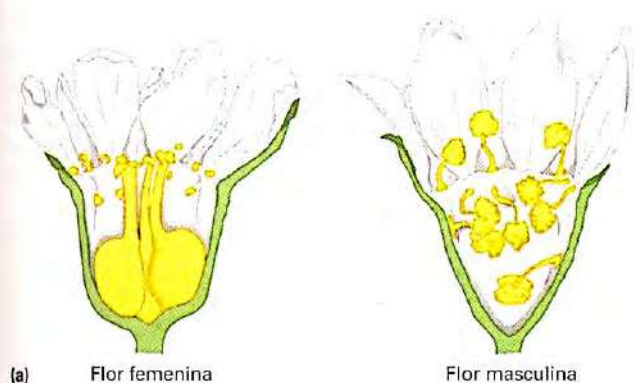


Figura 2-12. Dos especies de plantas dioicas. (a) *Osmaronia dioica*. (b) *Auruncus dioicus*. (Parte a, Leslie Bohm; parte b, Anthony Griffiths.)

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* ha sido uno de los organismos de investigación más importantes en Genética; su corto y sencillo ciclo de vida contribuye a su utilidad en este aspecto (Fig. 2-11). Las moscas del vinagre también tienen hembras XX y machos XY. Sin embargo, el mecanismo de determinación del sexo en *Drosophila* es diferente al de los mamíferos. En *Drosophila*, el número de cromosomas X determina el sexo: dos X dan lugar a una hembra y un X da lugar a un macho. En los mamíferos, la presencia del cromosoma Y determina el sexo masculino y la ausencia del Y determina el sexo femenino. Esta diferencia se pone de manifiesto en el fenotipo sexual de los tipos cromosómicos anormales XXY y XO, como se muestra en el Cuadro 2-3. Sin embargo, pospondremos una discusión a fondo sobre este tema hasta el Capítulo 23.

Las plantas vasculares presentan varios tipos distintos de determinación del fenotipo sexual. Las especies **dioicas** muestran dimorfismo sexual semejante al de los animales, con plantas femeninas con flores que sólo contienen ovarios y plantas masculinas con flores que sólo contienen anteras (Fig. 2-12). Algunas plantas dioicas, pero no todas, presentan una pareja de cromosomas no idénticos asociados con el sexo (y que probablemente lo determinan). De las especies con cromosomas sexuales no idénticos, una gran proporción presenta el sistema XY. Por ejemplo, la planta dioica *Melandrium album* tiene 22 cromosomas por célula: 20 autosomas más 2 cromosomas sexuales, con hembras

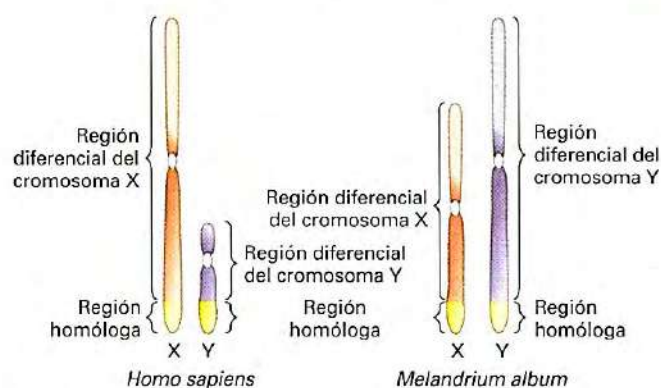


Figura 2-13. Regiones diferenciales y de emparejamiento de los cromosomas sexuales humanos y de la planta *Melandrium album*. Las regiones se localizaron observando por dónde emparejan los cromosomas durante la meiosis y por dónde no lo hacen.

XX y machos XY. Otras plantas dioicas no tienen parejas de cromosomas visiblemente diferentes; puede que tengan cromosomas sexuales, pero éstos no son distinguibles visualmente.

Los citogenetistas han dividido los cromosomas X e Y de algunas especies en regiones homólogas y no homólogas. Estas últimas se denominan regiones *diferenciales* (Fig. 2-13). Los genes de las regiones diferenciales no tienen contrapartida en el otro cromosoma sexual. En los machos, los genes de las regiones diferenciales son **hemicigóticos** («medio-cigóticos»). Los genes de la región diferencial del cromosoma X muestran un patrón de herencia denominado **ligamiento al X**; los de la región diferencial del cromosoma Y muestran **ligamiento al Y**. Los genes de la región homóloga muestran lo que podríamos llamar **ligamiento al X y al Y**. En general, se dice que los genes de los cromosomas sexuales están **ligados al sexo**.

Los genes de las regiones diferenciales de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia relacionados con el sexo. Los patrones de herencia de los genes de los autosomas dan lugar a descendientes masculinos y femeninos con las mismas proporciones fenotípicas, como está tipificado en los datos de Mendel (por ejemplo, ambos sexos presentarían una propor-



Figura 2-14. Una mosca *Drosophila melanogaster* de ojos rojos y otra de ojos blancos. (Carolina Biological Supply.)

ción 3:1). Sin embargo, los cruzamientos en los que se analiza la herencia de genes ligados al sexo muestran a menudo descendientes masculinos y femeninos con diferentes proporciones fenotípicas. De hecho, para genes de localización cromosómica desconocida, este patrón constituye una prueba diagnóstica experimental de que los genes en estudio están en los cromosomas sexuales. Tomemos *Drosophila* como ejemplo. En la estirpe silvestre, el color normal de los ojos es el rojo, pero se dispone de líneas puras de ojos blancos (Fig. 2-14). Esta diferencia fenotípica está determinada por dos alelos de un gen situado en la región diferencial del cromosoma X. Cuando se cruzan machos de ojos blancos con hembras de ojos rojos, toda la descendencia de la F_1 presenta ojos rojos, lo que demuestra que el alelo que determina el color blanco es recesivo. El cruzamiento de machos y hem-

bras de la F_1 de ojos rojos da lugar a una proporción 3:1 de ojos rojos y blancos en la F_2 , pero todas las moscas de ojos blancos son machos. Este patrón de herencia se explica porque los alelos están localizados en la región diferencial del cromosoma X, es decir, por ligamiento al X. Los genotipos se muestran en la Figura 2-15. El cruzamiento recíproco produce resultados diferentes. Un cruzamiento recíproco entre hembras de ojos blancos y machos de ojos rojos da lugar a una F_1 en la cual todas las hembras tienen ojos rojos y todos los machos tienen ojos blancos. La mitad de la F_2 está formada por moscas de ojos rojos y la otra mitad por moscas de ojos blancos, en ambos sexos. Por tanto, en el ligamiento al sexo, no sólo encontramos ejemplos de proporciones fenotípicas diferentes en los distintos sexos, sino también de diferencias entre los resultados de los cruzamientos recíprocos.

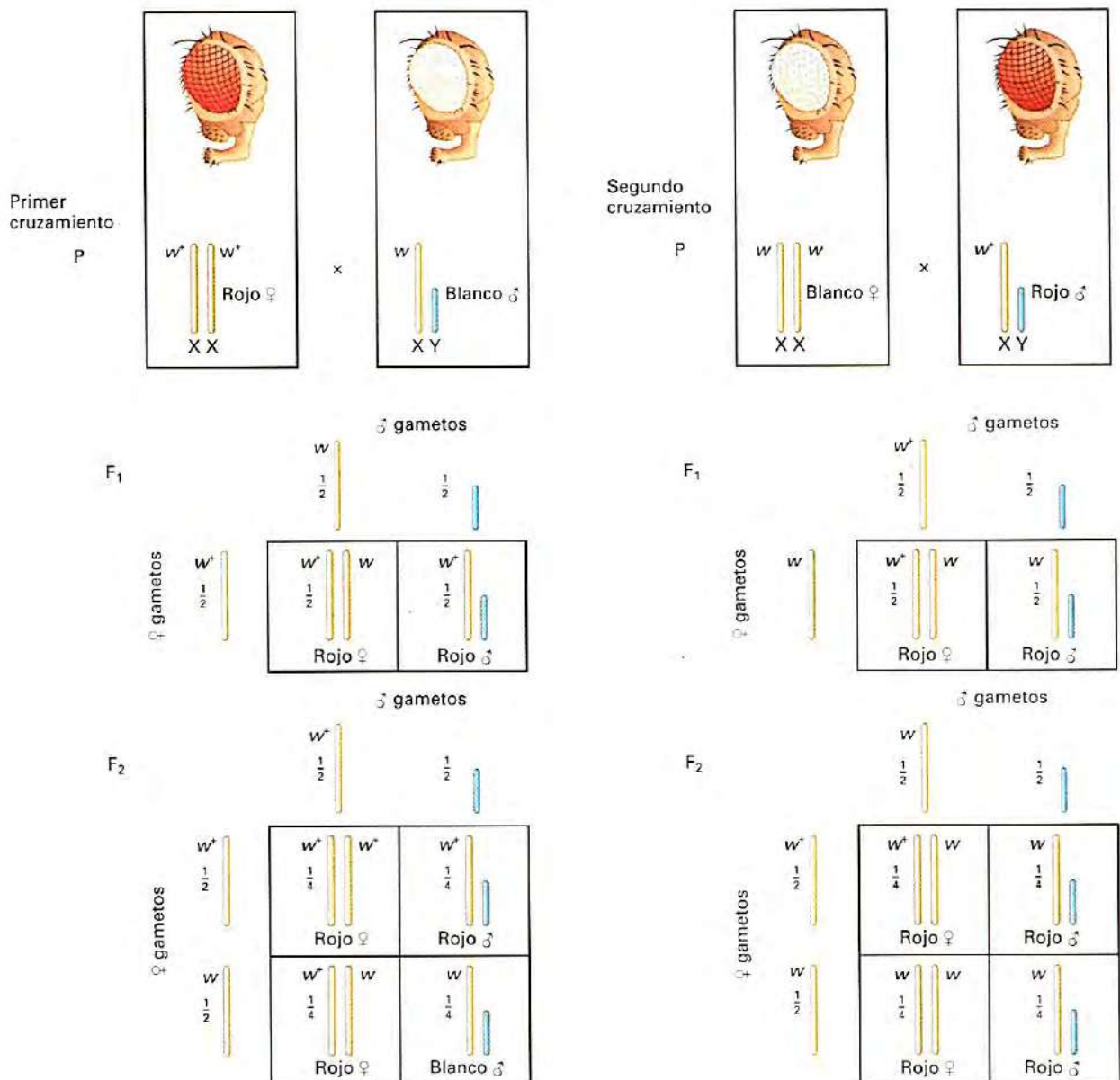


Figura 2-15. Explicación de los diferentes resultados que se obtienen en cruzamientos recíprocos entre ejemplares de *Drosophila* de ojos rojos (en la figura, «rojo») y de ojos blancos (en la figura, «blanco»). (En *Drosophila*, así como en otros sistemas experimentales, se utiliza el signo + en superíndice para denotar al alelo normal o silvestre. En este caso, w^+ = rojo y w = blanco.)

En *Drosophila*, el color de los ojos no tiene nada que ver con la determinación del sexo, con lo que vemos que los genes de los cromosomas sexuales no están necesariamente relacionados con la función sexual. Lo mismo ocurre en humanos, en donde los análisis de genealogías revelan la existencia de muchos genes ligados al sexo, de los cuales pocos tienen que ver con la función sexual.

COROLARIO

La herencia ligada al sexo muestra, de forma regular, diferentes proporciones fenotípicas en los dos sexos de la descendencia, así como diferentes proporciones en los cruzamientos recíprocos.

Genética humana

Los apareamientos humanos, como los de los organismos experimentales, muestran patrones de herencia del tipo descubierto por Mendel (herencia autosómica) y patrones de ligamiento al sexo. Como no se pueden realizar cruzamientos controlados en la especie humana, los genetistas deben recurrir al escrutinio de archivos familiares, con la esperanza de que se hayan producido cruzamientos informativos por azar. El escrutinio de archivos familiares se denomina **análisis de pedigrís o análisis de genealogías**. Un miembro de una familia que atrae la atención del genetista se llama **propositus**. Normalmente, el fenotipo del **propositus** es raro en algún aspecto (por ejemplo, el **propositus** puede ser enano). El investigador sigue entonces el rastro del fenotipo en la historia familiar y dibuja un árbol genealógico, o **pedigrí**, empleando para ello los símbolos normalizados que se indican en la Figura 2-16.

Muchos pares de fenotipos humanos opuestos están determinados por parejas de alelos. Los patrones de herencia en los análisis de pedigrís pueden revelar dicha determinación alélica, pero las pistas que aporta el pedigrí han de ser interpretadas de modo diferente, dependiendo de si uno de los fenotipos opuestos es una enfermedad rara o si ambos fenotipos de un par son formas comunes (morfos) de un polimorfismo. Las enfermedades hereditarias raras (poco frecuentes) son competencia de la Genética médica.

Genética médica

En el estudio de enfermedades poco comunes, pueden detectarse cuatro patrones generales de herencia por análisis de pedigrís: autosómicas recesivas, autosómicas dominantes, recesivas ligadas al cromosoma X y dominantes ligadas al cromosoma X.

Enfermedades autosómicas recesivas. El fenotipo afectado de una enfermedad autosómica recesiva está determinado por un alelo recesivo, y el fenotipo no afectado está determinado por el correspondiente alelo dominante. Por ejemplo, la enfermedad humana fenilcetonuria (PKU) se hereda de forma mendeliana simple como un fenotipo recesivo, donde la PKU está determinada por el alelo *p* y la condición normal por *P*. Así, las personas que sufren la enfermedad serán de genotipo *p/p* y los no afectados, *P/P* o *P/p*. ¿Qué características de un pedigrí nos revelarían este tipo de herencia? Dos pistas clave son (1) que la enfermedad aparece generalmente entre la descendencia de padres no afectados, y (2) que los individuos afectados son indistintamente varones y mujeres. Cuando sabemos que las proporciones fenotípi-

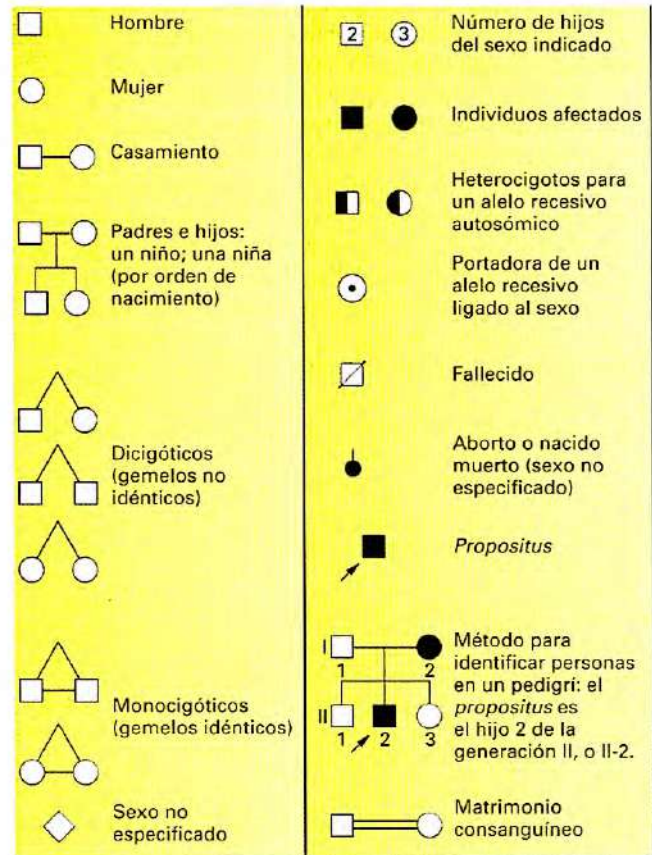
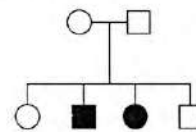
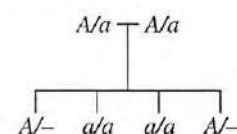


Figura 2-16. Símbolos que se utilizan en el análisis de pedigrís humanos (Según W. F. Bodmer y L.L. Cavalli-Sforza, *Genetics, Evolution and Man*. Copyright © 1976 W. H. Freeman and Company.)

cas en varones y en mujeres son las mismas, podemos asumir que se trata de herencia mendeliana simple y no de herencia ligada al sexo. El siguiente pedigrí típico ilustra el aspecto clave de la aparición de hijos afectados de padres sanos.



A partir de este árbol genealógico podemos deducir de forma inmediata que se trata de herencia mendeliana simple, siendo el alelo recesivo el responsable del fenotipo anormal (indicado con símbolos negros). Además, podemos deducir que ambos parentales son heterocigóticos, es decir, *A/a*; ambos deben llevar un alelo *a*, ya que cada uno de ellos ha transmitido este alelo a cada hijo enfermo, y deben llevar un alelo *A* porque ambos son fenotípicamente normales. Podemos asignar a los hijos (en el orden de la figura) los genotipos *A/-*, *a/a*, *a/a* y *A/-*. Así pues, el pedigrí puede representarse como:



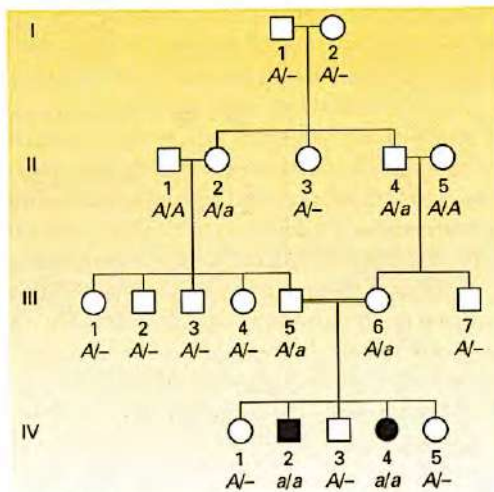


Figura 2-17. Pedigrí de un fenotipo recesivo poco común determinado por el alelo recesivo a . Normalmente, los pedigrís no incluyen los símbolos génicos, pero en este caso se han incluido los genotipos como referencia. Obsérvese que los individuos II-1 y II-5 se introducen en la familia desde fuera; se supone que son normales porque la condición hereditaria que se analiza es muy poco frecuente. Obsérvese también que no es posible estar seguro del genotipo de algunos individuos de fenotipo normal; tales individuos se indican como $A/-$.

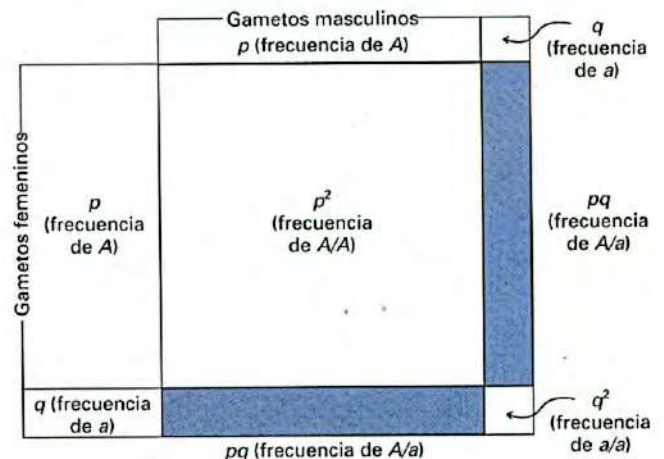
Observe que este pedigrí no apoya la hipótesis de herencia recesiva ligada al cromosoma X, porque según esa hipótesis, una hija afectada debe tener una madre heterocigota (lo cual es posible) y un padre hemicigoto, lo que es claramente imposible, porque habría expresado el fenotipo de la enfermedad.

Observe otro aspecto interesante del análisis de pedigrís: aunque operen las reglas mendelianas, rara vez se observan en una familia las proporciones de Mendel, dado el escaso tamaño de la muestra. En el ejemplo anterior, observamos una proporción fenotípica 1:1 en la descendencia de un cruzamiento monohíbrido. Si la pareja hubiera tenido, por ejemplo, 20 hijos, la proporción habría sido algo parecido a 15 hijos sanos y 5 con PKU (una proporción 3:1), pero cualquier proporción es posible en una muestra de tan sólo cuatro hijos y, en general, puede encontrarse cualquier proporción.

Los pedigrís de enfermedades autosómicas recesivas aparecen con muchos símbolos claros y pocos símbolos negros. Una enfermedad recesiva aparece en grupos de hermanos, en tanto que los miembros de generaciones anteriores y posteriores no suelen estar afectados. Para entender por qué esto es así, es importante comprender ciertos aspectos de la estructura genética de las poblaciones en las que aparecen estas enfermedades poco comunes. Por definición, si la enfermedad es poco común, la mayor parte de las personas no son portadoras del alelo anormal. Además, la mayoría de las personas que sí llevan el alelo anormal son heterocigotas, más que homocigotas. La razón básica de que los heterocigotos sean más frecuentes que los homocigotos recesivos es que, para ser un homocigoto recesivo, ambos padres deben llevar el alelo a , pero para ser un heterocigoto, sólo uno de los padres debe llevar un alelo a .

Los genetistas cuentan con un sistema cuantitativo que les permite relacionar la rareza de un alelo recesivo con la alta o

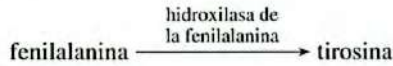
baja frecuencia de heterocigotos u homocigotos en la población. Para ello, se obtienen las frecuencias relativas de los genotipos en una población suponiendo que ésta se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, que será tratado en detalle en el Capítulo 24. De acuerdo con esta suposición simplificada, si las proporciones relativas de dos alelos A y a en una población son p y q , respectivamente, entonces las frecuencias de los tres posibles genotipos vienen determinadas por p^2 para A/A , $2pq$ para A/a y q^2 para a/a . Utilicemos un ejemplo numérico para ilustrar este concepto. Si suponemos que la frecuencia de un alelo recesivo q causante de una enfermedad es $1/50$, entonces p es $49/50$, la frecuencia de homocigotos con la enfermedad es $q^2 = (1/50)^2 = 1/2500$ y la frecuencia de heterocigotos es $2pq = 2 \times 49/50 \times 1/50$, aproximadamente $1/25$. Así, en este ejemplo vemos que los heterocigotos son aproximadamente 100 veces más frecuentes que los que sufren la enfermedad y esta relación aumenta cuanto más raro sea el alelo recesivo. La relación entre heterocigotos y homocigotos recesivos para un alelo poco común se muestra en el siguiente esquema. Observe que las frecuencias alélicas p y q pueden usarse como las frecuencias gaméticas en ambos sexos.



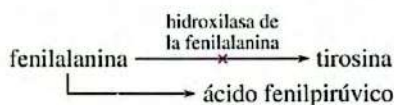
La aparición de un individuo afectado depende generalmente de la unión al azar de heterocigotos no emparentados. La consanguinidad (matrimonios entre parientes) incrementa la probabilidad de que el matrimonio sea entre dos heterocigotos. En la Figura 2-17 se muestra el caso de un matrimonio entre primos. Los individuos III-5 y III-6 son primos hermanos y tienen dos hijos homocigotos para el alelo poco frecuente. En la figura puede observarse que un ancestro heterocigoto puede dar lugar a muchos descendientes también heterocigoto. Así, dos primos pueden llevar el mismo alelo recesivo raro heredado de un antecesor común. Para que dos personas no emparentadas sean heterocigotas, deben haber heredado el alelo recesivo de ambas familias. Los matrimonios entre parientes acarrean pues un riesgo mucho mayor de producir fenotipos anormales por homocigosis de alelos recesivos que los matrimonios entre personas no emparentadas. Por esta razón, los matrimonios entre primos hermanos dan cuenta de una gran proporción de enfermedades recesivas en las poblaciones humanas.

¿Qué ejemplos hay de enfermedades humanas recesivas? La PKU ha servido anteriormente como ejemplo de análisis de pedigrís, pero ¿en qué consiste dicho fenotipo? La PKU es una enfer-

medad relacionada con el procesamiento del aminoácido fenilalanina, un componente de todas las proteínas que ingerimos como parte de nuestra dieta. La fenilalanina se convierte normalmente en tirosina por la acción de la enzima hidroxilasa de la fenilalanina:



Sin embargo, si una mutación en el gen responsable de esta enzima altera su secuencia de aminoácidos cerca del centro activo, la enzima no puede unir ni transformar la fenilalanina (su sustrato). Por ello, la fenilalanina se acumula en el cuerpo y es convertida a su vez en ácido fenilpirúvico, un compuesto que interfiere con el desarrollo del sistema nervioso, lo que conduce a un retraso mental.



Actualmente, los recién nacidos son examinados de forma rutinaria para detectar este fallo metabólico. Si se detecta el defecto, se disminuye la cantidad de fenilalanina consumida mediante una dieta especial, pudiendo detenerse el desarrollo de la enfermedad.

La fibrosis quística es otro ejemplo de enfermedad heredada según las reglas mendelianas como un fenotipo recesivo. El alelo que causa la enfermedad se aisló en 1989, pudiéndose determinar su secuencia de nucleótidos. Ello ha permitido entender la función del gen en personas afectadas y no afectadas, y abre la esperanza a un tratamiento más efectivo. La fibrosis quística es una enfermedad cuyo síntoma más importante es la secreción de

una gran cantidad de mucosidad en los pulmones, lo que provoca la muerte por varias causas, aunque normalmente ésta se precipita por infección de las vías respiratorias superiores. La mucosidad puede extraerse por medio de agitadores mecánicos, y la infección pulmonar puede evitarse mediante el uso de antibióticos; por tanto, tratándose adecuadamente, los pacientes con fibrosis quística pueden vivir hasta la edad adulta. La fibrosis quística está causada por un defecto en una proteína que transporta iones cloruro a través de la membrana celular. La alteración del equilibrio salino resultante cambia la constitución de la mucosidad pulmonar.

El albinismo, que sirvió como modelo de la determinación alélica de fenotipos opuestos en el Capítulo 1, también se hereda de forma autosómica recesiva. La naturaleza molecular de un alelo causante de albinismo se esquematiza en la Figura 2-18. Este esquema muestra la herencia autosómica recesiva en un pedigrí, así como la naturaleza molecular de los alelos implicados. En este ejemplo, el alelo recesivo *a* está causado por un cambio en un par de bases que introduce un codón sin sentido (fin de traducción) en medio del gen, lo que da lugar a un polipéptido truncado. Por casualidad, la mutación también introduce una nueva diana para una enzima de restricción. Así, una sonda específica del gen detecta dos fragmentos en el caso de *a* y un solo fragmento en *A*. (Otros tipos de mutaciones producirían otros efectos al nivel detectado por los análisis Southern, Northern y Western).

En todos los ejemplos citados hasta el momento, la enfermedad está causada por un alelo que da lugar a una proteína deficiente. En los heterocigotos, el único alelo funcional aporta una cantidad de proteína activa que resulta suficiente para las funciones celulares. Esta situación se conoce como haplosuficiencia.

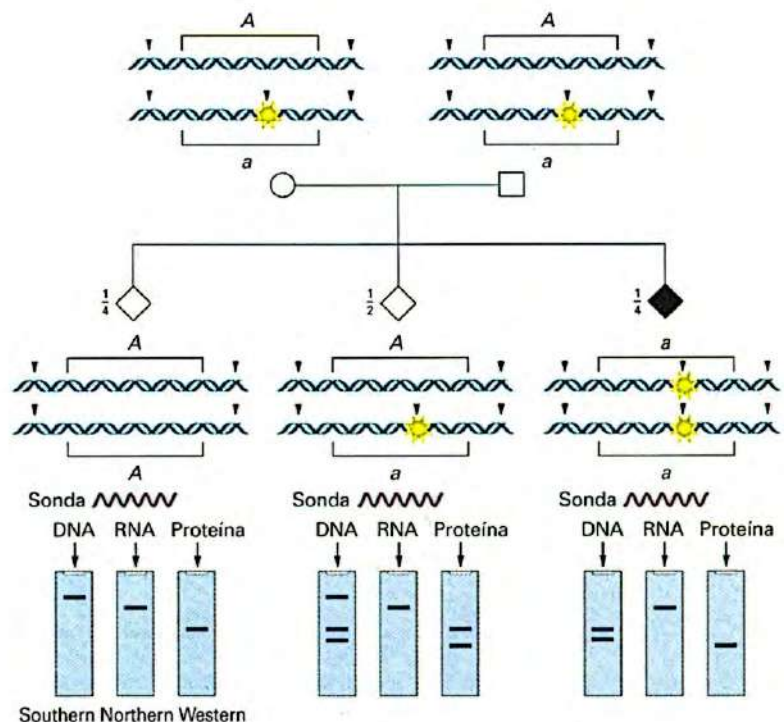


Figura 2-18. Base molecular de la herencia mendeliana en un pedigrí.

▼ Sitio de corte de una enzima de restricción ☀ Mutación sin sentido que genera una proteína pequeña



Figura 2-19. El fenotipo humano pseudoacondroplasia, ilustrado por una familia de cinco hermanas y dos hermanos. El fenotipo está determinado por un alelo dominante, que llamamos D , que entorpece el crecimiento óseo durante el desarrollo. La mayor parte de los miembros de la población humana pueden representarse como d/d con respecto a este gen. Esta fotografía fue tomada a la llegada de la familia a Israel tras el final de la Segunda Guerra Mundial (UPI/Bettmann News Photos.)

COROLARIO

En los pedigrís, las enfermedades autosómicas recesivas se distinguen por la aparición del fenotipo en la descendencia masculina y femenina de individuos no afectados.

Enfermedades autosómicas dominantes. En las enfermedades autosómicas dominantes, el alelo normal es el recesivo y el anormal es el dominante. Podría parecer paradójico que una enfermedad poco frecuente pueda ser dominante, pero recuerde que dominancia y recesividad son simplemente un reflejo de cómo actúan los alelos, y que no se definen en función de su abundancia en la población. Un buen ejemplo de enfermedad dominante poco frecuente con herencia mendeliana es la pseudoacondroplasia, un tipo de enanismo (Fig. 2-19). En este caso, las

personas de estatura normal son genotípicamente d/d y el fenotipo enano puede ser, en principio, D/d o D/D . Sin embargo, se piensa que en los individuos D/D las dos «dosis» del alelo D podrían producir un efecto tan grave que este genotipo es letal. Si ello es cierto, todos los acondroplásicos son heterocigotos.

Al estudiar un pedigrí, las pistas más importantes para identificar una enfermedad dominante con herencia mendeliana son que el fenotipo enfermo tiende a aparecer en cada generación del pedigrí y que los padres y madres afectados transmiten el fenotipo tanto a los hijos como a las hijas. De nuevo, la presencia de ambos sexos entre los descendientes afectados descarta el modo de herencia ligado al sexo. La enfermedad aparece en cada generación porque, normalmente, el alelo anormal presente en un in-

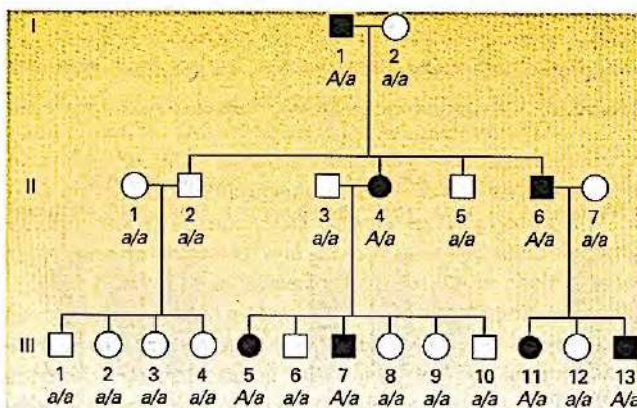


Figura 2-20. Pedigrí de un fenotipo dominante determinado por un alelo dominante A . En este pedigrí se han deducido todos los genotipos.

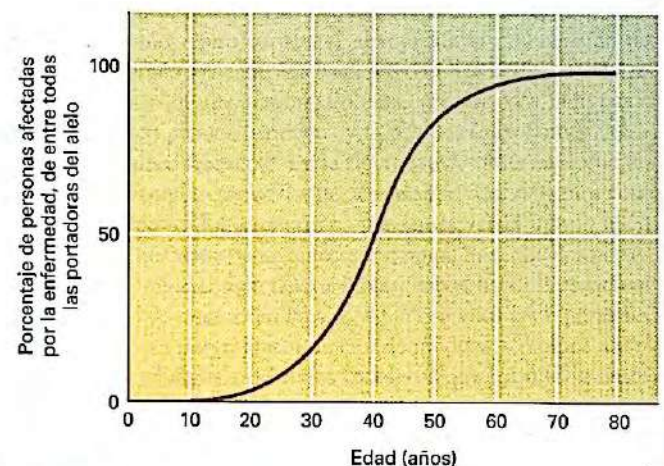


Figura 2-21. Edad de aparición de la enfermedad de Huntington. La gráfica muestra que las personas portadoras del alelo no muestran generalmente los síntomas de la enfermedad hasta que han superado la edad de tener hijos.

dividuo debe proceder de un ancestro de la generación anterior. Los alelos anormales también pueden surgir *de novo* por mutación. Esto es relativamente raro, pero tal posibilidad debe ser tenida en cuenta. Un pedigrí típico de una enfermedad dominante se muestra en la Figura 2-20. Advierta, una vez más, que las proporciones mendelianas no se observan necesariamente en las familias. Como ocurre con las enfermedades recesivas, los individuos poseedores de una copia del alelo raro (A/a) son mucho más frecuentes que los que poseen dos copias (A/A), de modo

que la mayoría de los afectados son heterocigotos, y prácticamente todos los emparejamientos en los que está implicada una enfermedad dominante son del tipo $A/a \times a/a$. Por tanto, cuando se computan globalmente los descendientes de muchos de estos matrimonios, se espera una proporción 1:1 entre individuos no afectados (a/a) y afectados (A/a).

La enfermedad de Huntington es un ejemplo de enfermedad heredada como un fenotipo dominante que está determinado por un alelo de un solo gen. El fenotipo consiste en una degenera-

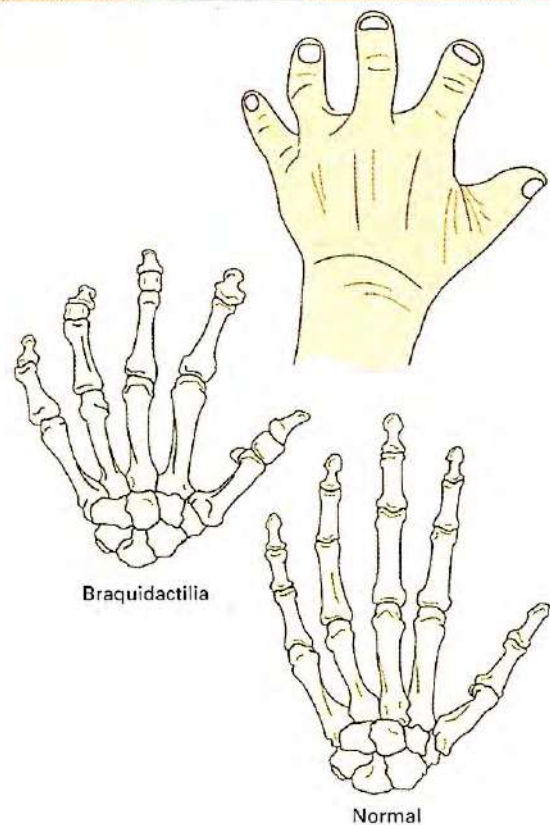
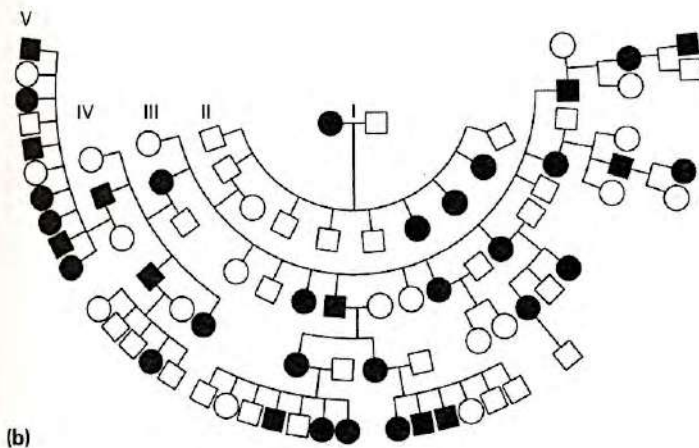
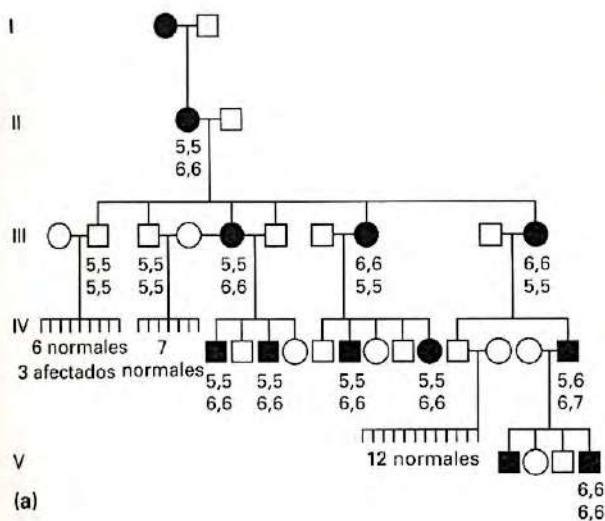
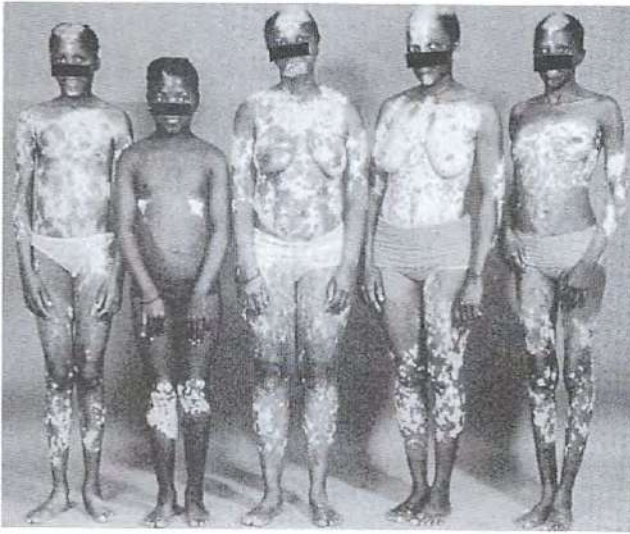
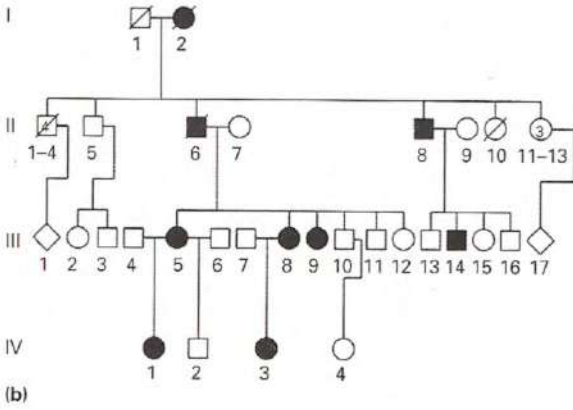


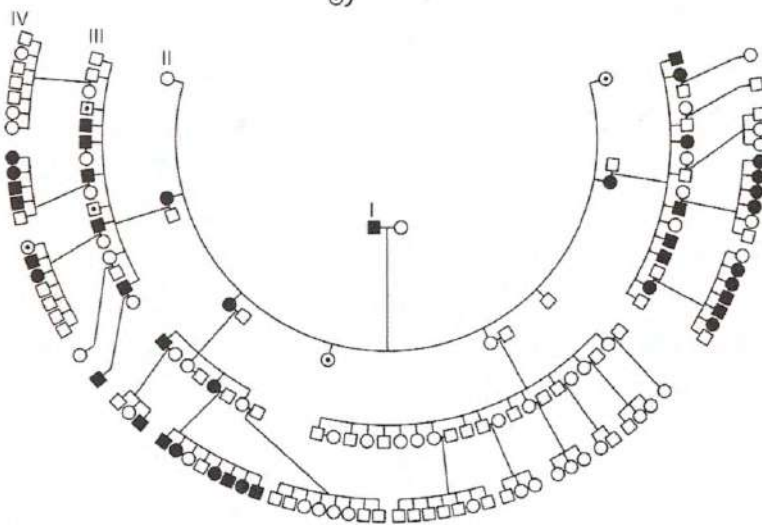
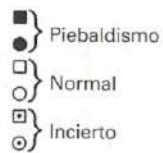
Figura 2-22. Algunos fenotipos raros de manos humanas. (a) (*derecha*) Polidactilia, fenotipo dominante caracterizado por la presencia de dedos extras en pies, manos o ambos, determinado por el alelo P . En el pedigrí que se acompaña (*izquierda*), se indica el número de dedos de las manos en la línea superior, y el de dedos de los pies en la línea inferior. (Obsérvese la variabilidad de la expresión del alelo P , tema que veremos en detalle en el Cap. 4.) (b) (*derecha*) Braquidactilia, fenotipo dominante de dedos cortos, determinado por el alelo B . Obsérvese los huesos terminales de los dedos de la mano, muy cortos en comparación con los dedos de una mano normal. El pedigrí de una familia con braquidactilia muestra un patrón de herencia típico de una enfermedad dominante poco frecuente. Todos los individuos afectados son B/b , y los no afectados son b/b . (Parte a, foto © Biophoto Associates/Science Source; parte b, basado en C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.^a ed., Copyright © 1973, W. H. Freeman and Company.)



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2-23. Piebaldismo, raro fenotipo humano dominante. Aunque el fenotipo se encuentra esporádicamente en todas las razas, sus detalles característicos se observan mejor en las personas de piel oscura. (a) Las fotografías muestran la vista de frente y de espalda de los individuos afectados IV-1, IV-3, III-5, III-8 y III-9 del pedigrí familiar que aparece en (b). Observe la variación de la expresión del gen del piebaldismo entre los miembros de la familia. (c) Un pedigrí más numeroso, de una familia noruega. Se cree que esta enfermedad se debe a un alelo dominante que interfiere con la migración de los melanocitos (las células productoras de melanina) desde la superficie dorsal a la ventral, durante el desarrollo. Particularmente característica es la mancha blanca en la frente, a menudo acompañada de un mechón de cabello blanco. La misma condición básica se conoce en ratones (d), en los que, de nuevo, los melanocitos dejan de cubrir la parte superior de la cabeza y la superficie ventral.

El piebaldismo no es una forma de albinismo; las células de las manchas blancas poseen el potencial genético para fabricar melanina, pero como no son melanocitos, no están programadas para hacerlo. En el albinismo verdadero, las células carecen del potencial para fabricar melanina. (El DNA del alelo del piebaldismo ha sido identificado recientemente como un alelo del gen *c-kit*, un tipo de gen conocido como protooncogén.) (Partes a y b de I. Winship, K. Young, R. Martell, R. Ramesar, D. Curtis y P. Beighton, «Piebaldism: An Autonomous Autosomal Dominant Entity», *Clinical Genetics*, 39, 1991, 330; parte c de C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.^a ed., Copyright © 1973, W. H. Freeman and Company; parte d de R. A. Fleischman, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas —véase también R. A. Fleischman, D. L. Saltman, V. Stastny y S. Zneimer, «Deletion of the *c-kit* Protooncogene in the Human Development Defect Piebald Trait», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1991, 10 885.)

ción neuronal que provoca convulsiones y muerte prematura. Sin embargo, es una enfermedad de manifestación tardía, no apareciendo generalmente los síntomas hasta después de que los individuos hayan comenzado a tener descendencia (Fig. 2-21). Cada hijo de un portador del alelo anormal tiene una probabilidad de un 50 % de heredar dicho alelo y la enfermedad asociada al mismo. Esta trágica situación ha llevado a realizar grandes esfuerzos para identificar a las personas portadoras del alelo anormal antes de que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad. La aplicación de técnicas moleculares ha dado como resultado un procedimiento de escrutinio muy prometedor.

Otras condiciones dominantes poco frecuentes son la polidactilia (mayor número de dedos) y la braquidactilia (dedos cortos), mostradas en la Figura 2-22, y un fenotipo de piel moteada, mostrado en la Figura 2-23, conocido como piebaldismo.

COROLARIO

En los pedigríes de enfermedades autosómicas dominantes mendelianas aparecen en cada generación tanto varones afectados como mujeres afectadas, ocurriendo también que varones y mujeres afectados transmiten la enfermedad en igual proporción a sus hijos e hijas.

Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X. Los fenotipos que muestran herencia recesiva ligada al X muestran típicamente los siguientes patrones en los pedigríes:

1. Muchos más varones que mujeres muestran el fenotipo a analizar. Ello se debe a que una mujer sólo puede estar afectada si tanto su padre como su madre son portadores del alelo (por ejemplo, $X^A/X^a \times X^a/Y$) mientras que para que un varón presente el fenotipo sólo es necesario que la madre sea portadora del alelo correspondiente. Si el alelo recesivo es muy poco frecuente, casi todos los individuos que presentan el fenotipo serán varones.
2. Ningún descendiente de un varón afectado estará afectado, pero todas sus hijas resultan ser «portadoras» del alelo recesivo que queda enmascarado por su condición heterocigótica. La mitad de los hijos varones de estas portadoras estarán afectados (Fig. 2-24). Observe que en fenotipos frecuentes ligados al cromosoma X, este patrón quedará oscurecido por el hecho de que el alelo recesivo puede heredarse tanto de

una madre heterocigota como del padre.

3. Ninguno de los hijos de un varón afectado mostrará el fenotipo en estudio, ni transmitirá el fenotipo a su descendencia. La razón de esta ausencia de transmisión varón-varón es que un hijo varón obtiene su cromosoma Y del padre, por lo que normalmente no heredará también el cromosoma X de éste.

En el análisis de pedigríes de alelos poco frecuentes ligados al cromosoma X, se supone que una mujer normal de genotipo desconocido es homocigota a menos que haya pruebas en contra de ello.

Quizás el ejemplo más conocido de herencia recesiva ligada al cromosoma X sea el de la ceguera a los colores verde y rojo. Las personas con esta enfermedad son incapaces de distinguir el rojo y el verde, y ven ambos colores como uno solo. Los genes para la visión del color han sido caracterizados a nivel molecular. La visión del color se basa en la presencia en la retina de tres tipos diferentes de células llamadas conos, cada uno de los cuales es sensible a luz de longitudes de onda del color rojo, del verde o del azul. Los determinantes genéticos de los conos sensibles al rojo y al verde están en el cromosoma X. Como ocurre con otros fenotipos recesivos ligados al cromosoma X, hay muchos más varones que mujeres con este fenotipo.

Otro ejemplo que nos resulta familiar es el de la *hemofilia*, un fallo en la coagulación de la sangre. Para que la sangre coagule,

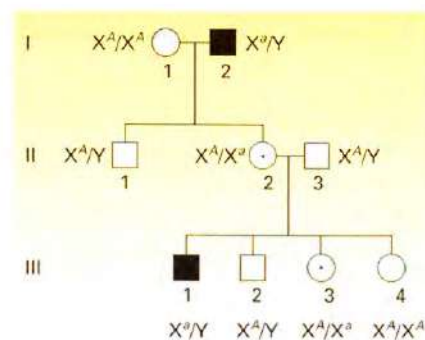
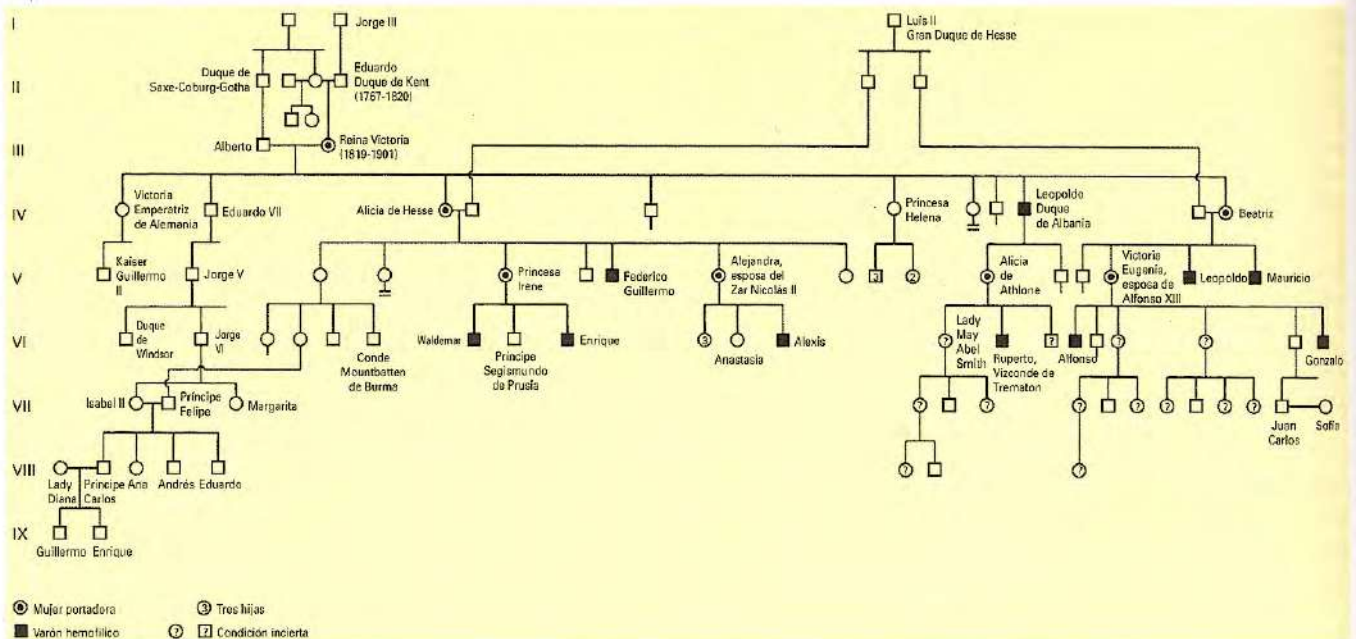


Figura 2-24. Pedigrí que ilustra cómo los alelos recesivos ligados al X se manifiestan en los varones y son portados por sus hijas en la siguiente generación sin que se exprese en ellas, para expresarse de nuevo en sus hijos varones. Observe que III-3 y III-4 no se distinguen fenotípicamente.



(a)



(b)

Figura 2-25. Transmisión de la hemofilia, una condición recesiva ligada al cromosoma X, en varias familias reales europeas. Un alelo recesivo causante de la hemofilia (fallo en la coagulación de la sangre) apareció en las células reproductoras de la Reina Victoria, o uno de sus padres, por mutación. Este alelo se extendió a otras familias reales por matrimonios entre ellos. (a) Este pedigrí parcial muestra varones afectados y mujeres portadoras (heterocigotas). Para mayor claridad, se han omitido la mayoría de los familiares que entraron en el pedigrí por casamiento. ¿Puede predecir la probabilidad de que el alelo recesivo siga presente en algún miembro de la familia real británica? (b) El cuadro muestra a la Reina Victoria rodeada por sus numerosos descendientes. (Parte a, según C. Stern, *Principles of Human Genetics*, 3.ª ed. Copyright © 1973 W.H. Freeman and Company; parte b, Royal Collection, St. James's Palace. Copyright Her Majesty Queen Elizabeth II.)

muchas proteínas deben interactuar de una forma secuencial. El tipo más frecuente de hemofilia se debe a la ausencia o mal funcionamiento de una de estas proteínas, denominada *Factor VIII*. Los casos más conocidos de hemofilia se encuentran en el pedigrí de varias familias reales europeas emparentadas (Fig. 2-25).

El alelo original de la hemofilia de este pedigrí apareció espontáneamente (por mutación) en las células reproductoras de los padres de la Reina Victoria o bien en ella misma. Alexis, hijo del último zar de Rusia, heredó el alelo de la Reina Victoria, que era abuela de su madre, Alejandra. Hoy día, la hemofilia puede ser

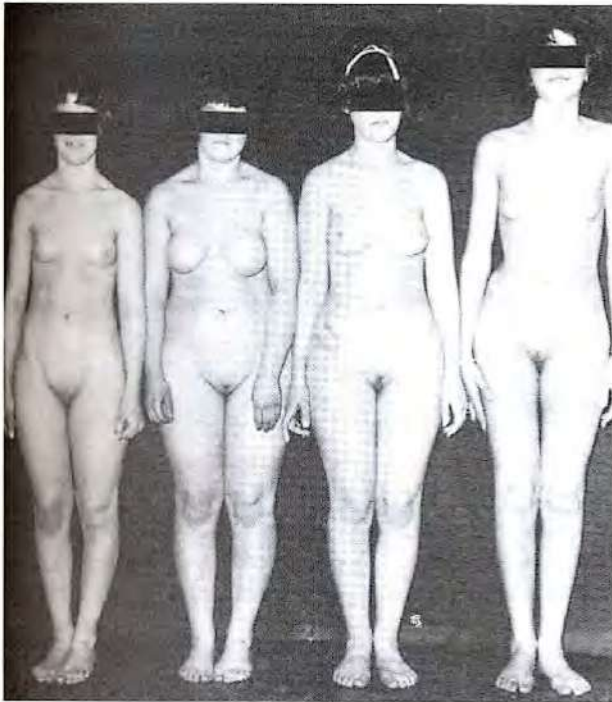


Figura 2-26. Cuatro hermanos con síndrome de feminización testicular (insensibilidad congénita a los andrógenos). Los cuatro individuos de la fotografía tienen 44 autosomas más un cromosoma X y otro Y, pero todos han heredado el alelo recesivo ligado al X que confiere insensibilidad a los andrógenos (hormonas masculinas). Una de sus hermanas (no mostrada) era portadora XX y tuvo un hijo que también desarrolló el síndrome de feminización testicular. (Leonard Pinsky, McGill University.)

tratada médicamente, pero hubo un tiempo en que era potencialmente mortal. Es interesante hacer notar que en el Talmud judío se dictan reglas para admitir excepciones a la norma obligatoria de circuncidar a los varones, reglas que muestran claramente que la forma de transmisión de la enfermedad a través de mujeres portadoras no afectadas era bien conocida en la antigüedad. Por ejemplo, un varón recién nacido quedaba exento de la circuncisión si los hijos de alguna hermana de su madre habían sangrado profusamente durante la circuncisión.

La *distrofia muscular de Duchenne* es una enfermedad mortal, ligada al X y recesiva. El fenotipo consiste en debilitamiento y atrofia de los músculos. Generalmente, la enfermedad comienza a manifestarse antes de los seis años, obliga al uso de silla de ruedas a los doce y suele provocar la muerte a los veinte. El gen responsable de la distrofia muscular de Duchenne ha sido ya

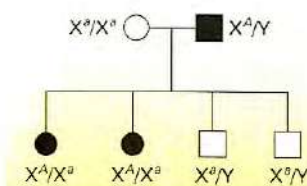


Figura 2-27. Pedigrí que muestra que todas las hijas de un varón que expresa un fenotipo dominante ligado al X también presentarán el fenotipo.

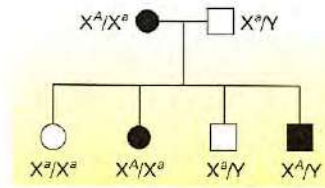


Figura 2-28. Pedigrí que muestra que todas las hembras afectadas por una condición dominante ligada al X son normalmente heterocigotas, que transmitirán la condición a la mitad de sus hijos y sus hijas.

aislado y se sabe que determina una proteína muscular, la distrofina. Este descubrimiento abre nuevas esperanzas para un mayor entendimiento de la fisiología de esta enfermedad y, en última instancia, para su tratamiento.

Un fenotipo recesivo y ligado al X, poco frecuente, y que resulta interesante desde el punto de vista de la determinación del sexo es el conocido como *síndrome de feminización testicular*, cuya frecuencia es de alrededor de 1 de cada 65 000 varones. Las personas que sufren de este síndrome son cromosómicamente varones, con 44 autosomas más un X y un Y, pero se desarrollan como mujeres (Fig. 2-26). Presentan genitales externos femeninos, una vagina ciega y carecen de útero. Pueden aparecer testículos, situados en los labios de los genitales o en el abdomen. Aunque muchas de estas personas están felizmente casadas, son por supuesto estériles. Este síndrome no revierte mediante tratamiento con hormonas masculinas (andrógenos) por lo que se la denomina en ocasiones *síndrome de insensibilidad a andrógenos*. La razón de esta insensibilidad es que el receptor de andrógenos no es funcional, de modo que la hormona masculina no puede tener efecto sobre los órganos diana implicados en la masculinidad. En la especie humana se genera feminidad cuando no funciona el sistema determinante de la masculinidad.

Enfermedades dominantes ligadas al cromosoma X. Éstas muestran las siguientes características:

1. Los varones afectados transmiten la condición a todas sus hijas y no lo hacen a ninguno de sus hijos varones (Fig. 2-27).
2. Las mujeres heterocigotas afectadas casadas con varones sanos transmiten el defecto a la mitad de sus hijos, tanto varones como hembras (Fig. 2-28).

En humanos se conocen pocos casos de fenotipos dominantes ligados al X. Uno de ellos es la *hipofosfatemia*, un tipo de raquitismo resistente al tratamiento con vitamina D.

Inactivación del cromosoma X

En un estado temprano del desarrollo de las hembras de mamífero, uno de los cromosomas X de cada célula es inactivado. El cromosoma X inactivado se condensa mucho y se hace visible como un cuerpo que se tiñe intensamente y que se conoce como el **corpúsculo de Barr** (Fig. 2-29). Sorprendentemente, el estado inactivo persiste a lo largo de todas las divisiones mitóticas subsiguientes que dan lugar al cuerpo adulto del animal. El proceso de inactivación ocurre al azar, afectando a cualquiera de los cromosomas X. Como consecuencia de esta inactivación, el cuer-

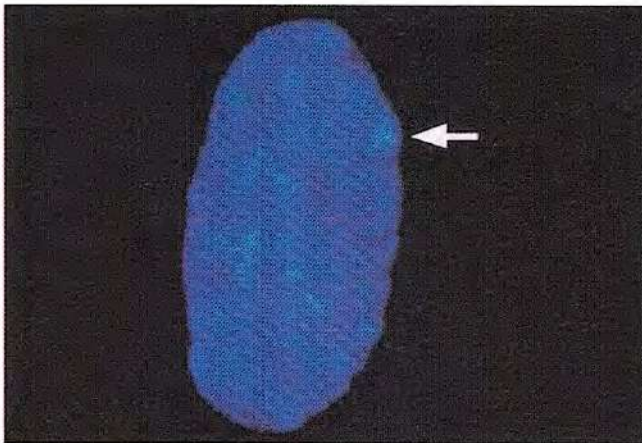


Figura 2-29. Un corpúsculo de Barr, cromosoma X condensado e inactivado, en el núcleo de una célula de una mujer normal. Los hombres no tienen corpúsculos de Barr. El número de estos corpúsculos que aparecen en una célula es siempre igual al número total de cromosomas X menos uno. (Karen Dyer Montgomery.)



Figura 2-31. Gata calicó. Tanto las gatas calicó como las gatas carey son heterocigotas para dos alelos, *O* (naranja) y *o* (negro), de un gen que controla el color del pelaje. Las manchas de color naranja y negro se deben a la inactivación del cromosoma X. Las manchas blancas se deben a un determinante genético distinto, presente en las gatas calicó, pero no en las gatas carey. (Anthony Griffiths.)

po adulto de la hembra es una mezcla, o **mosaico**, de células con cualquiera de los dos genotipos posibles respecto al cromosoma X (Fig. 2-30). Durante el crecimiento y el desarrollo de los tejidos, las células descendientes por mitosis de una célula progenitora permanecen a menudo cercanas unas a otras, de forma que si una

hembra es heterocigota para un gen que se expresa en dicho tejido y que está ligado al X, los dos alelos del heterocigoto se manifiestan en forma de sectores o parches. Un fenotipo en mosaico que nos resulta familiar es el patrón de pigmentación del pelaje de las gatas carey y calicó (Fig. 2-31). Se trata de hembras heteroci-

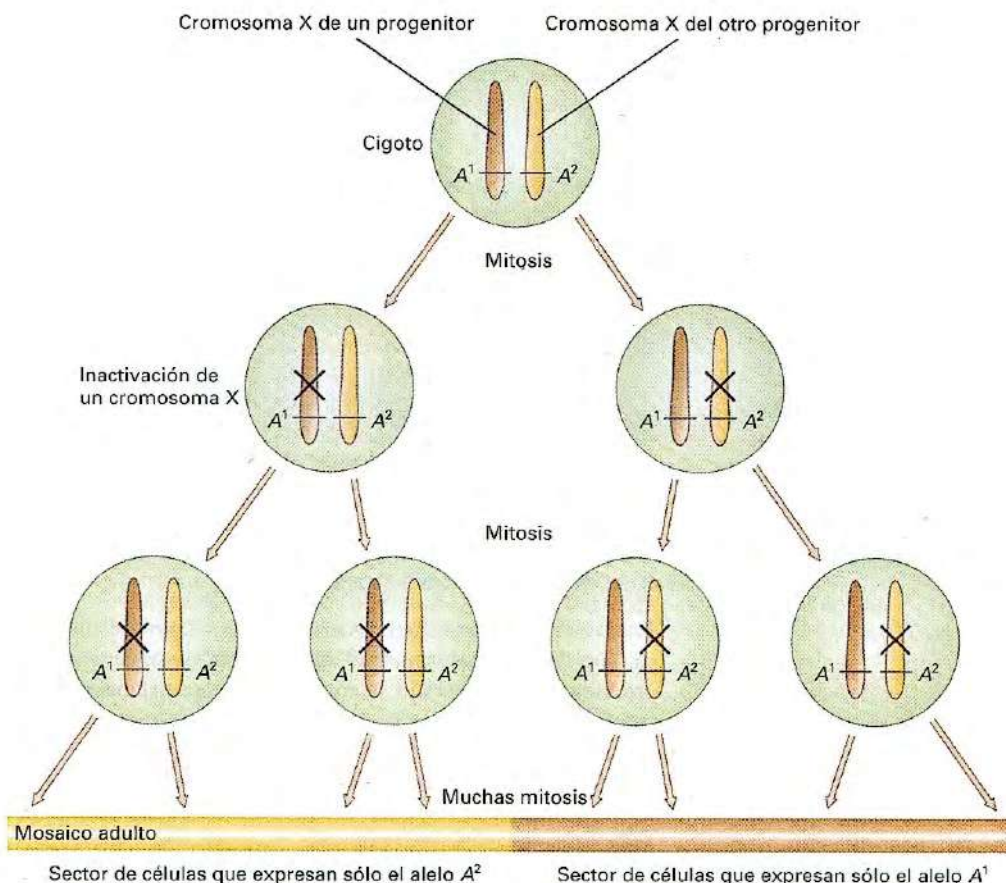
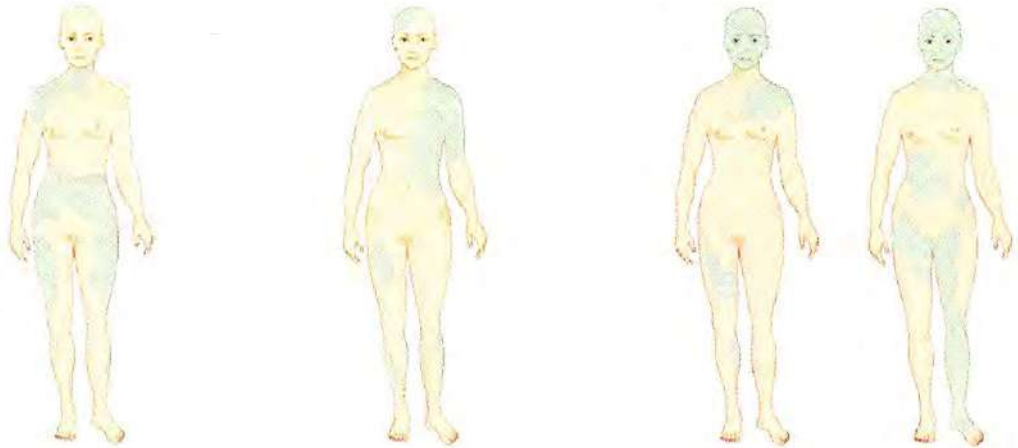


Figura 2-30. Inactivación del cromosoma X en los mamíferos. El cigoto de una hembra de mamífero heterocigota para un gen ligado al X da lugar a un adulto mosaico, compuesto por dos líneas celulares que expresan uno u otro de los alelos del gen heterocigota, porque uno u otro de los cromosomas X se inactiva en todas las líneas celulares. Para mayor claridad, la inactivación se muestra en el estado de dos células, pero puede tener lugar en otros estados del desarrollo, también de escaso número de células.

Figura 2-32. Mosaicismo somático en tres generaciones de mujeres heterocigotas para la displasia ectodérmica anhidrótica, síndrome ligado al sexo consistente en la ausencia de glándulas sudoríparas. Las zonas sin estas glándulas se muestran de color verde. La extensión y localización de los diferentes tejidos se debe al azar, pero todas las mujeres muestran el característico patrón de mosaico.



gotas para los alelos *O* (que determina pelaje de color naranja) y *o* (que determina pelaje de color negro). La inactivación del cromosoma portador de *O* produce un parche negro que expresa *o*, mientras que la inactivación del cromosoma portador de *o* produce un parche naranja que expresa el alelo *O*.

Aunque todas las mujeres tienen un cromosoma X inactivado en cada una de sus células, la inactivación sólo se manifiesta si la mujer es heterocigota para un gen ligado al X. Ello es particularmente notable si, como en las gatas carey, el fenotipo se manifiesta en la parte exterior del cuerpo. Tal es el caso de la enfermedad conocida como *displasia ectodérmica anhidrótica*. Los varones portadores del alelo responsable (llamémosle *d*) en estado hemicigótico carecen de glándulas sudoríparas. Una mujer heterocigota (*D/d*) es un mosaico de sectores *D* y *d* esparcidos por todo el cuerpo, como se muestra en la Figura 2-32.

Curiosamente, la hipótesis de que el gen que produce el síndrome de feminización testicular está localizado en el cromosoma X se confirmó cuando se demostró al microscopio que la mitad de los fibroblastos de mujeres heterocigóticas para el gen podían unir andrógenos, pero no la otra mitad. Es conveniente hacer notar que la inactivación del cromosoma X se suprime en el tejido germinal femenino, de manera que ambos cromosomas X se transmiten a los óvulos.

Herencia ligada al Y

Los genes de la región diferencial del cromosoma Y humano son heredados sólo por los varones, siendo transmitida la región de padres a hijos varones. El gen *TDF* desempeña un papel primordial en la determinación de la masculinidad, ya que es responsable de la síntesis del **factor determinante de los testículos**. El gen *TDF* ha sido localizado en la región diferencial del cromosoma Y (véase el Capítulo 23). Sin embargo, aparte de la propia masculinidad, no se ha demostrado rotundamente el ligamiento al Y de ningún fenotipo humano. Como posibilidad, se ha propuesto la presencia de pelos en el borde de la oreja (Fig. 2-33). Este fenotipo es extraordinariamente raro en las poblaciones de la mayoría de los países, pero es más frecuente en las poblaciones de la India. Un genetista indio, K. Dronamraju, estudió el fenotipo en su propia familia. Todos los varones de la familia descendientes de un mismo antepasado varón mostraban dicho carácter. En otras fa-

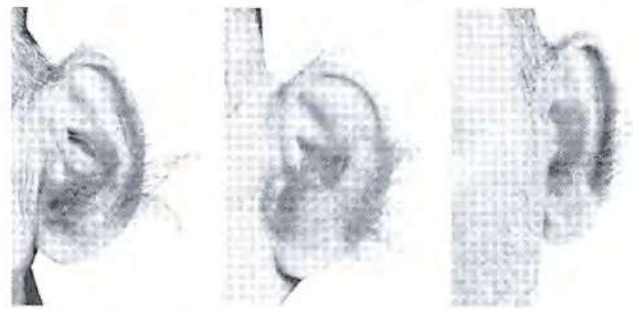


Figura 2-33. Borde de la oreja peludo. Se ha propuesto que este fenotipo puede deberse a un alelo de un gen ligado al Y. (Tomado de C. Stern, W. R. Centerwall y S. S. Sarkar, *The American Journal of Human Genetics*, 16, 1964, 467. Reproducido con permiso de Grune & Stratton, Inc.)

milias indias, sin embargo, los varones parecen transmitir el fenotipo sólo a algunos de sus hijos varones, lo cual ha hecho que las pruebas de ligamiento al Y no se consideren concluyentes.

Polimorfismos autosómicos humanos

En el Capítulo 1 se explicó que un polimorfismo es la coexistencia en una población de dos o varios fenotipos *comunes* de un carácter. Los fenotipos alternativos de un polimorfismo se heredan a menudo como alelos de un solo gen. En la especie humana hay muchos ejemplos. Considere, por ejemplo, los siguientes dimorfismos: ojos azules u ojos marrones, pelo oscuro o pelo rubio, presencia o ausencia de hoyuelos en la barbilla, presencia o ausencia del «pico de viuda» y lóbulos de la oreja separados o pegados a la mejilla.

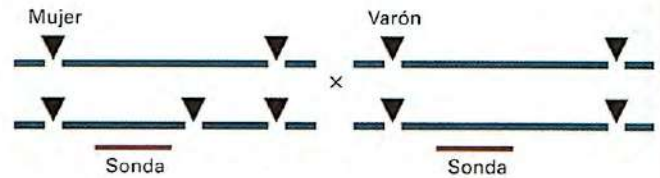
La interpretación de los pedigríes de dimorfismos es diferente de la realizada para el caso de las enfermedades raras porque, por definición, ambas formas de un dimorfismo son frecuentes. Analicemos un pedigrí de un dimorfismo humano interesante. La mayoría de las poblaciones humanas son dimórficas para la capacidad de percibir el sabor del compuesto feniltiocarbamida (PTC). Ello significa que las personas pueden, bien detectarlo como un sabor amargo desagradable o, para gran sorpresa e incredulidad de éstos, no percibirlo en absoluto. En el pedigrí de la Figura 2-34 podemos observar que dos «perceptores» pueden tener hijos no perceptores. Esto indica claramente que el alelo responsable de la capacidad para percibir el sabor es dominante, y que el alelo para

el carácter no perceptor es recesivo. Observe, sin embargo, que casi todas las personas que se introducen en esta familia portan el alelo recesivo, bien en heterocigosis o bien en homocigosis. Tal pedigrí difiere, por tanto, de los que incluyen anomalías recesivas raras, para las cuales se asume normalmente que todos los individuos que entran en la familia son homocigotos normales. Como ambos alelos PTC son frecuentes, no es sorprendente que todos los miembros de la familia menos uno estén casados con portadores de al menos una copia del alelo recesivo.

El polimorfismo constituye un fenómeno genético muy interesante. Los genetistas de poblaciones han quedado sorprendidos al descubrir el alto grado de polimorfismo que hay, generalmente, en las poblaciones naturales de plantas y animales. Además, aunque la genética de los polimorfismos es sencilla, hay muy pocos polimorfismos para los que exista una explicación satisfactoria sobre la coexistencia de los morfos. Pero el polimorfismo está muy extendido a todos los niveles del análisis genético, incluso a nivel de DNA. De hecho, los polimorfismos observados en el DNA han sido muy valiosos como puntos de referencia (marcas) que ayudan a los genetistas a encontrar su camino en la exploración de los cromosomas de los organismos complejos.

Un tipo útil de marca molecular cromosómica, o marcador, es el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, o RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Vimos en el Capítulo 1 que las enzimas de restricción son enzimas bacterianas que cortan el DNA en secuencias específicas del genoma. Las secuencias dianas no tienen significado biológico en organismos distintos a las bacterias —ocurren por puro azar—. Aunque, generalmente, las dianas de restricción aparecen consistentemente en sitios específicos, algunas veces un sitio concreto está ausente en uno de los dos cromosomas, o aparece un sitio extra en uno de ellos. Si tal diana de restricción (ausente o presente) flanquea una secuencia con la que hibrida una sonda, la hibridación tipo Southern dará como resultado un polimorfismo o RFLP. Considere este ejemplo sencillo de un

cruzamiento en el que un cromosoma de uno de los progenitores contiene una diana extra que no aparece en los otros cromosomas de ese tipo:



La hibridación Southern mostrará dos bandas en la mujer y una sola en el varón. Los fragmentos «heterocigóticos» se heredarán exactamente igual que un gen. Podríamos escribir el cruzamiento anterior como:

$$\begin{array}{rcl} \text{largo/corto} & \times & \text{largo/largo} \\ \text{y los descendientes serán} & \frac{1}{2} & \text{largo/corto} \\ & \frac{1}{2} & \text{largo/largo} \end{array}$$

de acuerdo con la ley de la segregación igualitaria.

COROLARIO

Las poblaciones de plantas y animales (incluyendo la especie humana) son muy polimórficas. Los morfopuestos están generalmente determinados por alelos que se heredan con un patrón mendeliano simple.

El trabajo de Mendel ha resistido el paso del tiempo y nos ha proporcionado el trabajo preliminar básico para todos los estudios de Genética moderna. Fue la primera persona que prestó atención a la regularidad matemática de los patrones hereditarios. A partir de estos patrones fue capaz de realizar deducciones sobre la naturaleza fundamental de la herencia. Los genetistas actuales siguen utilizando hoy día la misma estrategia que empleó Mendel. Y, aún así, su trabajo permaneció sin ser reconocido y fue rechazado hasta 35 años después de su publicación. ¿Por qué? Hay muchas razones posibles, pero aquí consideraremos sólo una. Quizás fue así porque la ciencia biológica de aquel tiempo no supo aportar pruebas sobre la existencia de ninguna unidad física real en las células que pudiera corresponderse con las partículas genéticas de Mendel. Los cromosomas no habían sido estudiados todavía, la meiosis no había sido descrita e, incluso, se desconocían los detalles sobre el ciclo de vida de las plantas. Sin este conocimiento básico, podría haber parecido que las ideas de Mendel constituían meros juegos matemáticos.

Sobre la puerta de entrada del Museo de Mendel, en Brno, hay una frase melancólica escrita por Mendel en checo: «MÁ DOBA PŘIJDE», que significa «Mi tiempo llegará». El tiempo de Mendel llegó; durante el siglo XX florecieron la investigación y el entendimiento de la herencia, como resultado de los estudios seminales de Mendel realizados en el diminuto jardín de un monasterio. Sus «factores» hipotéticos (genes, como los llamamos actualmente) son una realidad molecular bien entendida, e incluso se están caracterizando genomas completos. Es posible comenzar con las últimas investigaciones sobre clonación, terapia génica, seres transgénicos, el proyecto genoma humano y muchos otros, y rastrear hacia el pasado a lo largo de la literatura hasta llegar a aquel único artículo titulado «Experimentos de hibridación de plantas», presentado en 1865 ante la Sociedad de Historia Natural de Brunn.

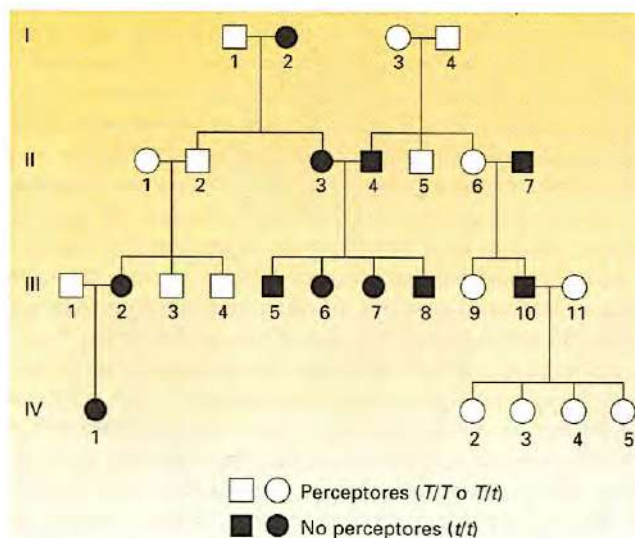


Figura 2-34. Pedigrí para la capacidad de percibir el sabor del compuesto químico PTC.

RESUMEN

La Genética moderna se basa en el concepto de gen, la unidad fundamental de la herencia. Como resultado de sus experimentos con guisantes de jardín, Mendel fue el primero en reconocer la existencia de los genes. Por ejemplo, cruzando una línea pura de plantas de guisante de jardín de flores púrpuras con otra de flores blancas, y permitiendo la autopolinización de la generación F_1 , que era completamente púrpura. Mendel consiguió una generación F_2 de plantas con una proporción 3:1 de flores púrpuras y blancas. En cruzamientos como el anterior, pero realizados con plantas de semillas amarillas y verdes, descubrió que existe una proporción 1:2:1 que subyace a todas las proporciones 3:1. A partir de estas proporciones matemáticas exactas, Mendel concluyó que existen determinantes hereditarios de naturaleza particulada, conocidos actualmente como genes. En las células de las plantas superiores y de los animales, los genes aparecen en parejas. Las distintas formas de un gen se denominan alelos. Los pares génicos pueden ser idénticos (homocigóticos) o estar formados por alelos diferentes (heterocigóticos). Un alelo puede ser dominante, por ejemplo Y (amarillo), o recesivo, por ejemplo y (verde). La dominancia se define por el fenotipo expresado en el heterocigoto.

En un cruzamiento entre plantas heterocigóticas amarillas (Yy) y plantas homocigóticas recesivas verdes (yy), se obtiene una proporción 1:1 de plantas amarillas y verdes. A partir de esta proporción, Mendel confirmó la llamada primera Ley, que establece que durante la formación de los gametos, los dos alelos de un gen se separan uno de otro y segregan a un mismo número de gametos. Por tanto, cada gameto lleva un solo alelo de cada gen. La unión de los gametos para formar un cigoto ocurre al azar, con independencia del alelo que lleve cada uno. La ley de la segregación igualitaria se basa en la segregación de los cromosomas homólogos en la primera división de la meiosis. Se ha

demostrado que esta ley es aplicable a todos los organismos que experimentan divisiones meióticas.

Las conclusiones anteriores provienen del trabajo de Mendel con cruzamientos monohíbridos. En los cruzamientos dihíbridos, Mendel encontró proporciones 9:3:3:1 en la F_2 , que corresponden en realidad a dos proporciones 3:1 combinadas aleatoriamente. A partir de estas proporciones, Mendel infirió que los alelos de los dos genes estudiados en un cruzamiento dihíbrido se comportan de forma independiente. Este concepto constituye la segunda Ley de Mendel, que es generalmente aplicable a genes situados en cromosomas diferentes. La base de la ley es la segregación independiente de los cromosomas no homólogos durante la meiosis.

En muchos organismos, el sexo está determinado por cromosomas especiales denominados cromosomas sexuales. Se encuentran ejemplos en *Drosophila*, en la especie humana y en ciertas plantas dioicas. Los genes de los cromosomas sexuales muestran patrones de herencia diferentes a los mostrados por los genes de los autosomas, que muestran patrones mendelianos estrictos. En ciertos cruzamientos, aparecen proporciones fenotípicas distintas en los dos sexos de la descendencia. Además, en ciertos cruzamientos recíprocos de los dos mismos fenotipos opuestos, aparecen diferencias en las proporciones de la descendencia.

La Genética mendeliana tiene una gran trascendencia para los seres humanos. Muchas enfermedades están determinadas por alelos anormales, recesivos o dominantes, de genes autosómicos. Estos alelos se heredan de forma estrictamente mendeliana. Otras enfermedades muestran, claramente, herencia ligada al sexo. Todos estos patrones hereditarios pueden deducirse mediante el análisis de pedigrís utilizando ciertas reglas normalizadas. Los morfos de los dimorfismos humanos también se heredan siguiendo los patrones mendelianos.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

segregación independiente / genotipo / fenotipo / dihíbrido / cruzamiento de prueba / proporción 9:3:3:1 / autocruzamiento / gametos / fecundación / proporción 1:1:1:1

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

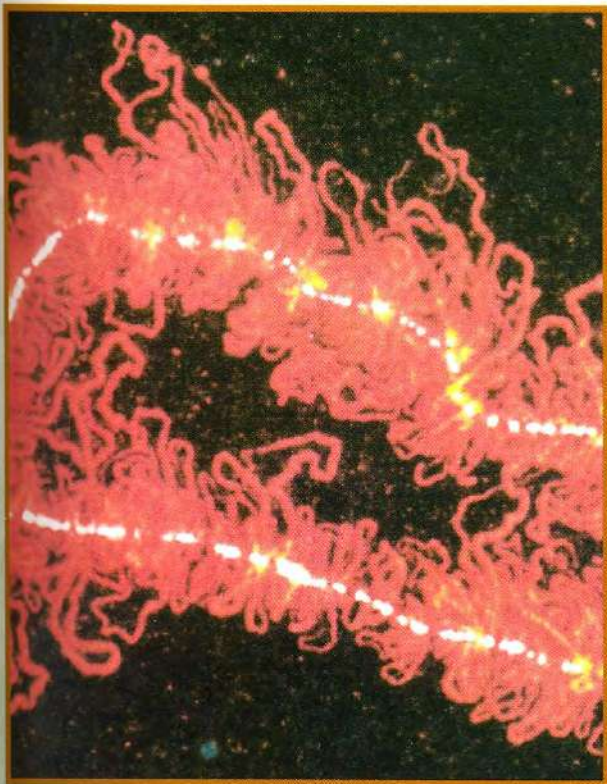
Cada capítulo incluye un problema resuelto que pone especial énfasis en la integración de conceptos de diferentes capítulos. El aprendizaje de cualquier disciplina es un proceso lineal, en el que se va avanzando de tema en tema con cierto orden. Pero la propia disciplina no es lineal. Es, más bien, una serie de partes integradas que el profesional ve en su conjunto. Esperamos que el énfasis en la integración clarificará la estructura general de la Genética, y que el lector no verá los contenidos de cada capítulo de manera aislada. Al ir pasando de un capítulo a otro, los niveles de comprensión se sustentan sobre los precedentes y la materia se ensambla como las capas de una cebolla.

◆ Problema ◆

Se han realizado cruzamientos entre dos líneas puras de conejos, que llamaremos A y B. Un macho de la línea A se cruzó con una hembra de la línea B, y los conejos de la F_1 se cruzaron entre sí para producir la F_2 . Se descubrió que $\frac{3}{4}$ de los animales de la F_2 acumulaban grasa subcutánea blanca y $\frac{1}{4}$ la acumulaba de color amarillo. Más tarde se examinaron los animales de la F_1 y se descubrió que acumulaban grasa blanca. Varios años más tarde, se intentó repetir el experimento usando el mismo macho de la línea A y la misma hembra de la línea B. Esta vez, la F_1 y toda la

3

BASES CROMOSÓMICAS DE LA HERENCIA



Cromosomas en escobilla.

Los cromosomas de las hembras de algunos animales adoptan este aspecto de escobillas durante la fase meiótica diplotene. Se cree que la estructura en escobilla refleja la organización interna de todos los cromosomas: un esqueleto central (de aspecto brillante en esta fotografía) del que se proyectan unos lazos laterales (en rojo), formados por una molécula continua de DNA, plegada y asociada a histonas.

(M. Roth y J. Gall.)

Ideas fundamentales

Los genes forman parte de los cromosomas.

La mitosis es la división nuclear que da lugar a dos núcleos hijos, cada uno de los cuales contiene idéntico material genético que el núcleo original.

La meiosis es la división nuclear mediante la cual una célula reproductora con dos dotaciones equivalentes de cromosomas, se divide dos veces para dar cuatro productos meióticos, cada uno de los cuales contiene una sola dotación de cromosomas.

Las leyes de Mendel sobre la distribución igualitaria y la segregación independiente se basan en la separación de los miembros de cada pareja cromosómica y en la independencia de los distintos pares cromosómicos, fenómenos que ocurren durante la meiosis.

Los cromosomas pueden identificarse con el microscopio mediante el empleo de varios marcadores visibles.

Un cromosoma está formado por una única molécula de DNA muy larga.

El DNA está enrollado alrededor de complejos de proteínas que, a su vez, se enrollan y forman lazos y nuevos enrollamientos sobre sí mismos hasta formar el cromosoma.

Una gran proporción del DNA eucariótico está presente en varias copias.

La mayoría del DNA repetido posee una función desconocida.

La belleza del análisis de Mendel está en que no se necesita conocer qué son los genes o cómo provocan un determinado fenotipo, para estudiar los resultados de un cruzamiento y predecir los de cruzamientos futuros, siguiendo las leyes de la distribución igualitaria y la segregación independiente. Todo ello es posible simplemente representando los hipotéticos factores abstractos de la herencia (los genes) mediante símbolos, sin preocuparnos acerca de su estructura molecular o su localización celular. No obstante, nuestro interés gira naturalmente en torno a las siguientes cuestiones: ¿dónde están localizados los genes en la célula? y ¿cuál es la forma exacta en que se llevan a cabo la segregación y la distribución independiente a nivel celular?

Un avance importante en el desarrollo de la Genética fue la noción de que los genes, tal como habían sido definidos por Mendel, forman parte de estructuras celulares específicas, los cromosomas. Este concepto tan simple ha llegado a ser conocido como la **teoría cromosómica de la herencia**. Aunque simple, la idea ha tenido profundas implicaciones, puesto que ha permitido correlacionar los resultados de ciertos cruzamientos con la conducta de unas estructuras que pueden observarse realmente al microscopio. Esta fusión entre las disciplinas de la Genética y la Citología es todavía hoy un aspecto esencial del análisis genético y tiene aplicaciones importantes en la Genética clínica, la Genética agrícola y la Genética evolutiva. En primer lugar, desarrollaremos la historia de esta teoría.

Desarrollo histórico de la teoría cromosómica

¿Cómo tomó forma la teoría cromosómica? Las pruebas se acumularon de forma gradual a partir de distintas fuentes. Una de las primeras pruebas vino del comportamiento de los cromosomas durante la división nuclear de las células. En el período de tiempo entre las investigaciones de Mendel y su redescubrimiento, muchos biólogos estaban interesados en la herencia, aunque no eran conscientes de los resultados de Mendel y abordaban el problema de una manera completamente distinta. Estos investigadores prestaron atención a la naturaleza física del material hereditario. Un lugar obvio para buscarlo eran los gametos, que constituyen los únicos elementos de enlace entre las generaciones. Considerando que el óvulo y el espermatozoide difieren en tamaño pero contribuyen por igual al legado genético de los descendientes, el citoplasma no parecía el alojamiento más probable de las estructuras hereditarias. Se sabía, sin embargo, que los núcleos eran aproximadamente del mismo tamaño en el óvulo y en el espermatozoide, de modo que se consideraron buenos candidatos para contener las estructuras hereditarias.

Descubrimiento de la división nuclear

¿Qué se sabía sobre el contenido del núcleo celular? Pronto, se hizo evidente que los componentes más conspicuos eran los cromosomas, los cuales resultaron poseer propiedades únicas que los diferenciaba del resto de las estructuras celulares. Una propiedad que intrigaba especialmente a los biólogos era la constan-

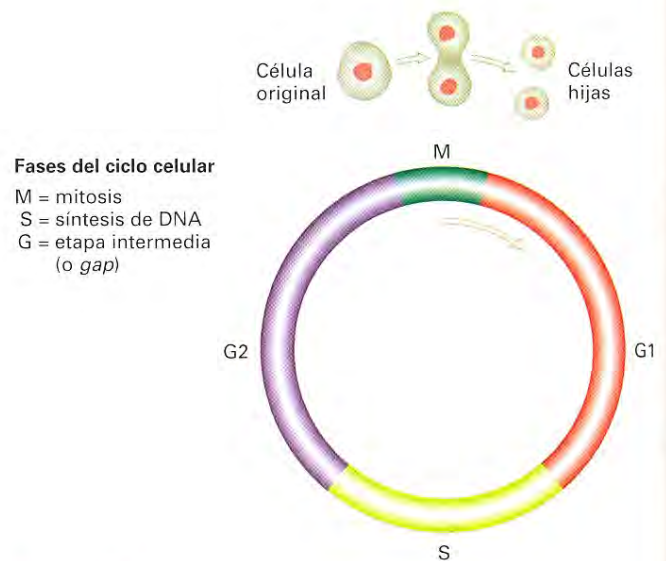
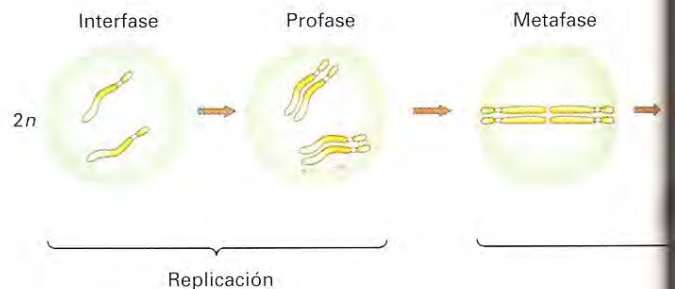
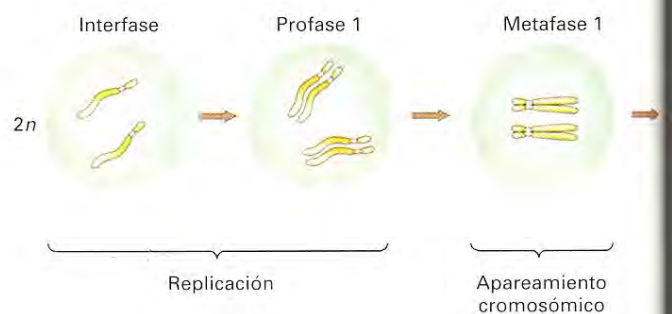


Figura 3-1. Fases del ciclo celular.

Mitosis



Meiosis



cia del número de cromosomas de una célula a otra dentro de un organismo, de un organismo a otro de la misma especie y de generación en generación en esa especie. En consecuencia, se planteó la siguiente pregunta: ¿Cómo se mantiene el número de cromosomas? La pregunta se resolvió observando con el microscopio el comportamiento de los cromosomas durante la división celular; de tales observaciones surgió la hipótesis de que los cromosomas son las estructuras portadoras de los genes.

La **mitosis** es la división nuclear asociada a la división de las células somáticas (las células de un organismo eucariótico que no van a convertirse en células sexuales). Las etapas del ciclo de división celular (Fig. 3-1) son similares en la mayoría de los organismos. Las dos partes fundamentales del ciclo son la **interfase** (que abarca la fase G_1 , la fase de síntesis y la fase G_2) y la **mitosis**. El acontecimiento clave de la interfase tiene lugar en la **fase S** (fase de síntesis) en la cual se replica el DNA de cada cromosoma. La consecuencia de la replicación del DNA es que todos los cromosomas están compuestos por dos **cromátidas**

hermanas, que se extienden longitudinalmente una junto a la otra. Estas cromátidas hermanas no se observan durante la interfase, pero se hacen visibles durante la **profase**, una etapa temprana de la mitosis durante la cual los cromosomas se contraen en una serie de estructuras espirales que pueden desplazarse más fácilmente. Una versión simplificada de los principales acontecimientos de la mitosis se muestra en la Figura 3-2. La siguiente etapa es la **metafase**, en la cual cada pareja de cromátidas hermanas se sitúa en el plano ecuatorial de la célula. En la **anafase**, las cromátidas hermanas son empujadas a los polos opuestos de la célula mediante microtúbulos que se unen a los centrómeros. Los microtúbulos forman parte del **huso acromático**, una serie de fibras paralelas que se extienden de un polo a otro de la célula. El proceso de separación de las cromátidas se completa en la **telofase**, durante la cual la membrana nuclear se reconstituye alrededor de cada núcleo y la célula se divide en dos **células hijas**. Cada una de ellas hereda una cromátida de cada pareja de cromátidas hermanas, obteniendo así una copia de cadaromo-

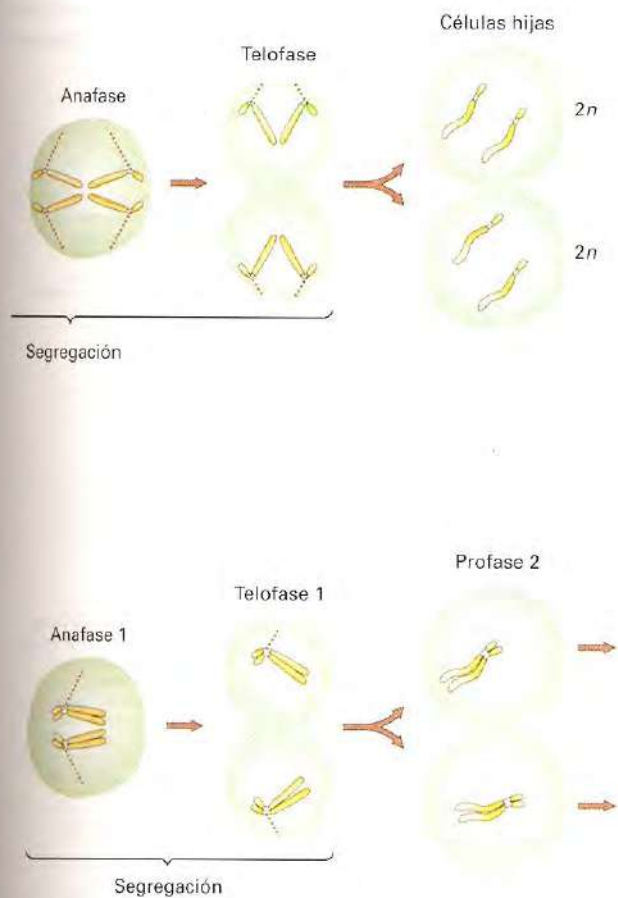
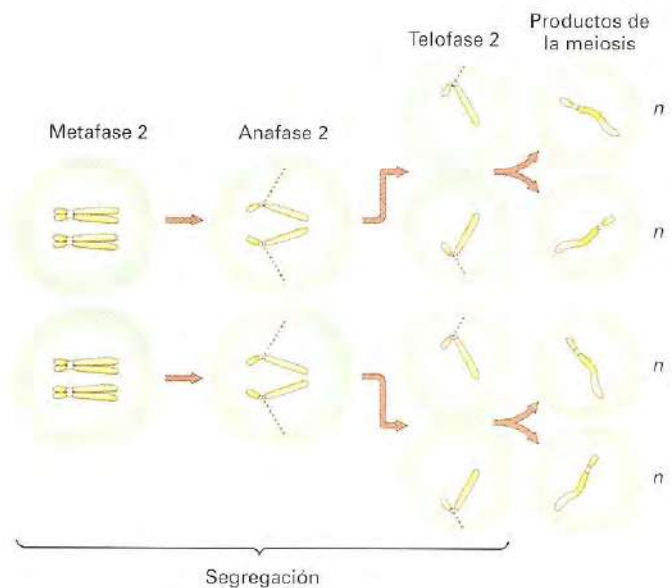


Figura 3-2. Representación simplificada de la mitosis y la meiosis en células diploides ($2n$, diploide; n , haploide). Se muestran otras versiones detalladas en las Figuras 3-3 y 3-4.



soma. Por tanto, este tipo de división produce dos células genéticamente idénticas a una única célula progenitora. Divisiones celulares sucesivas y las divisiones mitóticas acompañantes tienen como resultado una población de células idénticas genéticamente. Por ejemplo, la mitosis es el tipo de división que permite a un organismo pluricelular ser construido a partir de una única célula huevo o cigoto. Partiendo de esta descripción simplificada, vemos que los dos procesos fundamentales de la mitosis son la *replicación del DNA* seguida de la *segregación*. La segregación es el nombre que se da a la separación de los dos cromosomas homólogos o de las cromátidas. (En la Fig. 3-3 se muestra una descripción completa de la mitosis en una planta.)

Aunque los primeros investigadores no conocían el DNA ni que se replicaba durante la interfase, ya resultaba evidente que la mitosis era el proceso mediante el cual se mantenía el número de cromosomas durante la división celular. Por tanto, los cromosomas parecían ser los candidatos naturales para contener los genes. No obstante, quedaba aún un problema concerniente a la unión de los dos gametos en el proceso de fecundación. Sabían que en dicho proceso los dos núcleos se fusionan, pero aun así, el número de cromosomas permanece constante. ¿Qué es lo que impide la duplicación del número de cromosomas en cada generación? Este enigma se resolvió tras la predicción de un tipo de división especial que *reducía a la mitad* el número de cromosomas. Dicha división especial, que fue descubierta finalmente en

tejidos productores de gametos de plantas y animales, se denomina *meiosis*. La Figura 3-2 muestra un esquema simplificado de ésta.

Meiosis es el nombre que reciben las dos divisiones nucleares sucesivas, denominadas meiosis I y meiosis II, de unas células especiales denominadas **meiocitos**. Las dos divisiones meióticas y sus divisiones celulares acompañantes dan lugar a un grupo de cuatro células denominadas **productos meióticos**. En los animales y las plantas, los productos meióticos se transforman en **gametos** haploides. En la especie humana y otros animales, la meiosis tiene lugar en las gónadas, y los productos de la meiosis se denominan gametos: esperma (o más apropiadamente, espermatozoides) y óvulos. En las plantas con flor, la meiosis tiene lugar en las anteras y los ovarios, y los productos de la meiosis se llaman **meiosporas**, que al final darán lugar a los gametos. La meiosis viene precedida por una fase S en la que se replica el DNA de cada cromosoma para formar las cromátidas hermanas, tal y como sucede en la mitosis. Como en la mitosis, las cromátidas hermanas se vuelven visibles en la profase I. Sin embargo, a diferencia de la mitosis, los cromosomas homólogos se emparejan (en la metafase I) para formar grupos de cuatro cromátidas denominados **tétradas**. Las cromátidas no hermanas se acoplan en un proceso de ruptura y reunión denominado **recombinación**, que se trata con detalle en el Capítulo 5. En la anafase I, cada uno de los dos pares de cromátidas hermanas es empujado hacia

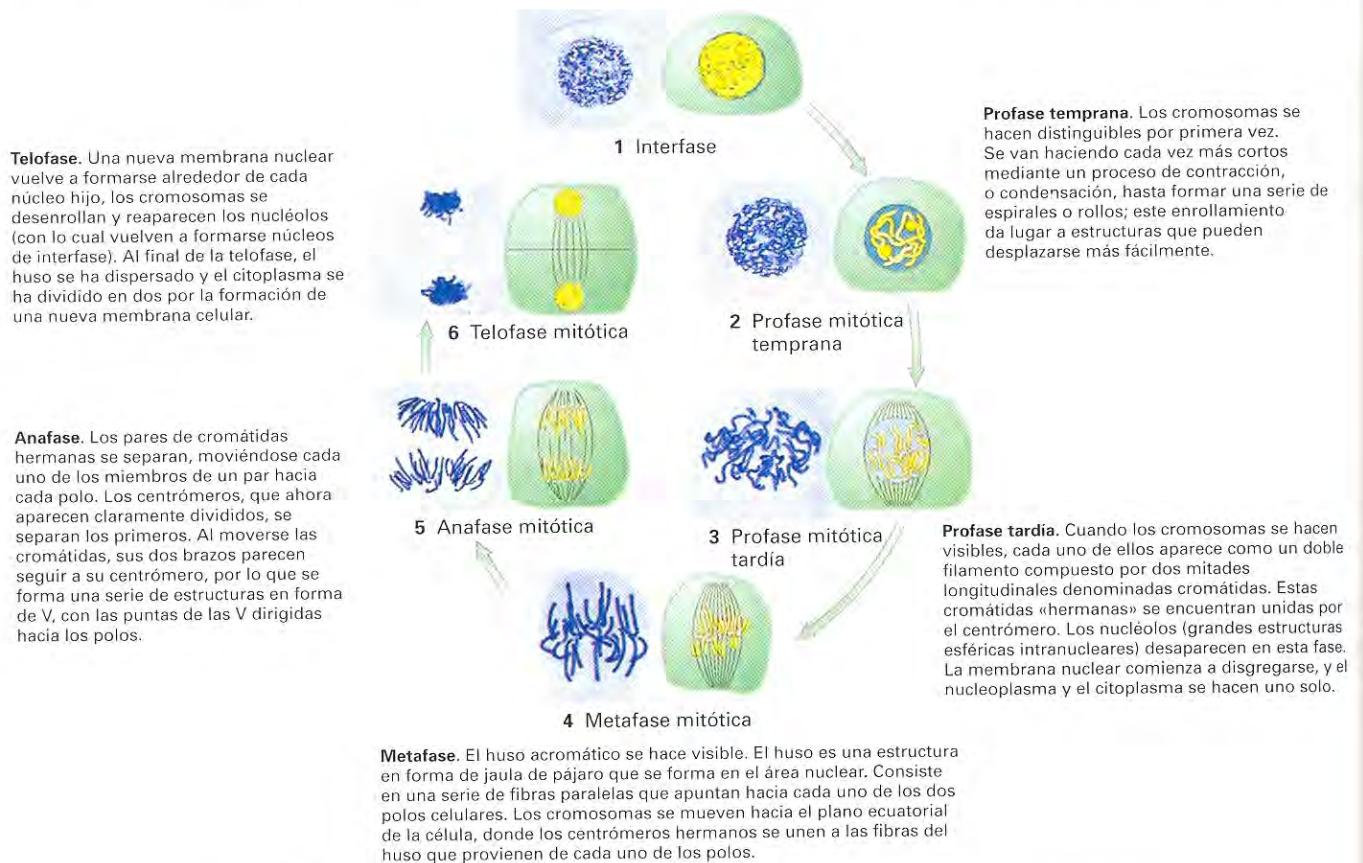
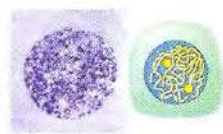
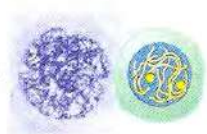


Figura 3-3. La mitosis. Las fotografías muestran los núcleos de las células del ápice de la raíz de *Lilium regale*. (De J. McLeish y B. Snode, *Looking at Chromosomes*. Copyright © 1958, St. Martin's, Macmillan.)



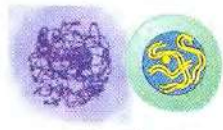
1 Leptotene

Profase I: Leptotene. Los cromosomas se hacen visibles y aparecen como hilos largos y delgados. El proceso de contracción cromosómica continúa durante el leptotene y a lo largo de toda la profase. Se forman a lo largo de cada cromosoma pequeñas áreas de engrosamiento (cromómeros), que dan a los cromosomas el aspecto de collares de perlas.



2 Zigotene

Profase I: Zigotene. Los cromosomas se emparejan de forma activa, haciéndose evidente que la dotación cromosómica de un meiocito está formada, en realidad, por dos dotaciones cromosómicas completas. De modo que cada cromosoma tiene un cromosoma compañero, al que se va adosando progresivamente (sinapsis), lado a lado, como una cremallera.



3 Paquitene

Profase I: Paquitene. Esta etapa se caracteriza por la presencia de gruesos cromosomas en sinapsis. Así pues, el número de pares homólogos de cromosomas en el núcleo es igual al número n . A menudo se observan en paquitene los nucléolos de forma muy pronunciada. Los cromómeros quedan alineados de forma precisa en los homólogos apareados, dando lugar a un patrón específico para cada par.



4 Diplotene

Profase I: Diplotene. Aunque cada cromosoma homólogo parezca estar formado por una sola fibra durante leptotene, el DNA ya se había replicado en realidad durante la fase S premeiótica. Esto se manifiesta durante el diplotene como un desdoblamiento longitudinal de cada homólogo apareado. Puesto que cada miembro de un par homólogo da lugar a dos cromátidas hermanas, la estructura en sinapsis consiste ahora en un manido de cuatro cromátidas homólogas. En diplotene, el apareamiento de los homólogos se hace menos compacto; de hecho, parecen repelerse uno al otro y, al separarse ligeramente, se observan estructuras en forma de cruz (quiasmas) entre las cromátidas no hermanas. Cada grupo homólogo de cuatro tiene generalmente uno o más quiasmas.



5 Diacinesis

Profase I: Diacinesis. Esta etapa se diferencia muy poco de la diplotene, excepto porque ocurre una mayor contracción cromosómica. Al final de la diacinesis, las largas fibras filamentosas de la interfase han sido sustituidas por unidades compactas que son mucho más manejables para los desplazamientos producidos durante la división meiótica.



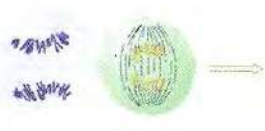
6 Metafase I

Metafase I: La membrana nuclear y los nucléolos desaparecen durante la metafase I, y cada par de homólogos ocupa un lugar en el plano ecuatorial. En esta etapa de la meiosis, los centrómeros no se dividen; esta falta de división representa una gran diferencia con respecto a la mitosis. Los dos centrómeros de cada par de cromosomas homólogos se unen a las fibras del huso de polos opuestos.

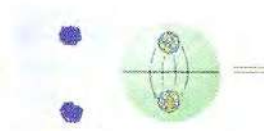


7 Anafase temprana I

Anafase I: La anafase comienza cuando los cromosomas se mueven en dirección a los polos. Cada uno de los miembros de un par homólogo se mueve hacia polos opuestos.



8 Anafase tardía I

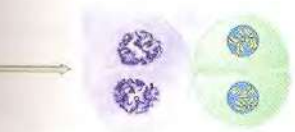


9 Telofase I

Telofase I: La telofase y la interfase resultante, denominada intercinesis, no son universales. En muchos organismos estas etapas no existen, no se vuelve a formar la membrana nuclear y las células pasan directamente a la meiosis II. En otros organismos, la telofase I y la intercinesis son muy breves; los cromosomas se alargan y se hacen difusos, y la membrana nuclear vuelve a formarse. En todo caso, nunca hay síntesis de DNA en este momento y el estado genético de los cromosomas no varía.

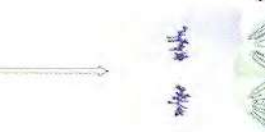


10 Intérfase



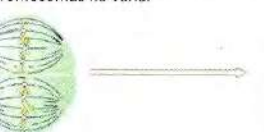
11 Profase II

Profase II: La presencia del número haploide de cromosomas en estado condensado caracteriza la profase.



12 Metafase II

Metafase II: Los cromosomas se organizan en el plano ecuatorial durante la metafase II. En este momento, las cromátidas a menudo se separan entre sí parcialmente en lugar de estar firmemente adosadas como en la



13 Anafase II

Anafase II: Los centrómeros se separan y las cromátidas hermanas son arrastradas hacia polos opuestos por las fibras del



14 Telofase II

Telofase II: Los núcleos vuelven a formarse alrededor de los cromosomas en



15 Tétrada

16 Granos jóvenes de polen

En las anteras de la flor, los cuatro productos de la meiosis se diferencian en granos de polen. En otros organismos, la diferenciación da lugar a otros tipos de estructuras a partir de los productos meióticos, como los espermatozoides de los animales.

Figura 3-4. La meiosis y la formación del polen. Las fotografías provienen de *Lilium regale*. **Nota:** Por simplicidad, se representan varios quiasmas entre sólo dos de las cromátidas; en la realidad, pueden tomar parte las cuatro cromátidas. (De J. McLeish y B. Snood, *Looking at Chromosomes*. Copyright © 1958, St. Martin's, Macmillan.)

un núcleo distinto de las células hijas. En la anafase II, las propias cromátidas hermanas se separan en los dos núcleos hijos que resultan de esa división. Por consiguiente, vemos que los acontecimientos fundamentales de la meiosis son la *replicación* del DNA, seguida del *apareamiento* de homólogos, de la *segregación* y luego de otra *segregación*. Por tanto, para cada tipo cromosómico, el número de moléculas de DNA va de $2 \rightarrow 4 \rightarrow 2 \rightarrow 1$, y cada *producto de la meiosis* ha de contener, por tanto, un cromosoma de cada tipo, la mitad del número que contenía el meiocito original. (En la Fig. 3-4 se da una descripción detallada de la meiosis.)

COROLARIO

Durante la *mitosis*, cada cromosoma se replica para formar las cromátidas hermanas, las cuales segregan a las células hijas. Durante la *meiosis*, cada cromosoma se replica para formar las cromátidas hermanas. Los cromosomas homólogos se aparean físicamente y segregan en la primera división. Las cromátidas hermanas segregan en la segunda división.

El mérito de la teoría cromosómica de la herencia (la idea de que las hipotéticas entidades invisibles denominadas genes forman parte de estructuras visibles denominadas cromosomas) se atribuye generalmente a Walter Sutton (un norteamericano que por entonces era un estudiante de doctorado) y a Theodor Boveri (un biólogo alemán). En 1902, ambos investigadores, por separado, cayeron en la cuenta de que el comportamiento de las partículas de Mendel durante la producción de los gametos del guisante mostraba un paralelismo exacto con la conducta de los cromosomas en la meiosis: los genes vienen en parejas (como los cromosomas); los alelos de un gen se distribuyen igualitariamente en los gametos (como los miembros de un par de cromosomas homólogos); genes distintos actúan de forma independiente (como los diferentes pares de cromosomas). Tras reconocer tal paralelismo (resumido en la Fig. 3-5), ambos investigadores llegaron a la misma conclusión: la similitud entre el comportamiento de los

genes y los cromosomas indicaba que los genes están situados en los cromosomas.

Por tanto, el análisis de la mitosis y la meiosis parecía apuntar a la misma conclusión. La teoría cromosómica no parecerá muy revolucionaria para un estudiante actual de Biología. A principios del siglo veinte, sin embargo, la hipótesis de Sutton-Boveri (que conectaba la Citología y el naciente campo de la Genética) fue un bombazo. La respuesta inicial a la publicación de la hipótesis fue buscarle «agujeros» que la desacreditaran. Durante muchos años, se produjo una feroz controversia acerca de la validez de la teoría cromosómica de la herencia.

Merece la pena repasar algunas de las objeciones levantadas contra la teoría de Sutton-Boveri. Por ejemplo, en su tiempo, no podían detectarse los cromosomas en la interfase (el intervalo entre dos divisiones celulares). Boveri tuvo que realizar algunos estudios muy detallados sobre la posición de los cromosomas antes y después de la interfase, para defender que los cromosomas mantienen su integridad física durante la interfase, aunque en ese momento fueran citológicamente invisibles. También se argumentó que los cromosomas son muy parecidos entre sí en algunos organismos, de forma que podrían estar apareando al azar, cuando las leyes de Mendel obligan a una segregación ordenada de los alelos. No obstante, se demostró que, en especies cuyos cromosomas se distinguen en forma y tamaño, aparecen pares de cromosomas iguales y que éstos se aparean y separan físicamente durante la meiosis.

En 1913, Elinor Carothers observó una situación cromosómica inusual en cierta especie de saltamontes (una situación que permitía una demostración directa de si diferentes parejas de cromosomas se separan en realidad de forma independiente). Estudiando los testículos del saltamontes, encontró un par de cromosomas constituido por dos miembros no idénticos; esto se conoce como par heteromorfo y, presumiblemente, los cromosomas muestran sólo una homología parcial. Además, observó que otro cromosoma, no relacionado con el par heteromórfico, no tenía

	Factores mendelianos	Cromosomas
Apareamiento cromosómico	A a	
Segregación	A ↓ a	
Distribución independiente	A B A b ↓ ↓ ↓ ↓ a b a B o	 o

Figura 3-5. Paralelismo entre el comportamiento de los genes mendelianos y los cromosomas durante la meiosis. Uno de los cromosomas del par homólogo se representa en un color más oscuro que el otro.

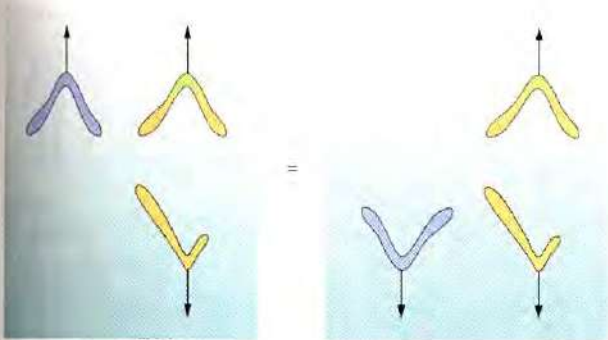


Figura 3-6. Las dos formas, igualmente frecuentes, de segregación de un par heteromorfo y un cromosoma desapareado para formar gametos, según como las observó Carothers.

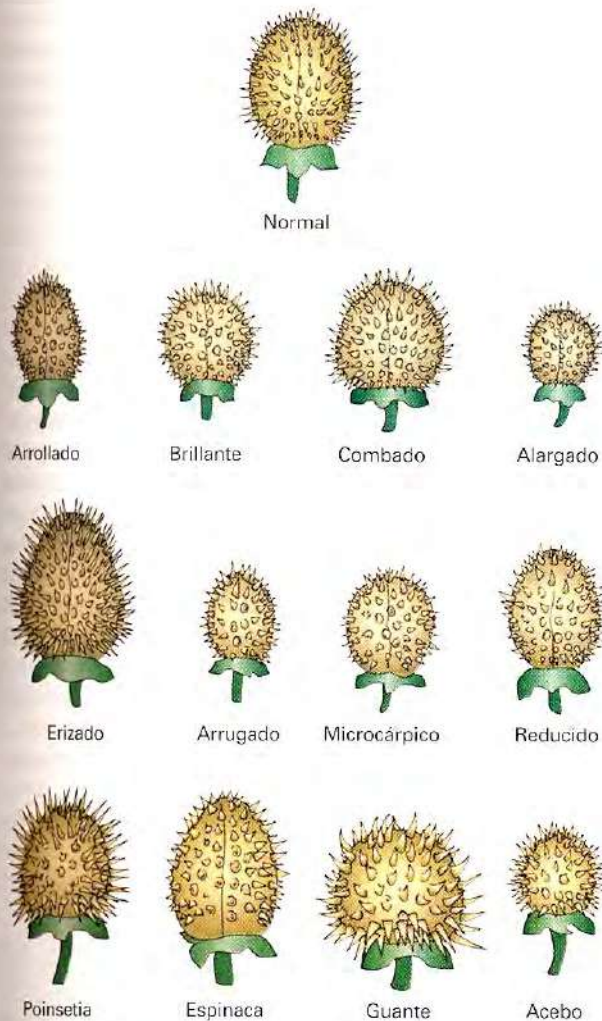


Figura 3-7. Frutos de plantas de *Datura*, cada una de ellas con un cromosoma extra distinto. Su aspecto característico indica que cada cromosoma es diferente de los demás. (De E. W. Sinnott, L. C. Dunn y T. Dobzhansky, *Principles of Genetics*, 5.ª ed., McGraw-Hill Book Company, Nueva York.)

ningún compañero. Carothers aprovechó estos cromosomas anormales como marcadores citológicos de la conducta de los cromosomas durante su segregación. En núcleos anafásicos, contó el número de veces que cada cromosoma del par heteromorfo migraba al mismo polo que el cromosoma sin compañero (Fig. 3-6). Observó que las dos alternativas posibles ocurrían con la misma frecuencia. Aunque estos cromosomas anormales no son ciertamente típicos, los resultados sugerían que los cromosomas no homólogos se distribuyen de manera independiente.

Otros investigadores sostenían que todos los cromosomas tenían la misma estructura fibrosa, sin que se detectaran diferencias cualitativas entre ellos. Ello sugería que todos los cromosomas están hechos del mismo material. Merece la pena introducir el análisis que contrarresta este argumento, en su secuencia histórica. En 1922, Alfred Blakeslee realizó un estudio de los cromosomas del estramonio (*Datura stramonium*), que tiene 12 pares de cromosomas. Obtuvo doce variedades diferentes, cada una de las cuales tenía los 12 pares de cromosomas normales más un cromosoma extra de un par determinado. Blakeslee observó que cada variedad era fenotípicamente distinta de las otras (Fig. 3-7). Este no sería el resultado esperado si fueran iguales todos los cromosomas no homólogos.

Todos estos hallazgos indicaban que la conducta de los cromosomas se corresponde estrechamente con la de los genes. Desde luego, ello hacía atractiva la teoría de Sutton-Boveri, pero hasta la fecha no existían pruebas concluyentes de que los genes estuvieran situados en los cromosomas. El razonamiento estaba simplemente basado en correlaciones. No obstante, nuevas observaciones aportarían tales pruebas, que aparecieron con el descubrimiento del ligamiento al sexo.

Descubrimiento del ligamiento al sexo

En los trabajos analizados hasta ahora, sin importar cuál fuera el sexo del parental de una u otra variedad en estudio, los cruzamientos recíprocos producían el mismo resultado, tal y como había demostrado Mendel. L. Doncaster y G. H. Raynor descubrieron la primera excepción a esta situación en 1906. Estudiaban el color del ala de un tipo de mariposa (*Abraaxas*), empleando dos líneas diferentes: una con alas claras y otra con alas oscuras. Si se cruzan hembras de alas claras con machos de alas oscuras, todos los descendientes tienen alas oscuras, indicando que el alelo para el color claro es recesivo. Sin embargo, en el cruzamiento recíproco (hembra de alas oscuras $\times$ macho de alas claras), todas las hembras descendientes tienen alas claras y todos los machos descendientes tienen alas oscuras. Por tanto, este par de cruzamientos recíprocos no da resultados similares, y el fenotipo del ala del segundo cruzamiento está condicionado por el sexo de la mariposa. Observe que las hembras descendientes de este segundo cruzamiento son fenotípicamente similares a su padre, igual que los machos son similares a su madre. Consideremos otro ejemplo similar.

William Bateson estudiaba la herencia del tipo de pluma de los pollos. Una línea tenía plumas que alternaban bandas de color claro y oscuro, fenotipo conocido como listado. Otra línea, no listada, tenía plumas coloreadas de modo uniforme. En el cruce de machos listados con hembras no listadas, todos los descendientes eran listados, demostrándose así que el alelo no lista-

do es recesivo. Sin embargo, el cruzamiento recíproco (hembra listada con macho no listado) dio lugar a machos listados y hembras no listadas. De nuevo, el resultado es que la descendencia femenina desarrolla el fenotipo del padre y la descendencia masculina el de la madre.

La explicación de estos resultados vino del laboratorio de Thomas Hunt Morgan, quien en 1909 había empezado a estudiar el fenómeno de la herencia en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). El ciclo de vida de *Drosophila* es el típico de muchos insectos. Las moscas crecen vigorosamente en el laboratorio. La elección de *Drosophila* como organismo de estudio fue muy afortunada para los genetistas, y especialmente para Morgan, cuyo trabajo le valió el Premio Nobel en 1934.

El color normal del ojo de *Drosophila* es el rojo. En sus primeros estudios, Morgan descubrió un macho de ojos completamente blancos (véase Fig. 2-14). Encontró las diferencias en los cruzamientos recíprocos y la relación entre las proporciones fenotípicas de los dos sexos de la descendencia que se describieron en el Capítulo 2. Esto es muy parecido a los resultados obtenidos con pollos y mariposas, pero existe una diferencia importante: en los pollos y las mariposas, los descendientes son como el parental de sexo contrario si quien llevaba los alelos recesivos era el parental macho; en cambio, en los cruzamientos con *Drosophila*, tal resultado aparece si la portadora de los alelos recesivos es la hembra parental.

Antes de volver a la explicación de Morgan de los resultados con *Drosophila*, hemos de fijarnos en los datos citológicos que pudo utilizar en sus interpretaciones. En 1891, H. Henking, trabajando con machos de una especie de himenópteros, observó que los núcleos meióticos tenían 11 pares de cromosomas y un elemento no apareado que se movía hacia uno de los polos en la primera división meiótica. Henking denominó a este elemento no apareado «cuerpo X». Creyó que era un nucléolo, aunque estudios posteriores demostraron que se trataba de un cromosoma. Elementos no apareados, similares a éste, se encontraron después en otras especies. En 1905, Edmon Wilson advirtió que las hembras de *Protenor* (otro himenóptero) tienen seis pares de cromosomas, mientras que los machos tienen sólo cinco pares y un cromosoma no apareado, al que Wilson llamó (por analogía) el cromosoma X. Las hembras, en realidad, tienen un par de cromosomas X.

También en 1905, Nettie Stevens observó que machos y hembras del escarabajo *Tenebrio* poseen el mismo número de cromosomas, pero una de las parejas de cromosomas es heteromorfa en el macho. Un miembro de la pareja heteromorfa parece

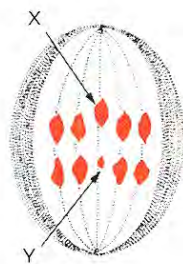


Figura 3-8. Segregación del par heteromorfo (X e Y) durante la meiosis de un macho de *Tenebrio*. En anafase I, los cromosomas X e Y son arrastrados hacia polos opuestos. (De A. M. Srb, R. D. Owen y R. S. Edgar, *General Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1965 por W. H. Freeman and Company.)

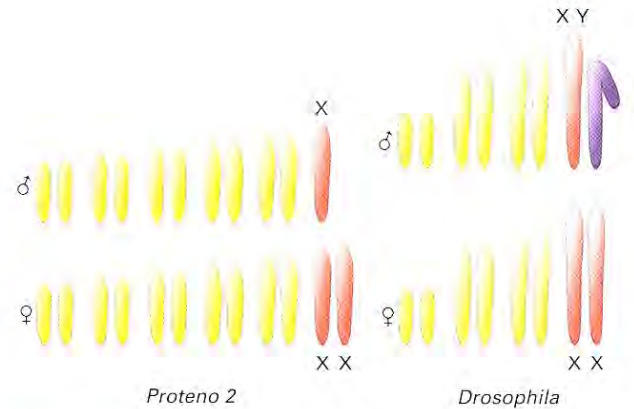


Figura 3-9. Dotación cromosómica de machos y hembras de dos especies de insectos distintas.

idéntico a los miembros de una pareja cromosómica de la hembra; Stevens lo llamó cromosoma X. El otro miembro de la pareja heteromorfa no se observa nunca en las hembras; lo llamó a éste el cromosoma Y (Fig. 3-8). Stevens observó una situación similar en *Drosophila melanogaster*, que tiene cuatro parejas de cromosomas, siendo una de las parejas de los machos heteromorfa. La Figura 3-9 resume estas dos situaciones básicas: el cromosoma extra no apareado y el par heteromorfo. (Usted se estará preguntando sobre el macho de saltamontes estudiado por Carothers, que tenía tanto una pareja heteromorfa como un cromosoma desapareado. Éste es un caso muy poco frecuente y no debemos preocuparnos por él ahora.)

Con esta información de base, Morgan elaboró una interpretación de sus datos genéticos. En primer lugar, parece que los cromosomas X e Y determinan el sexo de la mosca. Todas las hembras de *Drosophila* tienen cuatro parejas de cromosomas, mientras que todos los machos tienen tres parejas normales y una pareja heteromorfa. Así pues, la meiosis produce en la hembra óvulos, cada uno de los cuales posee un cromosoma X. Aunque los cromosomas X e Y de los machos son heteromorfos, como se mencionó en el Capítulo 2, parecen aparearse y segregan como una pareja de homólogos (Fig. 3-10). Por tanto, la meiosis produce en los machos dos tipos de espermatozoides, unos que llevan el cromosoma X y otros que llevan el cromosoma Y.

Después, Morgan volvió al problema del color de los ojos. Propuso que los alelos para el color rojo o blanco están presentes en el cromosoma X, pero no hay un gen equivalente en el cromosoma Y.

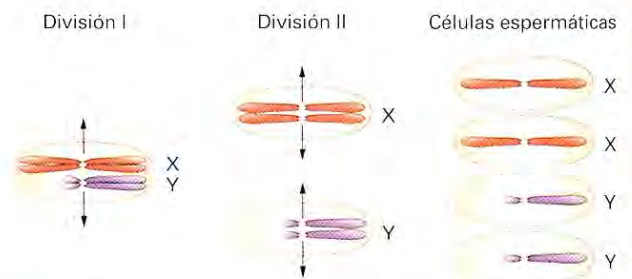


Figura 3-10. Apareamiento meiótico y distribución de los cromosomas X e Y en el mismo número de células espermáticas.

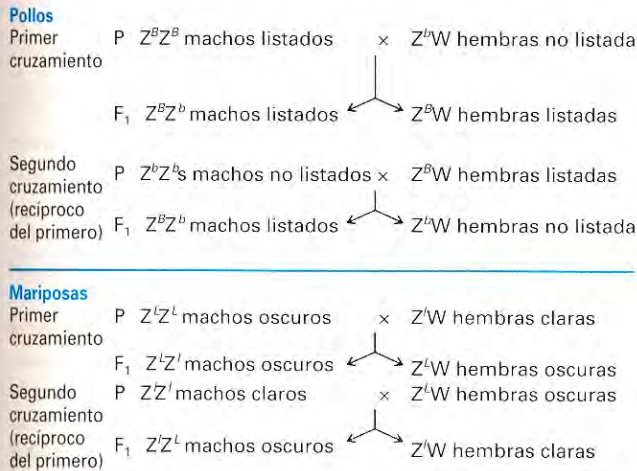


Figura 3-11. Forma de herencia de genes situados en los cromosomas sexuales de dos especies con el mecanismo de determinación sexual WZ.

soma Y. De modo que las hembras tendrían dos copias de este gen, mientras que los machos sólo una. Los resultados genéticos eran completamente consistentes con el comportamiento meiótico conocido de los cromosomas X e Y (como se describe en el Capítulo 2). Este experimento apoya firmemente la idea de que los genes se encuentran localizados en los cromosomas. No obstante, de nuevo es sólo una correlación y no constituye una prueba definitiva de la teoría de Sutton-Boveri.

¿Puede aplicarse la teoría de los cromosomas XX y XY a los resultados de los cruzamientos anteriores realizados con pollos y mariposas? En principio, cabría suponer que no. Sin embargo, Richard Goldschmidt se dio cuenta de inmediato que esos resultados podrían explicarse mediante una hipótesis parecida, suponiendo simplemente que los machos son en estos casos los portadores de la pareja de cromosomas idénticos, mientras que las hembras llevan la pareja heteromorfa. Para distinguir esta situación de la situación XY de *Drosophila*, Morgan propuso que los cromosomas sexuales del pollo y de la mariposa se denominaran W y Z, siendo los machos ZZ y las hembras WZ. De modo que cuando los genes de los cruzamientos entre pollos y entre mariposas están en el cromosoma Z, éstos pueden esquematizarse como en la Figura 3-11. Esta interpretación es consistente con los datos genéticos. En este caso, los datos citológicos confirmaron la hipótesis genética. En 1914, J. Seiler comprobó que ambos cromosomas son iguales en todas las parejas del macho de la mariposa, mientras que las hembras tienen una pareja heteromorfa.

COROLARIO
La forma peculiar de herencia que muestran ciertos genes hace muy probable que estén localizados en los cromosomas sexuales, los cuales muestran una forma de herencia paralela a la de aquéllos.

Una aclaración sobre símbolos genéticos

Con el propósito de definir los alelos variantes en relación al alelo «normal», se estableció una simbología especial en *Dro-*

sophila. Este sistema es de amplio uso entre los genetistas y resulta de especial utilidad para el análisis genético. El alelo para la forma del carácter más frecuente en las poblaciones naturales de *Drosophila* (o, alternativamente, el alelo que se encuentra en la colección estándar del laboratorio) se designa alelo estándar o **silvestre**. Todos los alelos restantes son, por tanto, alelos mutantes. La designación simbólica de un gen deriva del primer alelo mutante encontrado. En los experimentos de Morgan con *Drosophila*, dicho alelo fue el de ojos blancos, representado por w . El silvestre correspondiente se representa, por convención, añadiendo un superíndice de signo positivo; de modo que el alelo normal que determina ojos rojos se denota w^+ .

En caso de un polimorfismo, varios alelos son frecuentes en la naturaleza y todos pueden considerarse como silvestres. En este caso, se emplean superíndices para distinguir unos alelos de otros. Por ejemplo, dos alelos naturales del gen de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Drosophila* muestran dimorfismo. Estas dos formas de la enzima migran a distinta velocidad en un gel de electroforesis. Los alelos que determinan esas isoformas se designan Adh^F (del inglés, *fast*) y Adh^S (*slow*).

El alelo silvestre puede ser dominante o recesivo con respecto a un alelo mutante. El empleo de letras minúsculas para designar los dos alelos w^+ y w indica que el alelo silvestre es dominante sobre el de ojos blancos (es decir, w es recesivo frente a w^+). Poniendo otro ejemplo, la condición silvestre del ala de la mosca es tersa y plana, y el alelo mutante provoca que el ala sea retorcida. Como este alelo es dominante sobre el alelo silvestre, se escribe Cy (del inglés, *Curly*), mientras que el alelo silvestre se escribe Cy^+ . Observe que la letra mayúscula indica en este caso que Cy es dominante sobre Cy^+ . (Observe también en estos ejemplos que el símbolo de un gen puede consistir en más de una letra.)

Una prueba definitiva de la teoría cromosómica

El paralelismo entre el comportamiento de los genes y el de los cromosomas hacía muy verosímil la idea de que los genes forman parte de los cromosomas. Pero esto no era una prueba de la teoría cromosómica y el debate continuó. La prueba crucial fue aportada por uno de los estudiantes de Morgan, Calvin Bridges. El trabajo de Bridges comenzó con un cruzamiento de la mosca de la fruta al que nos hemos referido antes. Si las letras X e Y representan los cromosomas X e Y, podemos escribir los genotipos parentales mediante los símbolos $X^w X^w$ (ojos blancos) $\times$ $X^{w+} Y$ (ojos rojos). Sabemos que la descendencia esperada es $X^{w+} X^w$ (hembras de ojos rojos) y $X^w Y$ (machos de ojos blancos). Cuando Bridges repitió el cruzamiento a gran escala, observó unas pocas excepciones entre la descendencia. Alrededor de uno de cada 2000 individuos de la F₁ eran hembras de ojos blancos o machos de ojos rojos. Estos individuos se denominaron, en conjunto, como *descendencia excepcional primaria*. Todos los machos excepcionales de este conjunto resultaron ser estériles. Sin embargo, cuando Bridges cruzó las hembras excepcionales primarias, de ojos blancos, con machos normales de ojos rojos, se observó, además de la descendencia esperada de hembras de ojos rojos y machos de ojos blancos, una proporción mayor de descendencia excepcional, 4 % de hembras de ojos blancos y machos de ojos rojos que eran fértiles. Esta descendencia excep-

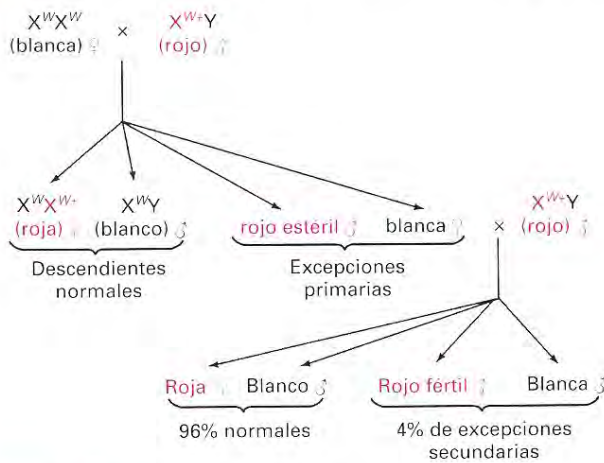


Figura 3-12. Cruzamientos con moscas *Drosophila* en los que se obtuvieron originalmente descendientes excepcionales primarios y secundarios. Rojo, mosca de ojos rojos; blanco, mosca de ojos blancos.

cional de madres excepcionales primarias se llamó *descendencia excepcional secundaria* (Fig. 3-12). ¿Cómo explicó Bridges estos descendientes excepcionales?

Las hembras excepcionales (que, como todas las hembras, contienen dos cromosomas X), han de recibir estos dos cromosomas de su madre, ya que son homocigóticas para w . De modo similar, los machos excepcionales deben haber recibido el cromosoma X de sus padres puesto que son w^+ . Bridges pensó que podrían producirse fallos durante la meiosis de la hembra, de manera que los cromosomas X apareados no se separaran, bien en la primera o bien en la segunda división. Ello daría como resultado núcleos meióticos que tendrían dos cromosomas X, o ninguno en absoluto. Este fallo en la separación de los cromosomas se denomina **no disyunción**. La fecundación de óvulos portadores de estos tipos de núcleos con espermatozoides de un macho silvestre producirá cuatro clases de cigotos (Fig. 3-13). Es importante señalar que la barra que representa a un cromosoma en este esquema no indica un cromosoma sencillo, sino un par de cromátidas hijas.

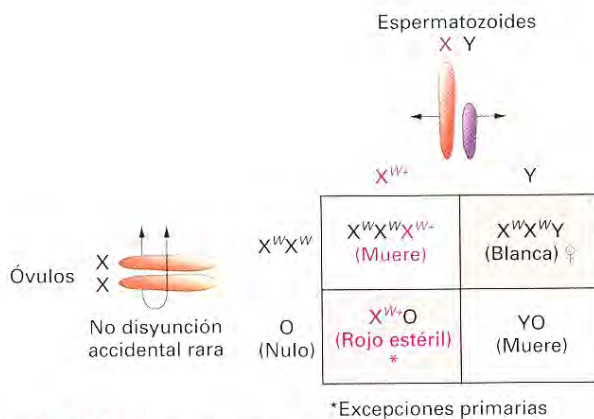


Figura 3-13. Explicación propuesta para dar cuenta de la descendencia excepcional primaria por no disyunción de los cromosomas X en la hembra parental. Rojo, mosca de ojos rojos; blanco, mosca de ojos blancos.

Bridges supuso que los cigotos XXX e YO morían antes de completar su desarrollo, de modo que se esperarían dos tipos de descendientes excepcionales, que serían $X^w X^w Y$ (hembras de ojos blancos) y $X^{w+} O$ (machos de ojos rojos). ¿Qué hay de la esterilidad de los machos excepcionales primarios? Tendría sentido, si suponemos que es necesaria la presencia de un cromosoma Y para la fertilidad de los machos.

En resumen, Bridges explicó la descendencia excepcional primaria postulando que meiosis aberrantes daban lugar, con baja frecuencia, a hembras XXY viables y machos XO. Comprobó este modelo de distintos modos. En primer lugar, examinó microscópicamente los cromosomas de la descendencia excepcional primaria y, efectivamente, eran XXY e XO, como había predicho. En segundo lugar, siguió prediciendo los apareamientos cromosómicos posibles durante la meiosis de las hembras XXY y, a partir de tales apareamientos, la naturaleza de la descendencia excepcional secundaria que surgía de ellos. De nuevo, el microscopio corroboró que todas sus predicciones eran correctas. Por tanto, asumiendo que el gen del color de los ojos se localizaba en el cromosoma, predijo de forma precisa la naturaleza de varios procesos genéticos anormales.

COROLARIO

La teoría de la localización cromosómica de los genes quedó establecida, sin ninguna sombra de duda, cuando Bridges empleó dicha teoría para predecir, con éxito completo, el resultado de determinados análisis genéticos.

La genética mendeliana en los ciclos de vida eucarióticos

Hasta ahora, hemos hablado principalmente de organismos diploides (organismos con dos dotaciones homólogas de cromosomas en cada célula). Como hemos visto, los diploides se designan $2n$, donde n corresponde al número de cromosomas en cada dotación cromosómica. Por ejemplo, las células del guisante contienen dos dotaciones de siete cromosomas, así que en este caso $2n = 14$. Los organismos que nos encontramos con más frecuencia en nuestra vida diaria (los animales y las plantas con flor) son diploides en la mayoría de sus tejidos.

No obstante, una gran proporción de la biomasa terrestre está constituida por organismos que pasan la mayor parte de su ciclo de vida en forma haploide, en la que cada célula contiene sólo una dotación de cromosomas. Algunos ejemplos significativos son los hongos y las algas. Las bacterias pueden considerarse haploides, pero constituyen un caso especial, ya que carecen de cromosomas del tipo de los que hemos descrito (El ciclo de vida de las bacterias se describe en el Capítulo 7). Igualmente importantes son aquellos organismos que pasan una parte de su ciclo de vida en forma haploide y otra parte en forma diploide. De tales organismos se dice que muestran **alternancia de generaciones**, en referencia al paso continuo de una fase $2n$ a otra n , y viceversa. De hecho, todas las plantas muestran alternancia de generaciones. No obstante, el estado haploide de las plantas con flor y las coníferas es poco vistoso y dependiente de la parte

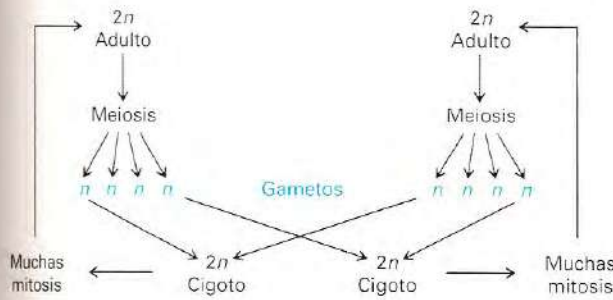


Figura 3-14. Ciclo de vida de un organismo diploide.

diploide de la planta, apareciendo como una estructura especial. En otras plantas, como los musgos y los helechos, el estado haploide sí aparece como una forma de vida independiente.

¿Presentan genética mendeliana todos estos ciclos de vida? La contestación es que el patrón de herencia mendeliana se da en cualquier organismo en cuyo ciclo de vida aparezca la meiosis, ya que las leyes de Mendel se basan en dicho proceso. Todos los grupos de organismos mencionados, excepto las bacterias, utilizan la meiosis como parte de su ciclo de vida.

Diploides

La Figura 3-14 resume de manera muy esquemática el ciclo diploide, que es el ciclo de la mayoría de los animales (incluyendo a la especie humana). El organismo adulto está constituido por células diploides, y la meiosis tiene lugar en células diploides especializadas, los meiocitos, los cuales se encuentran en las gónadas (testículos y ovarios). Los productos de la meiosis son los gametos (óvulos y espermatozoides). La fusión de los gametos

haploides da lugar a un cigoto diploide que, mediante mitosis, genera un organismo multicelular.

En la Figura 3-15, se muestra la meiosis de un organismo dihíbrido. El genotipo de la célula es $A/a ; B/b$, y se muestran los dos pares de alelos, A/a y B/b , en dos parejas de cromosomas distintos. Esta célula hipotética contiene cuatro cromosomas: un par de homólogos largos y un par de homólogos cortos. Las diferencias de tamaños entre distintos pares de cromosomas son frecuentes.

En la Figura 3-15, las partes 4 y 4' indican dos patrones distintos de segregación de alelos producidos por uniones diferentes del huso acromático a los centrómeros que se dan con igual frecuencia en la anafase I. La meiosis produce entonces cuatro cé-

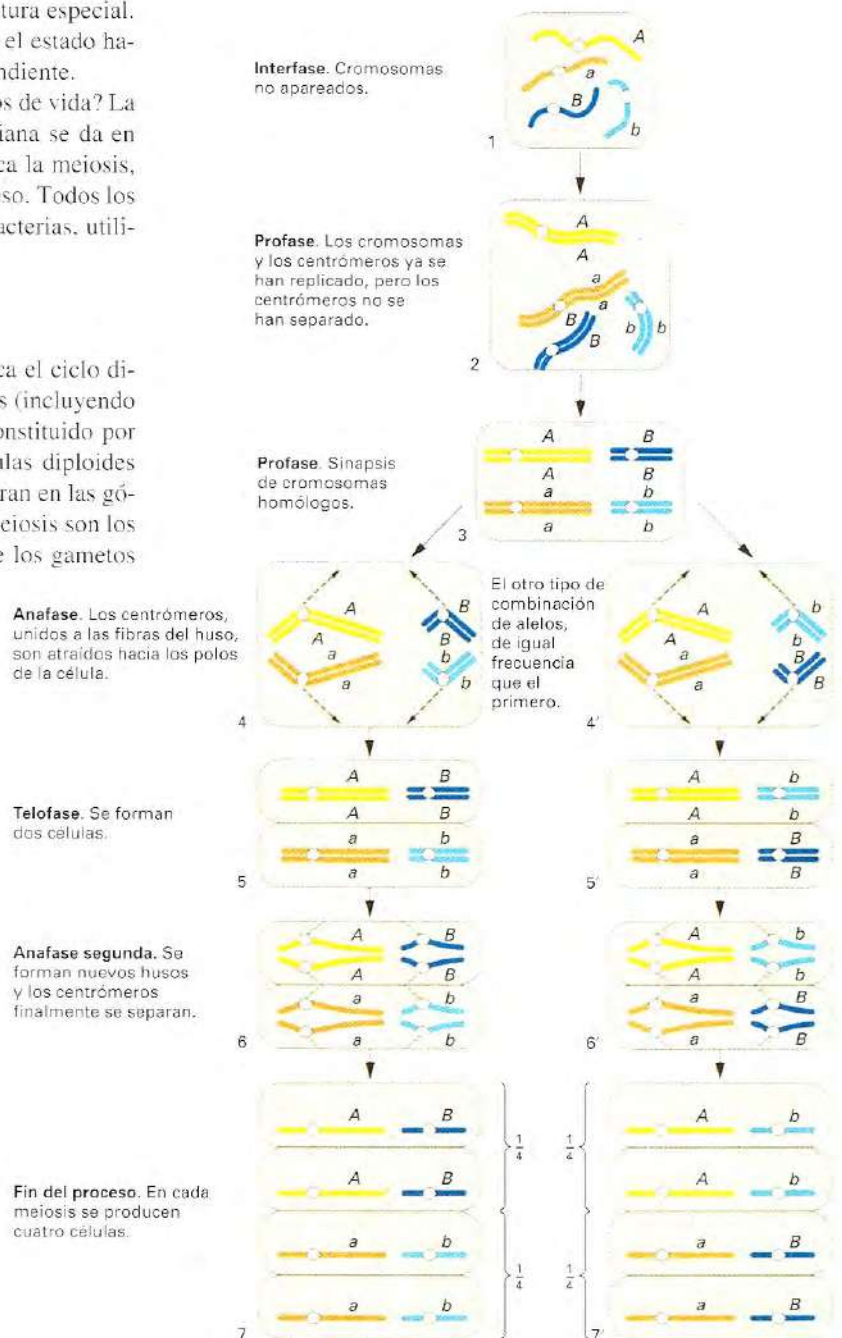


Figura 3-15. Meiosis en una célula diploide de genotipo $A/a ; B/b$. Se muestra cómo la segregación y la distribución al azar de diferentes parejas cromosómicas genera la razón gamética mendeliana 1:1:1:1.

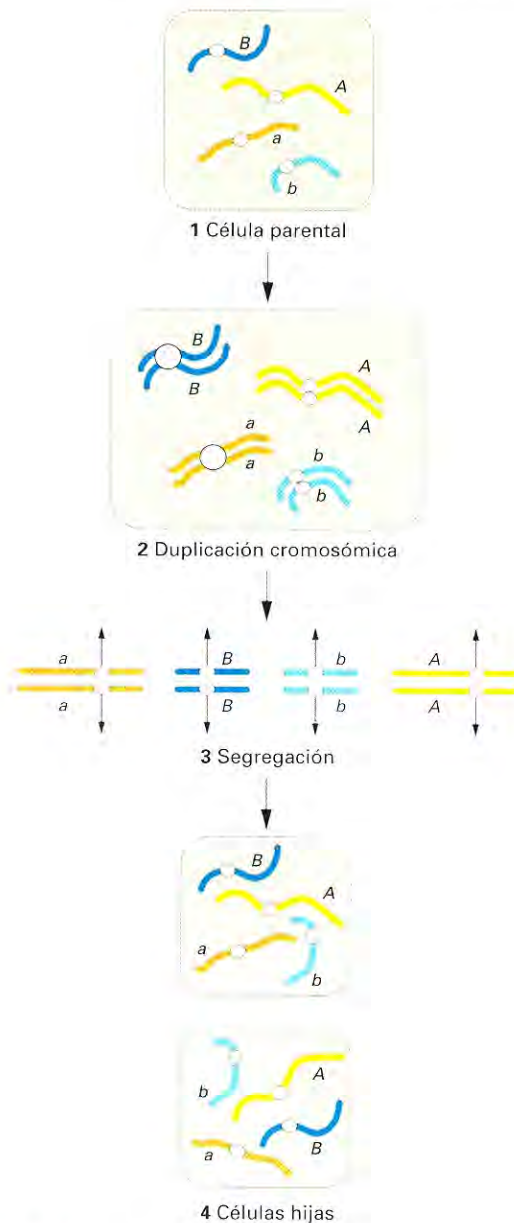


Figura 3-16. Mitosis de una célula diploide de genotipo $A/a ; B/b$. Cada gen heterocigótico se encuentra en un par cromosómico distinto.

lulas con los genotipos indicados en cada uno de los patrones de segregación. Puesto que los patrones de segregación 4 y 4' son igualmente frecuentes, los productos meióticos celulares de genotipos $A ; B$, $a ; b$, $A ; b$, y $a ; B$ se producen con la misma frecuencia. En otras palabras, la frecuencia de cada uno de estos cuatro genotipos es $\frac{1}{4}$. Esta distribución gamética es igual que la postulada por Mendel para un cruzamiento dihíbrido, y es la que insertamos en un extremo del diagrama de Punnett. La fusión al azar de estos gametos da lugar a la proporción fenotípica 9:3:3:1 en la F_2 .

El diagrama de la Figura 3-15 muestra exactamente cómo la conducta de los cromosomas da lugar a las proporciones mendelianas. Observe que la primera ley de Mendel (de la distribución igualitaria) describe lo que le ocurre a un par de alelos cuando la

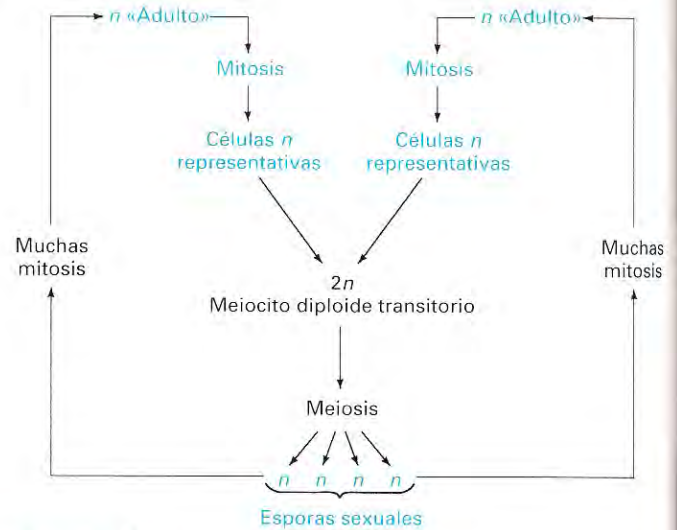


Figura 3-17. Ciclo de vida de un organismo haploide.

pareja de homólogos portadores de ellos se van a células distintas durante la primera división meiótica. Observe también que la segunda ley de Mendel (de la segregación independiente) es el resultado de la distribución independiente de cada pareja de cromosomas homólogos. La Figura 3-16 muestra la mitosis en el mismo individuo dihíbrido.

Haploides

La Figura 3-17 muestra un ciclo haploide básico. En este caso, el propio organismo es haploide. ¿Cómo puede producirse la meiosis en un organismo haploide? Después de todo, la meiosis supone el apareamiento de las dos dotaciones de cromosomas homólogos. La respuesta es que todos los organismos haploides que poseen meiosis pasan por un estado diploide transitorio que proporciona los meiocitos. En algunos casos, como en la levadura, se fusionan dos individuos adultos unicelulares haploides para producir un meiocito diploide que realiza entonces la meiosis. En otros casos, se fusionan células especializadas de distintos parentales para dar lugar a los meiocitos. Observe que estas células que se fusionan se llaman, apropiadamente, gametos, así que podemos ver que, en este caso, los gametos se producen por mitosis. Como es usual, la meiosis genera productos haploides, que se denominan **esporas sexuales**. En algunas especies, las esporas sexuales se convierten en adultos unicelulares; en otras, generan un individuo multicelular haploide, mediante mitosis sucesivas. Observe que un cruzamiento entre dos organismos haploides adultos supone una sola meiosis, mientras que el cruzamiento entre dos organismos diploides requiere una meiosis en cada progenitor. Como veremos después, esta simplicidad hace de los haploides unos organismos muy atractivos para el análisis genético. La mitosis de los haploides tiene lugar como se muestra en la Figura 3-18.

Analicemos un cruzamiento en un haploide concreto. Un organismo adecuado es *Neurospora crassa*, el hongo anaranjado del pan. Se trata de un organismo multicelular, en el cual las células se unen por sus extremos para formar cadenas de células,

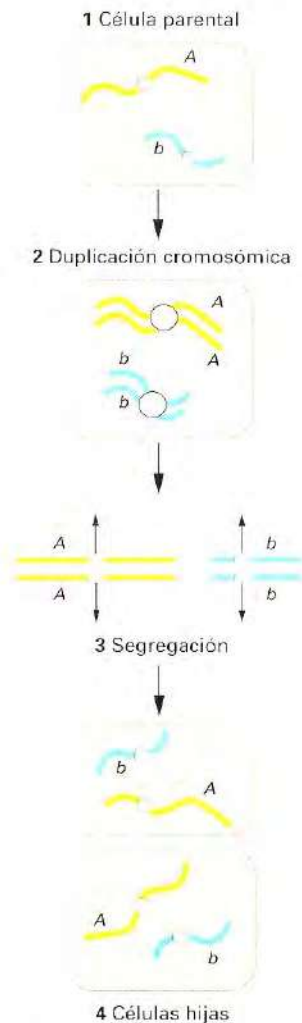


Figura 3-18. Mitosis en una célula haploide de genotipo $A; b$. Cada gen se encuentra en un cromosoma distinto.

o **hifas**. Las hifas penetran por el sustrato y también envían ramas aéreas que contienen unas células llamadas **conidios** (las esporas asexuales). Éstos se desprenden y dispersan para formar nuevas colonias o, alternativamente, actúan como gametos masculinos, fundiéndose con la estructura materna de un individuo distinto (Fig. 3-19), que ha de ser de un **tipo sexual** opuesto. En los hongos no existen sexos verdaderos y todos los cultivos haploides se desarrollan de forma similar. No obstante, las poblaciones contienen tipos sexuales distintos determinados genéticamente. En *Neurospora*, hay dos tipos sexuales denominados A y a , y la fase meiótica (o sexual) del ciclo de vida puede tener lugar sólo si se unen dos individuos haploides de tipo sexual distinto. Los tipos sexuales pueden considerarse como «sexos fisiológicos». Aunque esta definición no es del todo apropiada, resulta útil para enfatizar las diferencias no observables que se dan entre los dos tipos sexuales.

El gameto femenino queda dentro de un nudo especializado de hifas. Su núcleo haploide se empareja luego con un núcleo haploide masculino, sufriendo ambos varias divisiones mitóticas que dan lugar a numerosas parejas de núcleos. Los dos núcleos

de cada pareja se fusionan al final para formar los meiocitos diploides. Entonces tiene lugar la meiosis, generándose en cada meiocito cuatro núcleos haploides, que representan los cuatro productos meióticos. Por motivos desconocidos, los cuatro núcleos se dividen mitóticamente, dando como resultado ocho núcleos, que se convierten en ocho esporas sexuales con forma de balón de rugby, denominadas **ascosporas**. Las ascosporas son expulsadas desde un cuerpo fructífero con forma de botella, desarrollado a partir del nudo de hifas que contenía inicialmente el gameto femenino. Las ascosporas se pueden recoger y sembrar por separado en tubos de ensayo, donde cada una de ellas da lugar, por mitosis, a un nuevo individuo (Fig. 3-20).

¿Qué características podemos analizar en este organismo? Una es la coloración de los conidios, de la que se encuentran

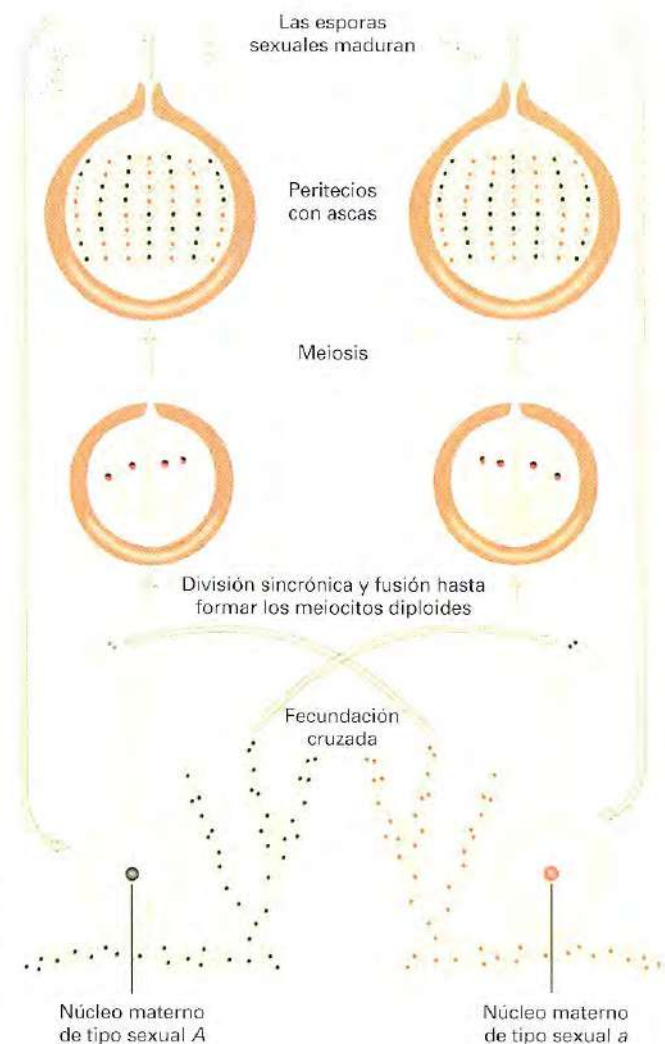


Figura 3-19. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*, el hongo anaranjado del pan. La autofecundación no es posible en esta especie: existen dos tipos sexuales, determinados por los alelos A y a de cierto gen. Un cruzamiento tendrá éxito sólo si es del tipo $A \times a$. Una espóra asexual del sexo opuesto se fusiona con un pelo receptivo, y un núcleo desciende a lo largo del pelo hasta emparejarse con un núcleo del nódulo de células. Los núcleos A y a se aparean, sufren entonces una serie de mitosis sincrónicas y, finalmente, se fusionan para formar los meiocitos diploides.

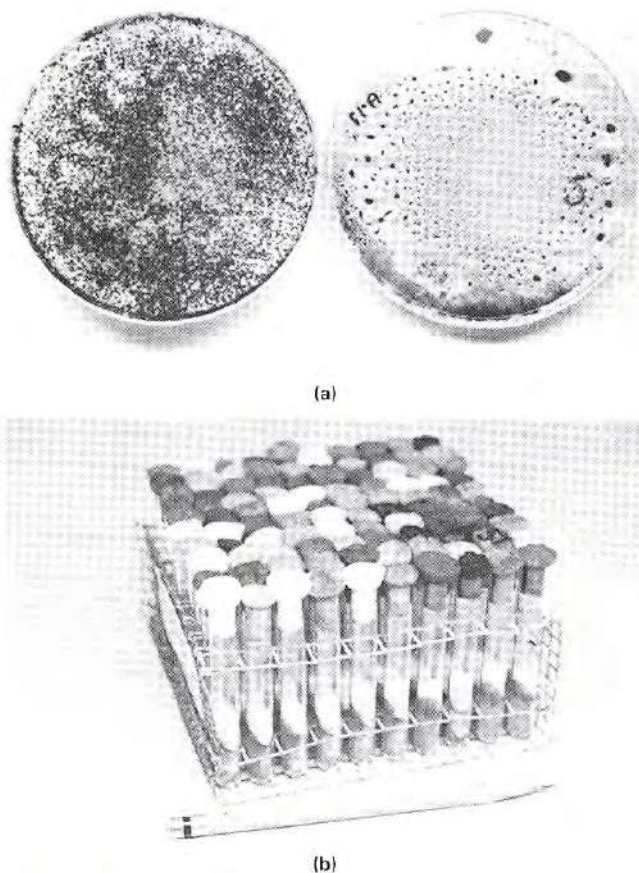


Figura 3-20. (a) Cruzamiento de *Neurospora* realizado en una placa de Petri (a la izquierda). Las numerosas esferas pequeñas de color negro son cuerpos fructíferos en los que se ha producido la meiosis; las ascosporas (esporas sexuales) fueron proyectadas y aparecen como una película fina de polvo sobre la humedad condensada en la tapa (que ha sido levantada y colocada boca arriba a la derecha de la placa de Petri). (b) Una gradilla de cultivos descendientes, producido cada uno de ellos a partir de una ascospora aislada. (Anthony Griffiths.)



Figura 3-21. Variantes de color del hongo *Neurospora* determinadas genéticamente. El tipo silvestre, de color naranja, aparece a la derecha, junto a las variantes, empezando por la izquierda, albina, amarilla y marrón. Sus genotipos son: silvestre ($al^+ \cdot ylo^+ \cdot ad^+$), albino ($al^- \cdot ylo^+ \cdot ad^+$), amarillo ($al^+ \cdot ylo^- \cdot ad^+$) y marrón ($al^+ \cdot ylo^+ \cdot ad^-$). (Anthony Griffiths.)

variantes respecto al tipo silvestre anaranjado. La Figura 3-21 muestra un cultivo normal y cultivos de algunas de las variantes de color, incluyendo una albina. Otra posible característica es la morfología de las colonias, para la cual se conocen dos fenotipos diferentes, uno normal, de apariencia esponjosa, y otro más compacto, denominado colonial.

Si cruzamos un cultivo esponjoso y anaranjado con otro colonial y albino de tipo sexual contrario, y aislamos y cultivamos 100 ascosporas, encontraremos las siguientes proporciones de fenotipos:

- 25 % esponjosos y anaranjados
- 25 % coloniales y albinos
- 25 % esponjosos y albinos
- 25 % coloniales y anaranjados

En total, la mitad de la descendencia es esponjosa y la mitad colonial. Por tanto, esta diferencia fenotípica debe estar determinada por dos alelos de un mismo gen que han segregado igualmente en la meiosis. Podemos llamar a estos alelos col^+ (esponjoso) y col (colonial). Lo mismo es cierto para el otro carácter: la mitad son de color anaranjado y la otra mitad albinos, de modo que la diferencia fenotípica en el color está también determinada por una pareja de alelos, que podemos denominar al^+ (anaranjado) y al (albino). Los cultivos parentales y los cuatro tipos de descendientes pueden representarse como:

		Parentales		
$col^+ ; al^+$		×		$col ; al$
(esponjoso, anaranjado)				(colonial, albino)
Descendientes				
$col^+ ; al^+$				(esponjoso, anaranjado)
$col ; al$				(colonial, albino)
$col^+ ; al$				(esponjoso, albino)
$col ; al^+$				(colonial, anaranjado)

La proporción 1:1:1:1 es el resultado de la segregación independiente, como se muestra en el esquema ramificado siguiente:

$$\begin{array}{lcl}
 \frac{1}{2} col^+ & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} \frac{1}{2} al^+ \longrightarrow \frac{1}{4} col^+ ; al^+ \\ \frac{1}{2} al \longrightarrow \frac{1}{4} col^+ ; al \end{array} \\
 \frac{1}{2} col & \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} & \begin{array}{l} \frac{1}{2} al^+ \longrightarrow \frac{1}{4} col ; al^+ \\ \frac{1}{2} al \longrightarrow \frac{1}{4} col ; al \end{array}
 \end{array}$$

Vemos, pues, que las leyes de Mendel son válidas incluso en un organismo tan sencillo como *Neurospora*.

Alternancia haploide/diploide

El ciclo de vida de un organismo con alternancia de generaciones consta de dos fases: una diploide y otra haploide. Generalmente, una de las fases es más prominente que la otra. De modo que, lo que todos reconocemos como una planta de helecho es el estado de **esporofito** diploide, fase en que tiene lugar la meiosis y se producen las esporas sexuales. No obstante, el organismo tiene otro estado independiente haploide, pequeño y fotosintético, más difícil de reconocer sobre el suelo del bosque, el **gametofito**. En el musgo, la planta verde es el estado haploide y el

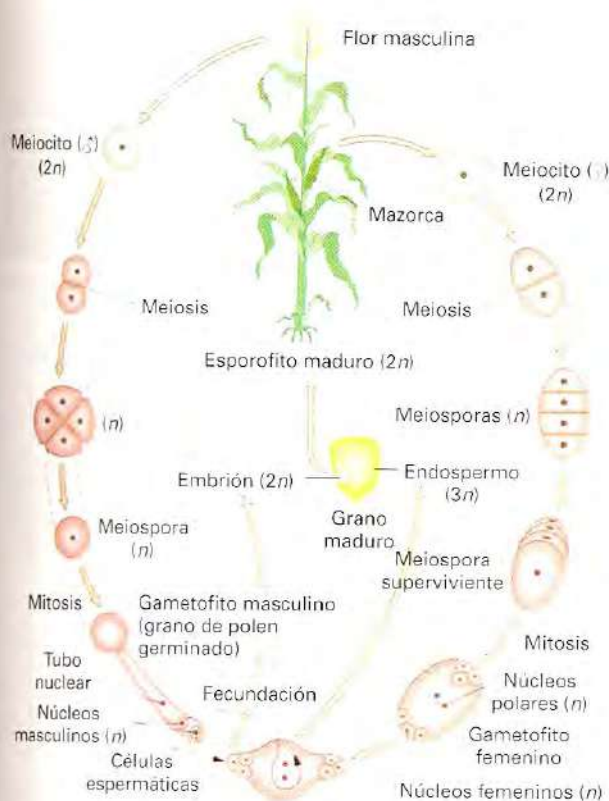


Figura 3-22. Alternancia de generaciones en el maíz. El gametofito masculino se desarrolla a partir de un meiocito del órgano correspondiente (borla superior). El gametofito femenino se produce a partir de un meiocito de la mazorca. Una célula espermática del gametofito masculino se fusiona con el núcleo ovular del gametofito femenino, formándose así un cigoto diploide que se desarrolla hasta formar un embrión. La otra célula espermática se funde con dos núcleos centrales del gametofito femenino, formándose una célula triploide (3n) que genera el tejido del endospermo que rodea al embrión. El endospermo constituye el alimento del embrión durante la germinación de la semilla. ¿Qué parte del esquema representa la fase haploide? ¿Qué parte representa la fase diploide?

tallo marrón que crece de la planta es un esporofito diploide independiente que, en realidad, vive parasitándola.

En las plantas con flor, la forma verde principal es el esporofito diploide. Los gametofitos haploides de las plantas con flor son extremadamente pequeños y dependientes de la forma diploide. Dichos gametofitos se encuentran en la flor. Cuando ocurre la meiosis en los meiocitos de la antera y el ovario, los productos haploides resultantes se llaman **esporas**. Las esporas sufren unas pocas divisiones mitóticas y generan un gametofito haploide multicelular pequeño. El gametofito masculino de las plantas con semilla es conocido como grano de polen. La Figura 3-22 muestra cómo en las plantas con flor, las células del gametofito actúan en la fecundación como óvulo o célula espermática. La Figura 3-23 muestra un esquema general del ciclo con alternancia de generaciones.

En musgos y helechos, las células espermáticas, que son muy móviles, deben desplazarse de un gametofito a otro, sobre una película de agua, para efectuar la fecundación. Veamos un posible cruzamiento a realizar con un musgo. El carácter a estudiar puede manifestarse en el gametofito o en el esporofito. Suponga

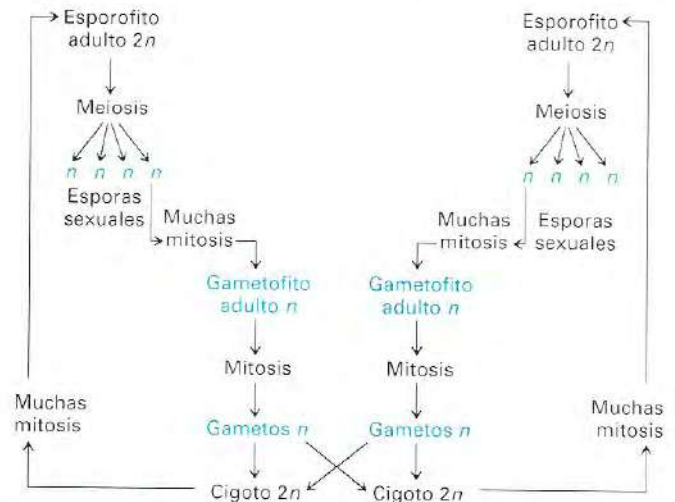


Figura 3-23. Alternancia de las fases diploide y haploide en el ciclo de vida de las plantas.

que tenemos un gen cuyos alelos afectan a las «hojas» del gametofito, siendo w un alelo que produce hojas de borde ondulado y w^+ un alelo que produce hojas de borde liso. Suponga también que otro gen distinto afecta al color del esporofito, siendo r responsable del color rojo y r^+ de la coloración marrón normal. Fecundamos un gametofito de hojas lisas (portador, sin manifestarlo, del alelo r) con gametos masculinos de un gametofito de hojas de borde ondulado y portador de r^+ (Fig. 3-24). Por tanto, el cruzamiento es $w^+; r \times w; r^+$.

Sobre el propio gametofito, se desarrolla un esporofito diploide de genotipo $w^+/w; r^+/r$ que resulta ser de color marrón (ya que el rojo es recesivo). Las células de este esporofito actúan como meiocitos, y se producen esporas sexuales (productos de la meiosis) en las siguientes proporciones:

- 25 % $w^+; r^+$
- 25 % $w^+; r$
- 25 % $w; r^+$
- 25 % $w; r$



Figura 3-24. Esquema de la herencia mendeliana en un cruzamiento hipotético en un musgo. Las alternativas w^+ o w se manifiestan sólo en la fase de gametofito haploide, mientras que r^+ o r se manifiestan sólo en la fase de esporofito diploide.

Sólo podremos observar el carácter de la hoja en estos gametofitos. Para averiguar qué individuos son r^+ y cuáles r , deberán realizarse los cruzamientos adecuados entre ellos.

De nuevo, las leyes de Mendel describen fielmente un fenómeno hereditario. Se trata, simplemente, de no perder de vista el grado de ploidía de cada fase del ciclo de vida y observar la aparición de proporciones mendelianas sencillas.

COROLARIO

Las leyes mendelianas son aplicables a los productos de la meiosis de cualquier organismo, siendo su formulación general la siguiente:

1. En la meiosis, los alelos de un gen se distribuyen igualitariamente entre los productos haploides resultantes.
2. En la meiosis, los alelos de un gen segregan de manera independiente de los alelos de otros genes que están situados en pares cromosómicos distintos.

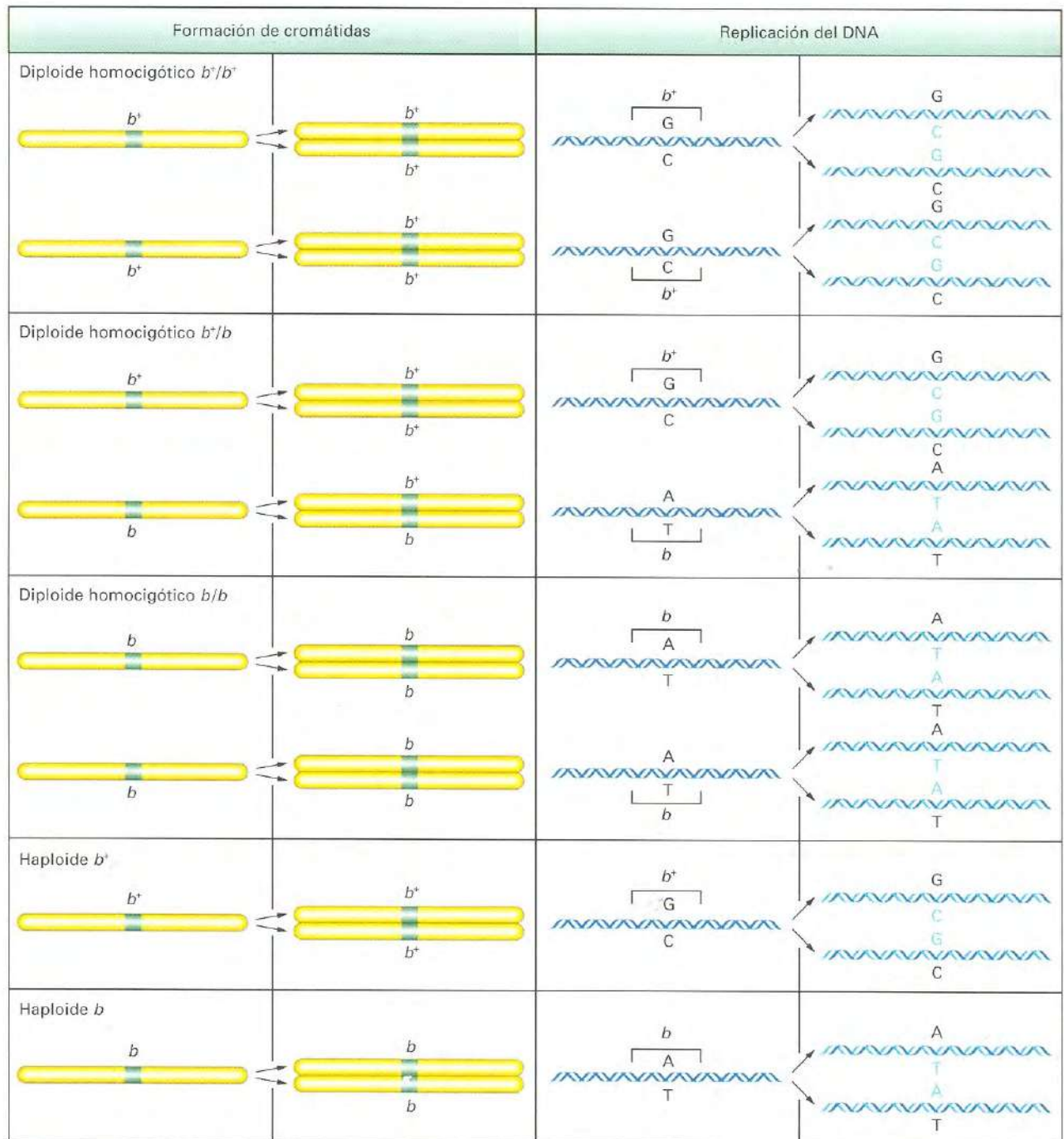


Figura 3-25. Relación entre la formación de cromátidas y la replicación subyacente del DNA. Se representan tres células diploides y dos células haploides de genotipos diferentes. El alelo silvestre se denomina b^+ y su alelo mutante b . El alelo mutante b se ha formado por sustitución de un par de bases G C del tipo silvestre por un par de bases A T en el alelo mutante.

Bases moleculares de la mitosis y la meiosis

Sabemos que, a nivel genético, un cromosoma es una sola molécula de DNA. La célula y la división celular son posibles gracias a la replicación del DNA, que tiene lugar durante la fase S previa a la división. Dicha replicación genera dos cromátidas herma-

nas. La Figura 3-25 muestra la formación de las cromátidas a nivel del DNA. Los acontecimientos de mitosis y meiosis pueden representarse, a nivel del DNA, como muestra la Figura 3-26 para un individuo diploide heterocigótico.

La adhesión y el apareamiento de los cromosomas son también propiedades moleculares claves. Tanto en la mitosis como

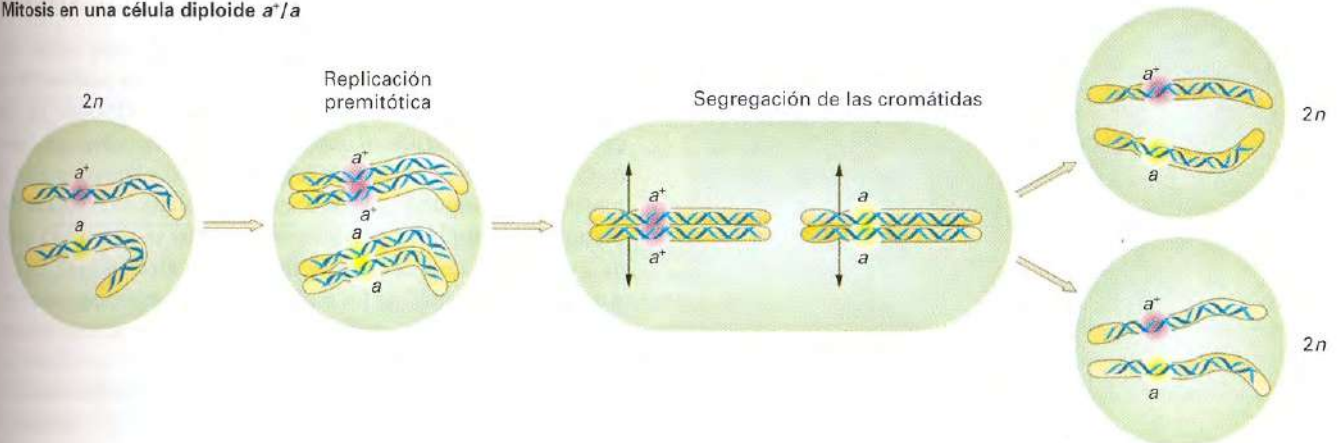
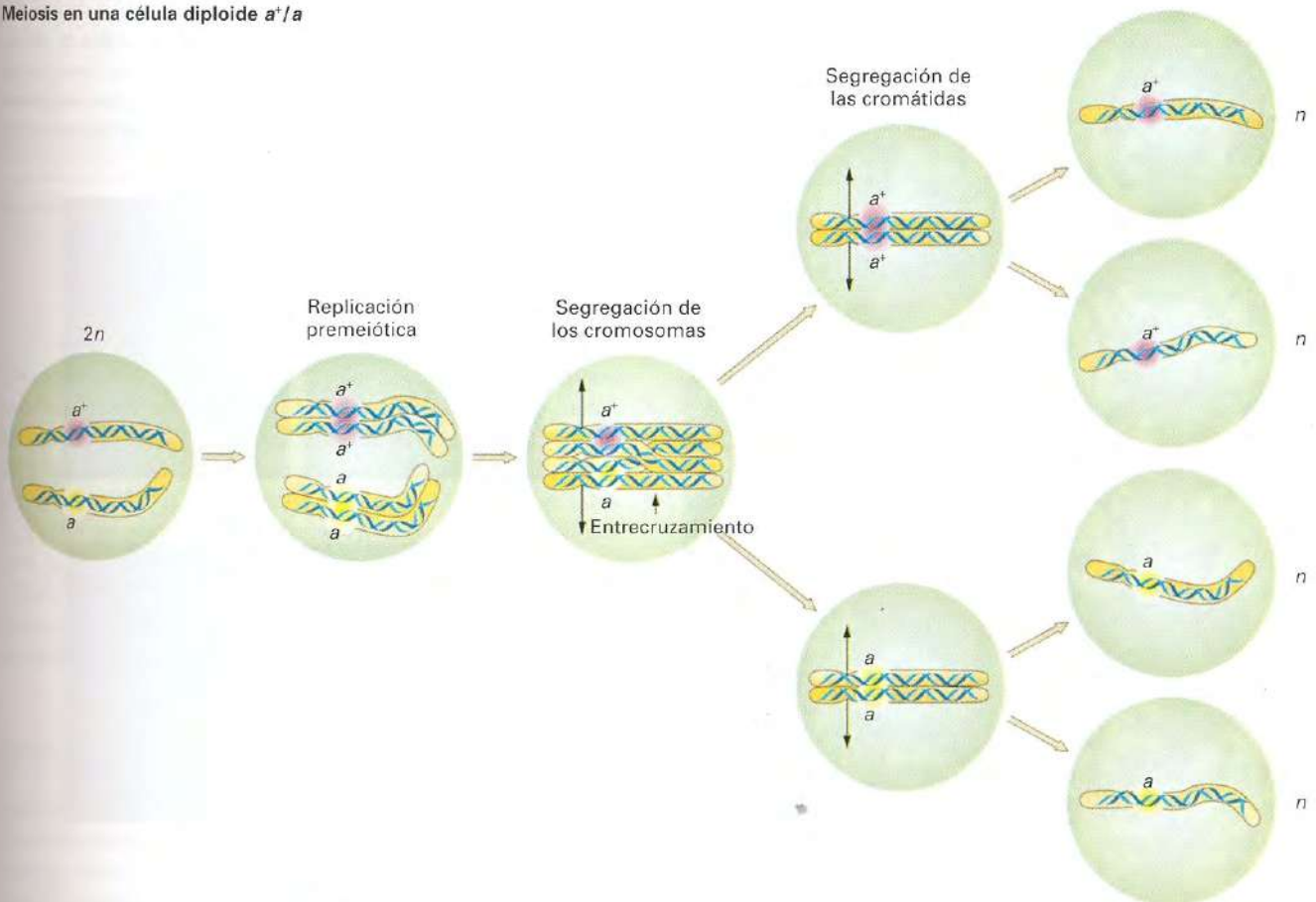
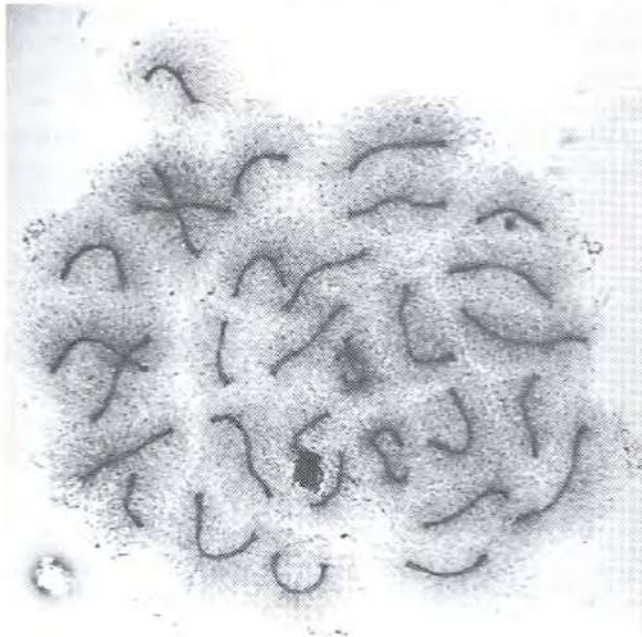
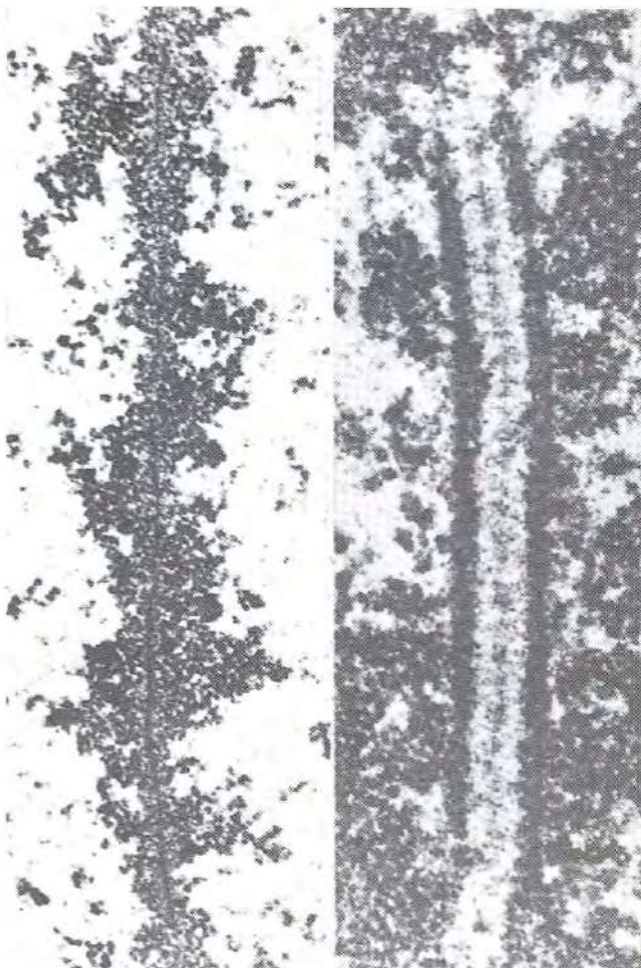
Mitosis en una célula diploide a^+/a Meiosis en una célula diploide a^+/a 

Figura 3-26. Representación simplificada de la mitosis y la meiosis al nivel del DNA. En ambos casos, se parte de una célula diploide de genotipo a^+/a .



(a)

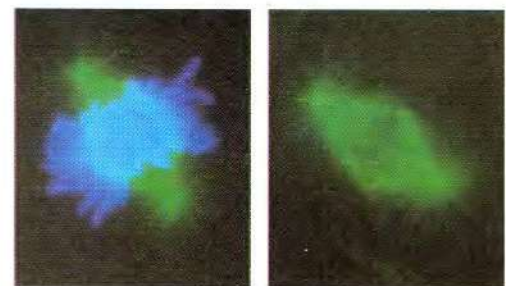


(b)

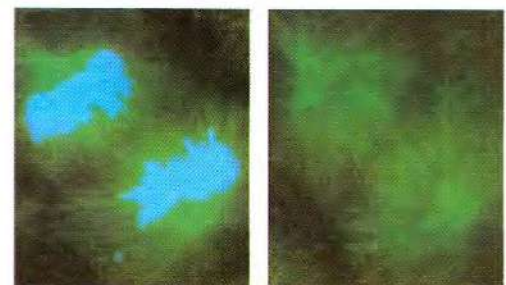
Figura 3-27. Complejo sinaptonémico. (a) En *Hyalophora cecropia*, un gusano de seda, el número cromosómico normal de los machos es 62, produciéndose 31 complejos sinaptonémicos. Uno de los cromosomas (*centro*) del individuo que se muestra aquí, está representado tres veces. Este tipo de cromosoma se denomina *trivalente*. El DNA está organizado en lazos regulares alrededor del complejo sinaptonémico. La estructura densa y negra es el nucléolo. (b) Complejo sinaptonémico normal de *Lilium tyrinum*. Observe (*a la derecha*) los dos elementos laterales del complejo sinaptonémico y observe también (*a la izquierda*) un cromosoma no apareado, mostrando el núcleo central correspondiente a uno de los elementos laterales (Por cortesía de Peter Moens.)

en la meiosis, las cromátidas hermanas se mantienen unidas a lo largo de su longitud hasta que se separan en la anafase de la mitosis o en la anafase II de la meiosis. La **adhesión de las cromátidas hermanas** se debe a unas proteínas adhesivas especiales. El emparejamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis se consigue gracias a unos ensamblajes moleculares denominados **complejos sinaptonémicos**, que se sitúan a lo largo de y entre los cromosomas homólogos apareados (Fig. 3-27). Aunque la existencia de los complejos sinaptonémicos se conoce desde hace tiempo, el funcionamiento exacto de estas estructuras todavía se está estudiando.

Las fibras del huso acromático son las que proporcionan la fuerza motriz de la mitosis y la meiosis (Fig. 3-28). Durante la división nuclear, se forman las fibras del huso de manera que éste queda paralelo al eje de la célula y conecta ambos polos. Las fibras del huso están constituidas por polímeros de una proteína llamada tubulina. El centrómero del cromosoma es una secuencia específica de DNA que es esencial para el movimiento de las cromátidas durante la división celular. Cada centrómero actúa como un sitio de unión para un complejo multiproteico



(a)



(b)

Figura 3-28. Marcado fluorescente del huso acromático (en verde) y de los cromosomas (en azul) durante la mitosis; (a) antes de que las cromátidas se separen; (b) durante la separación de las cromátidas. (De J. C. Waters, R. W. Cole y C. L. Rieder, *J. Cell Biol.* 122, 1993, 361. Cortesía de C. L. Rieder.)

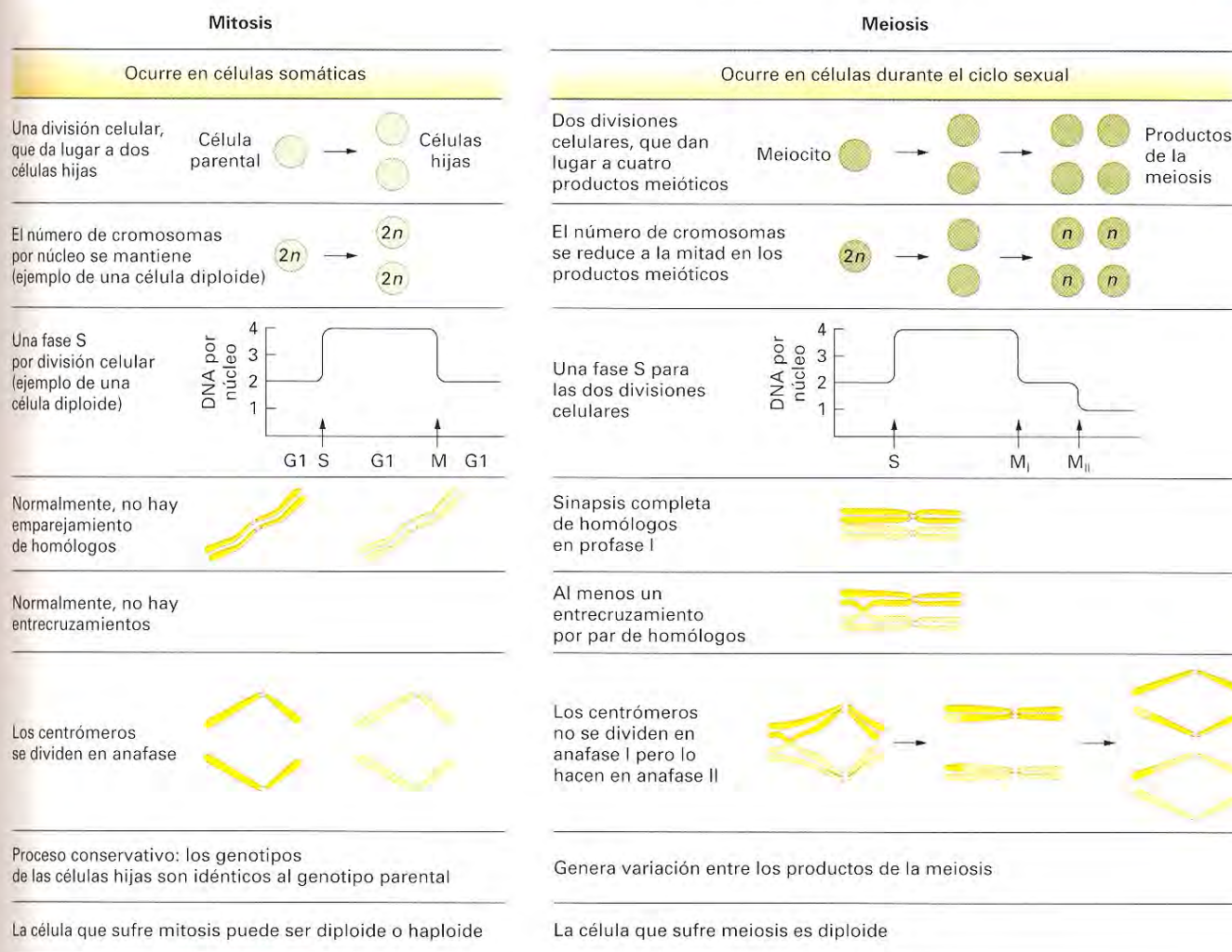


Figura 3-29. Comparación de los aspectos fundamentales de la mitosis y la meiosis.

denominado **cinetocoro**. A su vez, los cinetocoros funcionan como sitios de unión para los microtúbulos. Uno o varios microtúbulos de un polo se unen a un cinetocoro, y un número similar del polo opuesto se une al otro cinetocoro. Entonces, las fibras del huso tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos. El aparato del huso y los complejos cinetocoro-centrómoro son, pues, los que determinan la fidelidad de la división nuclear.

En la Figura 3-29 se comparan los acontecimientos clave de la mitosis y la meiosis. En los próximos apartados, analizaremos en mayor profundidad cómo se estructura un cromosoma.

Topografía de la dotación cromosómica

Hasta ahora, hemos considerado los cromosomas como estructuras vermiformes que contienen DNA (por tanto, los genes). En realidad, los cromosomas varían mucho en su tamaño y forma, y poseen algunas características que ayudan a los citogenetistas a identificar en muchos casos cromosomas específicos. En este apartado, consideraremos las características que permiten distin-

guir una dotación cromosómica de otra, así como un determinado cromosoma de otro.

Número de cromosomas

Las distintas especies poseen un número de cromosomas característico. El Cuadro 3-1 muestra algunos ejemplos. El número de cromosomas se presenta en un intervalo muy amplio, que va desde dos cromosomas en algunas plantas con flor hasta varios centenares en ciertos helechos.

Tamaño cromosómico

Los cromosomas de un genoma concreto pueden diferir considerablemente en tamaño. En la especie humana, por ejemplo, hay una diferencia de cerca de cuatro veces entre el tamaño del cromosoma 1 (el mayor) y el del cromosoma 21 (el más pequeño), como se observa en el Cuadro 3-2. Al estudiar los cromosomas de una especie, los citogenetistas tienen dificultades para identificarlos únicamente por su tamaño, pero esta característica sí les

CUADRO 3-1. Número de pares de cromosomas de diferentes especies de plantas y animales

Nombre común	Especie	Número de pares de cromosomas	Nombre común	Especie	Número de pares de cromosomas
Mosquito	<i>Culex pipiens</i>	3	Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	21
Mosca doméstica	<i>Musca domestica</i>	6	Hombre	<i>Homo sapiens</i>	23
Cebolla de jardinería	<i>Allium cepa</i>	8	Patata	<i>Solanum tuberosum</i>	24
Sapo	<i>Bufo americanus</i>	11	Vaca	<i>Bos taurus</i>	30
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	12	Burro	<i>Equus asinus</i>	31
Rana	<i>Rana pipiens</i>	13	Caballo	<i>Equus caballus</i>	32
Caimán	<i>Alligator mississippiensis</i>	16	Perro	<i>Canis familiaris</i>	39
Gato	<i>Felis domesticus</i>	19	Pollo	<i>Gallus domesticus</i>	39
Ratón doméstico	<i>Mus musculus</i>	20	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	52
Mono rhesus	<i>Macaca mulatta</i>	21			

CUADRO 3-2. Cromosomas humanos

Grupo	Número	Representación esquemática	Longitud relativa*	Índice centromérico*
Cromosomas grandes				
A	1		8.4	48 (M)
	2		8.0	39
	3		6.8	47 (M)
B	4		6.3	29
	5		6.1	29
Cromosomas medios				
C	6		5.9	39
	7		5.4	39
	8		4.9	34
	9		4.8	35
	10		4.6	34
	11		4.6	40
	12		4.7	30
D	13		3.7	17 (A)
	14		3.6	19 (A)
	15		3.5	20 (A)
Cromosomas pequeños				
E	16		3.4	41
	17		3.3	34
	18		2.9	31
F	19		2.7	47 (M)
	20		2.6	45 (M)
G	21		1.9	31
	22		2.0	30
Cromosomas sexuales				
	X		5.1 (grupo C)	40
	Y		2.2 (grupo G)	27 (A)

* Porcentaje respecto a la longitud total conjunta de una dotación haploide de 22 autosomas.

† Porcentaje que ocupa el brazo corto respecto a la longitud total del cromosoma. Los cuatro cromosomas más metacéntricos están señalados con una (M); los cuatro más acrocéntricos, con una (A).

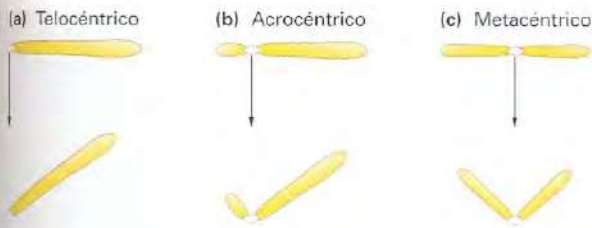


Figura 3-30. Clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero. Un cromosoma telocéntrico tiene su centrómero en el extremo; cuando el cromosoma se desplaza hacia un polo de la célula, durante la anafase de la división celular, tiene el aspecto de un pequeño bastón. Un cromosoma acrocéntrico tiene su centrómero entre el extremo y el centro del cromosoma; durante el desplazamiento de la anafase, el cromosoma tiene forma de J. Un cromosoma metacéntrico tiene su centrómero en el centro y durante la anafase tiene forma de V.

sirve para clasificarlos en distintos grupos. De modo que pueden identificarse anomalías en, por indicar un ejemplo, «uno de los cromosomas del grupo de tamaño A».

Centrómeros

El centrómero es la región del cromosoma a la que se unen las fibras del huso. La región centromérica se observa normalmente como un estrechamiento y su posición define la relación entre las longitudes de los dos brazos cromosómicos. Esta relación es una característica muy útil para la identificación de los cromosomas (Cuadro 3-2). Según las posiciones de sus centrómeros, los cromosomas se clasifican en **telocéntricos** (con el centrómero en un extremo), **acrocéntricos** (cerca del extremo) o **metacéntricos** (en el centro).

La posición del centrómero no sólo determina la relación de longitud entre los brazos, sino también la forma de los cromosomas cuando migran a los polos opuestos en la anafase. En este período, los cromosomas pueden tener formas distintas, desde un bastoncillo hasta forma de J o de V (Fig. 3-30). En ciertos organismos, como en los lepidópteros, los centrómeros son «difusos», debido a que las fibras del huso se unen a lo largo de todo el cromosoma.

Posición de los organizadores nucleolares

Los **núcleolos** son estructuras esféricas que contienen RNA ribosómico, un componente importante de los ribosomas. Los distintos organismos difieren con respecto a los núcleolos, que varían en número desde sólo uno hasta muchos por dotación cromosómica. Las células diploides de muchas especies sólo tienen un par de núcleolos. Éstos están asociados a estrechamientos de los cromosomas denominados **organizadores nucleolares** (Fig. 3-31), que se encuentran en posiciones muy específicas dentro de la dotación cromosómica. Los organizadores nucleolares contienen los genes que determinan los RNA ribosómicos. Las posiciones de los núcleolos, al igual que las posiciones de los centrómeros, son marcadores muy útiles para el análisis citogenético.



Figura 3-31. El núcleo y el organizador nucleolar del hongo haploide *Neurospora*. (Namboori Raju.)

Distribución de los cromómeros

Los **cromómeros** son engrosamientos localizados a lo largo del cromosoma, parecidos a las cuentas de collar, que se observan durante la **profase de la mitosis y la meiosis**. Las posiciones de los cromómeros tienden a ser fijas en los cromosomas homólogos. Aunque los cromómeros son muy buenos marcadores, su naturaleza molecular es desconocida.

Patrones de heterocromatina

Cuando los cromosomas se tratan con compuestos químicos que reaccionan con el DNA, como el reactivo de Feulgen, se ponen de manifiesto regiones de distinta intensidad de tinción. Las regiones que se tiñen muy intensamente se conocen como **heterocromatina** y las regiones que se tiñen menos se llaman **eucromatina**. Esta distinción refleja el grado de compactación o enrollamiento del DNA en el cromosoma. La heterocromatina puede ser **constitutiva** o **facultativa**. La heterocromatina constitutiva es una característica permanente de un sitio específico del cromosoma y, en este sentido, es una propiedad hereditaria. La Figura 5-15 muestra algunos ejemplos significativos de heterocromatina constitutiva en el tomate. Como su nombre indica, la heterocromatina facultativa aparece a veces, que no siempre, en una posición cromosómica determinada. Los patrones de heterocromatina y eucromatina de los cromosomas constituyen buenos marcadores citogenéticos.

Patrón de bandas

Ciertos métodos especiales de tinción cromosómica han puesto de manifiesto la existencia de series intrincadas de bandas (rayas transversales) en una amplia gama de organismos. Las posiciones y tamaños de las bandas son muy específicas de cada cromosoma. Uno de los patrones de bandas básicos es el producido por el reactivo Giemsa, un colorante que tiñe el DNA tras la digestión proteolítica suave de los cromosomas. Dicho reactivo genera un patrón de regiones teñidas débilmente (bandas G claras) y

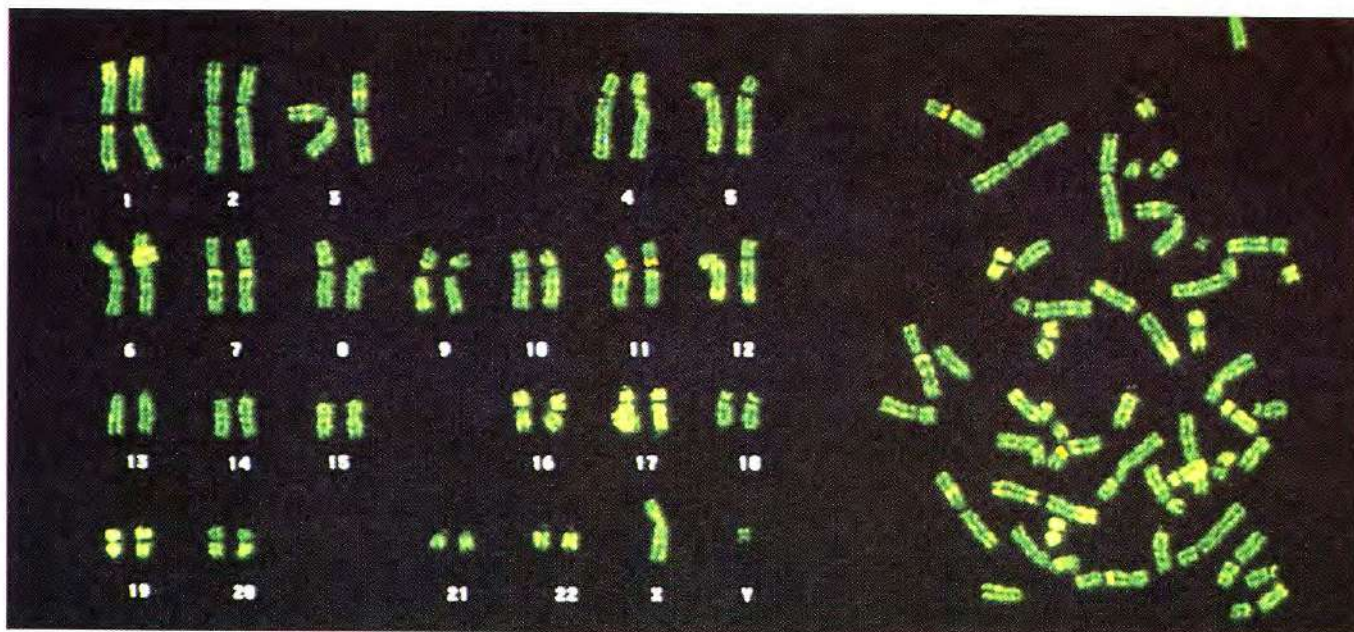


Figura 3-32. Cromosomas de un hombre teñidos con Giemsa para mostrar las bandas.

regiones teñidas intensamente (bandas G oscuras). La Figura 3-32 muestra un ejemplo de los patrones de bandas G en los cromosomas humanos. Estos patrones de bandas son constantes dentro de cada especie. En la dotación completa de 23 cromosomas humanos, existen aproximadamente 850 bandas G oscuras visibles en la metafase mitótica. Estas bandas resultaron muy útiles para subdividir las distintas regiones de los cromosomas, de modo que a cada una de ellas se le ha asignado un número específico.

Se pensaba que la diferencia entre las bandas claras y oscuras estaba relacionada con las diferentes proporciones de bases: las bandas G claras serían relativamente ricas en pares GC y las bandas G oscuras en pares AT. Sin embargo, en la actualidad se piensa que la diferencia en la proporción de bases es demasiado pequeña para dar cuenta de los distintos patrones de bandas. Parece que el factor crucial es la densidad de empaquetamiento de la cromatina: las regiones G oscuras se encuentran más densamente empaquetadas, con enrollamientos más estrechos, que dan lugar a una mayor densidad de DNA para la incorporación del colorante.

Además, se han establecido algunas otras conclusiones. Por ejemplo, estudios con desoxinucleótidos marcados han demostrado que las bandas G claras corresponden a zonas de replicación temprana. Más aún, si se emplea RNA mensajero polisómico (poli-ribosómico, que corresponde a los genes que se están transcribiendo activamente) para marcar los cromosomas *in situ*, la mayor parte de la marca se incorpora en las regiones G claras, lo cual sugiere que estas regiones contienen la mayoría de los genes activos. De este análisis, se concluyó que la densidad de genes activos es mayor en las bandas G claras.

Nuestra visión de las bandas cromosómicas se basa sobre todo en cómo se tiñen los cromosomas durante la metafase mitótica. Sin embargo, los dominios revelados por las bandas metafásicas deben estar presentes también durante la interfase, en las mismas posiciones relativas, formen bandas o no.

Un sistema especial de bandas que los citogenetistas han utilizado durante muchos años es característico de los denominados **cromosomas politénicos** de ciertos órganos de insectos dípteros. Los cromosomas politénicos se desarrollan de la siguiente manera. En tejidos secretorios, como los tubos de Malpighi, recto, intestino, almohadillas de las patas y glándulas salivales de dípteros, los cromosomas replican muchas veces su DNA sin que éste se separe en diferentes cromátidas. A medida que el cromosoma aumenta su número de réplicas, se alarga y se engrosa. Este manojito de réplicas da lugar al cromosoma politénico. Tomemos como ejemplo a *Drosophila*. El número $2n$ de este insecto es ocho, pero las células de los órganos especiales sólo contienen cuatro cromosomas politénicos. Hay cuatro cromosomas, y no ocho, porque durante este proceso especial de replicación, los miembros de cada par homólogo se unen de forma inesperada. Además, los cuatro cromosomas politénicos quedan unidos a una estructura denominada **cromocentro**, que es una fusión de las regiones heterocromatínicas localizadas alrededor de los centrómeros de los cuatro pares de cromosomas. El cromocentro de los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila* se muestra en la Figura 3-33, donde las letras L y R se refieren a los brazos derecho e izquierdo, asignados de forma arbitraria.

A lo largo de un cromosoma politénico se observan **bandas transversales**. Estas bandas son mucho más numerosas que las bandas Q, G o R, observándose por centenares en cada cromosoma. Las bandas varían en anchura y morfología, de modo que el patrón con el que aparecen en cada cromosoma es único y característico. Además, hay regiones que a veces aparecen hinchadas (**puffs** o **engrosamientos cromosómicos**) y a veces muy distendidas (**anillos de Balbiani**). Estas regiones corresponden a zonas de síntesis de RNA. Estudios moleculares recientes han demostrado que en cualquier región cromosómica de *Drosophila* hay más genes que bandas politénicas y, por tanto, las bandas

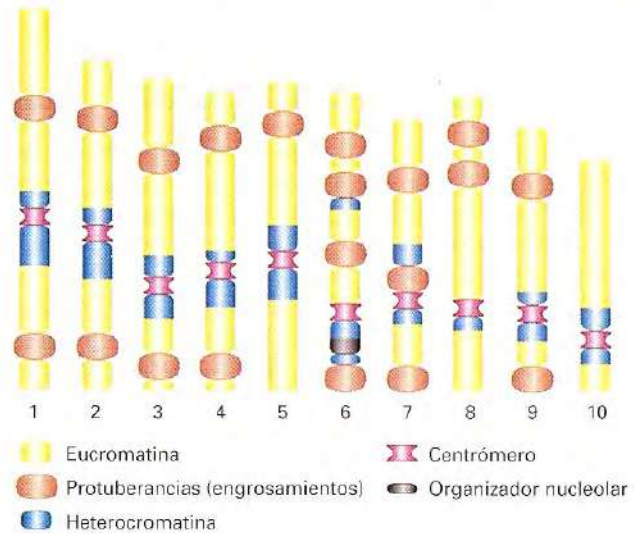
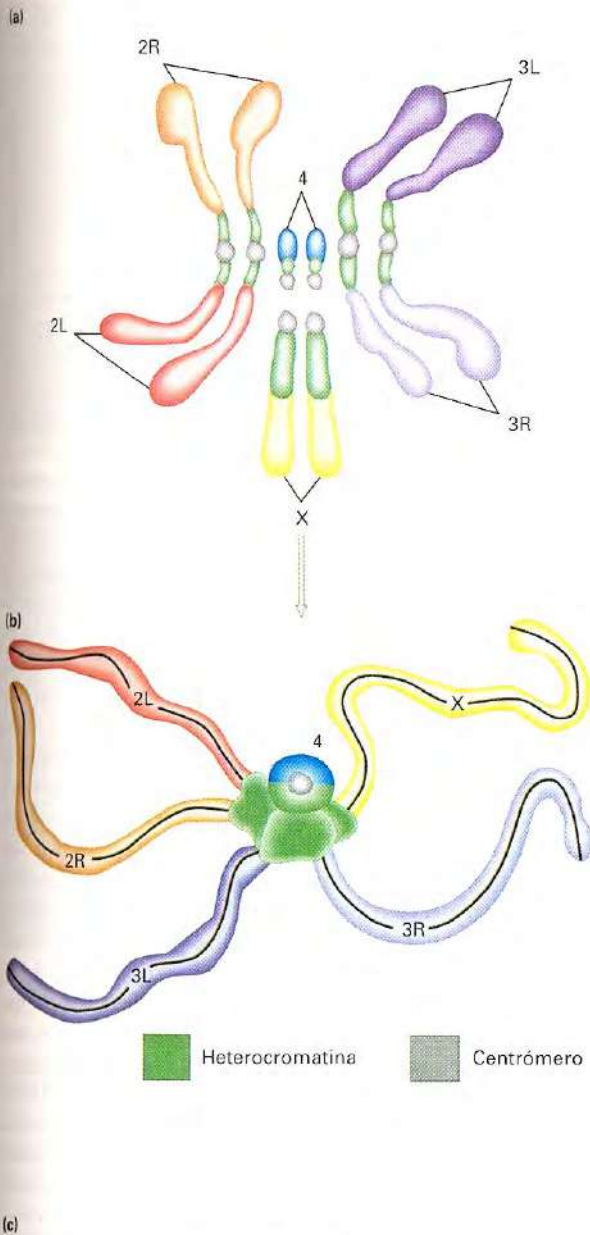


Figura 3-34. Los marcadores que caracterizan a los cromosomas del maíz.

no se corresponden con genes. De modo similar, no está claro el significado del patrón de bandas de los cromosomas de animales vertebrados. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, se piensa que las bandas cromosómicas están relacionadas con diferencias en el grado de condensación del DNA y que la mayoría de los genes activos residen en las regiones de bandas claras.

Mediante la utilización conjunta de los marcadores cromosómicos disponibles, los citogenetistas pueden distinguir los cromosomas individuales de muchas especies. Como ejemplo, la Figura 3-34 muestra un mapa de los marcadores cromosómicos del genoma de maíz. Observe cómo éstos permiten distinguir con el microscopio cada uno de los 10 cromosomas.

COROLARIO

Propiedades como la longitud, la relación de tamaño entre los brazos, la heterocromatina, el número y la posición de los engrosamientos, el número y la localización de los organizadores nucleolares y la distribución de bandas permiten identificar a cada uno de los cromosomas de la dotación que caracteriza a una especie.

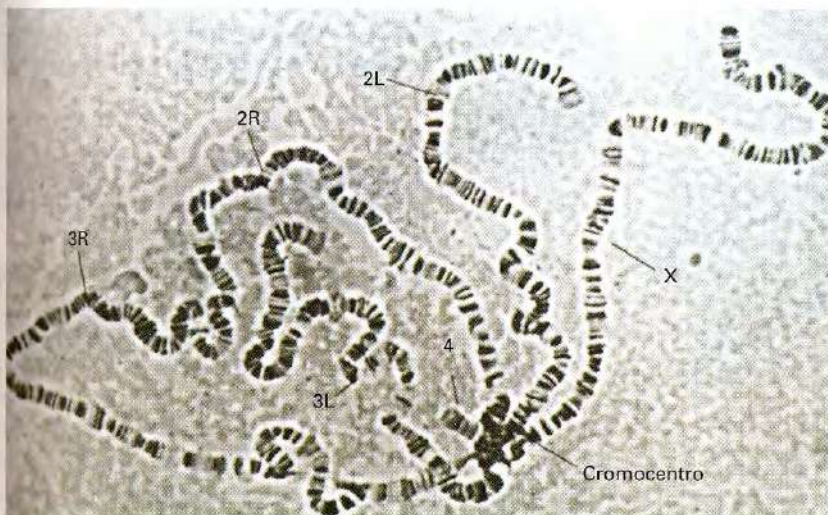


Figura 3-33. Los cromosomas politénicos forman un cromocentro en una glándula salival de *Drosophila*. (a) Cromosomas en metafase mitótica, con los brazos representados por distintos sombreados. (b) La heterocromatina se condensa para formar el cromocentro. (c) Fotografía de cromosomas politénicos. (Tom Kaufman.)

Estructura tridimensional de los cromosomas

¿Cuánto DNA hay en una dotación cromosómica? El único cromosoma de *Escherichia coli* contiene alrededor de 1.3 mm de DNA. En claro contraste, una célula humana contiene unos 2 m de DNA (1 m por dotación cromosómica). El cuerpo humano está constituido por unas 10^{13} células y, por tanto, contiene en total unos 2×10^{13} m de DNA. Podemos hacernos una idea de la extrema longitud de este DNA si lo comparamos con la distancia de la Tierra al Sol, que es de 1.5×10^{11} metros. Ello significa que el DNA de nuestro cuerpo podría extenderse hasta el Sol y volver casi 50 veces. Este hecho peculiar nos permite asegurar que el DNA de los eucariotas debe estar empaquetado de forma muy eficaz. En realidad, el empaquetamiento ocurre en el núcleo, donde los dos metros de DNA de cualquier célula humana se condensan en 46 cromosomas, todos ellos dentro de un núcleo que sólo mide 0.006 mm de diámetro. En este apartado, vamos a describir lo que sabemos sobre la estructura y la función de los genes eucarióticos en el «mundo real» del núcleo. Así que, en lugar de imaginarnos las maquinarias de replicación y transcripción desplazándose a lo largo de las líneas rectas que hemos empleado para representar los genes en los Capítulos 1 y 2, ahora tenemos que entender el hecho de que todos esos procesos tienen lugar en lo que se parecería mucho al interior de un ovillo de lana densamente enrollado.

Una molécula de DNA por cromosoma

Si se rompen células eucarióticas y se examina el contenido de sus núcleos al microscopio electrónico, los cromosomas aparecen como masas de fibras con forma de espagueti, de unos 30 nm de

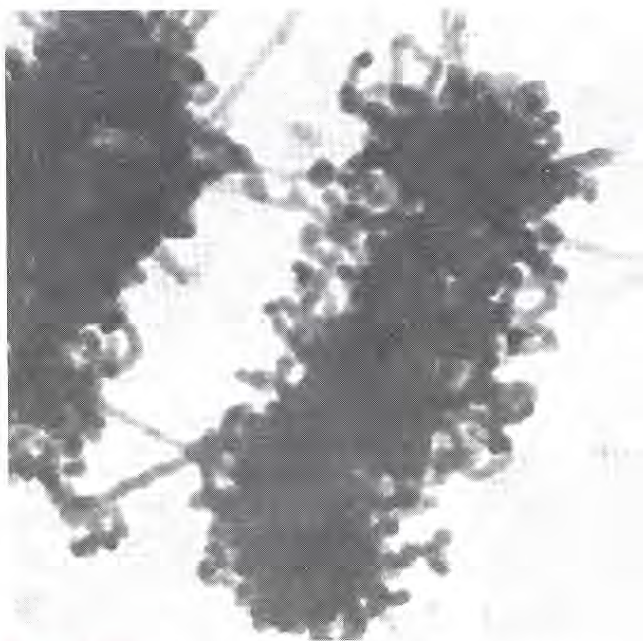


Figura 3-35. Micrografía electrónica de cromosomas en metafase de una abeja. Cada cromosoma parece estar compuesto por una fibra continua de 30 nm de ancho. (De E. J. DuPraw, *Cell and Molecular Biology*. Copyright © 1968, Academic Press.)

diámetro. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 3-35. En los años sesenta, Ernest DuPraw estudió cuidadosamente tales cromosomas, comprobando que no había extremos libres que salieran de la masa fibrilar. Esto sugiere que cada cromosoma es una sola fibra, larga y fina, plegada de alguna manera sobre sí misma. Si la fibra se corresponde de algún modo con una molécula de DNA, llegamos a la conclusión de que cada cromosoma está formado por una única molécula de DNA densamente empaquetada.

En 1973, Ruth Kavenoff y Bruno Zimm realizaron ciertos experimentos que demostraban que, muy probablemente, eso era lo que ocurría. Analizaron DNA de *Drosophila* mediante una técnica de enrollamiento viscoelástico que permitía determinar el tamaño de las moléculas de DNA en solución, midiendo sus propiedades de enrollamiento elástico. En palabras sencillas, el procedimiento equivale a estirar una goma enrollada para medir luego cuánto tiempo tarda en volver al estado completamente enrollado. El DNA se estira revolviéndolo en solución con una pequeña paleta, y se deja enrollar luego hasta su estado relajado. Se sabe que el tiempo que tarda en volver a enrollarse es proporcional al tamaño de las moléculas más largas presentes en la solución. En su estudio en *Drosophila melanogaster*, que tiene cuatro pares de cromosomas, Kavenoff y Zimm obtuvieron el valor de 41×10^9 dalton para la molécula más larga del genoma silvestre. A continuación, analizaron dos reorganizaciones cromosómicas de distinto tamaño y demostraron que la viscoelasticidad era proporcional al tamaño. Parecía como si, ciertamente, el cromosoma fuera una molécula de DNA continua que va de un extremo al otro a través del centrómero. Kavenoff y Zimm también fueron capaces de componer varias micrografías electrónicas de moléculas de DNA de alrededor de 1.5 cm de largo, presumiblemente correspondientes cada una a un cromosoma de *Drosophila* (Fig. 3-36).

Hoy día, los genetistas pueden demostrar directamente que ciertos cromosomas contienen una sola molécula de DNA, mediante la electroforesis de campo pulsante, una técnica que permite separar moléculas largas de DNA por su tamaño. Si el DNA de un organismo cuyos cromosomas son relativamente pequeños, caso de *Neurospora*, se hace correr en este aparato durante períodos de tiempo largos, el número de bandas que se separan en el gel es igual al de cromosomas (en el caso de *Neurospora*,

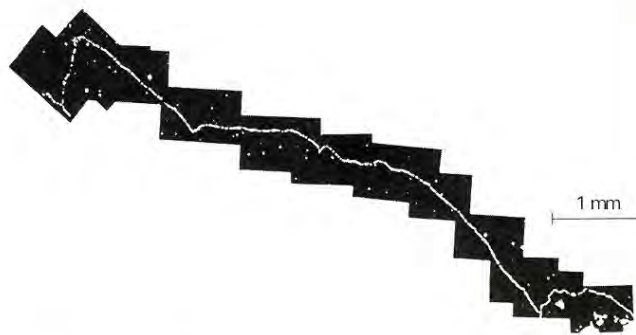


Figura 3-36. Composición de varias micrografías electrónicas de una molécula de DNA de *Drosophila*. La longitud total es de 1.5 cm y se cree que corresponde a un cromosoma completo. (De R. Kavenoff, L. C. Klotz y B. H. Zimm, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38, 1974, 4.)

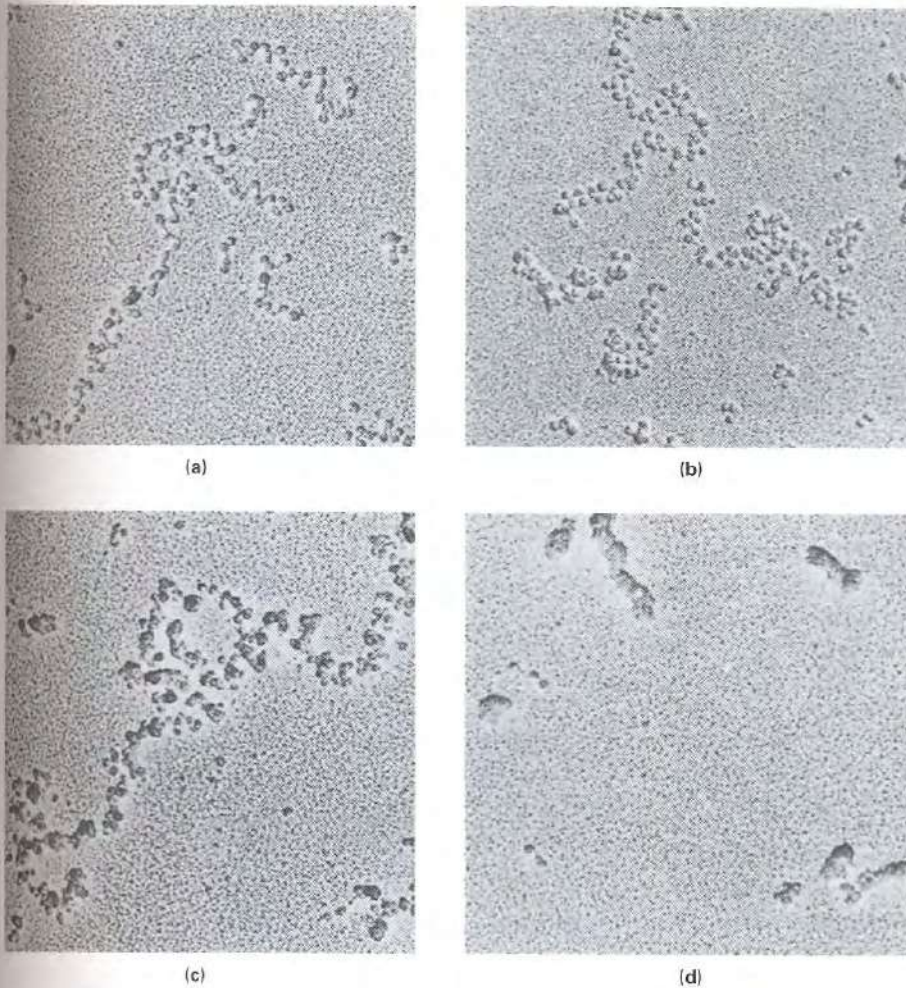


Figura 3-37. Micrografías electrónicas realizadas por Fritz Thomas y Theo Koller donde se demuestra la condensación de la cromatina con concentraciones crecientes de sales. Con concentraciones muy bajas de sal, como en (a), la cromatina forma una fibra relajada de unos 10 nm de espesor; los nucleosomas se encuentran unidos por tramos cortos de DNA. A una fuerza iónica cercana a la de las condiciones fisiológicas, como en (d), la cromatina forma una fibra más gruesa, de unos 30 nm de espesor. El origen de este solenoide puede deducirse mediante el examen de la cromatina con fuerzas iónicas crecientes intermedias, como en (b) y (c). Esta estructura se produce por un enrollamiento compacto del filamento nucleosómico. La cromatina se observa aquí aumentada 80 000 veces.

siete). Si cada cromosoma contuviera más de una molécula de DNA, se esperaría que el número de bandas fuera mayor que el número de cromosomas. Esta técnica de separación no puede emplearse con organismos cuyos cromosomas son muy grandes (caso del hombre y *Drosophila*) porque las moléculas de DNA resultan demasiado largas para moverse a través del gel, pero, así y todo, todas las pruebas apuntan al principio general de que un cromosoma contiene una única molécula de DNA.

COROLARIO
Cada cromosoma eucariótico contiene una sola molécula de DNA, larga y plegada.

Función de las histonas en el empaquetamiento del DNA

Hemos visto que, siendo la longitud de una molécula de DNA cromosómico mayor que la longitud del propio cromosoma, debe existir un sistema eficaz de empaquetamiento. ¿Cuáles son los mecanismos exactos que permiten empaquetar el DNA en cromosomas? ¿Cómo se convierte la larguísima cinta de DNA

en el bastoncillo relativamente grueso y denso que es el cromosoma? La mezcla completa de materiales de los que se componen los cromosomas recibe el nombre general de **cromatina**. Se trata de DNA y proteínas. Si se extrae la cromatina y se somete a diferentes concentraciones de sal, se observan al microscopio electrónico diferentes grados de compactación o condensación (Fig. 3-37). A baja concentración salina, se observa una estructura de unos 10 nm de diámetro que se asemeja a un collar de perlas. El hilo que une las cuentas del collar puede digerirse con la enzima DNasa, de lo que podemos inferir que el hilo está formado por DNA. Las cuentas del collar se denominan **nucleosomas**, que consisten en complejos de DNA y unas proteínas cromosómicas especiales que reciben el nombre de **histonas**. La estructura de las histonas está notablemente conservada en el amplio abanico de los organismos eucarióticos y los nucleosomas siempre están formados por un octámero compuesto por dos unidades de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El DNA da dos vueltas alrededor de cada octámero, como se aprecia en la Figura 3-38a. Cuando se aumenta la concentración de sal, el collar de nucleosomas asume gradualmente una forma enrollada denominada **solenoides** (Fig. 3-38b). El solenoide que aparece *in vitro* tiene un diámetro de 30 nm y corresponde, proba-

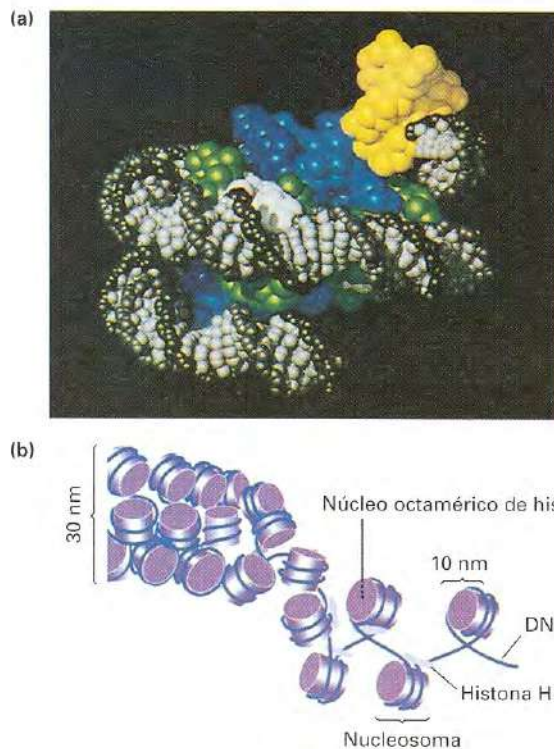
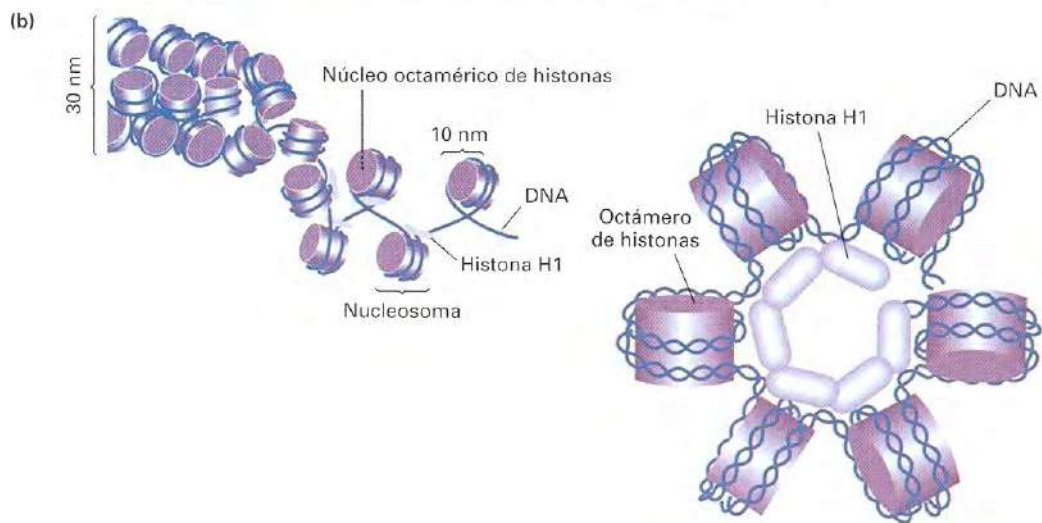


Figura 3-38. (a) Modelo de un nucleosoma que muestra al DNA enrollado dos veces alrededor de un octámero de histonas. (b) Dos vistas de un modelo del solenoide de 30 nm con los octámeros de histonas representados como discos de color morado. (Izquierda) Vista lateral parcialmente desenrollada. (Derecha) Vista desde un extremo. Se muestra a la histona adicional H1 rodeando a la parte central de la espiral, donde probablemente actúa como estabilizador. Al ir aumentando la concentración de sales, los nucleosomas se cierran para formar el solenoide, con seis nucleosomas por vuelta. (Parte a, Alan Wolfe y Van Moudrianakis. Parte b, de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed, Copyright © 1995. Scientific American Books.)



blemente, a las estructuras en forma de espagueti que aparecen *in vivo* y que se mostraron en la Figura 3-35. El solenoide mantiene su forma mediante otra histona, H1, que se dispone en el centro a lo largo del eje de la estructura, como se muestra en la Figura 3-38b.

Vemos, pues, que para conseguir este primer nivel de empaquetamiento, el DNA se enrolla alrededor de las histonas, que actúan, de alguna forma, como bobinas de hilo. Un nuevo enrollamiento genera la conformación en solenoide. Sin embargo, se requiere un grado adicional de compactación para convertir a los solenoides en la estructura tridimensional que llamamos *cromosoma*.

Enrollamientos de orden superior

Muchos estudios citogenéticos indican claramente que los cromosomas están visiblemente enrollados; la Figura 3-39 muestra

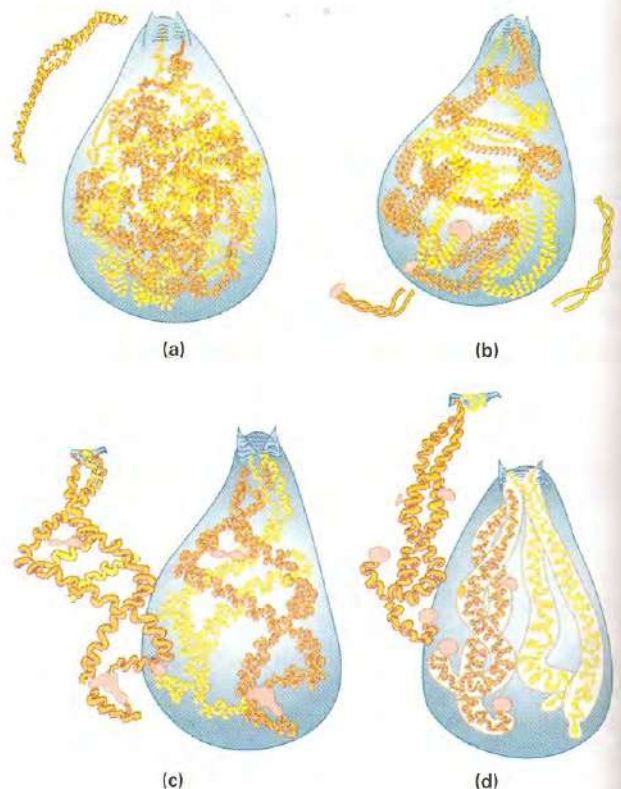


Figura 3-39. Dibujo que representa los cromosomas de un protozoo en la profase meiótica y que muestra los distintos grados de enrollamiento y superenrollamiento visibles con el microscopio óptico. Se muestran dos cromosomas grandes, uno en color amarillo y otro en naranja; la progresión es de (a) a (d). (a) Se observa enrollamiento, aunque son aparentes las zonas duplicadas. (b) La duplicación está bastante avanzada. (c) Comienza el superenrollamiento. (d) El superenrollamiento está bastante avanzado. (De L. R. Cleveland, «The Whole Life Cycle of Chromosomes and Their Coiling Systems», *Transactions of the American Philosophical Society*, 39, 1949, 1.)

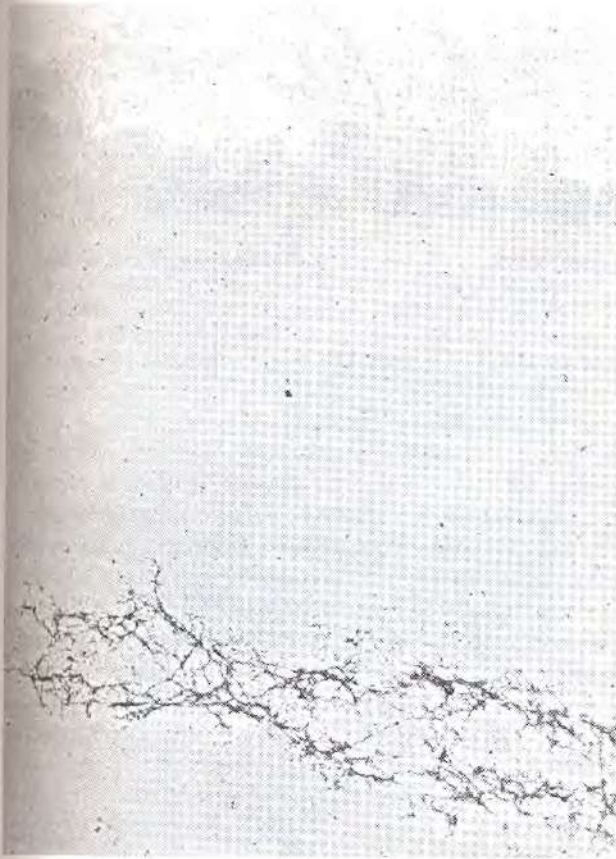


Figura 3-40. Micrografía electrónica de un cromosoma en metafase de una célula humana cultivada. Observe el armazón interno, a partir del cual las cadenas de DNA se extienden hacia fuera. No se aprecian extremos visibles en la parte más externa. Incluso a mayor aumento, se observa claramente que cada lazo comienza y termina cerca de la misma región del esqueleto. (De W. R. Baumbach y K. W. Adolph, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.)

un buen ejemplo del núcleo de un protozoo. Mientras que el diámetro de los solenoides es de 30 nm, el diámetro de estos elementos enrollados es el mismo que el del cromosoma durante la división celular, frecuentemente unos 700 nm. ¿Qué produce estos superenrollamientos? Una pista interesante se obtiene al observar cromosomas a los que hemos desprovisto de histonas por métodos químicos. Tras este tratamiento, los cromosomas presentan un cuerpo central densamente teñido, formado por proteínas no histónicas y denominado **armazón interno**, como se ve en la Figura 3-40 y en la micrografía electrónica de la portada de este capítulo. Proyectándose lateralmente a partir del armazón, se observan los lazos de DNA. A mayor aumento, en las micrografías electrónicas queda claro que cada lazo de DNA comienza y termina en el armazón. El armazón interno está compuesto básicamente por la enzima topoisomerasa II, que es capaz de pasar una cadena de DNA a través de otra que ha sido previamente cortada. Evidentemente, el armazón interno organiza la compleja madeja de DNA durante la replicación, evitando los posibles problemas derivados del desenrollamiento de las cadenas de DNA en ese momento crucial. En cualquier caso, está bien establecido que existe un armazón en los cromosomas eucarióticos y que parece ser un elemento de organización fundamental de dichos cromosomas.

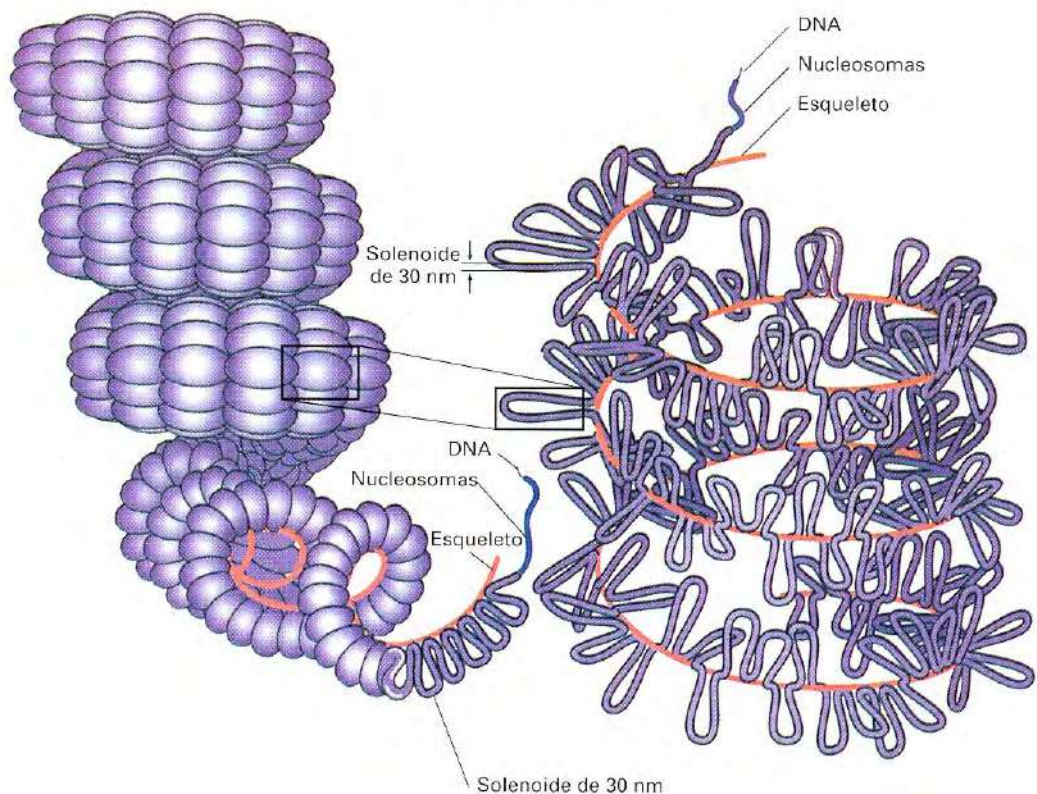


Figura 3-41. Modelo de la estructura del cromosoma. A la izquierda se muestra un enrollamiento compacto, que representaría la metafase; en este caso, los lazos están muy densamente empaquetados y sólo se observa su parte exterior. En los extremos libres, los solenoides se muestran desenrollados, para dar una idea de la escala relativa. A la derecha se muestra una estructura superenrollada más relajada, como se observa en la interfase.

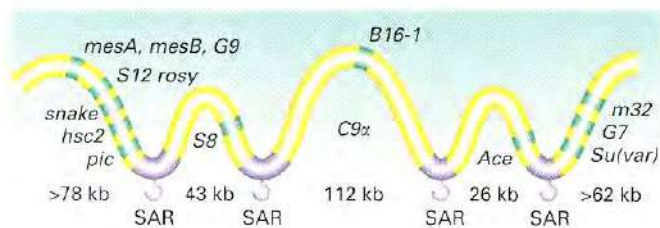


Figura 3-42. Algunos dominios de un lazo, cartografiados en *Drosophila*. Se muestran varios loci genéticos y las regiones de unión al armazón interno (SAR).

Volvamos ahora a la cuestión de cómo se produce el superenrollamiento del cromosoma. Las mejores pruebas sugieren que los solenoides se organizan en lazos que emanan de la matriz central del armazón que, a su vez, tiene forma de espiral. Una idea general de esta estructura aparece en la Figura 3-41, que ofrece una representación de un cromosoma poco enrollado de una célula en interfase y de un cromosoma enrollado de forma más compacta durante la metafase. ¿Cómo se unen los lazos al esqueleto? Parece que hay regiones especializadas del DNA denominadas **regiones de unión al armazón** (SAR, del inglés *Scaffold Attachment Regions*). Pruebas de ello son las siguientes. Si se trata la cromatina sin histonas con enzimas de restricción, los lazos de DNA se liberan del esqueleto, pero ciertas regiones especiales permanecen unidas al mismo. Estas regiones son resistentes a la digestión con exonucleasas y se ha demostrado que hay proteínas unidas a ellas. En el caso de *Drosophila*, cuando se eliminan las proteínas mediante digestión con proteasas, se demuestra que las regiones de DNA que estaban unidas a dichas proteínas contienen secuencias conocidas por ser específicas para la unión de la topoisomerasa. Es probable, pues, que estas regiones sean las SAR que unen los lazos al armazón. Algunos lazos concretos de *Drosophila* que han sido cartografiados aparecen en la Figura 3-42. El tamaño de estos lazos varía entre 4.5 y 112 Kb. Las SAR están sólo en zonas del DNA que no se transcriben.

COROLARIO

En los niveles progresivos de empaquetamiento cromosómico,

1. El DNA se enrolla sobre los nucleosomas, que actúan como bobinas de hilo.
2. La ristra de nucleosomas se enrolla formando un solenoide.
3. El solenoide forma lazos anclados a un esqueleto central.
4. El esqueleto unido a los lazos se dispone en un solenoide gigante.

Naturaleza de la heterocromatina y la eucromatina

¿Cuál es la base molecular de las regiones teñidas intensamente llamadas *heterocromatina* y de las teñidas con menos intensidad llamadas *eucromatina* (Fig. 3-43)? Experimentos de cartografía cromosómica demuestran que la mayoría de los genes activos se detectan mediante mutaciones situadas en la eucromatina. La eucromatina se tiñe con menos intensidad porque está empaquetada de forma más relajada, y la idea general es que éste es el estado más compatible con la transcripción y la actividad génica. En la

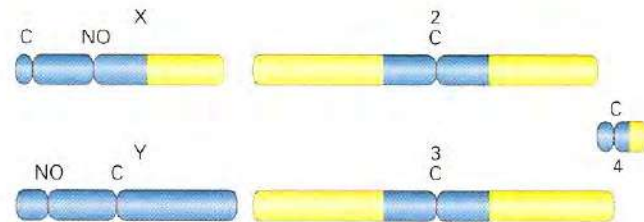


Figura 3-43. Posiciones que ocupa la heterocromatina en *Drosophila*. C representa los centrómeros y NO los organizadores nucleolares. El cromosoma 2 contiene una constricción cromosómica secundaria. La heterocromatina se representa en tono más oscuro (en azul). (De A. Hilliker y C. B. Sharp, *Chromosome Structure and Function*, J. P. Gustafson y R. Appels, eds. Plenum, 1988, pág. 91-95.)

mayoría de los organismos, la heterocromatina aparece flanqueando los centrómeros, pero algunos cromosomas completos, como el cromosoma Y de *Drosophila*, son heterocromáticos.

Los estudios más completos sobre genética de la heterocromatina se han realizado en *Drosophila*. Algunos genes esenciales de este organismo están situados en la heterocromatina, aunque se desconoce la función de la mayoría de dichos genes. La fracción de heterocromatina de *Drosophila* en la cual se cartografían genes es sólo 1/100 de la fracción de eucromatina de *Drosophila* que se cartografía como genes. Por tanto, existen largos tramos de DNA entre los genes funcionales. Observe que existe una clara diferencia en la actividad génica de las dos clases de cromatina.

Si pensamos en la arquitectura de los cromosomas, una pregunta de interés es en qué difiere la heterocromatina de la eucromatina y, más importante, cómo se mantiene esta diferencia. En primer lugar, como hemos visto, la diferencia es el grado de condensación. No se sabe si esta diferencia es similar a la que existe entre cromosomas interfásicos y metafásicos (en otras palabras, una diferencia en la intensidad del enrollamiento, como muestra la Fig. 3-41) o si existen otras diferencias estructurales. La cuestión de cómo se mantiene esta diferencia entre eucromatina y heterocromatina también es difícil de contestar. De hecho, la respuesta no se conoce actualmente, pero está sujeta a una intensa investigación.

COROLARIO

La eucromatina contiene la mayoría de los genes activos. La heterocromatina está más condensada y se tiñe más intensamente.

Organización de las secuencias

¿Cómo están dispuestos los genes sobre los cromosomas? ¿Qué proporción del DNA cromosómico total corresponde a genes activos o potencialmente activos? ¿Cuál es la naturaleza del DNA que se encuentra entre los genes? En este apartado respondemos a algunas de estas preguntas. Como en la mayoría de los aspectos de la investigación, la situación resultó ser más compleja de lo esperado y reveló algunas sorpresas.

Algunos de los primeros resultados significativos vinieron de estudios en los que muestras de DNA de núcleos eucarióticos se calentaban, para separar las dos cadenas de la hélice doble, y se dejaban luego enfriar. Siempre que se hace esto, y debido a los

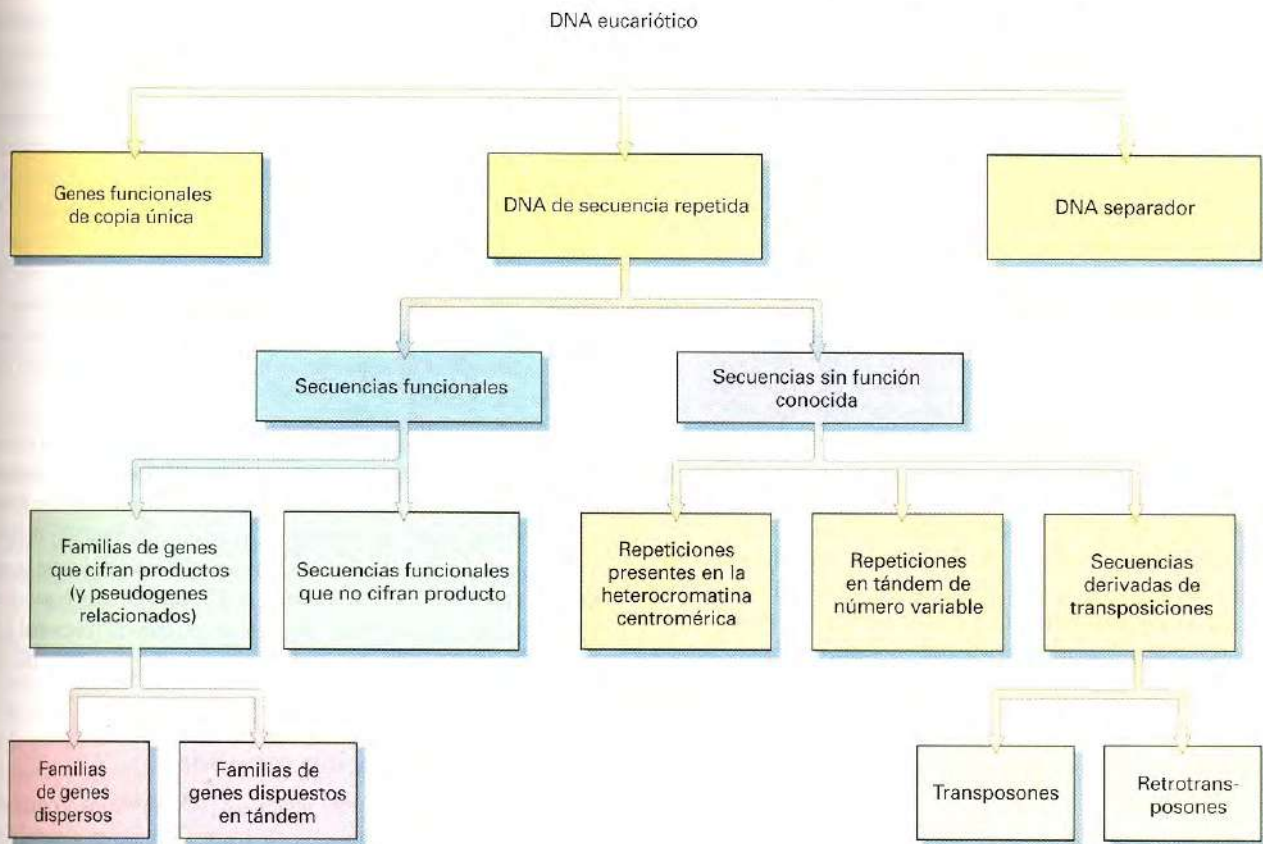


Figura 3-44. Clasificación del DNA eucariótico.

movimientos aleatorios de las moléculas en disolución, las secuencias complementarias, como aquellas que inicialmente estaban unidas por puentes de hidrógeno en la hélice doble, acaban encontrándose con el tiempo unas con otras. Este proceso se denomina **reasociación**. Sin embargo, la reasociación del DNA en estos estudios era sorprendentemente más rápida de lo que se esperaba para el encuentro de las dos cadenas separadas del gen. Para explicar la cinética de reasociación había que postular la existencia de una clase de DNA que está presente en el genoma en múltiples copias. Este DNA ha recibido el nombre de **DNA repetido**. Los genes de copia única acaban por reasociarse, aunque se toman más tiempo para hacerlo. Ahora sabemos que hay varias clases de DNA repetido. Podemos clasificar el DNA eucariótico como se muestra en la Figura 3-44. El tipo de DNA al que hasta ahora hemos venido dedicando toda nuestra atención en este libro, los genes de copia única (Fig. 3-45), están embebidos en un entramado variado de DNA repetidos.

Secuencias repetidas funcionales

Familias de genes dispersos. Varios tipos de proteínas están cifradas en familias de genes homólogos distribuidos por todo el genoma. Tales familias pueden estar compuestas por sólo unos pocos genes o por muchos, como ilustran algunos ejemplos: actinas, de 5 a 30 genes; queratinas, más de 20; cadena pesada de la miosina, de 5 a 10; tubulinas, de 3 a 15; proteínas de la envuelta del huevo en insectos, 50; globinas, hasta 5; región varia-



Figura 3-45. Cromosomas sometidos a hibridación *in situ* con una sonda fluorescente específica de un gen con una sola copia por dotación cromosómica (el gen de una proteína muscular en este caso). Sólo un locus muestra puntos fluorescentes, correspondientes a la sonda unida al gen de la proteína muscular. (De Peter Lichter *et al.*, *Science* 247, 1990, 64.)

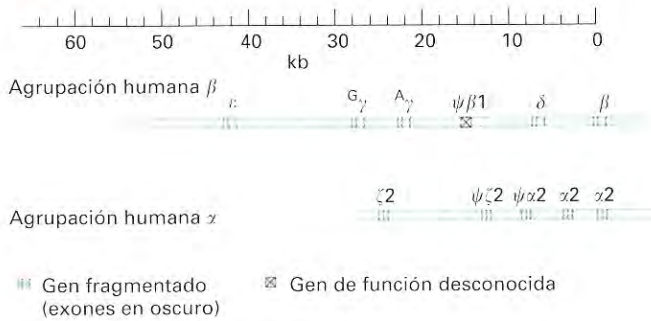


Figura 3-46. Las familias génicas humanas de las globinas tipo α y tipo β se encuentran organizadas en una sola agrupación que incluye genes funcionales y pseudogenes. Estos últimos están señalados aquí con el símbolo ψ . (De B. Lewin, *Genes*, Wiley, 1983.)

ble de las inmunoglobulinas, 500; albúmina de huevo, 3; e histonas, de 100 a 1000. Dentro de una familia, las secuencias exactas de nucleótidos pueden variar y distintos genes homólogos pueden llegar a tener funciones ligeramente diferentes. Algunos genes de las familias han llegado a perder su función, dando lugar a **pseudogenes** no transcritos, como se ilustra en la Figura 3-46.

Familias de genes dispuestos en tándem. Las células necesitan grandes cantidades de los productos de ciertos genes, habiéndose llegado a formar familias de estos genes dispuestos en tándem. Un buen ejemplo es el organizador nucleolar (NO), observado nítidamente en preparaciones citológicas de núcleos antes de que se averiguara su función; se observaba con facilidad porque no se teñía con colorantes normales de la cromatina. Varios estudios genéticos y moleculares han permitido desvelar el papel del NO. Ahora sabemos que los NO de los cromosomas X e Y de *Drosophila* contienen, respectivamente, 250 y 150 copias en tándem de genes que cifran RNA ribosómico (rRNA). Un NO contiene unas 250 copias en la especie humana. Esta redundancia permite asegurar una producción alta de rRNA por célula.

COROLARIO

El organizador nucleolar, distinguible citológicamente, está formado por muchos genes dispuestos en tándem que cifran RNA ribosómico.

Otro ejemplo de disposición en tándem es el de los genes del RNA transferente (tRNA). En la especie humana existen unos 50 sitios cromosómicos que corresponden a distintos tipos de tRNA, y en cada uno de ellos encontramos de 10 a 100 copias de esos genes.

Finalmente, también los genes de las histonas están dispuestos en tándem en algunas especies (Fig. 3-47). Tanto en el caso de las histonas como en los otros casos de genes repetidos y dispuestos en tándem, el análisis de secuencia demuestra que las múltiples copias génicas son idénticas. Dado que uno esperaría que aparecieran algunas diferencias por mutación en puntos que no sean cruciales, parece que existe algún mecanismo que mantiene la identidad de secuencia entre los distintos miembros de la agrupación génica.

Secuencias funcionales que no cifran producto. Los telómeros, extremos de los cromosomas, están formados por ristas en tándem de secuencias sencillas de DNA que no cifran un RNA o una proteína pero, no obstante, cumplen una función definida. Por ejemplo, en el ciliado *Tetrahymena* la secuencia que se repite es TTGGGG, y en el hombre es TTAGGG. Las repeticiones teloméricas están ahí para resolver un problema funcional inherente a la replicación de moléculas lineales de DNA, del cual trataremos en el Capítulo 8.

Secuencias sin función conocida

No se conoce la función de algunos DNA repetidos. A esta categoría pertenecen secuencias de DNA de las que, en general, existen muchas más copias por genoma que de las secuencias funcionales descritas anteriormente. El tamaño conjunto de esta clase de DNA es sorprendente. Se calcula, por ejemplo, que alrededor del 20 % del genoma humano consiste en secuencias repetidas no funcionales de uno u otro tipo. Hablaremos de tres de ellas.

DNA centromérico muy repetido. Después de centrifugar DNA genómico en un gradiente de densidad de cloruro de cesio, aparecen a menudo bandas satélites, separadas de la banda principal de DNA. Este **DNA satélite** consta de múltiples repeticiones en tándem de secuencias cortas de DNA que llegan a alcanzar una longitud de centenares de kilobases. Si se preparan sondas de tales secuencias sencillas de DNA y se emplean en experimentos de marcado de cromosomas *in situ*, la mayoría del DNA satélite resulta estar localizado en las regiones heterocro-

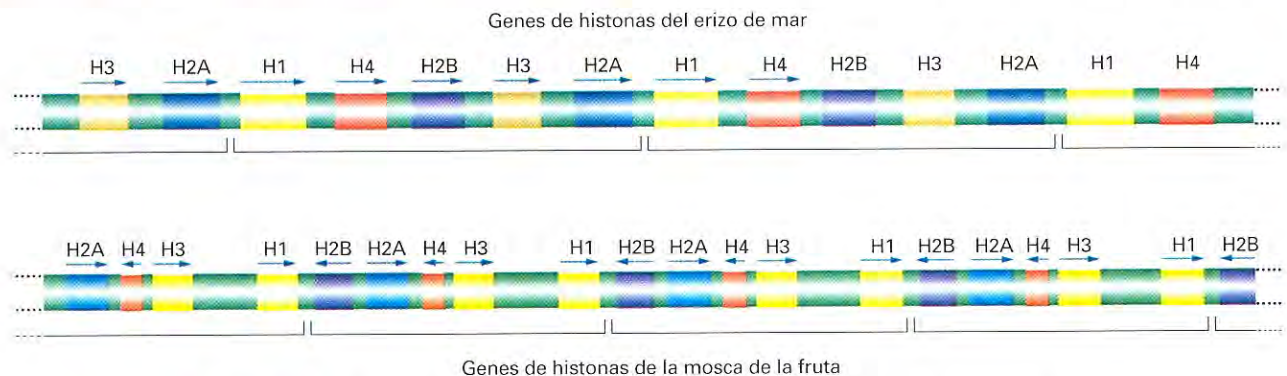


Figura 3-47. Repeticiones en tándem de los genes de las histonas del erizo de mar y la mosca de la fruta. Sólo se muestra una pequeña fracción de las repeticiones. Las flechas indican la dirección de la transcripción.



Figura 3-48. Localización por autorradiografía del DNA de ratón de secuencia sencilla en los centrómeros. Se añadió una sonda radiactiva de DNA de secuencia sencilla a los cromosomas, cuyo DNA había sido desnaturalizado. (Observe que todos los cromosomas de ratón tienen el centrómero en el extremo). (De M. L. Pardue y G. J. Gall, *Science* 168, 1970, 1356.)

matricas que flanquean los centrómeros. Puede haber una o varias unidades básicas, pero normalmente su longitud no es mayor de 10 bases. En *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, aparece la secuencia AATAACATAG repetida en tándem alrededor de todos los centrómeros. Igualmente, en el conejillo de Indias, la secuencia corta CCCTAA se repite en tándem a ambos lados de los centrómeros. En la Figura 3-48 se muestra un experimento de marcado *in situ* con DNA satélite de ratón.

Como las repeticiones centroméricas son una muestra no representativa del DNA genómico, su contenido en G + C puede ser significativamente distinto del resto del DNA. Ésta es la razón de que el DNA forme una banda separada en un gradiente de cloruro de cesio. El DNA centromérico repetido carece de función demostrada, tampoco sabemos qué relación tiene con la heterocromatina o con los genes presentes en la misma. Algunos organismos contienen una cantidad asombrosa de este DNA; el DNA satélite centromérico de canguro, por ejemplo, constituye hasta el 50 % de su DNA total.

VNTR. Una clase especial de repeticiones en tándem muestra variación en el número de éstas entre diferentes loci y entre distintos individuos de la misma especie. Este tipo de repeticiones se denominan **VNTR** (del inglés, *Variable Number of Tandem Repeat*, **número variable de repeticiones en tándem**). Los loci VNTR humanos están formados por tramos de 1 a 5 Kb, constituidos por un número variable de repeticiones de una unidad de 15 a 100 nucleótidos de larga. Si se dispone de una sonda VNTR, y se trata el DNA genómico completo con una enzima de restricción que no cuenta con un punto de corte dentro de la ristra de VNTR, la técnica Southern permite poner de manifiesto un gran número de bandas de tamaños distintos que se unen a la sonda. Dada la variación de un individuo a otro en el número de repeticiones en tándem, la serie de fragmentos que aparecen en la autorradiografía del Southern resulta ser específica de cada individuo. En realidad, los patrones de distribución de bandas se conocen como **huella digital del DNA** y son de uso corriente en la medicina forense (Capítulo 14).

Otro tipo de DNA repetido disperso consiste en repeticiones de dinucleótidos. Este tipo de DNA repetido se denomina **DNA microsatélite**. Aunque los microsatélites no se incluyen normalmente en la clase VNTR, son en realidad regiones dispersas de DNA compuestas de un número variable de dinucleótidos repetidos en tándem. Dado que el número de repeticiones varía entre distintos individuos, este tipo de DNA ha sido muy útil para obtener una gran colección de marcadores moleculares para cartografiar grandes extensiones del genoma humano, como veremos en el Capítulo 14.

Secuencias derivadas de transposiciones. Gran parte del genoma eucariótico está compuesto por elementos repetidos que se han propagado en el genoma haciendo copias de sí mismos y que pueden trasladarse a otras posiciones. Dichos elementos reciben el nombre genérico de elementos genéticos transponibles y se describen en detalle en el Capítulo 20. Los que se trasladan en forma de DNA se denominan **transposones**. El material genético de muchos organismos contiene múltiples copias de estos elementos, o de versiones truncadas de los mismos, dispersos por todo el genoma.

Otro tipo general de secuencias transponibles corresponde a los **retrotransposones** (Fig. 3-49), secuencias que se han extendido por todo el genoma mediante la acción de la transcriptasa inversa, una enzima que fabrica una cadena de DNA a partir de una de RNA. Una clase de esta categoría consiste en secuencias repetidas cuya estructura está relacionada con la de los retrovirus. Se desplazan mediante la transcripción inversa de sus transcritos de RNA en DNA, que entonces se inserta por todo el genoma. Ejemplos de tales retrotransposones son los elementos *copia* de *Drosophila* (secuencias de 5 kb presentes en unas 50 copias por genoma) y los elementos *Ty* de levadura (secuencias de 6 kb, con unas 30 copias completas por genoma). Los **LINE** (del inglés, *Long Interspersed Elements*, **elementos intercalados largos**) de mamíferos son retroelementos no víricos de 1 a 5 Kb que están presentes en 20 000 a 40 000 copias por genoma humano.

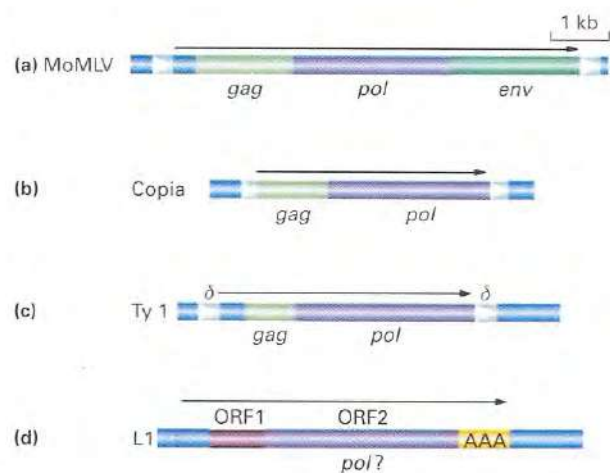


Figura 3-49. Estructura de cuatro retroelementos presentes en genomas eucarióticos: *gag*, *pol* y *env* son genes víricos; ORF1 y ORF2 son genes de función desconocida; AAA es la cola de poli(A) (presente en los mRNA); los triángulos indican repeticiones directas. (a) Un retrovirus, el virus de la leucemia murina Moloney. (b) Un retrotransposón de *Drosophila*, *Copia*. (c) Un retrotransposón de levadura, *Ty1*. (d) Una secuencia LINE humana, *L1*. (De J. R. S. Fincham, *Genetic Analysis: Principles, Scope and Objectives*. Blackwell, 1994.)

En la especie humana, la secuencia repetida Alu, llamada así porque contiene un punto de corte de la enzima de restricción *Alu*, es un ejemplo de un tipo de retrotransposones no relacionados con retrovirus. El genoma humano tiene cientos de miles de secuencias Alu completas o truncadas, dispersas entre los genes y en los intrones, llegando a constituir el 5 % del DNA total. La secuencia Alu completa tiene unos 200 nucleótidos y posee una semejanza notable con el RNA 7SL, un RNA que forma parte de un complejo implicado en la secreción de polipéptidos recién sintetizados a través del retículo endoplásmico. Presumiblemente, las secuencias Alu se originaron como productos de la retrotranscripción de estas moléculas de RNA. Repeticiones cortas y dispersas como las secuencias Alu reciben el nombre genérico de **SINE** (del inglés, *Short INterspersed Elements*, **elementos intercalados cortos**).

Otros ejemplos de la clase de elementos moderadamente repetidos son los muchos *pseudogenes* que se encuentran dispersos por el genoma y que se crearon seguramente mediante el proceso de retrotranscripción, ya que carecen de los intrones que se encuentran en el gen funcional original.

DNA separador

La categoría final de DNA es el **DNA separador**. Se trata simplemente del DNA que queda una vez identificados todos los elementos reconocibles. No hay que decir que sabemos muy poco de su función. Posiblemente su único papel sea sólo ése, separar, pero aún no se han realizado estudios en los cuales se elimine este tipo de DNA y se observen las consecuencias.

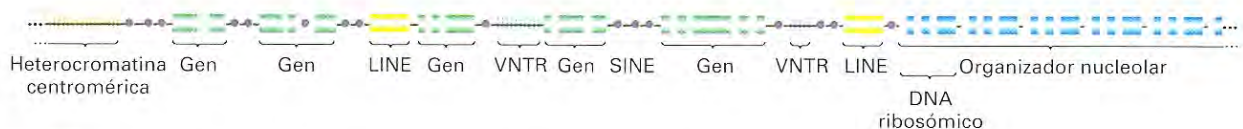


Figura 3-50. Representación general de la arquitectura de un cromosoma eucariótico. Esta pequeña región del cromosoma contiene cinco genes que determinan proteínas, un extremo con un organizador nucleolar y otro extremo de heterocromatina centromérica. Se muestran varios tipos de DNA de secuencia repetida. (Cada cromosoma contiene normalmente varios miles de genes.)

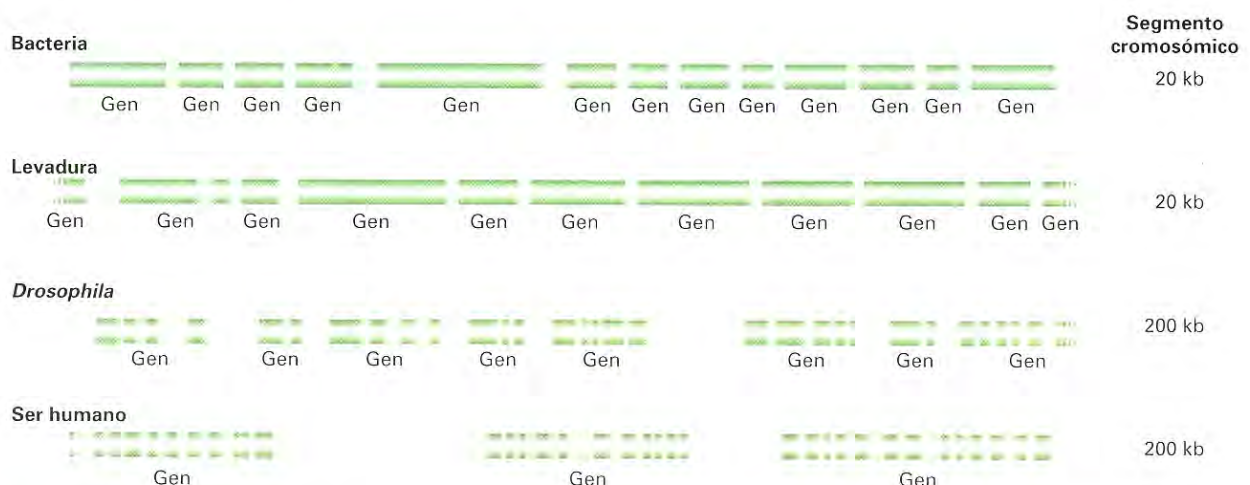


Figura 3-51. Tamaños aproximados de los genes (en kilobases) y regiones intergénicas de varios organismos representativos. Las secuencias que determinan proteína se muestran en verde oscuro; los intrones en verde claro. Hay que señalar que los segmentos de *Drosophila* y del ser humano mostrados son diez veces mayores que los de bacterias y levaduras.

COROLARIO

Los genes de copia única están embebidos en un complejo entramado de DNA repetido, en tándem o disperso, la mayoría del cual es de función desconocida.

La existencia de secuencias de DNA sin función conocida ha creado un dilema para los genetistas. Ideas previas sobre el poder de la selección natural habrían predicho que el DNA no funcional desaparecería a causa de la selección. Si fuera tan sólo por el gasto energético adicional que el organismo ha de invertir en la síntesis de este tipo de DNA, podríamos pensar que es una sobrecarga genética. Sin embargo, esta idea no parece ser correcta. Quizá lo que parece DNA no funcional sí desempeña alguna función, posiblemente como algún tipo de soporte genético que proporciona la masa adecuada para permitir el reparto eficaz de DNA durante la división celular, o quizá que separa los elementos funcionales (los genes) para su regulación adecuada. Alternativamente, los elementos repetidos que constituyen la mayor parte del DNA no funcional pueden haber aparecido de modo que escapen a la detección de las fuerzas de la selección natural. Este tipo de DNA se ha denominado **DNA egoísta**, DNA que existe con el único propósito de existir y que nunca se expone a los rigores del fenotipo.

La Figura 3-50 es un diagrama simplificado sobre la organización general de un cromosoma eucariótico hipotético, que resume mucho de lo explicado anteriormente. En la Figura 3-51 se muestran algunos de los separadores que se conocen actualmente, a partir de la secuenciación del DNA.

RESUMEN

Tras el redescubrimiento de los principios mendelianos en 1900, los científicos se dispusieron a buscar qué estructuras dentro de las células se correspondían con las hipotéticas unidades de la herencia de Mendel, que hoy llamamos genes. Al darse cuenta de que el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis era paralelo al de los genes, Sutton y Boveri propusieron que los genes estaban situados en o sobre los cromosomas. Las observaciones de Morgan sobre la herencia ligada al sexo supuso un afianzamiento de la hipótesis. La prueba definitiva de que los genes están en los cromosomas se debe a la utilización que hizo Bridges del comportamiento de ciertas aberraciones cromosómicas para explicar anomalías en la herencia.

Hoy sabemos que los mecanismos cromosómicos son los que producen las proporciones mendelianas. La primera ley de Mendel (de la distribución igualitaria) es el resultado de la separación de una pareja de cromosomas homólogos en células opuestas, durante la primera división meiótica. La segunda ley de Mendel (de la segregación independiente) es el resultado del comportamiento independiente de distintas parejas de cromosomas homólogos.

Dado que las leyes mendelianas se basan en la meiosis, la herencia mendeliana se da en cualquier organismo con una fase

meiótica en su ciclo de vida, incluyendo organismos diploides, haploides y organismos que alternan una generación haploide con otra diploide.

Los cromosomas se distinguen por un número de características topológicas como la posición del centrómero y del nucléolo, su tamaño y su patrón de bandas. El material del que están hechos los cromosomas es la cromatina, compuesta por DNA y proteínas. Cada cromosoma es una molécula de DNA que se enrolla alrededor de octámeros de histonas. En el intervalo entre dos divisiones celulares, los cromosomas se encuentran en un estado relativamente extendido, aunque todavía están asociados a las histonas. Durante la división celular, los cromosomas se condensan por el estrechamiento de su estado enrollado. Dicho estado les permite ser manejados fácilmente por el huso acromático.

El DNA eucariótico contiene parte de secuencias de copia única (los genes) y parte de secuencias repetidas. Las familias de genes funcionales, bien en tándem o dispersas, dan cuenta de parte del DNA de secuencia repetida. Algunos tipos de DNA muy repetido consisten en repeticiones de secuencias cortas sin función conocida. El número de repeticiones de un tipo determinado en una posición del cromosoma puede variar entre distintos individuos, dando lugar a una huella única de DNA.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

genes / cromosomas / meiosis / distribución igualitaria / segregación independiente / haploide / DNA / replicación / cromátida / histonas / DNA de secuencia repetida

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

Se cruzaron dos moscas de *Drosophila* de alas normales (transparentes y de forma alargada). En los descendientes aparecieron dos fenotipos nuevos: alas oscuras (de aspecto semiopaco) y alas recortadas (de extremos rectangulares). Los fenotipos de la descendencia fueron los siguientes:

Hembras	179 transparentes, alargadas
	58 transparentes, recortadas
Machos	92 transparentes, alargadas
	89 oscuras, alargadas
	28 transparentes, recortadas
	31 oscuras, recortadas

- Dé una explicación genética a estos resultados, indicando el genotipo de los parentales y de todas las clases fenotípicas descendientes, según su modelo.
- Diseñe un experimento que permita comprobar su modelo.

♦ Solución ♦

- El primer paso que debemos dar es entresacar los aspectos más notables de los datos. El primer aspecto que nos sorprende es la aparición de dos fenotipos nuevos. Ya encontramos este

fenómeno en el Capítulo 2, y lo explicamos por la presencia de alelos recesivos enmascarados por los correspondientes alelos dominantes. Así que empezaremos por suponer que una de las moscas parentales, o ambas, llevan alelos recesivos en dos genes diferentes. Esta inferencia se ve reforzada por la observación de que algunos descendientes manifiestan sólo uno de los nuevos fenotipos. Si los dos fenotipos nuevos aparecieran siempre juntos, podríamos suponer que un solo alelo recesivo es responsable de ambos.

Sin embargo, otro aspecto sorprendente de los datos, que no podemos explicar con los principios mendelianos del Capítulo 2, es la clara diferencia entre los dos sexos; aunque el número de machos es aproximadamente igual que el de hembras, los machos se distribuyen en cuatro clases fenotípicas, en tanto que las hembras se distribuyen sólo en dos. Ello sugiere inmediatamente algún tipo de herencia ligada al sexo. Al estudiar los datos, vemos que los fenotipos alas alargadas y alas recortadas segregan tanto en machos como en hembras, pero el fenotipo alas oscuras aparece solamente en los machos. Ello sugiere que el modo de herencia de la transparencia del ala difiere del modo de herencia de la forma del ala. En primer lugar, comprobamos que los fenotipos alas alargadas y alas recortadas aparecen en una proporción 3:1, tanto en machos como en hembras. Dicha proporción

7

TRANSFERENCIA GÉNICA EN BACTERIAS Y SUS VIRUS



as bacterianas en un medio de tinción.

Las colonias Lac^- son blancas. Las colonias Lac^+ se tiñen de rojo.

(Miller.)

Ideas fundamentales

El factor de fertilidad (F) permite la transferencia de DNA de una célula bacteriana a otra mediante el proceso de conjugación.

El factor F puede hallarse libre en el citoplasma o integrado en el cromosoma bacteriano.

Si F se integra en el cromosoma, pueden transferirse marcadores cromosómicos durante la conjugación.

Los bacteriófagos también pueden transferir DNA de una célula bacteriana a otra.

El proceso de transducción generalizada consiste en la incorporación aleatoria de fragmentos cromosómicos en la cápside de ciertos fagos bacterianos y su transferencia a otras células mediante infección.

Durante la transducción especializada, se produce la incorporación accidental en el genoma del fago de genes específicos de la bacteria cercanos a su sitio de integración y su transferencia a otras células por infección.

Los diferentes métodos de transferencia génica existentes en bacterias permiten a los genetistas elaborar mapas detallados de los genes bacterianos.

Hasta ahora, nos hemos ocupado casi exclusivamente de los genes empaquetados en cromosomas localizados en el interior del núcleo de organismos eucarióticos. Sin embargo, gran parte de la historia de la Genética y del análisis genético actual (en particular, la Genética molecular) está relacionada con organismos procarióticos, que no presentan un núcleo diferenciado, y con los virus. Aunque los **virus** comparten con los organismos vivos algunas de sus propiedades características, muchos biólogos consideran a los virus entidades diferentes que en ciertos sentidos no se parecen a los seres vivos. No son células; no pueden crecer o multiplicarse por sí mismos. Para reproducirse, han de parasitar a células vivas y utilizar su maquinaria metabólica. No obstante, los virus tienen propiedades hereditarias que pueden someterse a análisis genético. El análisis genético de las bacterias y sus virus ha constituido una fuente de descubrimientos que han sido esenciales para comprender la naturaleza y la estructura del material genético, del código genético y de la mutación.

Los **procariotas** son las bacterias y las algas verdeazuladas, ahora clasificadas como *cianobacterias*. Los virus que parasitan a las bacterias se denominan **bacteriófagos** o, simplemente, **fagos**. Los trabajos pioneros realizados con bacteriófagos han aportado mucha de la información actual sobre virus causantes de tumores y otros virus de animales y plantas.

En comparación con los eucariotas, los organismos procarióticos y los virus presentan cromosomas muy sencillos que no están localizados en un compartimiento delineado por la membrana nuclear. Debido a que son monoploides, estos cromosomas no sufren meiosis; aunque pasan por etapas análogas a la meiosis. El enfoque del análisis genético de la recombinación en estos organismos es sorprendentemente similar a la utilizada en eucariotas.

Como trataremos en detalle en este capítulo, existen varios mecanismos diferentes que permiten a las bacterias recombinar. En el primer proceso que estudiaremos, la **conjugación**, una célula bacteriana transfiere fragmentos de DNA a otra mediante contacto directo entre las células. Asimismo, una célula bacteriana puede tomar un fragmento de DNA del medio ambiente e incorporarlo a su propio cromosoma, proceso denominado **transformación**. Además, ciertos virus bacterianos toman ocasionalmente un fragmento de DNA de una bacteria y lo inyectan en otra, que puede incorporarlo en su cromosoma, mediante un proceso conocido como **transducción**.

Aspectos prácticos del trabajo con microorganismos

Las bacterias pueden cultivarse en medio líquido o en una superficie sólida, como el gel de agar, siempre que el medio contenga los ingredientes nutritivos básicos. En un medio líquido, las bacterias se dividen por fisión binaria: se multiplican geométricamente hasta que los nutrientes se agotan en el medio o hasta que se acumulan productos residuales tóxicos que detienen el crecimiento de la población. Con una pipeta, se puede inocular una pequeña cantidad de cultivo líquido en crecimiento en una placa de Petri que contenga medio con agar, y extenderla sobre la superficie con un asa de siembra estéril. Este proceso se conoce como **siembra en placa** (Fig. 7-1). Cada célula se divide enton-

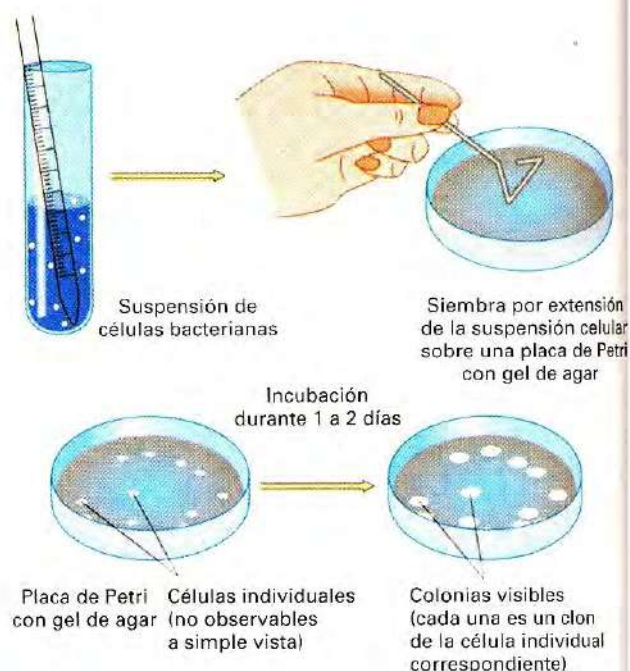


Figura 7-1. Métodos para el cultivo de bacterias en el laboratorio. Unas pocas células bacterianas que han estado creciendo en un medio líquido con nutrientes se extienden sobre un medio con agar que contiene también los nutrientes necesarios. Cada una de estas células originales se divide repetidamente por fisión binaria, dando lugar a una colonia. Todas las células de una colonia, procedentes de una misma célula, tendrán el mismo genotipo y fenotipo.

ces por fisión binaria. Debido a que las células están inmovilizadas en el agar, todas las células hijas permanecen juntas en un grupo. Cuando esta masa celular alcanza más de 10^7 células, se hace visible a simple vista como una **colonia**. Si la muestra sembrada inicialmente contiene muy pocas células, cada colonia individual de la placa procederá de una única célula original. Los miembros de una colonia que derivan de un solo antepasado genético común constituyen un **clon**.

Las bacterias silvestres son **protótrofos**: pueden formar colonias en **medio mínimo** (un sustrato que sólo contiene sales inorgánicas, una fuente de carbono y energía, y agua). Los clones

CUADRO 7-1. Algunos símbolos genotípicos utilizados en genética bacteriana

Símbolo	Carácter o fenotipo asociado al símbolo
<i>bio</i> ⁻	Requiere suplemento de biotina en el medio mínimo.
<i>arg</i> ⁻	Requiere suplemento de arginina en el medio mínimo.
<i>met</i> ⁻	Requiere suplemento de metionina en el medio mínimo.
<i>lac</i> ⁻	Incapaz de utilizar lactosa como fuente de carbono.
<i>gal</i> ⁻	Incapaz de utilizar galactosa como fuente de carbono.
<i>str</i> ^r	Resistente al antibiótico estreptomicina.
<i>str</i> ^s	Sensible al antibiótico estreptomicina.

Nota: el medio mínimo es el medio sintético básico para el crecimiento bacteriano, sin nutrientes suplementarios.

mutantes se identifican porque son **auxótrofos**: no crecerán a menos que el medio contenga uno o más nutrientes específicos (por ejemplo: adenina, o treonina y biotina). Además, las estirpes silvestres son sensibles a ciertos inhibidores del crecimiento, como la estreptomicona, mientras que los **mutantes resistentes** forman colonias aunque esté presente el inhibidor. Estas propiedades permiten a los genetistas distinguir diferentes fenotipos entre las colonias sembradas.

Para muchos caracteres, el fenotipo de un clon se determina fácilmente mediante reconocimiento visual o pruebas químicas sencillas. El fenotipo de una colonia se corresponde entonces con el de la célula original que dio lugar al clon, determinándose así las frecuencias de los diferentes fenotipos en la muestra sembrada. El Cuadro 7-1 incluye algunos fenotipos bacterianos y sus símbolos genéticos.

Conjugación bacteriana

En este apartado y en los siguientes se describe el descubrimiento de la transferencia de genes entre bacterias, y se explican los

diferentes tipos de transferencia y su empleo en la Genética bacteriana. En primer lugar consideraremos la conjugación, que requiere un contacto directo entre las células. La conjugación fue el primer método de transferencia génica estudiado en detalle.

El descubrimiento de la conjugación

¿Poseen las bacterias algún proceso similar a la reproducción sexual y la recombinación? Esta pregunta fue respondida en 1946, gracias al sencillo y elegante trabajo experimental de Joshua Lederberg y Edward Tatum, quienes estudiaban dos estirpes de *Escherichia coli* con requerimientos nutritivos distintos. La estirpe A crecía en medio mínimo sólo si se añadía metionina y biotina; la estirpe B crecía en medio mínimo sólo si se añadía treonina, leucina y tiamina. Así que la estirpe A puede representarse como $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ y la estirpe B como $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$. La Figura 7-2a explica de forma simplificada la idea del experimento. En este caso, las estirpes A y B se mezclan, y algunos de los descendientes se muestran ahora silvestres, pues han recuperado la capacidad de crecer sin la adición de suplementos. La Figura 7-2b ilustra el experimento con más detalle.

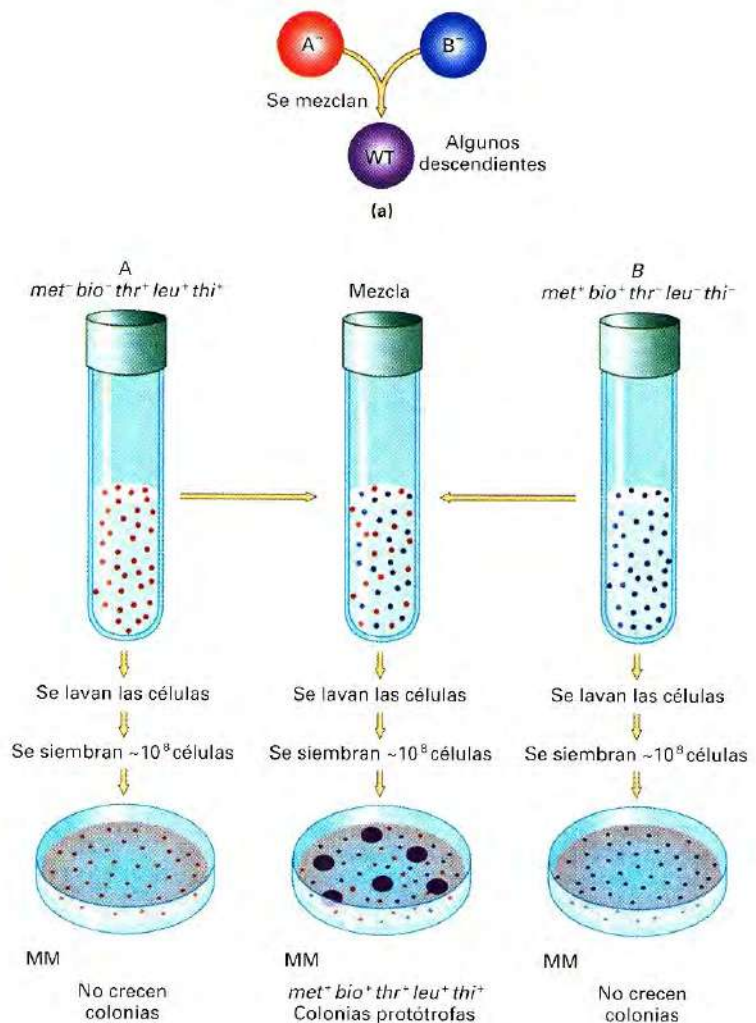


Figura 7-2. Demostración de Lederberg y Tatum de la recombinación genética entre células bacterianas. Las células del tipo A o del tipo B no pueden crecer en un medio mínimo (MM) sin suplementos, puesto que A y B llevan mutaciones que provocan incapacidad de sintetizar los constituyentes necesarios para el crecimiento celular. Sin embargo, si se mezclan las células A con las B durante unas horas y luego se siembran en una placa, aparecen unas pocas colonias en la placa de agar. Cada una de estas colonias deriva de una sola célula en la cual ha habido un intercambio de material genético; por tanto, son capaces de sintetizar todos los constituyentes necesarios del metabolismo.

Lederberg y Tatum sembraron bacterias en placas que contenían medio mínimo sin suplementos. Algunas placas se sembraron sólo con bacterias de la estirpe A, otras sólo con bacterias de la estirpe B, y otras con una mezcla de bacterias de las estirpes A y B que se habían incubado conjuntamente durante varias horas en un medio líquido que contenía todos los suplementos. En las placas donde se sembró sólo la estirpe A o sólo la estirpe B no aparecieron colonias, demostrando que la restauración de la prototrofia (la capacidad de crecer en medio mínimo sin suplementos) no se había producido por mutaciones revertientes. Sin embargo, en las placas que contenían la mezcla de las dos estirpes aparecieron colonias con una frecuencia de 1 cada 10 000 000 de células sembradas (en notación científica, 1×10^{-7}). Esta observación sugería que había ocurrido algún tipo de recombinación entre los genomas de las dos estirpes que había dado lugar a individuos protótrofos.

Necesidad de contacto físico entre las células

Podría pensarse que las células de dos estirpes no intercambian en realidad genes, sino que liberan sustancias que las otras células pueden absorber y utilizar para crecer. Esta posibilidad de «alimentación cruzada» fue descartada por Bernard Davis. Construyó un tubo con forma de «U» en el cual los dos brazos de la U estaban separados por un filtro de tamaño de poro pequeño. Los poros del filtro eran demasiado pequeños para permitir el paso de bacterias, pero suficientemente grandes para permitir el trasvase de medio líquido y de las sustancias disueltas en él (Fig. 7-3). Colocó la estirpe A en un brazo y la estirpe B en el otro. Después de incubar las estirpes durante un tiempo, analizó el contenido

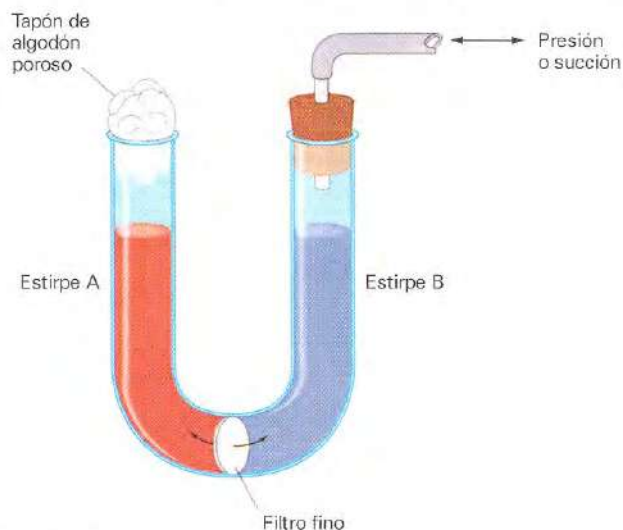


Figura 7-3. Experimento que demuestra la necesidad de contacto físico entre las células bacterianas para que tenga lugar la recombinación genética. Una suspensión de una estirpe bacteriana incapaz de sintetizar ciertos nutrientes se coloca en uno de los brazos del tubo con forma de U. Otra estirpe incapaz genéticamente de sintetizar distintos metabolitos necesarios se coloca en el otro brazo. El líquido se transfiere entre los brazos mediante la aplicación de presión o succión, pero las células no pasan a través del filtro central. Tras varias horas de incubación, se siembran las células, pero no crecen colonias en el medio mínimo.

de cada brazo para averiguar si habían aparecido células capaces de crecer en el medio mínimo y no encontró ninguna. En otras palabras, el *contacto físico* entre las dos estirpes era imprescindible para que se obtuvieran células silvestres. Parecía que se estaba produciendo algún tipo de transferencia génica y que se estaban obteniendo recombinantes genéticos reales.

El descubrimiento del factor de fertilidad (F)

En 1953, William Hayes determinó que la transferencia genética ocurría en una sola dirección en los tipos de cruzamientos que realizaba. Por tanto, la transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una célula actúa como donante y la otra célula como receptora. Al principio, este tipo de transferencia unidireccional de genes se equiparó a la existencia de diferencias sexuales, denominando «macho» al donante y «hembra» a la receptora. No obstante, este tipo de transferencia génica no es una verdadera reproducción sexual. En el caso de la **transferencia genética bacteriana**, un organismo recibe información genética de una célula **donante**, y la célula **receptora** cambia en función de la información recibida. En el caso de la **reproducción sexual**, los dos organismos donantes participan igualmente (o casi igualmente) en la formación de un organismo nuevo y sólo en casos excepcionales cualquiera de los donantes experimenta algún cambio.

COROLARIO

La transferencia de material genético en *E. coli* no es recíproca. Una de las dos células actúa como donante y la otra como receptora.

Pérdida y recuperación de la capacidad de transferir. Hayes descubrió casualmente una variante de su estirpe donante original que cuando se cruzaba con la estirpe receptora no producía recombinantes. Aparentemente, las células del tipo donante habían perdido la capacidad de transferir material genético y se habían convertido en células de tipo receptor. Al analizar esta variante donante «estéril», Hayes se dio cuenta de que *E. coli* podía perder y recuperar su fertilidad (capacidad de actuar como donante) con relativa facilidad. Hayes sugirió que la capacidad para actuar como donante era una propiedad hereditaria conferida por el **factor de fertilidad (F)**. Las estirpes portadoras de F son capaces de donar

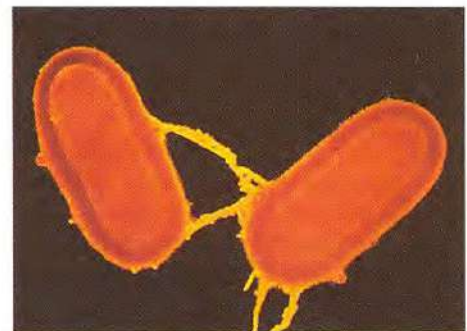


Figura 7-4. Las bacterias transfieren plásmidos (círculos de DNA), mediante conjugación. Una célula donante extiende una o más proyecciones (pili) que se adhieren a la célula receptora y la atraen para unirse a ella. (Oliver Meckes/MPI-Tübingen, Photo Researches.)

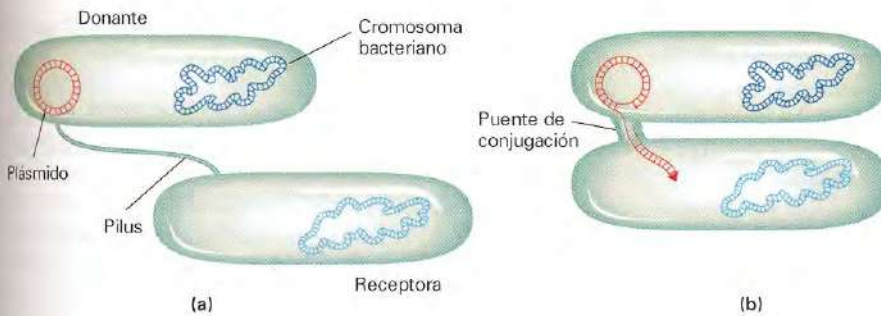


Figura 7-5. (a) Un pili une a las dos bacterias durante la conjugación. (b) Después se forma un puente (básicamente un poro) entre las dos células. A continuación, una cadena de DNA del plásmido pasa a la bacteria receptora, y a partir de cada cadena sencilla se forma una doble.

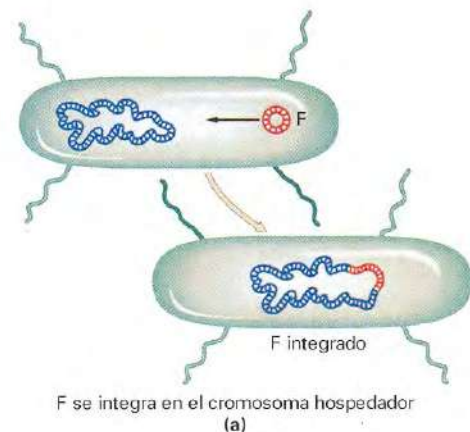
alelos y se designan F^+ . Las estirpes carentes de F no pueden donar alelos, siendo las receptoras. Tales estirpes se designan F^- .

Transferencia del factor F durante la conjugación. Hayes observó que los genotipos recombinantes para los genes marcadores aparecían con una frecuencia relativamente baja en los cruzamientos bacterianos, si bien el factor F parecía transmitirse muy eficazmente durante el contacto físico o **conjugación**. Parecía haber algún tipo de «transferencia infecciosa» del factor F. Ahora sabemos mucho más sobre el proceso de conjugación y sobre el factor F, que es un tipo de plásmido que se puede replicar en el citoplasma de modo independiente del cromosoma hospedador. Las Figuras 7-4 y 7-5 muestran cómo las bacterias transfieren plásmidos del tipo del factor F. El plásmido F dirige la síntesis de pili, unas proyecciones que inician el contacto con la célula receptora (Fig. 7-4), adhiriéndose a ella y permitiendo al DNA de F pasar a la célula receptora a través de un poro. Se transfiere una de las cadenas de DNA de F y luego la replicación del DNA restaura la cadena complementaria tanto en el donante como en el receptor. Esta replicación tiene como resultado que permanezca una copia de F en el donante y aparezca otra en el receptor, como muestra la Figura 7-5.

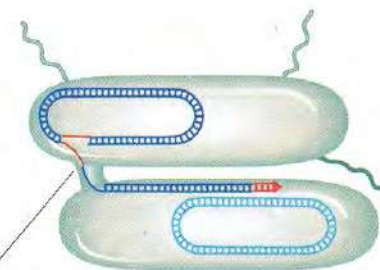
Las estirpes Hfr

Las investigaciones dieron un giro muy importante cuando Luca Cavalli-Sforza obtuvo una nueva clase de células a partir de una estirpe F^+ . Al cruzarla con células F^- , esta nueva estirpe producía recombinantes para marcadores genéticos con una frecuencia 1000 veces superior a la observada en una estirpe F^+ normal. Cavalli-Sforza la denominó estirpe Hfr (del inglés, *high frequency of recombination*) para indicar una alta frecuencia de recombinación. En los cruzamientos $Hfr \times F^-$, prácticamente ninguno de los parentales F^- se convertía en F^+ o en Hfr. Esto contrasta con los cruzamientos $F^+ \times F^-$, en los cuales una gran proporción de parentales F^- se convierten en F^+ por la transferencia del factor F. La Figura 7-6 ilustra este concepto. Resultó aparente que una estirpe Hfr es el resultado de la integración del factor F en el cromosoma, como indica la Figura 7-6a.

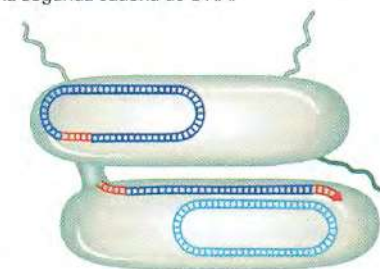
Ahora bien, durante la conjugación entre una célula Hfr y una F^- , una parte del cromosoma de la Hfr se transfiere junto con F. La rotura aleatoria del fragmento cromosómico interrumpe la transferencia antes de que se haya transferido el cromosoma completo. El fragmento cromosómico transferido puede entonces recombinar con el cromosoma de la célula receptora. Claramente,



F se integra en el cromosoma hospedador (a)



Se transfiere una sola cadena de F, junto con una copia de parte del cromosoma hospedador, a una célula receptora, en la cual se sintetiza la segunda cadena de DNA.



Una copia del cromosoma hospedador con F integrado (generada por replicación) permanece en la célula donante tras la replicación de la otra cadena sencilla. (b)

Figura 7-6. Transferencia de marcadores cromosómicos de *E. coli* mediada por F. (a) En ocasiones, el factor F libre se integra en el cromosoma de *E. coli*. (b) Cuando el factor F integrado se transfiere a otra célula de *E. coli* durante la conjugación, se lleva junto a él cualquier segmento de DNA de *E. coli* adyacente, transfiriendo así marcadores cromosómicos del hospedador a una nueva célula.

el bajo nivel de transferencia de marcadores genéticos observado por Lederberg y Tatum (véase Fig. 7-2) en el cruzamiento $F^+ \times F^-$ se puede explicar por la presencia de unas pocas células Hfr en la población. Cuando estas células se aíslan y purifican, como hizo Cavalli por primera vez, se transfieren entonces marcadores cromosómicos con alta frecuencia, debido a que todas las células son Hfr.

Determinación del ligamiento mediante conjugación interrumpida

La naturaleza exacta de las estirpes Hfr quedó establecida en el año 1957, cuando Elie Wollman y François Jacob estudiaban el

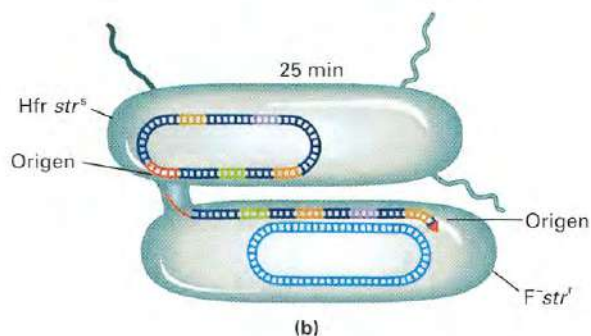
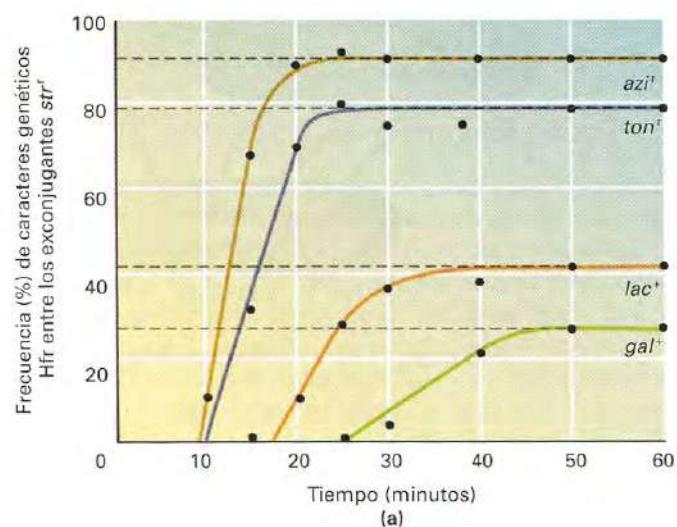


Figura 7-7. Experimentos de conjugación interrumpida con *E. coli*. Se cruzan células $F^- str^r$ con células $Hfr str^s$. Las células F^- tienen una serie de mutaciones (indicadas por los marcadores genéticos azi , ton , lac y gal) que les impiden llevar a cabo determinadas reacciones metabólicas. Por el contrario, las células Hfr son capaces de realizar todas estas reacciones. Tras la mezcla de los dos tipos de células, se recogen muestras a distintos tiempos, se disgregan las células en una batidora, para interrumpir la conjugación entre ellas, y se siembran en un medio con estreptomicina. El antibiótico elimina las células Hfr, pero permite el crecimiento de las células F^- , que son analizadas para comprobar si son capaces de llevar a cabo los cuatro pasos metabólicos. (a) Gráfica que muestra la frecuencia de recombinantes para cada marcador metabólico con respecto al tiempo transcurrido de apareamiento antes de la interrupción. La transferencia del alelo donante para cada paso metabólico depende del tiempo que se deja transcurrir la conjugación. (b) Representación esquemática de la transferencia de marcadores a lo largo del tiempo (Parte a modificada de E. L. Wollman, F. Jacob y W. Hayes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21, 1956, 141.)

patrón de transmisión de genes de células Hfr a células F^- durante un cruzamiento. Cruzaron una estirpe $Hfr str^s a^+ b^+ c^+ d^+$ con una estirpe $F^- str^r a^- b^- c^- d^-$. Después de mezclarlas, tomaron muestras a intervalos específicos de tiempo. Pusieron cada una de las muestras en una batidora de cocina durante unos pocos segundos para separar las parejas de células en conjugación y las sembraron en un medio que contenía estreptomicina para eliminar a las células donantes Hfr. El proceso se llama **conjugación interrumpida**. A continuación, analizaron la presencia de marcadores del donante en las células str^r . Aquellas células str^r portadoras de marcadores del donante han debido participar en el proceso de conjugación y se denominan **exconjugantes**. La Figura 7-7a muestra una gráfica de los resultados; azi^r , ton^r , lac^+ y gal^+ corresponden a a^+ , b^+ , c^+ y d^+ en nuestra descripción general del experimento. La Figura 7-7b ilustra la transferencia de los marcadores.

Lo más sorprendente de estos resultados es que cada uno de los alelos del donante apareció por primera vez en los receptores F^- en un momento concreto tras el comienzo de la conjugación, y en un orden característico. Además, el porcentaje máximo de células portadoras de un alelo donante determinado era menor para aquellos marcadores del donante que entraban más tarde. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, Wollman y Jacob concluyeron que la transferencia de los genes comienza en un punto fijo del cromosoma donante, denominado **origen (O)**, y continúa de manera lineal.

COROLARIO

El cromosoma de la estirpe Hfr, que originalmente es circular, se desenrolla y se transfiere a la célula F^- de modo lineal. La apertura del cromosoma y su transferencia comienzan en un punto concreto situado en un extremo del factor F integrado, denominado origen (O). Cuanto mayor es la distancia entre un gen y O, más tarde se transfiere a la célula F^- ; es muy probable que el proceso de transferencia cromosómica se interrumpa antes de que se transfieran los genes más alejados.

Wollman y Jacob se dieron cuenta de que sería fácil construir mapas de ligamiento a partir de los experimentos de conjugación interrumpida utilizando como medida de «distancia» el tiempo que tarda en entrar un alelo del donante después de que se haya iniciado la conjugación. La unidad de distancia en este caso es el minuto. De modo que, si un alelo donante b^+ entra en la célula F^- 10 minutos después que a^+ , entonces a^+ y b^+ están separados por 10 unidades (Fig. 7-8). Como en el caso de los mapas basados en frecuencias de recombinación, estos mapas de ligamiento son puramente interpretaciones genéticas, pues en aquellos tiempos no se conocía la base física del proceso.

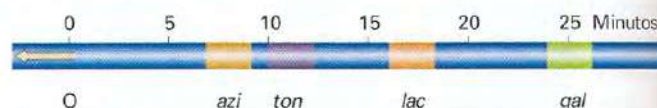
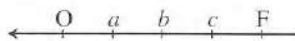


Figura 7-8. Mapa cromosómico basado en los datos de la Figura 7-7. Puede construirse un mapa de ligamiento del cromosoma de *E. coli* a partir de experimentos de conjugación interrumpida, utilizando el tiempo en que empieza a aparecer cada alelo donante tras el inicio de la conjugación. La unidad de distancia es el minuto. La flecha hacia la izquierda indica la dirección de la transferencia de los alelos del donante.

Circularidad del cromosoma e integración de F

Cuando Wollman y Jacob permitieron que los cruzamientos $Hfr \times F^-$ prosiguieran durante dos horas antes de tratar con la batidora, encontraron que algunos de los exconjugantes se convertían en Hfr . En otras palabras, una parte importante de F (la parte del extremo que ahora sabemos que confiere la «masculinidad» o capacidad de actuar como donante) se transmite con el tiempo, aunque con una eficacia muy baja y, aparentemente, como último elemento del «cromosoma» lineal. Ahora, tenemos el mapa siguiente, en el que la flecha indica el proceso de transferencia, que empieza en O :



Sin embargo, cuando se construyeron mapas de ligamiento por conjugación interrumpida y análisis de los tiempos de entrada a partir de estirpes Hfr aisladas independientemente, se observaron diferencias de una estirpe a otra.

Estirpe Hfr

H	$O \text{ thr pro lac pur gal his gly thi F}$
1	$O \text{ thr thi gly his gal pur lac pro F}$
2	$O \text{ pro thr thi gly his gal pur lac F}$
3	$O \text{ pur lac pro thr thi gly his gal F}$
AB 312	$O \text{ thi thr pro lac pur gal his gly F}$

A simple vista, parece haber una reorganización al azar de los genes. Sin embargo, existe un patrón; los genes no ocupan posiciones aleatorias en cada estirpe. Por ejemplo, observe que en todos los casos el gen *his* está situado entre *gal* y *gly*. Esto es aplicable a cualquiera de los genes, a menos que aparezca en uno de los extremos del mapa de ligamiento. El orden de transferen-

cia de los marcadores no es constante. En dos estirpes Hfr , por ejemplo, el gen *his* se transfiere antes que el gen *gly* (*his* está más próximo a O), pero en tres de las estirpes, el gen *gly* se transfiere antes que *his*.

¿Cómo podemos explicar estos resultados? Allan Campbell propuso una hipótesis sorprendente para la época: supongamos que en una bacteria masculina F^+ , el factor F es un elemento citoplásmico pequeño (y, por tanto, se transfiere fácilmente a una célula F^- durante la conjugación). Si el cromosoma de la bacteria F^+ fuera circular, cualquiera de los cromosomas lineales Hfr podrían generarse simplemente por inserción de F en el círculo, en la posición y la orientación adecuadas (Fig. 7-9).

De esta hipótesis se derivan varias conclusiones (confirmadas posteriormente)

1. La orientación en la que se integra F determina la polaridad del cromosoma Hfr , como se indica en la Figura 7-9a.
2. Un extremo del factor F integrado es el **origen**, donde comienza la transferencia del cromosoma Hfr ; el **término**, en el otro extremo de F , no se transfiere, a menos que todo el cromosoma lo hubiera hecho antes. Como el cromosoma se rompe con frecuencia antes de transferirse por completo, y como lo que confiere la masculinidad es el término de F , sólo una pequeña proporción de las células receptoras se convierten en células masculinas.

¿Cómo puede explicarse entonces la integración de F ? Wollman y Jacob propusieron que algún tipo de recombinación entre F y el cromosoma de la célula F^+ generaría el cromosoma Hfr . Campbell contribuyó con una brillante aportación a esta idea. Propuso que si F , como el cromosoma, fuera circular, un hecho de recombinación entre los dos círculos produciría un

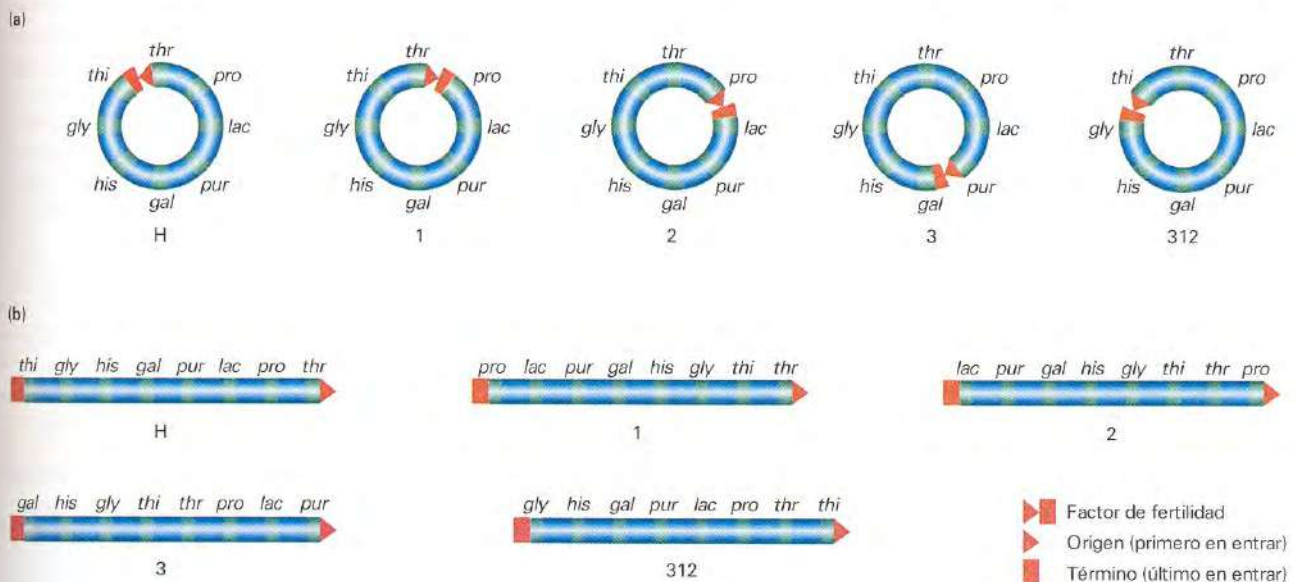


Figura 7-9. Circularidad del cromosoma de *E. coli*. (a) Mediante el uso de diferentes estirpes Hfr (H, 1, 2, 3, 312) que contienen el factor de fertilidad integrado en diferentes sitios del cromosoma y en distinta orientación, los experimentos de conjugación interrumpida indican que el cromosoma es circular. Se muestra el punto de movilización (origen) de cada estirpe. (b) Orden lineal de transferencia de marcadores de cada estirpe Hfr ; las puntas de flecha indican el origen y la dirección de la transferencia.

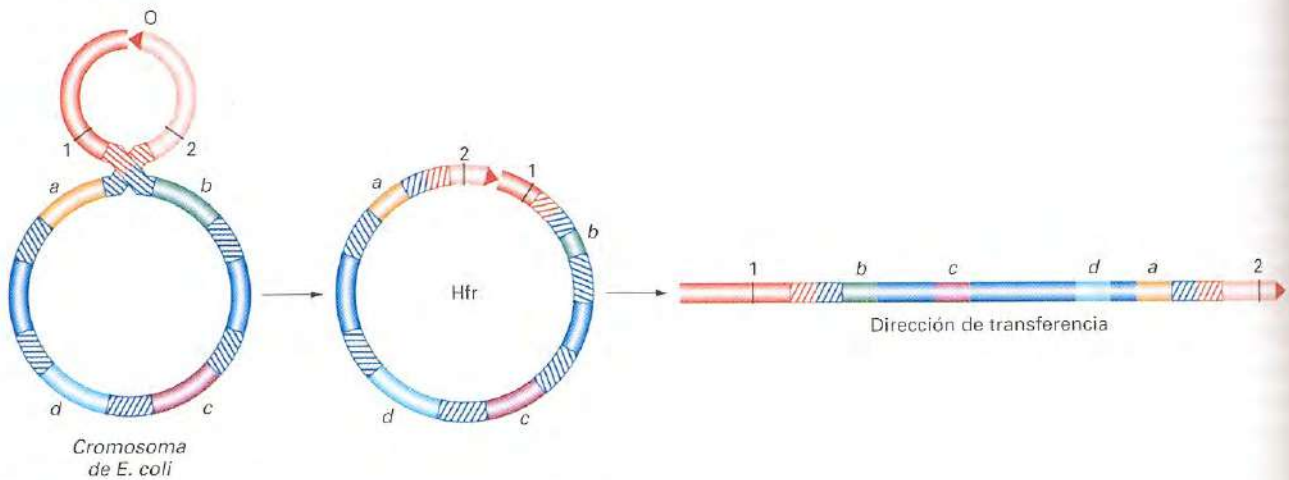


Figura 7-10. Integración del factor F en el cromosoma de *E. coli* mediante recombinación. Se muestran los marcadores hipotéticos de F 1 y 2 para indicar la dirección de la inserción. El origen (O) es el punto de movilización en el cual comienza la integración; la región de apareamiento es homóloga a una región del cromosoma de *E. coli*; *a-d* son los genes que representan el cromosoma de *E. coli*. Los genes sexuales de F son responsables del fenotipo F⁺. Las regiones de apareamiento (rayadas) son idénticas en el plásmido y el cromosoma, y derivan de unos elementos móviles denominados secuencias de inserción (véase Cap. 20). En este ejemplo, la célula Hfr generada por la inserción de F transferiría sus genes en el orden *a, d, c, b*. ¿Cuál sería el orden de transferencia si F se insertara en los demás sitios homólogos?

único círculo de mayor tamaño en el que F quedaría integrado (Fig. 7-10).

Suponga ahora que F está constituido por tres regiones diferentes, como se indica en la Figura 7-10. Si el cromosoma bacteriano tuviera varias regiones homólogas que pudieran emparejarse con la región de apareamiento de F, podrían generarse fácilmente distintos cromosomas Hfr por recombinación en esos sitios.

La circularidad del cromosoma y del factor F parecían inicialmente conceptos bastante inverosímiles, inferidos únicamente a partir de datos genéticos; la confirmación de su realidad física llegó sólo algunos años más tarde. El modelo de integración de recombinación directa también fue confirmado posteriormente.

El factor de fertilidad existe por tanto en dos estados: (1) en estado de plásmido, como elemento citoplásmico F libre que se transfiere con facilidad a las células receptoras F⁻, y (2) en estado integrado, como parte de un cromosoma circular que únicamente se transfiere en momentos tardíos de la conjugación. El término **episoma** (literalmente, «cuerpo adicional») fue acuñado para designar a una partícula genética que presenta esos dos estados característicos. Una célula portadora de F en estado libre se denomina F⁺, una célula con F en estado integrado se denomina Hfr, y una célula sin F se denomina F⁻. En la actualidad, el término **plásmido** se emplea para cualquier elemento circular en el citoplasma con capacidad de replicación autónoma, y el término «episoma» se usa en raras ocasiones.

Factores R

En los años 50 se descubrió en hospitales japoneses una propiedad espantosa de las bacterias patógenas. La disentería bacteriana está causada por una bacteria del género *Shigella*. Inicialmente, se había comprobado que esta bacteria era sensible a una amplia gama de antibióticos, que fueron empleados para controlar la enfermedad. Sin embargo, en los hospitales japoneses, las estirpes de *Shigella* aisladas de enfermos con disentería resultaron ser resistentes simultáneamente a muchos de estos fármacos, incluyendo la penicilina, la tetraciclina, la sulfanilamida, la estreptomycinina y el cloranfenicol. Este fenotipo de resistencia múltiple se heredaba como un paquete genético único, y podía ser transmitido de manera infecciosa, no sólo a otras estirpes de *Shi-*

CUADRO 7-2. Determinantes genéticos transferidos por varios plásmidos

Característica	Ejemplos de plásmido
Fertilidad	F, R1, Col
Producción de bacteriocinas	Col E1
Resistencia a metales pesados	R6
Producción de enterotoxinas	Ent
Metabolismo del alcanfor	Cam
Generación de tumores en plantas	T1 (en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)

gella sensibles, sino también a otras especies de bacterias relacionadas. Esta propiedad es extraordinariamente provechosa para la bacteria patógena, y sus consecuencias en la ciencia médica fueron terribles. En cambio, desde el punto de vista del genetista, esta situación es muy interesante. El vector que transportaba estas resistencias de una célula a otra resultó ser un elemento con capacidad de replicación autónoma, similar al factor F. Estos factores R (de «resistencia») se transfieren rápidamente por conjugación, tal como ocurre con la partícula F de *E. coli*.

De hecho, estos factores R fueron los primeros de muchos otros factores semejantes a F que se descubrieron más tarde. Se ha comprobado que estos elementos, que existen en el citoplasma en forma de plásmidos, llevan diferentes tipos de genes bacterianos. El Cuadro 7-2 muestra tan sólo algunas de las características que pueden ser transportadas por los plásmidos.

Mecanismos de transferencia

¿Muere una célula Hfr después de donar su cromosoma a una célula F^- ? La respuesta es no (salvo que el cultivo se trate con estreptomycin). El cromosoma Hfr se replica mientras se transfiere una cadena sencilla a la célula F^- ; esto garantiza que quede un cromosoma completo en la célula donante después de la conjugación. La cadena transferida se replica en la célula receptora, y los genes de la célula donante pueden incorporarse por recombinación al cromosoma de la célula receptora, generando una célula recombinante. Si esto no ocurre, los fragmentos de DNA transferidos se pierden en la célula receptora durante la división celular.

Suponemos que el cromosoma de la F^- es también circular, porque la célula receptora F^- , cuando recibe el factor F de una

célula F^+ , se convierte inmediatamente en una célula F^+ , de la cual puede derivarse luego una célula Hfr.

Surge la imagen de un cromosoma circular desenrollando una copia de sí mismo, que es luego transferida de forma lineal a la célula F^- . ¿Cómo se consigue la transferencia? Los estudios de microscopía electrónica muestran que las células Hfr y F^+ poseen unas estructuras fibrosas, los **pili F**, que sobresalen de su pared celular, como muestra la Figura 7-4. Los pili F facilitan el contacto entre las células, durante el que ocurre la transferencia del DNA a través de poros de la célula F^- .

El proceso de conjugación de *E. coli*

Revisemos ahora los distintos aspectos del proceso de conjugación de *E. coli* (Fig. 7-11) en cuanto a las diferencias entre las células F^- , F^+ y Hfr, ya que estas diferencias representan un resumen del ciclo.

Las estirpes F^- carecen del factor F y no pueden transferir DNA por conjugación. Sin embargo, actúan como receptoras del DNA transferido por las células F^+ o Hfr durante la conjugación.

Las células F^+ contienen el factor F en su citoplasma y, por tanto, pueden transferirlo de modo eficaz a las células F^- durante la conjugación.

Las células Hfr contienen el factor F integrado en el cromosoma bacteriano y no en el citoplasma.

Una estirpe F^+ transfiere marcadores cromosómicos porque, en cualquier población de células F^+ , una pequeña proporción de células (aproximadamente 1 de cada 1000) se ha convertido en Hfr por integración de F en el cromosoma bacteriano. Como los

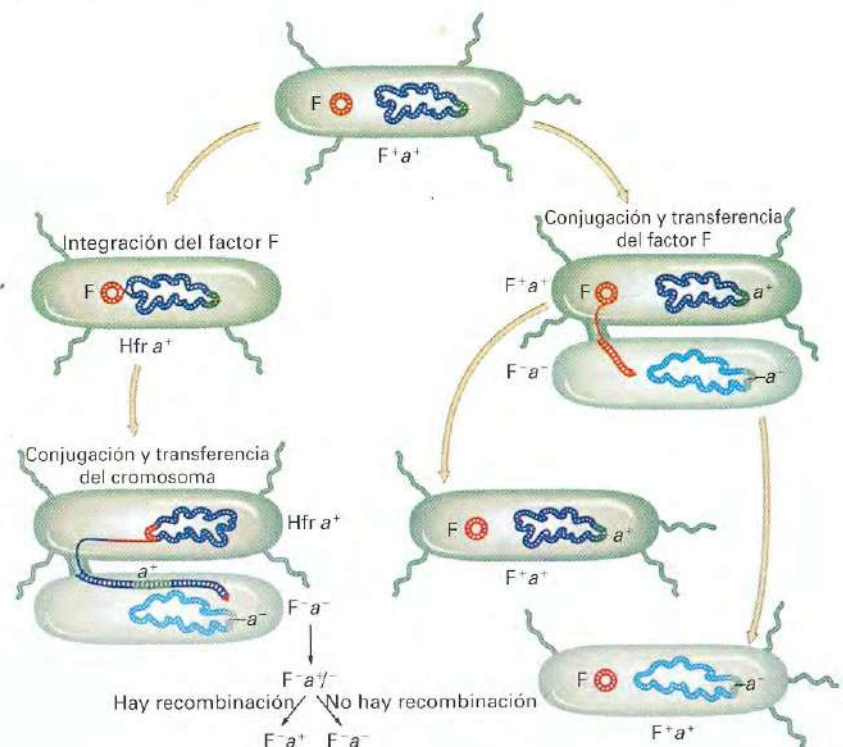


Figura 7-11. Resumen de los distintos acontecimientos que tienen lugar en el ciclo de conjugación de *E. coli*.

experimentos de conjugación suelen realizarse mezclando 10^7 - 10^8 células del donante y del receptor, la población contendrá varias células Hfr diferentes, derivadas de integraciones independientes de F en varios sitios distintos del cromosoma. Por tanto, cuando distintas células de la población transfieren marcadores cromosómicos, la transferencia comienza en distintos puntos del cromosoma. El resultado es la transferencia casi por igual de cualquier marcador cromosómico, aunque con baja frecuencia. Este tipo de transferencia mediada por células F^+ es la que Lederberg y Tatum observaron cuando descubrieron la transferencia génica en bacterias.

En una población F^+ , cada una de las células Hfr con un factor F integrado puede dar origen a una nueva estirpe Hfr si se aísla y se utiliza para iniciar un clon.

Las **estirpes Hfr** se originan a partir de un clon de células Hfr en las cuales ha tenido lugar una integración específica del factor F en el cromosoma bacteriano. Por tanto, todas las células de una estirpe Hfr determinada contienen una copia de F integrada exactamente en la misma posición del cromosoma.

En comparación con las células F^+ , en las que sólo una pequeña fracción de las células tiene F integrado en el cromosoma, las poblaciones Hfr transfieren marcadores cromosómicos a las células F^- con una frecuencia elevada. Además, en cualquier estirpe Hfr, los marcadores se transfieren desde un punto fijo y en un orden determinado. Esto también contrasta con lo que ocurre en las poblaciones de células F^+ , donde las células Hfr transfieren marcadores cromosómicos sin ningún orden particular, debido a que el factor F se integra en distintos puntos del cromosoma en diferentes células F^+ .

En un cruzamiento Hfr $\times F^-$, las células F^- no se convierten en Hfr o en F^+ , excepto en raras ocasiones, porque el cromosoma

Hfr casi siempre se rompe antes de que el término de F se transfiera a la célula F^- .

Recombinación entre genes marcadores después de la transferencia

Hasta ahora, sólo hemos estudiado el proceso de transferencia de información genética entre los individuos que participan en un cruzamiento. La existencia de esta transferencia se infiere a partir de la aparición de recombinantes entre los descendientes del cruzamiento. Sin embargo, antes de que se produzca un recombinante estable, los genes transferidos deben integrarse o incorporarse en el genoma del receptor mediante un mecanismo de intercambio. Consideraremos ahora algunas de las propiedades características de este intercambio.

El intercambio genético en procariotas no se produce entre los dos genomas completos (como ocurre en eucariotas); más bien, tiene lugar entre un genoma *completo*, el de la célula F^- , denominado **endogenote**, y otro *incompleto*, del donante, denominado **exogenote**. De hecho, lo que obtenemos es un diploide parcial o **merocigoto**. La genética bacteriana es la genética de la merocigosis. La Figura 7-12a presenta el esquema de un merocigoto.

Un solo hecho de recombinación no sería muy útil para generar recombinantes viables, porque el círculo se rompería y se formaría un cromosoma lineal extraño, parcialmente diploide (Fig. 7-12b). Para mantener intacto el círculo, debe producirse un número par de entrecruzamientos (Fig. 7-12c). El fragmento producido como resultado de este tipo de recombinación es sólo un genoma parcial, que generalmente se pierde durante el crecimiento celular posterior. Por tanto, no sobreviven los dos productos recíprocos de la recombinación (sólo lo hace uno de ellos). Un aspecto único del intercambio genético en bacterias es que en la mayoría de los casos podemos olvidarnos de los productos recíprocos de la recombinación.

COROLARIO

En la genética bacteriana se estudian los dobles entrecruzamientos y no se espera que aparezcan recombinantes recíprocos.

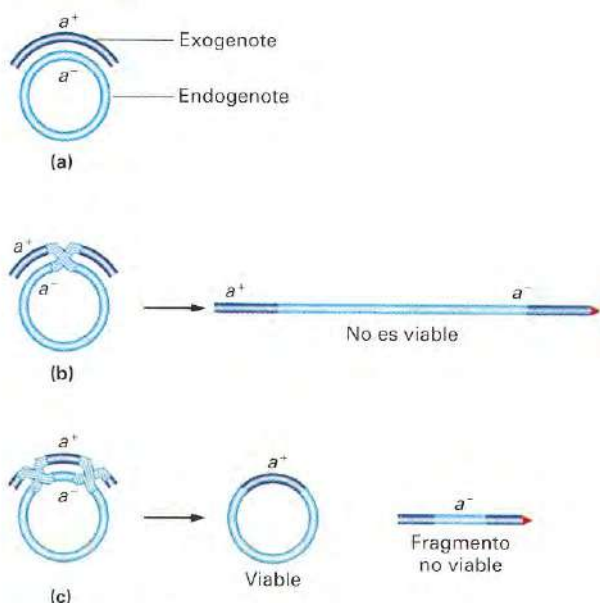
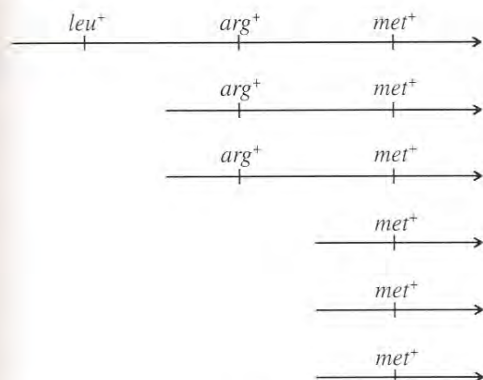


Figura 7-12. Recombinación entre exogenote y endogenote en un merocigoto. (a) El merocigoto. (b) Un único entrecruzamiento genera un cromosoma lineal parcialmente diploide. (c) Un número par de entrecruzamientos conduce a la formación de un círculo más un fragmento lineal.

El gradiente de transferencia

El merocigoto es un diploide parcial y algunos genes no llegan ni siquiera a participar en el proceso. Para apreciarlo mejor, volvamos a fijarnos en las consecuencias de la transferencia génica. En la célula receptora, normalmente, sólo aparece un fragmento del cromosoma donante, debido a que el proceso de conjugación se interrumpe espontáneamente, de manera que rara vez se transfiere el cromosoma completo. Una vez que la transferencia ha comenzado, la rotura espontánea puede ocurrir en cualquier momento. Esta situación genera un **gradiente de transferencia** natural y hace cada vez menos probable que la célula receptora reciba los marcadores genéticos más tardíos («tardíos» se refiere, en este caso, a los marcadores que están cada vez más alejados del origen y se transfieren, por tanto, más tarde). Por ejemplo, en un cruzamiento en el que la estirpe Hfr donante transfiere

los marcadores en el orden *met*, *arg*, *leu*, se espera una distribución de fragmentos como la que se representa a continuación:



Observe que hay muchos más fragmentos que contienen el locus *met* que el locus *arg*, y que el locus *leu* sólo está presente en un fragmento. Es sencillo ver que cuanto más cerca está un marcador del origen, más probable será que se transfiera durante la conjugación.

El concepto de gradiente de transferencia es idéntico al descrito anteriormente para los experimentos de conjugación interrumpida, exceptuando que en este caso estamos permitiendo la interrupción natural del proceso en vez de interrumpirlo mecánicamente.

Determinación del orden de los genes por gradiente de transferencia

Podemos servirnos del gradiente natural de transferencia para ordenar los marcadores genéticos, siempre que seleccionemos un marcador temprano que entre antes que los marcadores que deseamos ordenar. Veamos cómo se lleva a cabo. Supongamos que empleamos una estirpe Hfr que transfiere los siguientes marcadores en el orden *met*, *arg*, *aro*, *his*. En un cruzamiento entre una estirpe Hfr que es *met*⁺ *arg*⁺ *aro*⁺ *his*⁺ *str*^s y una F⁻ que sea *met*⁻ *arg*⁻ *aro*⁻ *his*⁻ *str*^r, se seleccionan recombinantes que crezcan en medio mínimo sin metionina, pero con arginina, aminoácidos aromáticos e histidina, en presencia de estreptomina. En este caso estamos seleccionando recombinantes en las estirpes F⁻ que sean *met*⁺ en un cruzamiento en el cual el locus *met* es el primer marcador que se transfiere. A continuación, podríamos estudiar la herencia de los otros marcadores presentes en la estirpe Hfr, comprobando su crecimiento en medio mínimo con suplementos y en ausencia de cada uno de los nutrientes requeridos. Un resultado típico sería:

met⁺ = 100 %
arg⁺ = 60 %
aro⁺ = 20 %
his⁺ = 4 %

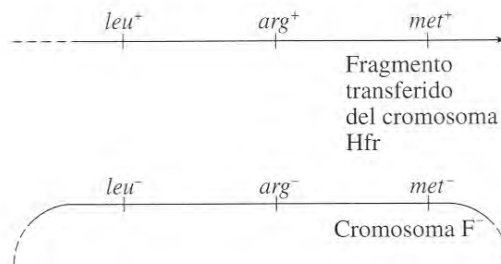
Observe que la frecuencia con la que se heredan los marcadores se corresponde con el orden de transferencia. Para que este método funcione, es crucial que se aplique a marcadores genéticos que entren después del marcador seleccionado, en este caso, después de *met*.

Cartografía de mayor resolución mediante frecuencias de recombinación en cruzamientos bacterianos

Los experimentos de conjugación interrumpida y el gradiente natural de transferencia ofrecen un vasto conjunto de datos de posiciones de los genes a lo largo de todo el mapa, pero se requieren otros métodos para obtener una mayor resolución en la cartografía de marcadores cercanos. En este apartado consideraremos una forma de abordar el problema, empleando las frecuencias de recombinación para medir el ligamiento.

Los primeros intentos de elaborar mapas genéticos a partir de experimentos de conjugación se vieron dificultados por el desconocimiento de que sólo se transfieren fragmentos del cromosoma y de que el gradiente de transferencia produce una tendencia hacia la incorporación de los marcadores más cercanos al origen. Para medir el ligamiento y dar algún significado a los cálculos de las distancias de mapa, es necesario establecer una situación en la que cada marcador tenga la misma oportunidad de ser transferido, de manera que las frecuencias de recombinación dependan sólo de la distancia entre los genes de interés.

Supongamos que tenemos que cartografiar tres marcadores: *met*, *arg* y *leu*. Si el orden es *met*, *arg* y *leu*, y *met* es el primero que se transfiere y *leu* el último, entonces desearíamos obtener una situación como la representada en el diagrama inferior para calcular las distancias de mapa entre estos marcadores:

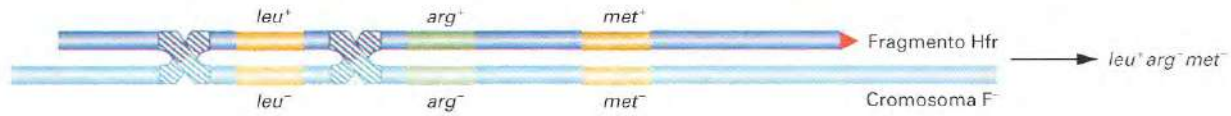


Simplemente tenemos que seleccionar el último marcador que entra, que en este caso es *leu*. ¿Por qué? Porque si seleccionamos el último marcador tendremos la seguridad de que todas las células que recibieron fragmentos con el último marcador también recibieron los marcadores anteriores, es decir, *arg* y *met*, en los mismos fragmentos. Podemos calcular la distancia de mapa del modo clásico, donde la unidad de mapa (u.m.) es equivalente al porcentaje de entrecruzamientos en el intervalo correspondiente del mapa. En la práctica, esto se hace calculando el porcentaje de los recombinantes producidos por recombinación entre dos marcadores, entre el total de recombinantes producidos. Veamos un ejemplo.

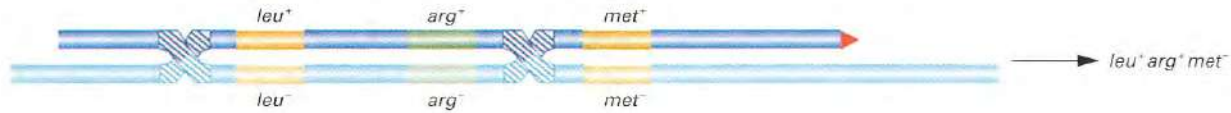
Cruzamiento modelo

En el cruzamiento de la estirpe Hfr que acabamos de describir (*met*⁺, *arg*⁺, *leu*⁺, *str*^s) con una estirpe F⁻ de genotipo *met*⁻, *arg*⁻, *leu*⁻, *str*^r, seleccionaríamos los recombinantes *leu*⁺ y luego buscaríamos los marcadores *arg* y *met*. En este caso, los marcadores *arg* y *met* se denominan **marcadores no seleccionados**. La Figura 7-13 ilustra los tipos de entrecruzamientos esperados. Observe que se necesitan dos hechos de recombinación para in-

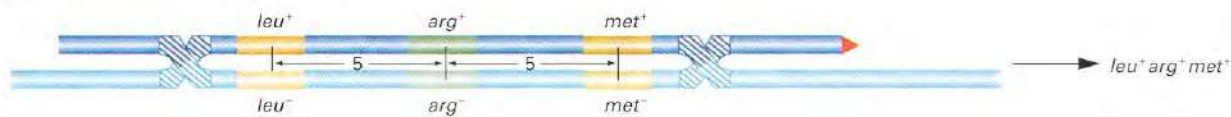
(a) Integración sólo del marcador tardío



(b) Integración del marcador tardío y uno de los tempranos



(c) Integración de todos los marcadores



(d) Integración de los dos marcadores extremos, pero no del central

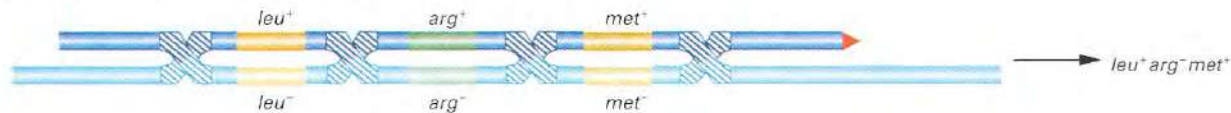


Figura 7-13. Incorporación de un marcador tardío en un cromosoma F^- de *E. coli*. Después del cruzamiento con una cepa Hfr, se selecciona el marcador leu^+ , que se transfiere tardíamente. Los marcadores tempranos (arg^+ y met^+) pueden ser o no incorporados, dependiendo del sitio donde ocurre la recombinación entre el fragmento Hfr y el cromosoma F^- . Como se indica en (c), se producirán entrecruzamientos en alguno de estos intervalos el 5 % de las veces, que generarán recombinantes $leu^+ arg^- met^-$ (a) y $leu^+ arg^+ met^-$ (b). Los entrecruzamientos que ocurren fuera de estos intervalos pueden generar el recombinante $leu^+ arg^+ met^+$ (c). El recombinante $leu^+ arg^- met^+$ requiere dos entrecruzamientos adicionales (d).

corporar parte del fragmento entrante en el cromosoma F^- . Debe producirse un hecho de recombinación a cada lado del marcador seleccionado (leu). Así, en la Figura 7-13, un entrecruzamiento debe producirse a la izquierda del marcador leu y el otro a la derecha. Supongamos que la distancia en el mapa entre cada marcador es 5 u.m. (un 5 % de recombinación). En un 5 % del total de recombinantes leu^+ , el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre arg y arg (Fig. 7-13a); en otro 5 % de los casos, el segundo entrecruzamiento ocurrirá entre arg y met (Fig. 7-13b). Esperaríamos entonces que el 90 % de los recombinantes leu^+ seleccionados fueran $arg^+ met^+$, ya que el segundo entrecruzamiento ocurre fuera del intervalo $leu-arg-met$ (Fig. 7-13c) en un 90 % de los casos. También esperaríamos que un 5 % de los recombinantes leu^+ fueran $arg^- met^-$, como resultado de un entrecruzamiento entre leu y arg , y que otro 5 % de los recombinantes leu^+ fueran $arg^+ met^-$, producidos por recombinación entre arg y met . En realidad, simplemente estamos determinando el porcentaje de veces que el segundo entrecruzamiento ocurre en cada uno de los tres intervalos posibles.

En un cruzamiento como el descrito, hay una clase de recombinantes que requiere dos hechos de recombinación adicionales (Fig. 7-13d). En este caso, los recombinantes $leu^+ arg^- met^+$ necesitarían cuatro entrecruzamientos en lugar de dos. Estos recombinantes raramente se observan, debido a que su frecuencia se ve muy reducida en comparación con las otras dos clases.

Transferencia infecciosa de genes marcadores por episomas

El trabajo de Edward Adelberg llevó al descubrimiento de la transferencia de genes con alta frecuencia mediada por episomas. Cuando en 1959 inició sus estudios sobre recombinación, la estirpe Hfr concreta con la que trabajó producía células F^- , por lo que las frecuencias de recombinación no eran muy altas. Adelberg denominó F' a este factor de fertilidad concreto para distinguirlo del factor F normal, por las siguientes razones:

1. La estirpe F^+ portadora del factor F^+ volvía a convertirse en estirpe Hfr mucho más frecuentemente que las estirpes típicas F^+ .
2. F' siempre se integraba en la misma posición, dando lugar al cromosoma Hfr original. (Recuerde que las estirpes Hfr derivadas al azar de machos F^+ tienen los orígenes de transferencia en posiciones distintas).

¿Cómo podrían explicarse estas propiedades características de F' ? La respuesta llegó cuando se obtuvo otro factor F' a partir de una estirpe Hfr en la que el locus lac^+ se encontraba cerca del extremo terminal del cromosoma Hfr (se transfería muy tarde).

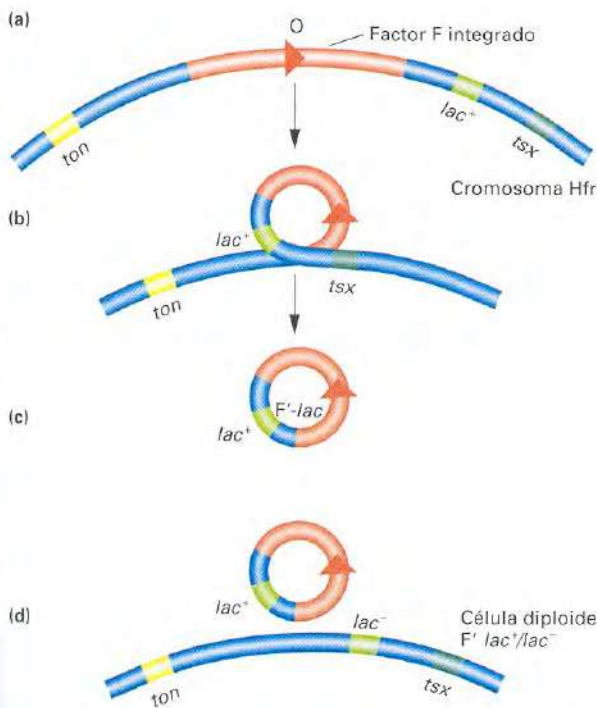


Figura 7-14. Formación y reintegración de un factor F', en este caso F' *lac*. (a) F aparece integrado entre los alelos *ton* y *lac*⁺ de una estirpe Hfr. (b y c) La escisión y separación errónea incluye al locus *lac*, produciendo una partícula F' *lac*⁺. (d) La transferencia de la partícula F' *lac* a una estirpe receptora F⁻ *lac*⁻ genera un diploide parcial F' *lac*⁺/*lac*⁻. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

Utilizando esta estirpe Hfr *lac*⁺, François Jacob y Adelberg encontraron un derivado F⁺ que transfería *lac*⁺ a estirpes receptoras F⁻ *lac*⁻ con una frecuencia muy elevada. Además, las células receptoras que se comportaban como F⁺ *lac*⁺ producían en ocasiones células hijas F⁻ *lac*⁻ con una frecuencia de 1×10^{-3} . Por tanto, el genotipo de los receptores parecía ser F' *lac*⁺/*lac*⁻.

Ahora ya tenemos la pista: F' es un elemento citoplásmico que lleva parte del cromosoma bacteriano. De hecho, no es más que un factor F que ha integrado un fragmento del cromosoma de la célula hospedadora. En la Figura 7-14 se ilustra el proceso por el que se origina y se reintegra. Este factor F' concreto se conoce como F'-*lac*, porque el fragmento cromosómico incorporado contiene el gen *lac*. Se han aislado factores F' con muchos genes cromosómicos diferentes y se han denominado de una forma acorde. Por ejemplo, los factores F' portadores de *gal* o *trp* se conocen como F'-*gal* o F'-*trp*, respectivamente. Puesto que las células F' *lac*⁺/*lac*⁻ presentan fenotipo Lac⁺, podemos deducir que *lac*⁺ es dominante sobre *lac*⁻. Como veremos más adelante, en el Capítulo 11, las relaciones de dominancia-recesividad entre alelos aportan una información muy útil a la hora de interpretar la función de un gen.

La diploidía parcial de segmentos específicos del genoma puede generarse utilizando un conjunto de F' originados a partir de estirpes Hfr. Las células F' se seleccionan determinando si hay transferencia infecciosa de genes normalmente tardíos de

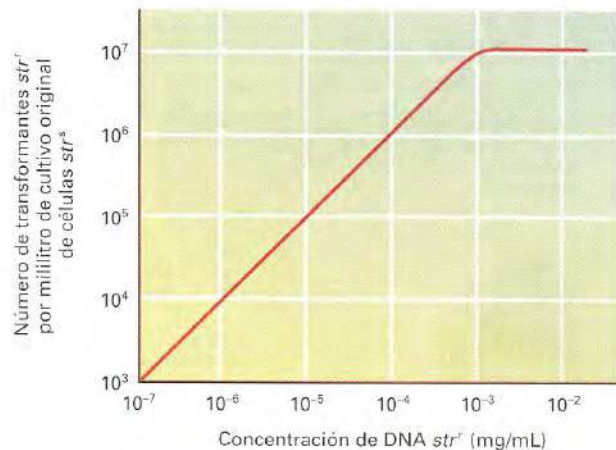


Figura 7-15. Transferencia genética de la resistencia a estreptomicina (*str*⁺) a células de *E. coli* sensibles a estreptomicina (*str*⁻). La obtención de transformantes *str*⁺ entre las células *str*⁻ depende de la concentración de DNA *str*⁺ utilizada. (De G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company, Nueva York.)

una estirpe Hfr específica. Algunas estirpes F' llevan fragmentos muy grandes (hasta una cuarta parte) del cromosoma bacteriano; si se utilizan marcadores adecuados, los merocigotos generados pueden ser utilizados en estudios de recombinación.

COROLARIO

Durante la conjugación entre un donante Hfr y un receptor F⁻, los genes del donante se transfieren linealmente a la célula F⁻ a través del cromosoma bacteriano, siendo el factor de fertilidad el último que se transfiere.

Durante la conjugación entre un donante F⁺ portador de un plásmido F' y un receptor F⁻, puede producirse la transferencia infecciosa de una parte concreta del genoma donante a la célula F⁻, por medio del plásmido. La parte que se transmite se encontraba originalmente al lado del locus F en la estirpe Hfr a partir de la que se originó la estirpe F⁺.

Transformación bacteriana

Algunas bacterias cuentan con otro método de transferencia de DNA y producción de recombinantes que no requiere conjugación. La conversión de un genotipo en otro por la introducción de DNA exógeno (es decir, fragmentos de DNA de una fuente externa) recibe la denominación de **transformación**. Este proceso fue descubierto en *Streptococcus pneumoniae*, en 1928, por Frederick Griffith. En 1944, Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty demostraron que el «principio transformante» era el DNA. Ambos resultados constituyen hitos históricos en la elucidación de la naturaleza molecular de los genes. Trataremos este trabajo con más detalle en el Capítulo 8.

Tras la demostración de que el DNA era el agente que determinaba el componente polisacárido de *S. pneumoniae*, se demostró la existencia de transformación para otros genes, tales como los que confieren resistencia a antibióticos (Fig. 7-15). El principio transformante, DNA exógeno, se incorpora al cromoso-

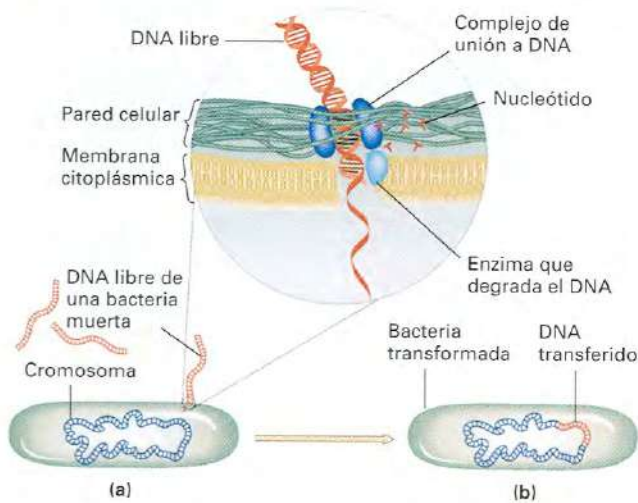


Figura 7-16. Una bacteria en el proceso de transformación (a) recoge DNA libre procedente de una célula bacteriana muerta. Complejos de unión a DNA localizados en la superficie de la bacteria incorporan el DNA (círculo ampliado) y las enzimas degradan una cadena de DNA hasta nucleótidos, mientras que la otra cadena se integra en el cromosoma de la bacteria (b). (Modificado de R. V. Miller, «Bacterial Gene Swapping in Nature.» Copyright © 1998, por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

ma bacteriano mediante un proceso de rotura e inserción análogo al descrito para los cruzamientos $Hfr \times F^-$ de la Figura 7-12. Sin embargo, observe que durante la *conjugación*, el DNA se transfiere desde una célula viva a otra mediante un contacto íntimo, mientras que en la *transformación*, la célula adquiere fragmentos aislados de DNA externo. La Figura 7-16 describe este proceso.

Análisis del ligamiento por transformación

La transformación ha sido un instrumento muy útil en varias áreas de la investigación con bacterias. Más adelante trataremos su aplicación en algunas de las técnicas de Ingeniería genética. En este apartado, examinaremos su utilidad en relación con la obtención de información de las relaciones de ligamiento.

Cuando se extrae DNA (el cromosoma bacteriano) para realizar experimentos de transformación, es inevitable que se produzca la ruptura parcial del DNA en fragmentos más pequeños. Si dos genes donantes están situados muy próximos en el cromosoma, existe una alta probabilidad de que ambos se transfieran en el mismo fragmento de DNA transformante y se produzca, por tanto, una **transformación doble**. Por el contrario, si los genes están muy separados en el cromosoma, lo más probable es que estén contenidos en segmentos transformantes diferentes y la frecuencia de transformantes dobles será igual al producto de las frecuencias de transformación de cada gen por separado. Por tanto, debe ser posible comprobar un estrecho ligamiento entre dos genes mediante el análisis de la desviación de la regla del producto.

Desgraciadamente, hay varios factores que complican la situación, de los cuales el más importante es que no todas las células de una población bacteriana se encuentran en estado de **competencia** para ser transformadas. Debido a que las transformaciones

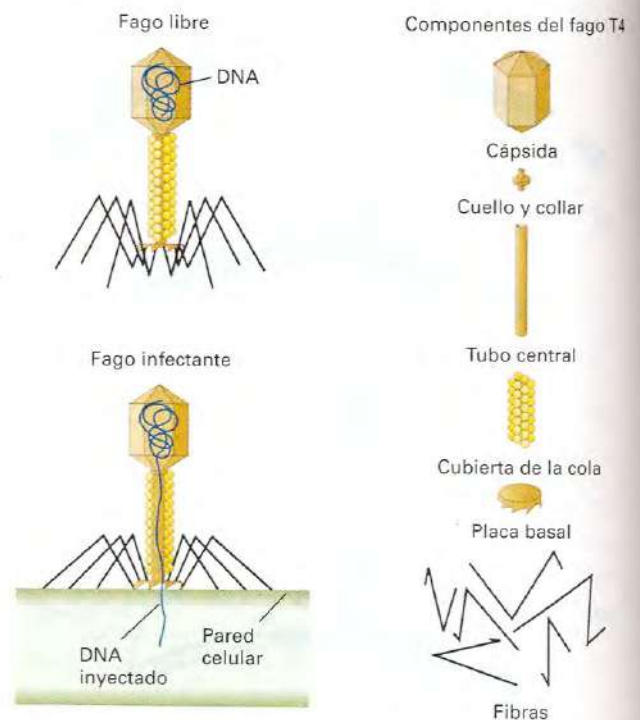


Figura 7-17. El fago T4, representado en su estado libre y en el momento de infectar a una célula de *E. coli*. Durante el proceso de infección, el fago inyecta su DNA dentro de la célula a través del hueco de la cola. En la parte derecha, el fago se ha desensamblado en sus diferentes componentes para mostrar su estructura tridimensional extraordinariamente organizada. (Modificado de R. S. Edgar y R. H. Epstein, «The Genetics of a Bacterial Virus». Copyright © 1965 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)



Figura 7-18. Ampliación del fago T4 de *E. coli* que muestra su estructura en detalle: obsérvese la cápsida, la cola y las fibras de la cola. El fago T4 fue empleado por Benzer en sus experimentos sobre la naturaleza del gen *rII* (de lisis rápida). (Fotografía de Jack D. Griffith.)

individuales se expresan como proporciones, el éxito de la regla del producto obviamente depende del tamaño absoluto de estas proporciones. Hay modos de calcular la proporción de células competentes, pero en este momento no es necesario que desviemos nuestra atención a este tema. Puede ampliar sus conocimientos sobre el análisis de ligamiento por transformación, resolviendo uno de los problemas que aparecen al final del capítulo, en el que se supone un 100% de competencia en las células receptoras.

Genética de bacteriófagos

En este apartado, describiremos cómo se realizan los cruzamientos con virus que infectan bacterias (fagos) y los experimentos que analizan minuciosamente la estructura fina del gen.

Infección de bacterias por fagos

La mayoría de las bacterias son susceptibles al ataque por bacteriófagos, que literalmente significa «comedores de bacterias».

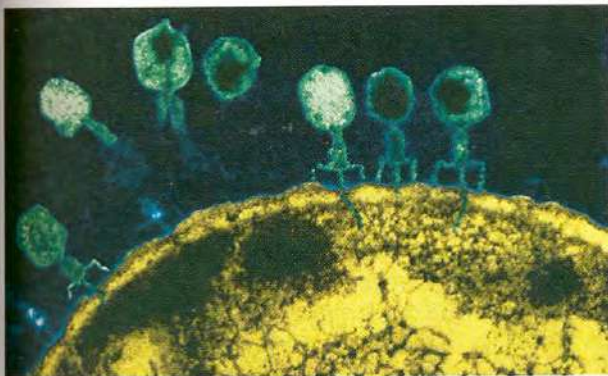


Figura 7-19. Micrografía de un bacteriófago adsorbiéndose a una bacteria e inyectando su DNA. (Dr. L. Caro/Science Photo Library, Photo Researches.)

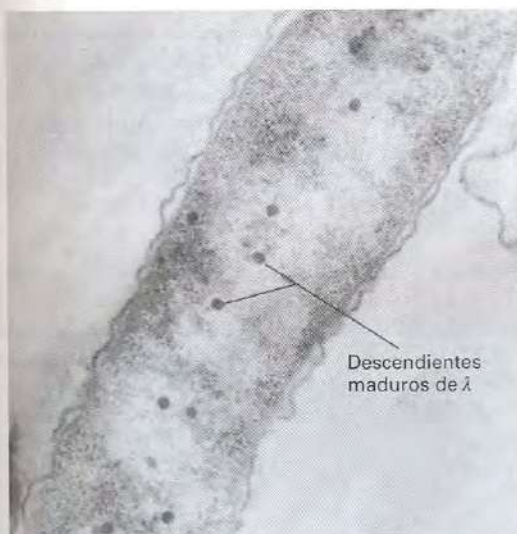


Figura 7-20. Partículas descendientes del fago λ madurando dentro de una célula de *E. coli*. (Jack D. Griffith.)

Un fago está constituido por un «cromosoma» de ácido nucleico (DNA o RNA) rodeado por una cubierta de moléculas de proteína. Una serie de fagos bien estudiados son los que se conocen como T1, T2, etc. Las Figuras 7-17 y 7-18 muestran la estructura de un fago perteneciente a la serie denominada **fagos T-par** (T2, T4, etc.)

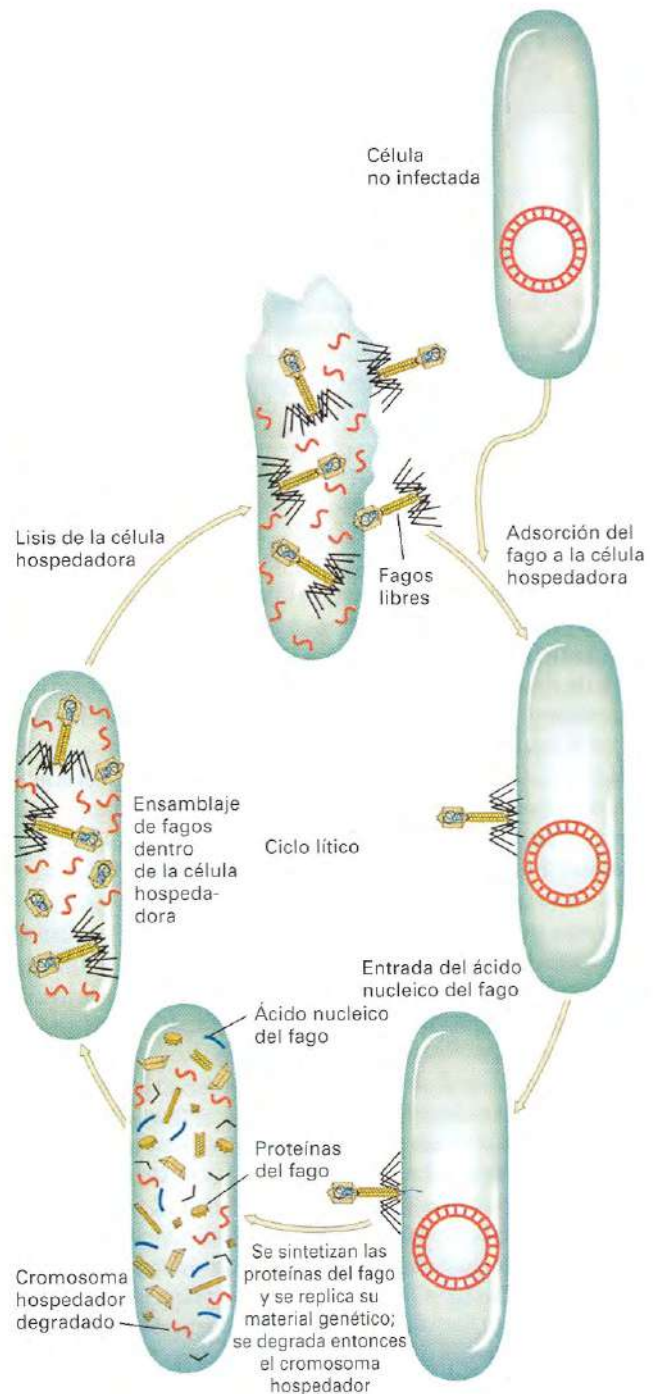


Figura 7-21. Ciclo lítico de un bacteriófago de transducción generalizada. (Modificado de J. Darnell, H. Lodish, y D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*. Copyright © 1986 por W. H. Freeman and Company.)

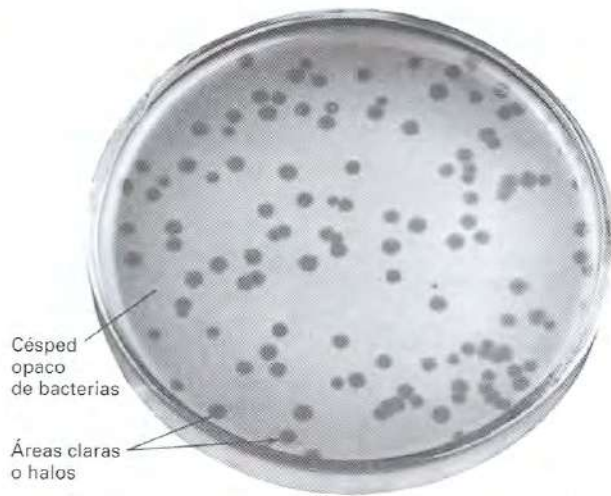


Figura 7-22. Aspecto de los halos producidos por un fago. Se extienden unos pocos fagos sobre una placa de medio sólido que contiene un césped de *E. coli* bien crecido. Cada fago infecta una célula bacteriana, dando lugar a 100 o más fagos descendientes que son liberados por lisis de la célula de *E. coli* y que a su salida infectan a células vecinas. Éstas, a su vez, sufren el mismo proceso, que continúa hasta que aparece una zona clara o halo, sobre el césped de bacterias. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

Durante la infección, el fago se adsorbe a una bacteria e inyecta su material genético dentro del citoplasma (Fig. 7-19). La información genética del fago pasa entonces a controlar la maquinaria de la célula bacteriana, desconectando la síntesis de componentes bacterianos y redirigiendo los materiales de síntesis de la bacteria hacia la fabricación de componentes del fago (Fig. 7-20). (La utilización de la palabra *información* tiene interés en este contexto, ya que significa literalmente «dar forma». Y ése es precisamente el papel del material genético del virus: suministrar órdenes para crear formas. En este caso, la forma es la estructura elegantemente simétrica de los nuevos fagos). Finalmente, se libera un elevado número de fagos descendientes cuando se rompe la pared de la célula bacteriana. Este proceso de rotura se denomina **lisis**.

Pero ¿cómo podemos estudiar el fenómeno de la herencia en fagos, si éstos son tan pequeños que sólo son visibles al microscopio electrónico? En el caso de los fagos, no se producen colonias visibles mediante siembra en placa, pero podemos producir una manifestación visible de las bacterias infectadas aprovechando algunas propiedades de los fagos. Veamos las consecuencias de la infección de una bacteria por un fago. La Figura 7-21 nos muestra la secuencia de acontecimientos en el ciclo de infección que lleva a la liberación de los fagos descendientes fuera de la célula lisada. Tras la lisis, los fagos descendientes infectan a las bacterias vecinas. Este fenómeno produce un incremento exponencial del número de células lisadas. Quince horas después del comienzo de un experimento de este tipo, los efectos son detectables a simple vista, observándose un área clara, **calva** o **halo de lisis**, en el césped opaco de bacterias que crecen sobre la superficie de una placa con medio sólido (Fig. 7-22). Dependiendo del genoti-

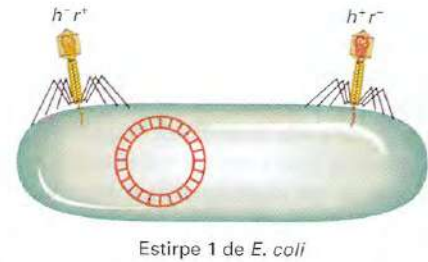


Figura 7-23. Infección mixta de *E. coli* por dos fagos.

po del fago, estos halos pueden ser grandes o pequeños, claros o turbios, etc. Por tanto, la **morfología del halo** es un carácter del fago que puede ser objeto de análisis. Otro carácter fenotípico de los fagos que puede ser analizado genéticamente es el **espectro de hospedadores**, ya que los fagos pueden diferir en las estirpes bacterianas que infectan y lisan. Por ejemplo, algunas estirpes bacterianas son inmunes a la adsorción o a la inyección del material genético de ciertos fagos específicos.

Cruzamientos con fagos

¿Podemos cruzar dos fagos de la misma manera en que cruzamos dos estirpes bacterianas? Podemos ilustrar el proceso utilizando un cruzamiento entre fagos T2, estudiados originalmente por Alfred Hershey. Los genotipos de dos estirpes parentales son $h^- r^+$ y $h^+ r^-$. Los alelos corresponden a los siguientes fenotipos: h^- infecta a dos estirpes diferentes de *E. coli* (que podemos llamar estirpes 1 y 2); h^+ infecta exclusivamente a la estirpe 1; r^- lisa las células con rapidez, produciendo así halos grandes; y r^+ lisa las células lentamente, produciendo halos pequeños.

En el cruzamiento, se infecta la estirpe 1 de *E. coli* con los dos fagos parentales T2, en una relación de fagos:bacterias (denominada **multiplicidad de infección**) suficientemente alta para asegurar que una gran proporción de células sean infectadas simultáneamente por ambos tipos de fagos. Este tipo de infección (Fig. 7-23) se denomina **infección mixta** o **infección doble**. El lisado de fagos (la descendencia) se analiza mediante su extensión sobre un césped de bacterias compuesto por una mezcla de las estirpes 1 y 2 de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro tipos de halos (Fig. 7-24 y Cuadro 7-3). Estos cuatro genotipos pueden clasificarse fácilmente como parentales ($h^- r^+$ y $h^+ r^-$) y recom-

CUADRO 7-3. Tipos de halos producidos por los fagos descendientes del cruzamiento $h^- r^+ \times h^+ r^-$

Fenotipo	Genotipo inferido
Claro y pequeño	$h^- r^+$
Turbio y grande	$h^+ r^-$
Turbio y pequeño	$h^+ r^+$
Claro y grande	$h^- r^-$

Nota: la claridad se debe al alelo h^- , que permite la infección de las dos estirpes bacterianas que constituyen el césped; la turbidez se debe al alelo h^+ , que limita la infección a las células de la estirpe 1.

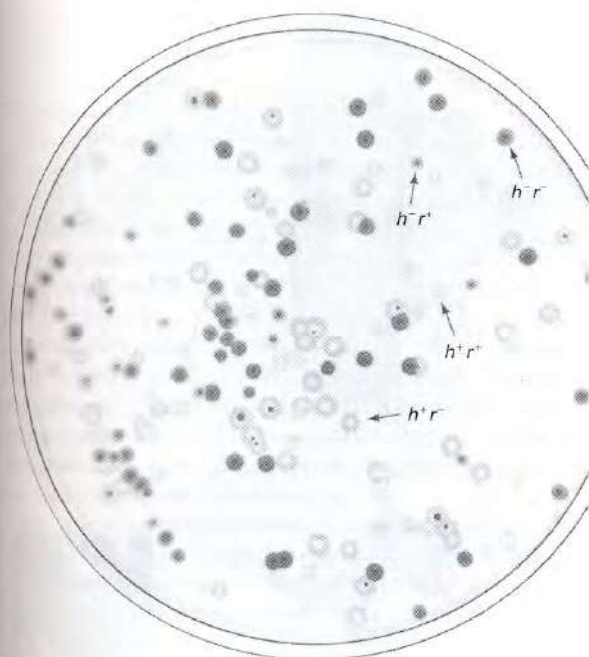


Figura 7-24. Fenotipos de los halos producidos por los descendientes del cruceamiento $h^+ r^+ \times h^- r^-$. Se añaden suficientes fagos de cada genotipo para asegurar que la mayoría de las bacterias será infectada al menos por un fago de cada tipo. Tras la lisis celular, se recogen los fagos descendientes y se añaden a un césped apropiado de *E. coli*. Pueden distinguirse cuatro fenotipos entre los halos, dos que corresponden a los dos tipos parentales y otros dos a los recombinantes. (De G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 por W. H. Freeman and Company.)

binantes ($h^+ r^+$ y $h^- r^-$), pudiendo calcularse la frecuencia de recombinación del modo siguiente:

$$RF = \frac{(h^+ r^+) + (h^- r^-)}{n.^{\circ} \text{ de halos totales}}$$

Si suponemos que recombinan los genomas completos de los fagos, pueden ocurrir entrecruzamientos sencillos que dan lugar a productos recíprocos viables, al contrario que en los cruzamientos bacterianos donde se requieren dos hechos de recombinación. Sin embargo, el análisis de los cruzamientos de fagos está sujeto a ciertas complicaciones. En primer lugar, pueden ocurrir varios ciclos de intercambio en el interior del hospedador; un recombinante producido inmediatamente después de la infección puede sufrir otros intercambios posteriormente. En segundo lugar, puede producirse la infección doble tanto de fagos genéticamente similares como de fagos diferentes. Por tanto, suponiendo el caso de dos fagos parentales P_1 y P_2 , además del cruzamiento de interés $P_1 \times P_2$, ocurren al mismo tiempo cruzamientos $P_1 \times P_1$ y $P_2 \times P_2$. Por estos dos motivos, los recombinantes obtenidos en los cruzamientos entre fagos son el resultado de un conjunto de hechos, más que de hechos de intercambio individuales bien definidos. No obstante, siempre que el resto de condiciones sean iguales, el cálculo de la RF es un índice válido de las distancias de mapa en fagos.

CUADRO 7-4. Fenotipos de halos producidos mediante diferentes combinaciones de estirpes de *E. coli* y de fagos

Estirpe del fago T4	Estirpe de <i>E. coli</i>	
	B	K
<i>rII</i>	Grande, redondo	No produce halos
<i>rII</i> ⁺	Pequeño, irregular	Pequeño, irregular

COROLARIO

Para estudiar el proceso de recombinación en fagos, se ponen en contacto los cromosomas parentales en una misma célula hospedadora mediante infección mixta. Los fagos descendientes se analizan y su genotipo se clasifica en parental o recombinante.

El sistema *rII*

Los trabajos de Seymour Benzer en los años cincuenta refinaron el análisis de los cruzamientos con fagos hasta tal punto que podían detectarse frecuencias muy pequeñas de recombinación. Su trabajo condujo a una mayor comprensión de la naturaleza de la estructura fina del gen, que consideraremos detalladamente en el Capítulo 9. La clave de su trabajo fue el desarrollo de un sistema que permitiera la selección de recombinantes raros. Dicho sistema utiliza los genes *rII* del fago T4.

Un tipo de fago mutante producía halos muy grandes e irregulares, de modo que llamó a estos fagos **mutantes *r*** (de lisis rápida). Benzer analizó genéticamente los mutantes *r* y localizó las mutaciones responsables para el fenotipo *r* en dos loci: *rI* y *rII*. Luego se concentró en los mutantes *rII*.

Fue una propiedad extraordinaria de los mutantes *rII* la que hizo posible el trabajo de Benzer: los mutantes *rII* tienen un espectro de hospedador distinto al de los fagos silvestres. Como hospedadores del fago T4 pueden usarse dos estirpes de *E. coli* diferentes, aunque relacionadas, llamadas B y K(λ). Con ambas bacterias, puede distinguirse entre fagos mutantes *rII* y silvestres. *E. coli* B permite el crecimiento de ambos, aunque los halos que aparecen son de tamaño distinto: los fagos silvestres producen halos pequeños y los mutantes *rII* producen halos grandes. *E. coli* K, abreviación de *E. coli* K(λ), no permite el crecimiento de los mutantes *rII*, pero sí el de los fagos silvestres. Los mutantes *rII* son **mutantes condicionales**, es decir, mutantes que pueden crecer en una serie de condiciones, pero no en otras. Se dice que *E. coli* B es **permissiva** para los mutantes *rII*, porque permite su multiplicación, mientras que *E. coli* K se considera **no permissiva** para dichos mutantes, porque no permite su multiplicación. El Cuadro 7-4 muestra las características de crecimiento y morfología del halo de estos fagos en cada estirpe hospedadora.

Sistemas de selección en cruzamientos genéticos con fagos

Benzer cruzó varios mutantes *rII* del fago T4 y calculó las frecuencias de recombinación, que utilizó posteriormente para localizar las mutaciones en la región del gen *rII*.

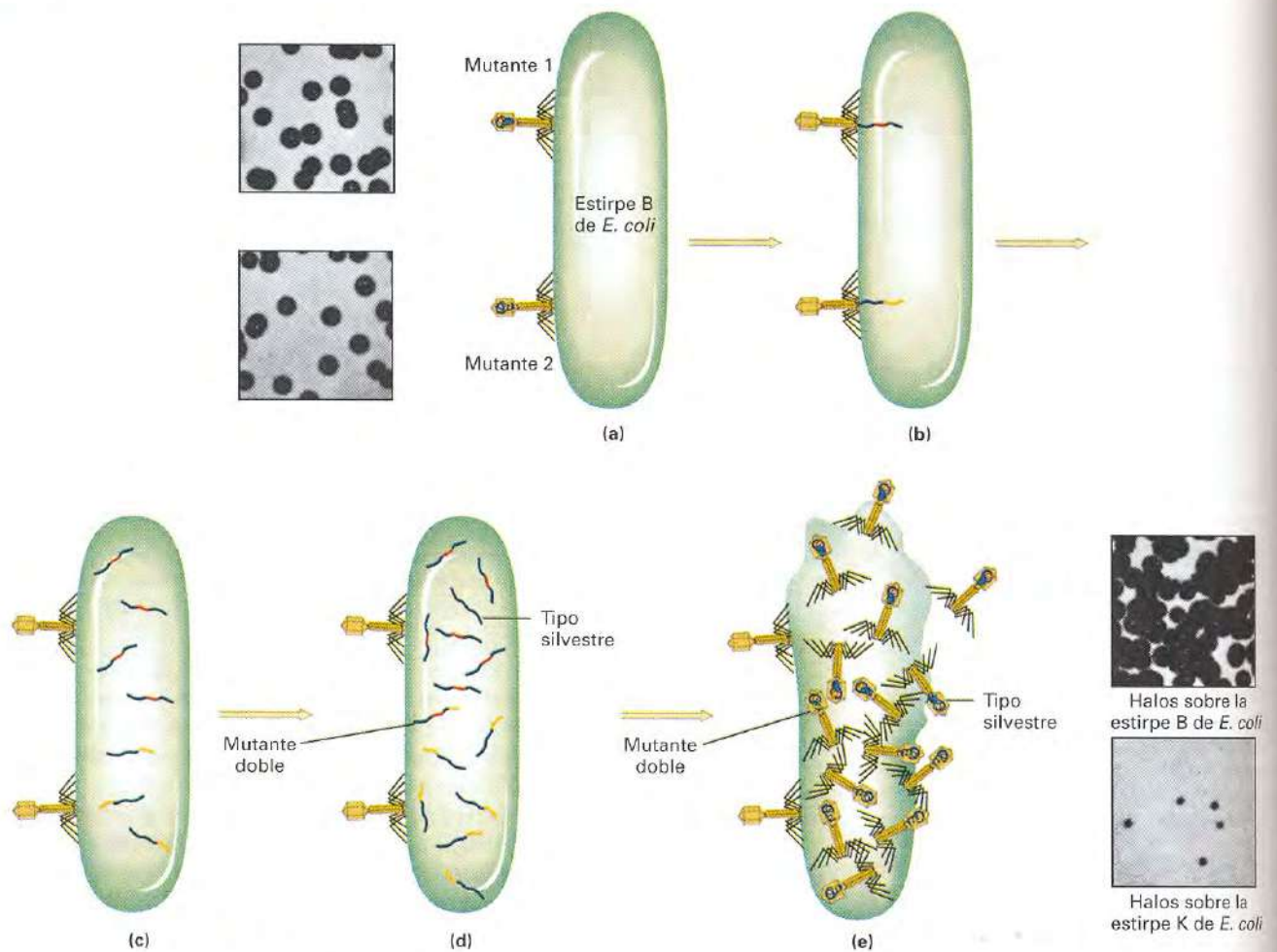


Figura 7-25. El proceso de recombinação permite que fragmentos de DNA de dos mutantes de fagos diferentes se combinen en una nueva molécula de DNA, que puede contener las mutaciones de ambos fagos o ninguna de ellas. Los mutantes obtenidos de los diferentes cultivos se mezclan con un cultivo de la estirpe B de *E. coli*. El cruzamiento ocurre cuando el DNA de cada uno de los fagos mutantes infecta a un solo bacilo. La mayoría de las réplicas de DNA son similares a un tipo de fago o al otro, pero, en ocasiones, la recombinação genera un mutante doble o un recombinante de tipo silvestre, que no contiene ninguna mutación. Al sembrar la descendencia de cada cruzamiento sobre la estirpe B, todos crecen con éxito, produciendo muchos halos. Al sembrar sobre la estirpe K, sólo los recombinantes del tipo silvestre son capaces de crecer. Puede detectarse un solo recombinante silvestre entre unos 100 millones de descendientes. (De S. Benzer, «The Fine Structure of the Gene.» Copyright © 1962. Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)

Veamos cómo se realiza esto. Supongamos que deseamos cruzar dos mutantes *rII* y recuperar fagos recombinantes silvestres. Ya que tanto los fagos silvestres como los mutantes *rII* forman halos distinguibles unos de otros, podemos cruzar dos mutantes *rII* distintos en *E. coli* B y examinar su descendencia sobre la propia estirpe *E. coli* B (Fig. 7-25, fotografía superior de la derecha), esperando encontrar algún halo pequeño silvestre entre los halos parentales grandes *rII*. Si la frecuencia de recombinação es suficiente para producir un número de halos silvestres del orden del 2 al 3 % o más, este procedimiento bastaría. Sin embargo, si la recombinação fuera menor del 1 %, el trabajo necesario para elaborar el mapa de muchas mutaciones *rII* sería abrumador.

No obstante, en vez de sembrar los fagos descendientes del cruzamiento en *E. coli* B, podríamos sembrarlos en *E. coli* K(λ)

(Fig. 7-25, fotografía inferior de la derecha), en la cual sólo crecerían los fagos recombinantes silvestres. Así detectaríamos los fagos recombinantes con toda facilidad, incluso si la frecuencia de recombinação fuera muy baja (digamos, 0.01 %). ¿Por qué? Porque un lisado de fagos (mezcla de fagos producida tras la lisis de las bacterias) típico de tales infecciones (esté o no implicado un cruzamiento) contiene más de 10^9 fagos por mililitro. Si mezclamos 0.1 mL de dicho lisado con 0.1 mL de bacterias *E. coli* K, y la frecuencia de recombinação es del 0.01 %, tendremos más de 10^5 (100 000) fagos silvestres recombinantes que han infectado a las bacterias. (En la práctica, se emplean diluciones crecientes del lisado de fagos hasta que se produzca un número de halos fácilmente cuantificable). De esta manera, podemos darnos perfecta cuenta del poder de resolución del sistema

rII-E. coli B/K. En un solo mililitro podemos encontrar un recombinante o revertiente entre 10^9 individuos. ¡Compare esto con el intento de encontrar un recombinante entre 10^9 moscas *Drosophila* o 10^9 ratones!

Una vez realizado el cruce, necesitamos determinar la frecuencia de recombinación. Para ello, en primer lugar, contamos el número de partículas víricas activas, o unidades formadoras de halos (ufh) que crecen sobre *E. coli* K (recuerde que éstos son sólo fagos recombinantes silvestres) y sobre *E. coli* B (éstos representan el total de los fagos descendientes, puesto que todas las partículas víricas crecen en la estirpe B). La frecuencia de recombinación puede calcularse dividiendo el doble del número de ufh sobre *E. coli* K por el número de ufh sobre *E. coli* B. ¿Por qué usamos el doble de ufh sobre *E. coli* K? Para tener en cuenta los recombinantes que son mutantes dobles y que no se detectan; dichos mutantes deben estar presentes en la misma proporción que los recombinantes silvestres.

Finalmente, en un cruzamiento de este tipo es necesario sembrar por separado cada lisado parental sobre *E. coli* K para determinar cuántos revertientes silvestres había en la población. Las **mutaciones de reversión** ocurren con una frecuencia muy baja, pero real. Es importante calcular esta frecuencia, y compararla con la frecuencia de recombinación calculada, para estar seguro de que tal recombinación ha ocurrido y no se trata simplemente de la reversión de los tipos parentales.

En resumen, el uso que dio Benzer al sistema *rII* y a dos hospedadores bacterianos distintos le proporcionó un método de selección de hechos poco frecuentes, evitando el escrutinio de gran número de halos.

COROLARIO
Benzer rentabilizó el fantástico poder de resolución derivado del empleo de un método de selección para acontecimientos poco frecuentes en fagos que se multiplican rápidamente. Esto le permitió cartografiar un gen con detalle a escala molecular.

Transducción

Algunos fagos son capaces de movilizar genes bacterianos y transferirlos de unas bacterias a otras por medio de un proceso denominado *transducción*. Por tanto, la transducción constituye un mecanismo de transferencia genética entre bacterias, adicional a los que ya hemos considerado: la conjugación, la transferencia infecciosa de episomas y la transformación.

Descubrimiento de la transducción

En 1951, Joshua Lederberg y Norton Zinder estudiaban procesos de recombinación en la bacteria *Salmonella typhimurium*, aplicando las técnicas que ya habían sido utilizadas eficazmente en *E. coli*. Estos investigadores utilizaron dos estirpes diferentes: una de ellas era de genotipo *phe⁻ trp⁻ tyr⁻* y la otra era *met⁻ his⁻* (no nos preocuparemos de momento sobre la naturaleza de estos marcadores, sólo tendremos en cuenta que los alelos mutantes confieren auxotrofia). Cuando cualquiera de las dos estirpes se sembraba en

placas de medio mínimo, no se observaban células silvestres. Sin embargo, tras mezclar las dos estirpes, aparecían células silvestres en una frecuencia aproximada de 1 de cada 10^5 . Hasta ahora, la situación parece similar a la recombinación en *E. coli*.

Sin embargo, en este caso también obtuvieron recombinantes en un experimento con un tubo en U, en el que el filtro impedía el contacto celular (conjugación). Variando el tamaño de poro del filtro que separaba los dos brazos, encontraron que el agente responsable de la recombinación tenía un tamaño parecido al del virus P22, un fago atemperado de *Salmonella*. Estudios adicionales reforzaron la idea de que el vector que permitía la recombinación era efectivamente el fago P22. El agente filtrable y P22 tienen propiedades idénticas en lo que respecta a tamaño, sensibilidad a antisueños e inmunidad a enzimas hidrolíticas. De este modo, Lederberg y Zinder, en lugar de confirmar la conjugación en *Salmonella*, descubrieron un nuevo tipo de transferencia genética mediada por virus que denominaron **transducción**. Durante el ciclo lítico, algunas partículas víricas incorporan genes bacterianos que más tarde son transferidos a otro hospedador, donde el virus introduce su contenido. Posteriormente, se ha demostrado que la transducción es bastante común tanto en los fagos atemperados como en los virulentos.

Hay dos tipos de transducción: generalizada y especializada. Los fagos de transducción *generalizada* pueden transferir cualquier parte del cromosoma de la bacteria que infectan, mientras que los fagos de transducción *especializada* únicamente llevan consigo partes específicas del cromosoma bacteriano.

Transducción con fagos y transducción generalizada

¿Cómo se originan los fagos transductores? En 1956, K. Ikeda y J. Tomizawa clarificaron esta cuestión realizando unos experimentos con el fago P1, un fago atemperado de *E. coli*. Observaron que cuando una célula donante no lisogénica se lisaba como consecuencia de una infección por P1, el cromosoma bacteriano se rompía en fragmentos pequeños. Ocasionalmente, las partículas de fago en formación empaquetaban accidentalmente DNA bacteriano en la cápsida en lugar del DNA del fago, dando origen al fago transductor.

Debido a que las proteínas de la cápsida determinan la capacidad del fago para atacar a una célula, tales fagos transductores pueden adsorberse a la célula bacteriana e inyectar su contenido, que en este caso son genes bacterianos donantes. Cuando se inyecta el contenido de un fago transductor al interior de una célula recipiente, se crea una situación de meroploidía en la cual los genes transducidos pueden incorporarse por recombinación (Fig. 7-26). Puesto que puede transducirse cualquier marcador de la célula hospedadora, este tipo de transducción se denomina **transducción generalizada**.

Los fagos P1 y P22 pertenecen a un grupo que muestra transducción generalizada (es decir, transfieren prácticamente cualquier gen del cromosoma hospedador). Durante su ciclo de vida, P22 probablemente se inserta en el cromosoma hospedador en forma de profago, mientras que P1 permanece independiente como un gran plásmido, pero ambos fagos son capaces de transducir marcadores por empaquetamiento erróneo de la cápsida durante la lisis.

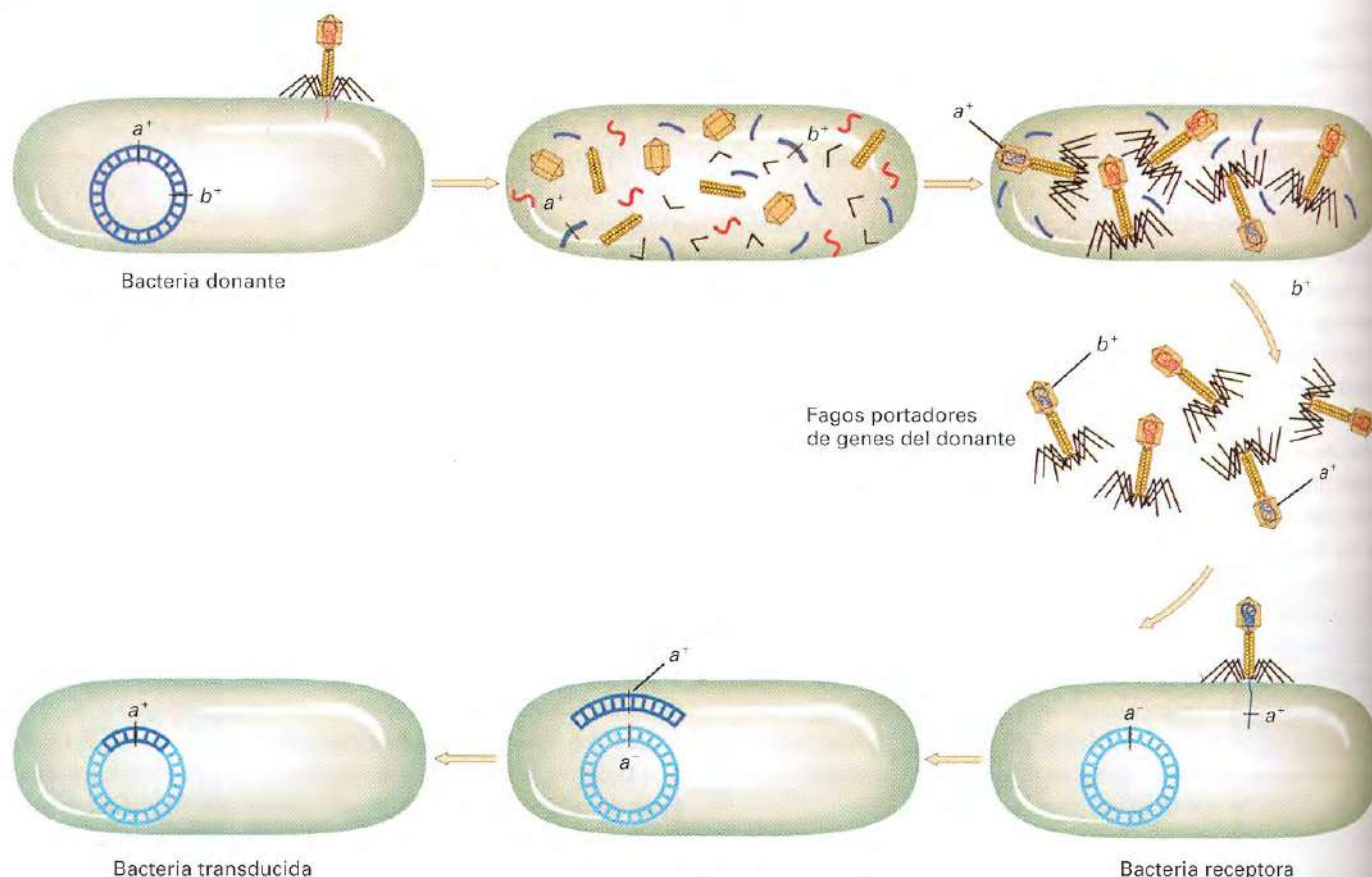


Figura 7-26. Mecanismo de transducción generalizada. En realidad, sólo una pequeña proporción de los fagos descendientes (1 de cada 10 000) contiene genes de la estirpe donante.

Análisis de ligamiento mediante experimentos de transducción

La transducción generalizada puede utilizarse para obtener información del ligamiento entre genes bacterianos si tales genes están suficientemente cercanos para que el fago pueda incorporarlos y transducirlos como un solo fragmento de DNA. Por ejemplo, supongamos que queremos medir el grado de ligamiento entre los loci *met* y *arg* de *E. coli*. Realizamos un cruzamiento entre una estirpe *met*⁺ *arg*⁺, y otra *met*⁻ *arg*⁻. Podemos incubar el fago P1 con la estirpe donante *met*⁺ *arg*⁺, permitir la infección con P1 de la estirpe *met*⁻ *arg*⁻, y seleccionar luego las colonias *met*⁺. Determinaríamos entonces qué porcentaje de las colonias *met*⁺ son también *arg*⁺. Las estirpes que han sido transducidas tanto para *met*⁺ como para *arg*⁺, se denominan **cotransductantes**.

El grado de ligamiento se expresa como frecuencias de cotransducción (Fig. 7-27). Cuanto mayor sea la frecuencia de cotransducción, menor será la distancia entre los dos marcadores genéticos.

En una extensión de este análisis, podemos estimar el tamaño del fragmento cromosómico que es capaz de incorporar un fago, realizando el siguiente tipo de experimento con el fago P1:

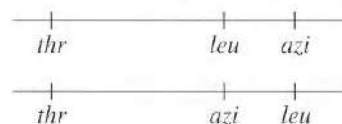
Donante *leu*⁺ *thr*⁺ *azi*^r → recipiente *leu*⁻ *thr*⁻ *azi*^s

Podemos seleccionar uno o más marcadores del donante en el recipiente y después (siguiendo la metodología de la genética de

CUADRO 7-5. Marcadores asociados en transducciones concretas con P1

Experimento	Marcador seleccionado	Marcadores no seleccionados
1	<i>leu</i> ⁺	50 % son <i>azi</i> ^r ; 2 % son <i>thr</i> ⁺
2	<i>thr</i> ⁺	3 % son <i>leu</i> ⁺ ; 0 % son <i>azi</i> ^r
3	<i>leu</i> ⁺ y <i>thr</i> ⁺	0 % son <i>azi</i> ^r

la merocigosis) buscar la presencia de los otros marcadores no seleccionados, tal como se indica en el Cuadro 7-5. El experimento 1 de el Cuadro 7-5 nos dice que *leu* está relativamente cerca de *azi* y lejos de *thr*, dejándonos con dos alternativas posibles:



El experimento 2 nos dice que *leu* está más cerca de *thr* que *azi*, por lo que el mapa debe ser:



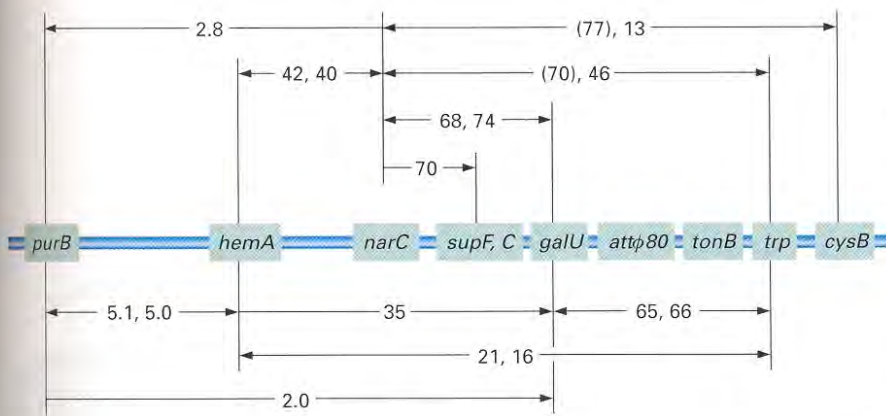


Figura 7-27. Mapa genético de la región *purB-cysB* de *E. coli* determinado por experimentos de cotransducción con P1. Los números son las medias en tanto por ciento de las frecuencias de cotransducción obtenidas en varios experimentos. En los casos en que se realizaron cruzamientos en ambos sentidos, la punta de cada flecha señala el marcador seleccionado con el ligamiento correspondiente más próximo a cada flecha. Los valores entre paréntesis no se consideran fiables debido a la interferencia del marcador no seleccionado. (Modificado de J. R. Guest, *Molecular and General Genetics* 105, 1969, 285.)

El experimento 3, en el que se seleccionaron los marcadores *thr*⁺ y *leu*⁺, indica que el fragmento de material genético transducido no incluye nunca el locus *azi*.

Si estudiáramos un número suficiente de marcadores para producir un mapa de ligamiento más completo, podríamos estimar el tamaño del fragmento transducido. Este tipo de experimentos indica que en P1 la cotransducción es posible para una distancia de aproximadamente 1.5 minutos en el mapa cromosómico de *E. coli* (1 minuto equivale a la longitud de cromosoma transferida por una estirpe Hfr en un minuto a 37 °C).

Lisogenia

En los años veinte, mucho antes de que *E. coli* se convirtiera en el organismo favorito de los genetistas microbianos, se obtuvieron algunos resultados interesantes mediante el estudio de la infección de *E. coli* por fagos. Algunas estirpes bacterianas son resistentes a la infección por ciertos fagos, pero causan la lisis de bacterias no resistentes si las dos estirpes bacterianas se mezclan. Las bacterias resistentes que inducen la lisis de otras células se denominan bacterias lisogénicas o lisógenos. Cuando se infectan bacterias no lisogénicas con fagos derivados de una estirpe lisogénica, una pequeña parte de las células infectadas no se lisa, sino que se convierte en lisogénica.

Aparentemente, las bacterias lisogénicas son de algún modo «portadoras» de fagos aunque ellas mismas son inmunes a su acción lítica. En un principio, se prestó poca atención a este fenómeno, después de que algunos estudios sugirieran que las bacterias lisogénicas estaban simplemente contaminadas con fagos externos que podían eliminarse tras purificación cuidadosa. Sin embargo, a mediados de los años cuarenta, André Lwoff estudió estirpes lisogénicas de *Bacillus megaterium* y siguió el comportamiento de una estirpe lisogénica a lo largo de muchas divisiones celulares. Observando cuidadosamente este cultivo, separó cada par de células hijas inmediatamente después de la división. A una de las células la puso en un cultivo y a la otra la observó hasta que se dividió. De este modo, obtuvo 19 cultivos que representaban 19 generaciones (19 divisiones celulares consecutivas). Los 19 cultivos eran lisogénicos, pero los análisis del medio no revelaron ningún fago libre en ningún momento durante estas divisiones, confirmando así que el comportamiento lisogé-

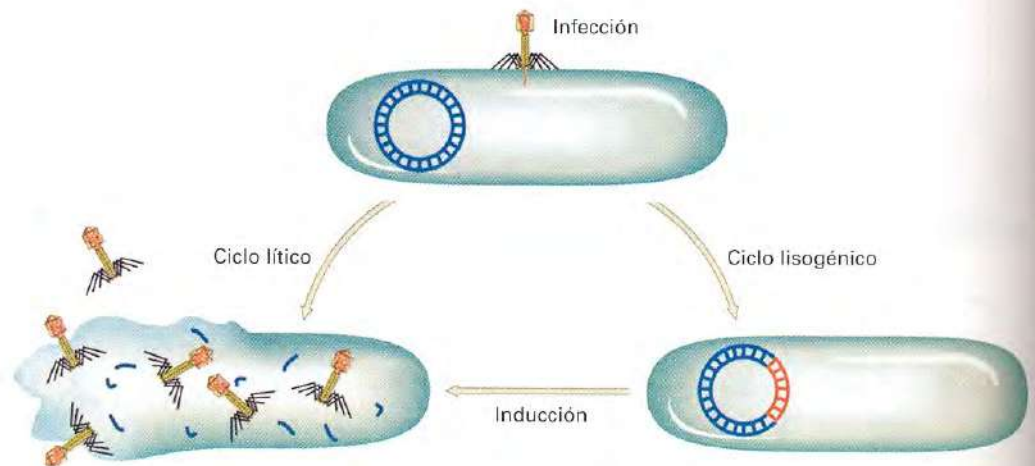
nico era un carácter que persistía tras la reproducción en ausencia de fagos libres.

Con baja frecuencia, Lwoff observó lisis espontánea de alguna de las células de sus cultivos. Si se extendía el medio sobre un césped de células no lisogénicas después de una de estas lisis espontáneas, aparecían halos, indicando que se habían liberado fagos durante la lisis. Lwoff propuso una hipótesis para explicar todas estas observaciones: cada una de las bacterias de la estirpe lisogénica contiene un factor no infeccioso que se transmite de generación en generación, pero ocasionalmente este factor da lugar a la producción de fagos infecciosos (sin la presencia de fagos libres en el medio). Lwoff denominó **profago** a este factor, porque de algún modo parecía ser capaz de *inducir* la formación de una descendencia de fagos infecciosos. Estudios posteriores revelaron que hay varios agentes, tales como la luz ultravioleta o determinados productos químicos, que pueden inducir la lisis de una proporción elevada de células en una población de bacterias lisogénicas.

Ahora estamos en disposición de comprender completamente las observaciones de Lwoff. Una bacteria lisogénica contiene un profago, que de algún modo protege a la célula contra una infección adicional, o **sobreinfección**, por fagos libres y se duplica durante la división, transmitiéndose a las células hijas. En una proporción pequeña de las células lisogénicas, el profago se **induce**, o **activa**, para producir fagos infecciosos. Este proceso termina con la protección de la célula contra el fago, por lo que aquella se lisa y libera fagos infecciosos al medio, infectando así cualquier célula no lisogénica presente en el cultivo.

Los fagos se clasifican en dos grupos. Los **fagos virulentos** presentan un ciclo infeccioso que siempre es **lítico**: no hay bacterias lisogénicas para estos fagos (puede que existan mutantes bacterianos resistentes a los fagos virulentos, pero la resistencia no se debe a la lisogenia). Los **fagos atemperados** siguen un ciclo lítico en determinadas circunstancias, pero normalmente inician un **ciclo lisogénico**, en el cual el fago se mantiene en la célula bacteriana como un profago. En este caso, la bacteria lisogénica se hace resistente a una nueva infección, «inmunidad» que es conferida por la presencia del profago y que se transmite durante muchas generaciones bacterianas. Los fagos atemperados también producen lisis cuando el profago es inducido, o activado. La Figura 7-28 representa los ciclos lítico y lisogénico de un fago atemperado típico.

Figura 7-28. Ciclos de vida alternativos de un fago atemperado y su célula hospedadora. (De A. Lwoff, *Bacteriological Reviews* 17, 1953, 269.)



COROLARIO

Los fagos virulentos no pueden convertirse en profagos; son siempre líticos. Los fagos atemperados pueden permanecer en la célula bacteriana en forma de profagos, permitiendo a las células hospedadoras sobrevivir como bacterias lisogénicas, aunque también son capaces de provocar la lisis bacteriana.

Base genética de la lisogenia

¿Cuál es la naturaleza del profago? Tras la inducción, el profago es capaz de dirigir la producción de fagos maduros completos, de modo que todo el genoma del fago debe estar presente en el fago. Pero, ¿es el fago una partícula pequeña que se encuentra libre en el citoplasma bacteriano, o está de algún modo asociado al genoma bacteriano? Casualmente, la estirpe original de *E. coli* utilizada por Lederberg y Tatum (pág. 209) resultó ser lisogénica

ca para un fago atemperado denominado **lambda** (λ). El fago λ se ha convertido en el fago más estudiado y mejor caracterizado. Los cruzamientos entre células F^+ y F^- han proporcionado resultados interesantes. El cruzamiento $F^+ \times F^-(\lambda)$ produce recombinantes lisogénicos, mientras que el cruzamiento recíproco $F^-(\lambda) \times F^-$, casi nunca produce recombinantes lisogénicos.

Estos resultados se hicieron más comprensibles cuando se descubrieron las estirpes Hfr. En el cruzamiento $Hfr \times F^-(\lambda)$, se obtienen fácilmente exconjugantes lisogénicos F^- con genes Hfr. Sin embargo, en el cruzamiento recíproco $Hfr(\lambda) \times F^-$, entre los exconjugantes aparecen los primeros genes que se transfieren a partir del cromosoma Hfr, pero no se observan recombinantes para los marcadores tardíos (aquellos que se transfieren después de cierto tiempo de iniciada la conjugación). Además, casi nunca se obtienen exconjugantes lisogénicos en este cruzamiento recíproco. ¿Cómo podrían explicarse estos resultados? Estas observaciones tendrían sentido si el profago λ se comportara como un locus genético bacteriano (es decir, como parte del cromosoma bacteriano). En experimentos de conjugación interrumpida, el profago λ siempre entra en la célula F^- en un momento específico, estrechamente ligado al locus *gal*. Por tanto, podemos situar al profago λ en un locus concreto próximo a la región *gal*.

En el cruzamiento entre una estirpe Hfr lisogénica y una estirpe recipiente F^- no lisogénica (no inmune), la entrada del profago λ a la célula no inmune induce el ciclo lítico de inmediato, proceso denominado **inducción cigótica**. Sin embargo, en el cruzamiento $Hfr(\lambda) \times F^-(\lambda)$, se obtiene fácilmente cualquier tipo de recombinante; es decir, no hay inducción del profago y en consecuencia no se produce lisis (Fig. 7-29). Parece como si el citoplasma de la célula F^- pudiera encontrarse en dos estados diferentes (dependiendo de si la célula contiene o no un profago de λ), de manera que el contacto entre un profago entrante y el citoplasma de una célula no inmune induciría inmediatamente el ciclo lítico. Ahora sabemos que un factor citoplásmico determinado por el profago reprime la multiplicación del virus. La entrada del profago en un ambiente no lisogénico diluye inmediatamente este factor represor y entonces el virus se reproduce. Pero si el virus determina el factor represor, ¿por qué no se reprime a sí mismo? Claramente lo hace, porque una fracción de las

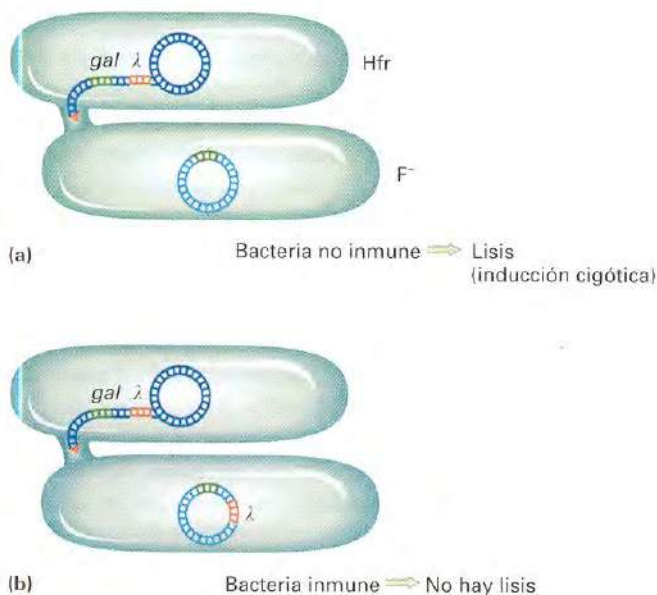


Figura 7-29. Inducción cigótica.

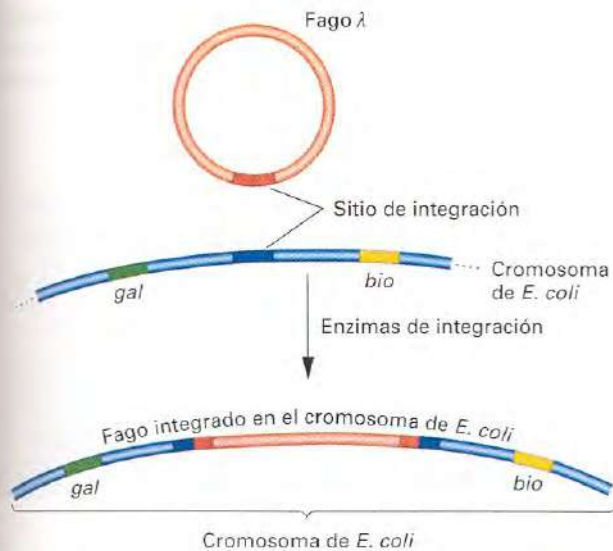


Figura 7-30. Modelo de Campbell de integración del fago λ en el cromosoma de *E. coli*. Se produce un hecho de recombinación recíproco entre un sitio de integración específico presente en el DNA circular de λ y una región concreta del cromosoma de la bacteria situada entre los genes *gal* y *bio*.

células infectadas se convierte en lisogénica. Se produce una competencia entre las señales génicas de λ necesarias para la reproducción y aquellas necesarias para la represión. El modelo de un represor citoplásmico determinado por el fago explica la inmunidad de las bacterias lisogénicas, ya que cualquier fago infectante nuevo encontraría inmediatamente un represor y sería inactivado. En el Capítulo 11 discutiremos con más detalle este modelo.

Integración del profago

¿Cómo se integra el profago en el genoma de una bacteria? Allan Campbell propuso en 1962 que λ lo hace mediante un

hecho de recombinación recíproca entre los cromosomas circulares de λ y de *E. coli*, como se muestra en la Figura 7-30. El entrecruzamiento ocurre entre una región específica de λ , el **sitio de integración de λ** , y una región del cromosoma bacteriano situada entre los genes *gal* y *bio*, ya que λ se integra en esa posición en el cromosoma de *E. coli*.

Un aspecto atractivo del modelo de Campbell es que permite hacer predicciones que pueden ser comprobadas por los genetistas utilizando el fago λ :

1. La integración del profago en el cromosoma de *E. coli* debería provocar un aumento en la distancia genética entre los marcadores bacterianos adyacentes, como se aprecia en la Figura 7-30 para *gal* y *bio*. De hecho, los estudios demuestran que el tiempo de entrada y las distancias de recombinación entre los genes bacterianos *aumentan* como consecuencia de la lisogenia.
2. La delección de fragmentos bacterianos adyacentes al sitio de integración del profago deberían deleccionar genes del fago, al menos algunas veces. Los estudios experimentales también confirman esta predicción.

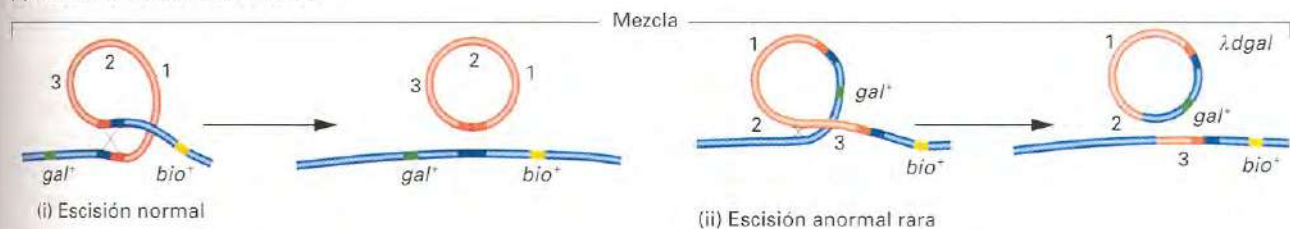
Transducción especializada

Ahora podemos comprender el proceso de **transducción especializada**, mediante el cual sólo pueden transducirse ciertos marcadores de la célula hospedadora.

El fago lambda es un buen ejemplo de fago transductor especializado. Como profago, λ siempre se integra entre las regiones *gal* y *bio* del cromosoma del hospedador (véase Fig. 7-30). En experimentos de transducción, λ sólo transduce los genes *gal* y *bio*. Visualicemos el mecanismo de transducción de λ .

La recombinación entre regiones de λ y del cromosoma bacteriano está catalizada por un sistema enzimático específico. Dicho sistema normalmente asegura que λ se integre siempre en el

(a) Producción de un lisido inicial



(b) Transducción con el lisido inicial

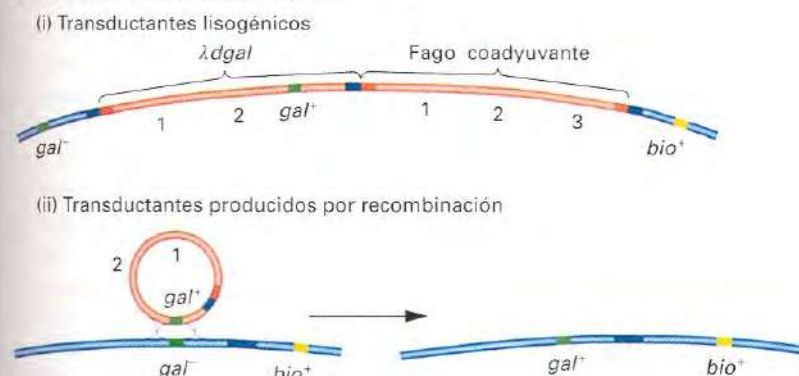


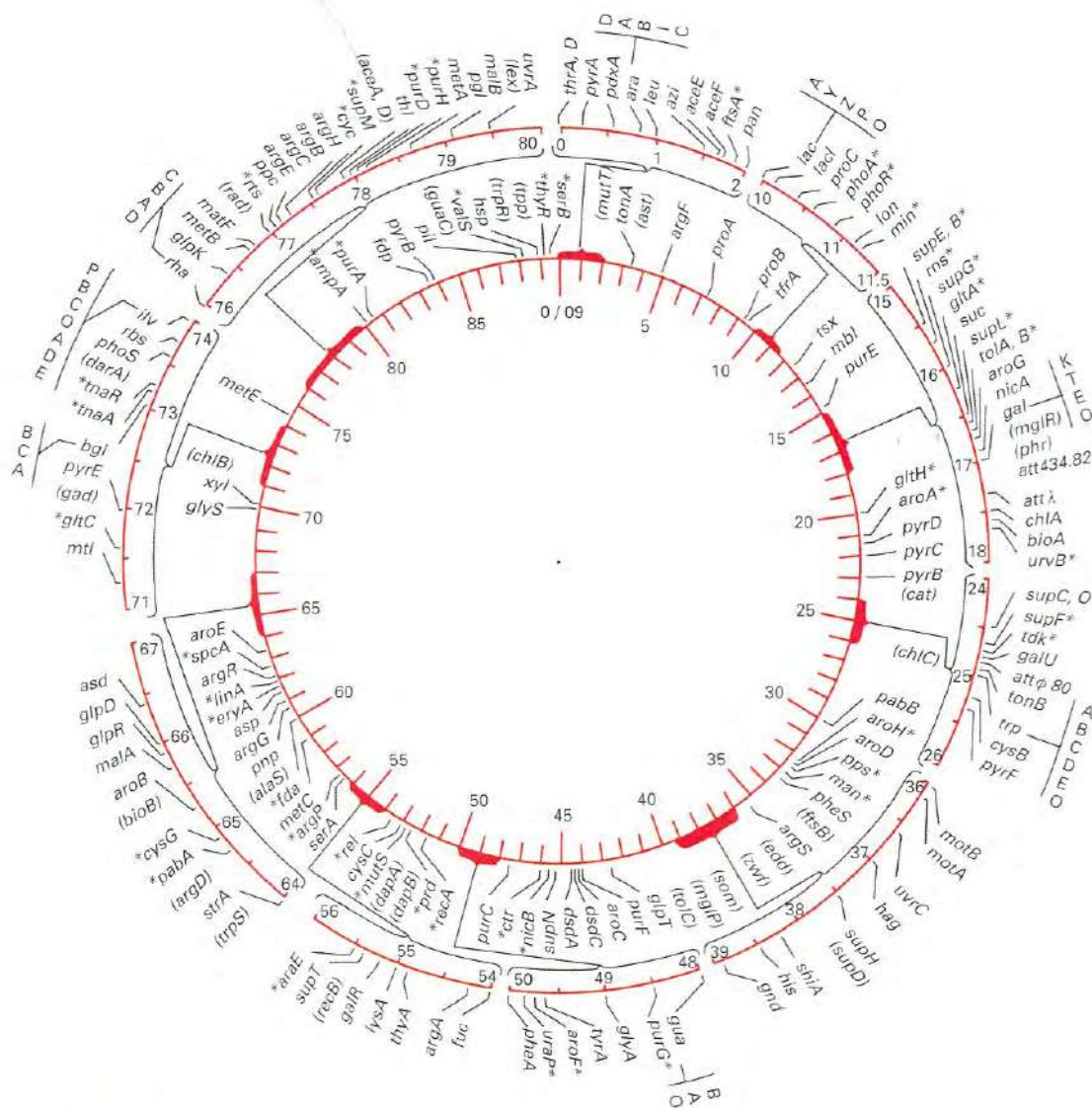
Figura 7-31. Mecanismo de transducción especializada del fago λ . (a) El cultivo bacteriano lisogénico puede producir partículas λ normales o, con muy baja frecuencia, una partícula anormal $\lambda dgal$, que es una partícula transductora. (b) La transducción con ese lisido mixto puede producir transductantes *gal*⁺ por la incorporación simultánea de $\lambda dgal$ y un fago λ silvestre.

misimo sitio del cromosoma y cuando se induce el ciclo lítico (por ejemplo, con luz ultravioleta), asegura que el profago λ se separe de modo preciso en el sitio correcto para dar lugar al cromosoma normal y circular de λ . Con muy baja frecuencia, se produce una escisión anormal del profago, dando lugar a partículas del fago portadoras de un gen próximo al sitio de integración y dejando atrás algunos genes del fago (Fig. 7-31a). Los genes adyacentes en el caso del fago λ , son *gal* a un lado y *bio* al otro. Las partículas resultantes son defectuosas, ya que algunos de sus genes han quedado en el cromosoma del hospedador y, por ello, se denominan λ dg λ (λ -defectuoso *gal*), o λ dbio. Estas partículas defectuosas portadoras de genes adyacentes pueden empaquetarse en las cápsidas de los fagos e infectar a otras bacterias. En presencia de una segunda partícula de fago silvestre, mediante una infección doble, la partícula λ dg λ puede integrarse en el sitio de integración de λ del cromosoma (Fig. 7-31b). De

este modo, los genes *gal* se transducen en este caso a una segunda célula hospedadora. Este mecanismo de transducción se denomina transducción especializada, porque se limita a genes que están muy próximos al profago integrado inicialmente.

COROLARIO

La transducción se produce cuando los fagos que se están formando incorporan genes del hospedador y los transfieren a otras células bacterianas. En la transducción generalizada, el fago puede transferir cualquier gen del hospedador. Ocurre cuando los fagos que están empaquetándose incorporan accidentalmente DNA bacteriano en lugar de su propio DNA vírico. La transducción especializada se debe a una escisión defectuosa del profago del cromosoma bacteriano, de modo que el nuevo fago incluye tanto genes bacterianos como genes del propio fago. Estos fagos transductores sólo pueden transferir genes específicos del hospedador.



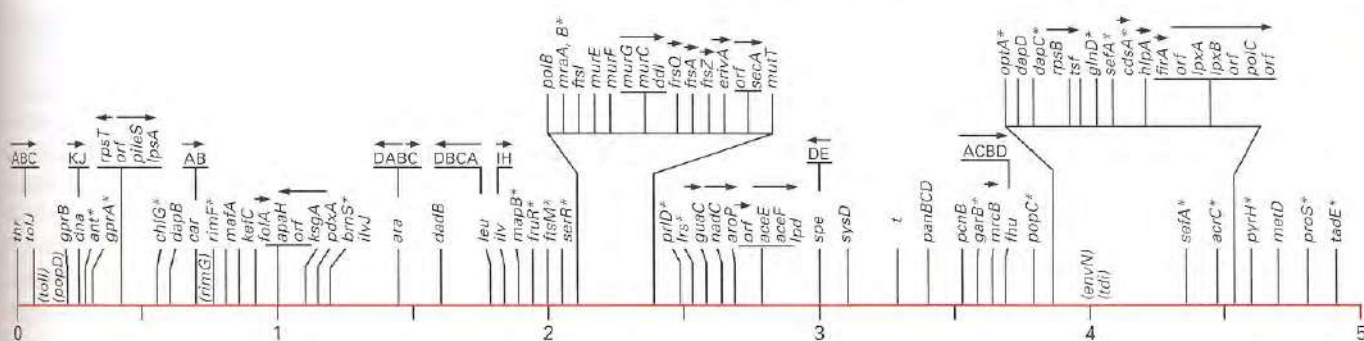


Figura 7-33. Representación lineal de una sección de 5 minutos del mapa de ligamiento de 100 minutos de *E. coli* de 1990. Los marcadores entre paréntesis no están cartografiados de forma precisa; aquellos marcados con asteriscos están cartografiados de forma más precisa que los que están entre paréntesis, pero todavía no se conocen exactamente. Las flechas sobre los genes y agrupaciones de genes indican la dirección de transcripción de esos loci. (De B. J. Bachmann, «Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Ed. 8.» *Microbiological Reviews*, 54, 1990, 130-197).

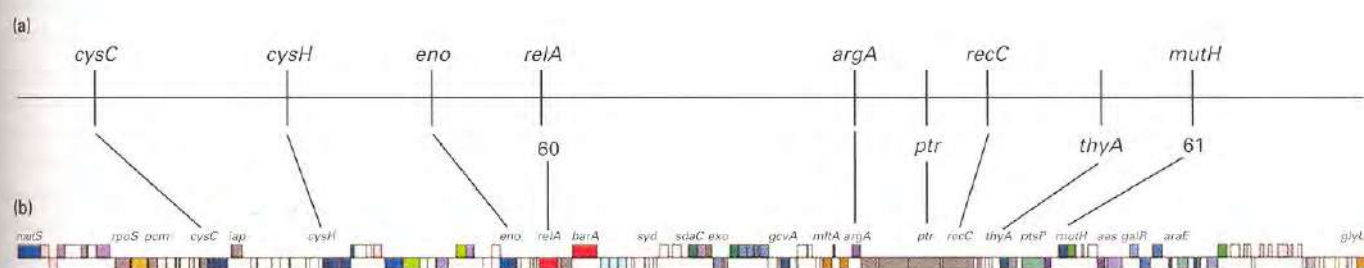


Figura 7-34. Correlación entre los mapas genético y físico. (a) Marcadores del mapa genético de 1990 en la región próxima a los minutos 60 y 61. (b) Posición exacta de cada gen, basada en la secuencia completa del genoma de *E. coli*. (Por simplicidad, no aparecen todos los genes en la figura). Los cuadrados pequeños representan genes y supuestos genes. Cada color representa un tipo de función diferente. Por ejemplo, el rojo denota una función reguladora y el azul oscuro denota las funciones de replicación, recombinación y reparación del DNA. Se indica la correspondencia del orden de los genes en los dos mapas.

Cartografía del cromosoma

Combinando las técnicas de conjugación interrumpida, análisis de ligamiento por recombinación, transformación y transducción, se han elaborado algunos mapas cromosómicos bacterianos muy detallados. Actualmente, los marcadores genéticos nuevos suelen localizarse primero en un segmento de unos 10 a 15 minutos, utilizando para ello una serie de estirpes Hfr que transfieren DNA a partir de diferentes puntos a lo largo del cromosoma. Esto permite seleccionar marcadores dentro del intervalo, que son utilizados luego en experimentos de cotransducción con el fago P1.

En el año 1963, el mapa de *E. coli* (Fig. 7-32) ya detallaba las posiciones de aproximadamente 100 genes. Tras 27 años de refinamiento posterior, el mapa de 1990 indica la posición de más de 1400 genes. La Figura 7-33 muestra una porción de 5 minutos del mapa de 1990 (que está ajustado a una escala de 100 minutos). La complejidad de estos mapas ilustra el poder de resolución y la sofisticación del análisis genético. ¿Hasta qué punto estos mapas corresponden a la realidad física? En 1997, se obtuvo la secuencia de DNA del genoma completo

de *E. coli*, permitiendo así comparar la posición exacta de los marcadores del mapa genético con la posición correspondiente a la secuencia lineal de DNA respectiva en la que están cifrados. La Figura 7-34 muestra la comparación de un segmento en ambos mapas. Claramente, el mapa genético corresponde de manera precisa a las posiciones relativas del mapa físico.

Revisión de la transferencia génica bacteriana

1. La transferencia de genes entre bacterias puede llevarse a cabo mediante conjugación, transformación y transducción mediada por fagos.
2. La herencia de marcadores genéticos mediante transferencia conjugativa de DNA por estirpes Hfr, transformación de segmentos del cromosoma donante y transducción generalizada son procesos que comparten una propiedad importante. En todos estos procesos, se introduce un fragmento de DNA

en la célula receptora, que debe sufrir dos hechos de recombinación para que sea integrado en el cromosoma y heredado posteriormente. Los fragmentos que no se incorporen, no pueden replicarse y por consiguiente, se diluyen y desaparecen de la población de células hijas.

3. La transferencia conjugativa de factores F' portadores de genes bacterianos y la transducción especializada de ciertos marcadores genéticos son procesos similares en el sentido de que en ambos casos se introduce eficazmente un conjunto limitado y específico de genes bacterianos en la célula receptora. Para su transmisión no es necesario que ocurra recombinación normal, como en el caso de la herencia de fragmentos de DNA. Después de la transferencia de F' , el factor F' se

replica en el citoplasma bacteriano como una entidad separada. Por otro lado, el DNA del fago transductor especializado se integra en el cromosoma bacteriano mediante un sistema de recombinación específico de ese fago. En ambos casos, se produce un diploide parcial (merodiploide), ya que los dos procesos permiten la herencia simultánea del gen transferido y del alelo correspondiente en la célula receptora.

4. La transferencia génica puede utilizarse para cartografiar el cromosoma bacteriano. Los cruzamientos con estirpes Hfr se utilizan primero para localizar una mutación en una región determinada del cromosoma. Posteriormente, la transducción generalizada proporciona una localización más precisa.

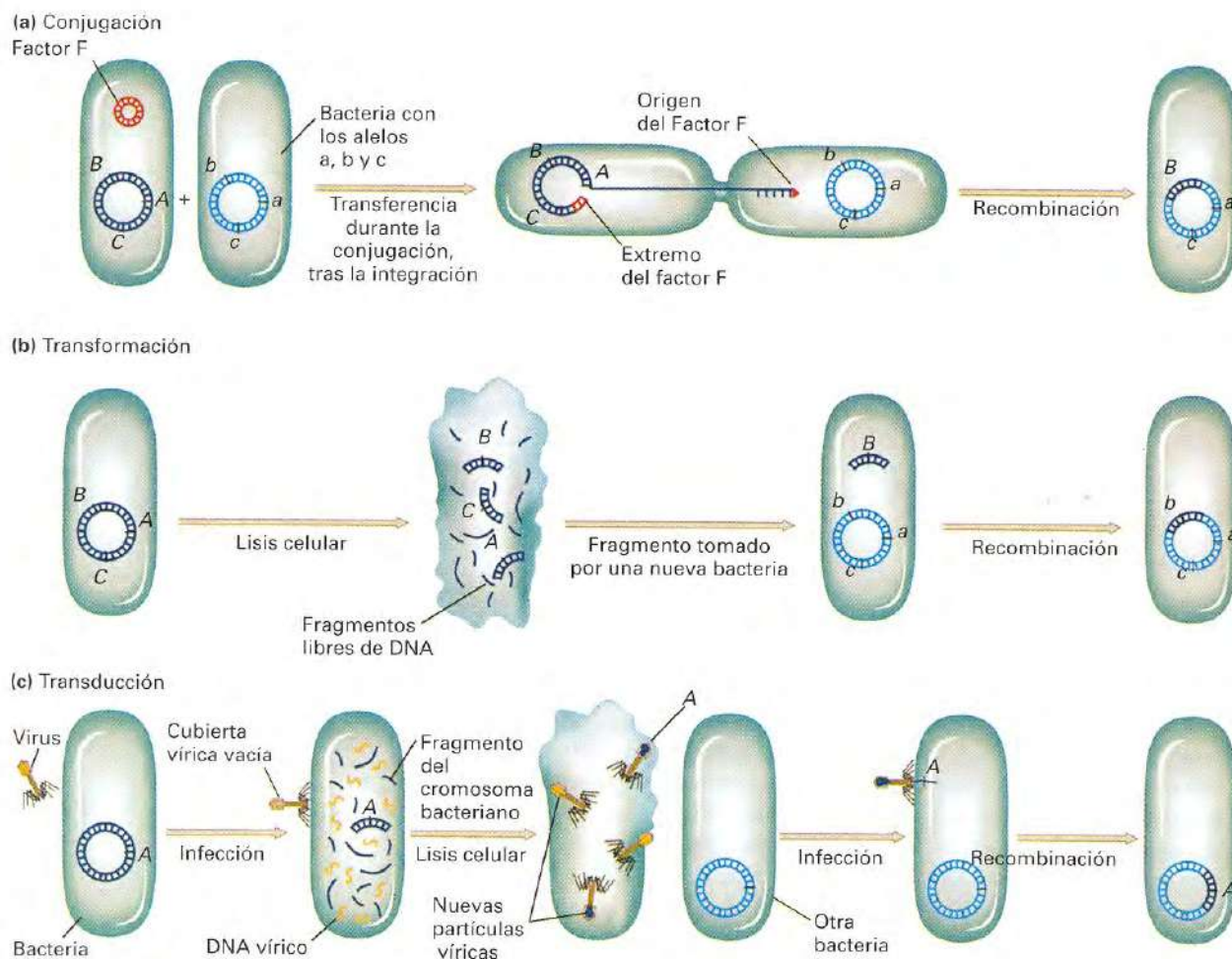


Figura 7-35. Procesos de recombinación en bacterias. La recombinación bacteriana requiere que una célula reciba un alelo de otra célula. (a) En el proceso de conjugación, un elemento citoplásmico, como el factor de fertilidad (F), se integra en el cromosoma de la célula bacteriana. Durante el contacto célula-célula, el factor integrado puede transferir todo o parte de ese cromosoma a otra célula cuyo cromosoma contenga alelos de los genes presentes en el fragmento transferido. Éste recombina con el segmento homólogo del cromosoma de la célula receptora; en el ejemplo mostrado aquí, el alelo B sustituye al alelo b . (b) En el proceso de transformación, un segmento de DNA portador de un determinado alelo es captado del medio ambiente por una célula cuyo cromosoma lleva un alelo con el que puede emparejar; los alelos (en nuestro ejemplo, B y b) se intercambian por recombinación homóloga. (c) En el proceso de transducción, después de que un fago haya infectado a una célula bacteriana, una de las partículas del fago sintetizadas *de novo* toma un segmento de DNA bacteriano en lugar del DNA vírico. Cuando esta partícula infecta a otra célula, inyecta el DNA bacteriano, que recombina con un segmento homólogo de la segunda célula, produciéndose así el intercambio de cualquiera de los alelos correspondientes (en nuestro ejemplo, A y a).

RESUMEN

El progreso conseguido en los últimos cincuenta años ha servido de base para los recientes avances realizados en el campo de la Genética molecular (que se discuten en los siguientes capítulos). En los primeros momentos de este período, se descubrió que la transferencia genética y la recombinación son procesos que ocurren entre distintos tipos de bacterias. En las bacterias, el material genético se transmite en un único sentido, desde una célula donante (F^+ o Hfr) a una célula receptora (F^-). La capacidad de actuar como donante está determinada por la presencia en la célula de un factor de fertilidad (F), que funciona como un epísona.

A veces, el factor F presente en las células F^+ en estado libre puede integrarse en el cromosoma de *E. coli* y dar lugar a una célula Hfr . Cuando esto ocurre, tiene lugar la transferencia de genes bacterianos y la posterior recombinación. Además, como el factor F puede integrarse en sitios diferentes del cromosoma hospedador, los científicos han podido demostrar que el cromosoma de *E. coli* es único y circular. La interrupción de la conjugación a distintos tiempos ha provisto a los genéticos de un método para elaborar mapas de ligamiento del cromosoma de *E. coli* y otras bacterias similares.

También pueden transferirse marcadores genéticos de unas bacterias a otras en forma de DNA desnudo. El estudio del proceso de transformación en bacterias permitió demostrar por primera vez que el DNA es el material genético. Para que se produzca la transformación, el DNA debe ser tomado por una célula

receptora, y entonces tener lugar la recombinación entre el DNA incorporado y el cromosoma del receptor.

Las bacterias pueden ser infectadas por bacteriófagos. En una forma de infección, el cromosoma del fago entra en la célula y, utilizando su maquinaria metabólica, produce fagos descendientes, que lisan la bacteria hospedadora. Las nuevas partículas de fagos pueden infectar a otras células. Si dos fagos de genotipos diferentes infectan a un mismo hospedador, durante el proceso lítico puede tener lugar la recombinación de sus cromosomas. La localización de genes siguiendo este método ha llevado a la conclusión de que los cromosomas de los fagos pueden ser también circulares.

En otra forma de infección, la lisogenia, el DNA inyectado del fago permanece latente en la célula hospedadora. En muchos casos, este fago latente (el profago) se integra en el cromosoma hospedador y se replica con él. Bien espontáneamente o bien mediante inducción, el profago puede salir de su latencia y lisan la célula hospedadora.

Los fagos pueden transportar genes bacterianos desde una célula donante a una receptora. En el proceso de transducción generalizada, durante la lisis se empaquetan fragmentos aleatorios de DNA en la cápsida del fago. En la transducción especializada, se incluyen en la cápsida del fago genes específicos del hospedador junto con DNA del fago, debido a la escisión errónea del profago de un locus cromosómico concreto.

La Figura 7-35 resume los procesos de conjugación, transformación y transducción.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

bacterias / conjugación / recombinación / plásmido F / Hfr / F^- / donante / recipiente / conjugación interrumpida / mapa cromosómico / pilus / merocigoto / gen

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

Suponiendo que una célula es incapaz de llevar a cabo el proceso de recombinación (es rec^-), ¿Cómo se comportaría esta célula como recipiente en transducciones generalizadas y en especializadas? En primer lugar, compare los dos tipos de transducción y luego determine el efecto de la mutación rec^- sobre la transmisión de genes mediante cada proceso.

♦ Solución ♦

La transducción generalizada implica la incorporación de fragmentos cromosómicos dentro de cápsidas de fagos, que pueden entonces infectar a células receptoras. Los fragmentos del cromosoma son incorporados en las cápsidas de forma aleatoria, de modo que cualquier marcador del cromosoma del hospedador puede ser transducido a otra célula. Por el contrario, en la transducción especializada el fago se integra en un punto específico del cromosoma y hay una incorporación poco frecuente en el genoma del fago de marcadores cromosómicos próximos a ese

sitio de integración del fago. Por tanto, sólo podrán ser transducidos aquellos marcadores que se encuentren próximos al sitio de integración específico del fago en el cromosoma del hospedador.

La herencia de marcadores ocurre mediante mecanismos diferentes en la transducción generalizada y en la especializada. Un fago transductor generalizado inyecta un fragmento del cromosoma de la célula donante en el citoplasma de la receptora. Este fragmento tiene que incorporarse al cromosoma receptor por medio de la recombinación, utilizando la maquinaria de recombinación de la bacteria. Por tanto, una bacteria receptora rec^- será incapaz de incorporar fragmentos de DNA, y no podrá heredar marcadores mediante transducción generalizada. En cambio, en el caso de la transducción especializada, el mecanismo principal de herencia de marcadores implica la integración de la partícula transductora en el cromosoma del hospedador, en el sitio de integración específico. Esta integración, que en ocasiones requiere la presencia de un fago auxiliar (coadyuvante), es media-

8

ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL DNA



Cromosomas en arlequín. (Sheldon Wolff/University of California, San Francisco.)

Ideas fundamentales

Células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo diferente; el agente transformante es el DNA.

Ciertos experimentos con fagos T2 marcados han permitido establecer que el material hereditario es el DNA.

James Watson y Francis Crick demostraron que la estructura del DNA es una hélice doble. Cada hélice es una cadena de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiésteres. Las dos cadenas helicoidales se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno específicos entre pares de bases.

La estructura del DNA asegura la fidelidad de la replicación porque la complementariedad entre las bases viene determinada por el establecimiento de puentes de hidrógeno específicos.

La replicación del DNA es semiconservativa, en cuanto que cada molécula doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada.

Se han caracterizado muchas de las enzimas que participan en la síntesis del DNA.

El esclarecimiento de la estructura del DNA por James Watson y Francis Crick, en 1953, fue uno de los descubrimientos más excitantes de la historia de la Genética. Abrió el camino a la comprensión en términos moleculares de la herencia y de la forma de actuar de los genes. Antes de que veamos cómo se logró resolver la estructura del DNA, resumamos qué se conocía sobre los genes y sobre el DNA en el momento en que Watson y Crick iniciaron su histórica colaboración:

1. Se sabía que los genes —los «factores» hereditarios descritos por Mendel— estaban asociados a caracteres concretos, pero se desconocía su naturaleza física.
2. La teoría «un gen-una enzima» (descrita con más detalle en el Cap. 9) postulaba que los genes controlan la estructura de las proteínas.
3. Se sabía que los genes estaban situados en los cromosomas.
4. Se descubrió que los cromosomas se componían de DNA y proteína.
5. Las investigaciones de Frederick Griffith y, subsecuentemente, las de Oswald Avery y sus colaboradores apuntaban al DNA como el material genético. Tales investigaciones, que se describen aquí, demostraban que las células bacterianas que expresan un fenotipo determinado pueden ser transformadas en células que expresan un fenotipo distinto, y que el agente transformante es el DNA.

El material genético: DNA

La naturaleza física del gen fascinó a los científicos durante años. Una serie de experimentos que se iniciaron en la década de 1920 acabaría por revelar que el material genético es el DNA.

El descubrimiento de la transformación

En 1928, en el curso de sus experimentos con la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, Frederick Griffith hizo una misteriosa observación. Esa bacteria, causante de la neumonía humana, es normalmente letal para los ratones. Sin embargo, han aparecido distintas estirpes de esta especie bacteriana que difieren en cuanto a su virulencia (capacidad para provocar la enfermedad o la muerte). Griffith utilizó en sus experimentos dos estirpes que se distinguían por el aspecto de sus colonias crecidas en cultivos de laboratorio. Las células de una de las estirpes, un tipo virulento normal, están rodeadas por una cápsula de polisacáridos que le da a las colonias una apariencia lisa; de ahí que ésta sea denominada estirpe S. Las células de la otra estirpe de Griffith, un tipo mutante no virulento que se reproduce en los ratones pero no es letal, carecen de esta cápsula de polisacáridos, lo cual hace que las colonias tengan una apariencia rugosa; ésta se denomina estirpe R.

Griffith mató algunas células virulentas, hirviéndolas, e inyectó las células muertas en ratones. Los ratones sobrevivieron.

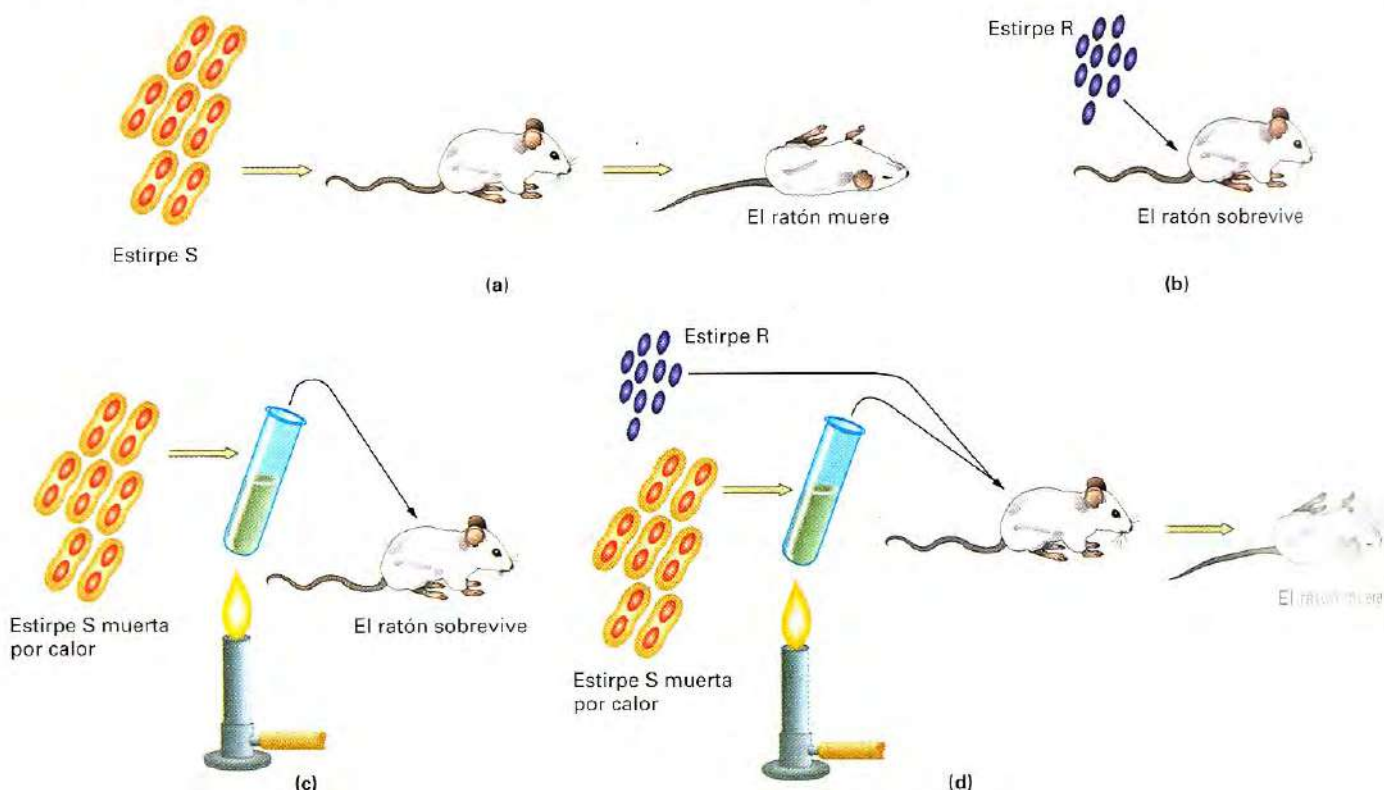


Figura 8-1. Primera demostración de la transformación bacteriana. (a) El ratón muere tras inoculación con la estirpe virulenta S. (b) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe R. (c) El ratón sobrevive a la inoculación con la estirpe S muerta por calor. (d) El ratón muere tras inoculación con una mezcla de la estirpe R viva y la estirpe S muerta por calor. De alguna manera, la estirpe S muerta transforma a la estirpe R en virulenta. Las partes a, b y c constituyen los controles de este experimento. (Tomado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 de W. H. Freeman and Company. Según R. Sager y F. J. Ryan, *Cell Heredity*, Wiley, 1961.)

demostrándose así que las cápsulas de las células no provocan la muerte. Sin embargo, ratones inyectados con una mezcla de células virulentas muertas y de células no virulentas vivas, murieron. Además, podían recuperarse bacterias vivas de los ratones muertos; estas células producían colonias lisas y, en subsiguientes inyecciones, eran virulentas. De alguna manera, los restos celulares de las células S hervidas habían convertido a las células R vivas en células S vivas. Este proceso se denomina **transformación**. El experimento de Griffith se resume en la Figura 8-1.

Este mismo método básico fue utilizado para determinar la naturaleza del *principio transformante* —el agente presente en los restos celulares, que es el responsable concreto de la transformación. En 1944, Oswald Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty separaron los distintos tipos de moléculas que se encuentran en las células S muertas y estudiaron su capacidad de transformación por separado. Estas pruebas demostraron que los propios polisacáridos no transforman a las células rugosas. Por tanto, la cubierta de polisacáridos, aunque claramente implicada en la acción patogénica, es sólo la expresión fenotípica de la virulencia. Tras el escrutinio de los diferentes compuestos, Avery y sus colaboradores descubrieron que sólo una clase de moléculas, el DNA, inducía la transformación de las células R (Fig. 8-2). Dedujeron que el DNA es el agente que determina la aparición del polisacárido y, por tanto, del carácter patogénico (véase una descripción del mecanismo de transformación en las págs. 219-220). Es más, parecía que proveer a las células R con el DNA de las células S era equivalente a proveerlas de los genes de las células S.

COROLARIO

La demostración de que el principio transformante es el DNA fue la primera demostración de que los genes se componen de DNA.

El experimento de Hershey y Chase

Los experimentos llevados a cabo por Avery y sus colaboradores eran definitivos, pero muchos científicos se resistieron a aceptar como material genético al DNA (y no a las proteínas). La prueba definitiva fue obtenida en 1952 por Alfred Hershey y Martha

Chase usando el fago (virus) T2. Su razonamiento fue que la infección del fago debe implicar la introducción (inyección) dentro de la bacteria de la información específica que dicta la reproducción viral. El fago es relativamente simple en cuanto a composición molecular. La mayor parte de su estructura es proteína, estando el DNA en el interior de la envuelta proteica de su «cabeza».

En las proteínas no se encuentra fósforo, que sí forma parte del DNA; inversamente, el azufre está presente en las proteínas pero nunca en el DNA. Hershey y Chase marcaron el DNA del fago con el radioisótopo del fósforo (^{32}P) y las proteínas con el del azufre (^{35}S), en cultivos distintos de fagos. Usaron entonces cada cultivo, por separado, para infectar *E. coli* con muchas partículas de virus por célula. Tras dejar tiempo suficiente para que se produjera la infección, separaron de las células bacterianas las carcasas vacías de los fagos (llamadas *fantasmas*) mediante agitación en una batidora de cocina. Separaron las células bacterianas de los fantasmas de los fagos, mediante centrifugación, y midieron entonces la radioactividad de las dos fracciones. Cuando se utilizaron los fagos marcados con ^{32}P , la mayor parte de la radioactividad terminaba en las células bacterianas, indicando que el DNA viral entraba en las células. También podía recuperarse ^{32}P de los fagos descendientes. Cuando se usaron los fagos marcados con ^{35}S , la mayor parte de la radioactividad terminaba en los fantasmas virales, indicando que la proteína viral nunca entra en la célula bacteriana (Fig. 8-3). La conclusión es ineludible: el DNA es el material hereditario; las proteínas del fago son meras empaquetadoras estructurales que se desechan después de inyectar el DNA viral en la célula bacteriana.

¿Por qué tal reticencia en aceptar esta conclusión? Se creía que el DNA era un compuesto químico más bien simplón. ¿Cómo podría una molécula tan simple almacenar toda la información sobre las múltiples características de un organismo? ¿Cómo podía ser transmitida tal información de una generación a la siguiente? Sin duda, el material genético debe poseer tanto la capacidad de poner en clave información específica como la de duplicar tal información de forma precisa. ¿Qué tipo de estructura, en una molécula tan simple, podría explicar unas funciones tan complejas?

La estructura del DNA

Aunque la estructura del DNA era desconocida, sus unidades básicas sí se conocían desde hacía muchos años. Los elementos básicos del DNA se habían aislado y analizado mediante rotura parcial de DNA purificado. Tales estudios demostraban que el DNA estaba compuesto sólo de cuatro moléculas básicas, llamadas **nucleótidos**, idénticas entre sí, excepto por contener cada una una base nitrogenada diferente. Cada nucleótido contiene fosfato, azúcar (del tipo llamado desoxirribosa) y una de las cuatro bases (Fig. 8-4). En ausencia del grupo fosfato, la base y la desoxirribosa forman un **nucleósido** en vez de un nucleótido. Las cuatro bases son **adenina**, **guanina**, **citocina** y **timina**. Los nombres químicos completos de los nucleótidos son 5'-monofosfato de desoxiadenosina (o desoxiadenilato, o dAMP), 5'-monofosfato de desoxiguanosina (o desoxiguanilato, o dGMP), 5'-monofosfato de desoxicitidina (o desoxicitidilato, o dCMP) y

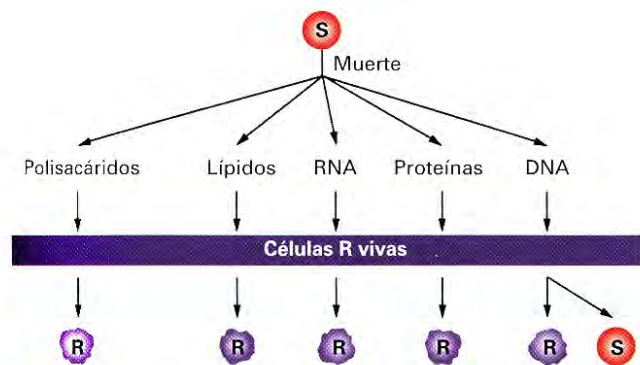


Figura 8-2. Demostración de que el DNA es el agente transformante. El DNA es el único compuesto que provoca la aparición de colonias lisas (S) al ser añadido a células rugosas (R) vivas.

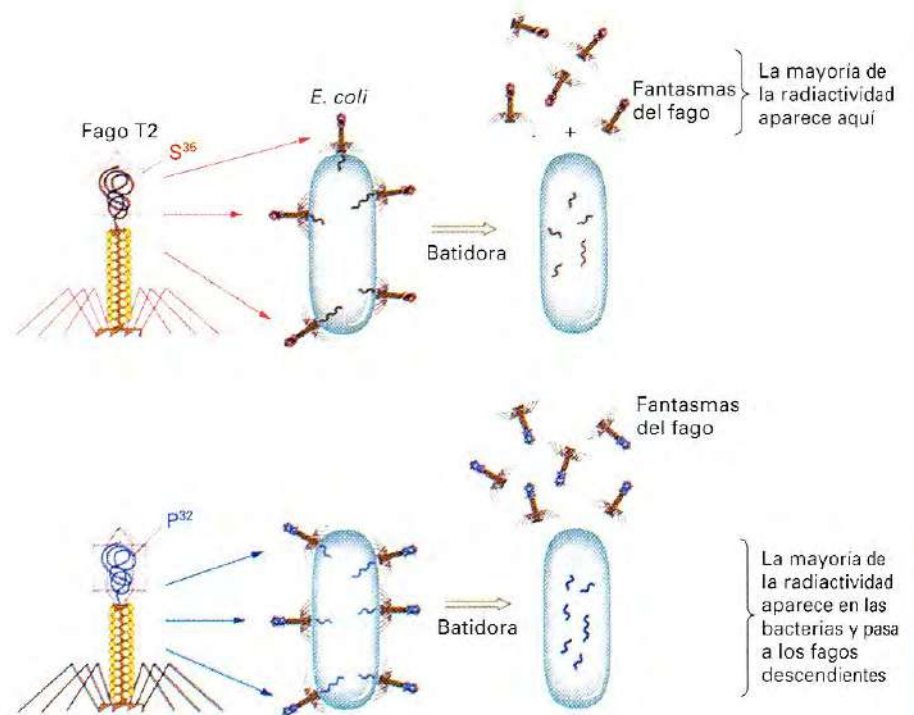
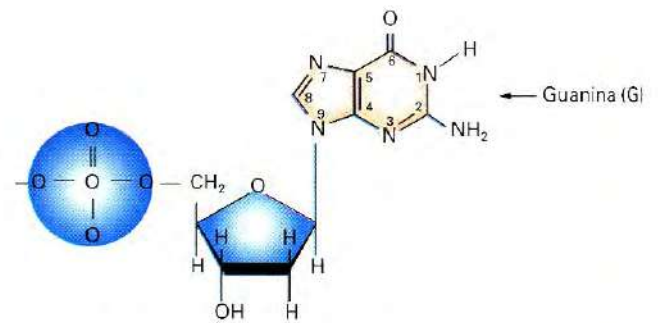
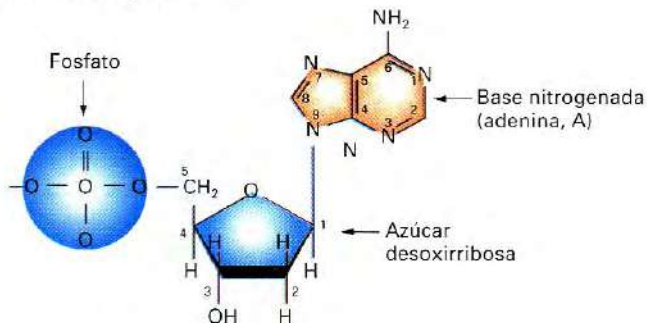


Figura 8-3. El experimento de Hershey y Chase, que demuestra que el material genético del fago es DNA, no proteína. El experimento emplea dos preparaciones de bacteriófagos T2. En una de ellas, las proteínas de la cubierta están marcadas con azufre radioactivo (^{35}S), ausente del DNA. En la otra, el DNA está marcado con fósforo radioactivo (^{32}P), ausente de las proteínas. Sólo el ^{32}P es inyectado dentro de *E. coli*, demostrando que el agente necesario para la producción de nuevos fagos es el DNA.

Nucleótidos púricos



Nucleótidos pirimidínicos

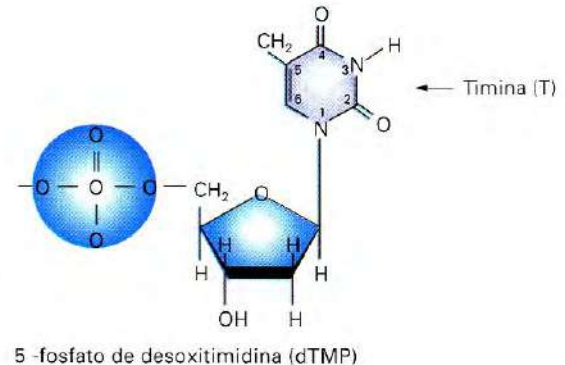
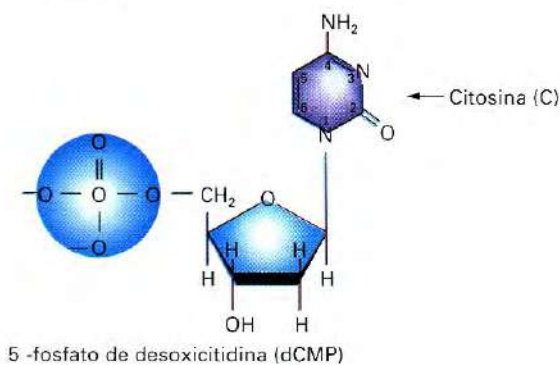


Figura 8-4. Estructura química de los cuatro nucleótidos (dos con bases púricas y dos con bases pirimidínicas) que constituyen los componentes fundamentales del DNA. El azúcar se denomina *desoxirribosa* porque es una variante del azúcar común ribosa, que tiene un átomo más de oxígeno.

5'-monofosfato de timidina (o desoxitimidilato, o dTMP). Sin embargo, resulta más cómodo referirse a cada nucleótido por la abreviatura de su base (A, G, C y T, respectivamente). Dos de las bases, adenina y guanina, son de estructura similar y se denominan **purinas**. Las otras dos bases, citosina y timina, también son similares y se denominan **pirimidinas**.

Después de que se hiciera evidente el papel central del DNA en la herencia, muchos científicos se dispusieron a determinar su estructura con exactitud. ¿Cómo puede una molécula con un rango tan limitado de componentes distintos almacenar la inmensa variedad informativa de las estructuras primarias de todas las proteínas de los seres vivos? Los primeros que tuvieron éxito en el empeño de encontrar una estructura razonable para el DNA —Watson y Crick, en 1953— trabajaron con dos tipos de pistas. En primer lugar, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins habían acumulado gran número de datos de difracción de rayos X sobre la estructura del DNA. En estos experimentos, se dirigen rayos X sobre fibras de DNA y se recoge la difracción de los rayos sobre una película fotográfica, en la que los rayos producen manchas. El ángulo de difracción representado por cada mancha de la película suministra información sobre la posición en la molécula de DNA de un átomo, o ciertos grupos de átomos. Este procedimiento no es fácil de llevar a cabo (ni de explicar), y la interpretación de las distribuciones de manchas resulta muy difícil. Los datos disponibles sugerían que el DNA es largo y muy fino, y que consta de dos partes similares que corren paralelamente una a otra a lo largo de la molécula. Los datos de rayos X demostraban también que la molécula es helicoidal (como una espiral). Se presentaban otras regularidades en la distribución de manchas, pero nadie había pensado todavía en una estructura tridimensional que diera cuenta exacta de esos patrones de manchas.

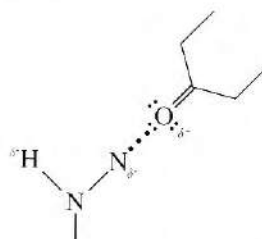
El segundo tipo de datos a disposición de Watson y Crick procedía del trabajo realizado varios años antes por Erwing Chargaff. Estudiando una variada gama de DNA de diferentes

organismos (Cuadro 8-1), Chargaff estableció ciertas reglas empíricas sobre las cantidades de cada componente del DNA:

1. La cantidad total de nucleótidos pirimidínicos (T + C) es siempre igual a la cantidad total de nucleótidos purínicos (A + G).
2. La cantidad de T es siempre igual a la de A, y la cantidad de C es siempre igual a la de G. Pero la cantidad de A + T no es necesariamente igual a la de G + C, como puede verse en la última columna del Cuadro 8-1. Este cociente varía entre distintos organismos.

La hélice doble

La estructura que diseñaron Watson y Crick a partir de esas pistas es una **hélice doble**, parecida a dos muelles entrelazados. Cada muelle (hélice) es una ristra de nucleótidos unidos por **enlaces fosfodiésteres**, en los que un grupo fosfato forma un puente entre grupos —OH de dos residuos de azúcar adyacentes. Los dos «muelles» (hélices) se mantienen juntos mediante **puentes de hidrógeno**, en los que dos átomos electronegativos «comparten» un protón entre las bases. Los puentes de hidrógeno se forman entre átomos de hidrógeno con una pequeña carga positiva y átomos aceptores con una pequeña carga negativa. Por ejemplo,



Cada átomo de hidrógeno de un grupo NH_2 es ligeramente positivo (δ^+) porque el átomo de nitrógeno atrae a los electrones implicados en el enlace N—H , dejando así al átomo de hidrógeno

CUADRO 8-1. Proporciones molares de las bases* de DNA de distintos orígenes

Organismo	Tejido	Adenina	Timina	Guanina	Citosina	$\frac{A + T}{G + C}$
<i>Escherichia coli</i> (K12)	—	26.0	23.9	24.9	25.2	1.00
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	29.8	31.6	20.5	18.0	1.59
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—	15.1	14.6	34.9	35.4	0.42
Levadura	—	31.3	32.9	18.7	17.1	1.79
<i>Paracentrotus lividus</i> (erizo de mar)	Esperma	32.8	32.1	17.7	18.4	1.85
Arenque	Esperma	27.8	27.5	22.2	22.6	1.23
Rata	Médula ósea	28.6	28.4	21.4	21.5	1.33
Hombre	Timo	30.9	29.4	19.9	19.8	1.52
Hombre	Hígado	30.3	30.3	19.5	19.9	1.53
Hombre	Esperma	30.7	31.2	19.3	18.8	1.62

* Expresadas en moles de nitrógeno constituyente por cada 100 átomos gramo de fosfato del hidrolizado.

Fuente: E. Chargaff y J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

no ligeramente escaso de electrones. El átomo de oxígeno tiene seis electrones sueltos en su capa externa que lo hacen ligeramente negativo (δ^-). Se forma, pues, un puente de hidrógeno entre un H y un O. Los puentes de hidrógeno son enlaces muy débiles (del orden sólo del 3 % de la fuerza de un enlace químico covalente) pero, como veremos, esta debilidad juega una función importante en el papel de la molécula de DNA en la herencia. Un aspecto químico adicional importante: el puente de hidrógeno es mucho más fuerte si los átomos implicados «apuntan uno al otro» en las orientaciones más idóneas.

Los puentes de hidrógeno se forman entre pares de bases y están indicados por líneas discontinuas en la Figura 8-5, que muestra una parte de la doble estructura emparejada, con las hélices desenrolladas. Cada par de bases consiste en una purina y una pirimidina, emparejadas según la regla siguiente: G empareja con C, y A lo hace con T. En la Figura 8-6, un esquema simple de la doble hélice, cada par de bases se representa por un «palito» entre las «cintas» o «esqueletos azúcar-fosfato» de las cadenas de nucleótidos. Observe en la Figura 8-5 que las dos cade-

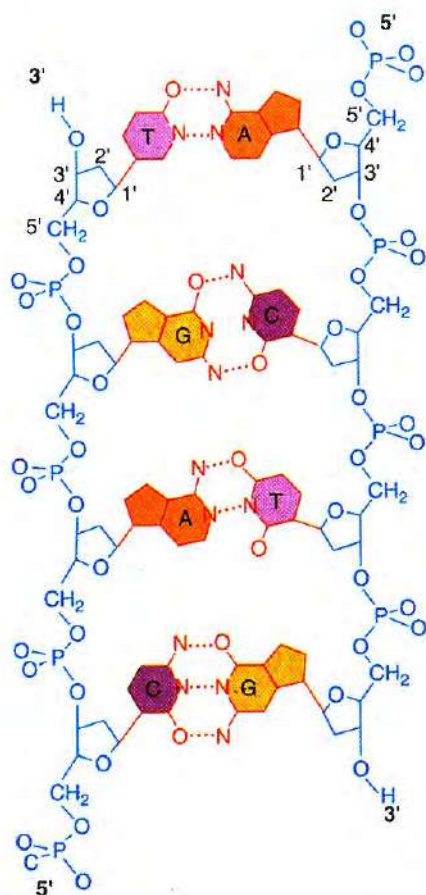


Figura 8-5. Doble hélice de DNA, desenrollada para mostrar los esqueletos azúcar-fosfato (en azul) y los escalones de pares de bases (en rojo). Los esqueletos corren en direcciones opuestas; los extremos se denominan 5' y 3' según la orientación de los átomos de carbono 5' y 3' de los anillos de azúcar. Cada par de bases consta de una purina, adenina (A) o guanina (G), y una pirimidina, timina (T) o citosina (C), conectadas mediante puentes de hidrógeno (*líneas punteadas*). (Tomada de R.E. Dickerson, «The DNA Helix and How it is Read». Copyright (©) 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

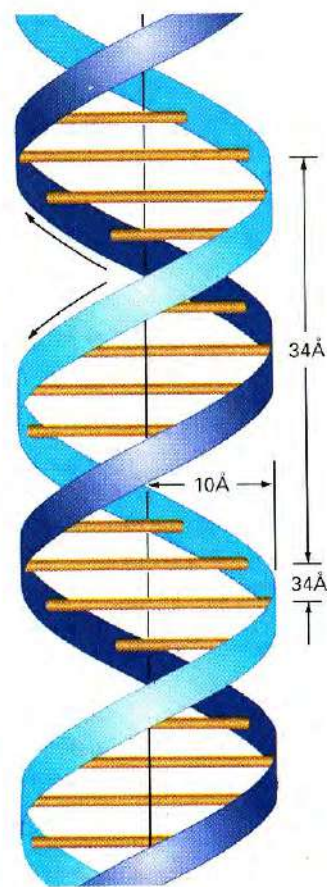


Figura 8-6. Modelo simplificado de la estructura helicoidal del DNA. Los palitos representan pares de bases, y las cintas representan los esqueletos azúcar-fosfato de las dos cadenas antiparalelas. Las distintas medidas se dan en angstroms ($1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$).

nas corren en direcciones opuestas; se dice que son **antiparalelas**, y (por razones aparentes en la figura) una se denomina cadena 5' $\rightarrow$ 3' y la otra cadena 3' $\rightarrow$ 5'.

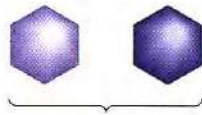
La doble hélice da cuenta perfectamente de los datos de rayos X y también se ajusta muy bien a los datos de Chargaff. Estudiando las maquetas que hicieron de la estructura, Watson y Crick notaron que el diámetro observado de la doble hélice (conocido por los datos de rayos X) se explicaría si una base púrica empareja siempre (mediante puentes de hidrógeno) con otra pirimidínica (Fig. 8-7). Tal emparejamiento explicaría la regularidad $(A + G) = (T + C)$ observada por Chargaff, pero predeciría cuatro posibilidades: $T \cdots A$, $T \cdots G$, $C \cdots A$ y $C \cdots G$. Sin embargo, los datos de Chargaff indicaban que T empareja sólo con A y C lo hace sólo con G. Watson y Crick demostraron que sólo esos dos emparejamientos tienen las conformaciones complementarias, tipo «llave-cerradura», adecuadas para permitir la formación eficiente de los puentes de hidrógeno (Fig. 8-8).

Observe que el par G—C establece tres puentes de hidrógeno, mientras que el par A—T establece sólo dos. Predeciríamos que el DNA que contenga muchos pares G—C será más estable que el DNA que contenga muchos pares A—T. En realidad, tal predicción ha sido confirmada. La estructura del DNA explica pulcramente los datos de Chargaff (Fig. 8-9) y es consistente con los datos de rayos X.

Imagen tridimensional de la doble hélice

Vistas en tres dimensiones, las bases aparecen más bien como estructuras planas que se apilan parcialmente unas sobre otras en la estructura retorcida de la hélice doble. Este apilamiento de bases coopera tremendamente a la estabilidad de la molécula al excluir las moléculas de agua de los espacios entre los pares de bases. (Este fenómeno se parece mucho a la fuerza estabiliza-

Pirimidina + pirimidina:
DNA demasiado fino



Purina + purina:
DNA demasiado grueso



Purina + pirimidina:
diámetro compatible
con los datos de rayos X



Figura 8-7. El emparejamiento de purinas y pirimidinas se corresponde exactamente con el diámetro de la hélice doble de DNA, calculado con los datos de rayos X. (Tomado de R. E. Dickerson, «The DNA Helix and How It Is Read». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

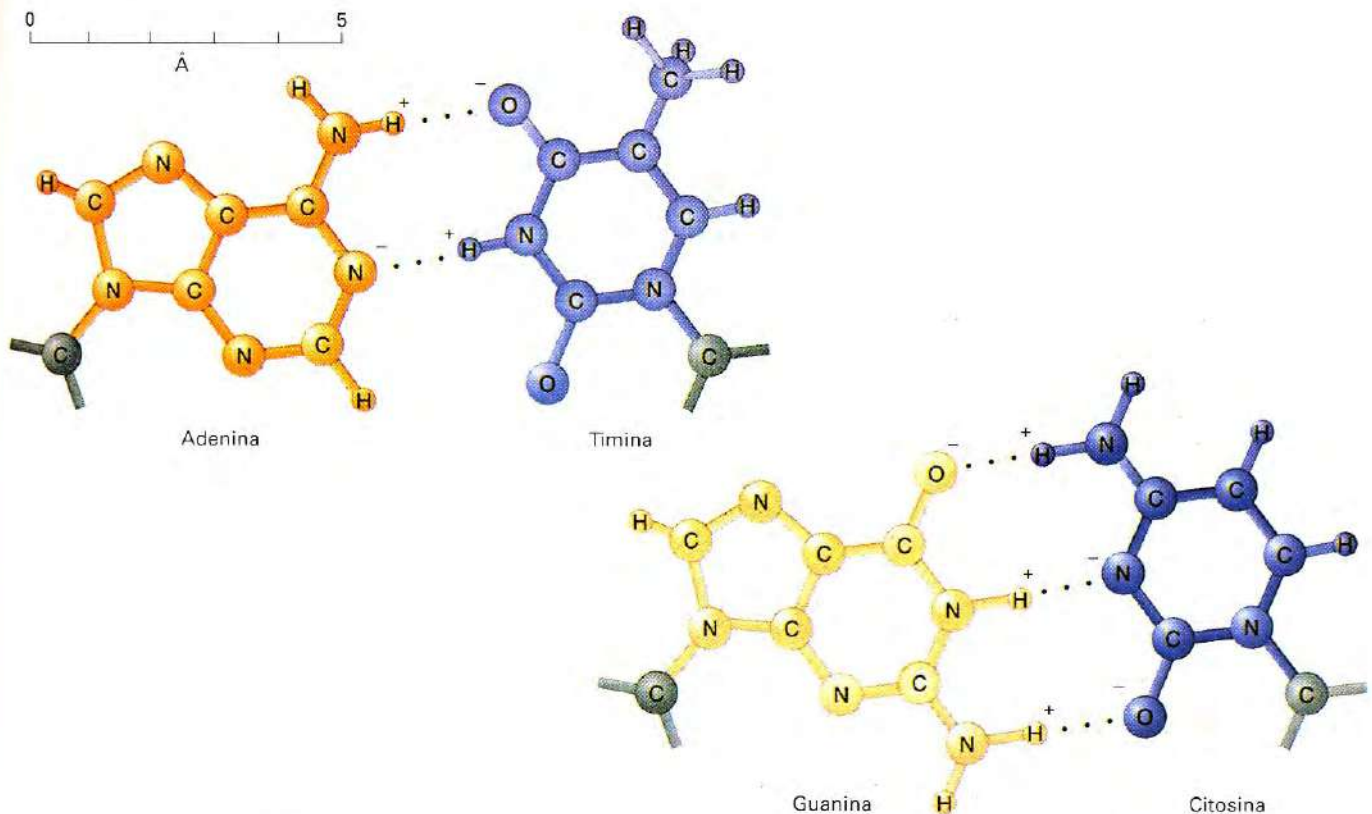


Figura 8-8. Encaje mediado por puentes de hidrógeno, a modo de «llave y cerradura», entre A y T y entre G y C (Tomado de G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. Copyright © 1963 de W.H. Freeman and Company).

dora que se percibe al introducir en el agua dos placas de cristal unidas y se intenta, a continuación, separarlas). Posteriormente, se observó que había dos formas de DNA en las fibras analizadas mediante difracción. La **forma A** está menos hidratada que la **forma B**, y es más compacta. Se cree que la forma B del DNA es la que se encuentra comúnmente en las células vivas.

El apilamiento de las bases en la doble hélice genera dos surcos en los esqueletos azúcar-fosfato. Tales surcos se denominan surco **mayor** y surco **menor** y pueden observarse fácilmente en el modelo (tridimensional) de espacios atómicos de la Figura 8-9a.

Implicaciones de la estructura del DNA

La elucidación de la estructura del DNA provocó una gran excitación entre los genetistas, y en todas las áreas de la Biología, por dos razones fundamentales. En primer lugar, la estructura sugería una forma obvia por la que la molécula puede ser **duplicada**, o **replicada**, ya que cada base determina a su complementaria mediante los puentes de hidrógeno. Hasta entonces, esta propiedad esencial de la molécula genética había sido un misterio. En segundo lugar, la estructura hace pensar que quizás la *secuencia* de pares de nucleótidos del DNA dicte la secuencia de aminoácidos de la proteína determinada por un gen. En otras palabras, algún tipo de **código genético** podría escribir información en el DNA como una secuencia de pares de nucleótidos y traducirla luego al lenguaje diferente de secuencias de aminoácidos de las proteínas.

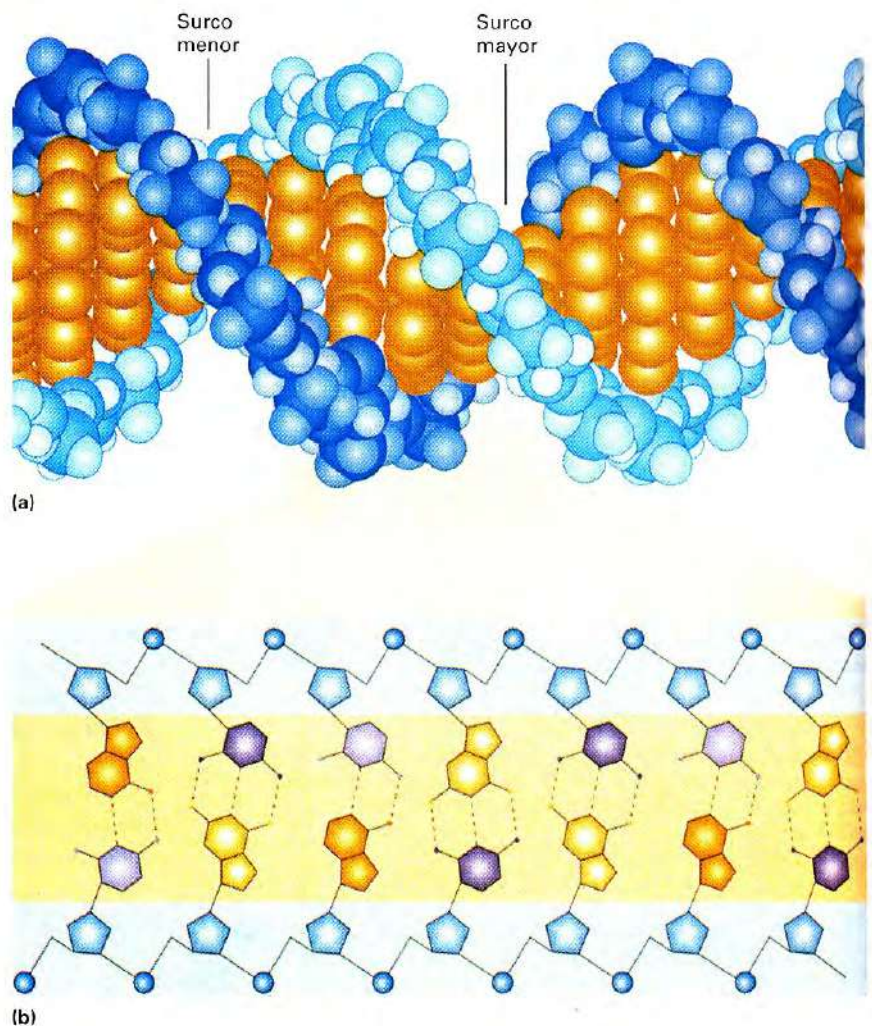


Figura 8-9. (a) Modelo de espacios atómicos de la doble hélice de DNA. (b) Representación de un corto segmento de pares de nucleótidos desenrollado, en el que se aprecia cómo los emparejamientos A—T y G—C generan las proporciones de Chargaff. Este modelo corresponde a una de las diversas formas del DNA, llamada *forma B*. (Parte «a» tomada de C. Yanofsky, «Gene structure and Protein Structure». Copyright © 1967 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos. Parte «b» según en A. Konberg, «The Synthesis of DNA». Copyright © 1968, de Scientific American Inc. Reservados todos los derechos.)

Estos datos básicos sobre el DNA son ahora familiares a casi cualquiera que haya leído un texto de Biología en la escuela primaria o secundaria, o incluso periódicos y revistas. Pero trate de trasladarse al escenario de 1953 e imagine la excitación de entonces. Hasta ese momento, la evidencia de que el poco interesante DNA era el material genético resultaba descorazonadora y decepcionante. Pero la estructura de Watson y Crick abría de repente la posibilidad de explicar dos de los grandes «secretos» de la vida. James Watson ha contado la historia de este descubrimiento (desde su peculiar punto de vista, fuertemente cuestionado por otros participantes en esa historia) en un libro fascinante, titulado *La Doble Hélice*, que revela el intrincado juego de enfrentamientos entre personalidades, inteligentes apreciaciones, trabajo duro y puro azar, que rodea a avances científicos de esta importancia.

Estructuras alternativas

Además de las formas A y B del DNA, se ha encontrado un nuevo tipo de estructura en cristales de un DNA sintético que contiene residuos nucleotídicos G y C alternados en la misma cadena. Este tipo de DNA, la **forma Z**, dispone su esqueleto en zigzag y genera una hélice «a izquierdas», mientras que las formas A y B del DNA son hélices «a derechas».

Replicación del DNA

La transmisión fiel de la información hereditaria depende de la replicación exacta del material genético. Esta sección examina los mecanismos de replicación del DNA

Replicación semiconservativa

La Figura 8-10 muestra un diagrama del posible mecanismo básico de replicación propuesto por Watson y Crick. Los esqueletos de azúcar-fosfato se representan como líneas y la secuencia de pares de bases es aleatoria. Imaginemos que la doble hélice es como una cremallera que se abre a partir de un extremo (el inferior de la Fig. 8-10). Vemos que, si la analogía de la cremallera es válida, el desenrollamiento de las dos cadenas dejará expuestas las bases de cada una de ellas. Debido a la estricta restricción de emparejamientos impuesta por la estructura del DNA, cada base expuesta emparejará sólo con su complementaria. Dada esta complementariedad de bases, cada una de las cadenas actuará como **molde**, o plantilla, y empezará a reproducir una hélice doble idéntica a la que se abrió. Se supone que los nuevos nucleótidos incorporados proceden de una reserva de nucleótidos libres que estaría presente en la célula.

Si este modelo es correcto, cada molécula hija debe contener una cadena de nucleótidos parental y otra sintetizada de nuevo. Esta predicción se ha sometido a prueba tanto en procariotas como en eucariotas. Pensando un poco veríamos que la molécula de DNA parental podría estar relacionada con las moléculas hijas de tres formas diferentes. Estas formas diferentes se denominan semiconservativa (el modelo de Watson y Crick), conservativa y dispersiva (Fig. 8-11). En la **replicación semiconservativa**, cada hélice doble hija contiene una cadena parental y otra recién sintetizada. En la **replicación conservativa**, sin embargo, una hélice doble hija está formada por dos cadenas sintetizadas de nuevo, conservándose la hélice doble parental. La **replicación dispersiva** da lugar a dos moléculas hijas cuyas cadenas contienen sólo ciertos *segmentos* de DNA parental y otros sintetizados de nuevo.

El experimento de Meselson y Stahl

En 1958, Matthew Meselson y Franklin Stahl se propusieron distinguir experimentalmente entre esas tres posibilidades. Cultivaron células de *E. coli* en un medio que contenía un isótopo pesado del nitrógeno (^{15}N) en vez del isótopo ligero normal (^{14}N). El isótopo pesado se incorporó a las bases nitrogenadas, que se incorporarían a su vez a las nuevas cadenas de DNA. Tras muchas divisiones celulares en presencia de ^{15}N , el DNA de todas las células debería estar bien marcado con el isótopo pesado. A continuación, separaron las células del medio con ^{15}N y las pusieron en un medio con ^{14}N , tomando muestras después de una y dos divisiones celulares. Extrañaron el DNA de las células de cada una de estas muestras y lo centrifugaron en una solución de cloruro de cesio (CsCl).

Si el cloruro de cesio se centrifuga a gran velocidad (50 000 rpm) durante muchas horas, los iones de cloruro y de cesio son empujados por la fuerza centrífuga hacia el fondo del tubo. Al final, se establece un gradiente de iones Cs^+ y Cl^- en el tubo, con mayores concentraciones de ellos en el fondo. También las moléculas de DNA en solución son empujadas hacia el fondo por la fuerza centrífuga. Pero en su trayecto hacia el fondo encuentran una concentración de sal cada vez mayor que tiende a empujarlas de nuevo hacia arriba, debido a la flotabilidad del DNA (su tendencia a flotar). Así pues, el DNA se «deposita» finalmente en cierta posición del tubo, justo donde la fuerza centrífuga compensa la flotabilidad de las moléculas en el gradiente de cloruro de cesio. La flotabilidad del DNA depende de su densidad (la cual, a su vez, depende de la relación de pares G—C a pares A—T). La presencia del isótopo más pesado del nitrógeno cambia la densidad de flotación del DNA. El DNA extraído de células que han crecido durante muchas generaciones en medio con ^{15}N puede distinguirse con facilidad del DNA de las células que lo han hecho en medio con ^{14}N por la posición de equilibrio que alcanzan en el gradiente de cloruro de cesio. Tales muestras se denominan familiarmente *DNA pesado* y *ligero*, respectivamente.

Meselson y Stahl comprobaron que una generación después de que las células *pesadas* se trasladaron a medio con ^{14}N el DNA formaba una única banda, de densidad intermedia entre las densidades de los controles pesado y ligero. Después de dos generaciones en medio con ^{14}N , el DNA formaba dos bandas: una en la posición intermedia y la otra en la posición ligera (Fig. 8-12). Éste es el resultado esperado del modo de replicación semiconservativa; de hecho, el resultado es compatible *sólo* con este mo-

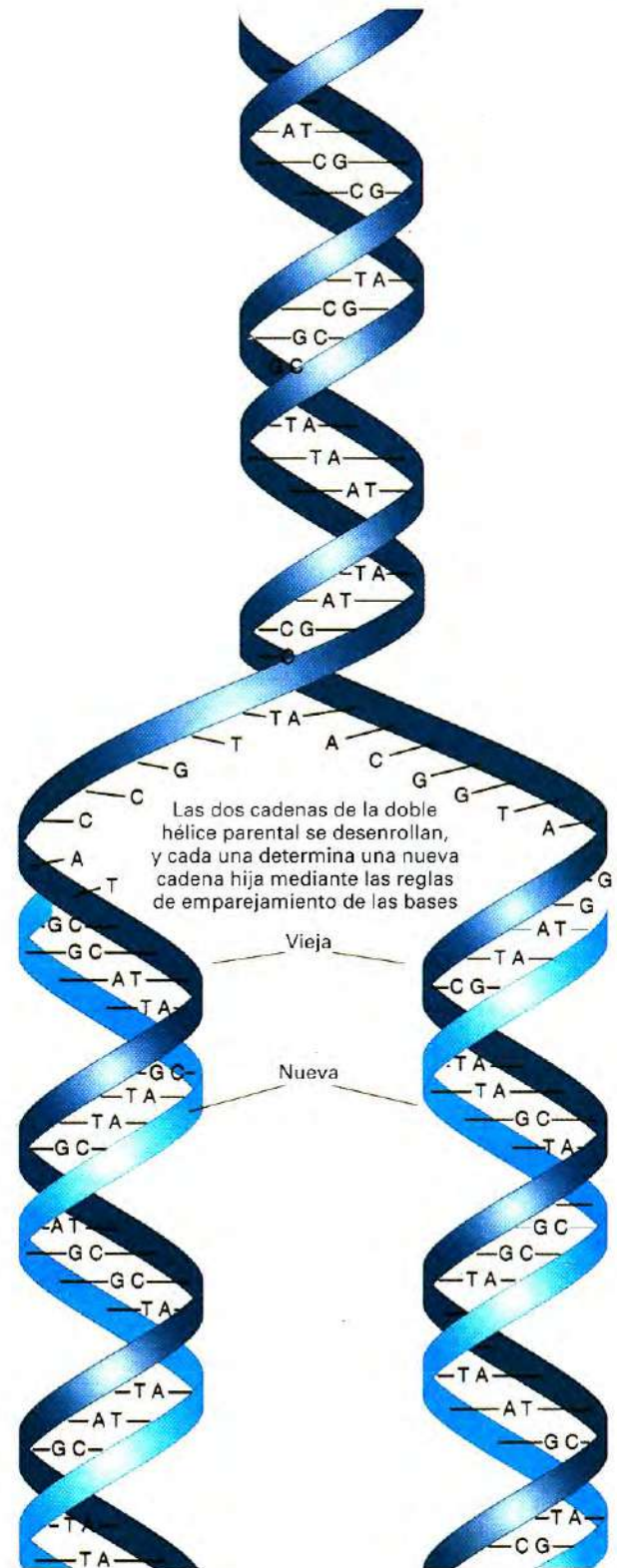


Figura 8-10. El modelo de replicación del DNA propuesto por Watson y Crick está basado en la especificidad de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases. Las cadenas complementarias aparecen en distinto color. Este dibujo es una versión simplificada de nuestra idea actual de cómo ocurre la replicación, pero representa bien la idea básica sugerida por la estructura de Watson y Crick. El hecho de que las cadenas nuevas pueden alargarse sólo en dirección 5' a 3' añade mayor complejidad al mecanismo real de la replicación.

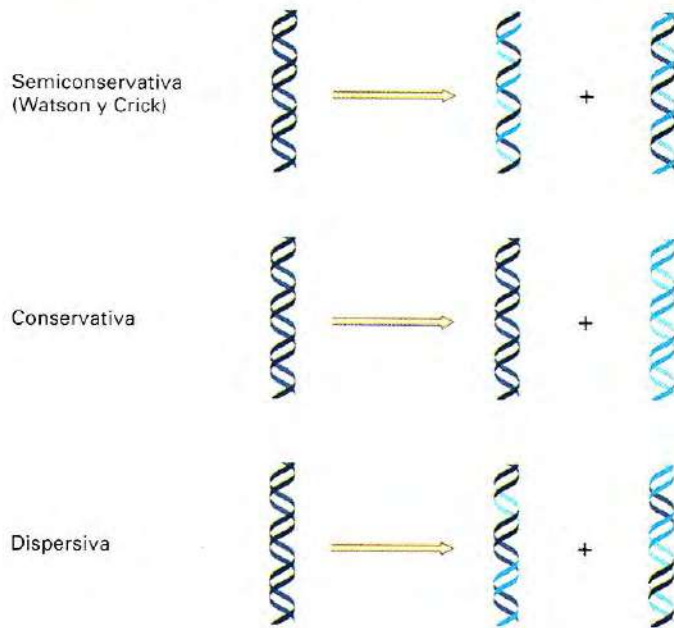


Figura 8-11. Tres formas alternativas de replicación del DNA. El modelo de Watson y Crick corresponde a la primera forma (semiconservativa). Las líneas de color azul claro representan las cadenas sintetizadas de nuevo.

delo, si el experimento se inicia con cromosomas constituidos por hélices dobles individuales (Fig. 8-13).

Autorradiografía

El experimento con *E. coli* de Meselson y Stahl fue prácticamente repetido con cromosomas de células de raíces de judía por Herbert Taylor, en 1958, utilizando técnicas citológicas. Taylor puso las células de raíz en una solución que contenía timidina tritiada [timidina-(^3H)], el nucleótido timidina marcado con un

isótopo radiactivo del hidrógeno llamado *tritio*. Dejó que las células realizaran la mitosis en esta solución, de manera que la timidina-(^3H) pudiera incorporarse al DNA. Lavó entonces las puntas de raíz y las trasladó a una solución que contenía timidina no radiactiva. La adición de colchicina a esta preparación inhibe la formación del huso acromático, de manera que los cromosomas metafásicos no se separan y las cromátidas hermanas permanecen unidas entre sí por el centrómero.

La localización celular del ^3H puede hacerse mediante **autorradiografía**. Al descomponerse, el ^3H emite una partícula beta (un electrón con energía). Si se coloca una lámina de emulsión fotográfica sobre una célula que contiene ^3H , se produce una reacción química allí donde una partícula beta choca con la emulsión. Ésta puede revelarse entonces como una fotografía, de forma que las emisiones de las partículas beta aparecen como granos o manchas negras. Además, la célula puede teñirse para hacer visibles sus estructuras e identificar la fuente de la radiactividad. La autorradiografía es un método en el que, en efecto, estructuras celulares radiactivas «se fotografían a sí mismas».

La Figura 8-14 muestra los resultados observados cuando se añade la colchicina durante la división en timidina-(^3H) o durante la división mitótica siguiente. Estos resultados pueden inter-

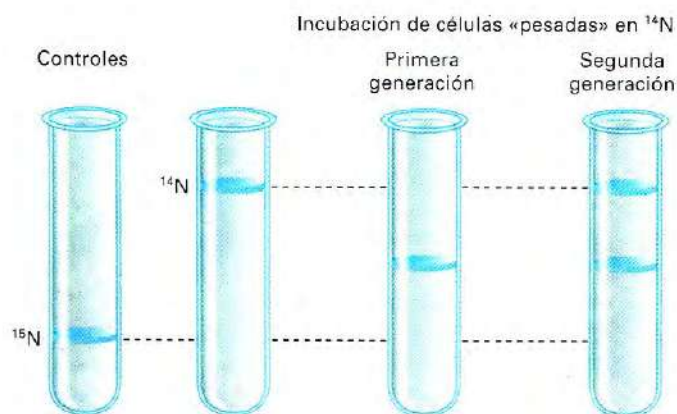


Figura 8-12. Centrifugación de DNA en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los cultivos mantenidos durante muchas generaciones en medio con ^{15}N ó ^{14}N permiten establecer los controles de posición de las bandas de DNA pesado y ligero, respectivamente. Cuando células cultivadas en ^{15}N se transfieren a medio con ^{14}N , la primera generación produce una banda de DNA intermedia, y la segunda generación produce dos bandas, una intermedia y otra ligera.

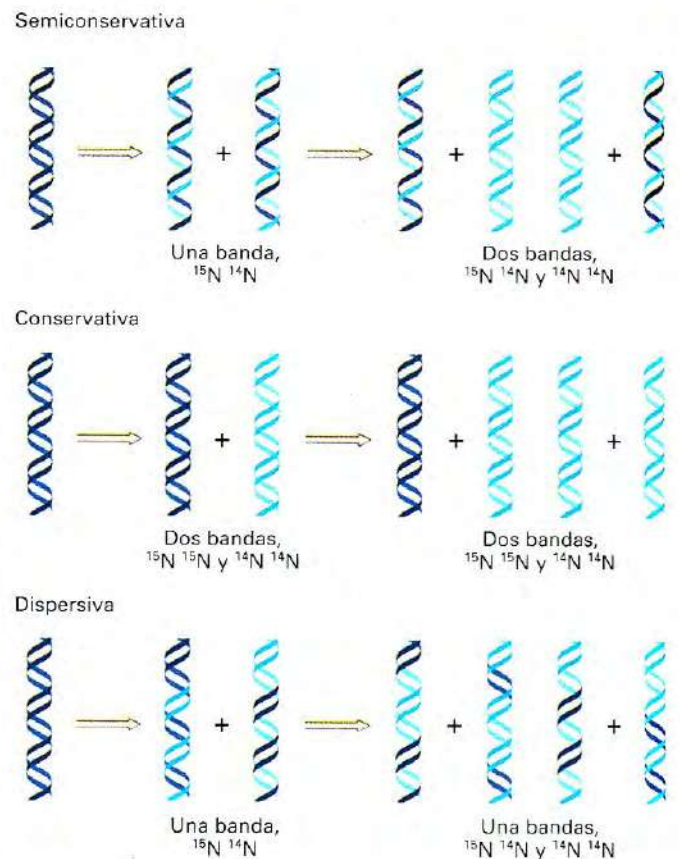


Figura 8-13. Sólo el modelo semiconservativo de replicación del DNA predice resultados como los de la Figura 8-12: una banda intermedia en la primera generación y una intermedia y otra ligera en la segunda generación. (Véase explicación de los colores en la Fig. 8-11.) Recuerde que tras el crecimiento en ^{15}N , las células se pasaron a ^{14}N .

pretarse representando cada cromátida como una molécula única de DNA que se replica de forma semiconservativa (Fig. 8-15).

Cromosomas en arlequín

Usando una técnica de tinción más moderna, es posible visualizar la replicación semiconservativa de los cromosomas en mitosis sin necesidad de autorradiografía. En este método, se deja que los cromosomas sufran dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR). El patrón del marcado con BUdR, que aparece en la Figura 8-16a, es el recíproco del de la Figura 8-15, porque se emplea BUdR en las dos replicaciones, en vez de ser sustituida por timina normal durante la segunda replicación, como en el procedimiento de la autorradiografía. Entonces, se tiñen los cromosomas con Giemsa y con un colorante fluorescente; este método distingue entre las cromátidas híbridas, con una cadena que contiene BUdR y otra cadena original (teñidas de oscuro), y las cromátidas cuyas dos cadenas contienen BUdR (de color claro), generando los llamados **cromosomas en arlequín** (Fig. 8-16b). (Observe, de paso, que los cromosomas en arlequín son particularmente adecuados para detectar intercambios entre cromátidas hermanas en la mitosis; en la Figura 8-16b se ven dos ejemplos). Empleando técnicas similares, Taylor demostró que la replicación cromosómica durante la meiosis es también semiconservativa.

La estructura del cromosoma

Las Figuras 8-14 y 8-15 traen a colación una de las grandes cuestiones genéticas no resueltas todavía: un cromosoma eucariótico ¿es esencialmente una única molécula de DNA envuelta por una matriz de proteína? Dos hechos apoyan contundentemente que, en efecto, así es. En primer lugar, si hubiera muchas moléculas de DNA en el cromosoma (ya sea dispuestas unas al lado de otras, extremos con extremos, u orientadas al azar), sería casi imposible que los cromosomas se replicaran de forma semiconservativa (yendo todo el material marcado a una cromátida, según los resultados de Taylor). Estudios con cromosomas aislados y largas moléculas de DNA apoyan la idea de que cada cro-

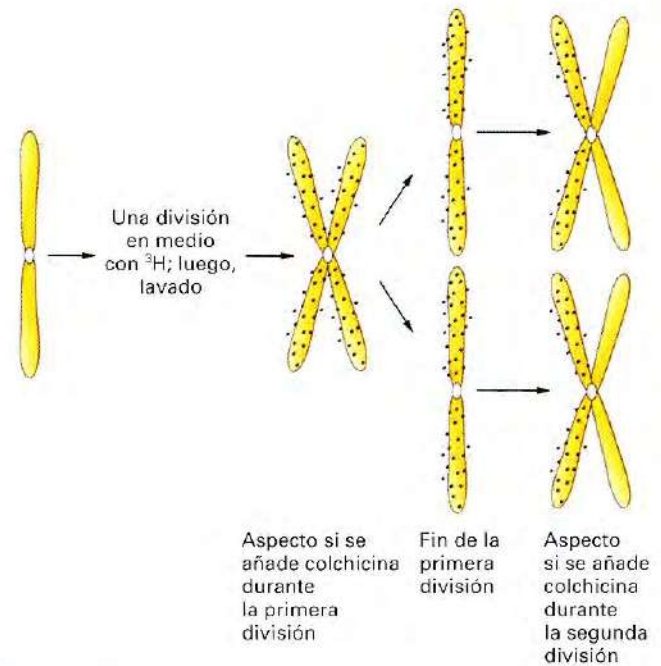


Figura 8-14. Esquema de la autorradiografía de cromosomas de células cultivadas durante un ciclo de división en presencia del isótopo radiactivo del hidrógeno ^3H (tritio) y cultivadas después en un medio no radiactivo durante una segunda división mitótica. Cada punto representa la huella dejada por una partícula de radiactividad.

mátida es una molécula única de DNA. El segundo hecho que apoya la hipótesis de una única molécula es que el DNA y los genes se comportan como si estuvieran unidos extremo con extremo en una única ristra o cadena, que llamamos un *grupo de ligamiento*. Todos los datos de ligamiento (Cap. 5) nos dicen que no necesitamos más que una única serie lineal de genes por cada cromosoma para explicar los fenómenos genéticos. Como vimos en el Capítulo 3, se ha demostrado de forma convincente que un cromosoma o cromátida contiene en realidad una sola molécula de DNA.

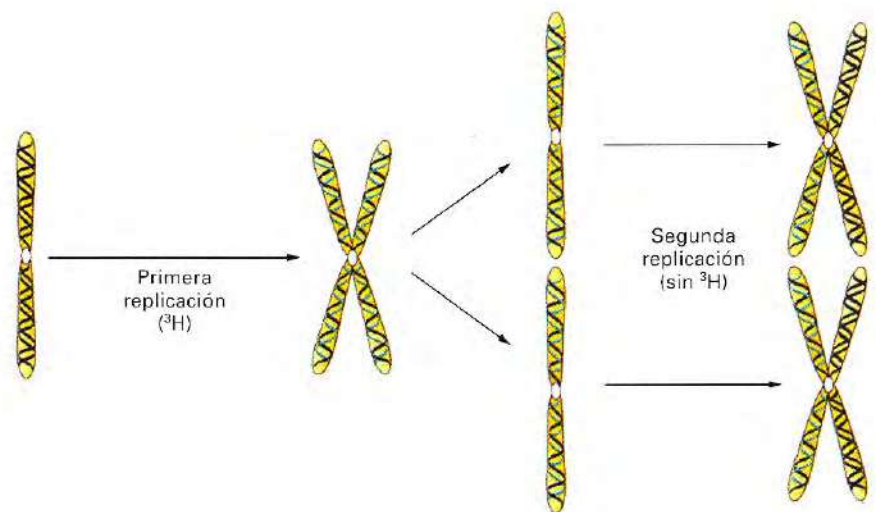
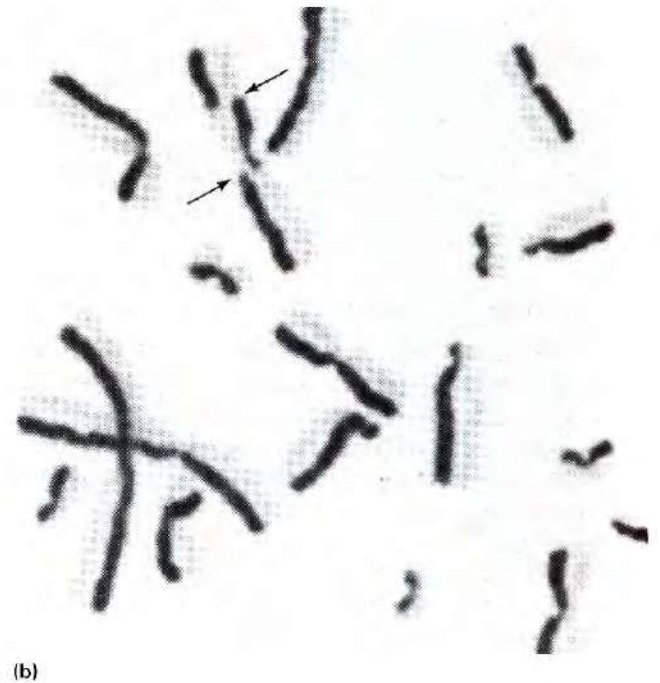
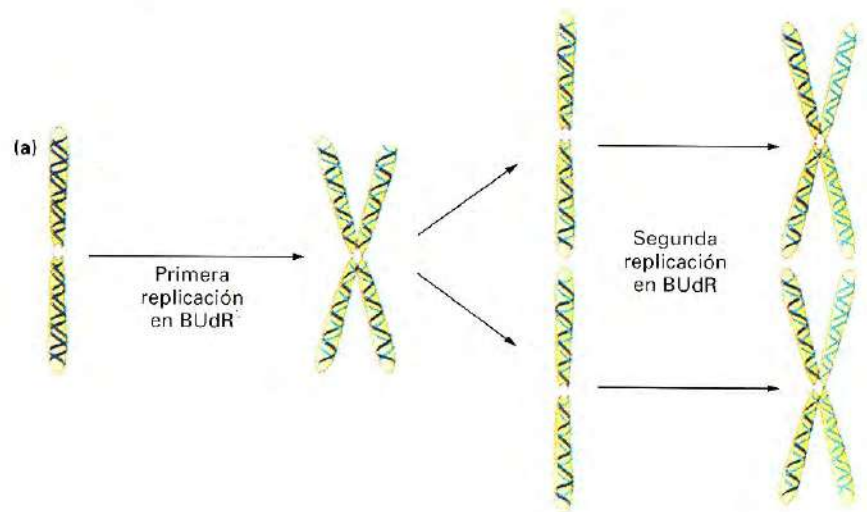


Figura 8-15. Interpretación de la Figura 8-14 al nivel del DNA. Las líneas en azul claro representan cadenas radiactivas. En la segunda replicación (que tiene lugar en una solución no tritiada) tanto la cadena hecha de ^3H como la cadena no tritiada actúan de molde para la incorporación de nucleótidos no radiactivos, generándose una cromátida híbrida y otra no tritiada.

Figura 8-16. (a) Esquema de la generación de cromosomas en arlequín. El método consiste en dejar que los cromosomas pasen dos ciclos de replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BUdR), que sustituye a la timidina en el DNA sintetizado de nuevo. Al teñir entonces los cromosomas con un colorante fluorescente y con Giemsa, se produce el aspecto de la figura. (Las líneas de color azul claro representan las cadenas que han incorporado BUdR). (b) Fotografía de cromosomas en arlequín de células de ovario de hámster chino (CHO). Las cromátidas con dos cadenas que contienen BUdR aparecen más claras en la fotografía, mientras que aquellas con una cadena original y otra hecha de BUdR aparecen más oscuras. En la parte superior (flechas), aparece un cromosoma que ha sufrido dos intercambios entre cromátidas hermanas. (Fotografía cortesía de Sheldon Wolf y Judy Bodycote.)



La horquilla de replicación

Una predicción del modelo de replicación del DNA de Watson y Crick es que, cuando está siendo replicada, en la molécula de DNA debe encontrarse una **horquilla** de replicación. John Cairns, en 1963, puso a prueba esta predicción dejando que el DNA en replicación de células bacterianas incorporara timidina tritiada. Teóricamente, cada molécula hija sintetizada de nuevo debe contener entonces una cadena radiactiva («caliente») y otra no radiactiva («fría»). Tras variar el período y el número de ciclos de replicación en medio «caliente», Cairns extrajo el DNA de las células, lo puso en un portaobjetos y lo autorradiografió para observarlo luego al microscopio óptico. Tras un ciclo de replicación en timidina- (^3H) , aparecieron anillos de puntos en la autorradiografía. Cairns interpretó los anillos como se muestra en la Figura 8-17. En ella resulta aparente también que el cromosoma bacteriano es circular —hecho que se deducía también de los datos genéticos descritos anteriormente (Cap. 7)—.

durante el segundo ciclo de replicación, se vieron realmente las horquillas predichas por el modelo. Además, la densidad de granos en los tres segmentos era tal que podía interpretarse como aparece en la Figura 8-18. Cairns observó toda clase de tamaños en estos patrones autorradiográficos en forma de luna, en correspondencia con el movimiento progresivo de la cremallera de replicación, u horquilla, alrededor del anillo. Formas como las que aparecen en la Figura 8-18 se llaman **formas theta** (θ).

Replicación mediante el círculo rodante

La replicación de ciertas moléculas circulares, como las de los plásmidos y ciertos virus, se produce por el mecanismo repre-

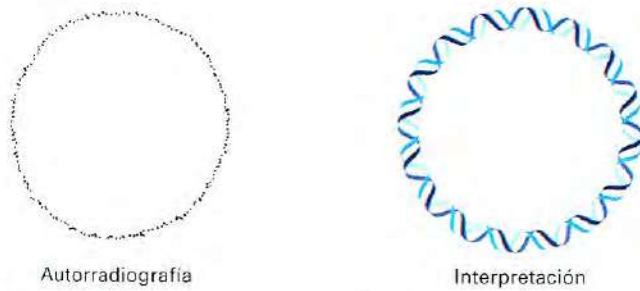


Figura 8-17. *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano después de un ciclo de replicación en timidina tritiada. Según el modelo de replicación semiconservativa, una de las dos cadenas debe ser radiactiva. *Derecha:* Interpretación de la autorradiografía. La línea azul claro representa la cadena tritiada.

sentado en la Figura 8-19. Aquí, el corte mediante una nucleasa genera un extremo 3'-OH libre al que se van añadiendo los nucleótidos. Como se ve en la Figura 8-19, conforme progresa la síntesis, el otro extremo de la cadena es desplazado del círculo de doble cadena y luego copiado. Podemos imaginar este desplazamiento de la cadena como resultado de que el círculo fuera rodando. Como no hay un punto final de la replicación, la síntesis continúa a menudo más allá de una sola copia completa del círculo, generándose concadenados (serie de cadenas enlazadas), de tamaño equivalente a varios anillos completos, que serán procesados después por recombinación para generar círculos de tamaño normal.

El mecanismo de la replicación del DNA

Watson y Crick razonaron, en primer lugar, que el apareamiento de bases complementarias constituye la base de la fidelidad de la replicación del DNA; es decir, que cada base de la cadena molde determina la base complementaria de la nueva cadena. Sin embargo, actualmente sabemos que el proceso de replicación del DNA es muy complejo y que necesita de la participación de

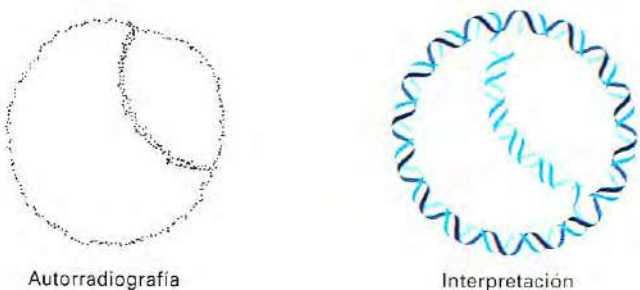


Figura 8-18. *Izquierda:* Autorradiografía de un cromosoma bacteriano durante el segundo ciclo de replicación en timidina tritiada. En esta estructura theta (θ), la hélice doble recién replicada que cruza el círculo podría contener ambas cadenas radiactivas (si la cadena parental fuera la radiactiva). *Derecha:* La doble densidad del trazado radiactivo del autorradiograma parece confirmar la interpretación que se hace aquí. Las hélices de color azul claro representan las cadenas «calientes».

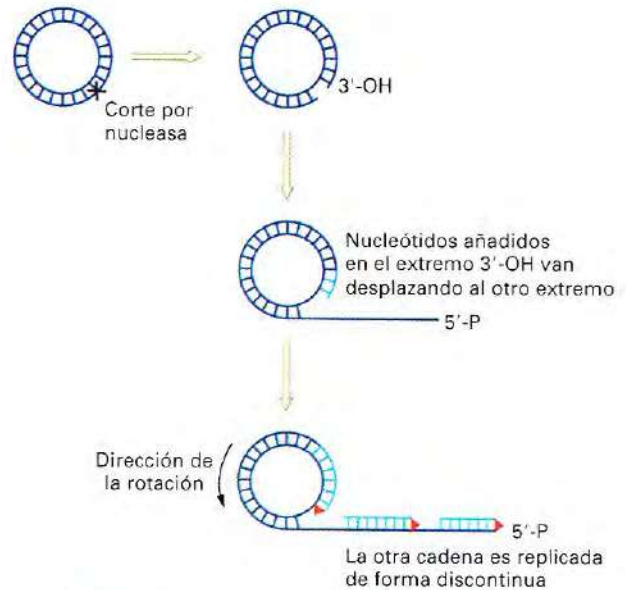
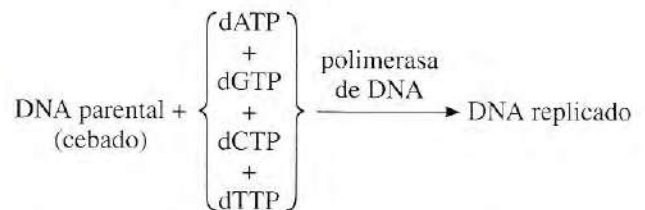


Figura 8-19. Replicación mediante el anillo rodante. El DNA sintetizado de nuevo es el de color azul. La cadena desplazada es utilizada para una replicación discontinua, como se describe en el texto. (Según D. L. Hartl y E. W. Jones, *Genetics: Principles and Analysis*, 4.ª ed. Jones and Barlett, 1998.)

muchos componentes diferentes. Vamos a examinar cada uno de estos componentes y comprobar cómo actúan juntos para proporcionar el esquema actual de la síntesis de DNA en *E. Coli*, el sistema de replicación celular más estudiado. En la sección anterior, se introdujo el concepto de horquilla de replicación. La Figura 8-20 proporciona un esquema detallado del movimiento de la horquilla durante la replicación del DNA.

Polimerasas de DNA

A finales de la década de 1950, Arthur Kornberg consiguió identificar y purificar la primera polimerasa de DNA, una enzima que cataliza la reacción de replicación:



Esta reacción funciona sólo con la forma trifosfato de los nucleótidos (como el trifosfato de desoxiadenosina, o dATP). Al término de la reacción, la cantidad total de DNA puede ser hasta 20 veces la cantidad de DNA de entrada, de manera que el DNA presente al final debe ser fundamentalmente DNA replicado. La Figura 8-21 ilustra la reacción de elongación de la cadena, o reacción de **polimerización**, catalizada por las polimerasas de DNA. Ahora sabemos que en *E. coli* hay tres polimerasas de DNA.

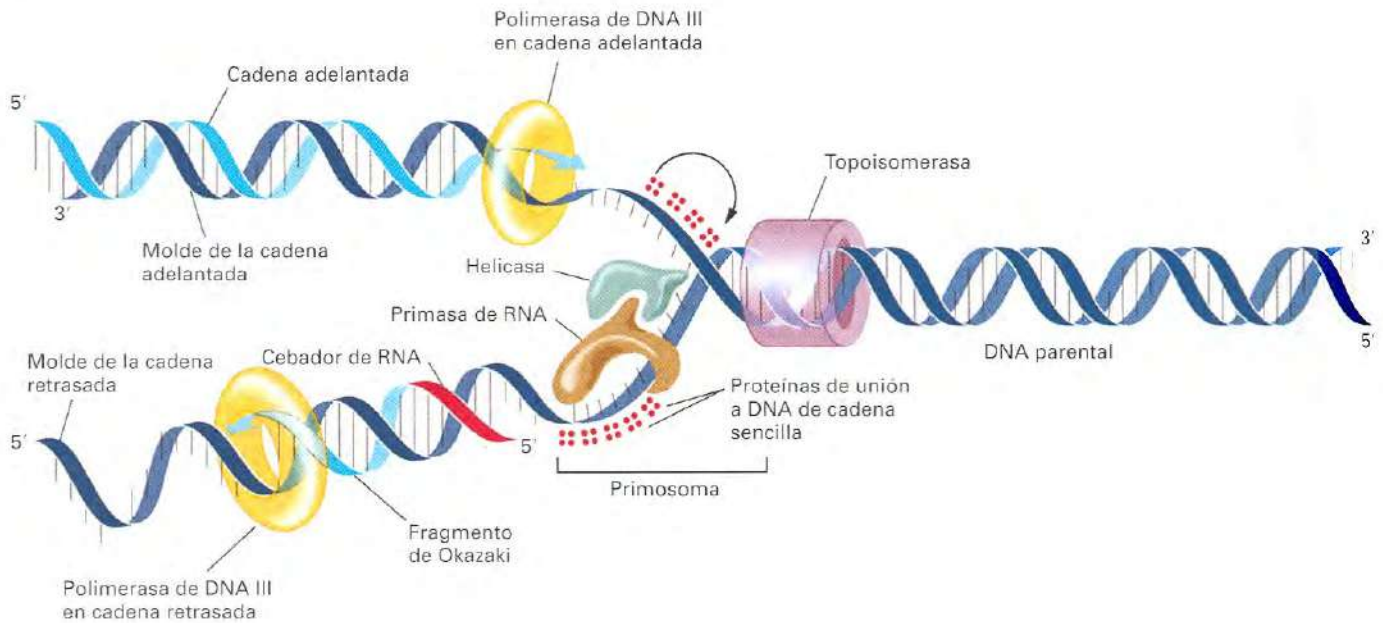


Figura 8-20. Horquilla de replicación del DNA.

La primera enzima purificada por Kornberg se denomina **polimerasa de DNA I** o **pol I**. Esta enzima posee tres actividades que parecen localizarse en tres regiones distintas de la molécula:

1. una actividad polimerasa que cataliza la elongación de la cadena en dirección $5' \rightarrow 3'$;
2. una actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ que elimina bases mal apareadas; y

3. una actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ que degrada DNA de doble cadena

Posteriormente, se identificaron en *E. coli* dos polimerasas adicionales, pol II y pol III. A la enzima pol II no le ha sido asignado un papel concreto, aunque quizás repare daños del DNA. Pol III, junto con pol I, tiene un papel en la replicación del DNA de *E. coli* (Fig. 8-20). El complejo completo, u **holoenzima**, de pol III contiene al menos 20 subunidades polipeptídicas distintas, aunque el «cuerpo central» catalítico está formado sólo por tres subunidades, alfa (α), epsilon (ϵ) y theta (θ). El complejo pol III completará la replicación de una molécula de DNA de cadena sencilla si ya hay presente al menos un tramo pequeño de doble cadena. El pequeño oligonucleótido que forma ese tramo de doble cadena se denomina **cebador**.

Orígenes de replicación procarióticos

En *E. coli*, la replicación se inicia en un punto de **origen** fijo, pero progresa luego **bidireccionalmente** (con horquillas en movimiento a ambos extremos de la zona en replicación), tal como aparece en la Figura 8-22, terminando en un punto denominado **término**. El origen único se llama *oriC* y está situado en el minuto 83 del mapa genético. Tiene una longitud de 245 pb y contiene varios elementos, como se muestra en la Figura 8-23. Primero hay una serie de secuencias casi idénticas de 13 pb en tándem, una a continuación de otra. Hay también una serie de sitios de unión de una proteína, la proteína DnaA. Un paso inicial de la síntesis de DNA es el desenrollamiento del DNA en el origen, en respuesta a la unión de la proteína DnaA. El resultado de la replicación bidireccional puede verse en la Figura 8-24, que ofrece una visión más completa de la replicación del DNA.

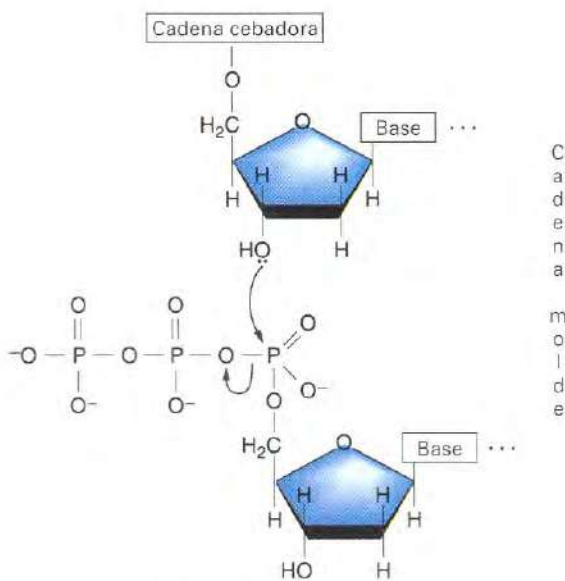


Figura 8-21. Reacción de elongación de la cadena catalizada por la polimerasa de DNA. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

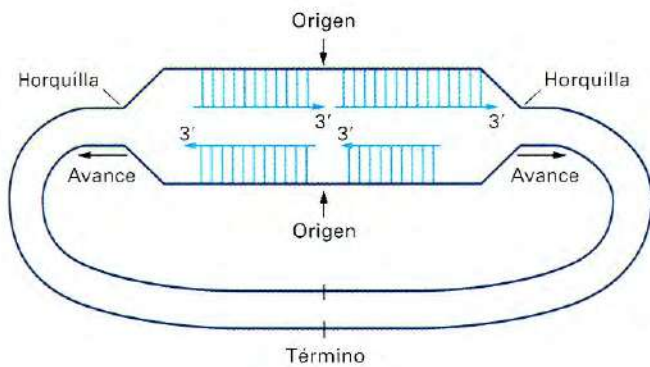


Figura 8-22. Diagrama de la replicación del DNA avanzando en las dos direcciones a partir del origen. (Tomado de A. Kornberg, *DNA synthesis*, Copyright © 1974, de W.H. Freeman and Company.)

Orígenes de replicación eucarióticos

Bacterias como *E. coli* emplean normalmente 40 minutos en cada ciclo de replicación-división celular, pero los en eucariotas, la duración del ciclo varía desde las 1.4 horas de la levadura hasta las 24 horas de las células animales en cultivo, pudiendo durar de 100 a 200 horas en algunos casos. Los eucariotas tienen que resolver el problema de coordinar la replicación de más de un cromosoma, debiendo además replicar la compleja estructura del propio cromosoma (véase la descripción de la estructura cromosómica del Cap. 3).

En los eucariotas, la replicación progresa a partir de múltiples puntos u orígenes. Ello puede demostrarse mediante un experimento en el que exponemos brevemente una célula eucariótica a timidina- (H^3) , paso denominado **pulso**, y añadimos luego timidina «fría» (no marcada) en exceso, paso denominado **caza**; se extrae entonces el DNA y se hace una autorradiografía. La Figura 8-25 muestra el resultado del experimento, con lo que parecen ser distintos tramos de la molécula de DNA replicándose

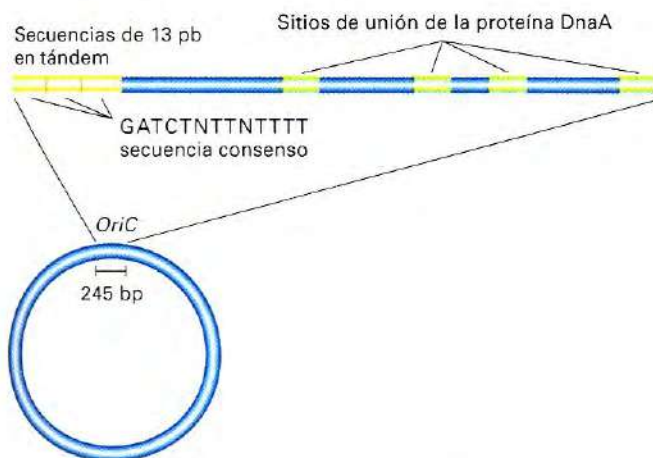


Figura 8-23. El origen de replicación de *E. coli*, *oriC*, tiene una longitud de 245 pb. Contiene tres secuencias casi idénticas de 13 nucleótidos, dispuestas en tándem, y cuatro sitios de unión de la proteína DnaA.

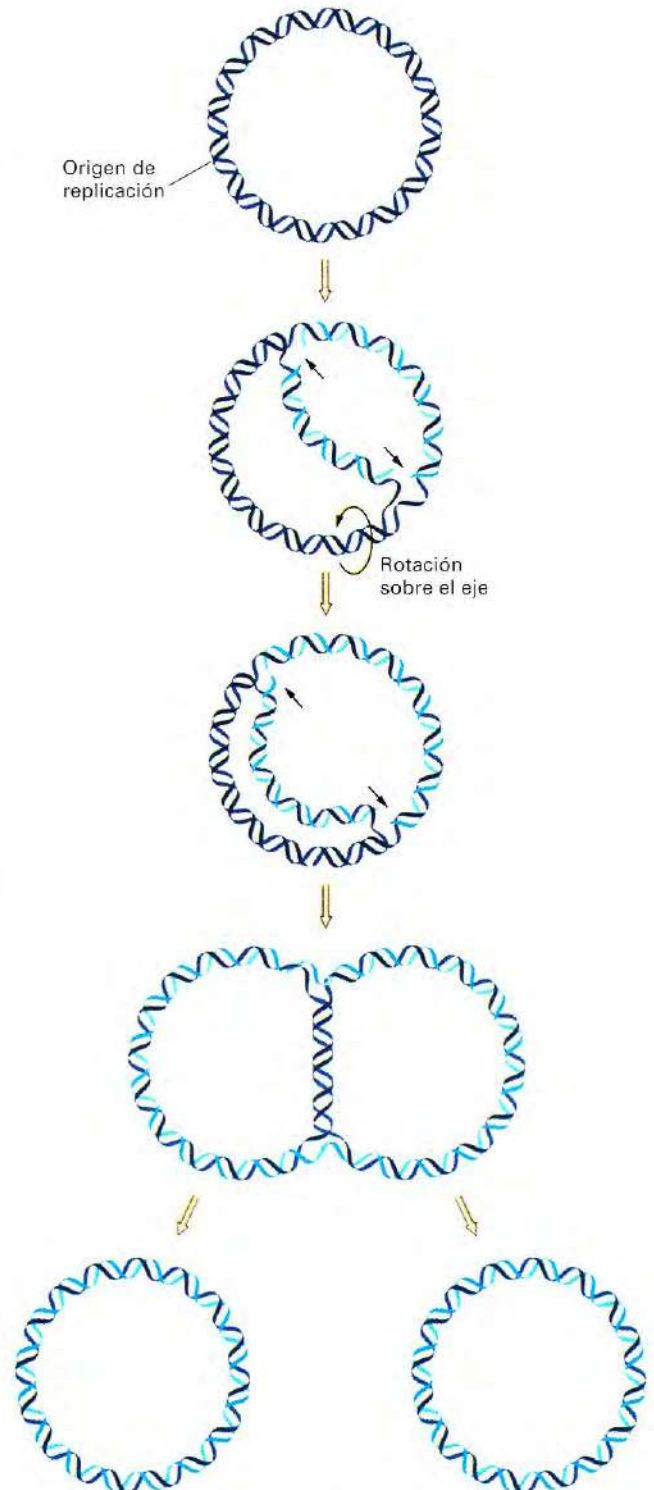


Figura 8-24. Replicación bidireccional de una molécula de DNA circular.

simultáneamente. La replicación parece comenzar en diferentes sitios de estos cromosomas eucarióticos. Un experimento similar de pulso, caza y autorradiografía de la replicación de los cromosomas politénicos (gigantes) de *Drosophila* revela muchas regiones en replicación dentro de un mismo brazo cro-

Autorradiografía

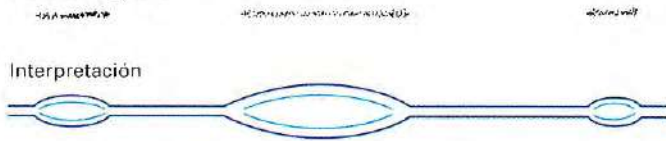


Figura 8-25. Una forma de replicación del DNA, revelada por autorradiografía. Una célula es expuesta brevemente a timidina $-(^3\text{H})$ (pulso) y transferida luego a timidina no radioactiva (fría) en exceso (caza). Se extiende el DNA sobre un portaobjeto y se autorradiografía. Según la interpretación que se muestra, habría varios puntos de replicación en una misma hélice doble de DNA.

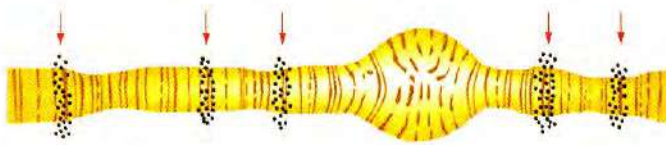


Figura 8-26. Forma de replicación de un cromosoma de *Drosophila* revelada por autorradiografía. En un mismo cromosoma se ven varios puntos de replicación, señalados con flechas.

mosómico (Fig. 8-26). Así y todo, no hay una prueba contundente de que estas regiones correspondan en realidad a diferentes puntos de iniciación de una única molécula de DNA. Sin embargo, experimentos realizados con la levadura indican la existencia de unos 400 orígenes de replicación distribuidos a lo largo de los 17 cromosomas de ese organismo, y en humanos se estima que existen más de 10 000 horquillas de replicación.

Iniciación de la síntesis de DNA

Las polimerasas de DNA pueden alargar una cadena, pero no iniciar su síntesis. Por tanto, como ya se ha comentado, la síntesis de DNA debe iniciarse a partir de un cebador, un corto oligonucleótido que genera un tramo de DNA de dos cadenas. La acción del cebador en la replicación del DNA puede verse en la Figura 8-27 (véase también la Fig. 8-20). Los cebadores, de RNA, son sintetizados bien por la polimerasa de RNA o bien por una enzima denominada **primasa**. Ésta sintetiza un fragmento corto de RNA (de unos 30 pb de largo) complementario de un tramo específico del cromosoma. La cadena es alargada luego como DNA por la polimerasa de DNA. La primasa de *E. coli* forma un complejo con el DNA molde y otras proteínas adicionales, como DnaB, DnaT, Pri A, Pri B y Pri C. El complejo completo recibe el nombre de **primosoma** (véase Fig. 8-20).

Las cadenas adelantada y retrasada

Las polimerasas de DNA sintetizan cadenas nuevas sólo en dirección $5' \rightarrow 3'$ y, por tanto, dado el antiparalelismo de la molé-

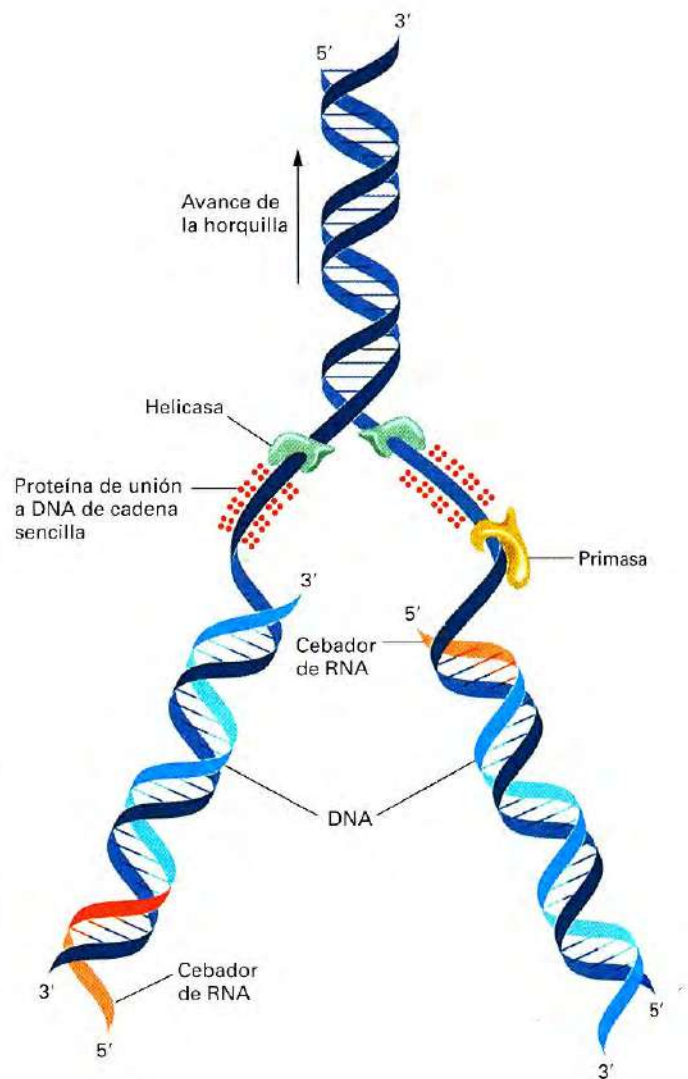


Figura 8-27. Iniciación de la síntesis de DNA mediante un cebador de RNA

cula de DNA, se desplazan *sobre la cadena molde* en la dirección $3' \rightarrow 5'$ de ésta. Como consecuencia de esta polaridad, mientras una de las cadenas nuevas, la **cadena adelantada**, se fabrica de forma continua, la otra, la **cadena retrasada**, debe fabricarse de forma discontinua, a pequeños trozos, como puede observarse en la Figura 8-28 (véase también la Fig. 8-20). La adición de nucleótidos a lo largo de la cadena molde de la cadena retrasada debe producirse hacia el extremo $5'$ de dicha cadena molde (porque la replicación *siempre* progresa a lo largo del molde en la dirección $3' \rightarrow 5'$ de éste, de manera que la cadena nueva crezca en dirección $5' \rightarrow 3'$). Así pues, la nueva cadena debe crecer en dirección opuesta al movimiento de la horquilla de replicación. Conforme el movimiento de la horquilla expone una nueva sección del molde de la cadena retrasada, se inicia un nuevo tramo de cadena retrasada que crece alejándose de la horquilla hasta que se para en el fragmento anterior. En *E. coli*, la pol III lleva a cabo la mayor parte de la síntesis de ambas cadenas del DNA, y la pol I rellena los huecos dejados en la cadena

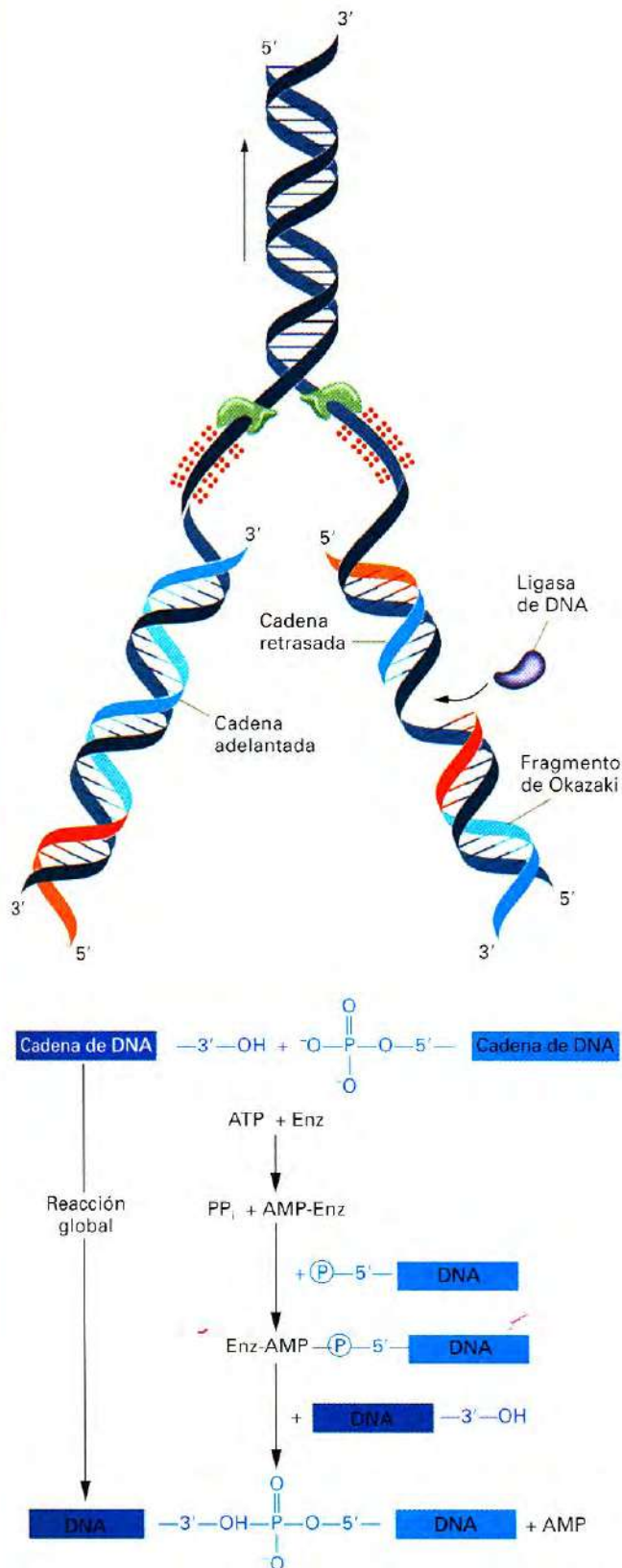


Figura 8-29. La reacción catalizada por la ligasa de DNA (Enz) une el extremo 3'-OH de un fragmento al extremo 5' fosfato del fragmento adyacente. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.^a ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

Figura 8-28. La síntesis de DNA se produce de forma continua en la cadena adelantada y discontinua en la cadena retrasada.

retrasada, que son luego sellados por la enzima **ligasa de DNA**. La ligasa de DNA une trozos sueltos de DNA catalizando la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' fosfato de un nucleótido emparejado a su complementario y un grupo 3' OH adyacente, como se muestra en la Figura 8-29. Es la única enzima capaz de sellar cadenas de DNA. La Figura 8-30 muestra la síntesis de la cadena retrasada y la reparación de huecos en detalle. Los cebadores necesarios para la síntesis discontinua de la cadena retrasada son fabricados por la primasa (paso «a»). Luego son alargados por la polimerasa de DNA (paso «b») apareciendo fragmentos de DNA que fueron detectados por primera vez por Reiji Okazaki y se denominan por ello **fragmentos de Okazaki**. La actividad exonucleasa 5' → 3' de la enzima pol I elimina los cebadores (paso «c»), y la misma enzima rellena con

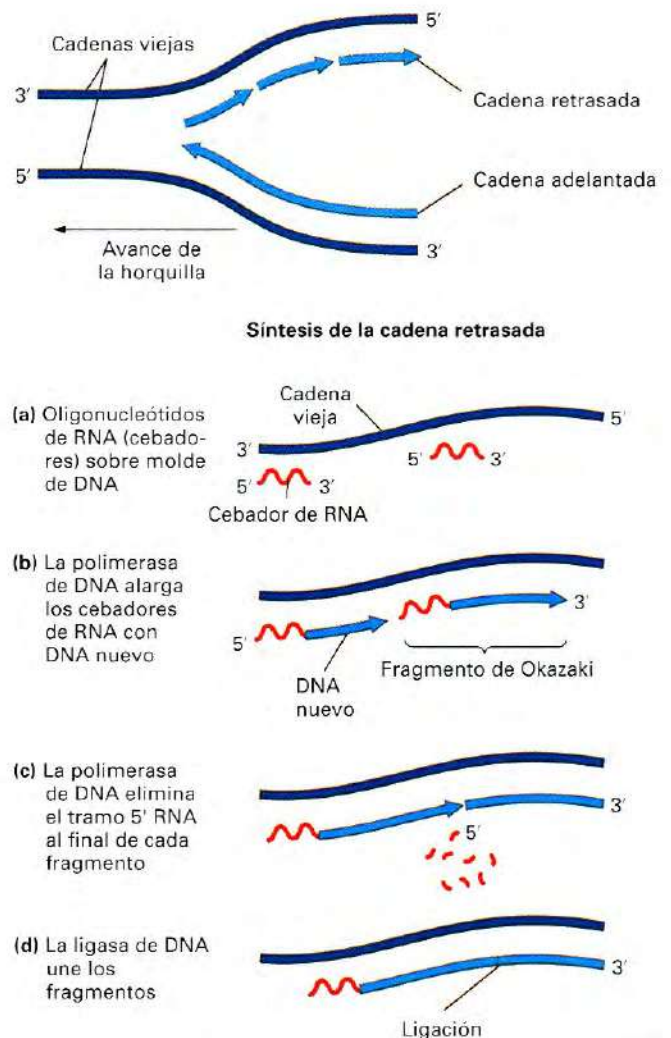


Figura 8-30. Esquema general de una horquilla de replicación (arriba) y pasos sucesivos de la síntesis de la cadena retrasada. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.^a ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

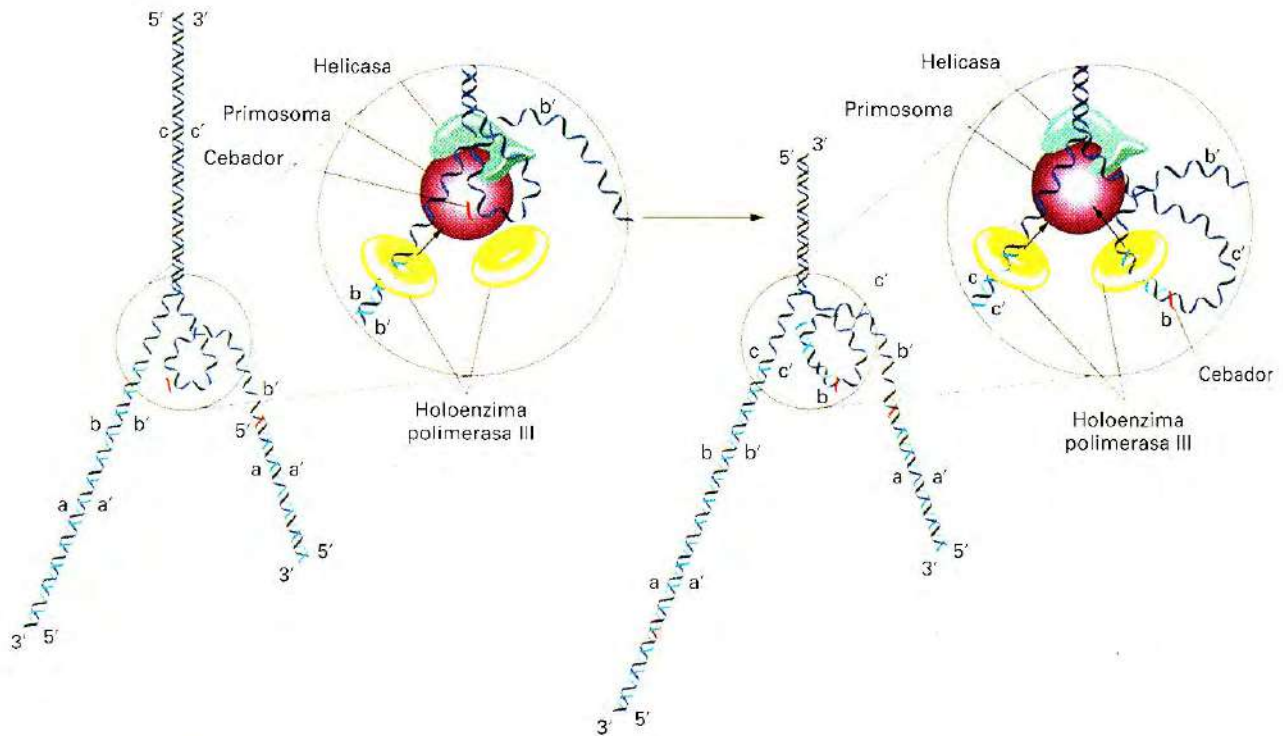


Figura 8-31. Un lazo en la cadena molde de la cadena retrasada permite que un dímero de la holoenzima polimerasa III se sitúe en la horquilla de replicación y fabrique las dos cadenas hermanas. (Cortesía de A. Kornberg. Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

DNA los huecos, que son sellados por la ligasa de DNA (paso «d»). La Figura 8-31 muestra un mecanismo propuesto para permitir que una misma molécula dimérica de la holoenzima participe en la síntesis tanto de la cadena adelantada como de la cadena retrasada. Dicho mecanismo propone la formación en la cadena molde de la cadena retrasada de un lazo que permite a un único dímero de la enzima pol III generar ambas cadenas hermanas. Tras avanzar unos 1000 pares de bases, la enzima pol III soltaría al segmento de doble cadena retrasada, dejando que se forme un nuevo lazo.

Replicación de los extremos de los cromosomas

Los extremos de los cromosomas crean un problema especial para el proceso de replicación. La Figura 8-32 presenta dicho problema. Considerando a la cadena adelantada, la extensión del polinucleótido durante la replicación puede llegar siempre al extremo sin problemas, ya que viene cebada desde atrás. La cadena retrasada, sin embargo, alcanza un punto en su extremo sobre el que su modo de cebar con RNA no puede actuar, queda un tramo sin polimerizar y se produciría un acortamiento del cromosoma. Para resolver este problema, los extremos de los cromosomas, llamados **telómeros**, contienen repeticiones en tándem de secuencias cortas de DNA. En el ciliado *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia repetida es TTGGGG; en humanos, es TTAGGG. Estas repeticiones no determinan un producto proteico o un RNA, sino que juegan un papel definido en la replicación. Una

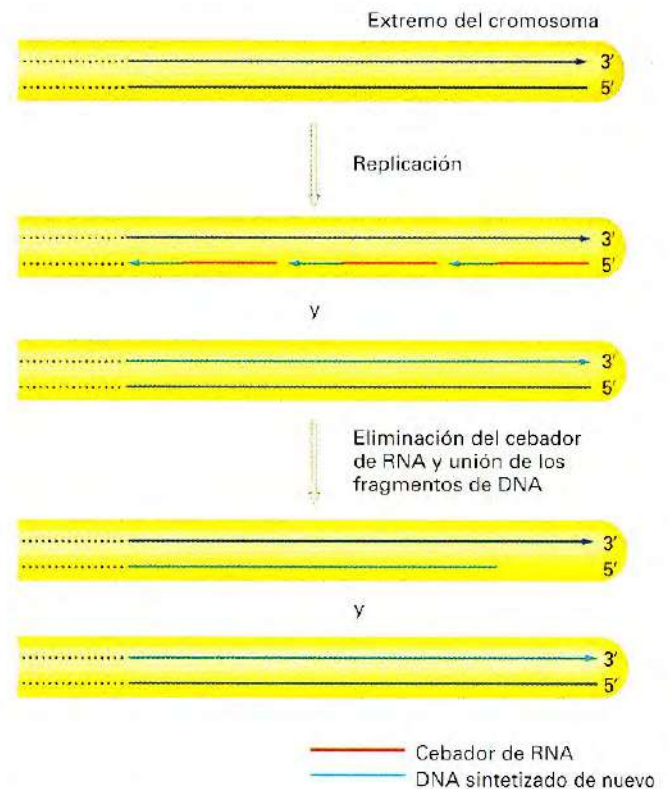


Figura 8-32. El problema de la replicación de los extremos de los cromosomas. No hay forma de «cebar» el último tramo de la cadena retrasada y el cromosoma se iría acortando.

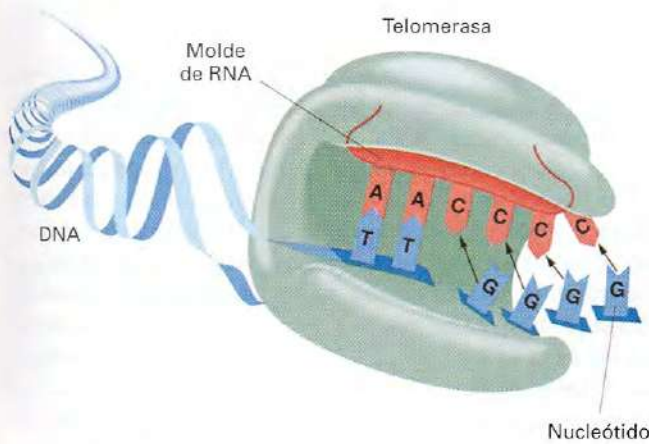


Figura 8-33. La telomerasa contiene una pequeña molécula de RNA que actúa como molde para la adición de una secuencia complementaria de DNA al extremo 3' de la hélice doble. En el ciliado *Tetrahymena*, la secuencia de DNA añadida es TTGGGG.

enzima llamada **telomerasa** añade esas secuencias cortas a los extremos de los cromosomas. La proteína telomerasa es un miembro de la clase de enzimas denominadas transcriptasas inversas, empleadas en situaciones especiales en las que se sintetiza DNA a partir de RNA. La telomerasa lleva una pequeña molécula de RNA, parte de la cual actúa como molde en la polimerización de la unidad telomérica repetida que se añade al extremo 3'. En *Tetrahymena*, por ejemplo, la secuencia en el RNA es 3'-AACCCC-5', que actúa como molde para la unidad telomérica repetida 5'-TTGGGG-3' (Fig. 8-33). El DNA adicional puede actuar entonces como molde para la síntesis de la cadena retrasada. Este proceso contrarresta la tendencia al acortamiento durante la replicación normal. La Figura 8-34 muestra las posiciones del DNA telomérico, reveladas mediante hibridación *in situ*. En varios tejidos somáticos humanos se ha demostrado acortamiento gradual con la edad de la longitud de los telómeros. Además, fibroblastos humanos en cultivo muestran un progresivo acortamiento telomérico hasta que finalmente mueren. Tales observaciones han llevado a la teoría telomérica del envejecimiento, cuya validez está siendo ahora sometida a comprobación.

Helicasas y topoisomerasas

Las **helicasas** son enzimas que rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas en la doble hélice a las dos cadenas del DNA. La reacción requiere hidrólisis de ATP. Entre las helicasas de *E. coli* se encuentran las proteínas DnaB y Rep. La proteína Rep parece ayudar a desenrollar la hélice por delante de la polimerasa (véase la Fig. 8-20). El DNA desenrollado es estabilizado por la proteína SSB (del inglés, *single-stranded binding*) que se une a DNA de cadena sencilla e impide la regeneración de la doble hélice.

La acción de las helicasas durante la replicación genera retorcimientos del DNA circular que deben ser eliminados para que continúe la replicación. El DNA circular puede sufrir enrollamientos y retorcimientos, como los que pueden introducirse en



Figura 8-34. Cromosomas híbridos *in situ* con una sonda de DNA específica de telómeros que ha sido acoplada a un compuesto que, al microscopio, emite fluorescencia en amarillo. La sonda se une a ambos extremos de cada cromátida hermana. En la parte inferior de la fotografía aparece un núcleo intacto. (Robert Moyzis.)

una gomilla. Los **superenrollamientos** son generados y eliminados por enzimas denominadas **topoisomerasas**, una de las cuales es la llamada girasa de DNA (Fig. 8-35). Las topoisomerasas pueden también generar (*concatenar*) o eliminar (*desconcatenar*) nudos o enlaces en una cadena. Hay dos tipos básicos de topoisomerasas. Las enzimas de tipo I provocan una incisión en una de las cadenas del DNA de doble cadena. Las enzimas de tipo II provocan la rotura de ambas cadenas. En *E. coli*, las enzimas topo I y topo III son ejemplos de enzimas de tipo I, mientras que la girasa es una enzima de tipo II.

El desenrollamiento de las cadenas de DNA para abrir la horquilla de replicación genera retorcimientos extras en otras regiones, y el superenrollamiento relaja la tensión de esos retorcimientos (Fig. 8-36). La girasa es necesaria para eliminar superenrollamientos positivos generados por delante de la horquilla de replicación.

Corrección mediante exonucleasa

Tanto la polimerasa de DNA I como la polimerasa de DNA III poseen una actividad exonucleasa 3' → 5' que funciona como «lectora» y «correctora de pruebas», detectando apareamientos incorrectos que se hayan introducido erróneamente durante la

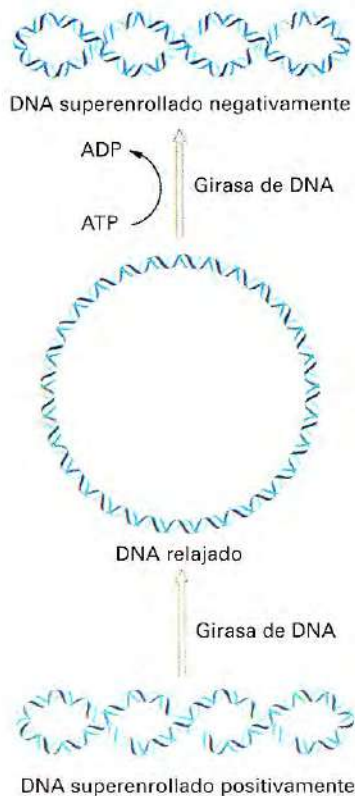


Figura 8-35. Superenrollamiento catalizado por la girasa de DNA. La replicación del DNA genera superenrollamientos «positivos», que aparecen en la parte inferior del dibujo, debidos a la rotación rápida del DNA en la horquilla de replicación. La girasa abre y cierra enlaces fosfodiésteres, relajando así el superenrollamiento, tal como aparece aquí (DNA relajado). La girasa también puede generar superenrollamientos en la dirección contraria, llamados superenrollamientos *negativos*; estos últimos facilitan la disociación de la doble hélice. (Según L. Stryer, *Biochemistry*, 4.^a ed., Copyright © 1995, de Lubert Stryer.)

polimerización y eliminándolos. La actividad correctora de la enzima pol III se localiza en la subunidad ϵ , que debe estar unida a la subunidad α para realizar su función correctora con máxima eficacia (Fig. 8-37). Las estirpes que carecen de una subunidad ϵ activa muestran una mayor tasa de mutación (véase Cap. 16). La Figura 8-38 muestra la eliminación de un residuo de citosina que ha sido emparejado erróneamente con una adenina. Como puede observarse, la hidrólisis se produce en el extremo 5' de la base mal apareada; la eliminación de una base incorrecta deja el grupo 3'-OH de la base precedente, sobre el que puede ahora conti-

nuar libremente el crecimiento de la cadena, aceptando el nucleósido trifosfatado correcto (timidina, en este caso).

Observe que esta actividad exonucleasa se produce sobre el extremo 3' de la cadena en crecimiento (es, por tanto, 3' $\rightarrow$ 5'). La necesaria coordinación de la actividad exonucleasa con la elongación de la cadena ayuda a explicar por qué la replicación va en dirección 5' $\rightarrow$ 3'. Como vimos anteriormente, las nuevas bases se añaden cuando el grupo 3' OH de la última desoxirribosa de la cadena en crecimiento ataca al fosfato de alta energía del nucleósido trifosfatado que va a ser añadido (véase Figura 8-21). Así se produce el crecimiento 5' $\rightarrow$ 3'. Es concebible que la replicación fuera en dirección 3' $\rightarrow$ 5' (en la Fig. 8-21, el trifosfato 5' de la parte inferior sería la última base de la cadena, y el 3' OH que lo atacaría sería el del nucleósido trifosfatado a ser añadido a la cadena). Sin embargo, si la replicación fuera en esta dirección, las escisiones de la exonucleasa deberían producirse sobre el extremo 5' de la cadena. Cuando fuera eliminada una base mal apareada, quedaría un grupo 5' OH al final de la cadena en crecimiento. El grupo 3' OH del nuevo nucleósido trifosfatado que debiera incorporarse ahora se encontraría con ese grupo 5' OH, en vez de con el 5' trifosfato de alta energía necesario para la formación del enlace. Éste no se formaría y la elongación de la cadena se pararía. Por eso la replicación no va en dirección 3' $\rightarrow$ 5'.

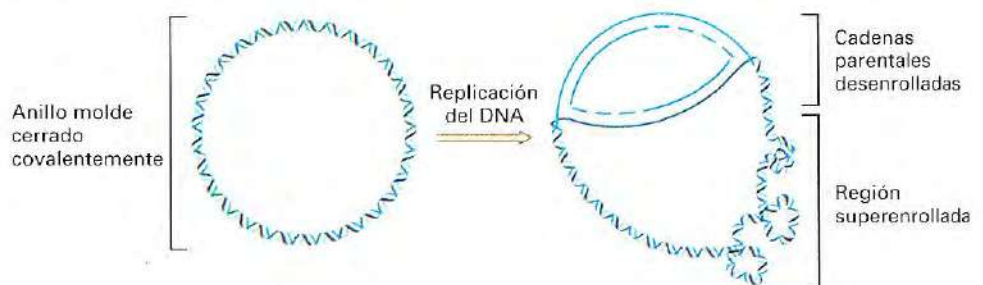
Polimerasas de DNA eucarióticas

En eucariotas superiores se encuentran al menos cinco polimerasas de DNA, α , β , γ , δ y ϵ . Las polimerasas del núcleo α y δ ejercen papeles similares a la pol I de *E. coli*. La polimerasa β actúa en la reparación del DNA y en el relleno de huecos. La polimerasa γ se encuentra en las mitocondrias y parece tomar parte en la replicación del DNA mitocondrial.

Aplicaciones experimentales de la complementariedad entre secuencias de bases

En 1960, Paul Doty y Julius Marmur observaron que al calentar el DNA a 100 °C se deshacen todos los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas complementarias, y el DNA pasa a ser de cadena sencilla (Fig. 8-39). Si la solución se enfría lentamente, vuelve formarse DNA de cadena doble. Este proceso de **reaso-ciación** ocurre cuando dos cadenas colisionan de tal manera que las secuencias de bases complementarias se alinean y reconstituyen la hélice doble original. Como se muestra en la Figura 8-39, la reasociación de cadenas complementarias es muy específica, y ello constituye la base de muchas técnicas importantes en Bio-

Figura 8-36. Acción giratoria de la topoisomerasa durante la replicación. Por delante de la horquilla de replicación se van acumulando retorcimientos (superenrollamientos positivos) conforme se van separando las dos cadenas. Para eliminarlos, se necesita una topoisomerasa que actúa como un girador (a modo de cojinete), que permite una replicación continuada. (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.^a ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)



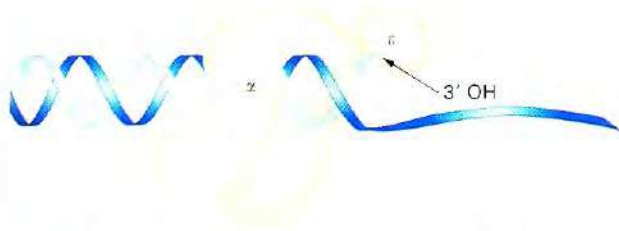


Figura 8-37. Corrección de pruebas del complejo pol III α - ϵ . (Tomado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.^a ed. Copyright © 1992 de W. H. Freeman and Company.)

logía molecular, tales como la identificación de tramos específicos de DNA mediante hibridación y el aislamiento de fragmentos concretos de DNA empleados en clonación, como se explica en el Capítulo 12. La Figura 8-40a muestra un perfil cinético típico de la disociación del DNA con el aumento de la temperatura. A una temperatura característica de cada tipo de DNA, éste empieza a «desnaturalizarse». Se define la temperatura de fusión, T_m , como la temperatura a la que la mitad de las moléculas están desnaturalizadas en cadenas sencillas. La temperatura de fusión depende de la proporción de pares G:C, porque tales pares de bases establecen tres puentes de hidrógeno, mientras que los pares A:T se mantienen unidos por dos puentes de hidrógeno. Como aparece en la Figura 8-40b, cuanto mayor es la proporción de pares G:C, mayor es la temperatura de fusión.

El descubrimiento de Doty y Marmur de que, en solución, cadenas sencillas separadas de una hélice doble se enlazan unas con otras, debido al emparejamiento complementario de sus bases, llevó a diversas aplicaciones experimentales que han tenido un efecto enorme en la investigación en Genética molecular.

1. **Análisis de la estructura genómica.** Si se disocia DNA genómico total y luego se le deja renaturalizar, se observan

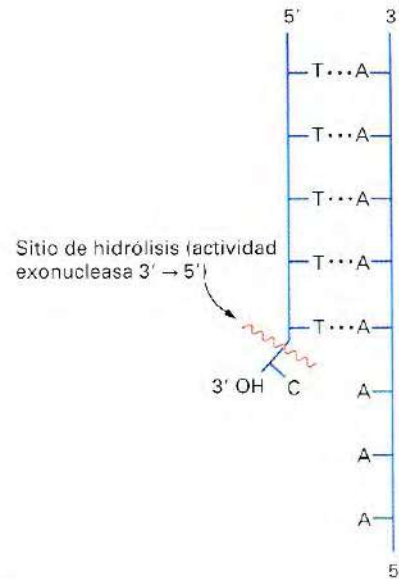


Figura 8-38. Acción exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de la polimerasa III.

distintas fases en el proceso de reasociación. Hay una fase inicial de reasociación muy rápida. Esta fase corresponde al DNA muy repetido, porque existen muchas copias por genoma de ese DNA. Estas copias se encuentran unas a otras con más rapidez que los genes únicos, presentes en una sola copia por genoma haploide. Las fracciones que luego van reasociándose progresivamente contienen DNA cada vez menos repetido, reasociándose al final las secuencias únicas. Este comportamiento permitió a los científicos aislar y caracterizar las distintas clases de DNA repetido. Tal caracterización permitió, a su vez, caracterizar de forma general genomas de organismos de la mayoría de los grupos taxonó-

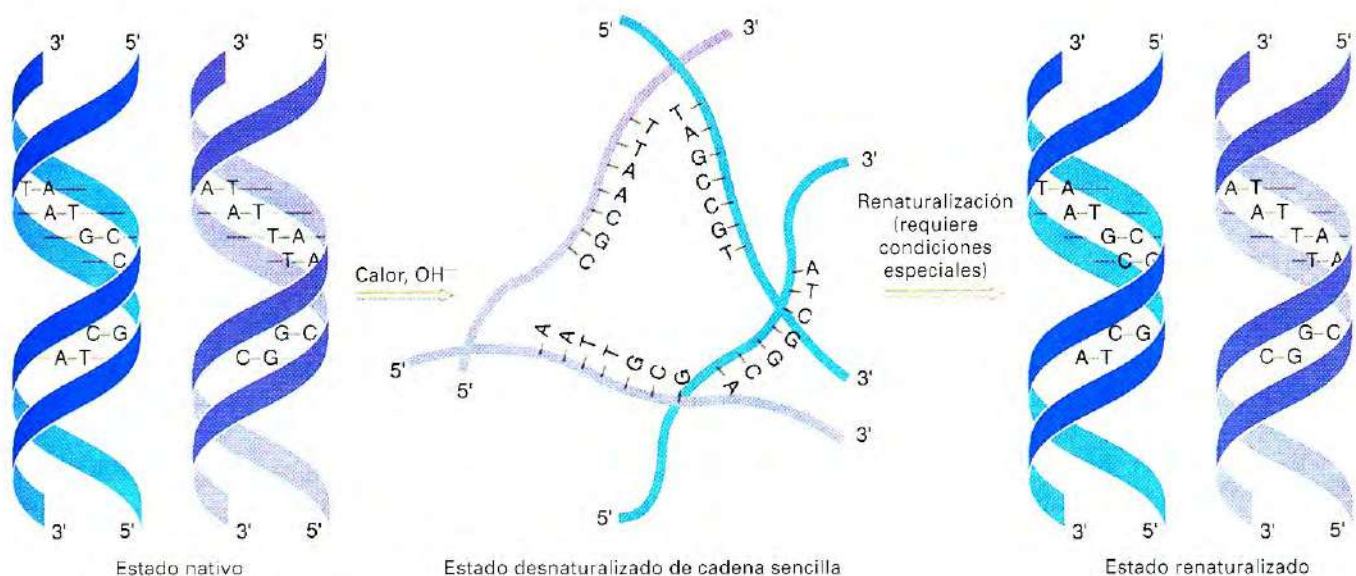


Figura 8-39. Desnaturalización y renaturalización de moléculas de DNA de doble cadena.

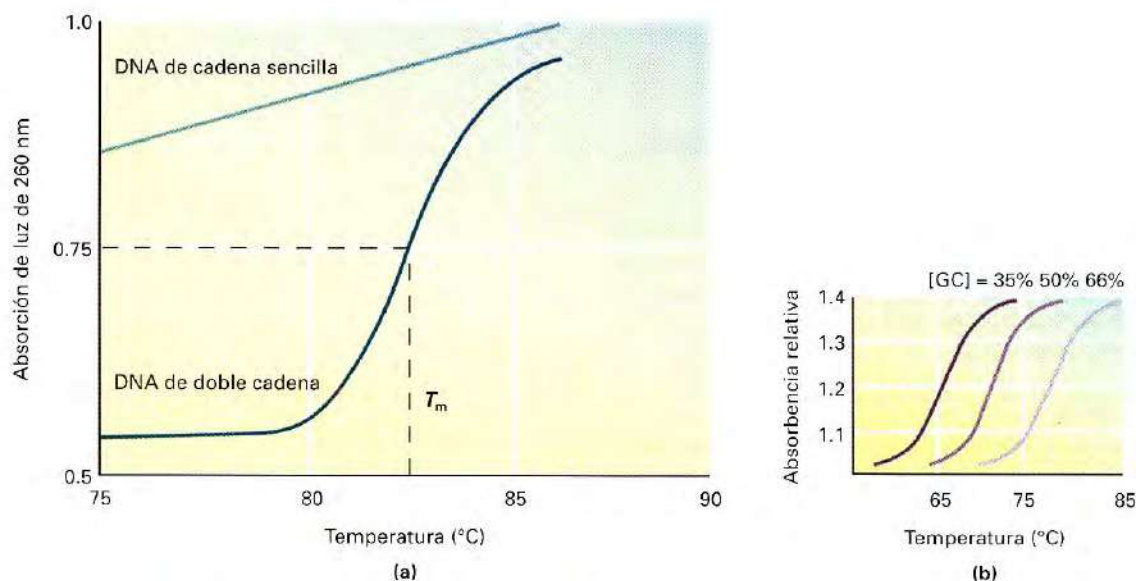


Figura 8-40. (a) Absorción de luz ultravioleta (longitud de onda de 260 nm) de soluciones de DNA de cadena sencilla y de doble cadena. Conforme se van disociando tramos de DNA de doble cadena, la absorción de esos tramos aumenta casi dos veces. La temperatura a la que la mitad de las bases del DNA de doble cadena se han desnaturalizado se denomina T_m . (b) Curvas de desnaturalización de DNA. Se representa la absorbencia relativa a la de 25 °C frente a la temperatura. (La longitud de onda de la luz incidente era de 260 nm.) La T_m del DNA de *E. coli* es 69 °C (50 % de pares GC) y 76 °C la del DNA de *Pseudomonas aeruginosa* (68 % de pares GC). (Parte «b» tomada de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © de Lubert Stryer.)

micos, ofreciendo otra estrategia de comparación evolutiva al nivel genético.

2. **Aislamiento de genes.** Muchos de los métodos para aislar genes (clonación de genes, véase Cap. 12) están basados en la hibridación de DNA por complementariedad de bases. El método más común aprovecha un fragmento de DNA desnaturalizado radiactivo, que se emplea como sonda para encontrar un clon con un gen concreto de interés en una mezcla de clones representativa de todo el genoma.
3. **Técnicas de hibridación de Southern y Northern.** Vimos en el Capítulo 1 que puede emplearse una sonda desnaturalizada radiactiva para identificar fragmentos genómicos concretos en una mezcla fraccionada en un gel de electroforesis (técnica de hibridación de Southern); con una técnica paralela, podemos detectar transcritos de RNA específicos en un gel de electroforesis (técnica de hibridación Northern). Dado al poder de resolución de estas técnicas, hoy día forman parte del repertorio metodológico empleado diariamente por genetistas de todo el mundo.
4. **Cartografía cromosómica.** La hibridación con sondas ha permitido la identificación de *marcadores de DNA* en posiciones cromosómicas concretas. [Un tipo de marcador de

DNA es el polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP); véase el Cap. 13]. Los marcadores de DNA han aportado muchos miles de nuevos loci con los que saturar el mapa cromosómico. Además, algunos de ellos son marcadores ligados a alelos de enfermedades hereditarias humanas, permitiendo su diagnóstico. En una técnica relacionada, puede añadirse una sonda marcada a DNA parcialmente desnaturalizado y todavía en forma de cromosoma para revelar la posición cromosómica del DNA homólogo a dicha sonda (hibridación *in situ*, véase el Cap. 14).

Vemos, por tanto, que la estructura del DNA ofrece no sólo dos propiedades críticas para su función biológica (replicación y depósito de información), sino también técnicas que resultan claves para la disección genética de los organismos y sus células.

COROLARIO

La especificidad de la complementariedad de las bases constituye el fundamento de la continuidad de la vida, vía replicación del DNA, y el fundamento del flujo de información del DNA a la proteína: determinante principal de la forma biológica. Esa misma especificidad es empleada por los genetistas como instrumento para investigar la estructura y función génica y genómica.

RESUMEN

El trabajo experimental sobre la naturaleza molecular del material hereditario ha demostrado de forma concluyente que el material genético es DNA (no proteína, RNA u otra sustancia). Em-

pleando datos obtenidos por otros investigadores, Watson y Crick propusieron un modelo de hélice doble, con dos cadenas enrolladas entre sí y que corren de forma antiparalela. La especi-

Acididad de la unión de las dos cadenas está basada en el acoplamiento entre adenina (A) y timina (T) y entre guanina (G) y citosina (C). El primer par de bases se mantiene mediante dos puentes de hidrógeno, el segundo mediante tres.

El modelo de Watson y Crick descubre cómo el DNA puede replicarse en forma ordenada, un requerimiento esencial del material genético. La replicación se lleva a cabo de forma semiconservativa tanto en procariotas como en eucariotas. Una hélice doble es replicada en dos hélices idénticas, con la misma secuencia lineal de nucleótidos; cada una de las dos hélices dobles nuevas está formada por una cadena de DNA vieja y otra polimerizada de nuevo.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

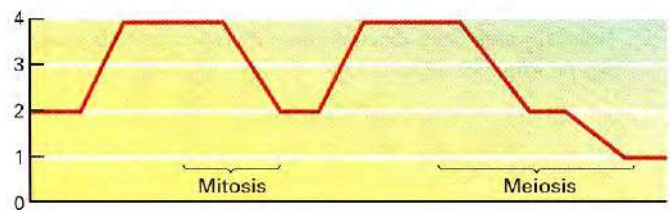
La replicación se lleva a cabo con la ayuda de varias enzimas, incluyendo polimerasa de DNA, girasa y helicasa. Se inicia en sitios especiales denominados orígenes de replicación y progresa a lo largo del DNA en ambas direcciones. Como la polimerasa de DNA actúa sólo en dirección $5' \rightarrow 3'$, una de las cadenas nuevas de cada horquilla de replicación debe ser fabricada a trozos cortos que son unidos luego por la ligasa de DNA. La polimerización del DNA no puede iniciarse sin un pequeño cebador de doble cadena que es también fabricado por enzimas especiales.

hélice doble de DNA / nucleótidos / puentes de hidrógeno / semiconservativa / $5'$ / replicación / cromátida / mitosis / polimerasa de DNA / meiosis / fase S / gen / $3'$

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULOS

La mitosis y la meiosis se presentaron en el Capítulo 3. Teniendo en cuenta lo tratado en este capítulo sobre replicación de DNA, dibuje una gráfica que muestre el cambio con el tiempo del contenido en DNA de una célula que sufre mitosis y luego meiosis. Asuma que la célula es diploide.

♦ Solución ♦



PROBLEMAS RESUELTOS

- Si una molécula de DNA contiene un 56 % de GC, ¿cuáles serán los porcentajes de cada una de las cuatro bases (A, T, G y C) de esa molécula?

♦ Solución ♦

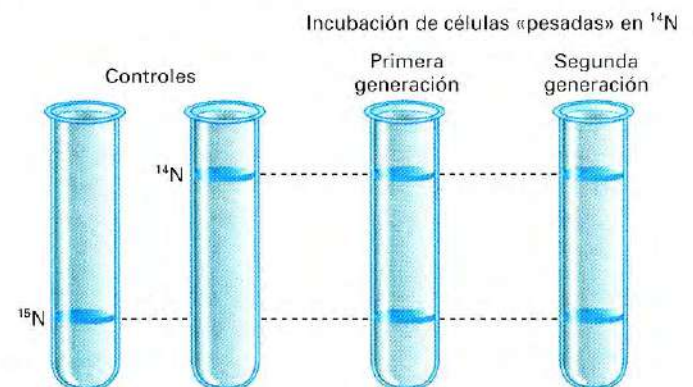
Si el contenido en GC es del 56 %, como $G = C$, el contenido de G es del 28 % y el de C del 28 %. El contenido de AT es $100 - 56 = 44$ %. Como $A = T$, el contenido de A es del 22 %, y el de T del 22 %.

- Describe el patrón de bandas esperado en el gradiente de CsCl del experimento de Meselson-Stahl en caso de replicación conservativa. Haga un dibujo.

♦ Solución ♦

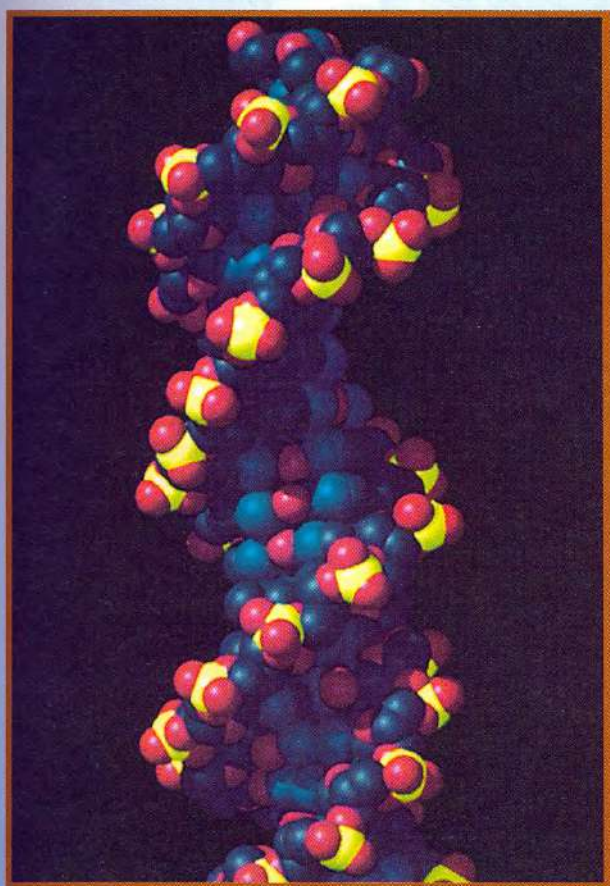
Vea la Figura 8-13 para una explicación adicional. Si la replicación fuera conservativa, y la bacteria es cultivada en presencia de ^{15}N y luego en ^{14}N , después de la replicación, una molécula de DNA será toda ella de ^{15}N y la otra toda de ^{14}N , apareciendo en

el gradiente una banda pesada y otra ligera. Después de la segunda generación, el DNA ^{15}N producirá una molécula hecha toda ella de ^{15}N y otra hecha toda ella de ^{14}N , mientras que la molécula hecha de ^{14}N producirá sólo DNA hecho de ^{14}N . Por tanto, de nuevo se generan dos tipos de DNA, uno hecho sólo de ^{15}N y otro sólo de ^{14}N , apareciendo de nuevo una banda pesada y otra ligera:



10

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FUNCIÓN GÉNICA



Modelo simulado por ordenador de la molécula de DNA.

(J. Newdol, Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco. Copyright © Regents, University of California.)

Ideas fundamentales

El DNA se transcribe en una molécula de mRNA, que posteriormente se traduce durante el proceso de síntesis proteica.

La traducción requiere moléculas de RNA transferentes y ribosomas.

El código genético consiste en un código de tripletes no solapados.

Existen secuencias específicas que marcan las posiciones donde debe comenzar y terminar la transcripción y la traducción.

En los eucariotas, el transcrito primario se procesa de diversas maneras antes de convertirse en mRNA.

Muchos genes eucarióticos contienen segmentos de DNA, denominados intrones, que interrumpen la secuencia informativa del gen.

Para eliminar los intrones y producir el mRNA final, el transcrito primario eucariótico sufre un proceso de corte y empalme.

El objetivo de este capítulo es analizar cómo la información genética se traduce en la aparición de macromoléculas funcionales. Los productos iniciales de todos los genes son los ácidos ribonucleicos (RNA). El RNA es similar al DNA, excepto que el azúcar en el RNA es la ribosa y el uracilo sustituye a la timina. El RNA se sintetiza mediante un proceso que copia la secuencia nucleotídica del DNA. Puesto que este proceso recuerda a la transcripción o copia de palabras escritas, el proceso de síntesis de RNA se conoce como **transcripción**, y el producto así obtenido se denomina **transcrito**. Veremos en este capítulo que uno de los primeros indicios sobre cómo el DNA dirige la síntesis de proteínas se obtuvo de experimentos realizados con bacteriófagos, a partir de los cuales se demostró que la expresión génica resultaba en la transcripción de moléculas de RNA a partir del DNA molde. La transcripción es catalizada por una enzima, la polimerasa de RNA, siguiendo unas normas muy similares a las que gobiernan la replicación.

Existen varias clases de RNA que analizaremos en este capítulo. Los *RNA informativos* son intermediarios en el proceso de decodificación de los genes a cadenas polipeptídicas. El RNA informativo a partir del cual se sintetizan directamente las proteínas es el **RNA mensajero (mRNA)**. En los procariotas, el transcrito, tal como es sintetizado a partir del DNA (el transcrito primario), es el mRNA. En los eucariotas, sin embargo, el transcrito primario sufre un procesamiento que consiste en la modificación de los extremos 5' y 3', y la eliminación de fragmentos (intrones) del transcrito primario. El resultado final de este procesamiento del pre-mRNA es el mRNA. Más adelante en este capítulo, analizaremos con más detalle estos pasos en la producción del mRNA. La secuencia de nucleótidos del mRNA se convierte en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica por un proceso denominado **traducción**.

Los *RNA funcionales* nunca se traducen en polipéptidos. Ejercen su acción en forma de RNA y desempeñan varias funciones diferentes. En todos los organismos se han encontrado dos clases. Las moléculas de **RNA transferente (tRNA)** transportan los aminoácidos al mRNA durante la síntesis proteica. Los tRNA son componentes generales de la maquinaria de traducción. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** se asocian a un conjunto de proteínas diferentes para formar los ribosomas, que son las «máquinas» encargadas de la síntesis proteica. Existen otras dos clases de RNA funcionales que están implicados en el procesamiento de la información y son específicos de eucariotas. Los **RNA nucleares pequeños (snRNA)** participan en el procesamiento en el núcleo de los transcritos primarios a RNA mensajeros. Varias proteínas específicas se combinan con los snRNA y forman pequeñas partículas ribonucleoproteicas (**snRNP**) que sirven de «plataforma» para las reacciones de corte y empalme. Los **RNA citoplásmicos pequeños (scRNA)** están involucrados en el transporte de proteínas dentro de las células eucarióticas. En concreto, se encargan de asegurar que polipéptidos destinados, por ejemplo, a ser secretados, se inserten en el compartimiento celular adecuado (el retículo endoplásmico rugoso). Así comienza el proceso de secreción proteica.

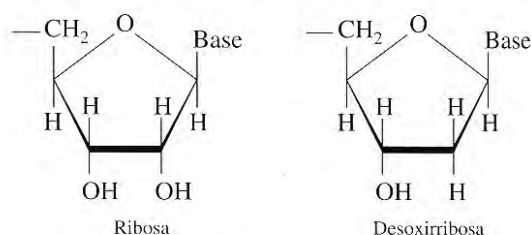
Cualquier función del DNA y del RNA se basa en dos principios fundamentales:

1. Las bases complementarias de las cadenas nucleotídicas individuales pueden establecer puentes de hidrógeno y formar así estructuras de cadena doble.
2. Secuencias nucleotídicas concretas de los ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble pueden ser reconocidas por proteínas específicas que se unen a los ácidos nucleicos. En los siguientes apartados puede verse aplicado este principio.

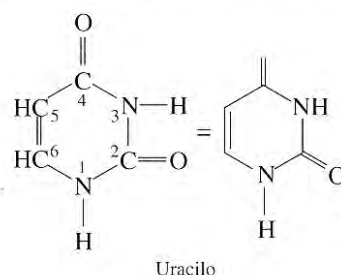
Propiedades del RNA

Aunque tanto el RNA como el DNA son ácidos nucleicos, el RNA difiere en varios aspectos fundamentales:

1. EL RNA suele estar constituido por una sola cadena de nucleótidos, no es una hélice doble. Como consecuencia, el RNA puede adoptar una gama mucho mayor de estructuras tridimensionales complejas que el DNA de cadena doble. Consideraremos esta propiedad con más detalle posteriormente en este capítulo.
2. El RNA tiene el azúcar **ribosa** en sus nucleótidos, en vez de una desoxirribosa. Como sus nombres indican, los dos azúcares difieren en la presencia o ausencia de un átomo de oxígeno. Igual que las cadenas individuales del DNA, el RNA presenta un esqueleto de fosfato-ribosa, en el que cada base se une covalentemente a la posición 1' de cada ribosa.



3. Los nucleótidos del RNA pueden tener las bases adenina, guanina y citosina, pero la base pirimidínica **uracilo (U)** sustituye a la timina. No obstante, el uracilo establece puentes de hidrógeno con la adenina, igual que lo hace la timina.



Transcripción

Los primeros investigadores del tema tenían motivos justificados para pensar que la información no se transfiere directamente del DNA a las proteínas. En una célula eucariótica, el DNA se encuentra en el núcleo, mientras que las proteínas se sintetizan en el citoplasma. La necesidad de un intermediario es obvia.

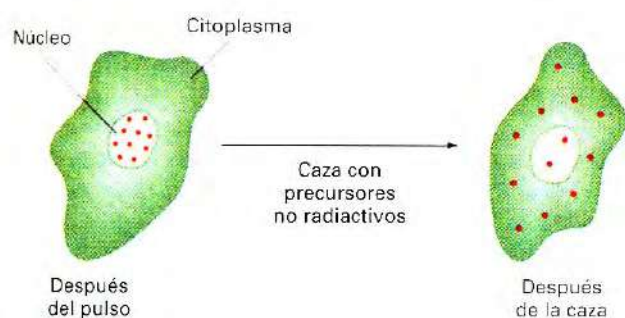


Figura 10-1. El RNA sintetizado durante un breve período de tiempo se marca, suministrando a la célula un «pulso» de precursores radiactivos del RNA, seguido de una «caza» con precursores no radiactivos. En una autorradiografía, el RNA marcado aparece como granos oscuros. Los resultados sugieren que el RNA se sintetiza en el núcleo y luego se transporta al citoplasma.

Experimentos pioneros que sugirieron la existencia de un RNA intermediario

Si se suministran precursores radioactivos a las células, donde primero se observa el RNA es en el núcleo, lo que indica que es ahí donde se sintetiza el RNA. En un experimento de **pulso y caza**, los precursores del RNA marcados se suministran en forma de un pulso breve. Una vez que estos precursores se han incorporado al RNA, las células se transfieren a un medio con precursores no marcados. De este modo se puede «cazar o perseguir» la marca incorporada en el RNA, ya que a medida que este RNA se degrada, la síntesis de nuevas moléculas de RNA ocurre a partir de los precursores no marcados. Los experimentos de pulso y caza nos permiten seguir la evolución temporal de una población de moléculas de RNA que han sido sintetizadas casi simultáneamente. En muestras tomadas después de la caza, el RNA marcado se encuentra en el citoplasma (Fig. 10-1). Parece, entonces, que el RNA se sintetiza en el núcleo y se traslada posteriormente al citoplasma, donde se sintetizan las proteínas. Por ello, el RNA es un buen candidato a servir de intermediario en la transferencia de información entre el DNA y las proteínas.

En 1957, Elliot Volkin y Lawrence Astrachan realizaron una observación significativa. Encontraron que uno de los cambios

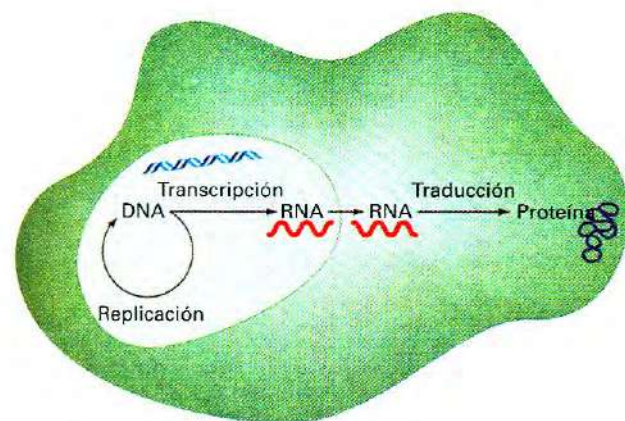


Figura 10-2. Los tres procesos de flujo de información: replicación, transcripción y traducción.

moleculares más sorprendentes que ocurren cuando *E. coli* es infectada con el fago T2 es un aumento repentino en la síntesis de RNA. Además, el RNA cuya síntesis se induce por el fago tiene una vida media muy corta, como se demuestra en el siguiente experimento. Primero, las bacterias infectadas se someten a un pulso con uracilo radiactivo (un precursor específico del RNA); luego, las bacterias se someten a una caza con uracilo no marcado. El RNA recuperado poco después del pulso se encuentra marcado, pero el recuperado algo después de la caza no está marcado, lo que indica que el RNA tiene una vida media muy corta. Finalmente, cuando se compara el contenido nucleotídico del RNA inducido por el fago se observa que este RNA es muy parecido al DNA del fago.

La conclusión más tentativa de los dos experimentos descritos es que el RNA se sintetiza a partir del DNA y, de algún modo, se utiliza para sintetizar proteínas. Podemos ahora definir tres etapas en el flujo de información (Fig. 10-2): *replicación* (la síntesis de DNA), *transcripción* (la copia a RNA de una parte del DNA) y *traducción* (la síntesis de un polipéptido dictada por la secuencia del RNA).

Complementariedad y asimetría en la síntesis de RNA

El parecido entre el RNA y el DNA sugería que la transcripción podría estar basada en la complementariedad entre bases, en la que también se fundamenta la replicación del DNA. La enzima

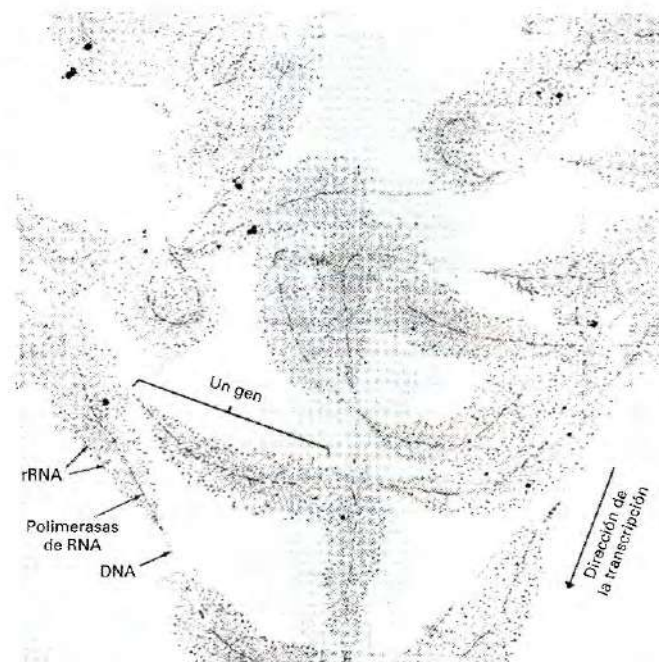


Figura 10-3. Transcripción en el nucléolo de *Triturus viridescens* (un anfibio) de los genes repetidos en tándem que determinan el RNA ribosómico (rRNA). (El rRNA es un componente del ribosoma). A lo largo de cada gen se encuentran unidas muchas moléculas de polimerasa de RNA transcribiendo en una dirección. Las moléculas de RNA en crecimiento tienen aspecto de fibras que emanan del esqueleto de DNA. Las moléculas de RNA más cortas se encuentran más cerca del sitio de inicio de la transcripción; las más largas casi han completado el proceso. De ahí, el aspecto de «árbol de Navidad». (Fotografía de O. L. Miller Jr. y Barbara A. Hamkalo.)

encargada de la transcripción, la polimerasa de RNA, podría realizar la transcripción a partir de la cadena molde de forma bastante similar a como se lleva a cabo la replicación.

De hecho, este modelo para la transcripción puede confirmarse citológicamente (Fig. 10-3). También se demuestra que la síntesis del RNA utiliza el DNA como molde, ya que, en presencia de DNA y polimerasa de RNA purificada, puede producirse RNA *in vitro* a partir de nucleótidos. Cualquiera que sea la fuente de DNA utilizada, el RNA sintetizado presenta una relación $(A + U)/(G + C)$ similar a la relación $(A + T)/(G + C)$ del DNA (Cuadro 10-1). Este experimento no indica si el RNA se sintetiza a partir de ambas cadenas o sólo de una, pero refleja que la frecuencia lineal de los pares A—T (en comparación con los pares G—C) en el DNA se corresponde con la abundancia relativa de (A + U) en el RNA. (Estas nociones pueden resultar difíciles de captar sin la ayuda de esquemas; el problema 2 de este capítulo debería ayudar a su comprensión).

Para comprobar si existe complementariedad entre el DNA y el RNA, los investigadores pueden hacer uso de la especificidad y precisión de la hibridación entre ácidos nucleicos. El DNA se desnaturaliza y se mezcla con el RNA sintetizado en su presencia. Cuando la preparación se enfría lentamente, algunas de las cadenas de RNA se asocian con el DNA complementario dando lugar a un híbrido DNA-RNA. El híbrido DNA-RNA tiene una densidad diferente a la de la doble hélice DNA-DNA, por lo que su presencia puede detectarse por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los ácidos nucleicos sólo se asocian si existen tramos suficientemente largos de complementariedad entre las bases, de manera que la aparición de un híbrido DNA-RNA demuestra que la secuencia del transcrito es complementaria a la del DNA parental.

¿Es posible determinar si el RNA se sintetiza a partir de una sola o de ambas cadenas del DNA? Parece razonable que se utilice una sola cadena, porque la transcripción de ambas cadenas produciría dos moléculas de RNA complementarias a partir del mismo tramo de DNA, y dos proteínas diferentes (con secuencias aminoacídicas distintas). De hecho, existen una variedad de pruebas químicas que demuestran que la transcripción suele utilizar una sola de las cadenas de DNA (aunque no necesariamente la misma cadena a lo largo de todo el cromosoma).

Los experimentos de hibridación también nos permiten contestar a dicha pregunta. Si las dos cadenas presentan una relación purinas:pirimidinas suficientemente diferente, pueden separarse en un gradiente de cloruro de cesio porque tienen densidades distintas. El RNA sintetizado a partir de un tramo de DNA puede ser purificado y mezclado por separado con cada una de las ca-

denas para determinar si es complementario a una sola de las cadenas. J. Marmur y colaboradores separaron las cadenas de DNA del fago SP8 de *Bacillus subtilis* de la siguiente manera. Desnaturalizaron el DNA, lo enfriaron rápidamente para impedir la reasociación y separaron las cadenas en CsCl. Así, demostraron que el RNA de SP8 hibrida con una sola de las cadenas y que, por consiguiente, la transcripción es **asimétrica**, es decir, ocurre a partir de una sola de las cadenas.

Aunque, para cada gen, el RNA se transcribe a partir de una sola cadena, la misma cadena no se utiliza necesariamente como molde a lo largo de todo el cromosoma o en las diferentes etapas del ciclo de vida. El RNA sintetizado en diferentes momentos del ciclo de infección de un fago hibrida con diferentes segmentos del cromosoma, indicando que hay una expresión diferencial de genes a lo largo del ciclo (Fig. 10-4). En el fago λ , cada una de las cadenas de DNA se transcribe parcialmente en diferentes momentos del ciclo. En el fago T7, sin embargo, la misma cadena se utiliza para transcribir los genes tempranos y tardíos. La Figura 10-5 muestra una secuencia de RNA sintetizada a partir

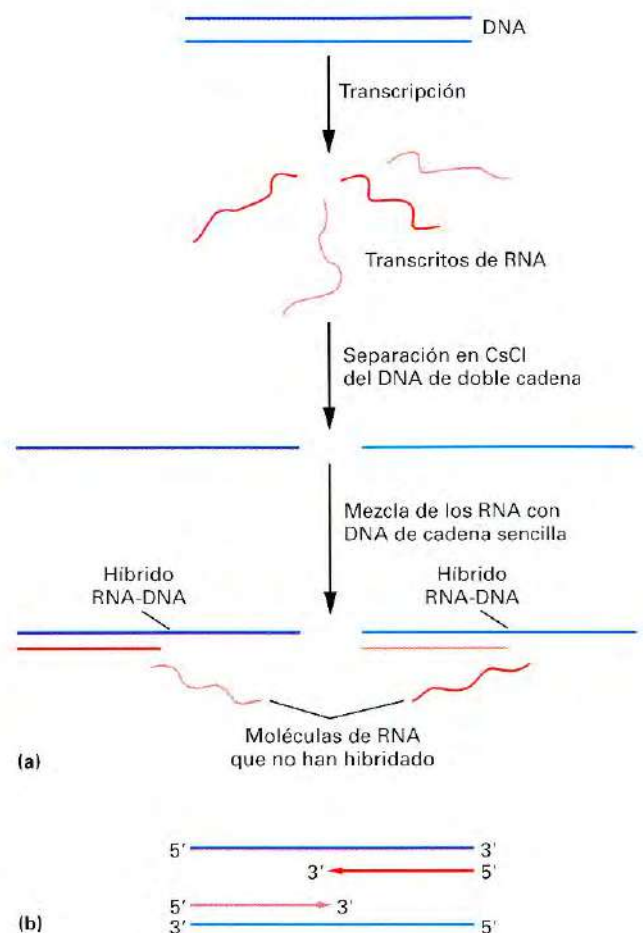


Figura 10-4. (a) Los experimentos de hibridación DNA-RNA demuestran que cada transcrito de RNA es complementario a sólo una de las dos cadenas del DNA parental. En este ejemplo, ambas cadenas de DNA se transcriben, pero la transcripción es asimétrica, es decir, en una región concreta sólo se transcribe una de las cadenas. (b) Mapa de este genoma hipotético que muestra la dirección de la transcripción de los dos transcritos de cadenas opuestas de DNA.

CUADRO 10-1. Proporción de nucleótidos de distintos DNA y de sus transcritos (*in vitro*)

Origen del DNA	$\frac{(A + T)}{(G + C)}$ del DNA	$\frac{(A + U)}{(G + C)}$ del RNA
Fago T2	1.84	1.86
Vaca	1.35	1.40
<i>Micrococcus</i> (bacteria)	0.39	0.49

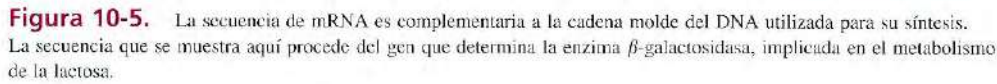


Figura 10-6. Transcripción de dos genes. (a) La polimerasa de RNA se mueve desde el extremo 3' de la cadena molde, generando una cadena de RNA que crece en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' (ya que debe ser antiparalela a la cadena molde). Observe que algunos genes se transcriben a partir de una cadena del DNA y otros a partir de la cadena complementaria. (b) Se está añadiendo un uracilo al extremo 3' del transcrito del gen 1, así que crece en la dirección 5' $\rightarrow$ 3'.

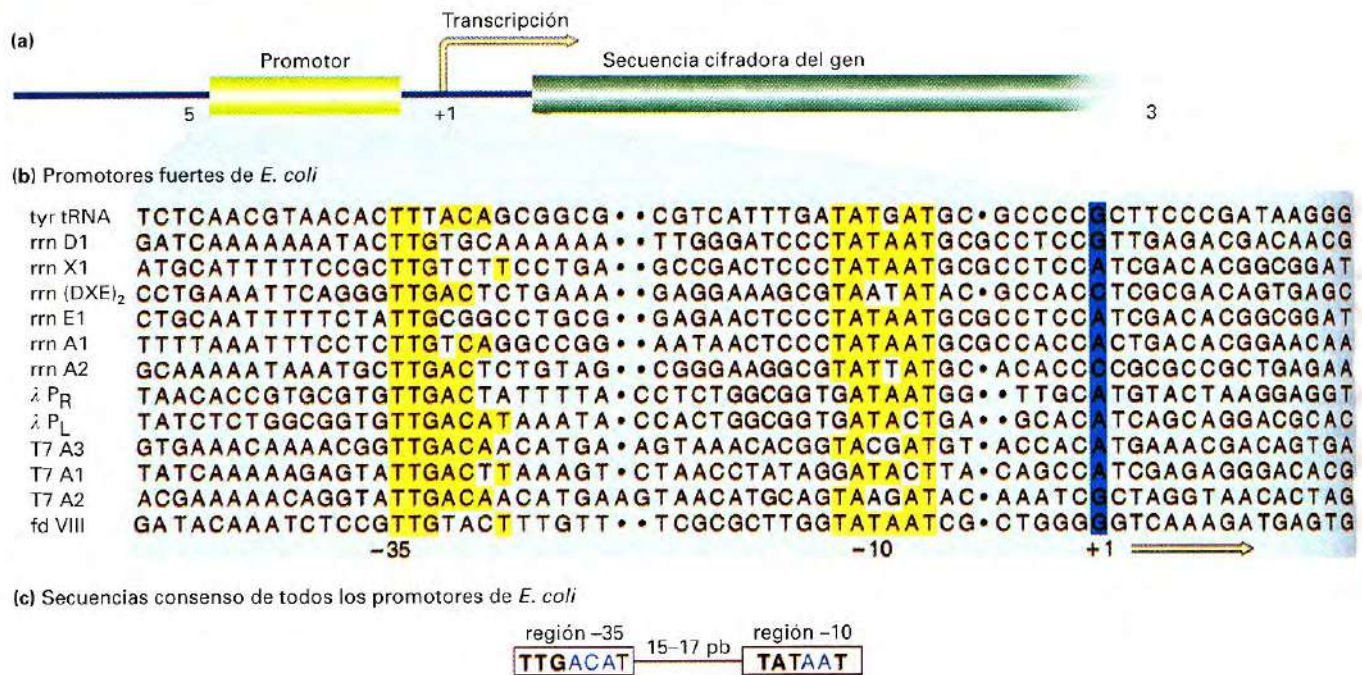


Figura 10-8. Secuencia promotora. (a) El promotor está situado «aguas arriba» (hacia el extremo 5') del sitio de inicio y de las secuencias codificadas. (b) Los promotores contienen regiones con secuencias similares, que aparecen sombreadas en amarillo en los 13 promotores de *E. coli* mostrados. Los espacios (indicados con puntos) se introducen para potenciar la homología en las secuencias consenso. A la izquierda se indica el gen controlado por cada promotor. La numeración se asigna considerando el número de bases anteriores (-) o posteriores (+) al sitio de inicio de la transcripción. (c) El código de color utilizado en las secuencias consenso deducidas a partir de todos los promotores de *E. coli* es: letras azules, >75%; letras negras en negrita, 50-75%; letras negras, 40-50%. [Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.^a ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc. Véase W. R. McClure, *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1985, 171 (Consensus Sequences).]

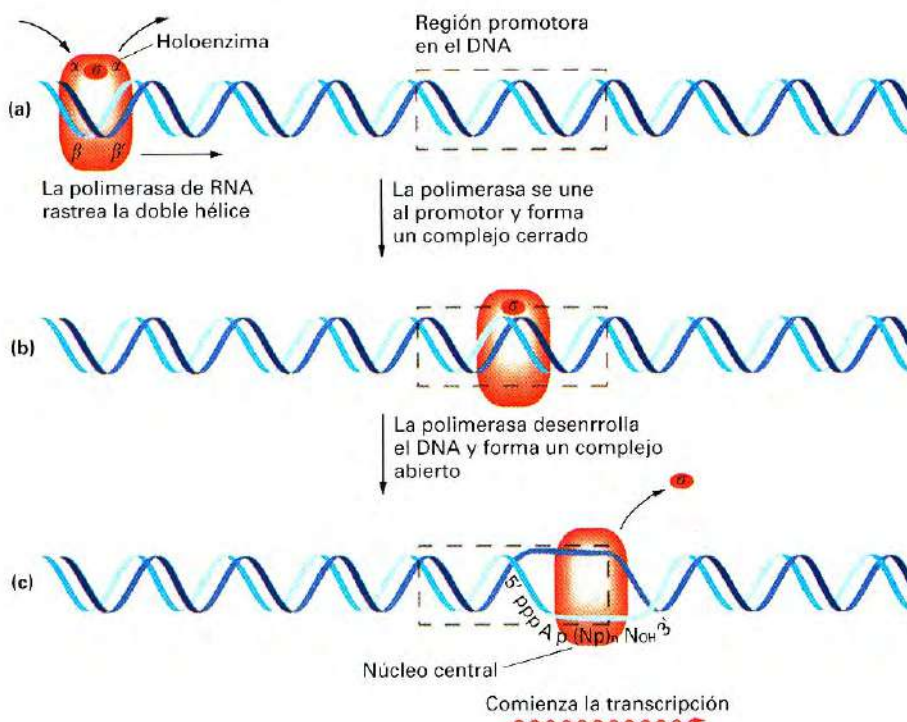


Figura 10-9. Iniciación de la transcripción. (a) La polimerasa de RNA busca un sitio promotor. (b) La enzima reconoce un sitio promotor y se une a él fuertemente, formando un complejo cerrado. (c) La holoenzima desenrolla una pequeña región de DNA, formando el complejo abierto. La transcripción comienza y se libera el factor σ . Se muestra el transcrito de RNA, comenzando con trifosfato de adenosina (pppA) y terminando en N_{OH} tras la incorporación de un número indeterminado de nucleótidos [(Np)_n]. (Tomado de J. Darnell, H. Lodish, y D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, 2d ed. Copyright © 1990 de Scientific American Books, Inc.)

estructura de la polimerasa de RNA de *E. coli*. Podemos ver que la enzima está compuesta por cuatro subunidades diferentes. La subunidad beta (β) tiene un peso molecular de 150 000, la beta prima (β') de 160 000, la alfa (α) de 40 000 y la sigma (σ) de 70 000. La subunidad σ puede disociarse del resto del complejo, dejando el **núcleo central de la enzima**. La enzima completa con la subunidad σ es la RNA polimerasa en su forma de **holoenzima** y es necesaria para que la transcripción se inicie correctamente; una vez iniciado el proceso, el núcleo central de la enzima continúa con la transcripción.

Analicemos las tres fases de la transcripción: **iniciación, elongación y terminación**.

Iniciación

Las secuencias a las que se une la polimerasa de RNA para iniciar la transcripción se denominan **promotores**. (En el Cap. 11 analizaremos su papel en la regulación génica). La Figura 10-8 muestra las secuencias promotoras correspondientes a 13 sitios de inicio de la transcripción del genoma de *E. coli*. Las bases están alineadas por homología o similitud en la secuencia que aparece justo antes de la primera base transcrita (designado como «sitio de iniciación» en la Fig. 10-8).

Cabe señalar que en la Figura 10-8 aparecen dos regiones con similitud parcial en prácticamente todos los casos. Estas regiones se conocen como regiones -35 y -10 debido a su posición respecto al sitio de inicio de la transcripción. En la parte inferior de la Figura 10-8 se muestra la secuencia promotora consenso o ideal. Se ha demostrado que la polimerasa contacta con estas dos regiones cuando se une al DNA. La enzima desenrolla entonces la doble hélice y comienza la síntesis de una molécula de RNA.

La subunidad disociable de la polimerasa de RNA, el factor σ , es responsable de que la polimerasa de RNA reconozca y se una específicamente a las regiones promotoras. En primer lugar, la holoenzima explora el DNA en busca del promotor (Fig. 10-9a); una vez reconocidas las secuencias -35 y -10 , se une a ellas débilmente. La estructura resultante se conoce como el **complejo cerrado** con el promotor (Fig. 10-9b). A continuación, la enzima se une más fuertemente y desenrolla las bases cercanas a la región -10 . Cuando la polimerasa unida provoca esta desnaturalización local de la doble hélice se dice que forma el **complejo abierto** con el promotor (Fig. 10-9c). Para esta etapa de iniciación se requiere la subunidad sigma.

Elongación

Poco después de la iniciación de la transcripción, el factor sigma se disocia de la polimerasa de RNA. El RNA se sintetiza siempre en la dirección $5' \rightarrow 3'$ (Figs. 10-10 y 10-11), a partir de

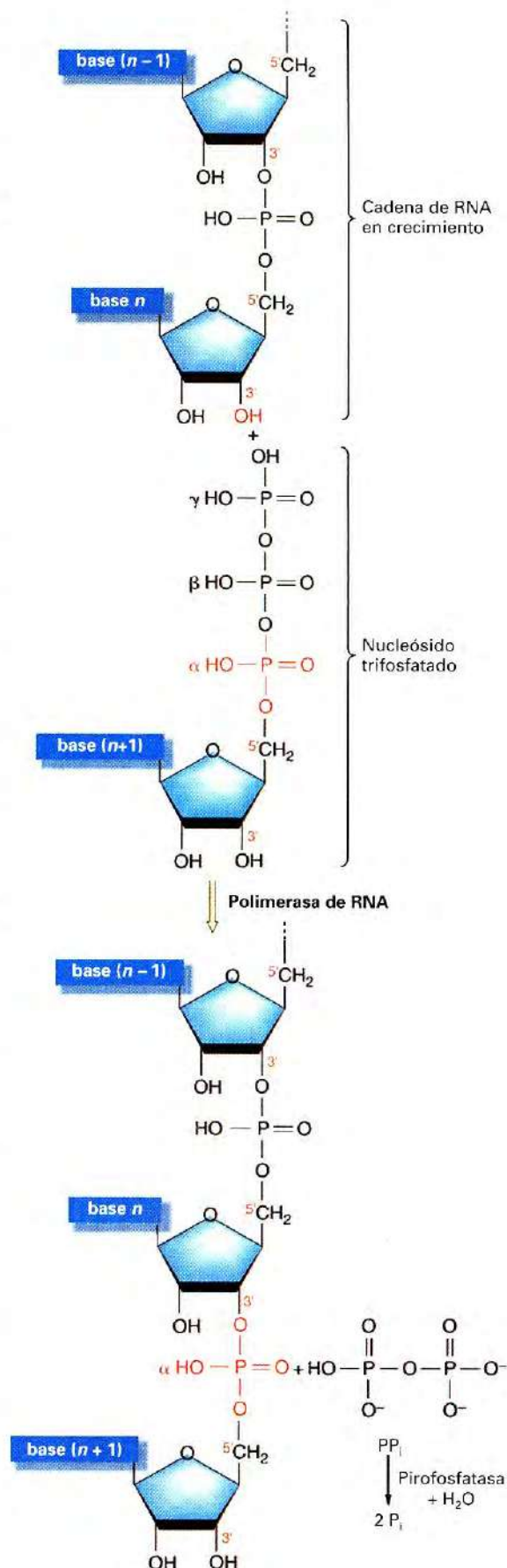


Figura 10-10. La incorporación secuencial de los nucleótidos ocurre de uno en uno, en dirección $5'$ a $3'$. La cadena crece por formación de un enlace entre el extremo $3'$ hidroxilo de la cadena en crecimiento y un nucleósido trifosfato, liberando una molécula de pirofosfato (PPi). Esto conduce a la adición neta de un fosfato, que se incorpora al esqueleto de la nueva cadena. El DNA crece por reacción con desoxirribonucleósidos trifosforados, mientras que el RNA lo hace por reacción con ribonucleósidos trifosforados. (Tomado de H. Lodish y D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.^a ed. Copyright © 1995, de Scientific American Books, Inc.).

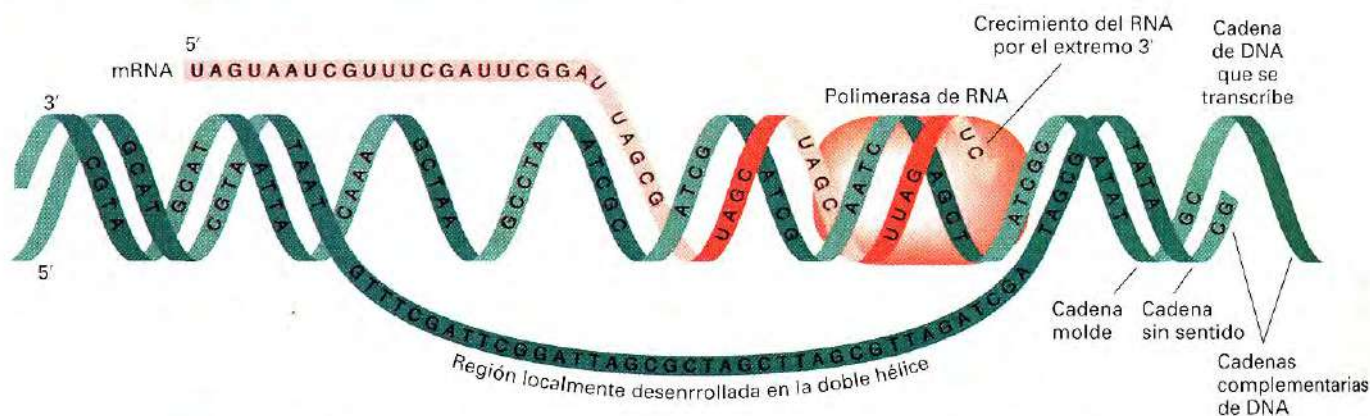
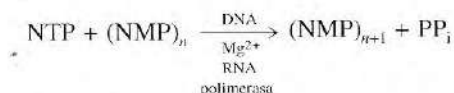


Figura 10-11. Transcripción mediada por la polimerasa de RNA. Se está sintetizando una cadena de RNA, en la dirección 5' → 3', a partir de una región localmente abierta en el DNA. (Tomado de E. J. Gardner, M. J. Simmons, y D. P. Snustad, *Principles of Genetics*, 8.ª ed. Copyright © 1991 de John Wiley and Sons, Inc.).

ribonucleósidos trifosfatados libres (NTP) que sirven de sustrato a la enzima. La siguiente ecuación representa la adición de cada ribonucleótido.



La energía necesaria para la reacción proviene de la ruptura del enlace trifosfato de alta energía para dar lugar a monofosfato y difosfato inorgánico (PP_i), como se indica en la Figura 10-10. La Figura 10-11 ilustra el proceso de elongación. Debido a que la polimerasa de RNA se mueve a lo largo de una doble hélice es necesario que se genere una «burbuja de transcripción», que va desplazándose a lo largo de la molécula de DNA durante la elongación. Hay determinadas secuencias que pueden provocar una pausa en el movimiento de la polimerasa, algo crucial para que se produzca la terminación de la transcripción.

Terminación

Cuando la polimerasa de RNA reconoce secuencias específicas en el DNA que actúan como señales de terminación de la transcripción, la cadena de RNA en crecimiento y la polimerasa se disocian del molde de DNA. *E. coli* dispone de dos mecanismos principales de terminación.

En el primero de estos mecanismos, la terminación es directa. Las secuencias terminadoras corresponden a unos 40 pb, que finalizan en un tramo rico en GC seguido por una serie de 6 o más A en la cadena molde. Las secuencias GC correspondientes del RNA se disponen de modo que el transcrito establece enlaces complementarios consigo mismo en esa región, como se representa en la Figura 10-12. La región de RNA de cadena doble resultante, denominada **lazo en horquilla**, va seguida de un trecho de residuos U (residuos A en el DNA molde). El lazo en horquilla y el trecho de residuos U parece que actúan como señal para la disociación de la polimerasa de RNA y la terminación de la transcripción.

En el segundo tipo, se requiere la ayuda de un factor proteico adicional denominado **rho** para que la polimerasa de RNA reco-

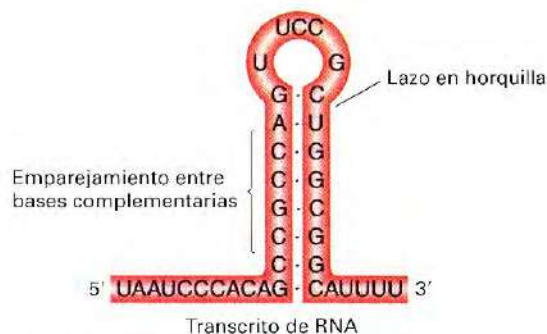


Figura 10-12. Estructura de un sitio de terminación de la transcripción bacteriana. La estructura en horquilla se forma debido a la complementariedad entre las bases de la propia cadena de RNA.

nozca las señales de terminación. Los mRNA que presentan señales de terminación dependientes de rho no presentan el trecho de residuos U al final del RNA y, normalmente, tampoco presentan el lazo en horquilla. En la Figura 10-13 se muestra un modelo para la terminación dependiente de rho. Rho es un hexámero compuesto por seis subunidades idénticas; la hidrólisis de ATP a ADP y P_i dirige la reacción de terminación. El primer paso en la terminación es la unión de rho a un sitio específico en el RNA denominado *rut* (Fig. 10-13a y b). Después de la unión, rho «arranca» el RNA de la polimerasa de RNA, probablemente translocándose a lo largo del mRNA, como se ilustra en la Figura 10-13b y c. Los sitios *rut* están localizados justo aguas arriba (es decir, en dirección 5') de las secuencias donde la polimerasa de RNA tiende a detenerse.

La eficacia de ambos mecanismos de terminación depende de las secuencias circundantes y de otros factores proteicos.

RNA eucariótico

Hay varios aspectos que distinguen la síntesis de RNA y su procesamiento en los eucariotas respecto a los procariotas.

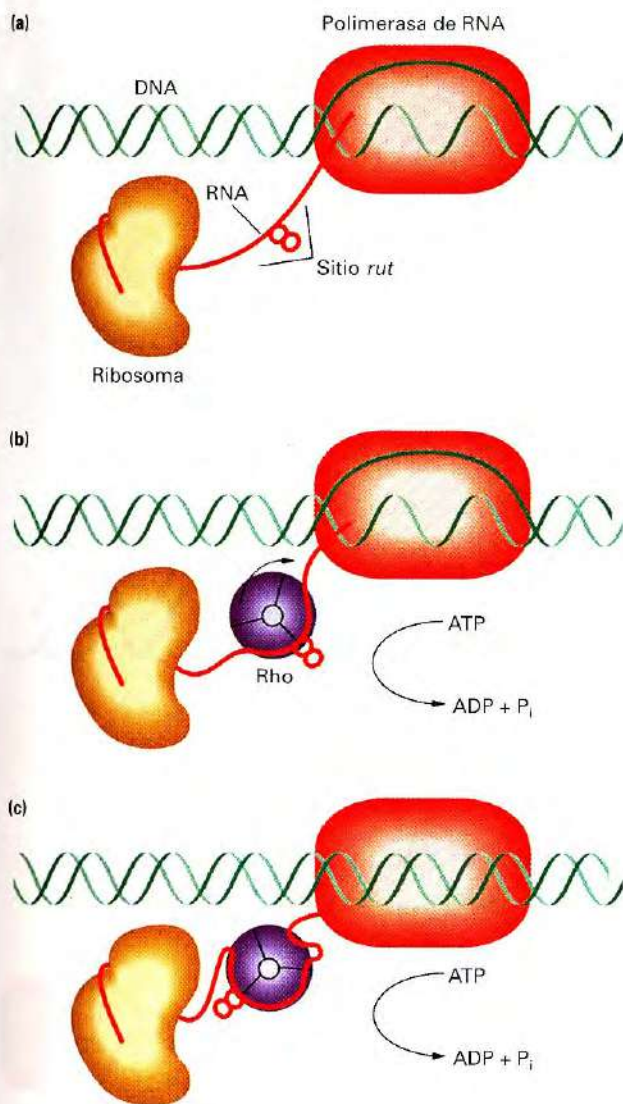


Figura 10-13. Modelo de acción de rho sobre un RNA en crecimiento que está siendo simultáneamente traducido. (Tomado de J. P. Richardson, *Cell* 64, 1991, 1047-1049.)

Síntesis de RNA

Mientras que hay una sola polimerasa de RNA que sintetiza todos los RNA en procariotas, los eucariotas tienen tres polimerasas de RNA diferentes:

1. La polimerasa de RNA I sintetiza rRNA.
2. La polimerasa de RNA II sintetiza mRNA. En eucariotas, las moléculas de mRNA siempre determinan la síntesis de una sola proteína, mientras que en procariotas hay muchos mRNA que contienen información para la síntesis de varias proteínas.
3. La polimerasa de RNA III transcribe los tRNA, así como moléculas de RNA nucleares y celulares de pequeño tamaño.

Las polimerasas eucarióticas son mucho más complejas que las polimerasas procarióticas. Algunas de sus subunidades son similares a las proteínas de *E. coli* correspondientes, pero otras no.

Procesamiento de RNA

El producto inicial de la transcripción, el transcrito de RNA primario, se procesa de diversas maneras antes de ser transportado al citosol, donde es utilizado por la maquinaria de traducción (Fig. 10-14). La Figura 10-15 ilustra con detalle los pasos del procesamiento. En primer lugar, durante la transcripción, se añade una **caperuza** constituida por un residuo 7-metilguanosina al extremo 5' del transcrito, mediante el establecimiento de un enlace trifosfato. A continuación, se añade una cola de adeninas al extremo 3' del transcrito. La longitud de estas **colas de poli (A)** es de unos 150 a 200 residuos. Una vez que se han llevado a cabo estas modificaciones, un paso de **maduración** elimina partes internas del transcrito. El descubrimiento de este proceso, del que se deriva que los genes están «fragmentados» y que su región informativa está interrumpida por secuencias internas, constituye uno de los hallazgos más importantes de la Genética molecular en los últimos 25 años.

Genes fragmentados

Los estudios con transcritos sintetizados a partir de DNA de virus de mamíferos indicaron por primera vez una falta de correspondencia entre el DNA viral y las moléculas de mRNA. Cuando la tecnología del DNA recombinante (véase el Cap. 12) facilitó el análisis físico de los genes eucarióticos se hizo patente que los transcritos *primarios* se acortaban mediante la elimina-

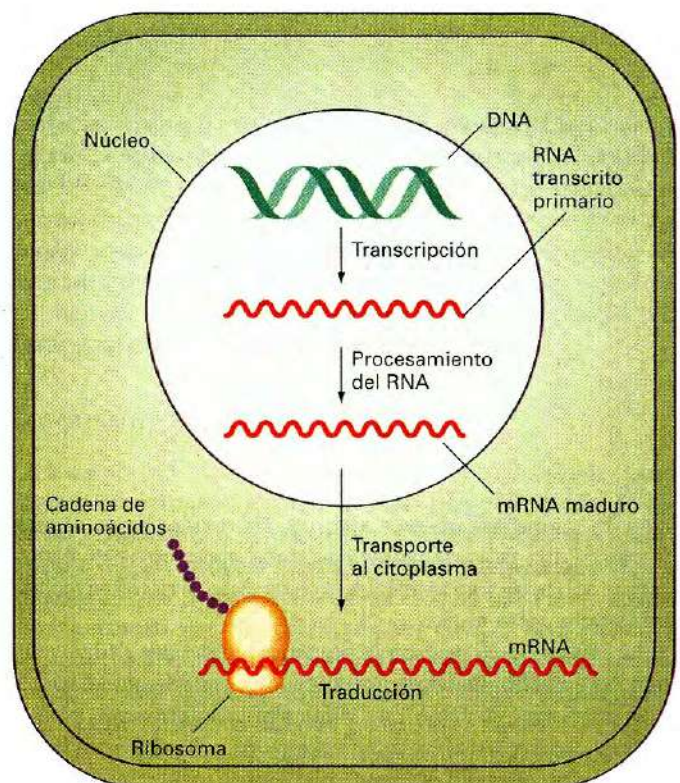
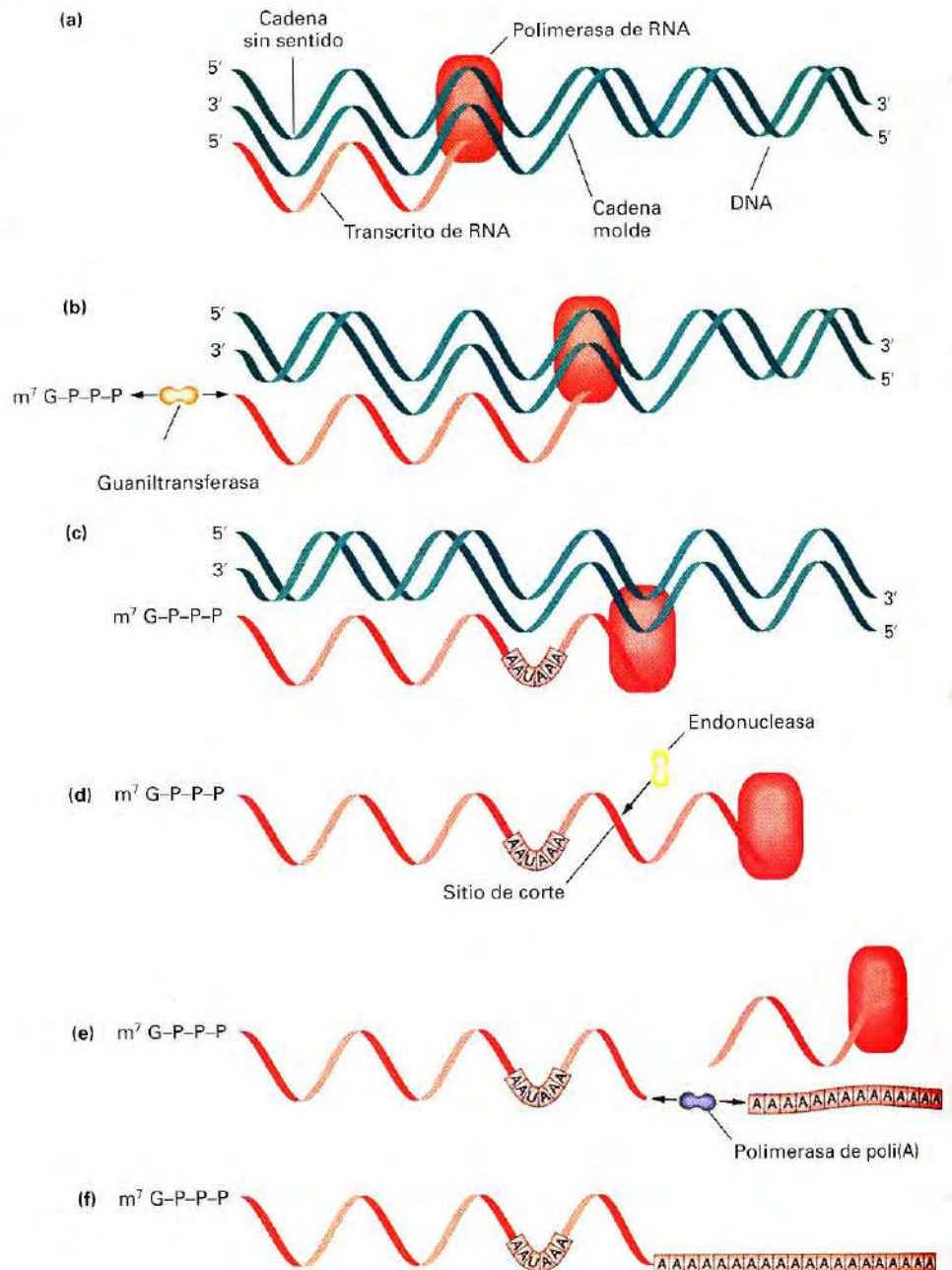


Figura 10-14. Expresión génica en eucariotas. El mRNA se procesa en el núcleo antes de ser transportado al citoplasma. (Tomado de J. E. Darnell, Jr., «The Processing of RNA». Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

Figura 10-15. Procesamiento de un transcrito primario. (a) La transcripción está mediada por la polimerasa de RNA. (b) Poco después del inicio de la transcripción, la enzima guaniltransferasa añade 7-metilguanósina (m^7Gppp) al extremo 5' del mRNA. (c) La secuencia AAUAAA, cerca del extremo 3', actúa como señal para que ocurra (d) una reacción de corte unas 20 pb aguas abajo catalizada por una endonucleasa. (e) Entonces, la enzima polimerasa de poli(A) añade una cola de poli(A), compuesta por 150 a 200 residuos de adenosina, al extremo 3' del sitio de corte. (f) Así se produce el mRNA primario completo. (De J. E. Darnell, Jr., «The Processing of RNA.» Copyright © 1983 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos).

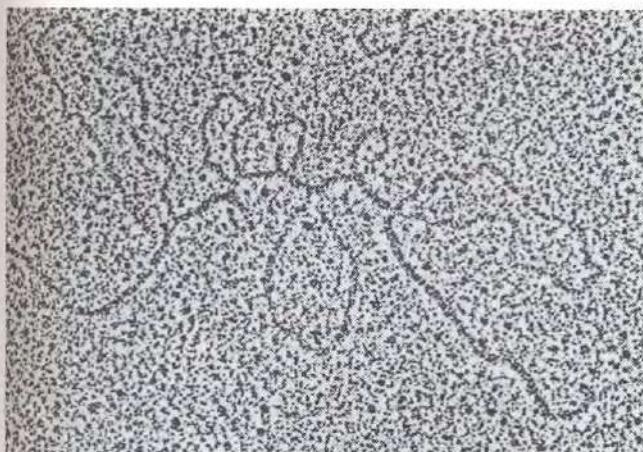


ción de segmentos internos antes de ser transportados al citoplasma. En la mayoría de los eucariotas superiores estudiados, esto se aplica no sólo al mRNA, sino también al rRNA, e incluso en algunos casos al tRNA.

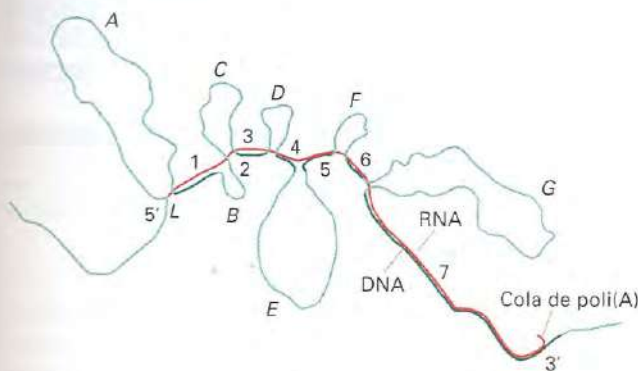
La Figura 10-16 muestra la organización del gen de la ovalbúmina de pollo, una proteína compuesta por 386 aminoácidos. Los segmentos de DNA que contienen la información para la síntesis de la proteína están interrumpidos por secuencias denominadas **intrones**. En la Figura 10-16 estos segmentos se designan con las letras A a G. El transcrito primario se procesa mediante una serie de reacciones de «corte y empalme», igual que un mensaje grabado en una cinta puede ser cortado y empalmado. El procesamiento conduce a la eliminación de intrones y al

empalme de las regiones informativas, denominadas **exones**, produciendo un mRNA cuya secuencia es exactamente colineal con la secuencia de la ovalbúmina. En la Figura 10-16, los exones aparecen indicados por la letra L y los números 1 a 7. En diferentes genes, se han detectado intrones con una longitud de hasta 2000 pares de bases. Algunos genes contienen hasta 16 intrones.

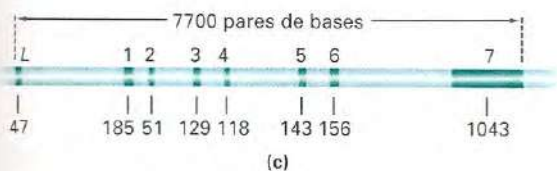
Es obvio que el procesamiento ocurre después de la transcripción y en varios pasos, porque es posible aislar tanto transcritos de RNA (denominados anteriormente RNA nuclear heterogéneo, o HnRNA) que corresponden a toda la región genética (intrones + exones), como transcritos de tamaño intermedio. En estos transcritos de longitud intermedia ya se han eliminado al-



(a)



(b)



(c)

Figura 10-16. Organización en fragmentos separados del gen de la proteína ovoalbúmina. (a) La micrografía electrónica y (b) su representación cartográfica muestran el resultado de un experimento en el que una cadena sencilla de una molécula de DNA que incluye el gen de la proteína de la clara del huevo (ovoalbúmina) se dejó hibridar con mRNA para la ovoalbúmina, la molécula a partir de la cual se traduce la proteína. Los segmentos de cadena sencilla que sobresalen a modo de bucles corresponden a los intrones. (c) La representación esquemática del gen muestra los siete intrones (en verde claro), los ocho exones (en verde oscuro) y el número de pares de bases de cada exón; el tamaño de los intrones varía desde los 251 pares de bases del intrón B hasta los cerca de 1600 de G. (Tomado de P. Chambon, «Split Genes». Copyright © 1981 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

unos intrones, pero otros se mantienen. En la Figura 10-17 se resume la secuencia de pasos en el procesamiento del RNA.

Procesamiento alternativo

Mediante la utilización de rutas alternativas de procesamiento se pueden producir diferentes mRNA y, por lo tanto, diferentes

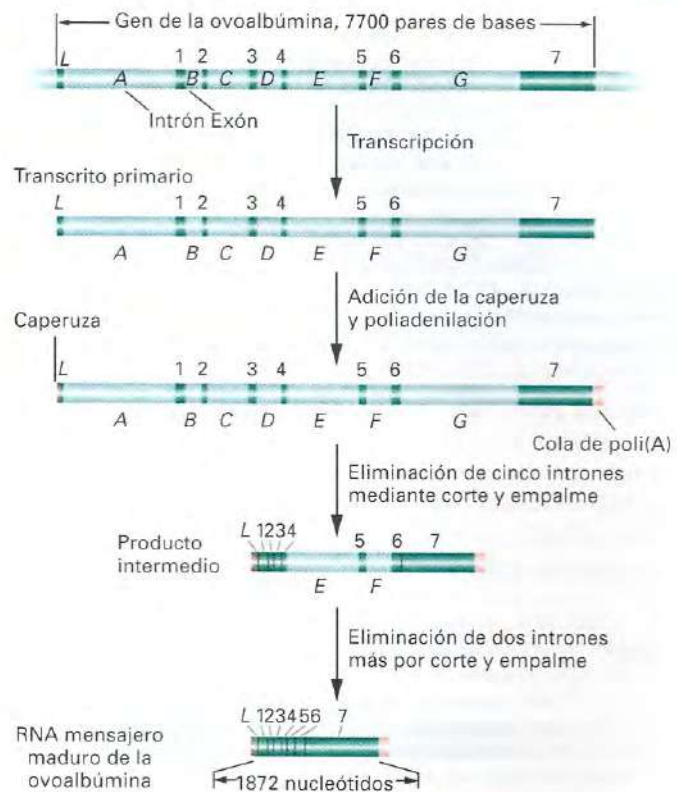


Figura 10-17. El mRNA maduro se produce en varios pasos. (Tomado de P. Chambon, «Split Genes». Copyright © 1981 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

proteínas a partir de un único transcrito primario. Las distintas formas proteicas que se generan por procesamiento alternativo suelen aparecer en tipos celulares diferentes o en diferentes etapas del desarrollo. La Figura 10-18 muestra la amplia gama de combinaciones producidas por el procesamiento diferencial del transcrito primario del gen de la tropomiosina α . Así se genera un conjunto de proteínas relacionadas, cada una de ellas con un funcionamiento óptimo en un tipo celular concreto.

Mecanismo de corte y empalme

La secuenciación de las uniones exón-intrón ha puesto de manifiesto que existen secuencias específicas muy conservadas en estas posiciones. Como se muestra en la Figura 10-19, en prácticamente todos los casos analizados se encuentra la secuencia GU en el punto de corte 5' del intrón y AG en el 3'. Se ha demostrado que estas secuencias son reconocidas por moléculas de RNA nucleares pequeñas (snRNA) en una reacción en la que se coordina la complementariedad entre bases con la acción de las enzimas implicadas. La propia reacción de corte y empalme se ilustra en la Figura 10-20, en la que se muestra la eliminación de un intrón en forma de «lazada», como resultado de dos reacciones de transesterificación. Las reacciones consisten en el intercambio de un enlace fosfoéster por otro, dando como resultado la fusión o ligación de dos exones.

Los snRNA se asocian con proteínas para formar partículas ribonucleoproteicas pequeñas (snRNP). En células superiores, las

Figura 10-18. Patrones complejos de corte y empalme en eucariotas. El transcrito pre-mRNA del gen de la α -tropomiosina sufre procesamiento alternativo en tipos celulares diferentes. Los recuadros de color verde claro representan intrones; los otros colores representan exones. Las señales de poliadenilación aparecen indicadas con una A. Las líneas discontinuas en los mRNA maduros indican regiones que han sido eliminadas mediante corte y empalme. TM, tropomiosina. (Tomado de J. P. Lees et al., *Molecular and Cellular Biology* 10, 1990, 1729-1742.)

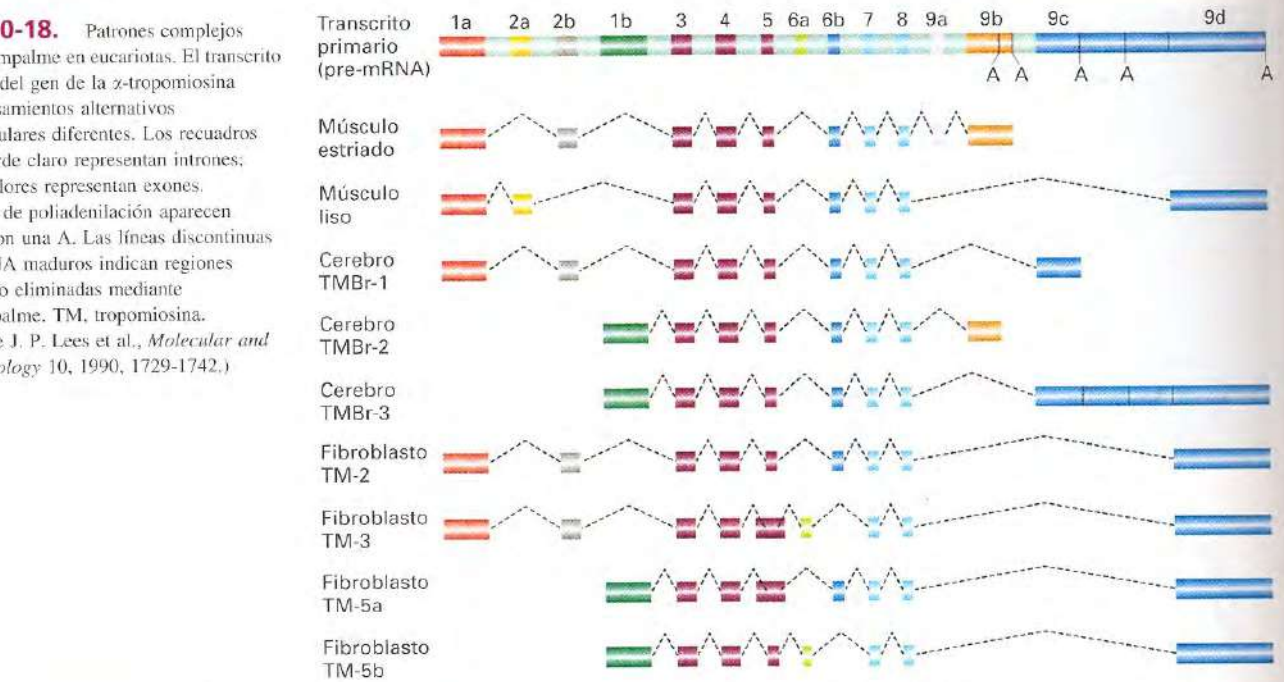


Figura 10-19. Secuencias consenso en los sitios 3' y 5' donde se produce el corte y empalme de los mRNA eucarióticos. Casi todos los intrones comienzan con GU y terminan con AG. Del análisis de las regiones fronterizas entre muchos exones e intrones, se han podido establecer unas secuencias consenso de nucleótidos que aparecen preferentemente en los extremos 5' y 3'. Además de la secuencia AG, hay otros nucleótidos situados justo aguas arriba del sitio 3' que también son importantes para que el proceso de corte y empalme ocurra correctamente. (Tomado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 de James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, y Mark Zoller.)

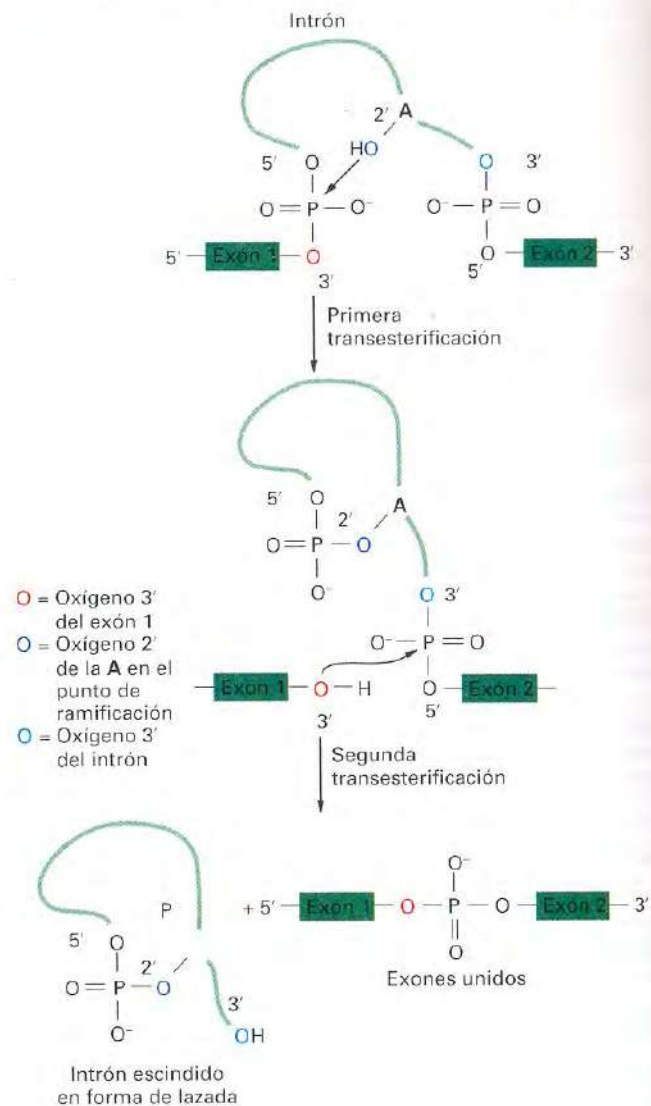


Figura 10-20. El empalme de los exones del transcrito primario ocurre mediante dos reacciones de transesterificación. En la primera reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del intrón y el oxígeno 3' (en rojo) del exón 1 se intercambia por un enlace éster con el oxígeno 2' (en azul oscuro) del residuo A del punto de ramificación. En la segunda reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del exón 2 y el oxígeno 3' (en azul claro) del intrón se intercambia por enlace éster con el oxígeno 3' del exón 1, provocando la liberación del intrón en forma de lazada y la unión de los dos exones. Las flechas señalan las posiciones donde los oxígenos activados reaccionan con los átomos de fósforo. (Tomado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Biology of the Cell*, 3.ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.)

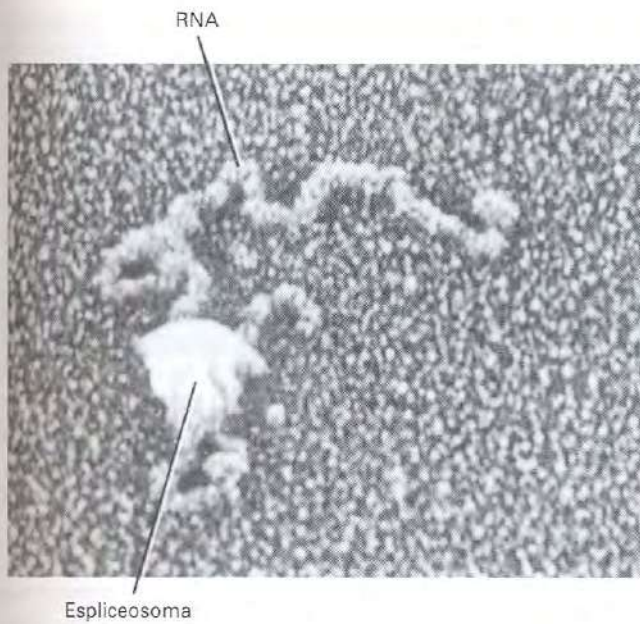


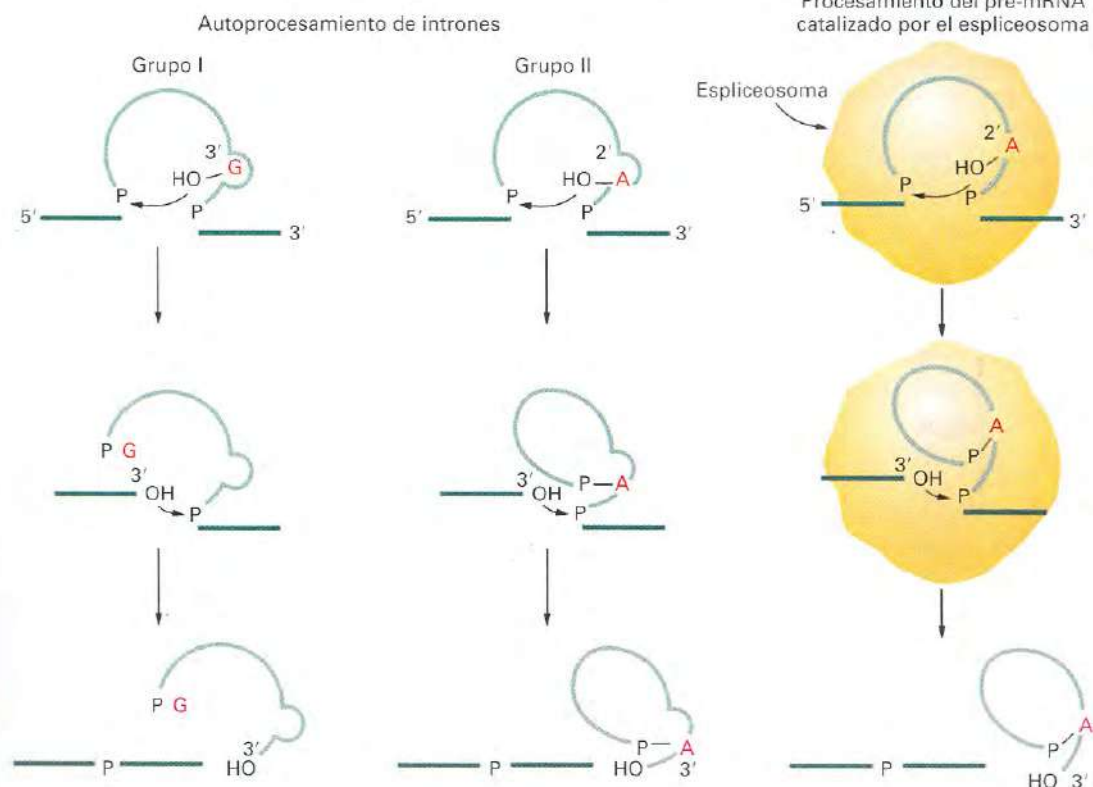
Figura 10-21. Fotografía con el microscopio electrónico del espliceosoma. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3ª ed. Copyright © 1995 de Scientific American Books, Inc.).

snRNP, el transcrito primario, y factores asociados se unen constituyendo un complejo ribonucleoproteico de peso molecular elevado (60S) denominado **espliceosoma** (Fig. 10-21), que cataliza las reacciones de transesterificación descritas.

Autoprocesamiento

Actualmente, se conocen numerosos ejemplos de moléculas de RNA que pueden catalizar el procesamiento de sus intrones sin la ayuda de proteínas. Esta capacidad de autoprocesamiento fue descubierta por Thomas Cech y colaboradores en *Tetrahymena*, y constituyó la primera demostración de que una molécula de RNA puede actuar como una enzima y catalizar una reacción biológica específica. Estos RNA con actividad catalítica se denominan **ribozimas**. Según el mecanismo específico de procesamiento, los intrones que se autoprocesan se clasifican en grupo I o grupo II. Los intrones del grupo I se encuentran en transcritos primarios de algunos virus de *E. coli*, de *Tetrahymena* y de algunos otros organismos unicelulares, en mitocondrias y cloroplastos, y en algunos tRNA primarios de bacterias. Los intrones del grupo II se encuentran en algunos tRNA primarios y en algunos transcritos primarios de mitocondrias y cloroplastos. En la Figura 10-22 se muestra un esquema de las diferencias en el mecanismo de procesamiento de los intrones del grupo I, del grupo II y

Figura 10-22. Mecanismo de autoprocesamiento de los intrones de los grupos I y II, y procesamiento del mRNA por el espliceosoma. El intrón se indica en color azul; los exones que han de unirse se indican en rojo. En los intrones del grupo I (a la izquierda), el cofactor guanósina (G) se asocia con el centro activo. El grupo hidroxilo 3' de esta guanósina participa en una reacción de transesterificación con el fosfato del extremo 5' del intrón; esta reacción es análoga a la que se produce con el grupo hidroxilo 2' de la A del sitio de ramificación en el procesamiento de los intrones del grupo II y del pre-mRNA. La siguiente transesterificación, que conduce a la unión de los exones 5' y 3', es similar en los tres mecanismos de corte y empalme. Observe que los intrones del grupo I se liberan como moléculas lineales y no como las estructuras ramificadas que se producen en los otros dos casos. (Tomado de P. A. Sharp, *Science* 235, 1987, 769.)



de los dependientes del aparato procesador. El producto resultante de la eliminación de un intrón del grupo I no tiene forma de lazada, sino que es una molécula lineal.

Traducción

Aunque el mRNA dirige la síntesis proteica, si mezclamos mRNA y los 20 aminoácidos en un tubo de ensayo con la esperanza de producir proteína, quedaremos defraudados. Es necesaria la presencia de otros componentes; el descubrimiento de la naturaleza de estos componentes fue clave para descifrar el mecanismo de la traducción. Una técnica de centrifugación sencilla pero elegante contribuyó al descubrimiento de estos componentes adicionales.

Aplicaciones de los gradientes de sacarosa

Para crear un **gradiente de densidad de sacarosa**, se depositan en un tubo de ensayo, una sobre otra, capas sucesivas de soluciones de sacarosa cada vez menos concentradas. Luego, se coloca cuidadosamente el material a estudiar sobre la superficie. Cuando la solución se centrifuga en un aparato que permite que el tubo bascule libremente, el material que está sedimentando progresa a través del gradiente a diferentes velocidades dependiendo de los tamaños y formas de las moléculas. En un período fijo de tiempo, las moléculas de mayor tamaño avanzan más que las moléculas pequeñas. Las moléculas separadas pueden recuperarse en distintas fracciones mediante la recolección continua de gotas a partir de un pequeño orificio practicado en la parte inferior del tubo (Fig. 10-23). El tiempo que una determinada fracción tarda en recorrer la distancia fija hasta el fondo del tubo refleja su valor de sedimentación (S), que es una medida del tamaño de las moléculas presentes en dicha fracción.

Es importante destacar las diferencias entre un gradiente de sacarosa y el gradiente de CsCl que describimos en el Capítulo 8. En un gradiente de CsCl, las moléculas en estudio tienen una densidad intermedia entre la de la solución menos concentrada y

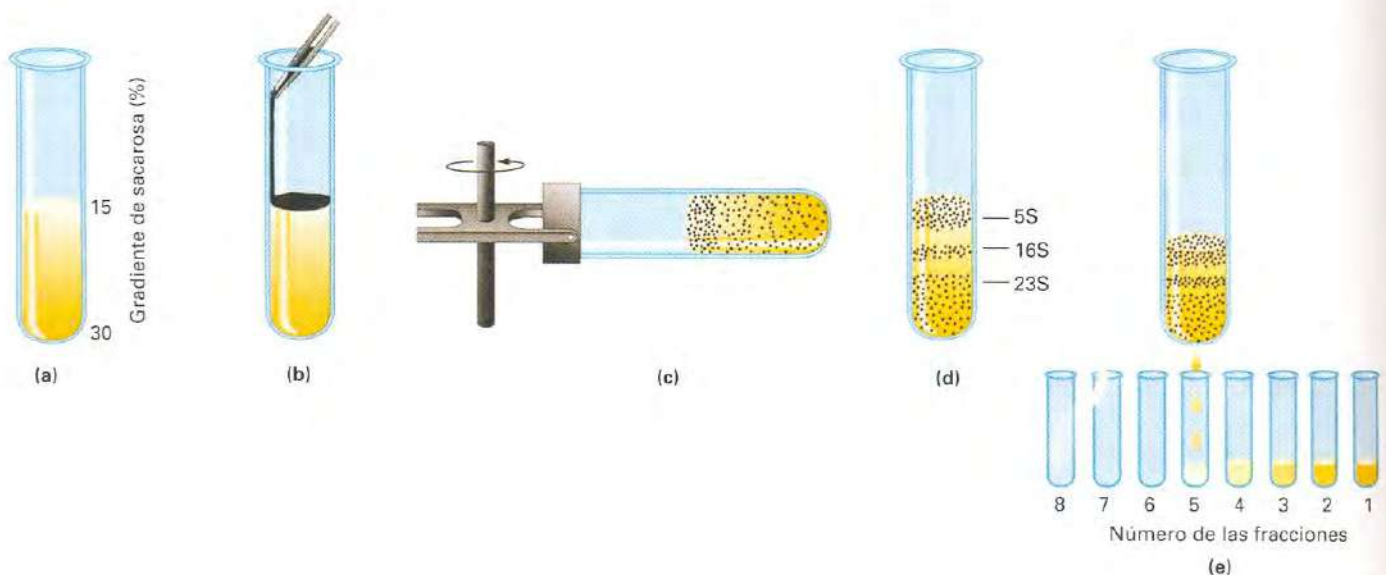
la de la solución más concentrada de CsCl. Por tanto, en el equilibrio, las moléculas formarán una banda en una posición concreta del gradiente. En un gradiente de sacarosa, las moléculas en estudio son más densas que cualquiera de las soluciones de sacarosa utilizadas y, en el equilibrio, se encontrarían todas ellas en el fondo del tubo formando un precipitado. No obstante, migran hacia el fondo del tubo a velocidades diferentes, dependiendo de su forma y tamaño. Comparando las posiciones de las distintas moléculas en el gradiente en un momento determinado, podemos determinar sus tamaños relativos.

Los principales componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas pudieron separarse según su tamaño haciendo uso del poder de fraccionamiento de la técnica del gradiente de sacarosa (Fig. 10-23). Las moléculas de RNA transferente (4S) pudieron distinguirse fácilmente de los RNA ribosómicos, que están constituidos por tres clases: 23S, 16S y 5S. Estos tamaños aparecen resumidos en el Cuadro 10-2.

Variación genética

Si los genes son segmentos de DNA y el DNA es una simple sucesión de pares de nucleótidos, ¿cómo dictan las secuencias de pares de nucleótidos las secuencias de aminoácidos de las proteínas? De inmediato, se nos ocurre la analogía con un código. Cómo llegó a descifrarse el código genético es la historia que

Figura 10-23. Técnica del gradiente de sacarosa. (a) El gradiente se genera por centrifugación de un tubo en el que se han depositado capas sucesivas de soluciones de sacarosa de distinta densidad. (b) La muestra que se desea analizar se deposita sobre la superficie del gradiente. (c) Durante la centrifugación, los diferentes componentes (fracciones) de la muestra sedimentan diferencialmente. (d) Las diferentes fracciones forman bandas en el gradiente centrifugado. (e) Las diferentes bandas se recogen por separado tomando muestras desde el fondo del tubo a intervalos fijos de tiempo. El valor S de cada fracción depende de su posición en el gradiente, que está relacionado con el tiempo que tarda en salir por el fondo del tubo. (Tomado de A. Rich, «Polyribosomes». Copyright © 1963 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)



CUADRO 10-2. Moléculas de RNA de *E. coli*

Tipo	Porcentaje del RNA celular	Coefficiente de sedimentación (S)	Peso molecular	Número de nucleótidos
RNA ribosómico (rRNA)	80	23	1.2×10^6	3700
		16	0.55×10^6	1700
		5	3.6×10^4	1700
RNA transferente (tRNA)	15	4	2.5×10^4	75
RNA mensajero (mRNA)	5		Heterogéneo	Variable

Fuente: L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.

contaremos en esta sección. La experimentación fue sofisticada y rápida, y no tardó mucho en descifrarse el código, una vez que su existencia parecía segura.

Por pura lógica, si los nucleótidos constituyen las «letras» del código, la combinación de estas letras puede originar «palabras» que representen diferentes aminoácidos. Una pregunta obligada atañe a la lectura de este código. ¿Es o no solapado? Luego podemos preguntarnos cuántas letras del mRNA son necesarias para constituir una palabra, o **codón**, y qué codón o codones representan cada aminoácido específico.

Código solapado versus no solapado

La Figura 10-24 muestra la diferencia entre un código solapado y uno no solapado. En el ejemplo, se muestra un código de tres letras o **tripletes**. En un código no solapado, los sucesivos aminoácidos están determinados por palabras sucesivas del mensaje (codones), como se muestra en la parte inferior de la Figura 10-24. En un código solapado, los sucesivos aminoácidos están determinados en el mRNA por codones que comparten algunas

bases consecutivas; por ejemplo, las dos últimas bases de un codón serían también las dos primeras del siguiente. Los codones solapados se muestran en la parte superior de la Figura 10-24. Así pues, para la secuencia AUUGCUCAG, en un código no solapado, los tres primeros aminoácidos estarían cifrados por los tripletes AUU, GCU y CAG, respectivamente. Sin embargo, en un código solapado y con un solapamiento de dos bases, los tres primeros aminoácidos estarían cifrados por los tripletes AUU, UUG y UGC, como se indica en la Figura 10-24.

Ya en 1961 parecía claro que el código genético no era solapado. El análisis de proteínas alteradas por mutación, en particular, los mutantes del virus del mosaico del tabaco obtenidos con ácido nitroso, puso de manifiesto que sólo cambiaba un aminoácido a la vez en una región determinada de la proteína. Esto es precisamente lo que produce un código no solapado. Como se indica en la Figura 10-24, un código solapado implicaría que el cambio de una sola base alteraría a la vez tres aminoácidos adyacentes de la proteína.

Cabe destacar que, aunque la existencia de un código solapado fue descartada del análisis de proteínas individuales, nada excluía el uso de fases de lectura alternativas para determinar los aminoácidos de dos proteínas distintas. En nuestro ejemplo, una proteína estaría cifrada por la serie de codones que se lee como AUU, GCU, CAG, CUU, etc. Una segunda proteína podría estar cifrada por codones desplazados una base y que serían, por tanto, UUG, CUC, AGC, UUG, etc. Esto constituye un ejemplo de almacenamiento de la información que cifra dos proteínas distintas en dos fases de lectura diferentes, manteniéndose el uso de un código de lectura no solapada durante la traducción de una proteína concreta. Se conocen algunos ejemplos de este tipo de cambios en la fase de lectura.

El número de letras de cada codón

Al leer una molécula de mRNA a partir de uno de sus extremos, sólo podemos encontrar una de las cuatro bases posibles, A, U, G o C. Por lo tanto, si las palabras estuvieran constituidas por una sola letra, sólo serían posibles cuatro palabras. El código genético no puede estar basado en un vocabulario tan limitado, ya que debemos contar con una palabra para cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas celulares. Si las palabras estuvieran formadas por dos letras, entonces tendríamos de $4^2 = 16$ palabras posibles; por ejemplo, AU, CU o CC. Este vocabulario sigue siendo limitado.

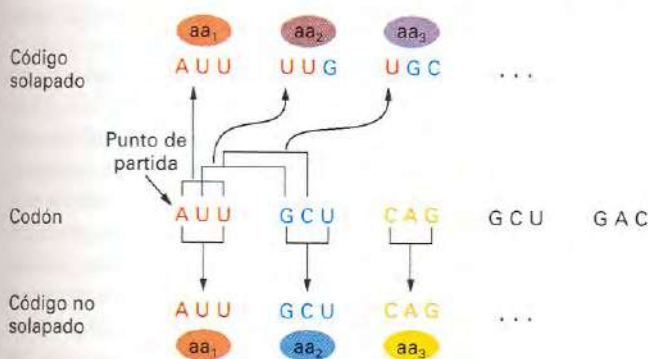
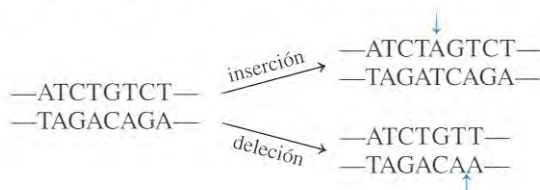


Figura 10-24. Diferencia entre un código solapado y uno no solapado. El ejemplo corresponde a un código de tres letras (un código de tripletes). Un código solapado utilizaría codones con algún nucleótido en común en la traducción de una misma proteína, tal como se ilustra en la parte superior del esquema (referente a la secuencia de mRNA que aparece en la parte central del esquema). En un código no solapado, los codones que se leen en la traducción de una proteína no comparten ningún nucleótido. Observe que la designación de los aminoácidos como aa₁, aa₂, etc. en ambos modelos no implica que los aminoácidos sean idénticos. Dado que los tripletes que componen los codones respectivos para el aa₁, por ejemplo, son diferentes según el modelo, es muy probable que los aminoácidos también lo sean. La coincidencia numérica entre aminoácidos sólo implica una coincidencia en la posición que ocupan en la cadena proteica.

Si las palabras fuesen de tres letras, serían posibles $4^3 = 64$ palabras; por ejemplo, AUU, GCG o UGC. Este vocabulario sería ya más que suficiente para constituir el código. Podemos concluir, por tanto, que las palabras del código deben estar formadas por al menos tres pares de nucleótidos. Sin embargo, si todas las palabras fueran «tripletes», tendríamos de muchas más palabras que las 20 necesarias para especificar los aminoácidos comunes.

Uso de supresores para demostrar la clave de tripletes

Pruebas convincentes de que un codón está realmente constituido por tres letras (y no más de tres) se obtuvieron en experimentos genéticos de gran belleza, dados a conocer en 1961 por Francis Crick, Sidney Brenner y colaboradores, y realizados con mutantes del locus *rII* del fago T4. Indujeron mutaciones que producen el fenotipo *rII* (véase el Cap. 9) empleando un compuesto denominado *proflavina*, del que se suponía que actuaba por adición o deleción de un solo par de nucleótidos en el DNA. (Esta suposición se basaba en pruebas experimentales que aquí no se incluyen). Los siguientes ejemplos ilustran la acción de la proflavina sobre el DNA de cadena doble.



Partiendo de una mutación particular inducida con proflavina, a la que llamaron FCO, Crick y sus colaboradores encontraron «reversiones» (recuperaciones del fenotipo normal) que detectaron por la formación de halos de lisis silvestres sobre la estirpe K(λ) de *E. coli*. El análisis genético de estos halos puso de manifiesto que los «revertientes» no eran exactamente iguales que el silvestre, sugiriendo así que la segunda mutación no era una reversión precisa de la mutación original. De hecho, la reversión se debía a la presencia de una *segunda mutación* en un sitio diferente del de la mutación FCO, aunque en el mismo gen; esta segunda mutación «suprimía» el fenotipo mutante causado por la mutación FCO. Recuerde del Capítulo 4 que una **mutación supresora** es la que contrarresta o suprime los efectos de otra mutación.

Cuando la mutación supresora se separó por recombinación de la primera mutación se observó que la propia mutación supresora era también una mutación *rII* (Fig. 10-25).

¿Cómo explicaríamos estos resultados? Si suponemos que la lectura es polarizada, es decir, si el gen se lee desde un único extremo, entonces, la adición o deleción provocada originalmente por la proflavina podría provocar el fenotipo mutante, al interrumpir el mecanismo normal de lectura responsable de establecer los grupos de bases que han de interpretarse como palabras. Por ejemplo, si cada tres bases en el mRNA constituyen una palabra, entonces la «fase de lectura» se establecería tomando las tres primeras bases del extremo como la primera palabra, las tres siguientes como la segunda palabra y así sucesivamente. En tal caso, la adición o deleción de un solo par de bases induci-

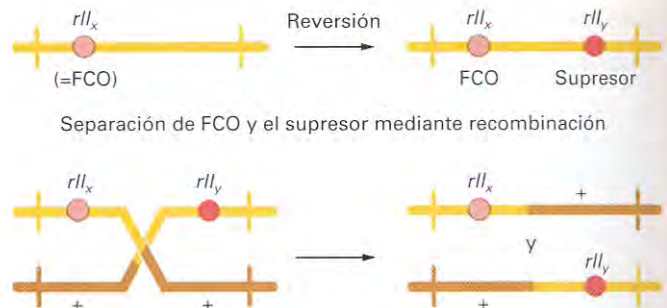


Figura 10-25. El supresor de una mutación *rII*, cuando se separa por recombinación de la mutación *rII*, resulta ser él mismo una mutación *rII*. El mutante original, FCO, se obtuvo mediante tratamiento con proflavina. Luego, cuando la estirpe FCO se trató de nuevo con proflavina, se encontró un revertiente que, a primera vista, parecía silvestre. Sin embargo, se observó que se había inducido una segunda mutación en la región *rII*, y que el doble mutante *rII*_x*rII*_y se comportaba como la estirpe silvestre.

da con proflavina cambiaría la fase de lectura del mRNA desde ese punto en adelante, provocando la lectura errónea de todas las palabras siguientes. Esta **mutación de cambio de fase** podría convertir gran parte del mensaje genético en un auténtico galimatías. No obstante, una deleción o adición de un par de bases en otro sitio cercano restablecería la fase de lectura, limitando el galimatías al corto trecho entre los dos sitios mutados. Considere el siguiente ejemplo, en el que se usan palabras de tres letras para representar codones:

Si quitamos la H: CON TEO HAN IDO DOS MAS
CON TEO ANI DOD OSM AS

Si insertamos la E: CON TEO ANE IDO DOS MAS

La inserción suprime el efecto de la deleción porque restablece el sentido de casi toda la frase. Por sí sola, sin embargo, la inserción también cambiaría el sentido de la frase:

CON TEO HAN EID ODO SMA S

Si suponemos que el mutante FCO se debe a una adición, entonces la segunda mutación (supresora) tuvo que ser una deleción porque, como hemos visto, así se restablecería la fase de lectura del mensaje resultante (una segunda inserción no la corregiría). En los siguientes diagramas, por simplicidad, utilizamos una cadena hipotética de nucleótidos para representar el RNA. También suponemos que las palabras del código están formadas por tres letras y se leen en una dirección concreta (de izquierda a derecha en nuestros diagramas).

1. Mensaje silvestre

CAU CAU CAU CAU CAU

2. Mensaje *rII*_x: las palabras distales cambian (x) debido a una mutación de cambio de fase (las palabras marcadas con (✓) permanecen igual)

Adición →
CAU ACA UCA UCA UCA U
✓ x x x x

3. Mensaje $rII_0 rII_b$; algunas palabras erróneas, pero la fase de lectura se recupera en palabras sucesivas

Delección

CAU	ACA	UCU	CAU	CAU
✓	×	×	✓	✓

Las pocas palabras incorrectas en el genotipo suprimido explicarían que los «revertientes» (fenotipos suprimidos) que Crick y sus colaboradores encontraron no fueran fenotípicamente iguales que el verdadero silvestre.

Hemos dado por supuesto que la mutación original era una adición, pero la explicación sería la misma si la mutación original FCO fuera una delección y la mutación supresora fuera una adición. Si asignamos el signo (+) a la mutación FCO, entonces la mutación supresora sería automáticamente de signo contrario (-). Se ha demostrado experimentalmente que una mutación (+) no puede suprimir a otra mutación (+), y una (-) tampoco puede suprimir a otra (-). En otras palabras, dos mutaciones del mismo signo nunca actúan como supresora una de la otra. Sin embargo, se ha demostrado que las combinaciones de *tres* mutaciones (+) o de *tres* mutaciones (-) pueden actuar conjuntamente restaurando el fenotipo silvestre.

Esta observación supuso la primera prueba experimental de que las palabras del código genético estaban compuestas por tres pares de nucleótidos consecutivos o tripletes. Sólo si las palabras son tripletes, se explica que tres adiciones o tres delecciones de un par de nucleótidos restauren automáticamente la fase de lectura del mRNA. Por ejemplo,

Delecciones

CAU	CAU	CAU	CAU	CAU	CAU	CAU
↓	↓		↓			
CAU	ACA	UAU	CAU	CAU	CAU	CAU
✓	×	×	✓	✓	✓	✓

Las pruebas de que las deducciones genéticas sobre la proflavina eran correctas proceden del análisis de mutaciones inducidas con proflavina en un gen cuyo producto proteico podía ser analizado. George Streisinger trabajó con el gen de la enzima lisozima, cuya secuencia de aminoácidos conocía. Utilizando proflavina, indujo una mutación en el gen y luego seleccionó revertientes inducidos también con proflavina, que genéticamente resultaron ser mutantes dobles (con mutaciones de signo opuesto). Como había predicho, al analizar la proteína de uno de los mutantes dobles, encontró un trecho de aminoácidos distintos entre dos extremos silvestres:

Silvestre:

—Thr—Lys—Ser—Pro—Ser—Leu—Asn—Ala

Revertiente:

—Thr—Lys—Val—His—His—Leu—Met—Ala

Degeneración del código genético

El trabajo de Crick sugería también que el código genético era **degenerado**. Esta expresión no pretende ser una descalificación

moral. Alude simplemente a que cada uno de los 64 tripletes debe tener algún significado en el código y, por tanto, al menos algunos de los aminoácidos deben de estar representados por dos o más tripletes distintos. Si sólo se usaran 20 tripletes (careciendo de sentido los 44 tripletes restantes, que no cifrarían ningún aminoácido), entonces se esperaría que la mayoría de las mutaciones de cambio de fase dieran lugar a palabras sin sentido, conduciendo presumiblemente a una paralización del proceso de fabricación de la proteína. Si así fuera, la supresión de los cambios de fase no ocurriría nunca o casi nunca. Si, por el contrario, todos los tripletes cifraran un aminoácido, entonces los cambios en las palabras simplemente provocarían la incorporación de aminoácidos erróneos en la proteína. Estas consideraciones llevaron a Crick a razonar que muchos de los aminoácidos, si no todos, tendrían varios nombres distintos en el código de pares de bases, hipótesis que posteriormente fue confirmada bioquímicamente.

COROLARIO

Los trabajos presentados hasta aquí demuestran que

1. El código genético no es solapado.
2. Tres bases cifran un aminoácido. Estos tripletes se denominan codones.
3. El mensaje empieza a leerse a partir de un punto fijo y el proceso de lectura continúa hasta el final de la secuencia informativa. Sabemos que es así porque una sola mutación de cambio de fase en cualquier parte de la secuencia informativa altera el alineamiento de los codones del resto de la proteína.
4. El código es degenerado, en el sentido de que algunos aminoácidos están representados por más de un codón.

El desciframiento del código

El desciframiento del código genético (la determinación del aminoácido cifrado por cada triplete) ha sido uno de los logros genéticos más excitantes de los últimos 50 años. Una vez que se dispuso de las técnicas experimentales necesarias, el código genético no tardó en descifrarse.

El primer logro fue descubrir la manera de producir mRNA sintético. Si se mezclan los nucleótidos del RNA con una enzima especial, la fosforilasa de polinucleótidos, se produce una reacción de síntesis de RNA de cadena sencilla. Esta síntesis ocurre en ausencia de DNA, por lo que los nucleótidos se incorporan al azar. Esta capacidad de sintetizar mRNA ofrecía la excitante posibilidad de crear moléculas de mRNA con secuencias particulares y analizar los aminoácidos determinados en ellas. El primer mensajero sintético obtenido, poli(U), se generó mezclando sólo nucleótidos de uracilo con la enzima sintetizadora de RNA, lo que produce —UUUU—. En 1961, Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei mezclaron poli(U) con la maquinaria de síntesis de proteínas de *E. coli in vitro* y *observaron la formación de proteína!* La excitación giraba principalmente en torno a cuál sería la secuencia de la proteína. Resultó ser polifenilalanina —una cadena de moléculas de fenilalanina unidas entre sí constituyen-

Diagram illustrating the structure of a protein chain. The top part shows a sequence of amino acids: -U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-U-. Below this, arrows point to a sequence of phenylalanine residues: -Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-Phe-.

A partir de estos datos, podemos deducir que los codones formados por una guanina y dos uracilos ($G + 2U$) determinan valina, leucina y cisteína, aunque no podemos asignar la secuencia específica de los tripletes que cifran cada uno de estos aminoácidos. De igual modo, un uracilo y dos guaninas ($U + 2G$) deben determinar triptófano, glicina y quizás algún otro. Parece que el modelo de Watson y Crick es correcto en su predicción de la

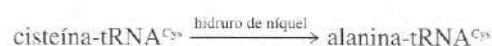
Codón	Probabilidad	Razón *
UUU	$p(\text{UUU}) = \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{27}{64}$	1.00
UUG	$p(\text{UUG}) = \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
UGU	$p(\text{UGU}) = \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
GUU	$p(\text{GUU}) = \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{9}{64}$	0.33
UGG	$p(\text{UGG}) = \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GGU	$p(\text{GGU}) = \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GUG	$p(\text{GUG}) = \frac{1}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{64}$	0.11
GGG	$p(\text{GGG}) = \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{64}$	0.03

CUADRO 10-4. Frecuencias observadas de varios aminoácidos en las proteínas traducidas a partir de un mRNA sintético compuesto de $\frac{3}{4}$ de uracilo y $\frac{1}{4}$ de guanina

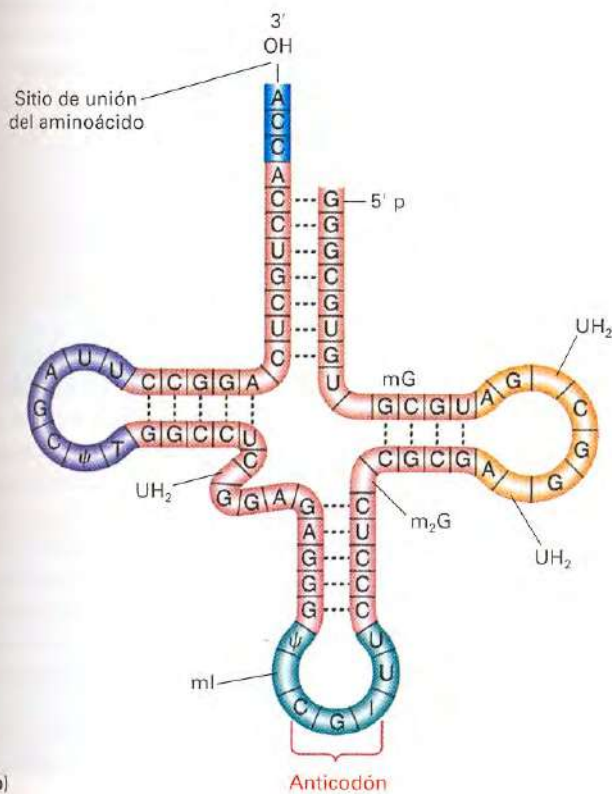
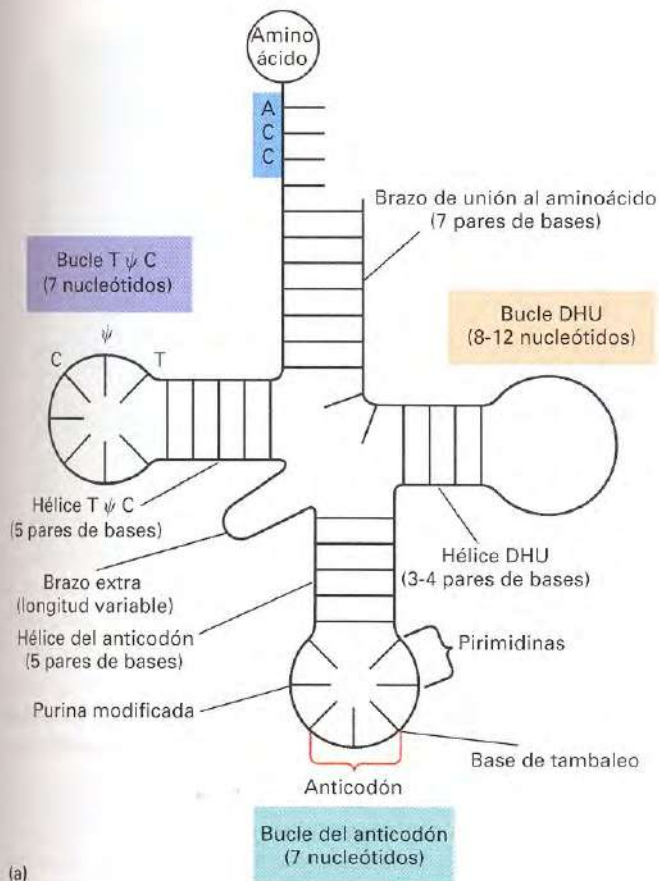
Aminoácido	Razón *
Fenilalanina	1.00
Leucina	0.37
Valina	0.36
Cisteína	0.35
Triptófano	0.14
Glicina	0.12

Antes de considerar otras palabras del código, analizaremos las moléculas de tRNA, que contribuyen a explicar el vínculo entre los codones del mRNA y el reconocimiento de aminoácidos concretos.

¿Es el tRNA o el propio aminoácido el que reconoce la porción del mRNA que cifra un aminoácido concreto? Un experimento muy convincente proporcionó la respuesta a esta pregunta. En dicho experimento, se trató el cisteinil-tRNA «cargado» con cisteína (tRNA^{Cys}) con hidruro de níquel, que convierte la cisteína unida al tRNA en el aminoácido alanina, sin afectar al tRNA:



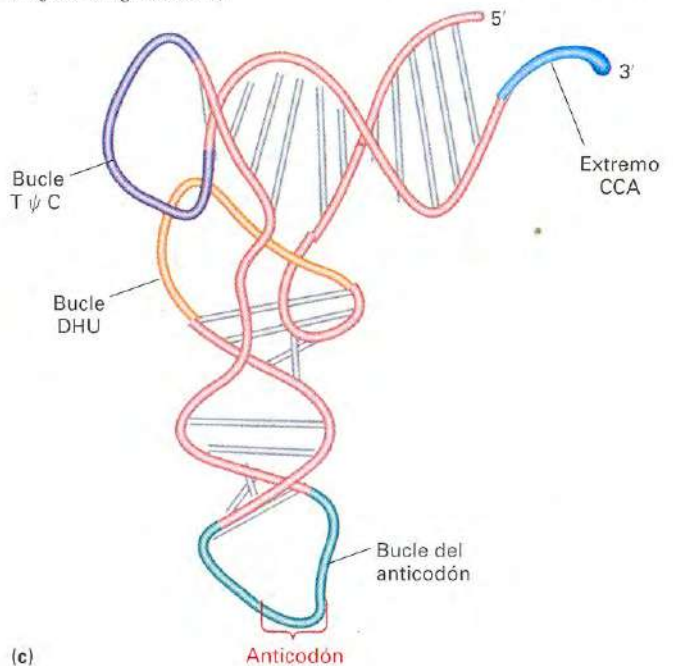
La Figura 10-26a muestra varios sitios funcionales de la molécula de tRNA. El sitio que reconoce un codón en el mRNA se denomina **anticodón**; sus bases son complementarias y antiparalelas a las bases del codón. Otro sitio operativo identificable es el sitio de unión al aminoácido. Es probable que los otros brazos cooperen en la unión del tRNA al ribosoma. La Figura 10-26b muestra un tRNA concreto (el tRNA de levadura para alanina). Las estructuras en forma de hoja de trébol «plana» que aparecen en estos diagramas no corresponden a la conformación real adoptada por las moléculas de tRNA; normalmente, el tRNA adopta una estructura de hoja de trébol plegada en forma de L.



como se muestra en la Figura 10-26c. Estos diagramas se basan en análisis químicos muy sofisticados de las secuencias de nucleótidos de los tRNA y en datos cristalográficos sobre la estructura global de la molécula. Aunque el parecido estructural entre las distintas moléculas de tRNA es grande, cada una de ellas adopta una estructura tridimensional única que permite su reconocimiento por la sintetasa correcta, encargada de catalizar la unión de un tRNA con su aminoácido específico para formar el aminoacil-tRNA. (Las sintetetas se tratarán en el apartado sobre «La síntesis de proteínas»). La especificidad del sistema de carga de los tRNA es fundamental para mantener la integridad del proceso de síntesis proteica.

¿De dónde proceden los tRNA? Si se introduce tRNA radiactivo en un núcleo celular cuyo DNA ha sido desnaturalizado parcialmente mediante calor, la radiactividad aparece localizada (por autorradiografía) en regiones concretas de los cromosomas. Probablemente, estas regiones reflejan la localización de los genes de los tRNA; se trata de regiones del DNA que no producen mRNA, sino tRNA. El tRNA marcado hibrida en esas posiciones por la complementariedad entre su secuencia de bases y la del gen parental. Una situación similar ocurre con el rRNA. Vemos, pues, que ni siquiera la idea «un gen-un polipéptido» es absolutamente válida. Algunos genes no cifran proteínas; en su lugar, determinan moléculas de RNA que forman parte de la maquinaria de traducción.

Figura 10-26. Estructura del RNA transferente. (a) Regiones funcionales de cualquier molécula de tRNA. (b) Secuencia específica del tRNA de la alanina de levadura. Las flechas señalan distintos tipos de bases modificadas raras. (c) Esquema de la estructura tridimensional real del tRNA de la fenilalanina de levadura. Los símbolos ψ , mG, m₂G, mI, y DHU (UH₂) son abreviaturas de las bases modificadas pseudouridina, metilguanósina, dimetilguanósina, metilinosina y dihidrouridina, respectivamente. (Parte a, tomada de S. Arnott, «The Structure of Transfer RNA», *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 22, 1971, 186; partes b y c, tomadas de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.^a ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer; parte c, basada en un dibujo de Sung-Hou Kim.)



COROLARIO

Algunos genes cifran proteínas; otros genes determinan RNA (tRNA o rRNA) como producto final.

¿Cómo adopta el tRNA su estructura tan curiosa? Probablemente, se pliega de forma espontánea en la conformación más estable. El RNA transferente contiene varias bases «raras» o modificadas (como el pseudouracilo, ψ) en sus nucleótidos; estas bases intervienen directamente en el plegamiento, además de cumplir otras funciones en el tRNA. Quizás haya advertido la existencia de algunos emparejamientos inusuales de bases en los lazos del tRNA en la Figura 10-26b, como una G emparejada por puentes de hidrógeno con una U (en vez de con una C). En el siguiente apartado se discute este emparejamiento aparentemente erróneo.

El código al completo

Dos tipos de experimentos permitieron descifrar las palabras específicas del código. El primero implicaba la síntesis de «mini mRNA» constituidos por tan sólo tres nucleótidos. Estos mini mRNA son demasiado cortos para ser traducidos en una proteína, pero inducen la unión de los aminoacil-tRNA a los ribosomas en una especie de intento fallido de traducción. Se puede sintetizar un mini mRNA específico y determinar *qué* aminoacil-tRNA se ha unido a los ribosomas. Por ejemplo, el problema de la combinación G + 2U discutido anteriormente puede resolverse utilizando los siguientes mini mRNA:

GUU, que estimula la unión de valil-tRNA
 UUG, que estimula la unión de leucil-tRNA
 UGU, que estimula la unión de cisteinil-tRNA

El uso de mini mRNA semejantes permitió descifrar los 64 codones posibles.

El segundo tipo de experimentos que sirvió para descifrar el código implicaba el uso de *copolímeros con repetición*. Por ejemplo, se utilizó el copolímero designado (AGA) $_n$, que consiste en una sucesión de nucleótidos AGAAGAAGAAGA, para la síntesis de proteínas *in vitro*. A partir de la secuencia de los polipéptidos resultantes y de los posibles tripletes que pueden darse en el copolímero de RNA, pudieron verificarse muchas de las palabras del código. (Este tipo de experimento se detalla en el Problema 10 de la serie de este capítulo. Al intentar resolverlo, se pondrá en el lugar de H. Gobind Khorana, galardonado con el Premio Nobel por la dirección de estos experimentos).

La Figura 10-27 ofrece el diccionario completo del código genético, compuesto por 64 palabras. Inspeccione este diccionario con cuidado y pondere el milagro de la Genética molecular. Esta labor de inspección debería revelar varios aspectos que requieren explicaciones adicionales.

Múltiples codones para un solo aminoácido

Como vimos en nuestra discusión sobre la degeneración del código, el número de codones para un aminoácido concreto varía desde uno (triptófano = UGG) hasta seis (serina = UCU, UCC,

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G
						Tercera letra

Figura 10-27. El código genético.

UCA, UCG, AGU o AGC). ¿Por qué? La respuesta es compleja pero no difícil de entender; podemos dividirla en dos partes:

1. Algunos aminoácidos pueden ser transportados hasta el ribosoma por varios tipos (especies moleculares) de tRNA *alternativos* que contienen anticodones diferentes, mientras que otros aminoácidos son transportados hasta el ribosoma por un solo tRNA.
2. Algunas especies de tRNA pueden incorporar su aminoácido específico en respuesta a varios codones distintos, no sólo uno, por cierto relajamiento en el emparejamiento entre el extremo 3' del codón y el extremo 5' del anticodón. Este emparejamiento algo permisivo se denomina **tambaleo**.

COROLARIO

El grado de degeneración para un aminoácido concreto está determinado por el número de codones para ese aminoácido que cuentan con un tRNA distinto, más el número de codones para dicho aminoácido que comparten un mismo tRNA por el tambaleo.

Es mejor que consideremos primero el tambaleo, ya que esto nos llevará a discutir las distintas especies de tRNA. El tambaleo implica una situación en la que el tercer nucleótido de un anticodón (en el extremo 5') no está perfectamente alineado (Fig. 10-28). Este nucleótido puede formar puentes de hidrógeno no sólo con su nucleótido complementario normal en la tercera posición del codón sino también con un nucleótido diferente en esa posición. Crick estableció una serie de «reglas de tambaleo» que rigen qué nucleótidos pueden formar nuevos enlaces de hidrógeno mediante tambaleo y cuáles no (Cuadro 10-5). En el Cuadro 10-5, la letra I denota inosina, una de las bases raras que se encuentran en el tRNA, a menudo en el anticodón.

La Figura 10-28 muestra los codones posibles reconocidos por una de las especies de tRNA para la serina. De acuerdo con

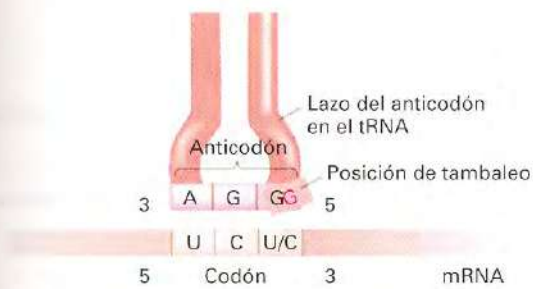


Figura 10-28. En la tercera posición (extremo 5') del anticodón, la G puede adoptar cualquiera de dos posiciones de tambaleo, emparejando así con U o con C. Esto significa que una sola especie de tRNA portador de un aminoácido (en este caso, serina) puede reconocer dos codones distintos —UCU y UCC— en el mRNA.

la regla del tambaleo, la G puede emparejar con U o con C. El Cuadro 10-6 incluye una lista de todos los codones para la serina e indica cómo estos codones pueden ser reconocidos por distintos tRNA.

En algunas ocasiones puede haber una especie adicional de tRNA, que representamos como $\text{tRNA}^{\text{Ser}_4}$, que tiene un anticodón idéntico a uno de los tres anticodones indicados en el Cuadro 10-6 pero difiere en otra parte de su secuencia nucleotídica. Estos cuatro tRNAs se denominan **tRNA isoaceptores** porque aceptan el mismo aminoácido, pero se transcriben a partir de genes diferentes.

Codones de terminación

El segundo detalle que puede que haya notado en la Figura 10-27 es que algunos codones no determinan aminoácido alguno. Estos codones se denominan **codones de parada o codones de**

CUADRO 10-5. Emparejamientos codón-anticodón permitidos por las reglas del tambaleo

Extremo 5' del anticodón	Extremo 3' del codón
G	U o C
C	sólo G
A	sólo U
U	A o G
I	U, C, o A

CUADRO 10-6. Distintos tRNA al servicio de los codones para serina

Codón	tRNA	Anticodón
UCU UCC	$\text{tRNA}^{\text{Ser}_1}$	AGG + tambaleo
UCA UCG	$\text{tRNA}^{\text{Ser}_2}$	AGU + tambaleo
AGU AGC	$\text{tRNA}^{\text{Ser}_3}$	UGG + tambaleo

terminación. Pueden considerarse como signos de puntuación, al igual que las comas o los puntos, que indican el fin del mensaje cifrado por el mRNA.

Uno de los primeros indicios de la existencia de codones de parada procede del trabajo realizado en 1965 por Brenner con el fago T4. Brenner analizó ciertas mutaciones (m_1 — m_6) en el gen que determina la síntesis de la proteína de la cápsida viral. Estos mutantes presentaban dos cosas en común. En primer lugar, la proteína de la cápsida viral de cada mutante era más corta que la del silvestre. En segundo lugar, la presencia de una mutación supresora (*su*) en el cromosoma de la célula hospedadora tenía como resultado la aparición de una proteína de la cápsida de longitud normal (silvestre) a pesar de la presencia de la mutación *m* (Fig. 10-29).

Brenner examinó los extremos de las proteínas acortadas y los comparó con la proteína silvestre, registrando para cada mutante el aminoácido que *habría* seguido insertándose para continuar con la cadena silvestre. Para los seis mutantes, estos aminoácidos habrían sido glutamina, lisina, ácido glutámico, tirosina, triptófano y serina. Estos resultados no muestran un patrón que resulte inmediatamente obvio, pero Brenner hizo la brillante deducción de que algunos de los codones para cada uno de estos aminoácidos eran similares en cuanto a que podían mutar al codón UAG por cambio de un solo par de nucleótidos en el DNA. Propuso, por tanto, que UAG se interpretaba como un codón de terminación, es decir, como una señal que avisa a la maquinaria de traducción de que la proteína está completa.

UAG fue el primer codón de terminación que se descifró y es conocido como **codón ámbar**. Los mutantes cuyo fenotipo defectuoso se debe a la presencia de un codón ámbar prematuro se denominan *mutantes ámbar*, y a sus supresores se les llama *supresores ámbar*. UGA, el **codón ópalo**, y UAA, el **codón ocre**, son también codones de terminación que cuentan con sus respectivos supresores. Los codones de terminación suelen denominarse **codones sin sentido** puesto que no cifran ningún aminoácido. No es ninguna sorpresa, entonces, que los codones de terminación no funcionen como mini mRNA induciendo *in vitro* la unión de un aminoacil-tRNA a los ribosomas. Más adelante, una vez que hayamos analizado el proceso de síntesis proteica, volveremos a considerar los codones de terminación y sus supresores.

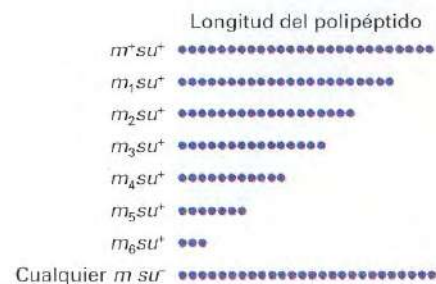


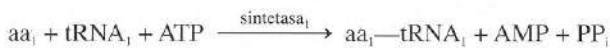
Figura 10-29. Tamaño de las cadenas polipeptídicas de la proteína de la cápsida del fago T4 en la estirpe silvestre (*parte superior*) y en varios mutantes ámbar (*m*). Un supresor ámbar (*su*) conduce a la síntesis de una cadena del mismo tamaño que la silvestre y al desarrollo del fenotipo silvestre.

La síntesis de proteínas

Podemos contemplar la **síntesis proteica** como una reacción química, y esta aproximación es la que utilizaremos en primer lugar. Luego prestaremos atención a las interacciones físicas que ocurren entre los principales componentes de la maquinaria de síntesis.

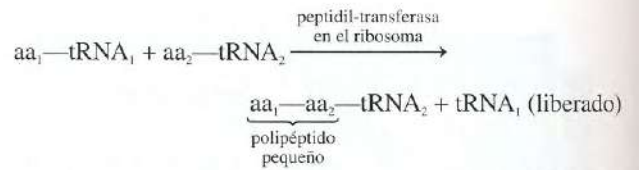
Cuando se considera la síntesis de proteínas como una reacción química:

1. Cada aminoácido se une a la molécula de tRNA adecuada mediante un enlace rico en energía derivado del ATP. El proceso lo cataliza una enzima específica denominada **sintetasa** (se dice que el tRNA está «cargado» cuando se ha unido a un aminoácido):

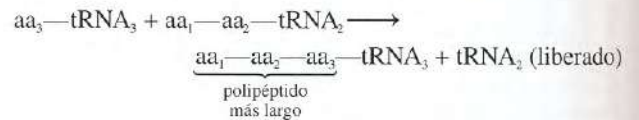


Existe una sintetasa diferente para cada aminoácido.

2. La energía del tRNA cargado se invierte en la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido del tRNA y otro aminoácido en el ribosoma:



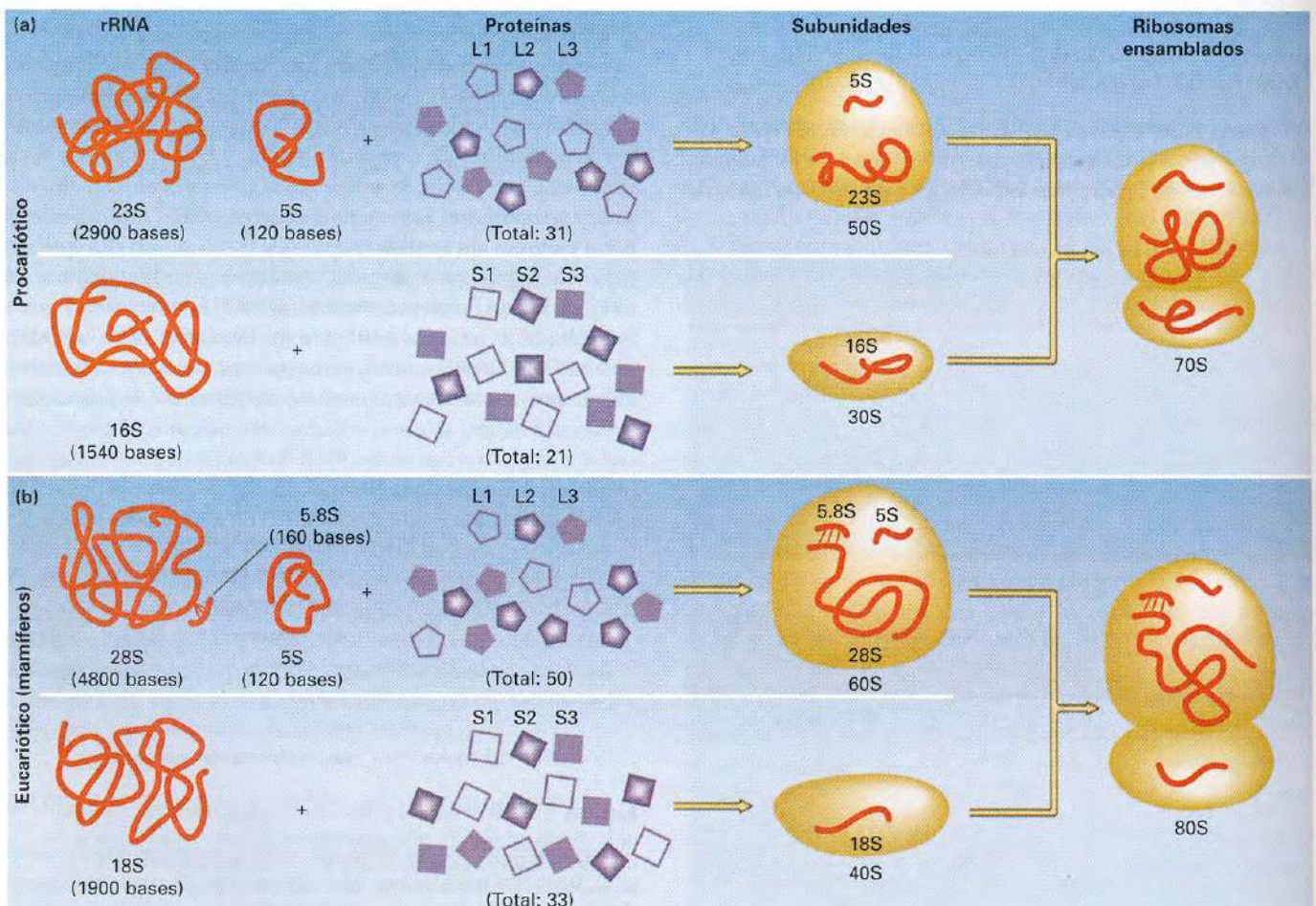
3. Los nuevos aminoácidos se unen a la cadena naciente mediante un enlace peptídico:



4. Este proceso continúa hasta que se añade el aa_n (el último aminoácido). Por supuesto, el proceso sólo funciona en presencia a la vez de mRNA, ribosomas, varios factores proteicos adicionales, enzimas e iones inorgánicos.

Los ribosomas

Los ribosomas están constituidos por dos subunidades que, en procariotas, sedimentan como partículas de 50S y 30S, que se asocian formando una partícula 70S, como se muestra en la Figura 10-30a. En los ribosomas eucarióticos, la subunidad grande



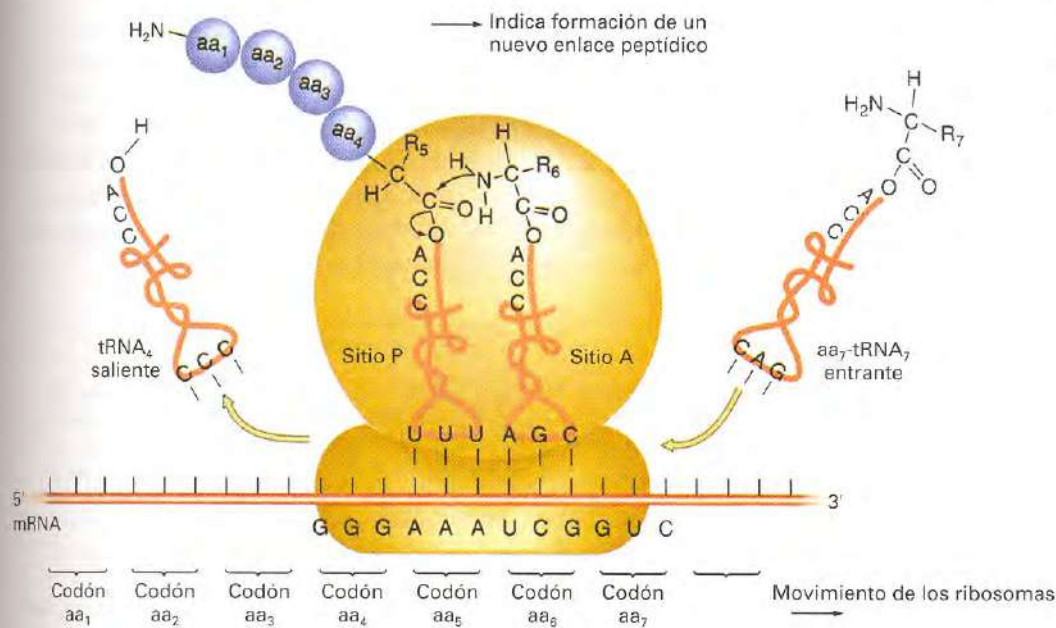


Figura 10-31. Adición de un aminoácido a la cadena polipeptídica creciente durante la traducción del mRNA.

es 60S, la subunidad pequeña 40S y el ribosoma completo 80S (Fig. 10-30b). Los ribosomas contienen sitios específicos que les permiten unirse al mRNA, a los tRNA y a otros factores proteicos específicos, todos ellos necesarios para la síntesis de proteínas. Examinemos primero la síntesis de proteínas en el ribosoma desde una perspectiva general y después veremos cada uno de los pasos con más detalle.

La Figura 10-31 muestra la síntesis de un polipéptido en el ribosoma. El mRNA se une a la subunidad pequeña 30S. Los tRNA se unen a dos sitios en el ribosoma que cubren parte de ambas subunidades. El **sitio A** es el punto de entrada para un aminoacil-tRNA (un tRNA portador de un solo aminoácido). El peptidil-tRNA, portador de la cadena polipeptídica creciente, se une al **sitio P**. Cada aminoácido nuevo se añade por transferencia de la cadena creciente al nuevo aminoacil-tRNA, dando lugar a la formación de un nuevo enlace peptídico. El tRNA que ha transferido su aminoácido se disocia entonces del sitio P y el ribosoma avanza hasta el siguiente codón del mensaje, transfiriendo el nuevo peptidil-tRNA al sitio P y dejando vacante el sitio A para el siguiente aminoacil-tRNA entrante.

El proceso de síntesis proteica se divide en tres etapas: **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Examinemos cada una de estas etapas con detalle, utilizando como ejemplo a los procariotas.

Figura 10-30. Los ribosomas constan de una subunidad grande y una pequeña. Cada subunidad contiene rRNA de distintas longitudes y un conjunto de proteínas (representadas con diferentes formas y tonos de colores). En todos los ribosomas hay dos moléculas principales de rRNA. (a) Los ribosomas procarióticos contienen además un rRNA de 120 bases que sedimenta a 5S. (b) Los ribosomas eucarióticos contienen dos rRNA pequeños: una molécula de rRNA 5S similar a la procariótica 5S y una molécula de 160 bases que sedimenta a 5.8 S. Las proteínas de la subunidad grande se denominan L1, L2, etc., y las de la subunidad pequeña S1, S2, etc. (De H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright ©, 1995 de Scientific American Books, Inc.).

Iniciación

Los tres pasos de la iniciación. Además del mRNA, los ribosomas y las moléculas específicas de tRNA, la iniciación requiere la participación de varios factores denominados **factores de iniciación IF1, IF2 e IF3**. En *E. coli* y en la mayoría de los organismos procarióticos restantes, el primer aminoácido de cualquier polipéptido recién sintetizado es la *N*-formilmetionina. En su incorporación no interviene el tRNA^{Met} sino un **tRNA iniciador** denominado tRNA^{Met}. Este tRNA iniciador tiene el anticodón normal para metionina pero inserta *N*-formilmetionina en vez de metionina (Fig. 10-32). En *E. coli*, AUG y GUG, y rara vez UUG, funcionan como codones de iniciación. Cuando uno de estos codones aparece en la posición de iniciación, el *N*-formilMet-tRNA lo reconoce y se incorpora *N*-formilmetionina como primer aminoácido de la cadena. Examinemos los pasos con mayor detalle.

1. El primer paso en la iniciación consiste en la unión del mRNA a la subunidad 30S (Fig. 10-33). El factor IF3 estimula dicha unión. Cuando no están ocupadas en la síntesis de proteínas, las subunidades ribosómicas están separadas; su ensamblaje para formar ribosomas completos ocurre como resultado del proceso de iniciación.
2. El factor de iniciación IF2 se une a GTP y al iniciador fMet-tRNA, y estimula la unión del fMet-tRNA al complejo de iniciación, guiando el fMet-tRNA hasta el sitio P, como se muestra en la Figura 10-33.
3. Una de las proteínas ribosómicas hidroliza el GTP unido a IF2, promoviendo así el ensamblaje de las dos subunidades ribosómicas (Fig. 10-33, parte inferior). En este momento, se disocian los factores IF2 e IF3. (Se desconoce cuál es la función exacta de IF1, aunque parece que participa en el proceso de reciclado de los ribosomas).

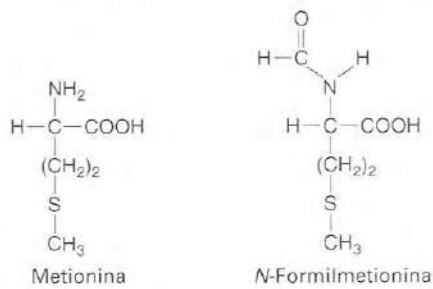


Figura 10-32. Estructura de la metionina (Met) y de la N-formilmetionina (fMet). En procariotas, un tRNA cargado con fMet puede iniciar una cadena polipeptídica, pero no puede incorporarse a una cadena en crecimiento; un tRNA cargado con Met puede insertarse en una cadena en crecimiento, pero no puede iniciar una nueva cadena. Ambos tRNA llevan el mismo anticodón, complementario al codón AUG.

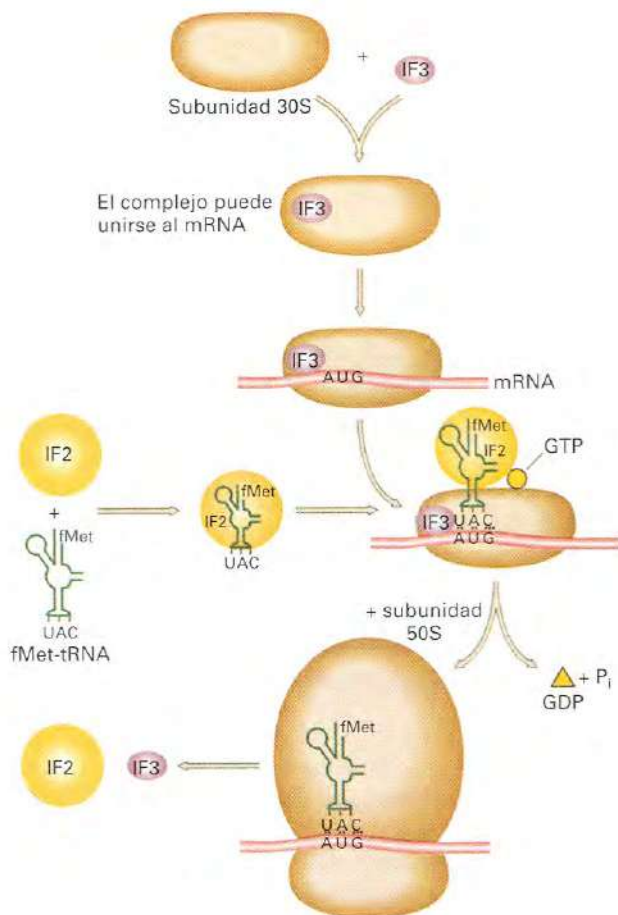


Figura 10-33. Pasos en la iniciación de la traducción (consulte el texto).

Figura 10-35. Unión entre la secuencia Shine-Dalgarno de un mRNA y el extremo 3' del rRNA 16S. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

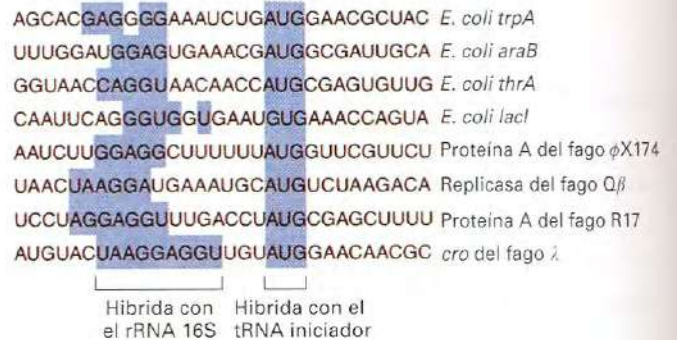
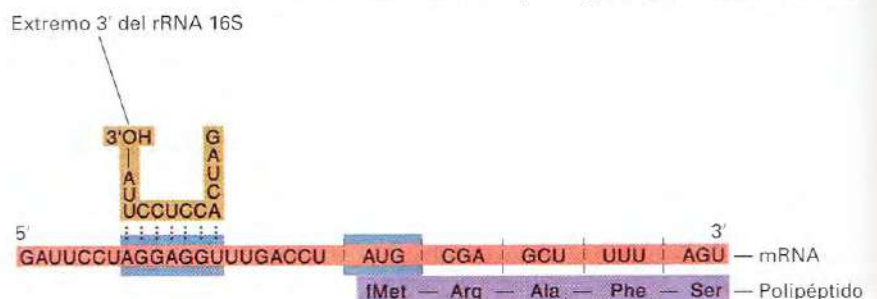


Figura 10-34. Las secuencias de los sitios de unión al ribosoma de *E. coli* y sus bacteriófagos muestran ciertos rasgos en común, que aparecen coloreados en rojo en la figura. El codón de iniciación (en color) está separado unos cuantos nucleótidos de una secuencia corta (en color) que es complementaria al extremo 3' del rRNA 16S. (Tomado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 de Lubert Stryer.)

Sitios de unión al ribosoma. ¿Cómo se seleccionan los codones de iniciación correctos entre los muchos codones AUG y GUG de una molécula de mRNA? John Shine y Lynn Dalgarno fueron los primeros en advertir que los verdaderos codones de iniciación estaban precedidos por secuencias que emparejaban bien con el extremo 3' del rRNA 16S. La Figura 10-34 muestra algunas de estas secuencias. Entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de iniciación existe una separación pequeña pero variable. La Figura 10-35 muestra el emparejamiento entre un mRNA hipotético y el rRNA 16S que, en presencia de fMet-tRNA, promueve la formación de complejos ribosoma-mRNA para el inicio de la síntesis proteica.

Elongación

En la Figura 10.36 se detallan los pasos del proceso de elongación, en los que colaboran tres proteínas, EF-Tu, EF-Ts y EF-G. Los pasos son:

1. El factor de elongación EF-Tu media la entrada de los aminoacil-tRNA al sitio A. Para ello, es necesario que EF-Tu se una primero a GTP. Este complejo EF-Tu-GTP activado se une al tRNA. A continuación, la hidrólisis del GTP a GDP favorece la unión del aminoacil-tRNA al sitio A, en cuyo momento se disocia el factor EF-Tu (Fig. 10-36a), dejando el nuevo tRNA en el sitio A (Fig. 10-36b).
2. El factor de elongación EF-Ts media la liberación de EF-Tu-GDP del ribosoma y la regeneración de EF-Tu-GTP.

3. En el paso siguiente, la translocación, se transfiere la cadena polipeptídica del peptidil-tRNA al aminoacil-tRNA que ocupa el sitio A, en una reacción catalizada por la enzima peptidil-transferasa (Fig. 10-36c). Es entonces cuando el ribosoma se transloca, avanzando un codón en el mRNA, al

moverse en dirección $5' \rightarrow 3'$. Este paso está mediado por el factor de elongación EF-G (Fig. 10-36d) y activado por la hidrólisis de GTP a GDP. En el proceso se libera el tRNA descargado del sitio P y se transfiere el peptidil-tRNA recién formado desde el sitio A al sitio P (Fig. 10-36e).

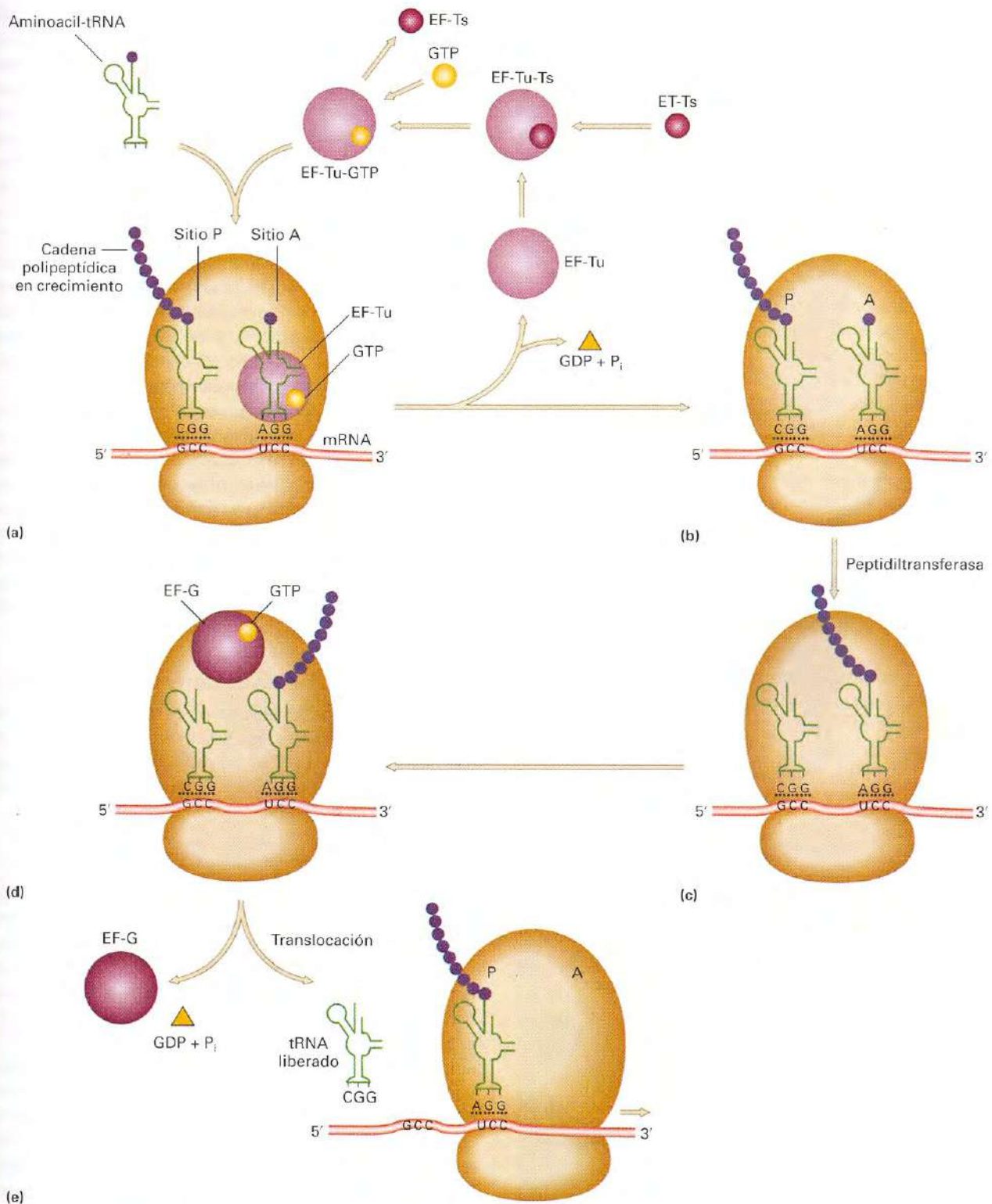


Figura 10-36. Pasos en la elongación (consulte el texto).

Terminación

Factores de liberación. En nuestra discusión previa sobre el código genético, hablamos de los tres codones de terminación de la síntesis proteica, UAG, UGA y UAA. Significativamente, ninguno de los tres codones de terminación son reconocidos por un tRNA, sino por factores proteicos denominados **factores de liberación**, abreviadamente **RF1** y **RF2**. RF1 reconoce los tripletes UAA y UAG, y RF2 reconoce los tripletes UAA y UGA. Existe un tercer factor, **RF3**, que también colabora en la catálisis

de la reacción de terminación. Cuando el peptidil-tRNA ocupa el sitio P, los factores de liberación, en respuesta a la presencia de los codones de terminación, se unen al sitio A. El polipéptido entonces se libera del sitio P, y las dos subunidades de los ribosomas se disocian en una reacción favorecida por la hidrólisis de GTP. La Figura 10-37 muestra un esquema del proceso.

Supresores de las mutaciones sin sentido. Conviene considerar los supresores de mutaciones sin sentido aislados por Brenner y sus colaboradores. Muchas de estas **mutaciones supresoras de fin de mensaje** provocan una alteración en el lazo del anticodón de algunos tRNA específicos, permitiendo que ahora reconozcan una mutación sin sentido en el mRNA. Como consecuencia, se inserta un aminoácido en respuesta al codón de parada prematuro y la traducción no se detiene en este triplete. En la Figura 10-38, se muestra una mutación ámbar que ha provocado la sustitución del codón silvestre por el codón de parada UAG. Por sí mismo, el codón UAG provocaría la terminación prematura de la traducción en esa posición y el consiguiente acortamiento de la proteína. La mutación supresora, en este caso, ha dado lugar a la aparición de un tRNA^{Tyr} con un anticodón que reconoce el codón mutado UAG. Por ello, el mutante suprimido contiene tirosina en la posición correspondiente de la proteína.

¿Qué sucede con las señales normales de parada, que dictan la terminación correcta de la síntesis proteica, en presencia de un supresor? En muchas de las señales de terminación naturales se encuentran dos codones de terminación consecutivos. Dado que la supresión es un fenómeno bastante ineficaz, debido a la competición con los factores de liberación, la probabilidad de que se supriman dos codones de terminación sucesivos es bastante baja. Por ello, se producen muy pocas proteínas que se hayan alargado como consecuencia de que la traducción prosiga más allá del codón normal de parada.

Resumen del proceso de síntesis de proteínas

La Figura 10-39 ofrece un resumen de los pasos tratados en esta sección sobre el proceso de síntesis de las proteínas. Una visión directa de la síntesis proteica la ofrece la micrografía electrónica de la Figura 10-40, que muestra la transcripción y traducción de un gen de *E. coli*.

Procesamiento de proteínas

El procesamiento puede continuar incluso después de que el mRNA se haya traducido en su correspondiente producto proteico. Por ejemplo, las proteínas de membrana o las proteínas secretadas por la célula se sintetizan con un péptido líder corto, denominado **secuencia señal**, en el extremo amino (N-terminal). Dicha secuencia señal está constituida por un trecho de 15 a 25 aminoácidos, de los cuales la mayoría son hidrofóbicos. Estos aminoácidos son reconocidos por factores y receptores proteicos que median el transporte a través de la membrana celular; en este proceso, una peptidasa introduce un corte que libera la secuencia señal (Fig. 10-41). (En el caso de algunas proteínas bacterianas que se secretan ocurre un fenómeno similar). Además, varias hormonas peptídicas pequeñas, tales como la corticotropina (ACTH), se producen tras el procesamiento específico de una proteína precursora de mayor tamaño.

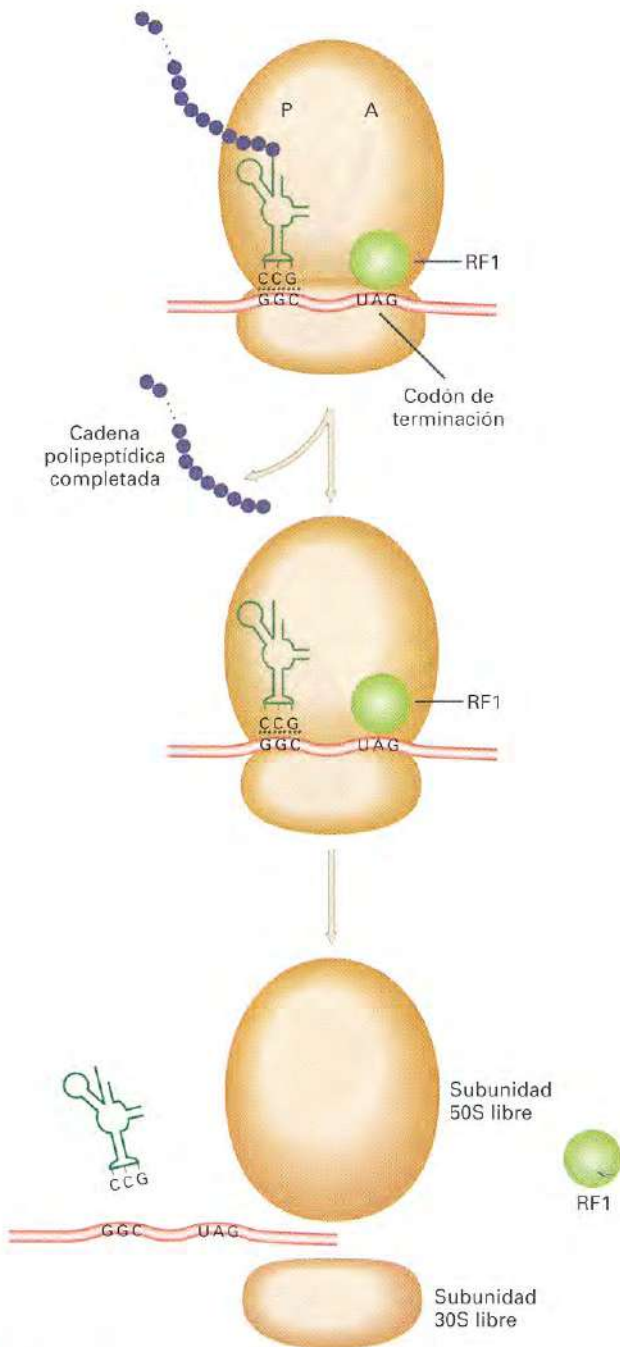


Figura 10-37. Pasos que conducen a la terminación de la síntesis proteica (consulte el texto).

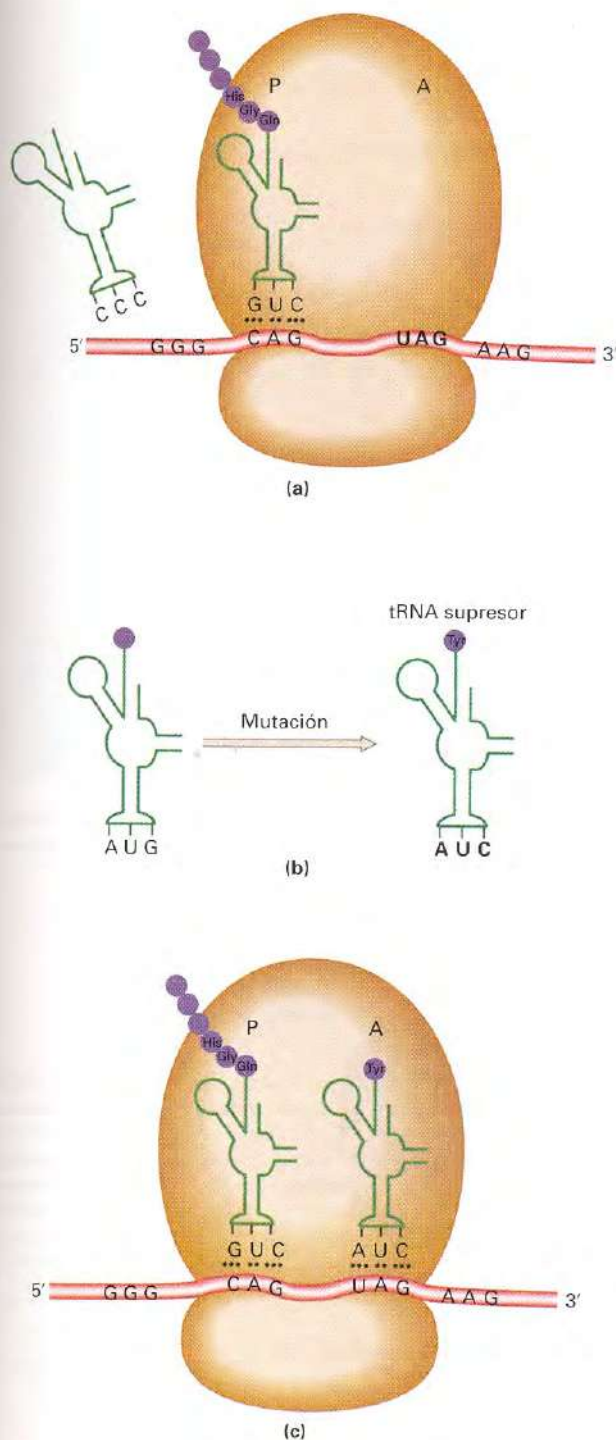


Figura 10-38. (a) Terminación de la traducción. En el ejemplo, la maquinaria de traducción no puede avanzar más allá del codón sin sentido (UAG, en este caso), debido a que no existe ningún tRNA capaz de reconocer el triplete UAG. Esto provoca la terminación prematura de la síntesis proteica y la liberación de un polipéptido más corto de lo normal. En el dibujo no se han incluido los factores de liberación. (b) Consecuencias moleculares de una mutación que altera el anticodón de uno de los tRNA de la tirosina, de manera que sea capaz de leer el codón UAG. (c) Supresión del codón UAG por el tRNA alterado, que permite ahora la elongación de la cadena. (Tomado de D. Watson, J. Tooze, y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*. Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company.)

Corte y empalme de segmentos proteicos

Tanto en los procariotas como en los eucariotas se ha observado un fenómeno sorprendente que consiste en la eliminación de segmentos internos de algunas proteínas. Estos segmentos internos se denominan **secuencias proteicas interpuestas** o **IVPS** (del inglés *Intervening Protein Sequence*). El aspecto más destacado de este proceso es que se forma un nuevo enlace peptídico entre las dos secuencias que flanquean la IVPS. La reacción es autocatalítica y puede ocurrir *in vitro*. La Figura 10-42 muestra un esquema del proceso de corte y empalme de proteínas. Curiosamente, todas las secuencias IVPS estudiadas hasta el momento muestran actividad endonucleasa, aunque esta actividad no está relacionada con la reacción de corte y empalme de proteínas.

Universalidad del flujo de la información genética

Hasta ahora, nuestra discusión ha girado en torno a lo que ocurre en los procariotas; lo sorprendente, sin embargo, es que el flujo de información y los procesos de cifrado son virtualmente idénticos en todos los organismos estudiados. Por ejemplo, el código genético deducido a partir de *E. coli* permite explicar satisfactoriamente todos los cambios de un solo aminoácido conocidos en la hemoglobina humana que resultan del cambio de un solo par de nucleótidos (Cuadro 10-7). Tales observaciones sugieren que el código genético es el mismo en todos los seres vivos. Además, una molécula informativa, tal como el mRNA de eritrocito de conejo, que está compuesto mayoritariamente por el transcrito del gen de la hemoglobina, en un ambiente no natural (como el oocito de rana) será traducido en hemoglobina de conejo (Fig. 10-43). Al parecer, la maquinaria de traducción es funcionalmente equivalente en una gama amplia de organismos.

Las técnicas de secuenciación de proteínas, RNA y DNA (véase el Cap. 12) han ratificado que el código genético es universal en todos los organismos estudiados hasta la fecha, desde los virus a las bacterias y los seres humanos. Las mitocondrias son

CUADRO 10-7. Mutaciones y cambios de codones inferidos de las mismas

Proteína *	Cambio de aminoácido	Cambio de codón inferido
Hemoglobina	Glu → Val	GAA → GUA
Hemoglobina	Glu → Lys	GAA → AAA
Hemoglobina	Glu → Gly	GAA → GGA
Sintetasa de triptófano	Gly → Arg	GGA → AGA
Sintetasa de triptófano	Gly → Glu	GGA → GAA
Sintetasa de triptófano	Glu → Ala	GAA → GCA
Proteína de la envoltura del TMV	Leu → Phe	CUU → UUU
Proteína de la envoltura del TMV	Glu → Gly	GAA → GGA
Proteína de la envoltura del TMV	Pro → Ser	CCC → UCC

* Mutaciones de la hemoglobina humana, de la sintetasa de triptófano de *E. coli* y de la proteína de la envoltura del virus del mosaico del tabaco (TMV).

Fuente: L. Stryer, *Biochemistry*, 2.ª ed. Copyright © 1981 de Lubert Stryer.

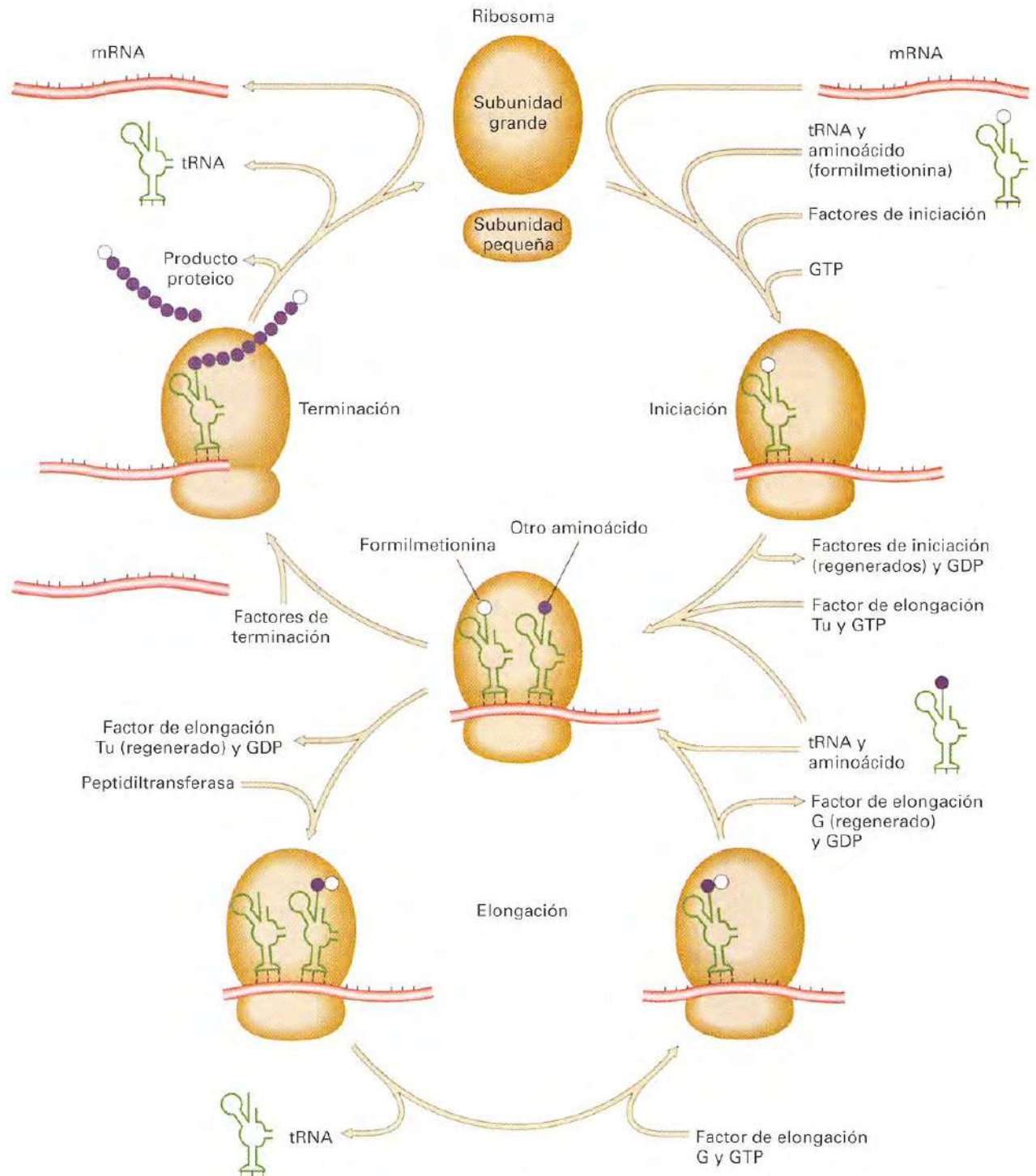


Figura 10-39. Las distintas operaciones que ocurren en el ribosoma. En la iniciación, el ribosoma reconoce la secuencia iniciadora en el mRNA y capta una molécula de tRNA cargada con un solo aminoácido. En todas las proteínas bacterianas, el primer aminoácido es la *N*-formilmetionina. En la elongación, un segundo aminoácido es añadido al primero. El ribosoma se desplaza entonces sobre la molécula de mRNA y el ciclo de elongación se repite. Cuando se alcanza el codón de terminación, la cadena de aminoácidos se pliega espontáneamente para formar la proteína. Seguidamente, el ribosoma se disocia en sus dos subunidades, que se reasocian antes de traducir una nueva molécula de mRNA. En la síntesis de proteínas colaboran varias proteínas catalíticas (factores de iniciación, elongación y terminación) y el trifosfato de guanosina, una pequeña molécula que libera energía al ser transformada en difosfato de guanosina (GDP). (Tomado de D. M. Engleman y P. B. Moore, «Neutron-Scattering Studies of the Ribosome». Copyright © 1976 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

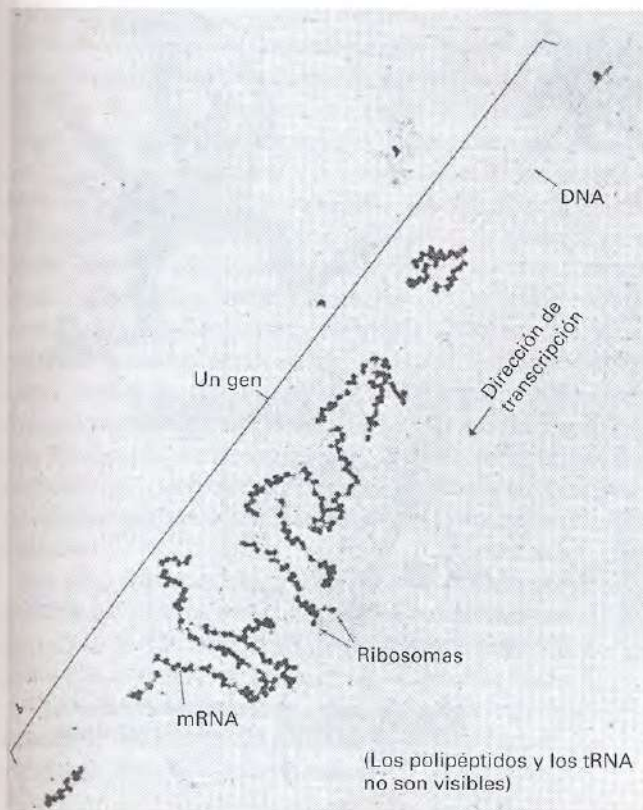
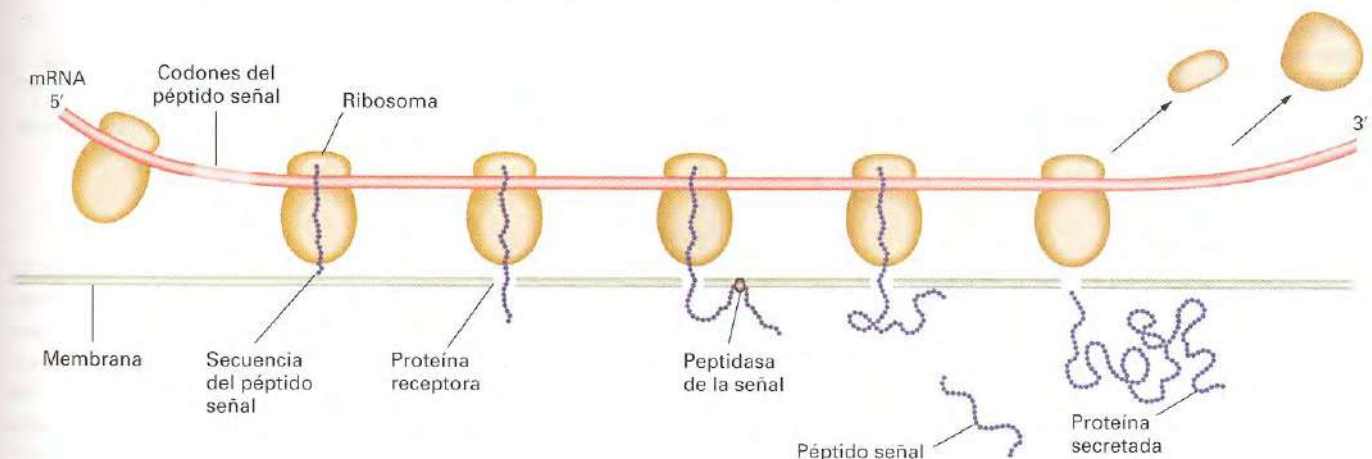


Figura 10-40. Gen de *E. coli* siendo transcrito y traducido de forma simultánea. (Micrografía electrónica de O. L. Miller, Jr., y Barbara A. Hamkalo.)

Figura 10-41. Secuencia señal. Las proteínas destinadas a ser secretadas al exterior de la célula presentan, en su extremo amino, una secuencia rica en aminoácidos hidrofóbicos. Esta secuencia señal se une a la membrana y arrastra al resto de la proteína a través de la bicapa lipídica. La secuencia señal es eliminada durante este proceso por una enzima denominada *peptidasa de la señal*. (Tomado de J. D. Watson, J. Tooze, y D. T. Kurtz, *Recombinant DNA: A Short Course*. Copyright © 1983 de W. H. Freeman and Company.)



una excepción (véase también el Cap. 21). En este caso, dos codones se traducen de manera distinta, debido a las características de los tRNA propios del sistema mitocondrial. Así pues, aunque el codón AUA normalmente significa isoleucina, en las mitocondrias se lee como metionina. Además, en las mitocondrias de mamífero, UGA se lee como triptófano, a pesar de que UGA normalmente es un codón de terminación. En las levaduras, las mitocondrias traducen UGA como triptófano, al igual que las mitocondrias de mamífero, pero AUA se lee como isoleucina, como en los sistemas bacterianos (no mitocondriales). Se han encontrado otras excepciones al código universal en el genoma nuclear de algunos protozoos. Como tendremos ocasión de comprobar en el Capítulo 13, a través de ciertos experimentos de Ingeniería genética, el DNA es DNA independientemente de su origen. La naturaleza y el mensaje del DNA representan un lenguaje de vida universal sobre la Tierra.

Esta equivalencia interespecífica de los componentes del aparato genético ¿refleja la existencia de un ancestro evolutivamente común a todas las formas vivas que habitan en la Tierra? ¿O refleja simplemente que ésta es la única opción bioquímica operativa en el ámbito terrestre (predestinación bioquímica)? Cualquiera que sea la respuesta, la maravillosa uniformidad de la base molecular de la vida está firmemente establecida. Existen pequeñas variaciones que no alcanzan a empañar la uniformidad fundamental del mecanismo que hemos descrito.

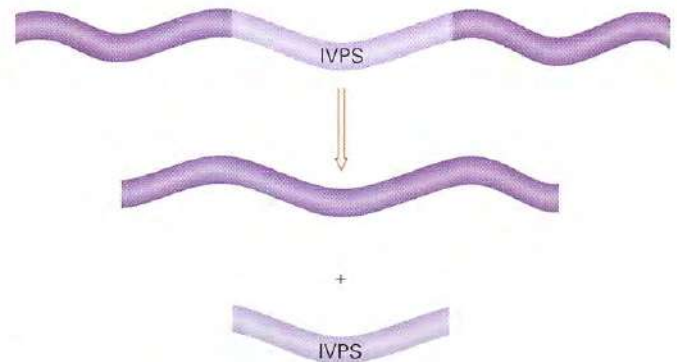


Figura 10-42. El procesamiento de proteínas conduce a la eliminación de un segmento interno (IVPS) y la formación de un nuevo enlace peptídico, que acaba uniendo las dos regiones originalmente adyacentes al segmento eliminado.

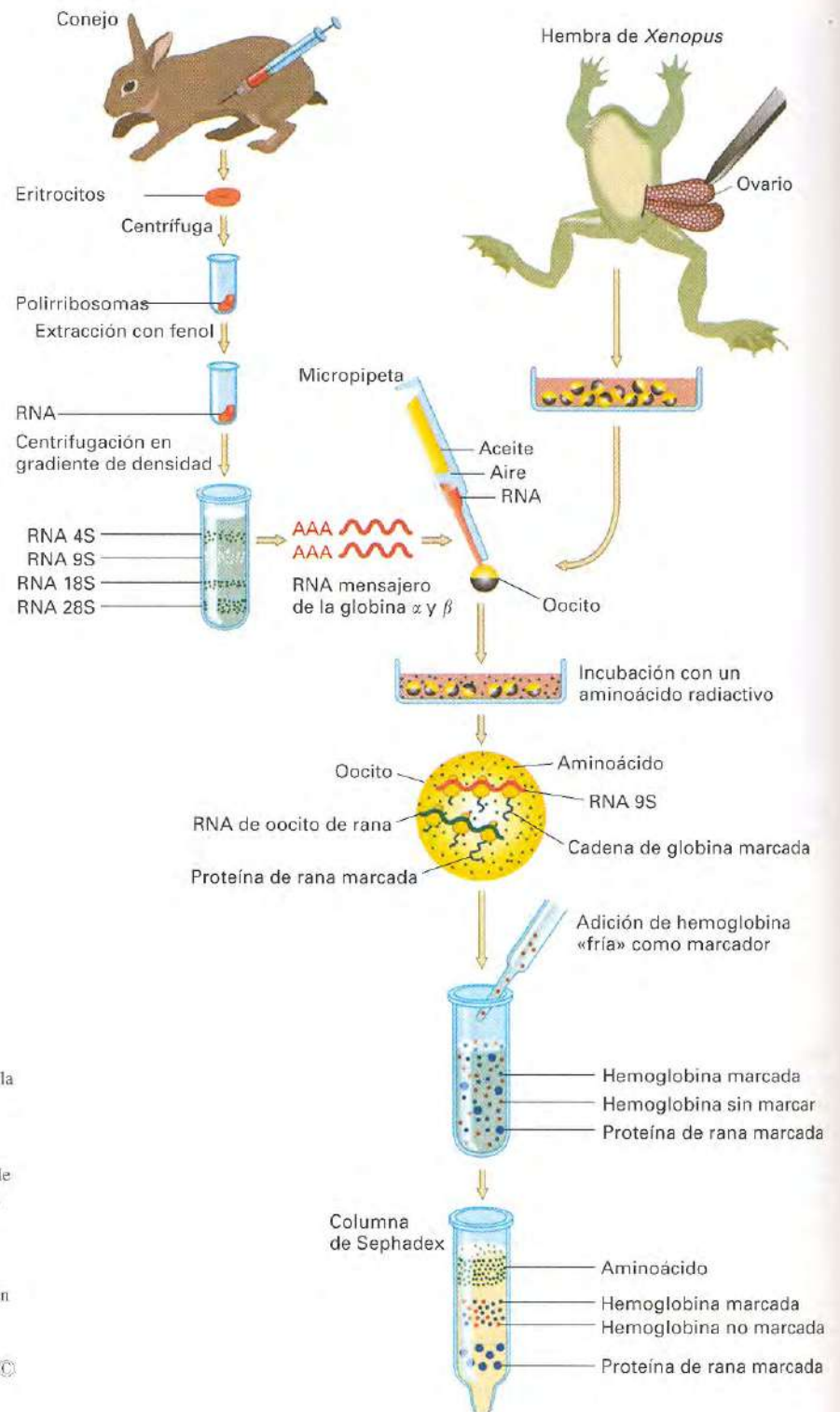


Figura 10-43. Traducción del mRNA de la hemoglobina de conejo en oocitos de rana (*Xenopus*) produce hemoglobina de conejo. Esta traducción la realiza la maquinaria de síntesis de *Xenopus*. Se inyecta el mRNA de la hemoglobina de conejo en un oocito de *Xenopus*, que luego se incuba en presencia de aminoácidos marcados radiactivamente. A continuación, los productos de la traducción se separan en una columna de cromatografía. La hemoglobina del conejo se identifica comparando su posición con la de hemoglobina de conejo no marcada. Este experimento es uno de los tantos que demuestran la uniformidad de los mecanismos moleculares genéticos en todas las formas vivas. (El Sephadex es un material de separación empleado en cromatografía). (Tomado de C. Lane, «Rabbit Hemoglobin from Frog Eggs». Copyright © 1976 de Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.)

División funcional del trabajo en el conjunto de genes

¿Qué tipos diferentes de genes son necesarios para construir un organismo? Recientemente, la secuenciación de varios genomas completos ha permitido empezar a vislumbrar la respuesta, de modo que tenemos ya cierta idea sobre las categorías generales

de genes y el tamaño relativo de estas categorías. Dos de los organismos eucarióticos para los que se conoce la secuencia completa de nucleótidos son la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, que cuenta con más de 6300 genes, y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, con más de 19 000 genes. En la levadura, 140 genes determinan rRNA, 40 determinan RNA nucleares pequeños y 275 determinan tRNA (comparados con 877 en el nematodo).

Del total de genes, 6217 en la levadura, y 19 099 en el nematodo, cifran proteínas. El conjunto de genes que determinan proteínas en un organismo se denomina **proteoma**. La división de funciones dentro del proteoma es un tema de considerable interés para la comprensión de qué tipos de genes se necesitan para que un organismo funcione. La comparación de las proteínas predichas por análisis de las secuencias genómicas de la levadura y del nematodo ha puesto de manifiesto un parecido extraordinario entre las proteínas que en ambos organismos cumplen funciones biológicas fundamentales, pero no entre las proteínas específicas de cada organismo. La Figura 10-44 muestra que el número de proteínas implicadas en las tareas biológicas básicas es muy similar en ambos organismos. Por lo tanto, aunque muchos procesos biológicos fundamentales los realizan proteínas muy parecidas en ambos organismos, la gran diferencia observada en el número total de proteínas debe explicarse por la existencia de proteínas que desempeñan funciones específicas de cada organismo.

Los datos obtenidos tras la secuenciación de una porción considerable del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han permitido elaborar una visión tentativa del proteoma de una planta, que se representa esquemáticamente en la Figura 10-45.

A partir de tales estimaciones puede empezar a perfilarse vagamente la base genética que sustenta la vida en este planeta, incluyendo la de la especie humana.

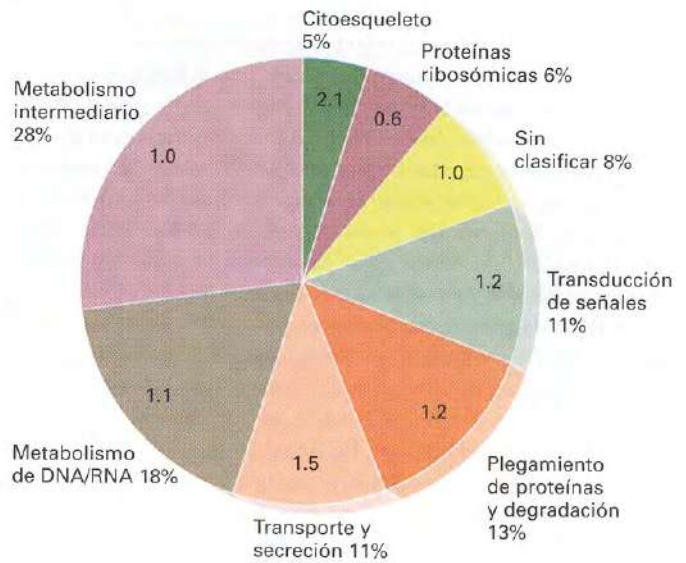


Figura 10-44. Distribución de las funciones biológicas básicas conservadas en la levadura y el gusano. Las secuencias de las proteínas de la levadura y del gusano pueden agruparse en grupos estrechamente relacionados. Cada grupo (incluyendo los grupos con dos o más secuencias) se asigna a una única categoría funcional. La cifra que aparece dentro de cada categoría indica la relación entre el número de secuencias de gusano/levadura para dicha categoría. (Tomado de S. A. Chervitz et al., «Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence», *Science* 282, 1998, 2022-2028.)

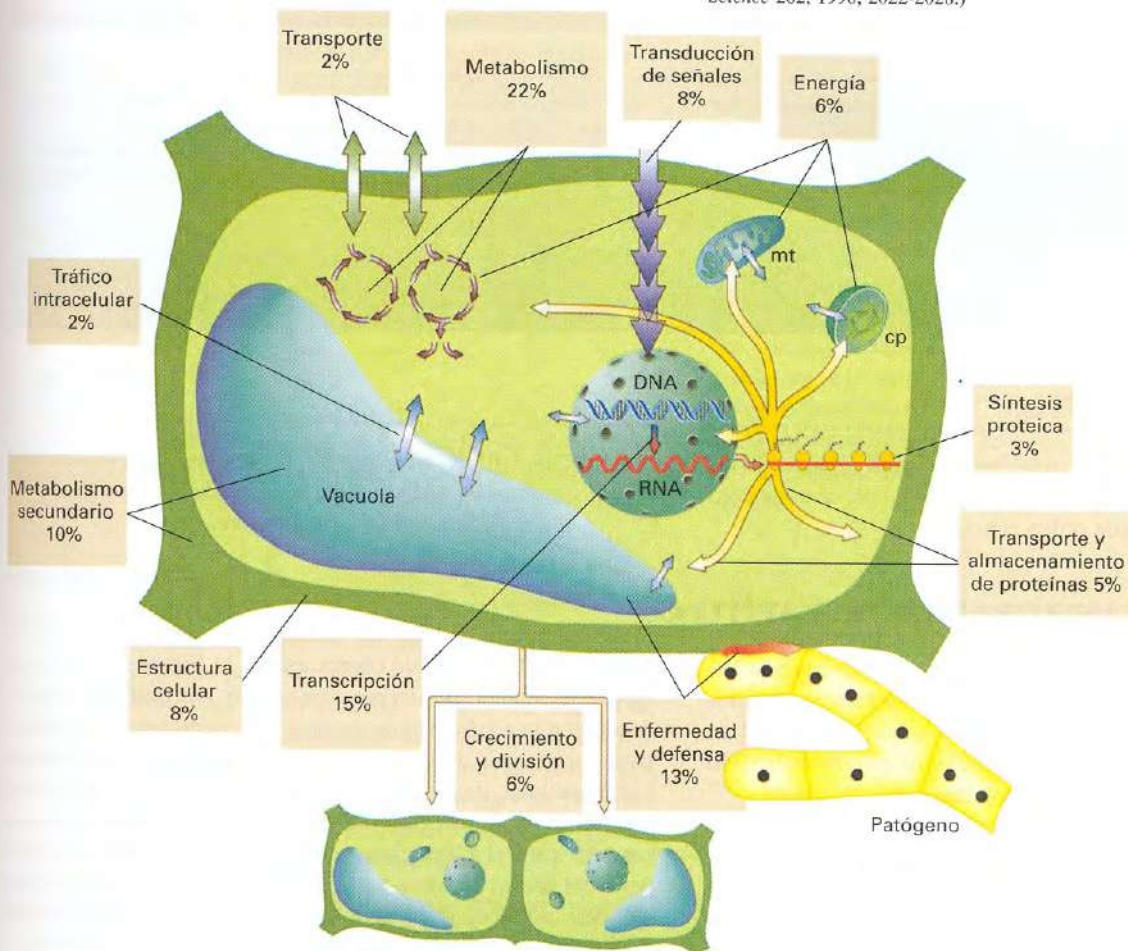


Figura 10-45. Distribuciones de varias categorías de genes que determinan proteínas. La estimación se ha hecho a partir de los genes de la planta *Arabidopsis thaliana* que conocemos en la actualidad. mt, mitocondria; cp, cloroplasto.

RESUMEN

En capítulos anteriores hemos conocido que el DNA es el material genético responsable de dirigir la síntesis de proteínas. El primer indicio sobre cómo el DNA logra esta hazaña proviene de observaciones realizadas en los eucariotas, donde se demostró que el RNA se sintetiza en el núcleo y luego se transfiere al citoplasma. Sin embargo, la mayoría de los detalles de este flujo de información del DNA a las proteínas provienen de experimentos realizados con bacterias y fagos.

Un RNA dado se sintetiza a partir de una sola de las dos cadenas del DNA. Este proceso de transcripción lo cataliza una enzima, la polimerasa de RNA, que sigue unas reglas parecidas a las de la replicación: A empareja con U (en vez de con T, como en el DNA) y G empareja con C. La ribosa es el azúcar utilizado en el RNA. La extracción de RNA de una célula revela la existencia de tres variedades: ribosómico, transferente y mensajero. Los tres tamaños de RNA ribosómico (rRNA) se asocian con una serie de proteínas para formar los ribosomas, las máquinas que llevan a cabo la síntesis de proteínas (traducción). Los RNA transferentes (tRNA) son un grupo de moléculas pequeñas de RNA, con especificidad cada una de ellas por un aminoácido concreto; se encargan de transportar los aminoácidos hasta el ribosoma, donde se añaden a la cadena peptídica en crecimiento.

Las moléculas de RNA mensajero (mRNA) presentan tamaños y secuencias muy distintas. Son las moléculas que contienen la información para la síntesis de proteínas. La secuencia de codones en el mRNA determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente. Cada codón es específico de un aminoácido, aunque varios codones diferentes pueden cifrar el mismo aminoácido; es decir, el código genético es redundante. Además, hay tres codones para los que no existe ningún tRNA; estos codones indican dónde debe terminar el proceso de traducción.

En los eucariotas, el RNA se procesa antes de ser transportado al citoplasma. Se añaden caperuzas y colas, y se eliminan partes internas del transcrito primario. Así pues, muchos genes eucarióticos están «fragmentados», de manera que las partes informativas del gen no son colineales con el mRNA procesado. El Cuadro 10-8 resume algunas de las diferencias entre la síntesis de RNA en procariotas y eucariotas.

Los procesos de almacenamiento de información, replicación, transcripción y traducción son fundamentalmente similares en todos los seres vivos. Al poner de manifiesto esta similitud, la Genética molecular ha suministrado una poderosa fuerza unificadora a la Biología.

CUADRO 10-8. Diferencias en la expresión génica entre procariotas y eucariotas

Procariotas	Eucariotas
1. Una sola polimerasa de RNA sintetiza las distintas clases de RNA.	1. Tres polimerasas de RNA distintas. De las tres clases de moléculas de RNA, cada una transcribe una clase distinta.
2. El mRNA se traduce a la vez que se transcribe.	2. El mRNA es procesado antes de ser transportado al citoplasma, donde se traduce. Se le añaden caperuzas y colas, y se eliminan regiones internas del transcrito.
3. Los genes son segmentos continuos de DNA, colineales con el mRNA traducido en proteína.	3. Los genes suelen estar fragmentados. No son segmentos continuos de secuencias informativas, debido a la interrupción por secuencias intercaladas (intrones).
4. Los mRNA suelen ser policistronicos	4. Los mRNA son monocistronicos.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, relacionando entre sí tantos de los siguientes términos como le sea posible. Observe que los conceptos no están en ningún orden concreto.

gen / mRNA / tRNA / transcripción / procesamiento / traducción / polimerasa de RNA / ribosoma / codón / anticodón / aminoácido / intrón

PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

En el Capítulo 9, consideramos varios aspectos distintos sobre la estructura de las proteínas. Tomando como referencia la Figura 9-8, explique los efectos esperados sobre la actividad de una proteína por una mutación sin sentido, de cambio de sentido y de cambio de fase en el gen que determina la proteína.

♦ Solución ♦

Las mutaciones sin sentido provocan la terminación prematura de la síntesis proteica, de manera que se sintetiza una proteína

incompleta. Como puede observarse en la Figura 9-8, un fragmento incompleto de una proteína es muy probable que no pueda adoptar la conformación correcta para constituir el centro activo. Por ello, esperamos que el fragmento proteico sea inactivo. Las mutaciones de cambio de sentido, por otro lado, provocan el cambio de un aminoácido por otro. Si dicho aminoácido es importante para el plegamiento correcto de la proteína, o forma parte del centro activo, o participa en la interacción entre subunidades, entonces el cambio de tal aminoácido normalmente conducirá a la síntesis de una proteína inactiva. Por otro lado, si

11

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

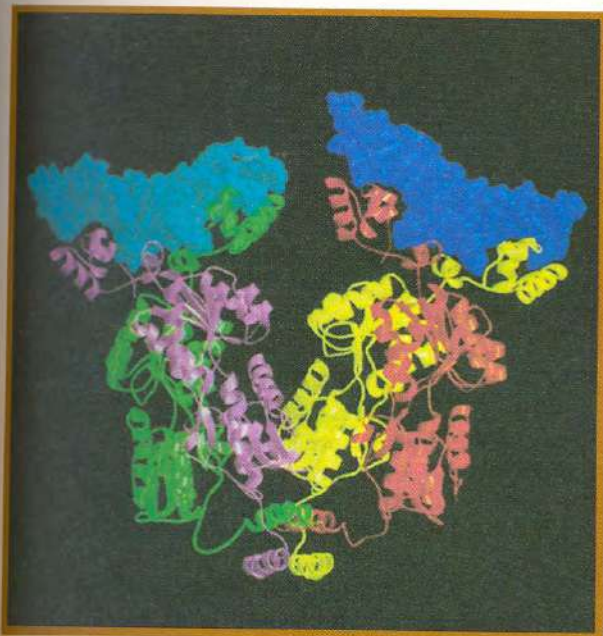


Imagen del complejo represor *lac*-DNA obtenida por estudios de cristalografía de rayos X.

En este caso, el tetrámero del represor está unido a dos operadores. Cada dímero se une a un operador. Los operadores mostrados aquí (azul claro y azul oscuro) tienen una longitud de 21 pares de bases. Los monómeros presentan los colores verde, violeta, rojo y amarillo. Observe cómo el fragmento amino terminal de un monómero (violeta) se cruza con otro monómero (verde) para unirse a la primera parte del operador, mientras que el fragmento terminal del segundo monómero (verde) se cruza y se une a la segunda parte del operador. De esta forma, la hélice de reconocimiento de cada una de las dos subunidades se une a regiones consecutivas del mismo operador.

(Cortesía de M. Lewis, Geoffrey Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu, University of Pennsylvania.)

Ideas fundamentales

La regulación génica está mediada frecuentemente por proteínas que reaccionan ante señales ambientales aumentando o disminuyendo las tasas de transcripción de genes específicos.

En procariotas, la coordinación del control génico se consigue agrupando en el cromosoma genes estructurales coordinados, de forma que se transcriben en moléculas de mRNA multigénicas.

Un ejemplo de control negativo se observa en el sistema *lac*, en el que una proteína represora bloquea la transcripción uniéndose al DNA por un sitio denominado operador.

El control positivo se realiza mediante proteínas que activan la transcripción.

Muchas proteínas reguladoras presentan rasgos estructurales comunes.

En el DNA de los eucariotas existen sitios reguladores adicionales, como los intensificadores, que pueden actuar a una considerable distancia del sitio de inicio de la transcripción, modulando la expresión génica mediante interacción con proteínas reguladoras específicas.

En los Capítulos 9 y 10 hemos considerado qué son los genes y cómo la maquinaria celular los transcribe en moléculas de RNA, muchas de las cuales se traducen a proteínas. Pero, ¿cómo regula la célula la síntesis de sus proteínas? El control de la cantidad de proteínas específicas presentes en la célula es crucial para un organismo. En las células de los organismos superiores, determinados tipos celulares se diferencian y alcanzan un alto grado de especialización. Una célula del ojo humano sintetiza proteínas importantes para el color del ojo, pero no produce las enzimas detoxificadoras que se sintetizan en las células del hígado. Cada tipo celular ha conseguido expresar sólo algunas de sus proteínas.

Las bacterias también necesitan regular la síntesis de sus proteínas. Las enzimas implicadas en el metabolismo de los azúcares constituyen un buen ejemplo. El metabolismo de diferentes fuentes de carbono para obtener energía requiere enzimas metabólicas. Sin embargo, existen muchos tipos diferentes de compuestos que las bacterias pueden usar como fuente de carbono. Azúcares como la lactosa, la glucosa, la maltosa, la ramnosa, la galactosa o la xilosa constituyen sólo una fracción de las posibles fuentes de carbono. Existen varias enzimas diferentes que permiten introducir cada uno de estos compuestos al interior de la célula, y que catalizan los diferentes pasos que llevan a su rotura. Si una célula tuviera que sintetizar simultáneamente todas las enzimas que pudiera necesitar, el coste energético sería demasiado elevado. Por ello, es necesario que la síntesis de estas enzimas esté estrictamente regulada.

Los niveles de las proteínas están regulados por mecanismos que operan durante la transcripción o la traducción. En este capítulo trataremos sobre el control de la transcripción, que es el punto de control principal de regulación. Aunque la regulación de la transcripción es normalmente más compleja en células eucarióticas, algunos de sus aspectos son similares a los de procariotas. Consideraremos primero el control de la transcripción en procariotas y describiremos más tarde la regulación transcripcional en eucariotas.

Circuitos básicos de control

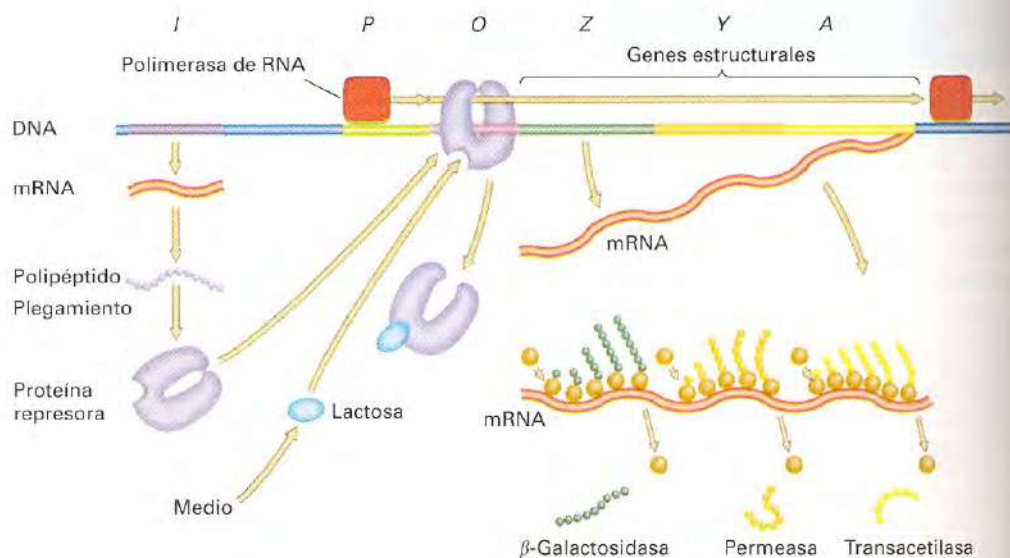
Como acabamos de señalar, el problema básico al que se enfrenta la célula es el de diseñar mecanismos para reprimir la transcripción de todos aquellos genes que determinen enzimas que no son necesarias y para activarlos en el momento en que las enzimas correspondientes sean necesarias. Para conseguir esto se han de cumplir dos requisitos:

1. Las células deben ser capaces de conectar y desconectar la transcripción de cada gen o grupo de genes específicos.
2. Las células deben ser capaces de reconocer las condiciones ambientales según las cuales los correspondientes genes deben ser activados o desactivados.

Revisaremos primero el modelo actual de un caso de control transcripcional en procariotas y consideraremos luego su desarrollo. El primer sistema que analizaremos es el metabolismo de la lactosa en *E. coli*. El detallado análisis genético de este sistema que François Jacob y Jacques Monod realizaron en los años cincuenta supuso el primer avance importante en la comprensión del control transcripcional. Sabemos mucho ahora sobre cómo funciona este sistema. La Figura 11-1 presenta un modelo físico del control de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa.

El metabolismo de la lactosa requiere dos enzimas: una permeasa para introducir la lactosa en la célula y una β -galactosidasa para romper la molécula de lactosa en glucosa y galactosa. La β -galactosidasa y la permeasa están determinadas por dos genes contiguos, *Z* e *Y*, respectivamente. Un tercer gen, el gen *A*, determina una enzima adicional, denominada *transacetilasa*, que no se requiere para el metabolismo de la lactosa, por lo que no nos centraremos en ella por ahora. Estos tres genes se transcriben en una única molécula multigénica de RNA mensajero (mRNA). Se desprende de ello que, regulando la producción de ese mRNA, puede regularse coordinadamente la síntesis de las tres enzimas. Un cuarto gen, el gen *I*, cercano pero no directamente adyacente a los genes *Z*, *Y* y *A*, determina una proteína **represora**, llamada

Figura 11-1. Regulación del operón *lac*. El gen *I* produce continuamente represor. El represor se une a la región operadora (*O*), bloqueando a la polimerasa de RNA unida al promotor (*P*), que no puede transcribir los genes estructurales adyacentes. Cuando hay lactosa, ésta se une al represor y cambia su forma, de modo que ya no puede unirse a *O*. La polimerasa de RNA puede entonces transcribir los genes estructurales *Z*, *Y* y *A*, y se producen las tres enzimas.



así porque bloquea la expresión de los genes *Z*, *Y* y *A*. El represor se une a una región del DNA cercana al comienzo del gen *Z* y al sitio donde se inicia la transcripción del mRNA. El sitio del DNA al que se une el represor se denomina **operador**. El represor ha de cumplir la propiedad de ser capaz de reconocer una secuencia de DNA corta y específica, es decir, un operador específico. Esta propiedad garantiza que el represor sólo se una a un sitio del DNA cercano a los genes que controla y no a otros sitios al azar del cromosoma. Al unirse al operador, el represor impide que la polimerasa de RNA inicie la transcripción. Normalmente, la polimerasa de RNA se une a regiones específicas del DNA situadas al comienzo de los genes o grupos de genes llamadas **promotores** (véase Cap. 10), iniciando así la transcripción en los sitios adecuados. El segmento *POZYA* de la Figura 11-1 constituye un **operón**, o unidad genética de expresión coordinada.

El represor *lac* es una molécula con dos sitios de reconocimiento: uno que reconoce la secuencia operadora específica del operón *lac* y otro que reconoce la lactosa y ciertos análogos. Cuando el represor se une a los derivados de la lactosa, sufre un cambio conformacional. Esta ligera alteración de la forma afecta al sitio de unión al operador y ello hace que el represor pierda afinidad por el operador. Así, en respuesta a la unión a los derivados de la lactosa, el represor se suelta del DNA. Se satisface de esta forma el segundo requerimiento de los sistemas de control, la capacidad para detectar las condiciones bajo las cuales merece la pena activar la expresión de los genes *lac*. En sistemas como *lac*, la supresión de la represión se denomina **inducción**; los derivados de la lactosa que inactivan al represor y permiten la expresión de los genes *lac* se llaman **inductores**.

Otros sistemas bacterianos utilizan proteínas *activadoras*, que deben unirse al DNA para activar la transcripción. Existen mecanismos adicionales de control que requieren proteínas que permitan que la transcripción continúe en respuesta a señales intracelulares. Antes de examinar con detalle algunos de estos circuitos reguladores, repasaremos los trabajos clásicos que llevaron inicialmente a describir los sistemas de control bacterianos, ya que constituyen un punto de referencia fundamental del análisis genético.

Descubrimiento del sistema *lac*: control negativo

Jacob y Monod utilizaron el metabolismo de la lactosa en *E. coli* (Fig. 11-2) para abordar el problema de la inducción enzimática (originalmente denominada *adaptación*), es decir, la aparición de una enzima específica sólo en presencia de su sustrato. Este fenómeno era bien conocido en bacterias desde hacía años. ¿Cómo podía una célula «saber» con exactitud qué enzimas debía sintetizar? ¿Cómo un sustrato concreto inducía la aparición de una enzima específica?

En el caso de sistema *lac*, el fenómeno de la inducción puede ilustrarse de la siguiente manera: en presencia de ciertos galactósidos llamados *inductores*, las células producen unas mil veces más β -galactosidasa, enzima encargada de descomponer β -galactósidos, que en ausencia de esos mismos azúcares. ¿Qué papel desempeña el inductor en el fenómeno de la inducción? Podría ser que el inductor simplemente activara un precursor de la

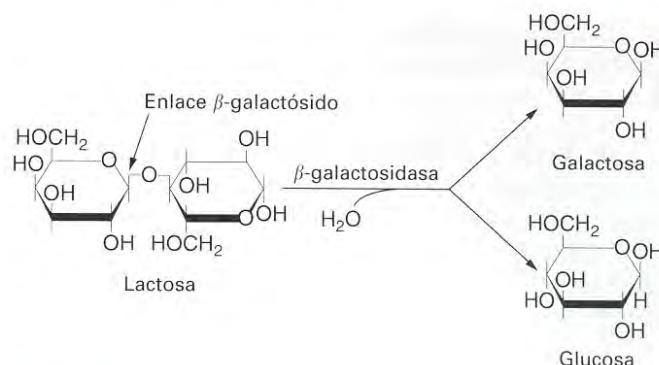


Figura 11-2. Metabolismo de la lactosa. La enzima β -galactosidasa cataliza una reacción en la que se añade agua al enlace β -galactósido para romper la lactosa en galactosa y glucosa. La enzima permeasa de la lactosa es necesaria para el transporte de la lactosa al interior de la célula.

β -galactosidasa, pre- β -galactosidasa, ya presente en la célula. Sin embargo, cuando Jacob y Monod siguieron el destino de ciertos aminoácidos marcados radiativamente que habían sido añadidos a células en crecimiento, antes o después de añadir el inductor, demostraron que la inducción suponía síntesis de nuevas moléculas de enzima. Estudios cinéticos establecieron que esas moléculas podían detectarse tan sólo tres minutos después de la adición del inductor. Además, si se quitaba el inductor, la síntesis de la enzima se detenía inmediatamente. Era evidente que la célula poseía un mecanismo para conectar y desconectar la expresión de los genes en respuesta a señales ambientales.

Genes que se controlan juntos

Cuando Jacob y Monod indujeron la β -galactosidasa, también indujeron la enzima permeasa, necesaria para el transporte de la lactosa al interior de la célula. El análisis de mutantes indicaba que cada enzima estaba determinada por un gen diferente. También se caracterizó la enzima transacetilasa (que es prescindible y cuya función se desconoce todavía) y posteriormente se demostró que estaba determinada por otro gen distinto, aunque también se inducía junto a la β -galactosidasa y la permeasa. Por tanto, Jacob y Monod identificaron tres **genes controlados coordinadamente**: el gen *Z*, que cifra la β -galactosidasa, el gen *Y*, que cifra la permeasa, y el gen *A*, que cifra la transacetilasa. La cartografía genética indicaba que los tres genes (*Z*, *Y* y *A*) estaban estrechamente ligados en el cromosoma. Estudios posteriores sobre éstos, y otros genes controlados coordinadamente, constataron que en muchos casos se produce una sola molécula de mRNA a partir de una serie de genes contiguos. Un inductor sintético que se usa con frecuencia es el isopropil- β -D-tiogalactósido, o IPTG (Fig. 11-3), un β -galactósido que no es descompuesto por la β -galactosidasa, lo cual permite controlar la concentración del inductor dentro de la célula.

El gen *I*

Análisis genéticos posteriores aclararon otros aspectos del circuito de control. Jacob y Monod caracterizaron un nuevo tipo de

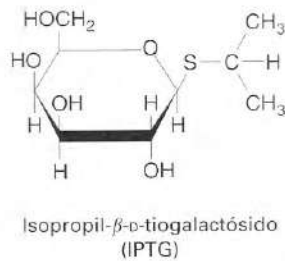


Figura 11-3. Estructura del IPTG, un inductor del operón *lac*. La β -galactosidasa no rompe el enlace β -D-tiogalactósido. Ello permite manipular la concentración intracelular de este inductor.

mutante, que sintetizaba las tres enzimas a sus máximos niveles, incluso en ausencia del inductor. Por primera vez se había detectado un mutante alterado, no en la *actividad* de una enzima, sino en el control de su *producción*. Estos **mutantes constitutivos** (que mostraban expresión continua desregulada) presentaban mutaciones próximas, pero diferentes, a los genes *Z*, *Y* y *A*, y definían el **locus *I*** como la región que controlaba la inducibilidad de las enzimas *lac*. Las células I^+ sintetizan niveles máximos de las enzimas *lac* sólo en presencia del inductor, mientras que las células I^- lo hacen tanto en presencia como en ausencia del inductor. La Figura 11-4 muestra un esquema de la región *lac* definida por estos experimentos.

El represor

El descubrimiento de factores F' (véase el Cap. 7) portadores de la región *lac* permitió la construcción de diploides parciales estables y facilitó la realización de pruebas de complementación. Las pruebas con los alelos I^+ e I^- establecieron que I^+ es dominante en *trans* sobre los alelos I^- , lo cual demostró que el pro-

ducto del gen *I* actuaba a través del citoplasma como un represor. El Cuadro 11-1 muestra el efecto de varias combinaciones de mutaciones, en los estados inducido y no inducido, sobre la producción de β -galactosidasa y permeasa.

Un apoyo experimental al modelo del represor fue la caracterización de las mutaciones I^S . Aunque cartografiaban en el gen *I*, estas mutaciones impedían la inducción de las enzimas *lac* por la lactosa o por el inductor sintético IPTG (véase la Figura 11-3). Es más, eran dominantes sobre los alelos I^+ e I^- (Tabla 11-2). La mutación I^S elimina la respuesta al inductor, presumiblemente porque altera el sitio de unión estereoespecífico e impide la unión al inductor. Por tanto, incluso en presencia de IPTG, estas moléculas pueden bloquear todavía la síntesis de las enzimas *lac*. Ello explicaría también su dominancia, porque el represor I^S estaría activo, incluso en presencia del represor silvestre que estaría inactivado por el inductor. Las mutaciones I^S apuntaban claramente a una interacción directa entre el producto del gen *I* y el inductor.

COROLARIO

La mutación

I^- afecta a la **región de unión al DNA del represor, impidiendo por tanto su unión y permitiendo la transcripción, incluso en ausencia del inductor**; la mutación I^S afecta a la **región de unión al inductor del represor, reprimiendo por tanto la transcripción, incluso en presencia del inductor**.

El operador y el operón

La especificidad del represor, que se traduce en el bloqueo de la síntesis de las enzimas *lac*, sugiere la formación de un complejo estereoespecífico con un elemento que Jacob y Monod denominaron *operador*. Se propuso que el operador era una región de

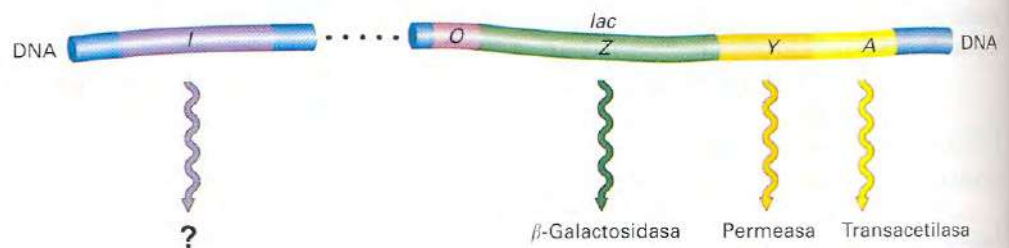


Figura 11-4. El locus *I* controla la inducibilidad de las enzimas *lac*.

CUADRO 11-1. Síntesis de β -galactosidasa y permeasa en estirpes haploides y diploides heterocigóticas portadoras de alelos I^+ e I^-

Estirpe	Genotipo	β -GALACTOSIDASA (Z)		PERMEASA (Y)		Conclusiones
		No inducida	Inducida	No inducida	Inducida	
1	$I^+ Z^+ Y^+$	-	+	-	+	I^+ es inducible
2	$I^- Z^+ Y^+$	+	+	+	+	I^- es constitutiva
3	$I^+ Z^- Y^- / F' I^- Z^+ Y^+$	-	+	-	+	I^+ es dominante sobre I^-
4	$I^- Z^- Y^- / F' I^+ Z^+ Y^+$	-	+	-	+	I^+ actúa en <i>trans</i>

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) y fueron inducidas con IPTG. La presencia de niveles máximos de la enzima se indica con el signo «+»; su ausencia o niveles muy bajos, con el signo «-». (Todas las estirpes son O^+ .)

CUADRO 11-2. Síntesis de β -galactosidasa y permeasa en la estirpe silvestre y en otras estirpes con diferentes alelos del gen *I*

Estirpe	Genotipo	β -GALACTOSIDASA (Z)		PERMEASA (Y)		Conclusiones
		No inducida	Inducida	No inducida	Inducida	
1	$I^+ Z^+ Y^+$	—	+	—	+	I^+ es inducible
2	$I^s Z^+ Y^+$	—	—	—	—	I^s está siempre reprimido
3	$I^s Z^+ Y^+ / I^+ I^+$	—	—	—	—	I^s es dominante sobre I^+

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) con y sin el inductor IPTG. La presencia de la enzima indicada se representa con el signo «+» y su ausencia, o niveles muy bajos, con el signo «—».

DNA próxima al comienzo del grupo de genes que estaban bajo su control. Los investigadores buscaron mutaciones en el operador que permitieran la síntesis de las enzimas *lac* en presencia de un represor activo. Estas mutaciones deberían ejercer su acción sobre los genes adyacentes a ellas en el operón, un efecto que se conoce como **dominancia en *cis*** (la palabra *cis* significa «adyacente»; el término *trans*, que usaremos a continuación, significa «a través de»). La dominancia normal (*trans*) implica la acción de un producto difusible; la dominancia en *cis* implica la interacción física de un elemento con los genes adyacentes a él. Ningún producto difusible resulta afectado por esta mutación. Seleccionando síntesis constitutiva (no reprimida) en células con dos copias de la región *lac*, para eliminar el efecto de mutaciones sencillas I^- , Jacob y Monod encontraron dichos mutantes, a los que denominaron O^C , de **operador constitutivo**. Como queda indicado en el Cuadro 11-3, las estirpes con este tipo de mutaciones son capaces de sintetizar cantidades máximas de enzima en presencia de IPTG, pero también sintetizan un 10 o un 20 % en

ausencia de inductor. Como también se indica en el Cuadro 11-3, las mutaciones O^C son, de hecho, dominantes en *cis*. Los experimentos de cartografía situaron al locus operador entre los genes *I* y *Z*.

Como hemos visto, el segmento *OZYA* constituye una unidad genética de expresión coordinada, que Jacob y Monod llamaron **operón**. La Figura 11-5 muestra un modelo simplificado de operón para el sistema *lac*. Se dice que el operón *lac* está bajo **control negativo** del represor *lac*, ya que éste bloquea normalmente la expresión de los genes *lac* en ausencia de inductor.

Repasemos el modelo de la Figura 11-5, tal como fue propuesto por Jacob y Monod. Los genes *Z* y *Y* cifran las estructuras de dos enzimas necesarias para el metabolismo del azúcar lactosa, la β -galactosidasa y la permeasa, respectivamente. El gen *A* determina la estructura de la enzima transacetilasa. Los tres genes están ligados en el cromosoma. Su transcripción en un (único) mRNA policistrónico proporciona las bases para el control coordinado de la síntesis de mRNA. La síntesis del mRNA poli-

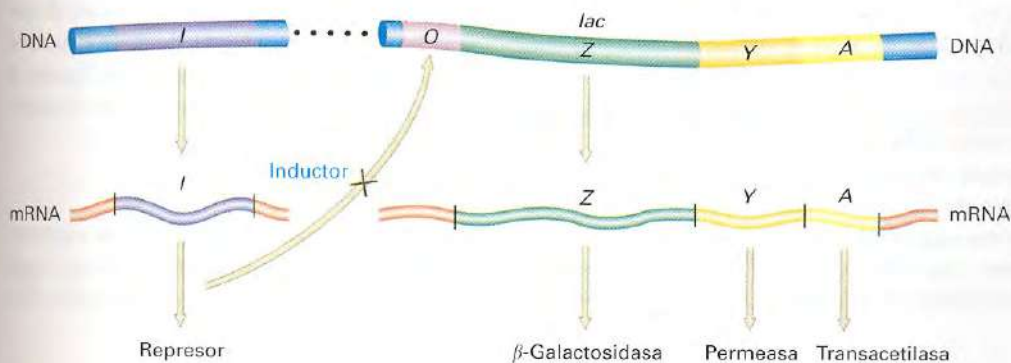


Figura 11-5. Modelo simplificado del operón *lac*. Los tres genes *Z*, *Y* y *A* se expresan coordinadamente. El producto del gen *I*, el represor, bloquea la expresión de los genes *Z*, *Y* y *A* mediante la interacción con el operador (*O*). El inductor inactiva al represor, impidiendo así su interacción con el operador. Cuando esto ocurre, el operón se expresa al máximo nivel.

CUADRO 11-3. Síntesis de β -galactosidasa y permeasa en estirpes mutadas en el operador, haploides y diploides heterocigóticas

Estirpe	Genotipo	β -GALACTOSIDASA (Z)		PERMEASA (Y)		Conclusiones
		No inducida	Inducida	No inducida	Inducida	
1	$O^+ Z^+ Y^+$	—	+	—	+	La condición silvestre es inducible
2	$O^+ Z^+ Y^+ / F' O^+ Z^- Y^+$	—	+	—	+	Z^+ es dominante sobre Z^-
3	$O^+ Z^+ Y^+$	+	+	+	+	O^C es constitutivo
4	$O^+ Z^- Y^+ / F' O^C Z^+ Y^-$	+	+	—	+	El operador actúa en <i>cis</i>

Nota: las bacterias se cultivaron en glicerol (sin glucosa) con y sin el inductor IPTG. La presencia o ausencia de la enzima se indica con los signos «+» y «—», respectivamente. Todas las estirpes son I^+ .

Figura 11-6. La naturaleza recesiva de las mutaciones I^- demuestra que el represor actúa en *trans*. Aunque el gen I^- no sintetiza represor activo, el gen silvestre I^+ proporciona un represor funcional que se une a los dos operadores de una célula diploide y bloquea la expresión del operón *lac* (en ausencia de inductor).

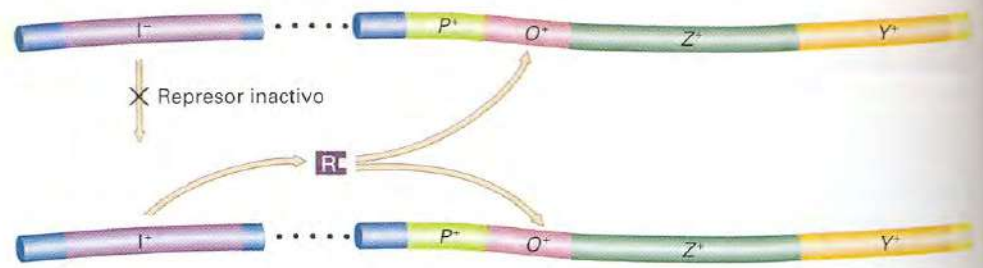
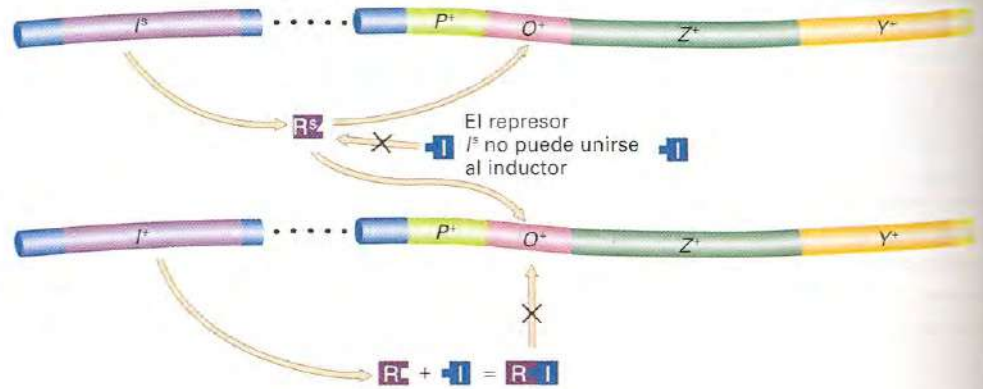


Figura 11-7. La dominancia de las mutaciones I^S se debe a la inactivación del sitio alostérico del represor Lac. En una célula diploide I^S/I^+ , ninguno de los genes estructurales *lac* se transcribe, incluso en presencia del inductor. A diferencia de lo que ocurre con el represor silvestre, el represor I^S carece de un sitio funcional de unión a la lactosa (el sitio alostérico) y, por tanto, no se inactiva en presencia del inductor. Así, incluso en presencia del inductor, el represor I^S se une irreversiblemente a todos los operadores de la célula, bloqueando la transcripción del operón *lac*.



cistrónico *lac* puede bloquearse por la acción de una molécula proteica represora, que se une a una región operadora cercana al sitio de inicio de la transcripción. El represor es el producto del gen *I*. Por tanto, las mutaciones en el gen *I* que impiden la síntesis de un represor funcional provocan la síntesis constitutiva, no reprimida, de las enzimas *lac*. La represión puede suprimirse también por ciertos galactósidos, denominados *inductores*, que inactivan al represor uniéndose a él y alterando su afinidad por el operador. De esta manera, el inductor provoca que el represor se separe del DNA.

Podemos entender ahora las propiedades de algunos de los diploides utilizados en las pruebas de complementación, a la luz del modelo del operón. La Figura 11-6 muestra cómo las mutaciones I^- son recesivas con respecto al alelo silvestre, porque todo lo que se necesita para sintetizar un represor que pueda unirse a los dos operadores del diploide es un gen *I* funcional. Por otro lado, la Figura 11-7 muestra una célula diploide que contiene una copia del gen *I* silvestre y una copia del gen I^S . La mutación I^S altera el sitio de unión al inductor, de modo que el

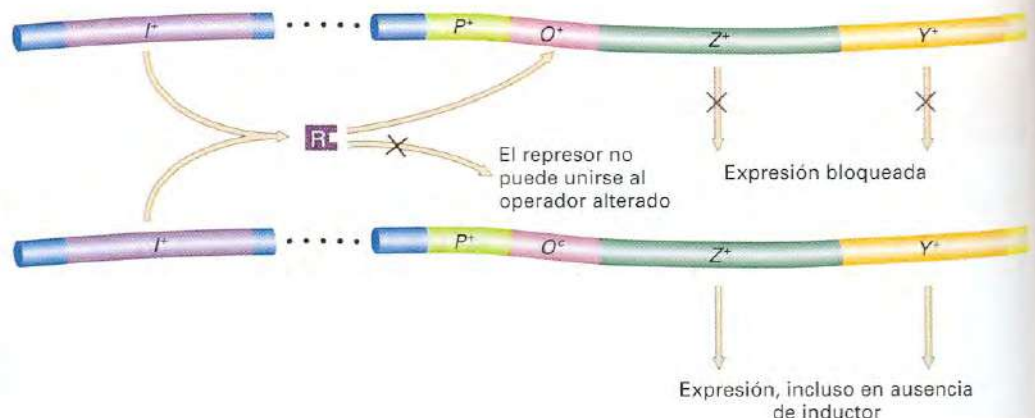
represor no puede unirse al inductor, aunque todavía reconozca al operador. Estas células diploides son Lac^- , porque el represor alterado siempre se unirá al operador, incluso en presencia del inductor, y bloqueará la síntesis de las enzimas *lac*.

Las mutaciones en el operador (O^c) son dominantes en *cis*, porque sólo son dominantes sobre los genes directamente ligados a ellas en el mismo cromosoma, como se esquematiza en la Figura 11-8. Así, si una misma célula contiene un operador silvestre y otro alterado en un segundo cromosoma, el represor reconocerá al operador silvestre y reprimirá a los genes que están ligados a él, pero no reconocerá al operador alterado. Por tanto, los genes ligados al operador alterado se expresarán incluso en ausencia de inductor.

El promotor *lac*

Experimentos genéticos demostraron que existe un elemento esencial para la transcripción *lac*, situado entre *I* y *O*, en el modelo del operón *lac*. Este elemento, denominado *promotor* (*P*),

Figura 11-8. El comportamiento de los heterocigotos O^+/O^c demuestra que los operadores actúan en *cis*. Como el represor no puede unirse a los operadores O^c , los genes estructurales *lac* ligados al operador O^c se expresan incluso en ausencia de inductor. Sin embargo, los genes *lac* adyacentes a un operador O^+ están sujetos a represión.



sirve como sitio de inicio de la transcripción. Las mutaciones en el promotor afectan de igual manera a la expresión de todos los genes del operón. Las mutaciones en el promotor son dominantes en *cis*, como se esperaría de un sitio del DNA que actúa como elemento de reconocimiento para el inicio de la transcripción, ya que los promotores sólo gobiernan la transcripción de los genes adyacentes a él en el operón, en la *misma* molécula de DNA. Como se mencionó en el Capítulo 10, experimentos *in vitro* han demostrado que la polimerasa de RNA se une a la región promotora y que la unión del represor al operador bloquea la unión de la polimerasa de RNA al promotor. Análisis de mutantes, experimentos físicos y comparaciones con otros promotores han identificado en un promotor procariótico típico dos regiones de unión para la polimerasa de RNA. La Figura 11-9 resume toda esta información.

COROLARIO

El operón *lac* es un conjunto de genes estructurales que determinan enzimas que participan en el metabolismo de la lactosa. Estos genes están controlados por la acción coordinada de un promotor y un operador dominantes en *cis*. La actividad de estas regiones está a su vez determinada por una molécula represora especificada por un gen regulador distinto. La Figura 11-1 reúne toda esta información en un solo esquema.

Caracterización del represor *lac* y del operador *lac*

El experimento decisivo fue realizado por Walter Gilbert y Benno Müller-Hill, quienes en 1966 aislaron y purificaron el represor mediante el análisis del componente que se unía al inductor IPTG marcado radiactivamente. Demostraron que el represor es una proteína formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales presentaba un peso molecular aproximado de 38 000. Cada molécula contiene cuatro sitios de unión a IPTG (más adelante en este capítulo se describe el represor con más detalle). *In vitro*, el represor se une al DNA que contiene la secuencia del operador y se despegue en presencia de IPTG. Gilbert y colaboradores han demostrado que el represor protege ciertas bases específicas del operador contra la acción de reactivos químicos. Estos experimentos proporcionaron pruebas decisivas del mecanismo de acción del represor propuesto por Jacob y Monod.

Gilbert usó la enzima DNasa para degradar el DNA unido al represor. Recuperó fragmentos cortos de DNA que se habían salvado de la actividad enzimática gracias a la protección de la molécula represora, y que presumiblemente constituyeran la secuencia operadora. Se determinó su secuencia de nucleótidos, y se comprobó que todas las mutaciones definidas como mutaciones en el operador implicaban un cambio en dicha secuencia

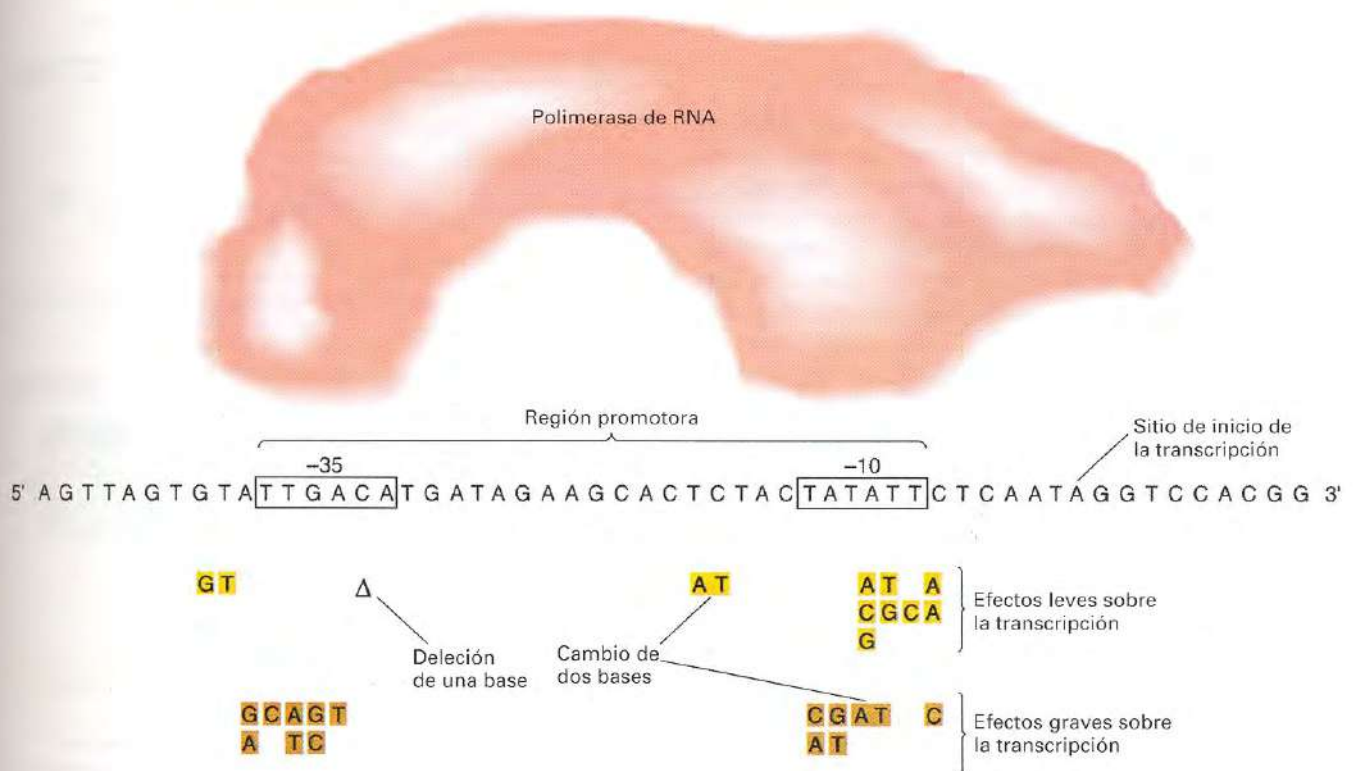


Figura 11-9. Algunas secuencias específicas del DNA son importantes para que la polimerasa de RNA transcriba eficazmente los genes de *E. coli*. Las secuencias enmarcadas, situadas aproximadamente 35 y 10 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción, están muy conservadas en todos los promotores de *E. coli*, lo que es indicativo de su papel como sitios de contacto en el DNA para la polimerasa de RNA. Mutaciones en esas regiones provocan efectos leves (color dorado) o graves (marrón) sobre la transcripción. Las mutaciones pueden ser cambios de un solo nucleótido o de pares de nucleótidos, o deleciones (Δ). (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.^a ed. Copyright © 1992 James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)

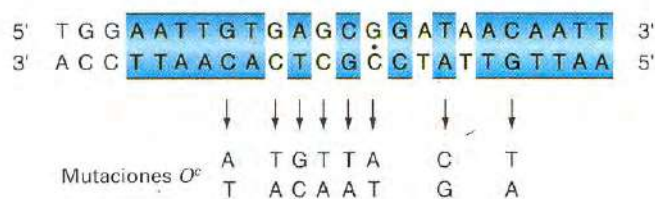


Figura 11-10. Secuencia de bases del operador de la lactosa, y los cambios de bases asociados con ocho mutaciones O^c . Los recuadros coloreados muestran los sitios de doble simetría rotacional y el punto marca su eje de simetría. (De W. Gilbert, A. Maxam y A. Mirzabekov, en N. O. Kjeldgaard y O. Møller, eds., *Control of Ribosome Synthesis*. Academic Press, 1976. Utilizada con el permiso de Munksgaard International Publishers, Ltd., Copenhagen.)

(Fig. 11-10). Estos resultados confirman que el locus operador es una secuencia específica de 17 a 25 nucleótidos situada justo antes del gen estructural *Z*. Muestran también la increíble especificidad del reconocimiento represor-operador, que puede romperse por un simple cambio de base. Cuando se determinó la secuencia de bases del mRNA *lac* (transcrito del operón *lac*), se comprobó que las primeras 21 bases del extremo 5' eran complementarias a la secuencia operadora determinada por Gilbert.

Represión catabólica del operón *lac*: control positivo

Además del sistema represor-operador, existe un sistema de control adicional. Se cree que este sistema ha evolucionado porque las células tienen enzimas específicas que favorecen la entrada y el metabolismo de la glucosa. Si *tanto* la glucosa como la lactosa están presentes en el medio, la síntesis de β -galactosidasa no se induce hasta que toda la glucosa ha sido utilizada. Así, la célula emplea su maquinaria metabólica (que, por ejemplo, induce las enzimas *lac*) para utilizar primero la glucosa disponible antes de dar los pasos que llevan a la creación de nueva maquinaria para metabolizar la lactosa. El modelo del operón descrito anteriormente no tiene en cuenta la supresión de la inducción por la glucosa, por lo que debemos modificarlo.

Los estudios indican que, de hecho, algún producto del catabolismo de la glucosa (cuya identidad aún se desconoce) impide la activación por lactosa del operón *lac*. A este efecto se le llamó originalmente **represión por el catabolito**. El catabolito de la glucosa actúa sobre un importante constituyente celular: el **monofosfato de adenosina cíclico (AMPc)**.

Cuando la glucosa está presente a altas concentraciones, la concentración de AMPc en la célula es baja; cuando la concentración de glucosa disminuye, la concentración de AMPc aumenta de forma correspondiente. Para que el operón *lac* se active es necesario que haya una alta concentración de AMPc. Los mutantes incapaces de convertir ATP en AMPc no pueden ser inducidos a producir β -galactosidasa, porque la concentración de AMPc no es lo suficientemente alta como para activar al operón *lac*. Existen, además, otros mutantes que producen

AMPc y no pueden activar las enzimas *lac*, porque carecen de una proteína, llamada CAP (proteína activadora de los genes catabólicos) determinada por el gen *crp*. La proteína CAP forma un complejo con el AMPc, y este complejo es el que se une al sitio CAP del operón. Unida al DNA, CAP interacciona físicamente con la polimerasa de RNA y, esencialmente, aumenta su afinidad por el promotor *lac*. De esta forma, el sistema de represión por catabolito contribuye a la activación selectiva del operón *lac* (Fig. 11-11).

El control por glucosa se lleva a cabo porque un producto del metabolismo de la glucosa inhibe la formación del complejo CAP-AMPc requerido para que la polimerasa de RNA se una al promotor *lac*. Incluso cuando hay una disminución en el nivel de los catabolitos de la glucosa y se forma el complejo CAP-AMPc, el mecanismo para metabolizar la lactosa sólo se pone en marcha si la lactosa está presente. Este nivel de control se lleva a cabo porque los inductores del operón *lac* deben unirse a la proteína represora para separarla del operador y permitir así la transcripción del operón *lac*. De esta forma, la célula conserva su energía y sus recursos, produciendo las enzimas para metabolizar la lactosa sólo cuando son útiles y necesarias. Estos conceptos se resumen en la Figura 11-12, que también muestra la curvatura del DNA que se produce cuando CAP-AMPc se une al sitio CAP, presumiblemente aumentando de esta forma la afinidad de la polimerasa de RNA por el promotor.

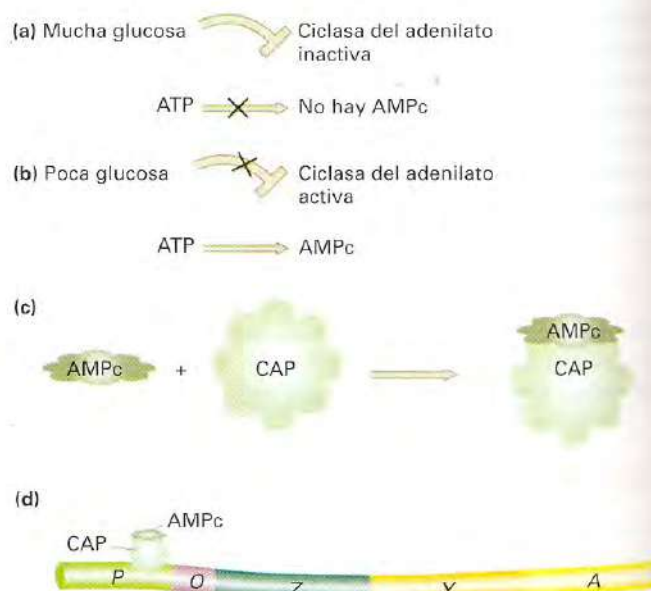


Figura 11-11. Control catabólico del operón *lac*. La inducción del operón por la lactosa es máxima cuando AMPc y CAP forman un complejo. (a) Cuando hay mucha glucosa, uno de sus productos catabólicos inhibe a la enzima ciclase del adenilato, impidiendo la conversión de ATP en AMPc. (b) Cuando hay poca glucosa, no hay producto catabólico, la ciclase del adenilato está activa y se forma AMPc. (c) Cuando hay AMPc, éste actúa como un efector alostérico, formando un complejo con CAP. (d) El complejo AMPc-CAP actúa como un activador de la transcripción del operón *lac*, uniéndose a una región del promotor *lac*. (CAP = proteína activadora de los genes catabólicos; AMPc = monofosfato de adenosina cíclico.)

COROLARIO

El operón *lac* es objeto de un sistema de control adicional que hace que el operón permanezca inactivo en presencia de glucosa, incluso cuando la lactosa está presente. Concentraciones altas de catabolitos de la glucosa dan lugar a bajas concentraciones de AMPc, que debe formar un complejo con CAP para que se produzca la inducción del operón *lac*.

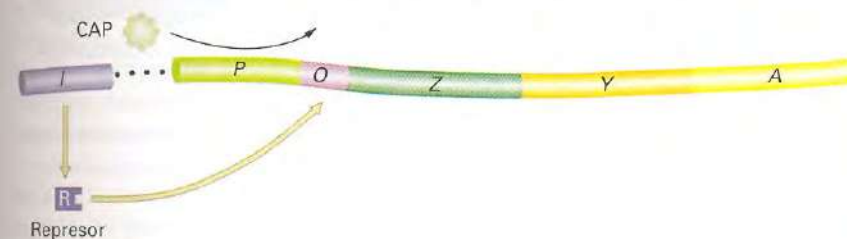
Control positivo y negativo

El control por el represor y el inductor del operón *lac* es un ejemplo de **control negativo**, en el cual la expresión está nor-

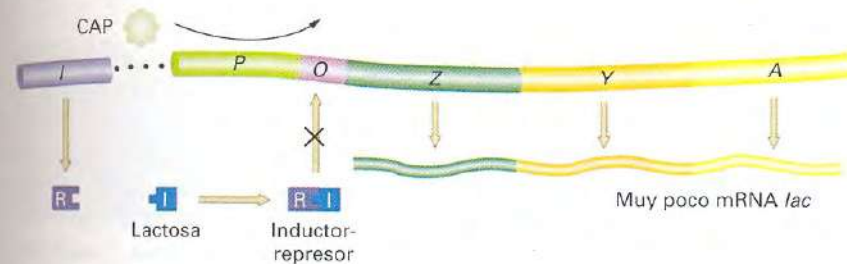
malmente bloqueada. Por el contrario, el sistema CAP-AMPc es un ejemplo de **control positivo**, porque la expresión del operón *lac* requiere la *presencia* de una señal activadora —en este caso, la interacción del complejo CAP-AMPc con su región de unión en el DNA. La Figura 11-13 ilustra las diferencias entre estos tipos básicos de sistemas de control.

Para que las proteínas activadoras o represoras ejerzan su función, cada una debe poder existir en dos estados: uno en que pueda unirse a su diana en el DNA, y otro en que no pueda hacerlo. Este estado debe ser el apropiado a una serie concreta de condiciones ambientales. En el caso de muchas proteínas activadoras o represoras, el modo en que se regula su unión al

(a) Glucosa presente (poco AMPc); no hay lactosa; no hay mRNA *lac*



(b) Glucosa presente (poco AMPc); lactosa presente



(c) No hay glucosa (mucho AMPc); lactosa presente

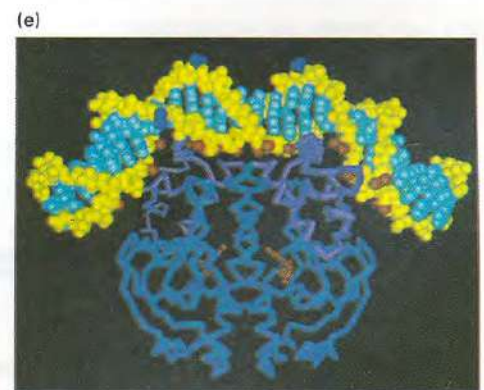
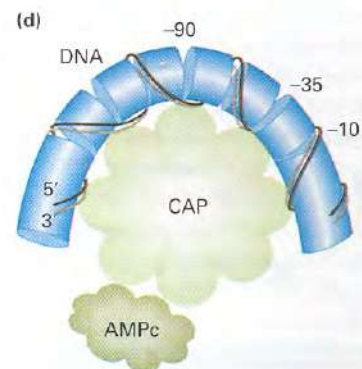
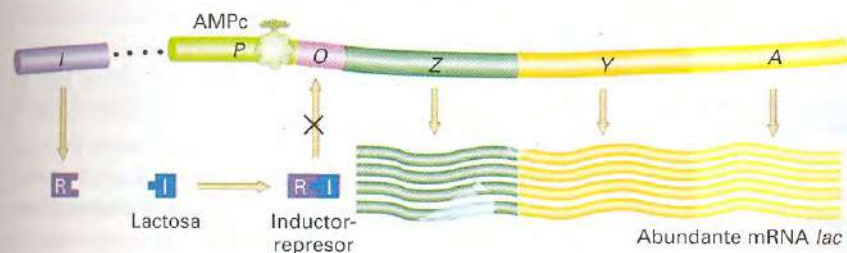
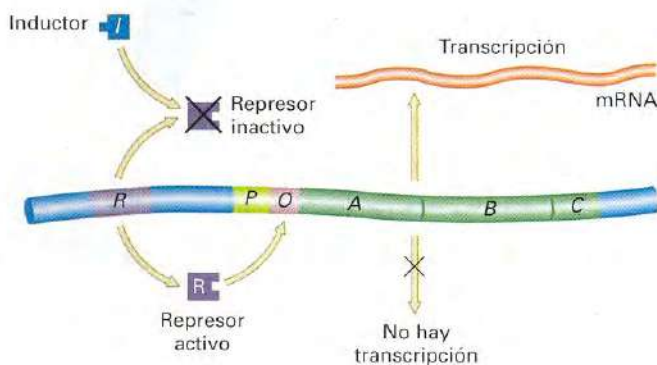


Figura 11-12. Control negativo y positivo del operón *lac* por el represor Lac y la proteína activadora de los genes catabólicos (CAP), respectivamente. (a) En ausencia de lactosa, que sirve como inductor, el represor Lac se une al operador. Independientemente de los niveles de AMPc y de la presencia de CAP, la producción de mRNA está bloqueada. (b) Cuando está presente la lactosa, ésta se une al represor, que ya no puede unirse al operador; sin embargo, sólo se producen pequeñas cantidades de mRNA porque la presencia de glucosa mantiene bajos los niveles de AMPc, y por tanto, no se forma ni se une al promotor el complejo CAP-AMPc. (c) Cuando el represor está inactivado por la lactosa y hay altos niveles de AMPc (debido a la ausencia de glucosa), el AMPc se une a CAP. El complejo CAP-AMPc se une entonces al promotor, el operón *lac* se activa y se producen grandes cantidades de mRNA. (d) Cuando CAP se une al promotor, genera una curvatura de más de 90° en el DNA. Aparentemente, la polimerasa de RNA se une con mayor eficacia cuando el promotor adquiere esta configuración curvada. (e) CAP unido a su sitio de reconocimiento en el DNA. Esta imagen está obtenida mediante el análisis estructural del complejo CAP-DNA. [Partes a-d modificadas de B. Gartenberg, y D. M. Crothers, *Nature* 333, 1988, 824. (Véase H. N. Lie-Johnson et al., *Cell* 47, 1986, 995.) Adaptado de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995, Scientific American Books. Parte e de L. Schultz y T. A. Steitz.]

DNA depende de la interacción de dos sitios diferentes en la estructura tridimensional de la proteína. Uno de ellos es el dominio de unión a DNA. El otro, el **sitio alostérico**, actúa como un interruptor que dispone al sitio de unión al DNA en uno de dos posibles estados: funcional o no funcional. El sitio alostérico interactúa con pequeñas moléculas llamadas efectores alostéricos. En el caso del operón *lac*, los inductores *lac* son los efectores alostéricos. Cuando éstos se unen al sitio alostérico, provocan un cambio conformacional en la proteína reguladora que altera la estructura del dominio de unión al DNA. Algunas proteínas represoras o activadoras deben unirse a su efector alostérico para ser capaces de unirse al DNA. Otras sólo pueden unirse al DNA en ausencia de su efector alostérico. La Figura 11-14 ilustra estos conceptos.

Empleando diferentes combinaciones de elementos controladores, las bacterias han desarrollado numerosas estrategias para regular la expresión de sus genes. A continuación se explican algunos ejemplos.

(a) Control negativo



(b) Control positivo

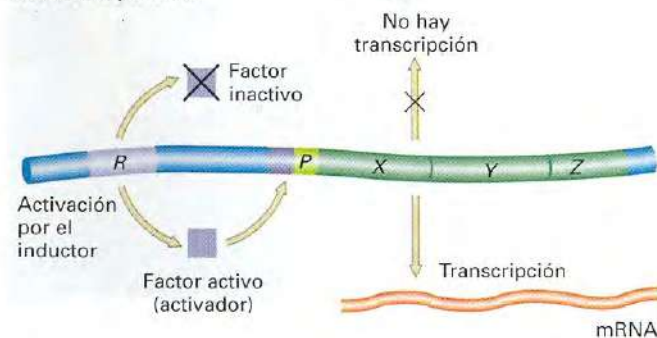


Figura 11-13. Comparación entre control positivo y negativo. Se muestran los aspectos básicos de ambos tipos de control. (a) En el control negativo, un represor activo (cifrado en el gen *R* en este ejemplo) bloquea la expresión de los genes del operón *A B C* uniéndose al sitio operador (*O*). Cuando el represor está inactivo, los genes se expresan. El represor puede ser inactivado por un inductor o por mutación. (b) En el control positivo, se requiere la presencia de un factor activo para que ocurra la expresión génica, como se muestra en el operón *X Y Z* de la figura. Pequeñas moléculas pueden convertir un factor inactivo en activo, como es el caso del AMPc y la proteína CAP. Un factor de control positivo inactivo no da lugar a expresión génica. El activador se une a la región controladora del operón, denominada *I* en este caso. (Las posiciones de *O* e *I* respecto al promotor, *P*, están dibujadas de forma arbitraria en los dos ejemplos.)

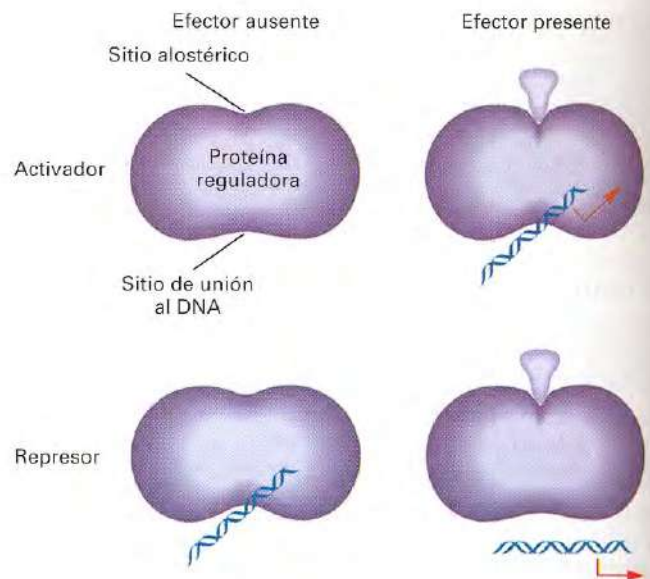


Figura 11-14. Acción de los efectores alostéricos sobre las actividades de unión al DNA de los activadores y represores.

Doble control positivo y negativo: el operón de la arabinosa

El metabolismo del azúcar arabinosa está catalizado por tres enzimas codificadas por los genes *araB*, *araA* y *araD*. La Figura 11-15 muestra un mapa de este operón. La expresión se activa en la **región iniciadora**, *araI*. Cuando el producto del gen *araC* se une a la arabinosa, se activa la transcripción, quizás afectando directamente la unión de la polimerasa de RNA a la región *araI*, que contiene el promotor de los genes *araB*, *araA* y *araD* (Fig. 11-16a). Esta activación representa un ejemplo de control positivo, porque el producto del gen regulador (*araC*) debe estar activo para que se exprese el operón.

Un control positivo adicional está mediado por el mismo sistema CAP-AMPc que regula la expresión del operón *lac*. En presencia de arabinosa, se requiere tanto CAP-AMPc como la unión del producto del gen *araC* a la región iniciadora para que la polimerasa de RNA se una al promotor de *araB*, *araA* y *araD*. En ausencia de arabinosa, el producto de *araC* asume una conformación diferente y reprime al operón *ara*, uniéndose tanto a *araI* como a una región operadora, *araO*, lo que provoca la formación de un bucle (Fig. 11-16b) que impide la transcripción. Por tanto, la proteína AraC adquiere dos conformaciones que llevan a cabo dos funciones opuestas en dos sitios de unión alternativos. La conformación depende de que el inductor, la arabinosa, esté o no unida a la proteína.

Rutas metabólicas

El control coordinado de los genes es un hecho muy generalizado en las bacterias. A principios de los años sesenta, cuando Milislav Demerec estudiaba la distribución de los loci que afec-

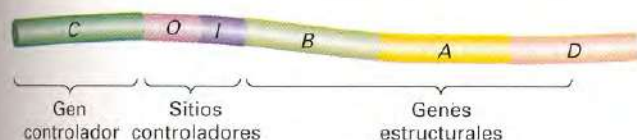


Figura 11-15. Mapa de la región *ara*. Los genes *B*, *A* y *D*, junto con los sitios *I* y *O* forman el operón *ara*.

taban a una ruta biosintética común, encontró que los genes de *Salmonella typhimurium* que controlaban algunas etapas de la síntesis del aminoácido triptófano estaban agrupados en una región reducida del cromosoma. Demerec estudió entonces la distribución de genes cuyos productos participaban en varias rutas metabólicas diferentes. Analizando mutaciones auxotróficas que representaban a 87 genes diferentes, encontró que 63 de ellos se localizaban en 17 agrupaciones génicas funcionalmente similares. Una **agrupación génica** se define como dos o más loci que controlan funciones relacionadas y que no están separados por ningún gen no relacionado con ellos.

Además, en aquellos casos en los que se conoce el orden de la actividad catalítica, se observa una notable congruencia entre el orden de los genes en el cromosoma y el orden en que actúan sus productos en la ruta metabólica. Esta congruencia queda reflejada en la organización de la agrupación del triptófano de *E. coli* (Fig. 11-17), caracterizada por Charles Yanofsky.

COROLARIO

Los genes que participan en la misma ruta metabólica están frecuentemente agrupados en los cromosomas procarióticos y, a menudo, en el mismo orden que las reacciones que controlan. Además, los genes de una agrupación se expresan a la vez.

Ejemplos adicionales de control: la atenuación

El operón *lac* es un ejemplo de sistema inducible, en el sentido de que la síntesis de una enzima se induce por la presencia de su

sustrato. También existen sistemas reprimibles, en los que un exceso de producto detiene la producción de las enzimas que participan en su síntesis. Se ha identificado un sistema de control de este tipo en una agrupación de genes que controlan la ruta de producción del triptófano. La síntesis del triptófano se interrumpe cuando hay un exceso de triptófano en el medio. Jacob y Monod propusieron que la agrupación de cinco genes *trp* de *E. coli* forma otro operón, que difiere del operón *lac* en que el represor del triptófano sólo se une al operador *trp* cuando está unido al triptófano (Fig. 11-17). Recuerde que el represor *lac* se une al operador cuando *no está* unido a la lactosa. Un segundo mecanismo de control modula también la síntesis del triptófano, actuando sobre la actividad enzimática. Es la **retroinhibición**. En este caso, la primera enzima de la ruta, determinada por los genes *trpE* y *trpD*, es inhibida por el propio triptófano.

Como ocurre con el operón *lac*, un análisis posterior reveló otro nivel de control superpuesto al mecanismo básico represor-operador. Al estudiar estirpes mutantes (portadoras de una mutación en *trpR*, el locus represor) que continuaban produciendo mRNA *trp* en presencia de triptófano, Yanofsky encontró que la eliminación de triptófano del medio llevaba a un aumento casi de diez veces en la producción de mRNA *trp*, incluso aunque el represor Trp estuviera inactivo y, por tanto, no pudiera ser responsable del incremento por medio de la desrepresión normal del operador debida a los bajos niveles de triptófano. Además, Yanofsky identificó la región responsable de este incremento, aislando un mutante totalmente constitutivo que producía mRNA *trp* a ese nivel diez veces superior al normal, incluso en presencia de triptófano, y demostró que dicha mutación era una delección entre el operador y el gen *trpE* (véase el mapa de la Figura 11-17).

Yanofsky aisló el mRNA multigénico del operón *trp*. Tras obtener su secuencia de nucleótidos, encontró una secuencia larga, denominada **secuencia líder**, de aproximadamente 160 bases, en el extremo 5' antes del primer triplete del gen *trpE*. El mutante que siempre producía mRNA *trp* a máximos niveles contenía una delección que se extendía desde la posición 130 a la 160 (Fig. 11-18). Yanofsky denominó **atenuador** al elemento inactivado por la delección, porque su presencia lleva, aparente-

(a) Control positivo



(b) Control negativo



Figura 11-16. Doble control del operón *ara*. (a) En presencia de arabinosa, la proteína AraC se une a la región *araI*, y la proteína CAP, si está unida a AMPc, se une a un sitio adyacente a *araI*. Ello estimula la transcripción de los genes *araB*, *araA* y *araD*. (b) En ausencia de arabinosa, la proteína AraC se une simultáneamente a las regiones *araI* y *araO*, formando un bucle en el DNA. Ello impide la transcripción del operón *ara*.

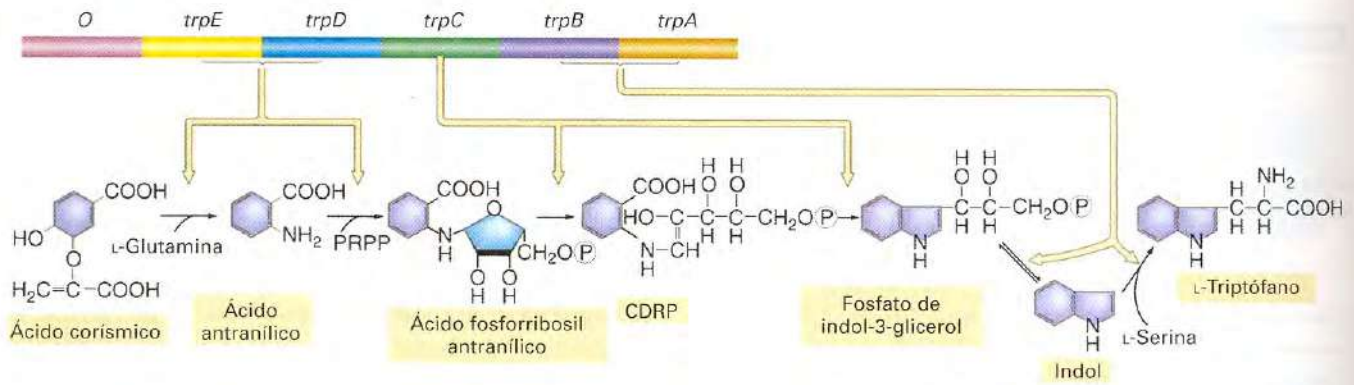


Figura 11-17. Orden en el cromosoma de los genes del operón *trp* de *E. coli* y secuencia de las reacciones catalizadas por los productos enzimáticos de los genes estructurales *trp*. Los productos de los genes *trpD* y *trpE* forman un complejo que cataliza pasos específicos, igual que los productos de los genes *trpB* y *trpA*. La sintetasa del triptófano es una enzima tetramérica formada por los productos de *trpB* y *trpA*, que cataliza un proceso en dos etapas que lleva a la formación del triptófano. (PRPP = pirofosfato de fosforribosilo; CDRP = 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-desoxirribulosa 5-fosfato.) (Tomado de S. Tanemura y R. H. Bauerle, *Genetics* 95, 1980, 545.)

mente, a una reducción de la tasa de transcripción cuando está presente el triptófano. La Figura 11-19 muestra la posición de estos elementos en el operón *trp*. Pero, ¿cuál es la función de las posiciones 1 a la 130 de la secuencia líder? Una observación sorprendente aportó la clave para resolver este problema.

Cuando estudiaba los mRNA transcritos por el operón *trp* (utilizando mutantes *trpR*⁻), Yanofsky descubrió que, incluso en presencia de altos niveles de triptófano (que deberían hacer que la región atenuadora redujera en diez veces el nivel de la transcripción), las primeras 141 bases de la secuencia líder se transcribían siempre al máximo nivel, aunque como era de esperar, el mRNA de longitud total sólo aparecía a un nivel diez veces menor. Dicho de otro modo, incluso en presencia de altas concentraciones de triptófano, las primeras 141 bases se transcriben al máximo nivel pero, por algún mecanismo de atenuación que ocurre en esa región, sólo uno de cada diez mRNA se transcribe hasta el final. Ello sugiere que el extremo del atenuador actúa como un terminador de la cadena de mRNA que, en presencia de triptófano, interrumpe la transcripción de nueve de cada diez moléculas de RNA. En ausencia de triptófano, el atenuador se desactiva de algún modo, y todas las moléculas de mRNA se completan (de ahí el aumento de diez veces). En aquellos mutan-

tes *trpR*⁻ en los que, además, el atenuador está deletado, no se produce el bloqueo en la extensión del mRNA, de modo que la transcripción continúa en cualquier caso (es decir, se produce mRNA al máximo nivel), independientemente de si el triptófano está presente o no.

¿Cómo se produce la interferencia con la terminación en el atenuador en ausencia de triptófano? La Figura 11-20 presenta un modelo basado en estructuras secundarias formadas por el mRNA en la región líder. El modelo propone que una de las dos conformaciones favorece la terminación de la transcripción y que la otra favorece la elongación. La traducción de parte de la secuencia líder induciría la conformación que favorece la terminación.

Se sabe que, de hecho, una porción de la secuencia líder cercana al comienzo se traduce y produce un péptido corto de 14 aminoácidos. En dicho segmento traducible hay dos codones para el triptófano (Fig. 11-21). Cuando hay un exceso de triptófano, hay un aporte suficiente de tRNA-Trp para conseguir una traducción eficaz del segmento traducible de la secuencia líder. El mRNA pasa a través del ribosoma a suficiente velocidad como para que el segmento 2 de la secuencia líder se introduzca en el ribosoma antes de que pueda formar una estructura en hor-

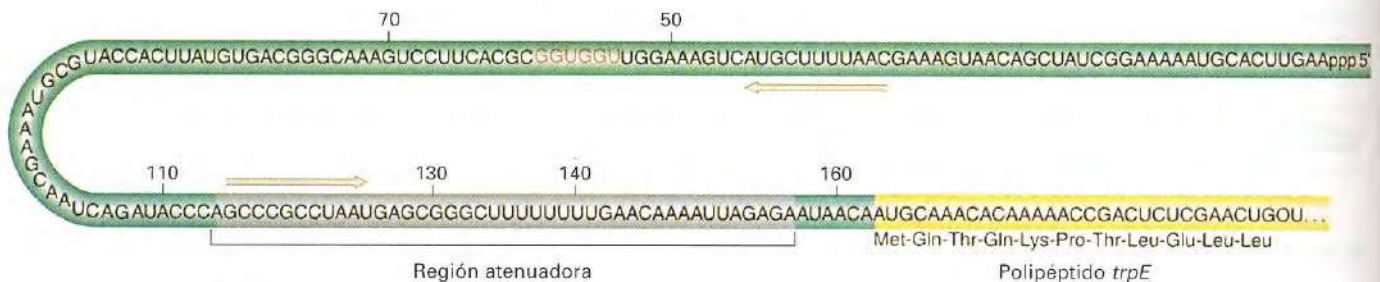


Figura 11-18. Secuencia líder, con el segmento atenuador del operón *trp* y el principio de la secuencia estructural *trpE* (se indica la secuencia de aminoácidos del polipéptido *trpE*). (Modificado de G. S. Stent y R. Calendar, *Molecular Genetics*, 2.^a ed. Copyright © 1978 por W. H. Freeman and Company. Basado en datos no publicados de Charles Yanofsky.)

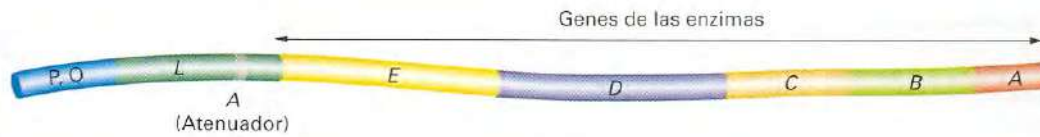


Figura 11-19. Representación del operón *trp* en la que se muestran los diferentes sitios controladores del promotor (P), el operador (O) y el atenuador (A), así como la secuencia líder (L) y los genes de las enzimas de la ruta de síntesis del triptófano (E, D, C, B y A). (Adaptado de L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 por Lubert Stryer.)

quilla con el segmento 3, como se muestra en la Figura 11-20b. De este modo, el segmento 3 puede formar una estructura terminadora de la transcripción con el segmento 4. Sin embargo, cuando hay poco triptófano, la traducción se hace más lenta en el segmento 1 en los codones Trp, por la escasa disponibilidad relativa de tRNA-Trp. Como muestra la Figura 11-20c, esta situación permite la formación de una estructura en horquilla entre los segmentos 2 y 3, impidiéndose la formación de la estructura terminadora entre los segmentos 3 y 4. Como consecuencia, en condiciones en las que hay poco triptófano, la transcripción no

se detiene en el atenuador. De esta forma, se consigue un nivel diez veces superior de enzimas biosintéticas del triptófano de la que se consigue por la interacción represor-operador. El análisis de numerosas mutaciones puntuales en la secuencia líder *trp* que favorecen o desfavorecen las respectivas estructuras secundarias ofrece un apoyo contundente al modelo de atenuación de Yanofsky.

Varios operones de enzimas implicadas en rutas biosintéticas tienen controles de atenuación similares al descrito para el operón del triptófano. Por ejemplo, la región líder del operón *his*,

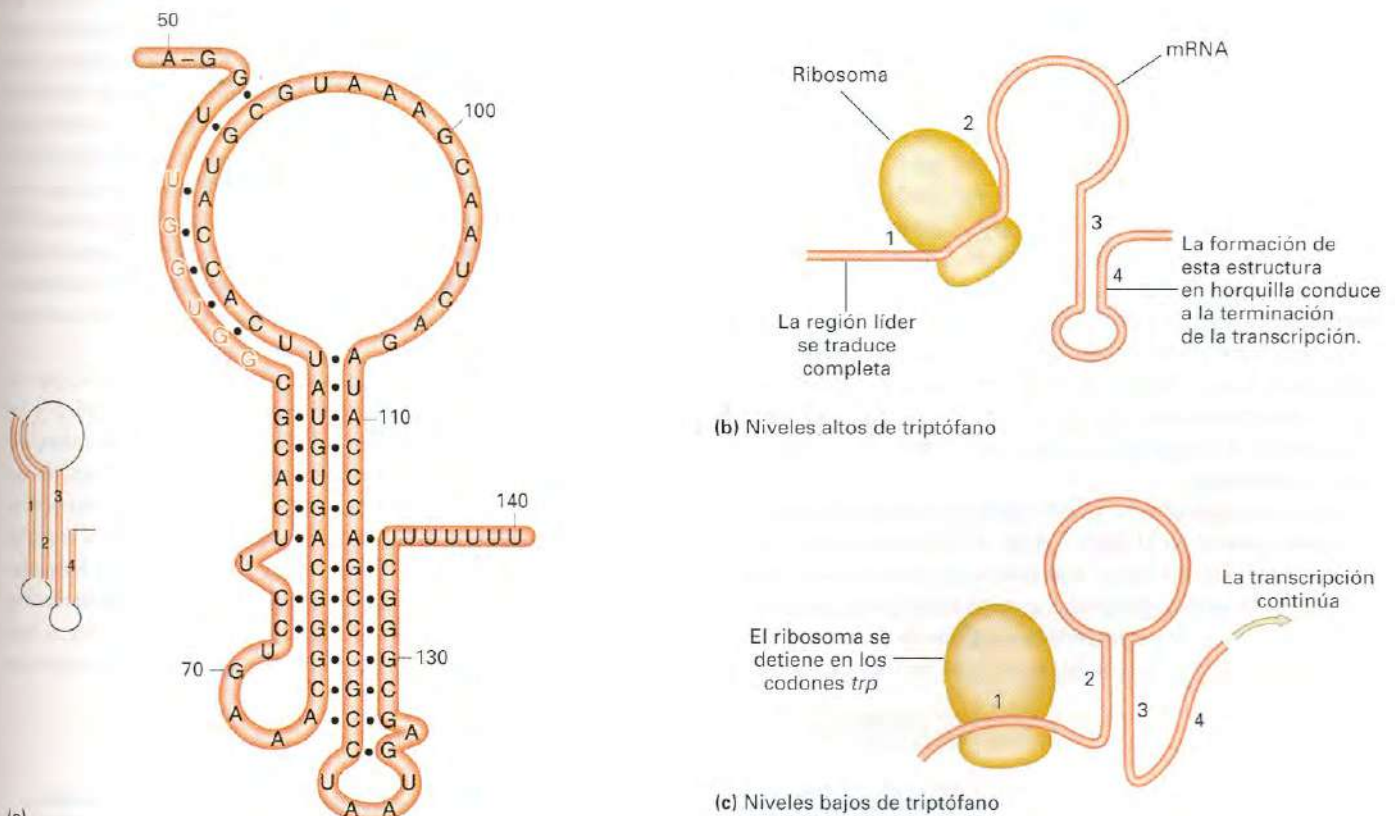
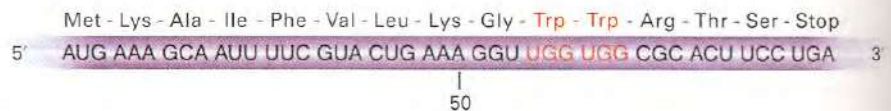


Figura 11-20. Modelo para explicar la atenuación del operón *trp*. (a) Estructuras secundarias propuestas para la región líder *trp* que causa la terminación en *E. coli*. Cuatro regiones pueden establecer emparejamientos de bases para formar estructuras en horquilla. (b) Cuando el triptófano es abundante, el segmento 1 del mRNA *trp* se traduce por completo. El segmento 2 se introduce en el ribosoma (aunque no es traducido), lo cual permite el emparejamiento de los segmentos 3 y 4. Esta región emparejada sirve, de algún modo, como señal para que la polimerasa de RNA detenga la transcripción. Por el contrario, cuando el triptófano es escaso (c), el ribosoma se detiene en los codones del segmento 1. El segmento 2 interacciona con el 3 en lugar de introducirse en el ribosoma, de modo que los segmentos 3 y 4 no pueden emparejarse. Como consecuencia, la transcripción continúa. (De D. L. Oxender, G. Zurawski y C. Yanofsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 1979, 5524.)

Figura 11-21. Se muestra el segmento traducido de la región *trp* líder, junto a la secuencia correspondiente del mRNA líder. La traducción de la secuencia líder termina en el codón de fin de mensaje (stop).



que determina las enzimas de la ruta biosintética de la histidina, contiene una región traducible con siete codones para histidina consecutivos. Mutaciones en otros loci que dan lugar a un descenso en los niveles de tRNA para histidina producen niveles parcialmente constitutivos de las enzimas determinadas en el operón *his*.

COROLARIO

El operón *trp* está regulado por un sistema de control negativo represor-operador que reprime la síntesis de enzimas del triptófano cuando ese aminoácido está presente en el medio. En un segundo nivel de control participa una región atenuadora donde se induce la terminación de la transcripción en presencia de triptófano.

El fago λ : un complejo de operones

Además de proponer el modelo del operón, Jacob y Monod sugirieron que la actividad genética de los fagos atemperados podía estar controlada por un sistema análogo al del operón *lac*. En el estado lisogénico, el genoma del profago está inactivo (reprimido). En la fase lítica, se activan (inducen) los genes necesarios para la reproducción del fago. La propuesta de Jacob y Monod de que en los fagos existía un control similar al del operón tuvo como consecuencia que el sistema genético del fago λ se haya convertido en uno de los sistemas de control mejor conocidos. En este fago, efectivamente, los dos estados funcionales están controlados por un sistema tipo operón. El sistema, sin embargo, ha resultado ser más complicado de lo que se supuso inicialmente.

Allan Campbell obtuvo y cartografió muchas mutaciones letales condicionales en el fago λ (Fig. 11-22), aportando pruebas evidentes de que los genes con funciones relacionadas estaban agrupados. Además, comprobó que las mutaciones que afectaban a los genes *N*, *O* y *P* impedían la expresión de la mayor parte del genoma tras la infección del fago. Sólo los loci situados entre

N y *O* seguían activos. Pronto veremos el significado de esta observación.

Cuando las bacterias normales se infectan con partículas de fagos λ silvestres, pueden ocurrir dos cosas: (1) el fago puede integrarse en el cromosoma bacteriano como un profago inerte (lisogenizando así a la bacteria), o (2) el fago puede producir las proteínas necesarias para que se produzca la maduración del fago y la lisis celular. Cuando se inoculan partículas de fagos silvestres sobre un césped de bacterias sensibles, aparecen halos de lisis en aquellos lugares donde las bacterias han sido infectadas y lisadas, pero estos halos son turbios debido a la presencia de bacterias lisogenizadas (que son resistentes a nuevas infecciones) en dichos halos.

Pueden buscarse fagos incapaces de lisogenizar a las células, seleccionando fagos mutantes que formen halos claros. Estos mutantes *claros* (*c*) son análogos a los mutantes *I* y *O* de *E. coli*. Por ejemplo, los mutantes condicionales en un sitio llamado *cI* son incapaces de lisogenizar en condiciones restrictivas, lo que sugiere que la mutación provoca un defecto en un represor o en un sitio de unión del represor (operador). Sin embargo, estos mutantes tampoco son capaces de inducir la lisis tras infectar una célula previamente lisogenizada con un profago silvestre, lo cual indica que el operador es funcional, porque el represor del fago silvestre es claramente capaz de impedir que el fago mutante entre en la fase lítica. Aparentemente, la mutación *cI* produce un represor defectuoso en el sistema de control del fago.

Se han aislado también mutantes virulentos del fago λ , que no lisogenizan las células, sino que entran en el ciclo lítico y se reproducen tras infectar a una célula lisogenizada. Por tanto, estos fagos mutantes son insensibles al represor de λ . Estudios de cartografía genética han demostrado la existencia de dos operadores, designados O_L y O_R , situados a la izquierda y a la derecha de *cI*, respectivamente. Cuando el fago λ infecta a un hospedador no inmune, la polimerasa de RNA comienza la transcripción a partir de dos promotores, P_L y P_R . Esto crea una pugna que determinará si el fago expresa sus funciones virulentas y entra en

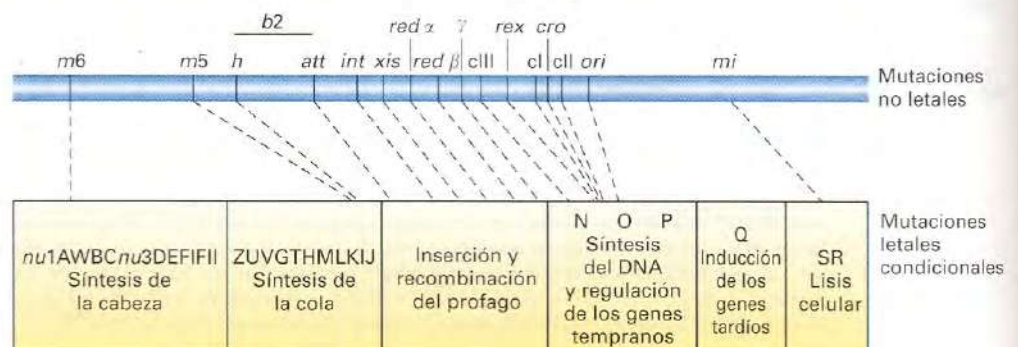


Figura 11-22. Mapa genético del fago λ . Se indican las posiciones de las mutaciones no letales y letales condicionales y las agrupaciones típicas de los genes con funciones relacionadas. (De A. Campbell, *The Episomes*, Harper & Row, 1969.)

el ciclo lítico, o si reprime estas funciones y establece lisogenia. La Figura 11-23 ofrece parte del mapa de λ y muestra la longitud de los distintos transcritos. P_L controla la transcripción hacia la izquierda que da lugar a la proteína antiterminadora N, además de varias funciones líticas. P_R controla la transcripción hacia la derecha, que cubre los genes *cro*, *cII* y *Q*, entre otros. Normalmente, estos transcritos terminan en puntos críticos específicos, antes de que puedan transcribirse los genes clave necesarios para el desarrollo lítico. Sin embargo, si se sintetiza la proteína N, ésta impide la terminación del transcrito (véase la Fig. 11-23) y se expresan las funciones líticas. La transcripción a partir de P_L y P_R puede ser bloqueada por la unión del represor a los operadores O_L y O_R . En el primer caso, se impide la síntesis de la proteína N y, por tanto, también se bloquea la elongación de los transcritos formados a partir de P_L y P_R .

El punto crítico para el establecimiento de la lisogenia es la síntesis del represor de λ , determinado por el gen *cl*, que tiene dos promotores. Uno de ellos, denominado P_E , sirve para establecer la lisogenia. El otro, P_M , sirve para mantenerla. Se requieren proteínas activadoras para que se inicie la transcripción en cada promotor. El activador de P_M es el propio represor determinado por el gen *cl*. Por tanto, para que se sintetice represor en una célula que no contenga moléculas de represor preexistentes, debe utilizarse el promotor P_E , que se activa por el producto del gen *cII*. Por tanto, *cII* debe transcribirse para que se establezca la lisogenia. También se requiere una proteína adicional, la integrasa, codificada en el gen *int*. Éste se transcribe a partir de su propio promotor, P_I (Fig. 11-23), que también debe ser activado por el producto del gen *cII*.

En el estado lisogénico, el represor de λ controla su propia síntesis a partir del promotor P_M , interaccionando con los tres operadores O_R1 , O_R2 y O_R3 (Fig. 11-24). Estos operadores tienen distintas afinidades por el represor de λ , siendo $O_R1 > O_R2 >$

O_R3 . Cuando hay muy poco represor de λ sólo se ocupa el sitio O_R1 , que bloquea la expresión de *cro* (la proteína Cro impide la síntesis del represor de λ uniéndose a O_R3). La unión del represor a O_R1 facilita la unión de una segunda molécula de represor a O_R2 . Cuando el represor de λ se une a O_R2 , activa la transcripción del gen *cl*. Sin embargo, cuando hay demasiado represor, éste se une al operador por el que tiene menos afinidad, O_R3 , y esta unión bloquea la transcripción del gen *cl*.

COROLARIO

La regulación de los estados lítico y lisogénico del fago λ proporciona un modelo de interacciones entre sistemas de control que puede ser útil para interpretar la regulación génica en los eucariotas.

Transcripción: regulación génica en eucariotas. Resumen

Los eucariotas se enfrentan a la misma tarea básica que los procariontes de coordinar la expresión de sus genes, si bien realizan esta coordinación de un modo mucho más complicado. Algunos genes deben responder a cambios en las condiciones fisiológicas, mientras que muchos otros forman parte de circuitos genéticos regulados durante el desarrollo que organizan a las células en tejidos y a éstos en un organismo completo (excepto en los eucariotas unicelulares). En estos casos, las señales que controlan la expresión génica son los productos de genes reguladores del desarrollo, más que señales procedentes del ambiente externo.

La mayoría de los genes eucarióticos están controlados al nivel de transcripción y los mecanismos son, conceptualmente, pa-

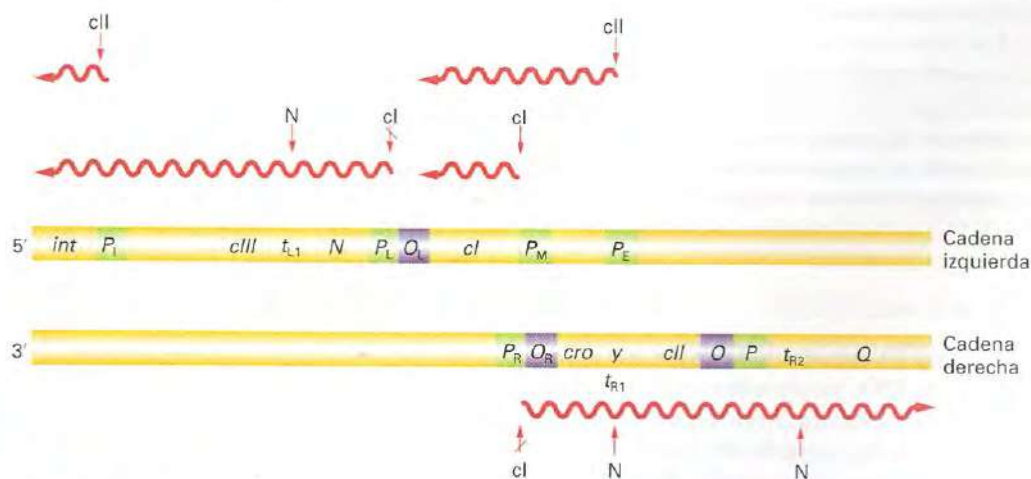


Figura 11-23. Mapa genético parcial del fago λ , con los genes principales y las proteínas reguladoras. Las líneas onduladas representan mRNA, y muestran el inicio, la dirección y la longitud de los transcritos. Una línea vertical al principio de un mRNA marca el sitio donde el producto génico indicado activa a un promotor. Si la flecha está atravesada por una barra inclinada, el producto génico reprime la transcripción. Cuando una flecha señala un sitio dentro de un mRNA, el producto génico indicado impide la terminación de la transcripción en ese sitio. Como indica el esquema, cuando la proteína N no actúa sobre ellos, t_{L1} es un terminador potencial de P_L y t_{R1} es un terminador potencial de P_R . (De D. Wulff y M. Rosenberg, en *Lambda II*, R. W. Hendrix et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983.)

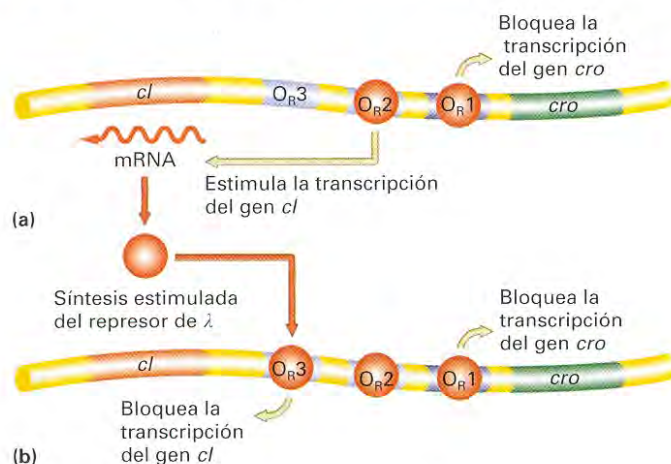


Figura 11-24. Autorregulación de los niveles del represor cI . (a) La unión del represor cI a O_R1 reprime la transcripción de cro y potencia la unión de una molécula de cI a O_R2 , lo cual, a su vez, estimula la transcripción del represor cI . (b) Cuando los niveles del represor cI son altos, éste se une a un tercer sitio, O_R3 . Como O_R3 solapa con el promotor de cl , se bloquea la posterior producción de cI , hasta que los niveles bajan, y el sitio O_R3 queda libre otra vez. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.^a ed. Copyright © 1995 por Lubert Stryer.)

recidos a los de bacterias: proteínas reguladoras en *trans* que operan uniéndose específicamente a secuencias diana del DNA, que actúan como reguladores de acción *cis*. No obstante, se requiere una regulación mucho más compleja para coordinar la actividad génica a lo largo de la vida de un organismo multicelular, por lo que también hay aspectos considerablemente novedosos. En este capítulo y en los siguientes veremos ejemplos de algunas de estas novedades.

El número de genes de los eucariotas es, típicamente, mucho mayor que el de los procariotas, a veces varios órdenes de magnitud mayor. Los genes de los organismos superiores también tienden a ser más grandes, debido a que las secuencias que actúan en *cis* pueden estar situadas a varias decenas de miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción y a que, en ocasiones, se requiere una batería de factores reguladores para conseguir la correcta regulación de ciertos genes.

Control en *cis* de la transcripción

Como vimos en el Capítulo 10, los eucariotas tienen tres tipos diferentes de polimerasas de RNA (nombradas con los números romanos I, II y III). Todas las moléculas de mRNA son sintetizadas por la polimerasa de RNA II, y el resto del capítulo tratará sobre la transcripción de las moléculas de mRNA. Para obtener un máximo nivel de transcripción, la polimerasa de RNA II requiere la cooperación de múltiples elementos reguladores en *cis*. Podemos distinguir tres clases de elementos en función de su posición relativa. Cerca del sitio de inicio de la transcripción están el promotor mínimo (el sitio de unión de la polimerasa de RNA II) y las secuencias proximales que actúan en *cis*. Estas interaccionan físicamente con proteínas que ayudan a la unión

de la polimerasa de RNA II a su promotor. Otras secuencias en *cis* actúan a una considerable distancia. Estos elementos se denominan intensificadores y silenciadores. A menudo, un intensificador o un silenciador sólo actúa en uno o unos pocos tipos celulares de un eucariota multicelular. Los promotores, los elementos próximos al promotor y los elementos que actúan a distancia son secuencias diana para la unión de diferentes proteínas de unión a DNA que actúan en *trans*.

El promotor mínimo y los elementos próximos al promotor

La Figura 11-25 muestra un esquema del promotor mínimo y de los elementos próximos al promotor. Llamamos **promotor mínimo** a la región comprendida entre el sitio de inicio de la transcripción y la secuencia TATA, que se encuentra aproximadamente 30 pb aguas arriba. Este promotor mínimo es incapaz por sí mismo de mediar una transcripción eficaz y precisa para ello de los **elementos proximales**, situados a unos 100-200 pb del sitio de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT funciona como uno de ellos y un segmento rico en GC puede ser otro. La Figura 11-26 ilustra cómo afectan las mutaciones en estos elementos a la tasa de transcripción.

Elementos que actúan en *cis* independientemente de la distancia

En eucariotas se conocen dos clases de elementos que actúan en *cis* y que pueden hacerlo a una distancia considerable del promotor. Los **intensificadores** son secuencias de acción *cis* que aumentan mucho las tasas de transcripción de promotores que se encuentran en la misma molécula. Actúan por tanto activando la transcripción, es decir, regulándola positivamente. Por el contrario, los **silenciadores** son secuencias de acción *cis* a las que se unen represores, inhibiendo a los activadores y reduciendo el nivel de transcripción. Los intensificadores y los silenciadores se parecen a los elementos proximales en cuanto que a ellos se unen proteínas reguladoras que actúan en *trans*. Se diferencian de ellos, sin embargo, en que son capaces de actuar a distancia, algunas veces a 50 kb o más, y en que pueden operar aguas arriba o aguas abajo del promotor al que controlan. Los elementos intensificadores y silenciadores están estructurados de forma compleja. La Figura 11-27 muestra la secuencia de DNA del intensificador de SV40 (del inglés *Simian Virus 40*), que se requiere para conseguir un nivel elevado de expresión de los transcritos del virus. El intensificador contiene cinco elementos necesarios para alcanzar el máximo nivel de transcripción. Se conocen intensificadores compuestos por múltiples copias de un elemento de unión. Estas diferentes secuencias sirven como sitios de reconocimiento para proteínas específicas reguladoras en *trans*.

Mecanismos de acción a distancia

¿Cómo regulan la transcripción los intensificadores y los silenciadores a muchos miles de pares de bases de distancia? La mayor parte de los modelos que explican estas acciones incluyen

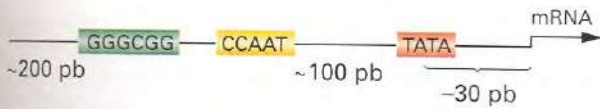


Figura 11-25. Región promotora de los eucariotas superiores. La secuencia TATA se encuentra aproximadamente a 30 pares de bases del sitio de iniciación del mRNA. Normalmente existen dos o más elementos próximos al promotor, situados a 100 y 200 pb aguas arriba del sitio de inicio del mRNA. Se indican la secuencia CCAAT y la secuencia rica en GC. Otros elementos aguas arriba de acción *cis* son las secuencias GCCACACCC y ATGCAAAT.

algún tipo de bucle en el DNA. La Figura 11-28 detalla un modelo de la activación del complejo de iniciación (véase también la Fig. 11-29). En este modelo, un bucle en el DNA acerca las proteínas reguladoras unidas a elementos intensificadores lejanos a los complejos proteicos asociados con las secuencias de acción *cis* próximas al promotor.

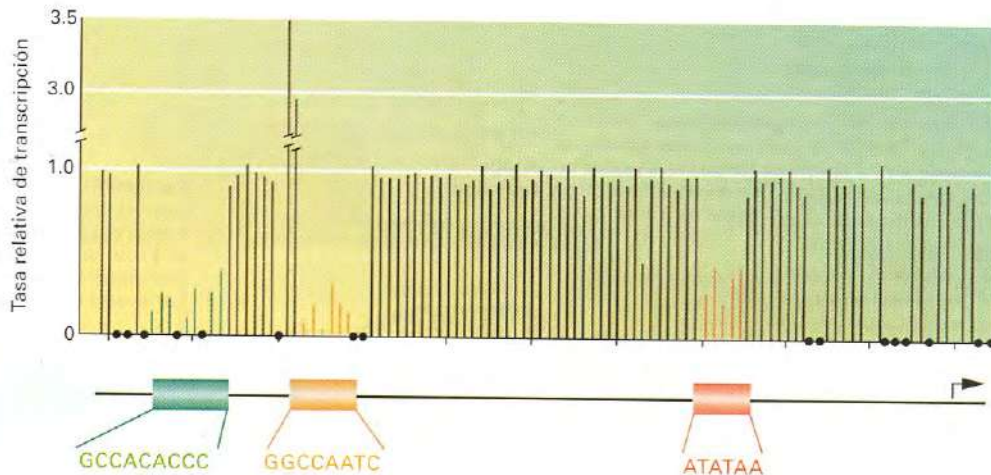


Figura 11-26. Efecto de mutaciones puntuales en el promotor del gen de la globina β . Se analizó el efecto sobre la transcripción de mutaciones puntuales repartidas por toda la región promotora. La altura de las líneas representa la tasa de transcripción, relativa al promotor silvestre, de promotores con un cambio de base en esa posición. El valor 1.0 representa una tasa igual a la del silvestre; las reducciones en la transcripción producen valores menores de 1.0. Se probaron casi todos los nucleótidos de la región promotora, salvo los señalados con puntos negros. El esquema de la parte inferior muestra las posiciones de la secuencia TATA y de dos elementos aguas arriba del promotor. Sólo las sustituciones de bases en esos tres elementos del promotor cambian las tasas de transcripción. (De T. Maniatis, S. Goodbourn y J. A. Fischer, *Science* 236, 1987, 1237.)

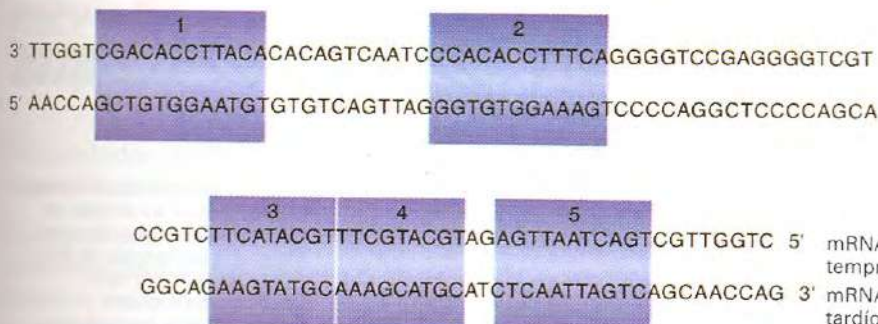


Figura 11-27. Organización del intensificador de SV40, un virus que infecta a primates. Sus secuencias reguladoras interaccionan con la maquinaria de regulación de la transcripción de la célula eucariótica. Las secuencias sombreadas 1 a 5 indican las secuencias que se requieren para alcanzar los niveles máximos de actividad intensificadora. (De T. Maniatis, S. Goodbourn y J. A. Fischer, *Science* 236, 1987, 1237.)

COROLARIO

Los intensificadores y los silenciadores eucarióticos pueden actuar a gran distancia.

Control en *trans* de la transcripción

Actualmente, se han identificado en eucariotas muchas proteínas reguladoras que actúan en *trans*. Como sus contrapartidas en procariotas, estas proteínas operan uniéndose a secuencias diana específicas en el DNA.

Las proteínas reguladoras que se unen al promotor mínimo y a los elementos proximales ayudan a la polimerasa de RNA II a iniciar la transcripción y, junto a ella, forman el complejo de iniciación, como se ilustra en la Figura 11-29a. Varios complejos de factores de transcripción diferentes (complejos TFII) interaccionan con la polimerasa de RNA II. Por ejemplo, el complejo TFIID consta de la proteína de unión a la secuencia TATA (TBP) y más de ocho subunidades adicionales (las TAF). Los

También se han identificado algunas de las proteínas que se unen a elementos independientes de la distancia. La proteína citada en el gen de levadura *GCN4* es un ejemplo de proteína que se une a un elemento intensificador. Opera sobre intensificadores llamados secuencias activadoras aguas arriba (UAS; del inglés *Upstream Activating Sequences*). *GCN4* activa la transcripción de muchos genes de levadura cuyos productos participan en rutas de síntesis de aminoácidos. Cuando faltan aminoácidos, aumenta el nivel de la proteína *GCN4* y, como consecuencia, aumentan los niveles de expresión de los genes biosintéticos. Las UAS reconocidas por *GCN4* contienen como elemento principal la secuencia de reconocimiento ATGAC-TCAT.

El promotor mínimo, los elementos proximales y los elementos independientes de la distancia son sitios del DNA reconocidos por proteínas de unión a DNA específicas de secuencia. Es necesario un conjunto adecuado de estas proteínas de acción *trans* para que la polimerasa de RNA II inicie la transcripción y alcance los niveles máximos de transcripción.

Muchos elementos intensificadores de los eucariotas superiores activan la transcripción en tejidos específicos, es decir, inducen la expresión de un gen en uno o unos pocos tipos celulares. Por ejemplo, los genes de los anticuerpos están flanqueados por potentes intensificadores que sólo operan en los linfocitos B del sistema inmunitario. Muchos intensificadores son componentes integrales de complicados circuitos genéticos específicos de tejido, en los cuales se basan los complicados acontecimientos que

Activadores
Estas proteínas se unen a los genes en sitios conocidos como intensificadores y aumentan la tasa de transcripción

Represores
Estas proteínas se unen a series de genes específicos en sitios conocidos como silenciadores, disminuyendo los niveles de transcripción.

Intensificador

Activador

Silenciador

Represor

Intensificador

Activador

Activador

250

40

110

60

30 Beta

30 Alfa

150

80

A

Proteína de unión a TATA

B

F

E

H

Polimerasa de RNA

Región codificante

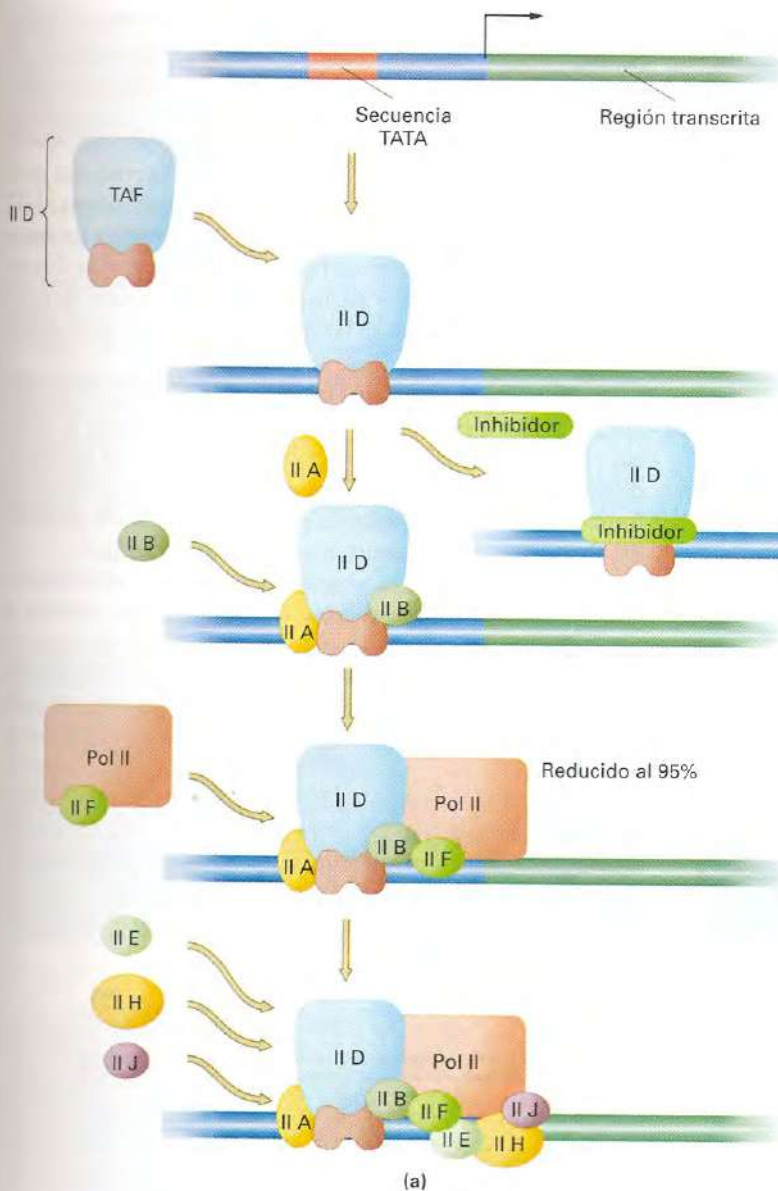
Secuencia TATA

Promotor mínimo

Coactivadores
Estas moléculas «adaptadoras» integran señales de los activadores y quizás también de los represores.

Factores de transcripción basal
En respuesta a las señales de

Factores de transcripción basal
En respuesta a las señales de los activadores, estos factores sitúan a la polimerasa de RNA en el sitio de inicio de la transcripción e inician el proceso de la transcripción.



(b)

Figura 11-29. (a) La formación del complejo de iniciación de la polimerasa de RNA II comienza con la unión del factor de transcripción TFIID a la secuencia TATA. TFIID está compuesto por una subunidad de unión a la secuencia TATA llamada TBP (marrón) y más de ocho subunidades adicionales (las TAF), representadas por un símbolo grande (azul claro). Los inhibidores pueden unirse al complejo TFIID-promotor, bloqueando la unión de otros factores generales de transcripción. La unión de TFIIB al complejo TFIID-promotor (para formar el complejo D-A) impide la unión de los inhibidores. TFIIB se une entonces al complejo D-A, a lo que sigue la unión de un complejo previamente formado entre TFIIF y la polimerasa de RNA II. Finalmente, TFIIE, TFIIH y TFIID se incorporan, en ese orden, al complejo y la transcripción puede iniciarse. (b) La proteína de unión a TATA (azul) es una molécula notablemente simétrica, con forma de silla de montar. Su región inferior se sitúa sobre el DNA y parece curvarlo. Esta curvatura facilita de alguna forma el ensamblaje del complejo que inicia la transcripción. (Parte a de H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira y J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3.ª ed. Copyright © 1995 por Scientific American Books; la parte b es cortesía de J. L. Kim y S. K. Berley, de *Nature* 365, 1993, 520.)

tienen lugar durante el desarrollo de los eucariotas superiores. La especificidad de tejido se confiere mediante una de dos formas posibles. Un intensificador actúa en un tejido específico si el activador que se une a él está presente sólo en algunos tipos celulares. Alternativamente, un represor específico de tejido puede unirse a un silenciador situado muy cerca del elemento intensificador, dejando a este último inaccesible a su factor transcripcional.

Propiedades de los intensificadores específicos de tejido

En algunos casos, la regulación se controla mediante series sencillas de intensificadores. En *Drosophila*, por ejemplo, las vitelogeninas son grandes proteínas de la yema del huevo que se sintetizan en los ovarios y en el cuerpo graso (que, en esencia, es

el hígado de la mosca) de las hembras adultas y que se transportan luego al oocito en desarrollo. Dos intensificadores diferentes situados a unos pocos cientos de pares de bases del promotor regulan el gen de la vitelogenina, uno estimulando su expresión en los ovarios y otro en el cuerpo graso.

El conjunto de intensificadores de un gen puede ser bastante complejo, controlando patrones de expresión génica igualmente complejos. El gen *dpp* (*decapentaplegic*) de *Drosophila*, por ejemplo, determina una proteína que media la señalización intercelular (véase el Cap. 23). Contiene numerosos intensificadores, quizás decenas o cientos, dispersos a lo largo de un segmento de DNA de unas 50 kb. Algunos de ellos están situados 5' (aguas arriba) del sitio de iniciación de la transcripción de *dpp*, otros están situados aguas abajo del promotor, otros en intrones, e incluso algunos están situados aguas abajo del sitio 3' de poliadenilación del gen. Cada uno de estos intensificadores regula la

expresión de *dpp* en una parte distinta del animal en desarrollo. Algunos de los intensificadores mejor caracterizados de *dpp* se muestran en la Figura 11-30.

El requerimiento de múltiples elementos intensificadores para regular la expresión específica de tejido ayuda a explicar el gran tamaño de los genes de los eucariotas superiores. La regulación específica de tejido de un gen puede ser bastante compleja, y precisar la acción de numerosos elementos intensificadores situados a distancia.

Disección de los elementos reguladores eucarióticos

Una parte importante de la Genética moderna tiene que ver con la identificación y caracterización de los elementos reguladores a distancia mediante construcciones transgénicas, en las que moléculas de DNA recombinante se insertan en el genoma de un organismo (véase el Cap. 13). En estas construcciones, se incorporan fragmentos aislados de un gen para determinar qué patrones espaciales y temporales controlan. Mediante este tipo de experimentos podemos localizar elementos reguladores concretos. A su vez, podemos utilizar estos elementos reguladores para desarrollar nuevas formas de identificar genes de interés. Veremos en los siguientes apartados cómo se llevan a cabo tales experimentos, usando como ejemplo los intensificadores transcripcionales. Tenga en cuenta, sin embargo, que las mismas técnicas y la misma lógica se aplican al estudio de otros tipos de elementos reguladores, algunos de los cuales se discutirán en el Capítulo 23.

Utilización de genes testigos para encontrar intensificadores

Normalmente, los intensificadores de un gen ya clonado se identifican usando **genes testigos (chivatos o delatores)**. En este tipo de construcciones, se fusiona un fragmento que contiene el DNA regulador en *cis* (normalmente mediante un sistema de «cortado y pegado» basado en el uso de enzimas de restricción) cerca de una unidad de transcripción que expresa una proteína testigo, es decir, una proteína cuya presencia es fácilmente detectable. Nuestra vieja amiga la enzima β -galactosidasa de *E. coli*, cifrada en el gen *lacZ*, es una proteína testigo utilizada frecuentemente, porque es muy fácil detectar su presencia mediante métodos histoquímicos, añadiendo al medio un sustrato sinté-

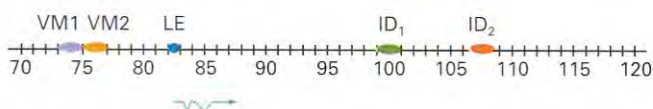


Figura 11-30. Mapa molecular de un gen complejo, el gen *dpp* de *Drosophila*. Las unidades del mapa están en kilobases. La unidad de transcripción básica del gen se muestra debajo de la línea de coordenadas del mapa. Las abreviaturas sobre la línea marcan los sitios de unos pocos de los muchos intensificadores específicos de tejido que regulan la transcripción durante diferentes etapas del desarrollo. Los patrones de expresión específica de tejido que confieren estos intensificadores se muestran en la Figura 11-32, donde también se explican las abreviaturas.

tico, el X-gal, y observando qué tejidos adquieren coloración azul. La unidad transcripcional con el gen testigo contiene un promotor «débil», que no puede iniciar la transcripción sin la ayuda de un intensificador (Fig. 11-31). La construcción se introduce mediante transformación en la línea germinal de un organismo hospedador, y se estudia entonces la presencia de la proteína testigo en las células apropiadas. En las Figuras 11-32 y 11-33 se muestran dos ejemplos de la expresión de genes testigos, uno mediante intensificadores del gen *dpp* de *Drosophila* (Fig. 11-32) y otro mediante un intensificador de ratón que determina expresión en las células precursoras del músculo (Fig. 11-33).

La presencia de la proteína testigo en un tejido indica la existencia de uno o más intensificadores en el fragmento de DNA que estamos estudiando. Una vez determinado que un fragmento de DNA contiene un intensificador, éste puede ser localizado de forma más precisa utilizando fragmentos cada vez más pequeños del DNA clonado en la misma prueba del gen testigo.

En última instancia, la secuencia de DNA del intensificador puede identificarse «recortando» el fragmento que contiene la región reguladora en *cis*. Cuando se conoce esta secuencia, la siguiente pregunta a realizarse es qué proteínas activadoras de la transcripción se unen al intensificador. Actualmente existen métodos que permiten identificar estas proteínas y clonar los genes que las determinan. Una vez clonados los genes correspondientes, éstos pueden analizarse por métodos genéticos y moleculares. Mediante estas aproximaciones experimentales, es posible analizar con detalle los circuitos genéticos que regulan la expresión génica en los eucariotas.

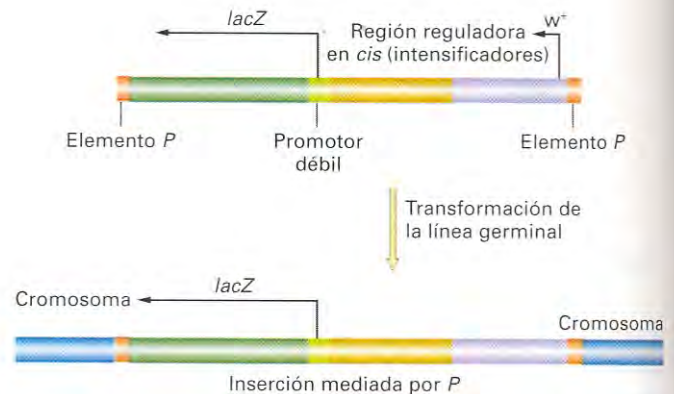


Figura 11-31. Utilización de construcciones con un gen testigo para identificar intensificadores de *Drosophila*. La línea superior representa parte de un plásmido, flanqueada por extremos del elemento P, de modo que el material genético situado entre ellos puede insertarse en el genoma por transformación mediada por el elemento P (véase el Cap. 20). Una región de DNA de la que se sospecha que contiene uno o más intensificadores se inserta en una posición inmediatamente adyacente a un promotor «débil», es decir, un promotor que no puede iniciar la transcripción por sí mismo. El promotor va unido a su vez al gen estructural *lacZ* de *E. coli* (el gen testigo), que determina la enzima β -galactosidasa. Si en la construcción hay intensificadores, éstos inducirán la expresión específica de tejido del gen *lacZ*. *w⁺* es el alelo silvestre del gen *white* de *Drosophila* que se utiliza para detectar la presencia en la mosca de la construcción con el gen testigo. Los embriones y los discos imaginales que se muestran en las Figuras 11-32 y 11-33 son ejemplos de expresión de construcciones con genes testigos en *Drosophila* y en ratones.

COROLARIO

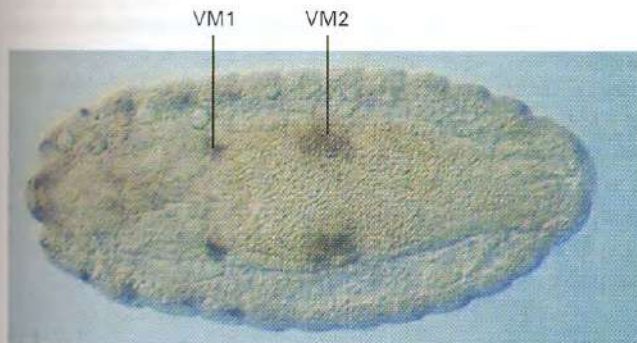
Las técnicas basadas en el uso de genes testigos se utilizan para caracterizar los elementos reguladores concretos de los genes.

Elementos reguladores y mutaciones dominantes

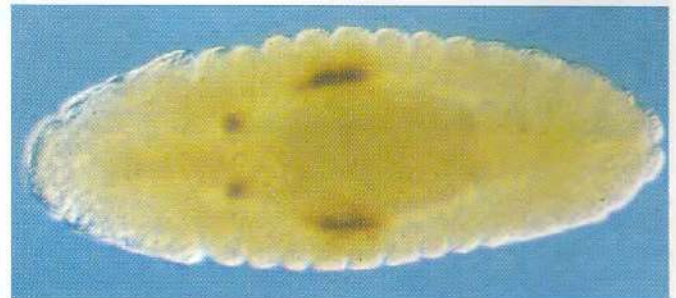
Las propiedades de los elementos reguladores nos ayudan a entender las propiedades de ciertas clases de mutaciones dominantes. Éstas pueden clasificarse en dos tipos generales. En algunas mutaciones dominantes, la inactivación de una de las dos copias de un gen reduce la cantidad de producto génico por debajo de un cierto umbral crítico para la producción de un fenotipo normal. Podemos pensar en estas mutaciones como **mutaciones dominantes por pérdida de función** (a las cuales nos referimos

como mutaciones haploinsuficientes en capítulos anteriores). En otros casos, el fenotipo dominante se debe a alguna nueva propiedad del gen mutante, no a una reducción de su actividad normal; esta clase comprende a las **mutaciones dominantes por ganancia de función**.

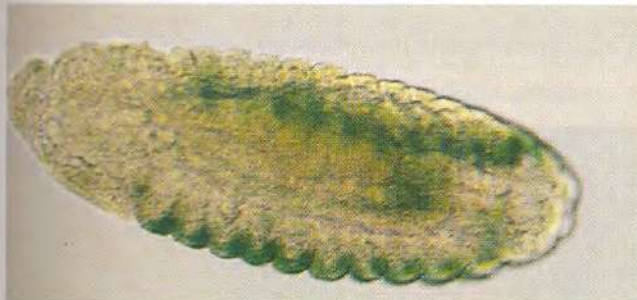
Muchas mutaciones dominantes por ganancia de función aparecen por la fusión entre sí de fragmentos de dos genes. (Observe, sin embargo, que hay otros mecanismos por el que pueden aparecer mutaciones dominantes por ganancia de función). Este tipo de fusiones pueden aparecer en los puntos de ruptura de reorganizaciones cromosómicas, como inversiones, translocaciones, duplicaciones o deleciones (véase el Cap. 17). Como los intensificadores actúan a gran distancia y pueden activar muchos promotores diferentes, puede ocurrir la desregulación de un gen si una reordenación cromosómica deja intensificadores de un gen adyacentes a la unidad de transcripción de otro gen. En ca-



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 11-32. Algunos ejemplos de la compleja regulación específica de tejido del gen *dpp*. En las partes a, c y d, la tinción azul se debe a un ensayo histoquímico de la actividad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* (la proteína determinada por el gen testigo *lacZ*). Las posiciones de los intensificadores de *dpp* responsables de los distintos patrones de tinción observados aquí se muestran en la Figura 11-30. (a) Ensayo mediante un gen testigo de la expresión del gen *dpp* de *Drosophila* en dos regiones del mesodermo visceral embrionario, el precursor de la musculatura del intestino. Las dos manchas de la izquierda corresponden al intensificador VM1, que controla la expresión en la parte anterior del mesodermo visceral; las dos manchas de la derecha corresponden al intensificador VM2, que controla la expresión en la parte posterior del mesodermo visceral. (b) Ensayo de hibridación *in situ* de RNA para estudiar la expresión de *dpp* en el mesodermo visceral embrionario. Observe que el patrón de expresión del color azul debido al gen testigo en la parte a es igual al patrón de expresión (marcada en marrón) del mRNA de *dpp* mostrada aquí, lo que confirma la fidelidad del ensayo basado en el gen testigo. (c) Expresión del gen testigo controlada por un intensificador diferente (LE) de *dpp* en el ectodermo lateral de un embrión. (d) Expresión del gen testigo controlada por ID, uno de los muchos intensificadores que determinan la expresión de *dpp* en los discos imaginales (un disco imaginal es un círculo plano de células de la larva que da lugar a uno de los apéndices de la mosca adulta). Se muestra un sector azul que corresponde a la expresión del gen testigo asociado al gen *dpp* en un disco imaginal de pata. (Las partes a y b son cortesía de D. Hursh; la parte c es cortesía de R. W. Padgett; la parte d es cortesía de R. Blackman y M. Sanicola.)



Figura 11-33. Embrión transgénico de 11.5 días que contiene DNA recombinante compuesto por una secuencia de 258 pb fusionada al gen *lacZ* de *E. coli*, que determina la enzima β -galactosidasa. El DNA de ratón de 258 pb contiene todas las secuencias reguladoras en *cis* necesarias para dirigir la expresión del gen *lacZ* en células precursoras del músculo, como revela la tinción azul que indica la actividad β -galactosidasa. Los precusores musculares teñidos incluyen los somitos, las yemas de las extremidades y los arcos branquiales del embrión (Reproducido de D. J. Goldhamer, B. P. Brunk, A. Faerman, A. King, M. Shani y C. P. Emerson, Jr., *Development* 121, 1995, 644.)

sos de este tipo, los intensificadores del gen situado a un lado del punto de ruptura regulan la transcripción de un gen situado al otro lado del punto de ruptura. A menudo, esta desregulación lleva a la expresión incorrecta del mRNA cifrado en la unidad de transcripción en cuestión. Tales fusiones ocasionan fenotipos mutantes por ganancia de función, dependiendo de la naturaleza de la proteína cifrada en el mRNA desregulado y de los tejidos en los cuales se expresa incorrectamente.

La clásica mutación dominante *Bar* de *Drosophila* es un ejemplo de desregulación debida a una fusión génica. En la mutación *Bar*, los elementos reguladores en *cis* que promueven expresión en el ojo en desarrollo se fusionan a un gen que normalmente no se expresa en el ojo. Este último gen determina un factor de transcripción cuya expresión incorrecta en el ojo lleva a la muerte de muchas células, lo que provoca el ojo pequeño típico del fenotipo *Bar*.

En unos cuantos casos, se conoce bien cuál es la causa de la desregulación en este tipo de fusiones génicas. Un ejemplo es la mutación *Tab* (*Transabdominal*) de *Drosophila*, que provoca que una parte del tórax de la mosca adulta se desarrolle como un tejido característico del sexto segmento abdominal (A6) (Fig. 11-34). Se sabe que la mutación *Tab* está relacionada con una

inversión cromosómica. Uno de los puntos de ruptura de la inversión corresponde a una región intensificadora del gen *sr* (*striped*). Los intensificadores del gen *sr* inducen la expresión del gen en ciertas partes del tórax de la mosca. El otro punto de ruptura está cerca de la unidad de transcripción del gen *Abd-B* (*Abdominal-B*). Este gen determina un factor transcripcional que normalmente se expresa sólo en las regiones posteriores del animal y que es responsable del fenotipo abdominal de cualquier tejido en el cual se exprese. (Trataremos acerca de genes tipo *Abd-B* en el Capítulo 23, en el apartado de los genes homeóticos). En la inversión *Tab*, los elementos intensificadores de *sr* que controlan expresión torácica quedan junto a la unidad de transcripción de *Abd-B*, provocando que este gen se active exactamente en aquellas partes del tórax donde normalmente lo haría *sr* (Fig. 11-35). Dada la función del factor transcripcional *Abd-B*, su activación en las células torácicas cambia el destino de éstas al de abdomen posterior. De esta forma, se entiende la base molecular de una mutación dominante.

Las fusiones génicas son una fuente muy importante de variación genética, ya que generan patrones nuevos de expresión génica. De hecho, podemos imaginar que este tipo de fusiones puede haber jugado un papel muy importante en los cambios de patrones de expresión génica durante la divergencia y la evolución de las especies. Además de afectar al desarrollo (tratado en el Cap. 23), tales mutaciones juegan un papel fundamental en la formación y desarrollo de muchos cánceres (tratados en el Cap. 22).

COROLARIO

La fusión de intensificadores específicos de tejido a genes que normalmente no están bajo su control puede dar lugar a fenotipos mutantes dominantes por ganancia de función.



Figura 11-34. Mutación *Tab*. La mosca de la izquierda es un macho silvestre. La mosca de la derecha es un macho mutante heterocigótico *Tab/+*. En la mosca mutante, parte del tórax (el tejido negro) ha cambiado a tejido que normalmente se encuentra en la parte dorsal de uno de los segmentos abdominales posteriores. El resto del tórax es normal. (De S. Celniker y E. B. Lewis, *Genes and Development* 1, 1987, 111.)

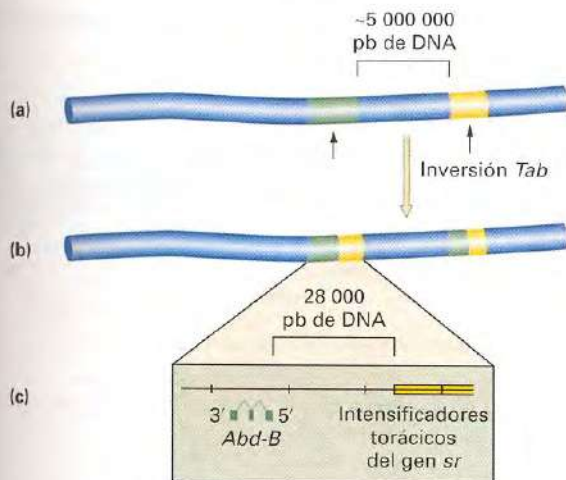


Figura 11-35. La mutación *Tab* se debe a una fusión génica. (a) Se muestran las posiciones de los genes *Abd-B* y *sr* en el mapa de un cromosoma 3 normal. Los dos genes se encuentran, aproximadamente, a 5 millones de pares de bases de distancia, y normalmente hay cientos de genes entre ellos. (b) La inversión *Tab* tiene un punto de ruptura en el gen *Abd-B* y el otro en el gen *sr* (flechas de la parte a). Como resultado, se fusionan fragmentos de los genes *Abd-B* y *sr* en ambos extremos de la inversión. (c) Visión ampliada del punto de ruptura de la inversión más cercano al centrómero. Los puntos de ruptura de la inversión han dado lugar a una molécula de DNA en la cual la región promotora de *Abd-B* está sólo a 28 000 pares de bases de los elementos intensificadores del gen *sr*. Ello provoca que el transcrito *Abd-B* se exprese ectópicamente en algunas partes del tórax de la mosca, donde el gen silvestre *Abd-B* no se transcribe normalmente.

Regulación de los factores transcripcionales

Algunos factores transcripcionales sólo se sintetizan en tejidos concretos. Las actividades de los propios factores transcripcionales están también reguladas en diferentes tipos celulares.

Hormonas esteroides: cómo enlazar la acción de los intensificadores con la fisiología del organismo

De la misma forma que es fundamental en los procariotas ajustar transcripcionalmente la actividad de las proteínas reguladoras con el estado fisiológico de la bacteria, también en los eucariotas es crucial el vínculo entre la regulación transcripcional y la fisiología del organismo. En el Capítulo 23 veremos algunos ejemplos de cómo las rutas de diferenciación y desarrollo de patrones aportan el contexto fisiológico para la activación de factores transcripcionales específicos. Algunas veces, la señal reguladora que activa a los factores transcripcionales eucarióticos proviene de una región muy distante del cuerpo. Por ejemplo, las hormonas liberadas al sistema circulatorio por un órgano que forma parte del sistema endocrino (Fig. 11-36) viajan por la circulación prácticamente a todas las regiones del cuerpo. Así, el sistema endocrino sirve como regulador maestro para coordinar cambios en la transcripción en células de muchos tejidos diferentes. En este mecanismo se basa la determinación del sexo en los mamíferos, que se tratará en el Capítulo 23.

Algunas hormonas son pequeñas moléculas que, debido a sus propiedades de solubilidad en lípidos, atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Este es el caso de las hormonas esteroides, como los glucocorticoides, la testosterona y los estrógenos. Una vez dentro de las células, las hormonas esteroides se unen y regulan a factores transcripcionales específicos. En este sentido, podemos pensar en los esteroides como análogos a los efectores alostéricos que regulan algunos operones bacterianos.

Un ejemplo es la hormona femenina estrógeno. La proteína ovoalbúmina de la clara del huevo se sintetiza en los oviductos de las gallinas como respuesta específica al estrógeno, que provoca un aumento en la transcripción del gen de la ovoalbúmina. Ello se consigue mediante la unión del estrógeno a una proteína receptora que primero reconoce a la molécula de estrógeno en el citoplasma y luego la transporta al núcleo. La molécula receptora es un factor transcripcional que se une entonces al DNA en un sitio intensificador denominado HRE (del inglés *hormone-response element*). La Figura 11-37 ilustra el proceso general de activación por el complejo esteroide-receptor.

COROLARIO

Como las procarióticas, las proteínas eucarióticas reguladoras de la transcripción deben poseer dominios que interactúen con señales moleculares del estado fisiológico de la célula.

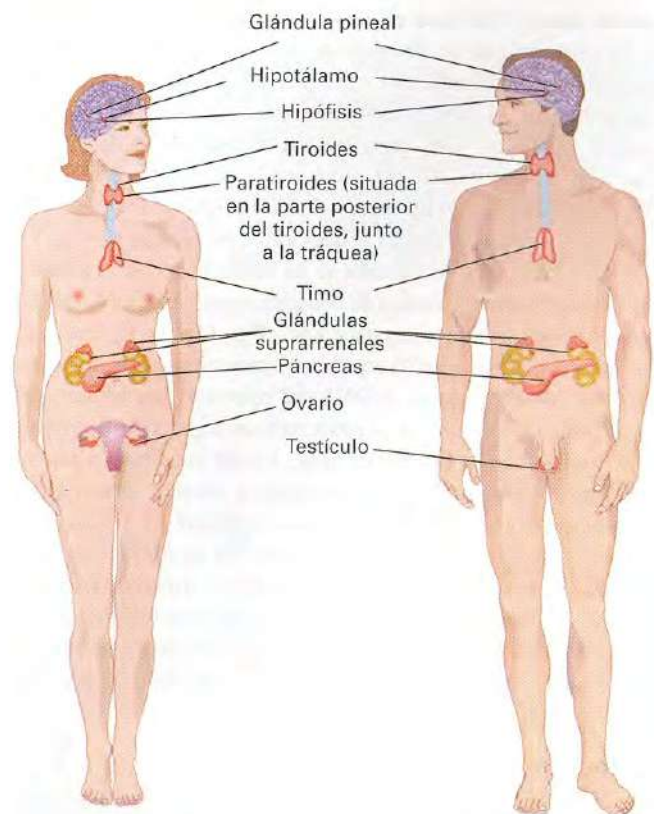
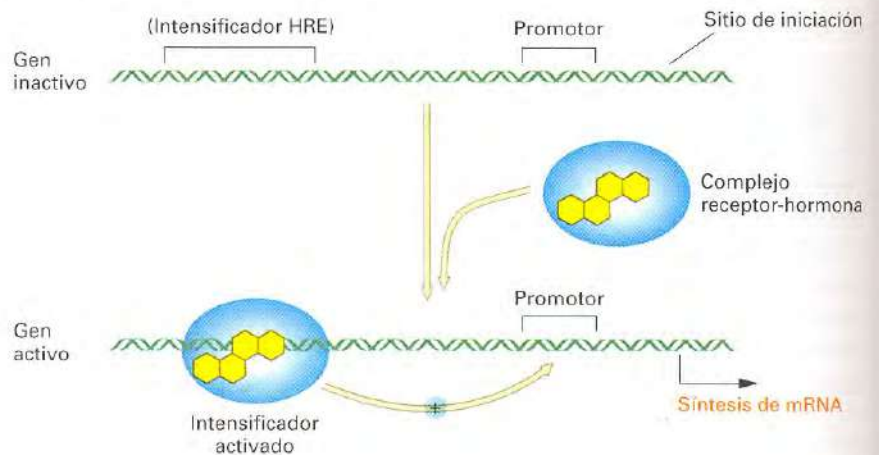


Figura 11-36. Órganos endocrinos humanos. (De W. K. Purves, G. H. Orians y H. C. Heller, *Life: The Science of Biology*, 4.ª ed. Sinauer Associates, Inc. y W. H. Freeman and Company, 1995.)

Figura 11-37. Acción de las hormonas esteroides en las secuencias intensificadoras. Una hormona esteroide (azul) se une a una proteína receptora soluble. Este complejo, a su vez, se une a las secuencias intensificadoras y las capacita para estimular la transcripción de los genes de respuesta a hormonas. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.^a ed. Copyright © 1995 Lubert Stryer.)



Estructura de las proteínas reguladoras

A lo largo de este capítulo, hemos visto que proteínas como el represor Lac, CAP o la proteína de unión a TATA son fundamentales para la regulación génica. Estas proteínas de unión a DNA específicas de secuencia son vitales para la regulación transcripcional de todos los organismos. Debemos, pues, hablar de cómo ocurre la unión a DNA específica de secuencia.

Los análisis de las secuencias de las proteínas y las comparaciones de sus estructuras indican que las proteínas reguladoras que se unen al DNA poseen características comunes. Una de ellas es la existencia de un dominio de unión al DNA, situado en un extremo, que sobresale del «cuerpo» central de la proteína. En algunos casos, el cuerpo central contiene el sitio de unión para el efector alostérico. Esta organización encaja con la del represor Lac (Fig. 11-38) y CAP, así como con la de muchas otras proteínas reguladoras como los receptores de esteroides. En este tipo de proteínas, sobresalen ciertas hélices α que encajan en el surco mayor del DNA. Esta interacción se ha visualizado resolviendo las estructuras tridimensionales de complejos proteína-DNA, como la del complejo operador-represor Lac (Fig. 11-39). En este caso, dos hélices α de la proteína represora interactúan con dos surcos mayores consecutivos en el DNA del operador. Las hélices están conectadas por un giro en la estructura secundaria de la proteína. Este motivo hélice-giro-hélice (Fig. 11-40) es común a muchas proteínas reguladoras. Hay, sin embargo, muchos otros motivos de unión al DNA. Sólo como ejemplo, la Figura 11-41 muestra la estructura de una parte de una proteína con *dedos de cinc*, en la cual un átomo de cinc se conjuga con cuatro aminoácidos de una pequeña parte de la cadena polipeptídica [dos cisteínas (C) y dos histidinas (H)]. Normalmente, las proteínas con dedos de cinc presentan varios de estos dedos. Parece que cada dedo de cinc interactúa con una secuencia específica del DNA.

COROLARIO

Las estructuras de las proteínas de unión a DNA nos ayudan a entender cómo establecen contacto con secuencias específicas del DNA por medio de dominios polipeptídicos que interactúan con el surco mayor de la hélice doble del DNA.

Herencia epigenética

El examen general que hemos realizado respecto a la regulación transcripcional da cuenta de la mayor parte de las observaciones que los genetistas han hecho durante todo este siglo. Sin embargo, todavía quedan fenómenos que requieren explicación. Una serie de este tipo de fenómenos, a los que nos referiremos como *herencia epigenética*, parece ser responsable de alteraciones heredables en las que la propia secuencia de DNA no cambia. Es probable que estos fenómenos constituyan otro nivel, poco entendido, de control génico. Algunos ejemplos de herencia epigenética en los cuales el estado de actividad de un gen depende de su historia genealógica son la paramutación y la impronta parental.

Paramutación

El fenómeno de la *paramutación* se ha descrito en varias especies de plantas, siendo especialmente notable el caso del maíz (Fig. 11-42), donde sólo se observa en unos cuantos genes. En

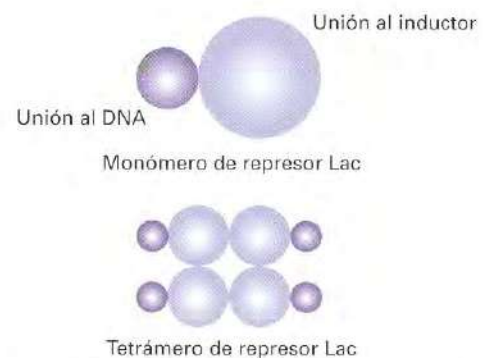


Figura 11-38. Representación esquemática de la organización de los dominios del represor Lac. Todas las mutaciones que afectan a la unión a DNA y al operador alteran el extremo amino terminal de la proteína. Los mutantes afectados en la unión al inductor presentan alteraciones en el resto de la proteína.

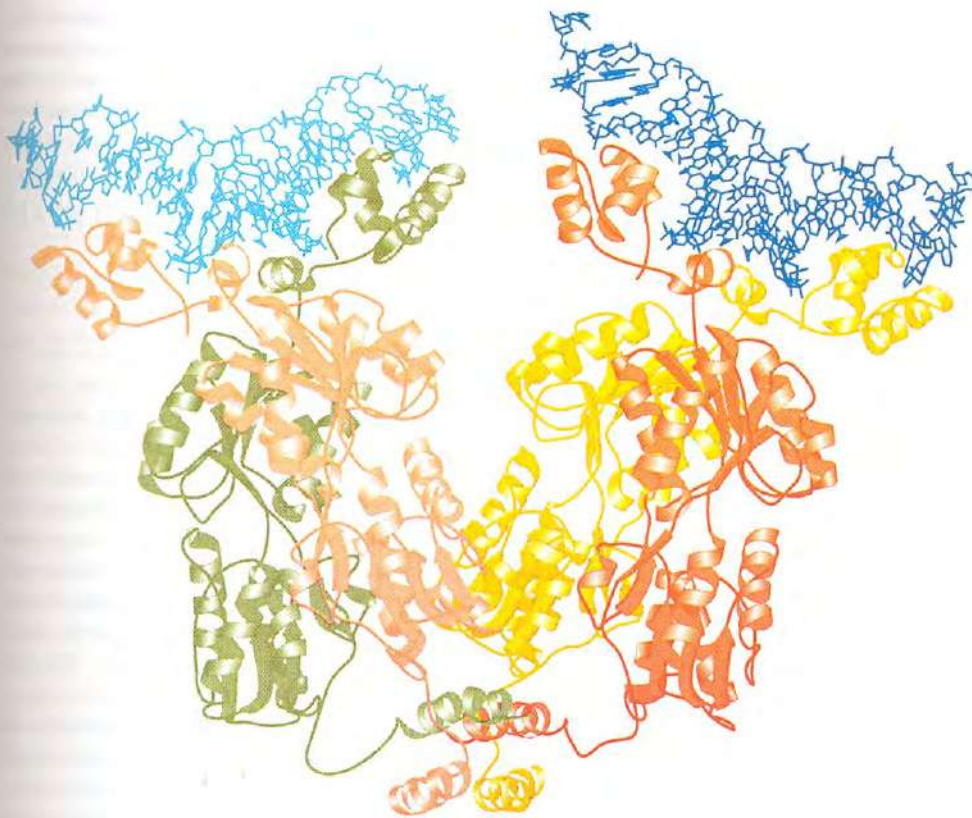


Figura 11-39. Imagen del complejo represor Lac-DNA obtenida por estudios de cristalografía de rayos X. En este caso, el tetrámero del represor está unido a dos operadores. Cada dímero se une a un operador. Los operadores mostrados aquí (azul claro y azul oscuro) tienen una longitud de 21 pares de bases. Los monómeros presentan los colores verde, rosa, rojo y amarillo. Observe cómo el fragmento amino terminal de un monómero (rosa) se cruza con otro monómero (verde) para unirse a la primera parte del operador, mientras que el fragmento terminal del segundo monómero (verde) se cruza y se une a la segunda parte del operador. De esta forma, la hélice de reconocimiento de cada una de las dos subunidades se une a regiones consecutivas del mismo operador. (Cortesía de M. Lewis, Geoffrey Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu, University of Pennsylvania).

este fenómeno, algunos alelos especiales, pero aparentemente normales, llamados paramutables, sufren cambios irreversibles tras haber estado presentes en el mismo genoma que otra clase de alelos especiales, llamados paramutagénicos. El gen *B-I* del maíz determina una enzima de la ruta de síntesis de pigmentos tipo antocianina en varios tejidos de la planta. Normalmente, los alelos nulos *b* provocan la ausencia de estos pigmentos, y son

completamente recesivos respecto a *B-I*. Hay un alelo paramutagénico especial, llamado *B'*, que confiere capacidad para sintetizar una pequeña cantidad de pigmento antocianina. En el cruzamiento entre homocigotos *B-I* y *B'*, los heterocigotos resultantes están débilmente pigmentados, siendo por tanto indistinguibles de los homocigotos *B'*. Este resultado sugeriría que *B-I* es recesivo frente a *B'*. Si esta sencilla explicación fuera cierta, la autofe-



Figura 11-40. Motivo hélice-giro-hélice de las proteínas de unión a DNA. Cada monómero de estas proteínas diméricas contiene un motivo de este tipo. Las dos unidades están separadas por 34 Å, una vuelta de la hélice de DNA. (De L. Stryer, *Biochemistry*, 4.ª ed. Copyright © 1995 Lubert Stryer.)

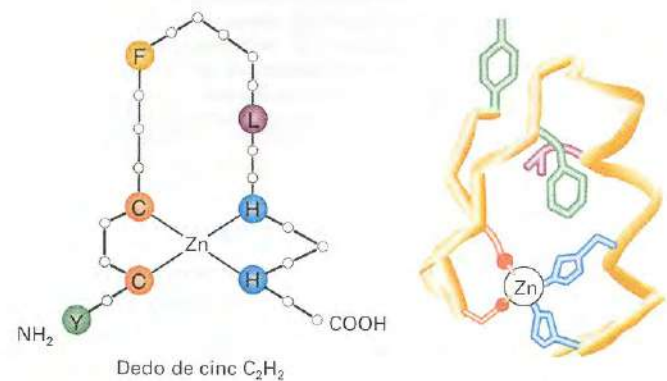


Figura 11-41. Modelo estructural del dominio de unión a DNA conocido como dedo de cinc. (De J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Copyright © 1992 James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski y Mark Zoller.)

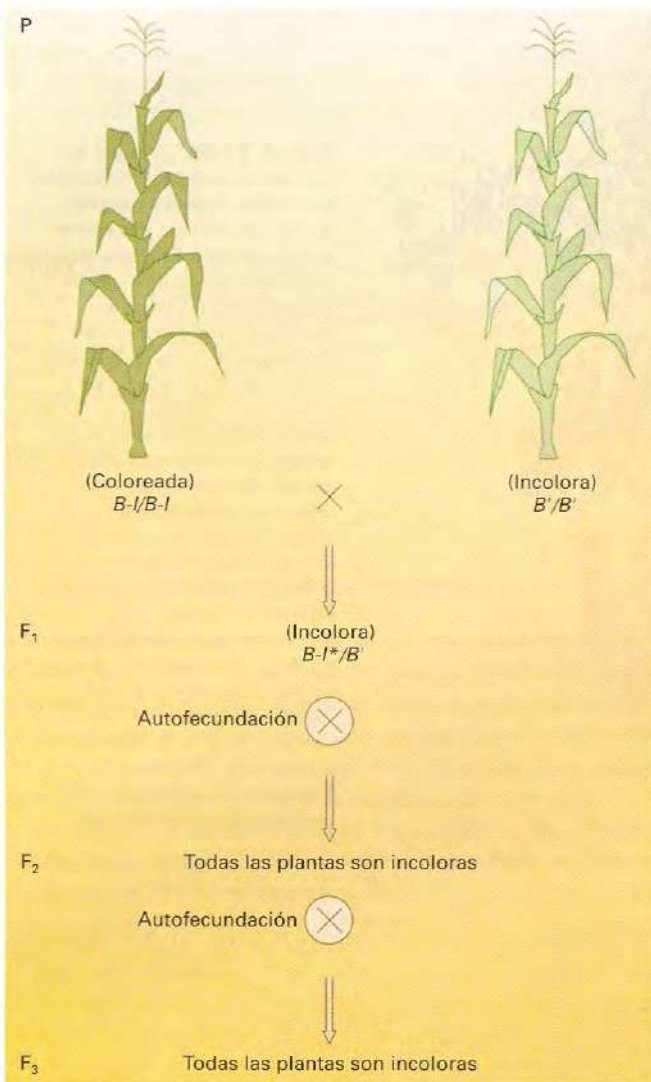


Figura 11-42. Serie de cruzamientos que demuestran la paramutación. La mutación $B-I$ da lugar a plantas pigmentadas, mientras que la mutación B' da lugar a plantas casi sin pigmento. Normalmente, cuando se cruza $B-I$ con plantas recesivas para el alelo b , que no produce color, las plantas resultantes son coloreadas. Sin embargo, cuando se cruzan entre sí plantas $B-I$ y B' , las plantas de la F_1 son prácticamente incoloras, como los homocigotos B' . Por tanto, el alelo $B-I$ ha sido alterado al estar en el mismo genoma que B' , lo que se indica con el símbolo $B-I^*$. Si esto se debiera simplemente a la dominancia de B' sobre $B-I$, la autofecundación de plantas de la F_1 debería generar aproximadamente 1/4 de plantas homocigóticas coloreadas en la F_2 . Sin embargo, ninguna planta de la F_2 es coloreada. Los cruzamientos de las plantas de la F_2 y de las subsiguientes generaciones no restauran el fenotipo coloreado. Así, se dice que $B-I$ ha sido paramutado por haber estado en el mismo núcleo con el alelo B' .

RESUMEN

El modelo del operón explica cómo se controlan los genes procarióticos mediante un mecanismo que coordina la actividad de varios genes relacionados. En el control negativo, la iniciación de la transcripción está controlada por un represor cuya afinidad de unión al operador puede ser alterada por moléculas inductoras. Para que se active la transcripción es preciso que se inactive el represor, es decir, el elemento de control negativo. En el control positivo, el inicio de la transcripción requiere la activación

de estas plantas heterocigóticas produciría plantas homocigóticas $B-I$. Sin embargo, en la próxima y en las siguientes generaciones sólo aparecen alelos B' , lo que indica que $B-I$ ha sido paramutado. De alguna forma, el alelo $B-I$ ha variado permanentemente su actividad, al haber estado expuesto (en el mismo genotipo) al alelo paramutagénico B' durante una sola generación.

Impronta parental

Otro ejemplo de herencia epigenética, descubierto hace unos 15 años en mamíferos, es la *impronta parental*, en la cual, ciertos genes autosómicos muestran sorprendentes patrones de herencia. Por ejemplo, el gen *Igf2* de ratón se expresa sólo si se hereda del padre. Se dice de él que sufre impronta materna, como si la copia del gen que deriva de la madre fuera inactiva. Al contrario, el gen *H19* de ratón sólo se expresa si proviene de la madre, por lo que se dice de él que sufre impronta paterna. La consecuencia de la impronta parental es que los genes correspondientes se expresan como si fueran hemicigóticos, incluso aunque haya dos copias de estos genes autosómicos en cada célula. Además, cuando estos genes se examinan a nivel molecular, no se observan cambios en sus secuencias de DNA. El único cambio que se aprecia es la presencia de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) extra en ciertas bases del DNA de los genes sometidos a impronta. Algunas bases del DNA de la mayoría de los organismos superiores están metilados (*Drosophila* es una excepción). Estos grupos metilo se añaden y se eliminan enzimáticamente, mediante la acción de ciertas metilasas y demetilasas. Normalmente, se observa una relación entre el nivel de metilación y la tasa de transcripción de un gen: los genes activos están menos metilados que los inactivos. Se desconoce, sin embargo, si es la alteración en el grado de metilación la que provoca los cambios epigenéticos o si los altos niveles de metilación aparecen como consecuencia de tales cambios.

¿Qué tienen en común estos ejemplos de herencia epigenética? El nexo principal es que, de alguna forma, un fragmento de un cromosoma es marcado como distinto de los demás en base a cuáles han sido sus antepasados o en base a qué otros genes estuvieron en el mismo genoma. En muchos de estos ejemplos, se han asociado diferencias en el nivel de metilación con diferencias en el nivel de expresión génica. No obstante, los mecanismos básicos y las razones por las cuales evolucionaron estos sistemas siguen siendo un misterio.

de un factor. Algunas veces, hay dos sistemas de control superpuestos. Por ejemplo, el sistema represor-operador del operón *lac* está supeditado al sistema de control positivo AMPc-CAP.

Un problema fundamental en el control de la transcripción de los eucariotas es entender cómo se regulan decenas o cientos de miles de promotores para producir los niveles adecuados de mRNA. Se sabe ahora que los promotores están controlados por el número y el tipo de los elementos próximos al promotor

y de los intensificadores, y por la acción de proteínas reguladoras que reconocen dichos elementos. En algunos aspectos, el control transcripcional en los eucariotas es parecido al que se produce en los procariotas, en el sentido de que, en ambos casos, factores que actúan en *trans* reconocen sitios que actúan en

cis. No obstante, por encima de esta semejanza, hay diferencias derivadas de la naturaleza de las formas de vida unicelulares frente a las multicelulares, como pueden ser las relacionadas con la coordinación de las funciones génicas en tejidos diferentes.

MAPA DE CONCEPTOS

Trace un mapa de conceptos, estableciendo tantas relaciones como le sea posible entre los términos siguientes. Observe que la lista de términos no sigue un orden concreto.

ambiente / promotor / operador / gen / operón /
polimerasa de RNA / mRNA / intensificador / factores *trans* /
regulación

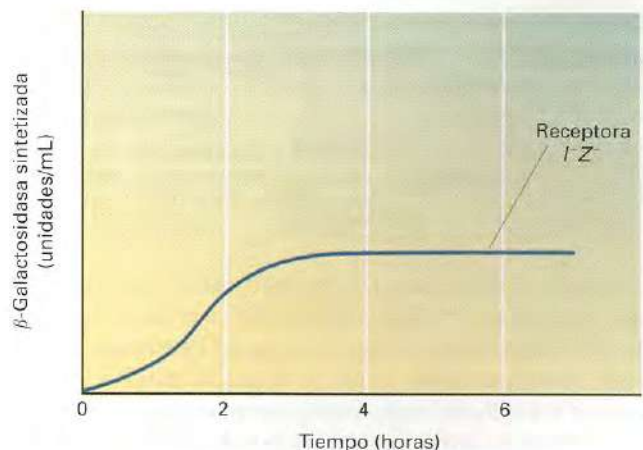
PROBLEMA DE INTEGRACIÓN DE CAPÍTULO

En el Capítulo 7 aprendimos cómo una estirpe Hfr transfiere a una estirpe receptora un segmento del cromosoma, que se rompe entonces y permanece durante un cierto tiempo en el citoplasma de la célula como un fragmento de DNA. Antes de que se dispusiera de plásmidos F', Jacob, Monod y su colaborador Arthur Pardee aprovecharon las propiedades de la transferencia Hfr para crear diploides parciales temporales de la región *lac*, ya que la estirpe Hfr con la que trabajaban donaba la región *lac* de forma temprana durante la transferencia resultante de la conjugación. Durante varias horas, la región *lac* del fragmento cromosómico se convertía en una segunda copia de la región *lac* en la estirpe receptora. Estos investigadores utilizaron una estirpe Hfr que transfería una región $I^+ Z^+$ a una estirpe receptora que era $I^- Z^-$, y estudiaron la expresión de β -galactosidasa a lo largo del tiempo. La gráfica muestra el resultado de su experimento. Observaron un aumento rápido de la síntesis de β -galactosidasa seguido de represión. ¿Puede ofrecer una explicación a estos resultados?

♦ Solución ♦

Cuando los genes $I^+ Z^+$ se introducen en la célula receptora, no hay represor en su citoplasma, de modo que la síntesis de

β -galactosidasa tiene lugar inicialmente al máximo nivel. Sin embargo, el gen I^+ recién introducido determina la síntesis de represor; tras un cierto tiempo, se obtiene suficiente cantidad de represor en el citoplasma de la célula receptora como para bloquear la síntesis de β -galactosidasa, lo cual explica por qué la curva se estabiliza a las dos horas del comienzo del experimento.



PROBLEMAS RESUELTOS

Esta serie de cuatro problemas resueltos, similares al problema 4 del final del capítulo, está diseñada para probar su comprensión del modelo del operón. Se le presentan varios diploides y se le pide que determine si los productos génicos *Z* e *Y* se forman en presencia y ausencia del inductor. Utilice una tabla similar a la del problema 4 como base para sus respuestas, pero los títulos de las columnas serán (en orden): gen *Z*-inductor ausente; gen *Z*-inductor presente; gen *Y*-inductor ausente; gen *Y*-inductor presente.

$$1. \frac{I^- P^- O^+ Z^+ Y^+}{I^+ P^+ O^- Z^- Y^-}$$

♦ Solución ♦

Una aproximación a estos problemas es considerar primero cada cromosoma por separado y dibujar entonces un esquema. La siguiente ilustración muestra un esquema del diploide:

