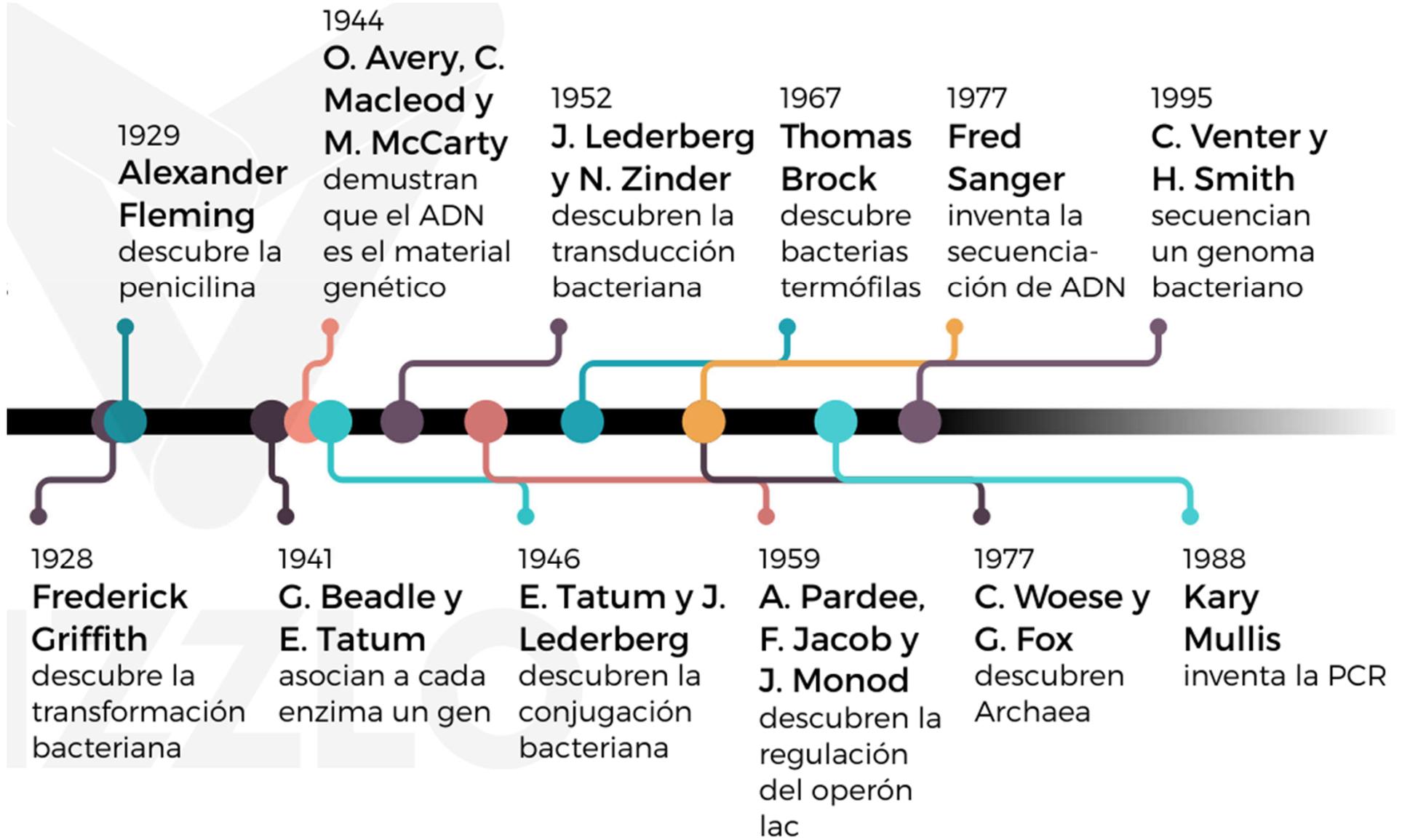




Genética de microorganismos

Transferencia de información



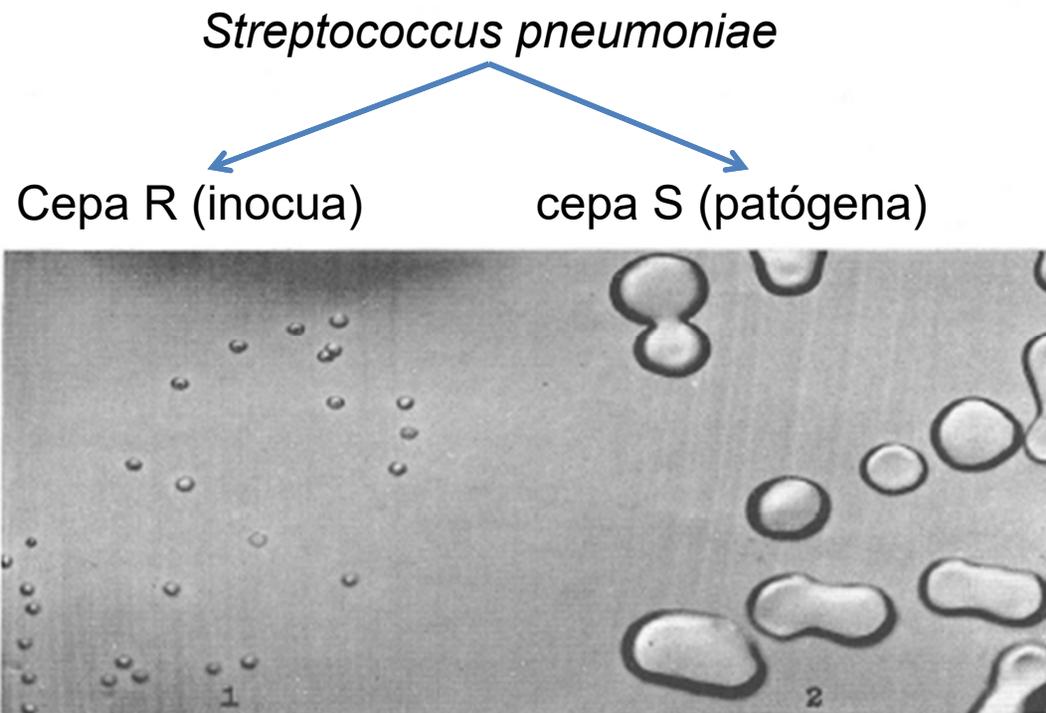
¿Cuál es la molécula que contiene la información heredable?

Candidatos:

- 1) Proteínas: “codigo de aminoácidos” (~21 aminoácidos)
- 2) Ácidos nucleicos: “código de bases” (4 bases)

THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE VOL. 79

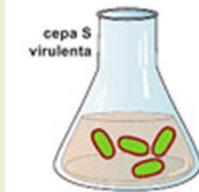
PLATE 1



(Avery *et al.*: Transformation of pneumococcal types)

EXPERIMENTO DE GRIFFITH

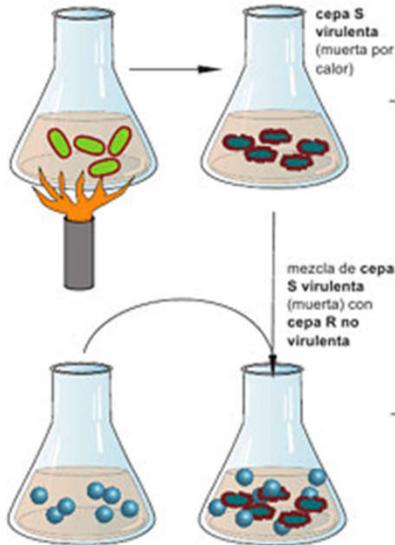
MÉTODO:



cepa S virulenta



cepa R no virulenta



cepa S virulenta (muerta por calor)

mezcla de cepa S virulenta (muerta) con cepa R no virulenta

RESULTADO:



el ratón muere



el ratón vive



el ratón vive



el ratón muere (se encuentran cepas S vivas en el corazón del ratón)

CONCLUSIÓN:

Existe una sustancia química capaz de transformar una célula en otra

La inoculación de un cultivo de la cepa S causa la muerte de los animales inyectados

La inoculación de un cultivo de la cepa R No afecta a los animales inyectados

La inoculación de un cultivo de la cepa S previamente inactivada por calor NO causa la muerte de los animales inyectados

La co-inyección de la cepa S inactivada y la cepa R no patógena, causa neumonía en los animales inyectados. Y de ellos se puede aislar otra vez la cepa S, con lo que la transformación permanece en el tiempo.

¿Qué es esa sustancia química?

Experimentos de Avery, McLeod y McCarthy

- 1- Purificaron distintas fracciones de neumococos tipo S (patógenos) inactivados por calor.
- 2- Individualizaron la fracción que transformaba a las cepas R (inócuas) en cepas S.
- 3- Analizaron químicamente la fracción que transformaba a la cepa R en S.

TABLE I

Elementary Chemical Analysis of Purified Preparations of the Transforming Substance

Preparation No.	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Phosphorus	N/P ratio
	<i>per cent</i>	<i>per cent</i>	<i>per cent</i>	<i>per cent</i>	
37	34.27	3.89	14.21	8.57	1.66
38B	—	—	15.93	9.09	1.75
42	35.50	3.76	15.36	9.04	1.69
44	—	—	13.40	8.45	1.58
Theory for sodium desoxyribonucleate	34.20	3.21	15.32	9.05	1.69

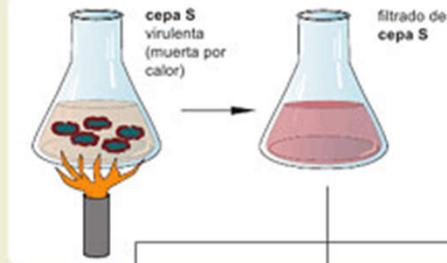
on the basis of the theoretical structure of sodium desoxyribonucleate (tetranucleotide). The analytical figures by themselves do not establish that the substance isolated is a pure chemical entity. However, on the basis of the nitrogen-phosphorus ratio, it would appear that little protein or other substances containing nitrogen or phosphorus are present as impurities since if they were this ratio would be considerably altered.

Sus experimentos concluyeron que el **factor transformante** tenía una composición similar a un **ácido nucleico**, pero no pudieron descartar una contaminación, aunque sea mínima, con otros componentes bacterianos.

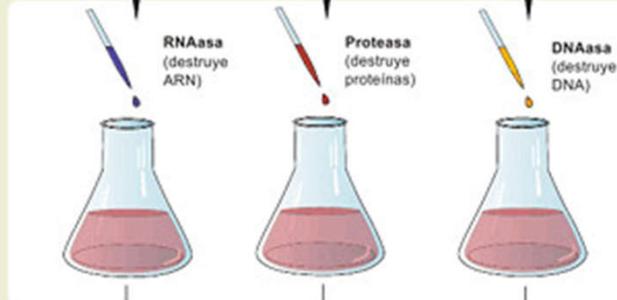
EXPERIMENTO DE AVERY

MÉTODO:

1. Homogeneizar y filtrar



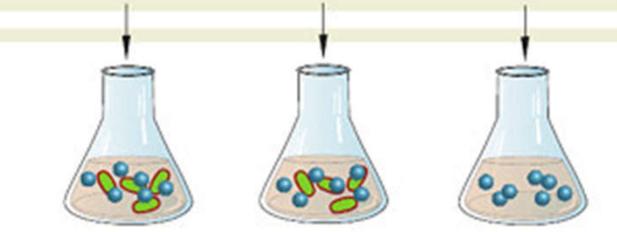
2. Tratamiento del filtrado con enzimas que destruyen el RNA, las proteínas y el DNA



3. El filtrado se añade a un cultivo de cepas R (no virulentas)



RESULTADO:



Los cultivos tratados con **RNAasa** o **proteasa** contienen **cepas S** transformadas...

...sin embargo en el cultivo tratado con **DNAasa** sólo aparecen **cepas R**

CONCLUSIÓN:

Dado que la DNAsa destruye al componente transformante, dicho componente es ADN.

Las bacterias estan formadas por proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, etc. por lo tanto Avery, McLeod y McCarthy añadieron a los neumococos S inactivados **preparados enzimaticos** que digieran distintos componentes de la bacteria **previamente** a la coinyeccion con la cepa R.

TABLE II
The Inactivation of Transforming Principle by Crude Enzyme Preparations

Crude enzyme preparations	Enzymatic activity			
	Phosphatase	Tributyrin esterase	Depolymerase for desoxyribonucleate	Inactivation of transforming principle
Dog intestinal mucosa.....	+	+	+	+
Rabbit bone phosphatase.....	+	+	-	-
Swine kidney ".....	+	-	-	-
Pneumococcus autolysates.....	-	+	+	+
Normal dog and rabbit serum.....	+	+	+	+

Sus experimentos concluyeron que sólo los extractos enzimaticos que eran capaces de degradar acidos nucleicos inactivaban el **factor transformante**.

Por lo tanto, el factor transformante debería ser un ácido nucleico.

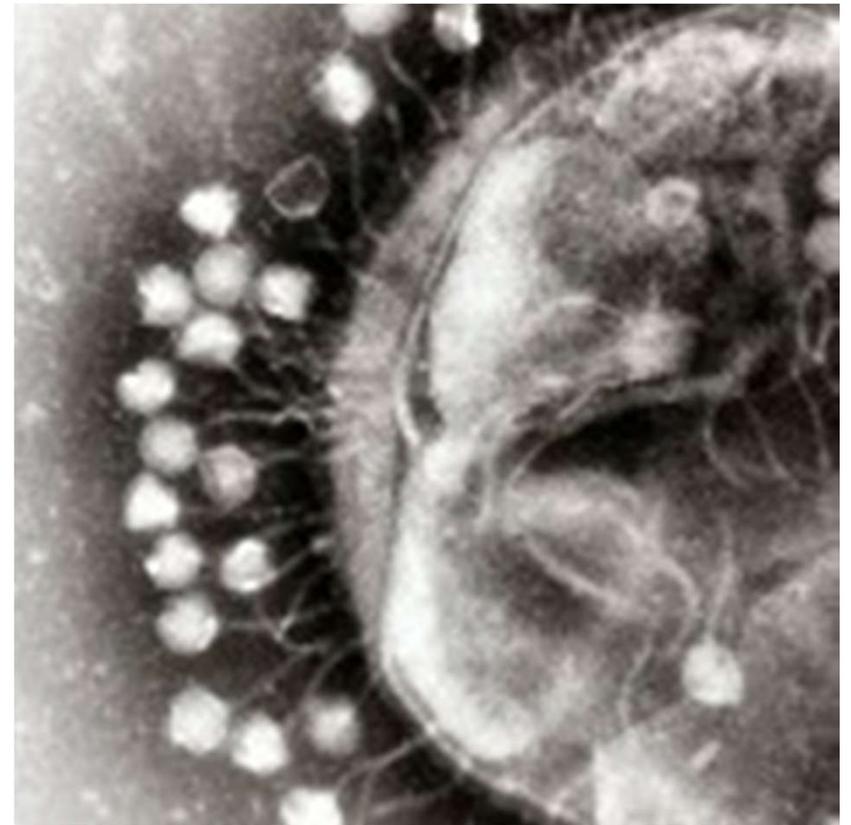
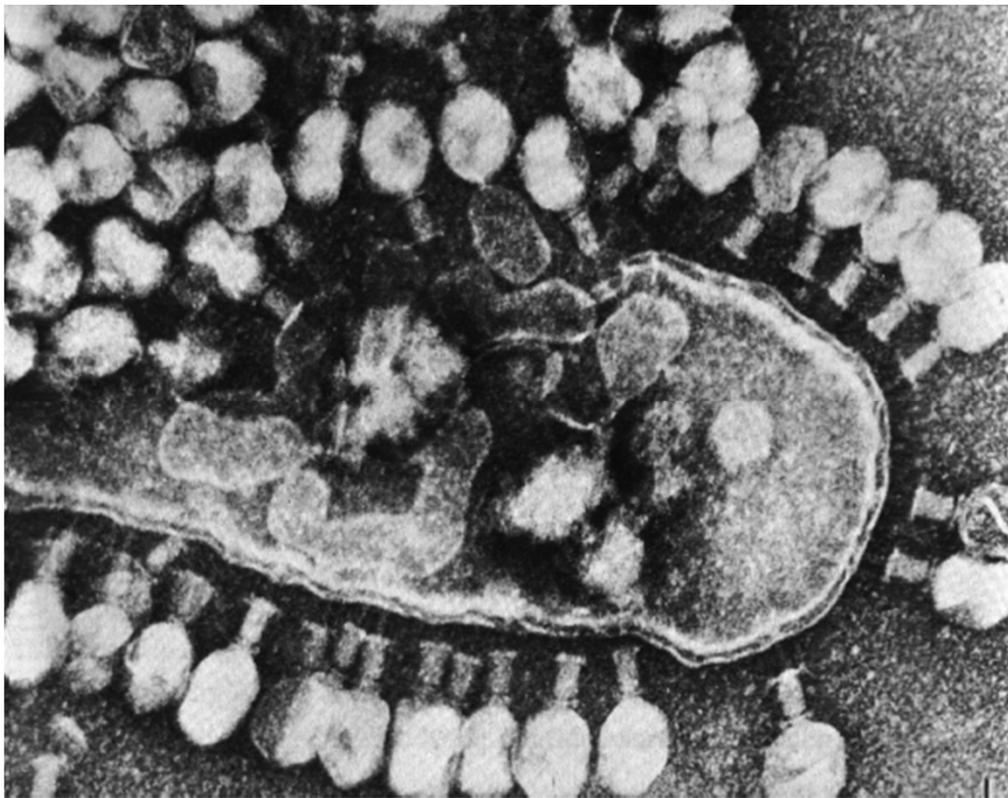
Más evidencia...

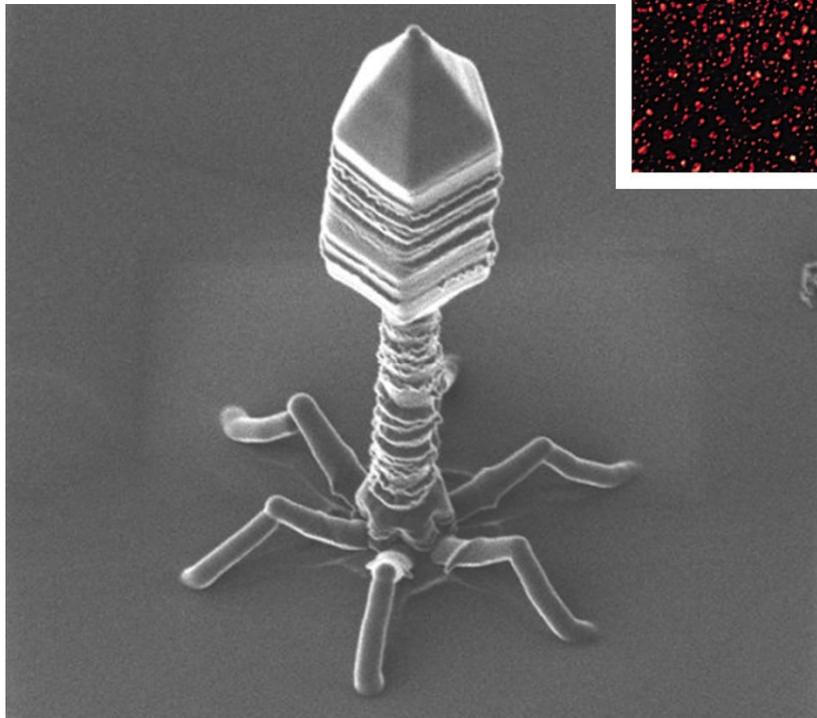
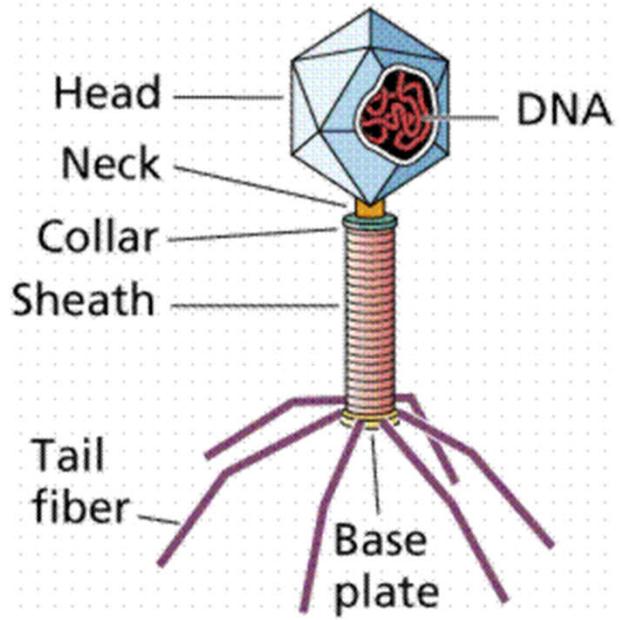
INDEPENDENT FUNCTIONS OF VIRAL PROTEIN AND NUCLEIC
ACID IN GROWTH OF BACTERIOPHAGE*

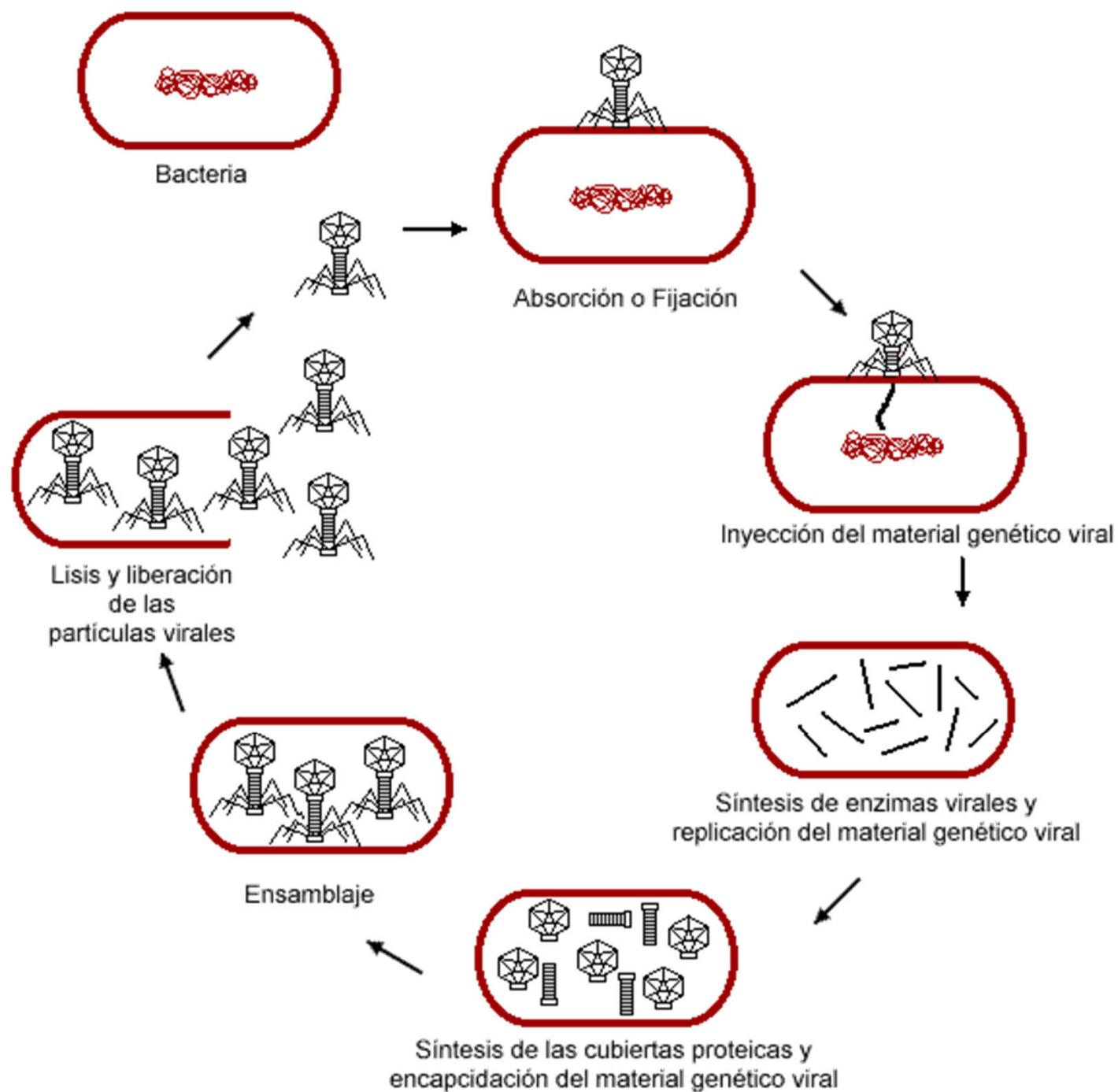
BY A. D. HERSHEY AND MARTHA CHASE

*(From the Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring
Harbor, Long Island)*

(Received for publication, April 9, 1952)

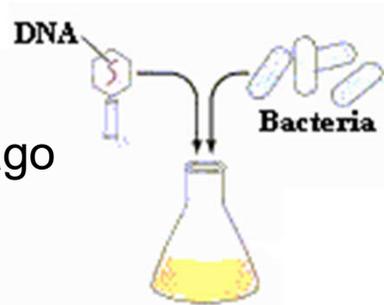




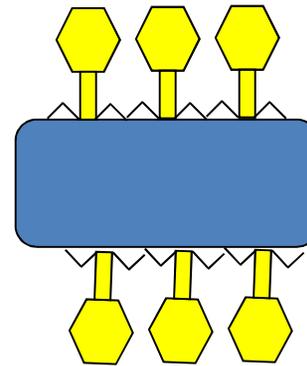


DISEÑO EXPERIMENTAL

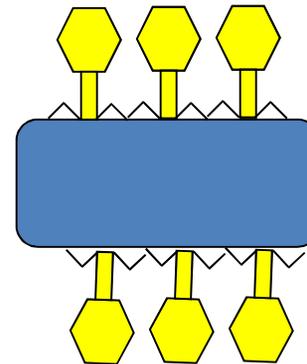
Infección de bacterias con un fago



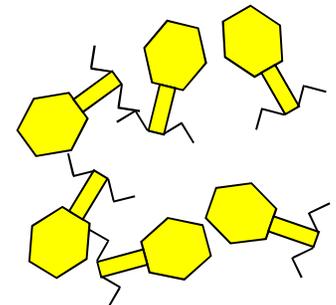
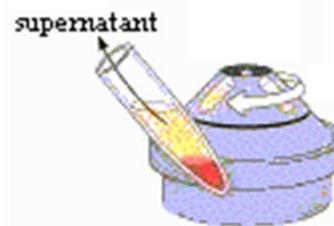
Incubar hasta el comienzo de la adsorción e inyección del material genético



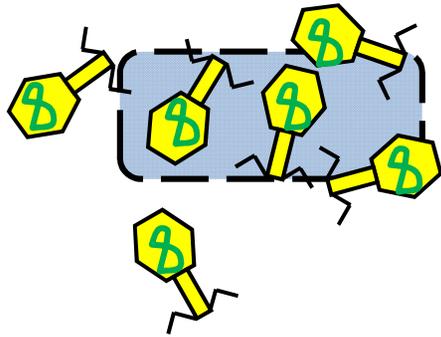
Despegar las bacterias del fago adherido por agitación en una licuadora



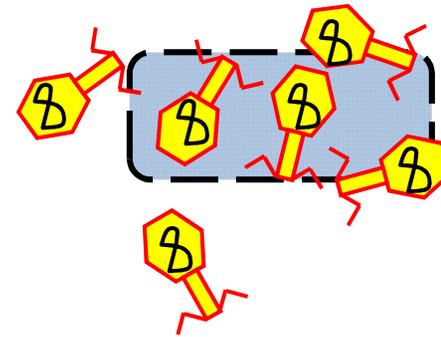
Separar las bacterias del fago suelto por centrifugación



PREMISA: el material inyectado contiene la información genética para generar nuevos Virus.



$P^{[32]}$ incorporado en ADN



$S^{[35]}$ incorporado en proteína

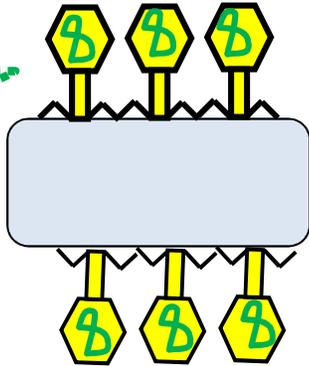
¿Con cuál isótopo radiactivo estará marcado el material inyectado (información heredable)?

PREDICCIÓN

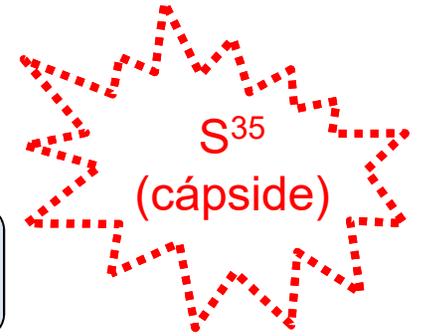
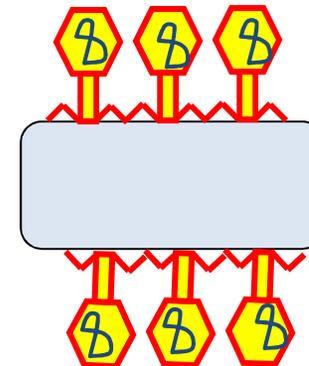
Si el material genético es de naturaleza proteica, entonces el material inyectado estará marcado con S^{35} .

Si el material genético es un ácido nucleico, entonces el material inyectado estará marcado con P^{32} .

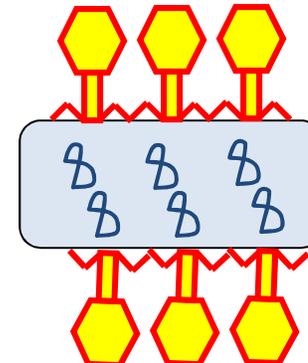
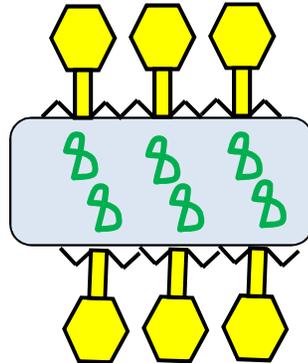
RESULTADOS:



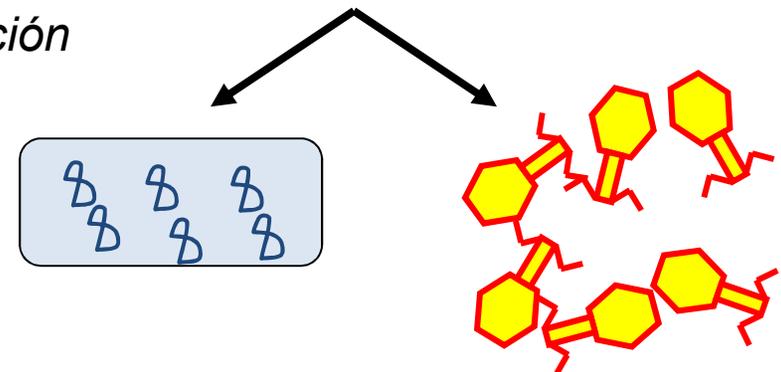
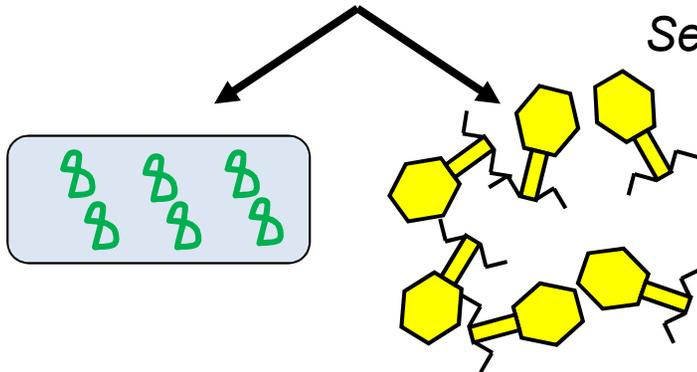
Adsorción



Inyección



Separación



Radiactividad P³² dentro de la bacteria

Radiactividad S³⁵ en el sobrenadante

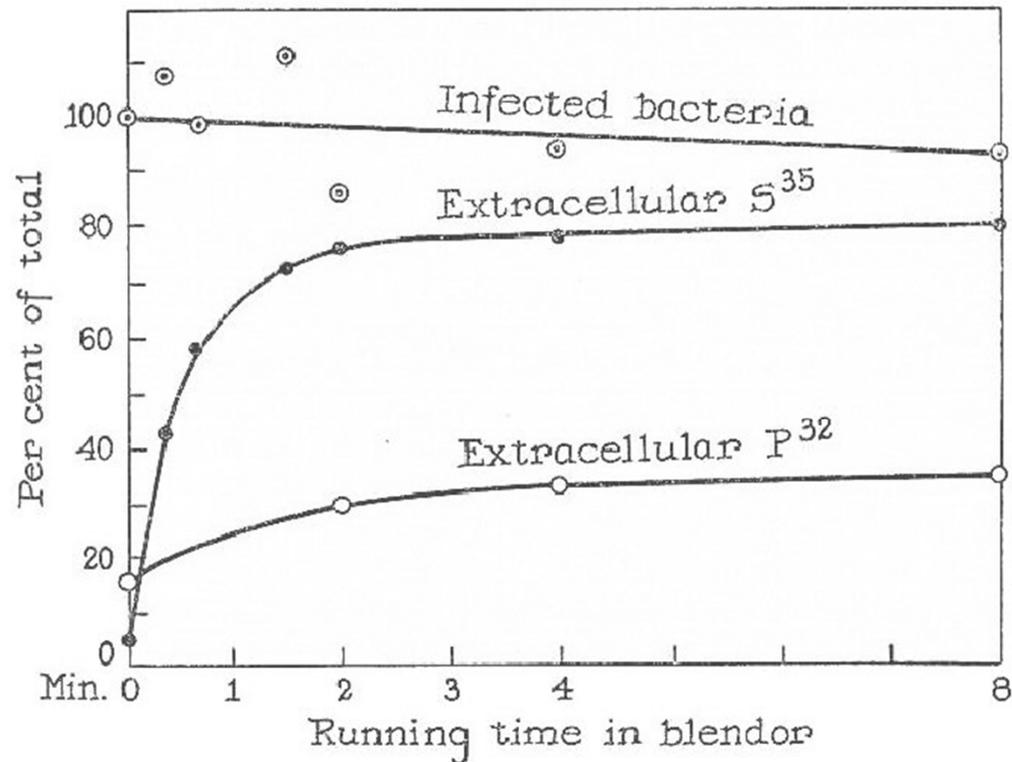


FIG. 1. Removal of S³⁵ and P³² from bacteria infected with radioactive phage, and survival of the infected bacteria, during agitation in a Waring blender.

CONCLUSIONES:

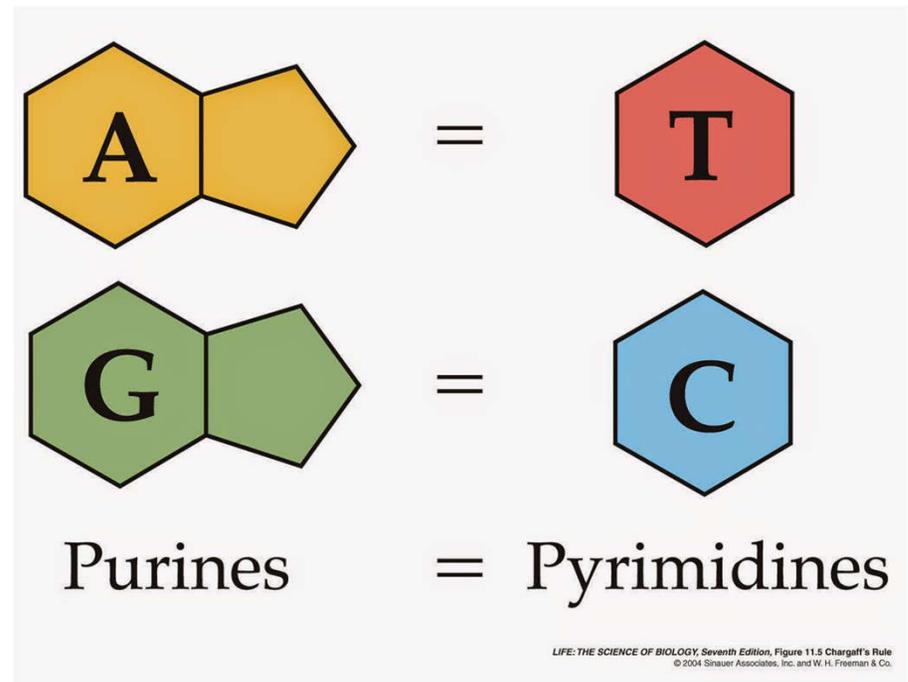
El fago para replicarse inyecta sólo el ADN, por lo tanto es el elemento suficiente para producir las proteínas del mismo fago.

El ADN del fago contiene toda la información genética para su replicación.

La estructura del ADN fue esclarecida a partir de una serie de datos previos:

- Erwin Chargaff determinó que
 - El número de adeninas = timinas
 - El número de citosinas = guaninas

Son las denominadas
Reglas de Chargaff

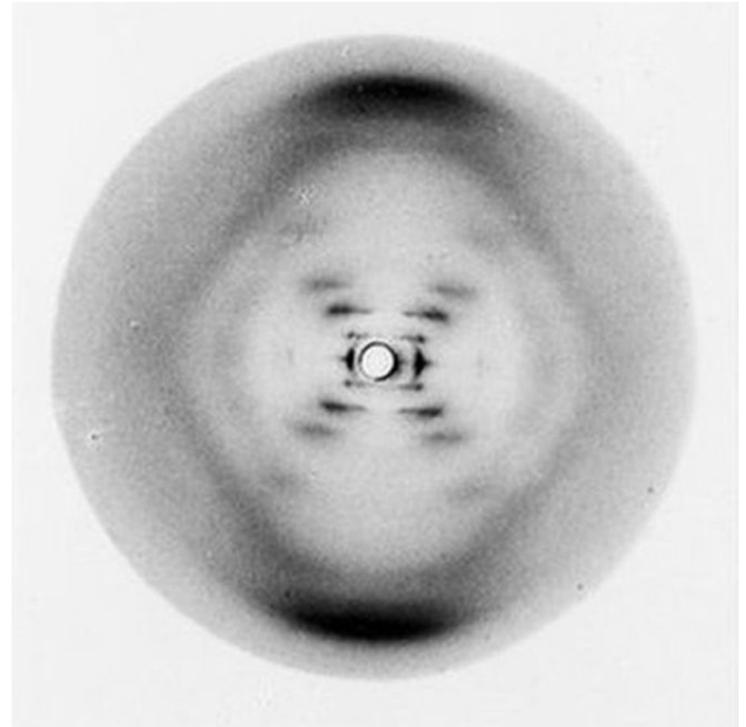


Rosalind Franklin y Maurice Wilkins:

Franklin hizo estudios de difracción de rayos X y descubrieron que:

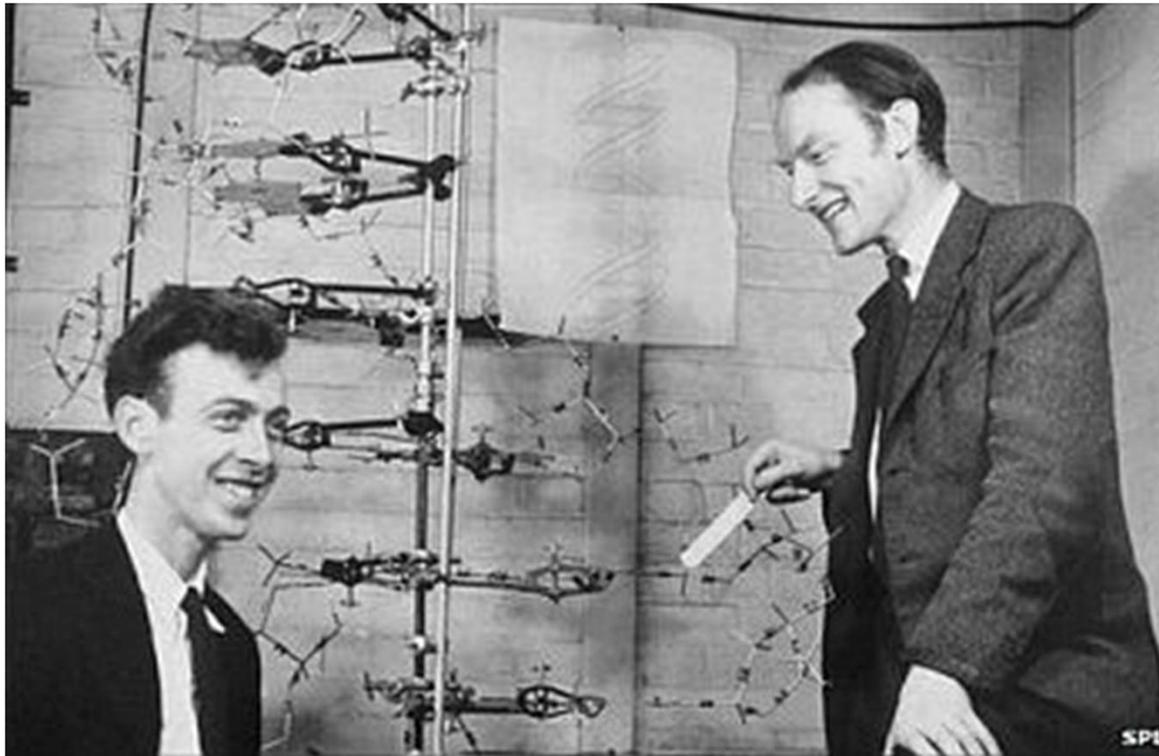
- el ADN es helicoidal
- la molécula tiene un diámetro de 2nm y que una vuelta de hélice es 3,4 nm

Difracción de rayos X del ADN



James Watson y Francis Crick, 1953

- Dedujeron la estructura del ADN usando las evidencias de Chargaff, Franklin, Wilkins y otros
- Propusieron la estructura de **doble hélice**



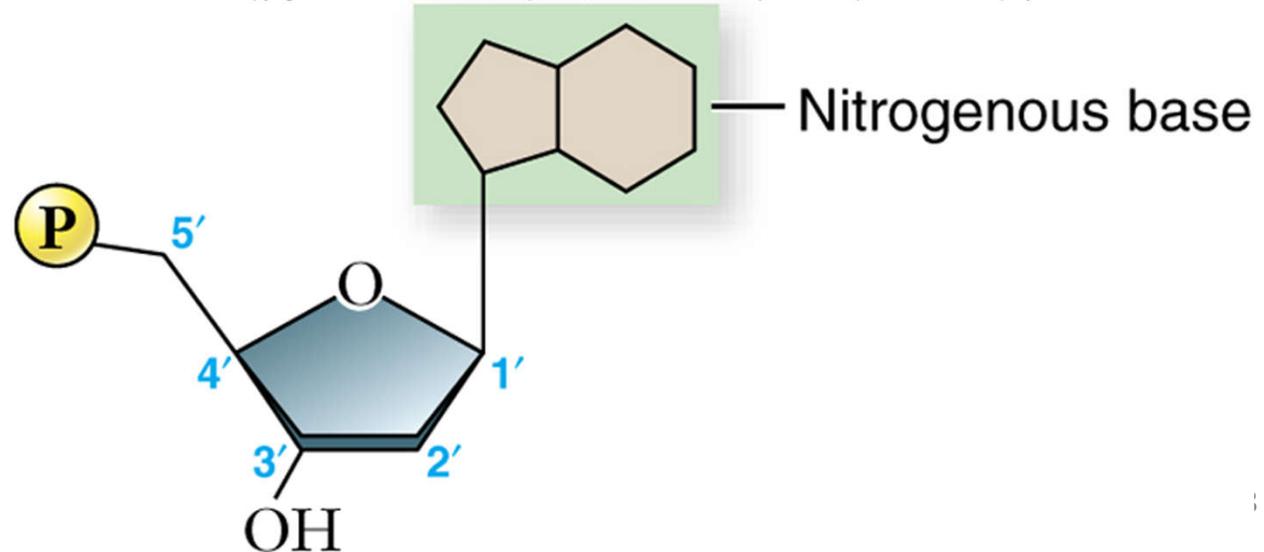
Composición del ADN

El ADN es un **ácido nucleico** formado por.

nucleótidos, cada uno compuesto por:

- un azúcar de 5 carbonos: **desoxirribosa**
- un grupo **fosfato** (PO_4^{-3})
- una **base nitrogenada**
 - adenina, timina, citosina, guanina

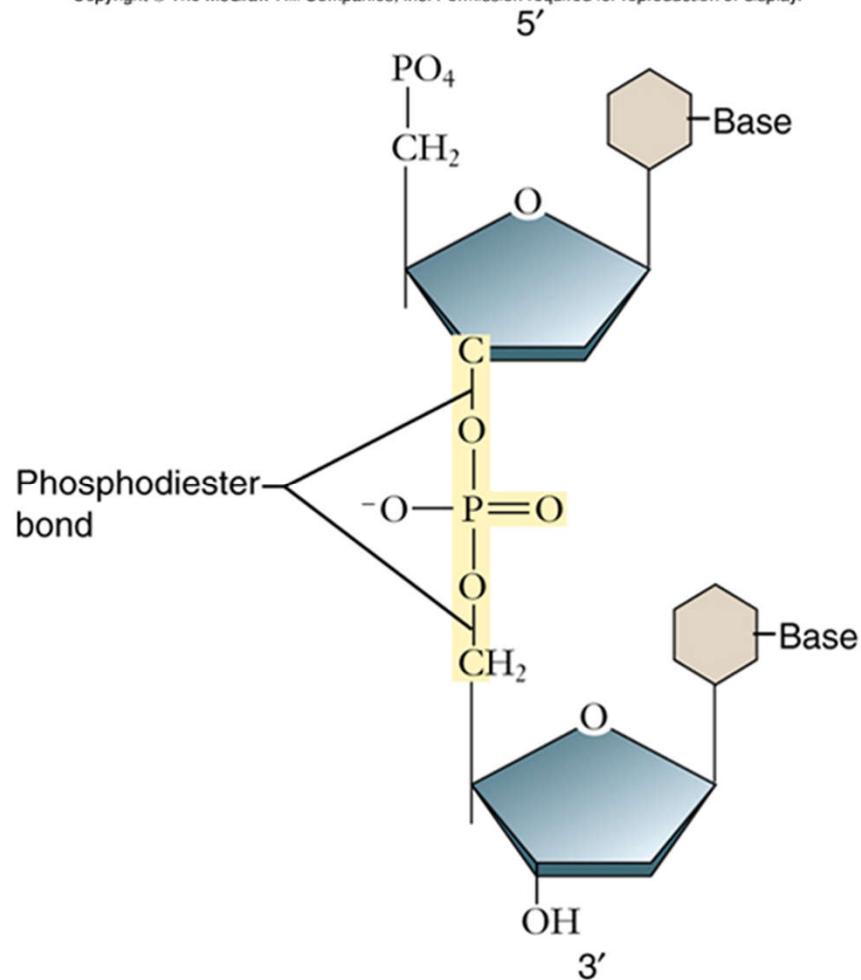
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Los nucleótidos están conectados por medio de un **enlace fosfodiéster** entre nucleótidos adyacentes

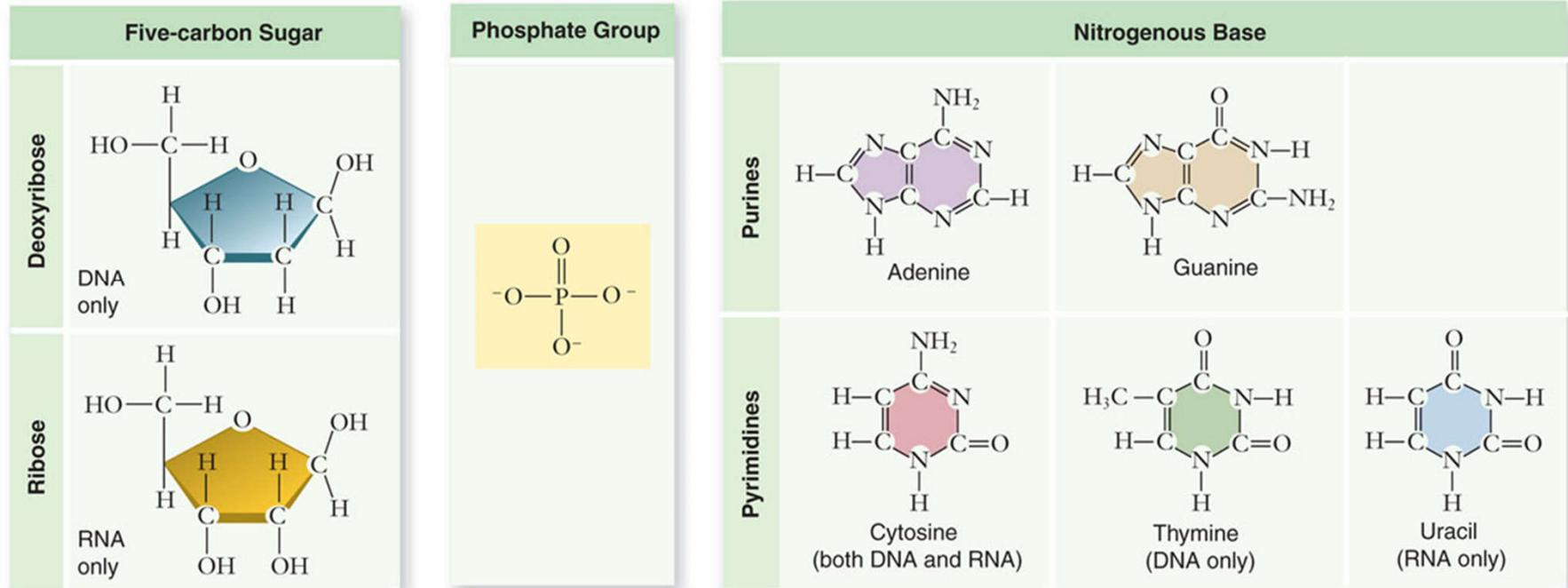
- Entre el fosfato de un nucleótido y el 3' –OH del próximo nucleótido

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



ADN y ARN

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Estructura del ADN

La doble hélice consiste en:

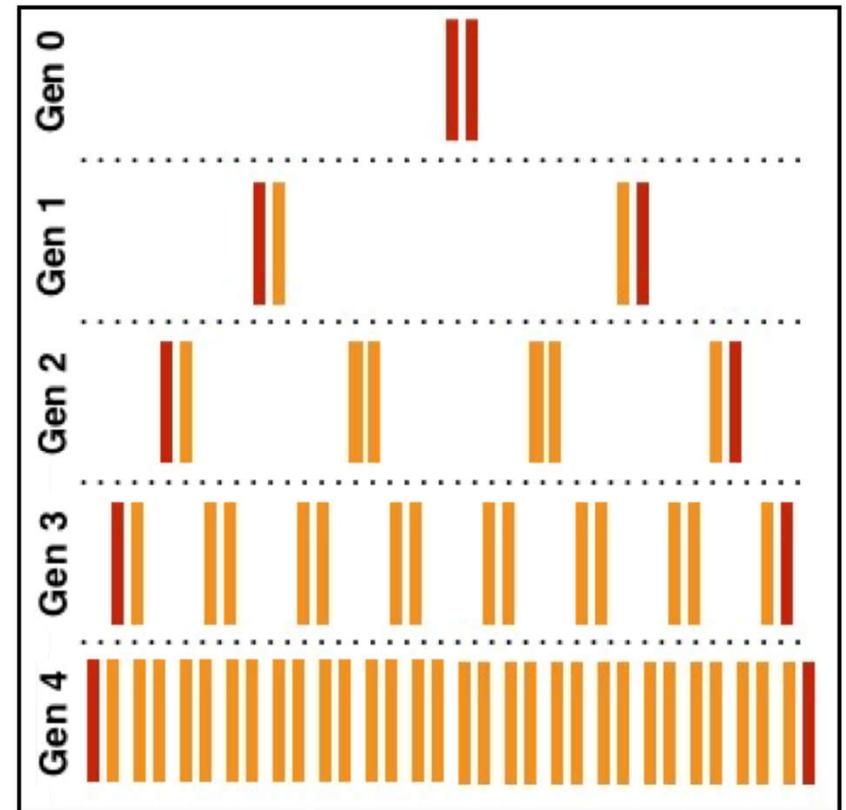
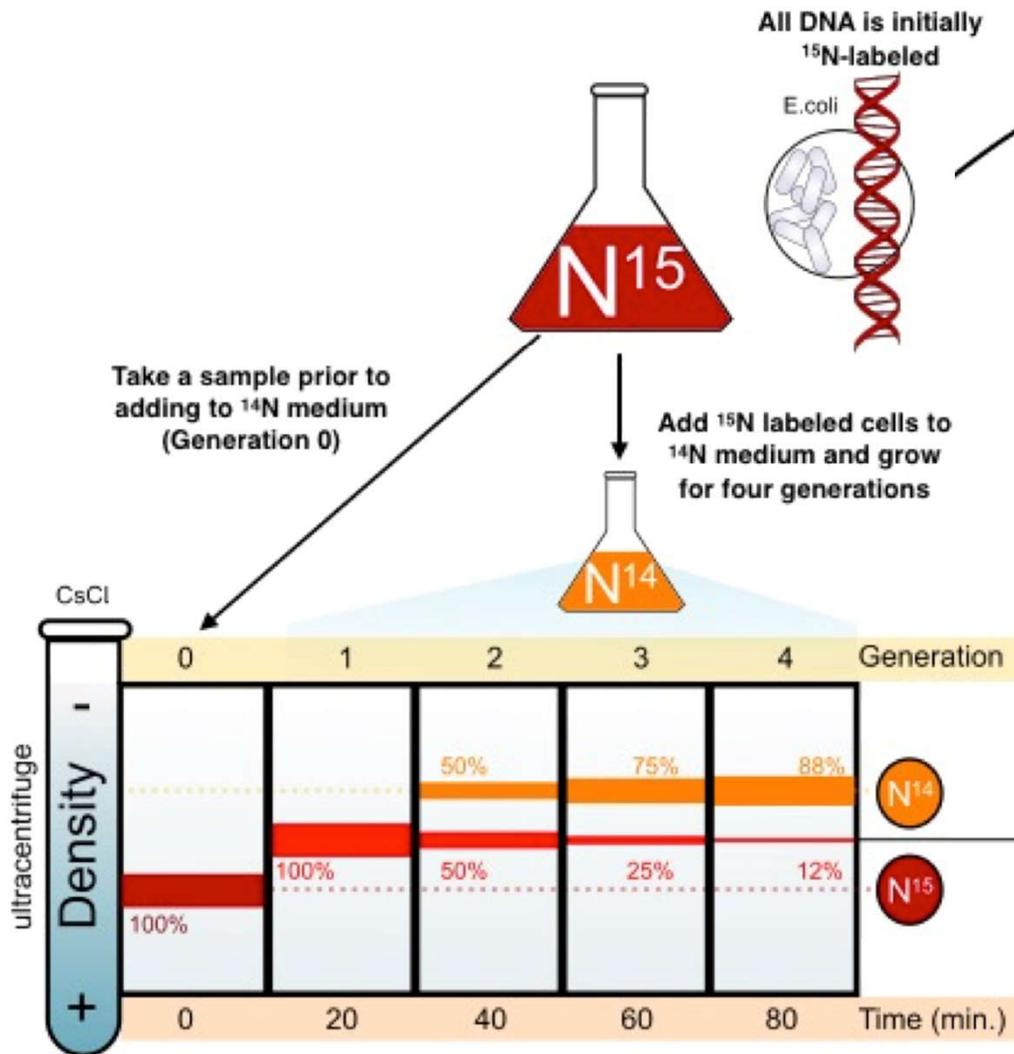
- Eje de 2 azúcar-fosfato
- Bases nitrogenadas hacia el interior de la molécula
- Unión de puentes de hidrógeno con las **bases complementarias** en la cadena opuesta.

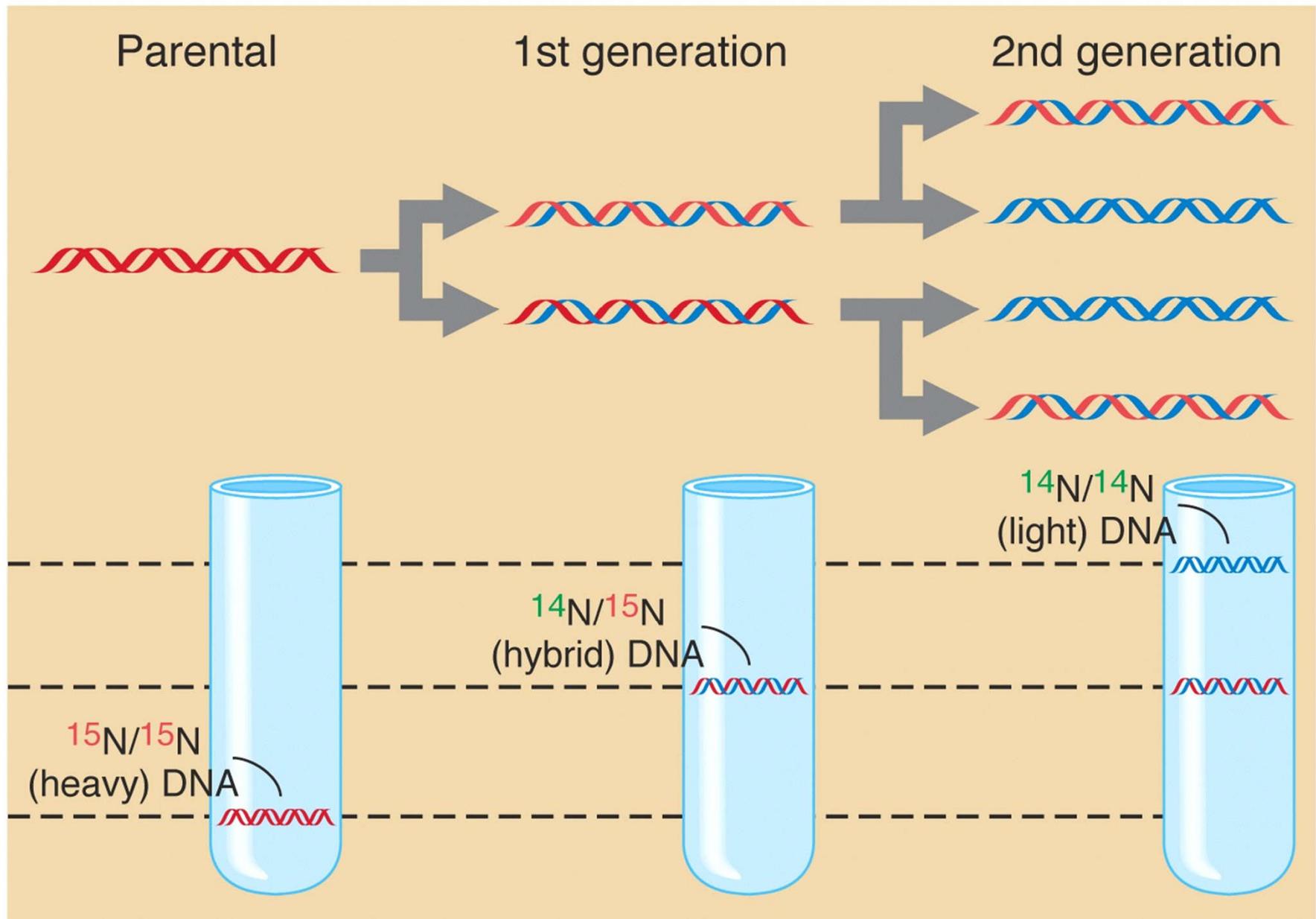
Las hebras son **antiparalelas**

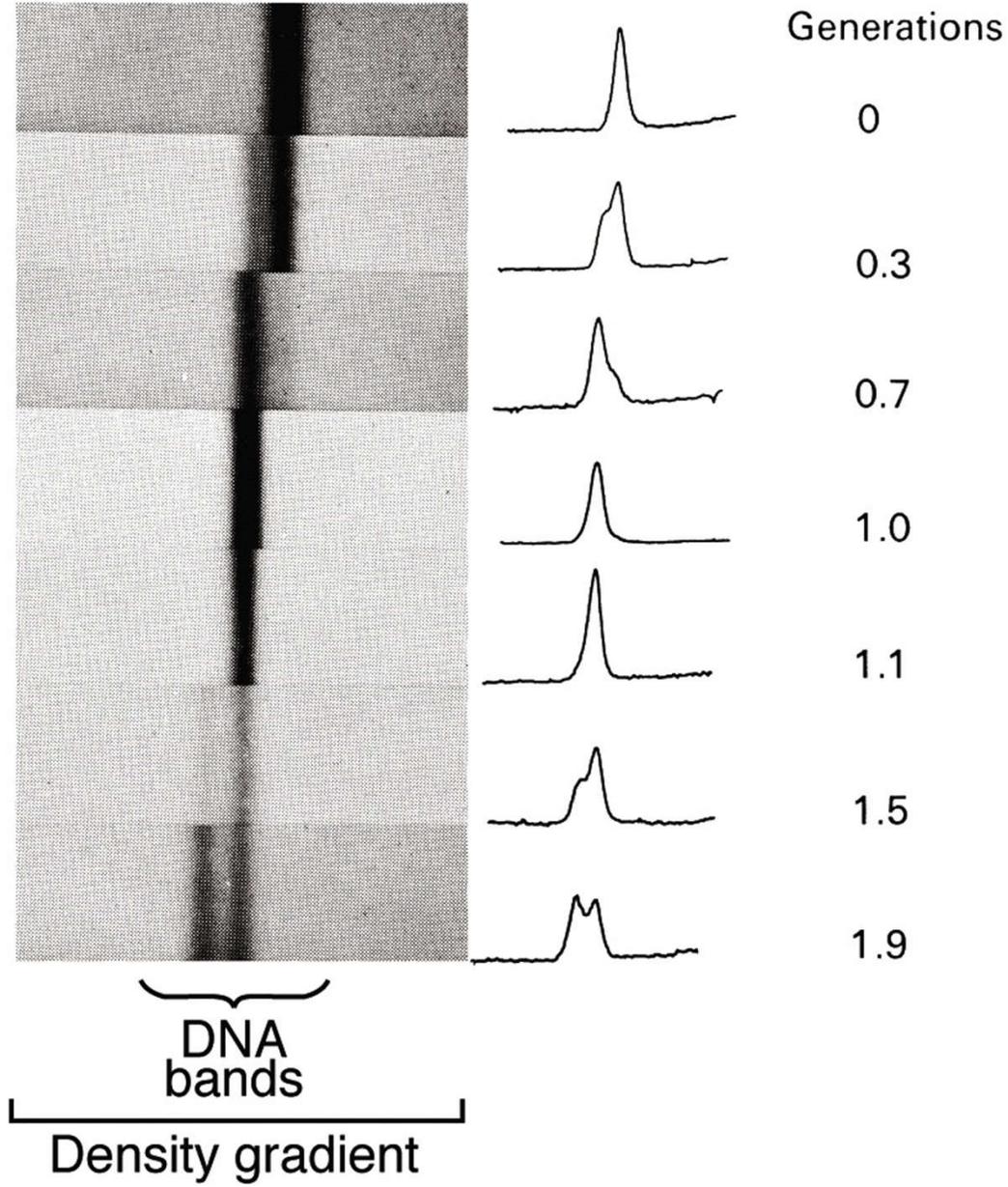
- Una orientada 5' ->3', y otra 3' ->5'

Las dos hebras se enrollan una en la otra.

Experimento de Meselson-Stahl:
La **replicación** es
SEMICONSERVATIVA





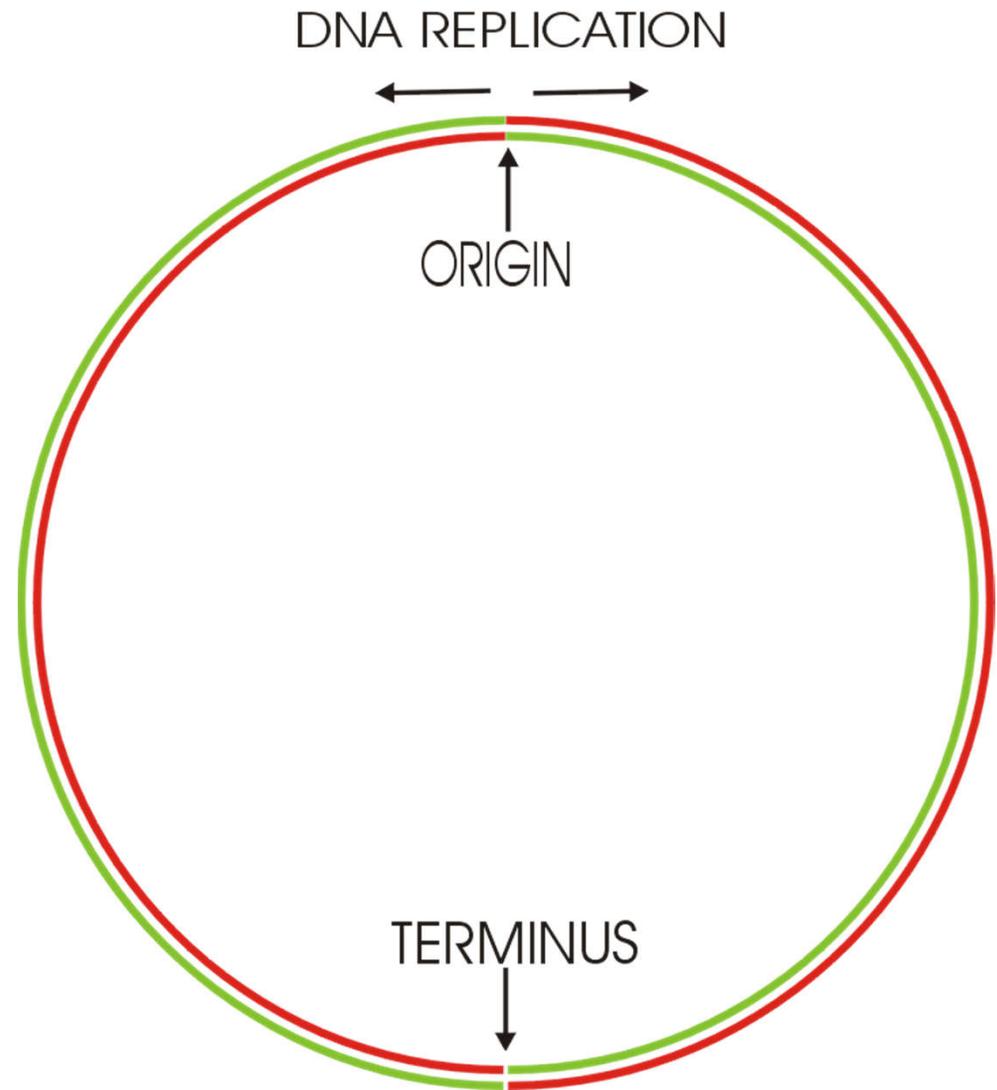
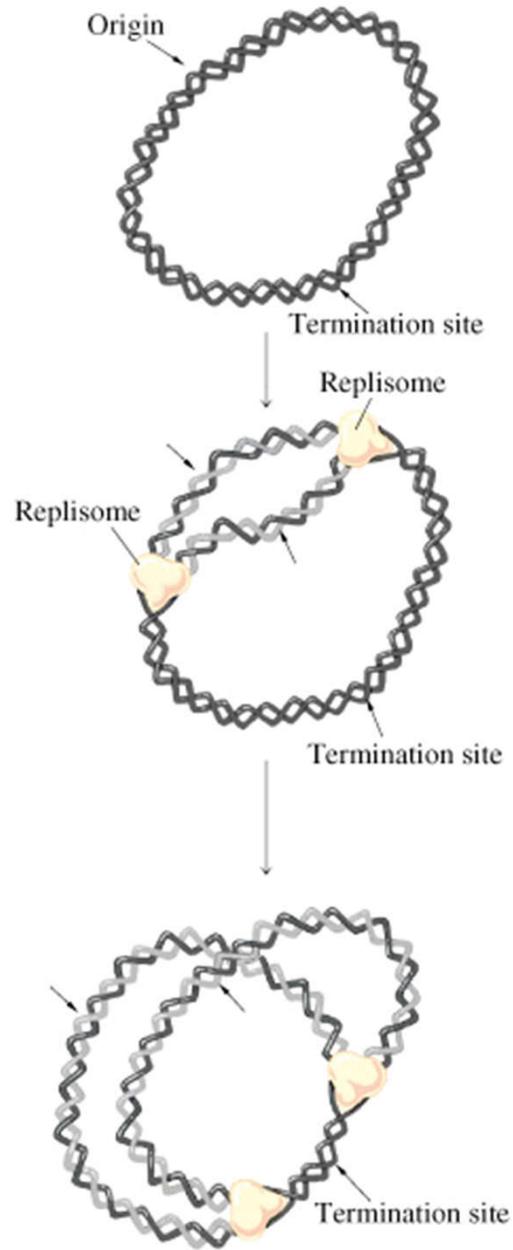


Replicación (ADN ↻)

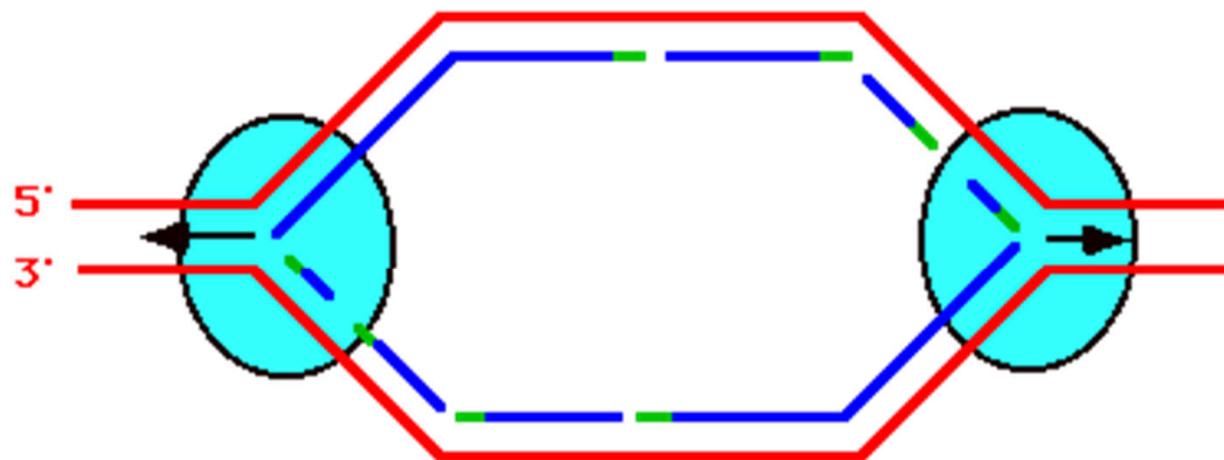


Leading Strand - Lagging Strand

Replicación bidireccional



Bidirectional Replication

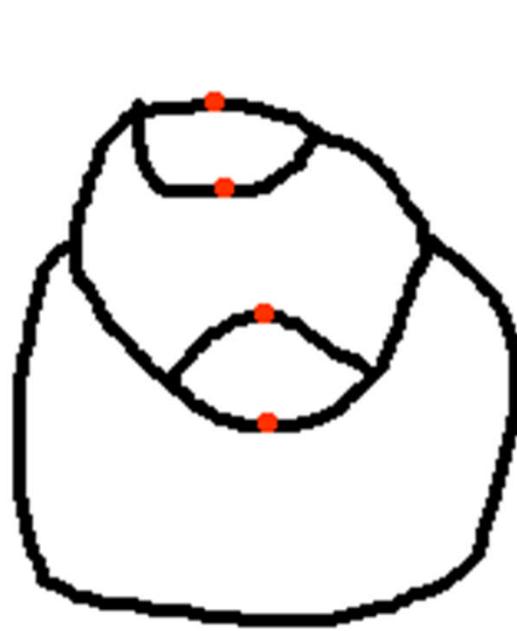


RNA

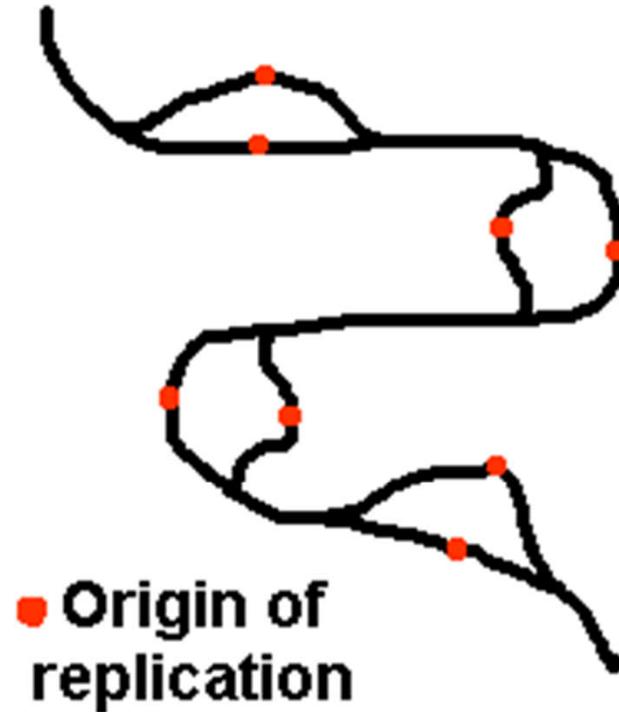
Template DNA

New DNA

Origen procariotas vs eucariotas

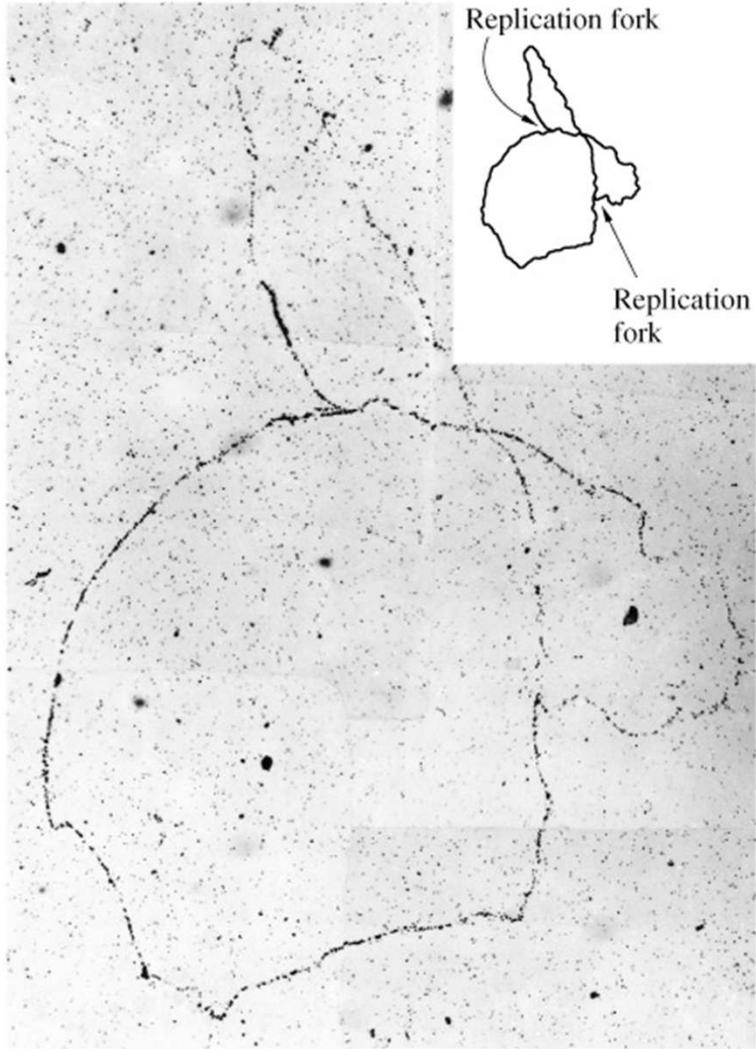


Bacteria:
One origin

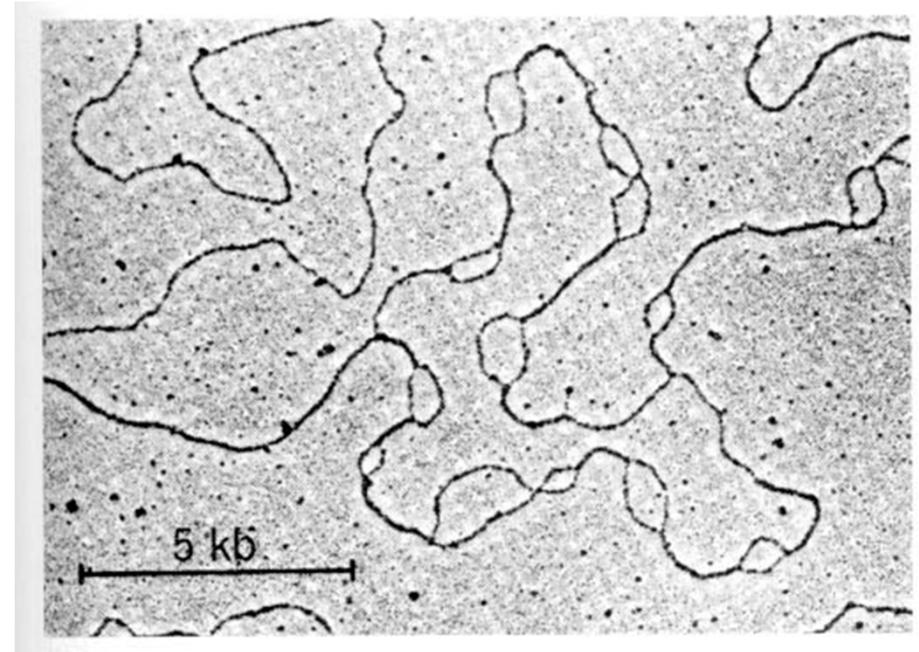


Eukaryotes:
Many origins

procariotas

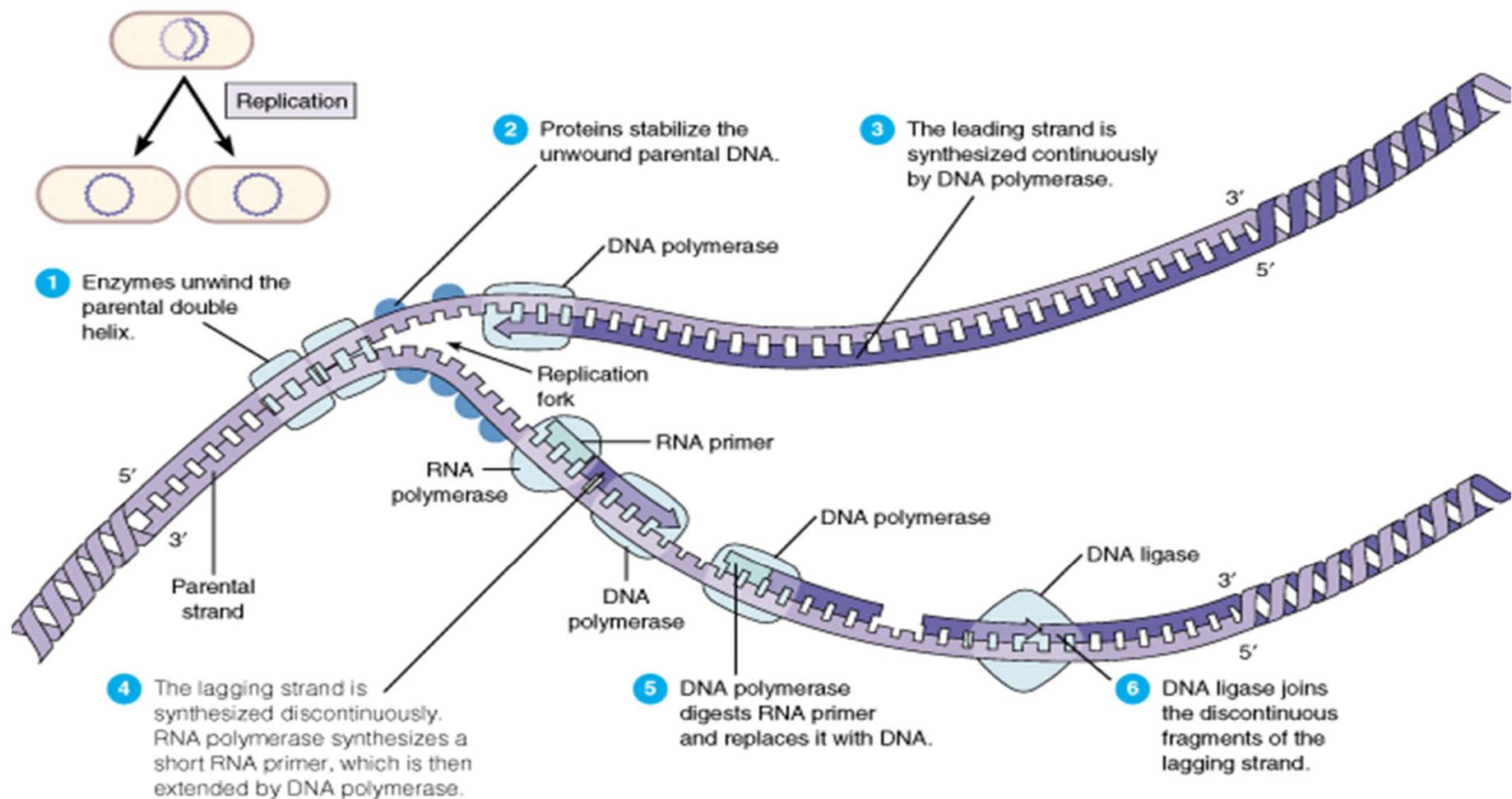


eucariotas



Duplicación del ADN

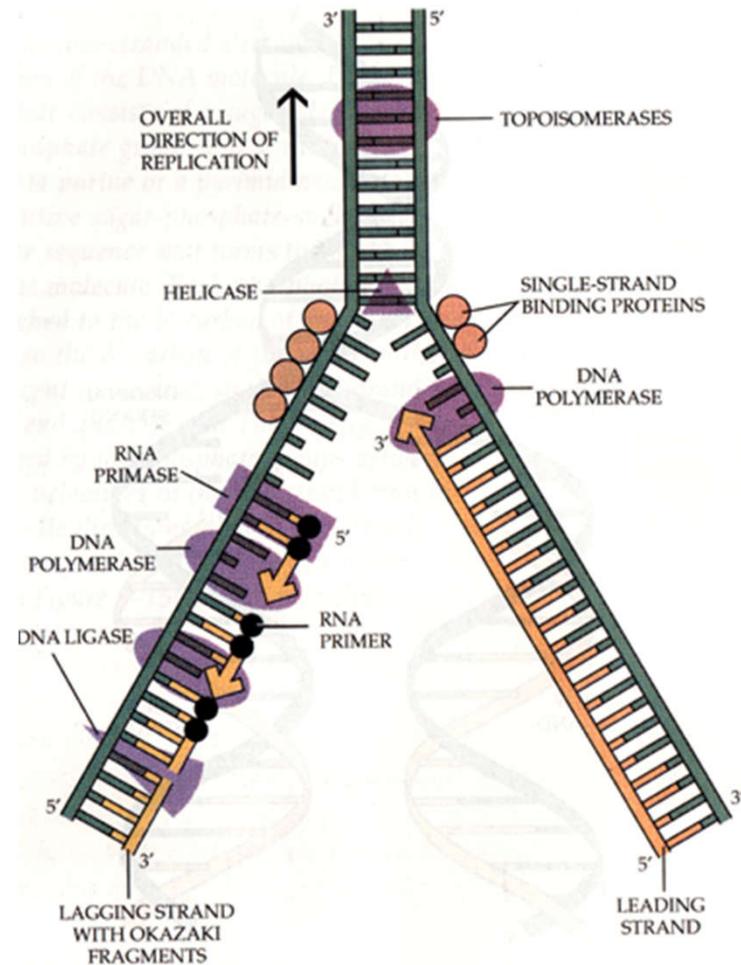
- La replicación del ADN es el proceso de copiado de la molécula de ADN. Es **semiconservativo**, en el cual cada hebra de la hélice original (*parental*) sirve de molde para generar la molécula *hija*.
- El proceso consiste en:
 - **Desenrollado (iniciación)**: las hebras parentales se separan por ruptura de los puentes hidrógeno. El proceso es enzimático (*helicasa*).
 - **Síntesis de la hebra hija (elongación)**: los nucleótidos individuales son incorporados por medio de la enzima *ADN polimerasa*. Se forma el enlace fosfodiéster por la ADN polimerasa.
 - **terminación** – Finalización del proceso
 - En procariontes, cuando se llega a la señal de término
 - En eucariontes, cuando se llega al telómero (fin del cromosoma)



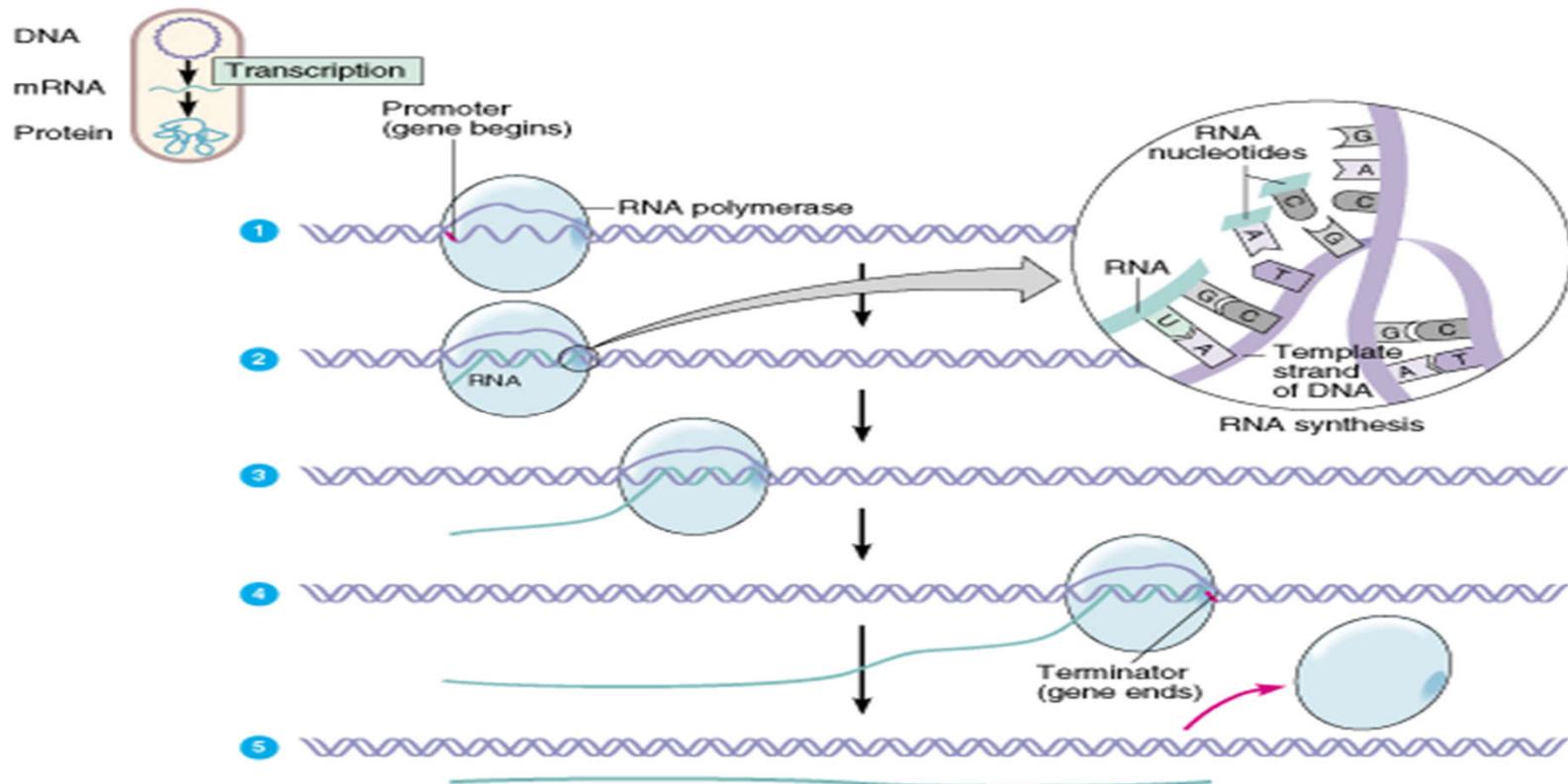
“Líderes” y “rezagados”

La hebra líder es
continua

La hebra rezagada es
discontinua

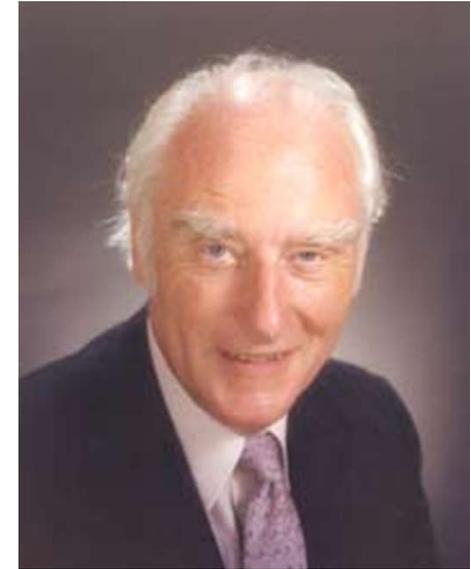


Transcripción (ADN → ARN)



En una conferencia en la *British Society of Experimental Biology*, en **1957**, titulada "On Protein Synthesis," Francis Crick propuso, aun sin pruebas experimentales, ideas que alteraron de manera definitiva la lógica de la biología.

Segun Crick, si las proteínas son la maquinaria de la célula, **la principal función de los genes debe ser codificar proteínas.**



Si las proteínas son cadenas de aminoácidos y los genes son cadenas de nucleótidos, debe haber una forma de codificar la información.

Para 22 aminoácidos se necesitan 22 “instrucciones”.
Un nucleótido codifica 4 posibles “instrucciones”.

Finalmente propuso que **la informacion fluye del ADN a proteína y no al revés.** Esto luego se llamó “dogma central de la biología molecular”

GENERAL NATURE OF THE GENETIC CODE FOR PROTEINS

By DR. F. H. C. CRICK, F.R.S., LESLIE BARNETT, DR. S. BRENNER
and DR. R. J. WATTS-TOBIN

Medical Research Council Unit for Molecular Biology,
Cavendish Laboratory, Cambridge

THERE is now a mass of indirect evidence which suggests that the amino-acid sequence along the polypeptide chain of a protein is determined by the sequence of the bases along some particular part of the nucleic acid of the genetic material. Since there

codes of Crick, Griffith and Orgel⁵. Alternatively, the correct choice may be made by starting at a fixed point and working along the sequence of bases three (or four, or whatever) at a time. It is this possibility which we now favour.

Evidencia del código genético

- 1940's: Beadle y Tatum correlacionaron mutaciones con enzimas no funcionales
- Primer evidencia directa: cambios funcionales en la molécula de hemoglobina
Cambio en un nucleótido ---> cambio de aminoácido
- 1961: Jacob and Monod proponen que el ARNm es un intermediario inestable entre ADN y proteína.
- **¿Cómo pueden 4 letras (A, T, G, C) codificar para 20 palabras (los aminoácidos)?**

Evidencia Teórica: Sidney Brenner (década 1960) argumentó que el código podría ser de tres letras.

Con un código de dos letras, cuántos aminoácidos puedo formar? $4^2 = 16$

Con un código de tres letras, cuántos aminoácidos puedo formar?

$4^3 = 64$, más de las necesarias para los 20 aminoácidos.

Evidencia Genética: Mutaciones: 1961: Francis Crick, Barnett, Brenner, and Watts-Tobin crearon mutantes por inserciones y deleciones en el cistrón B del locus *rII* del fago T4.

Evidencia Bioquímica : Nirenberg, Matthaei usaron mRNAs sintético y un sistema de traducción in vitro para descifrar el código.

Homopolímeros:

- poly(U) codifica para Phe-Phe-Phe-Phe-...
- poly(A) codifica para Lys-Lys-Lys-Lys-...
- poly(C) codifica para Pro-Pro-Pro-Pro-...

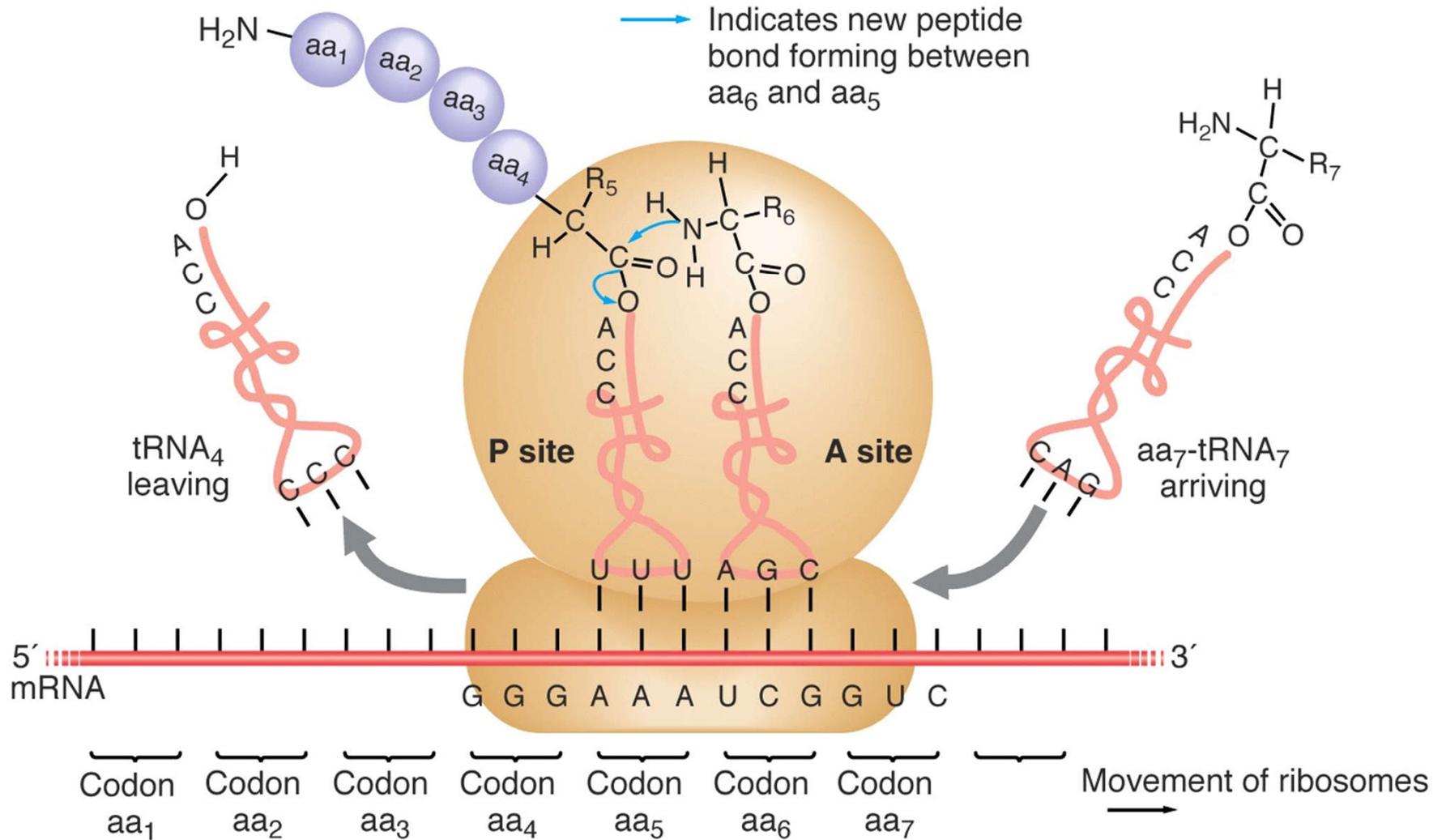
Khorana, a principio de 1960's estudió co-polímeros:

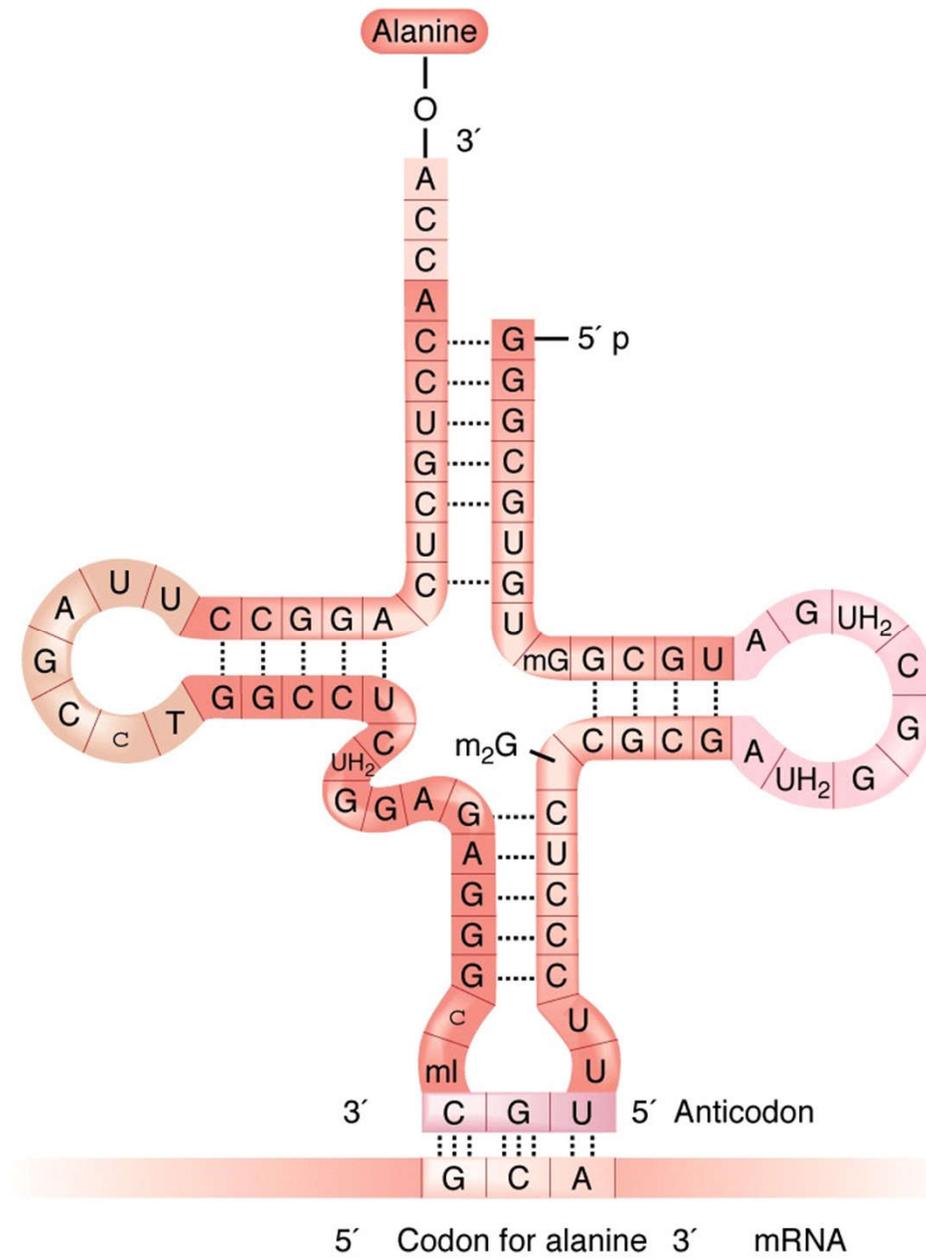
- UGUGUGUGUGUGUGUGU...
 - Cys-Val-Cys-Val-Cys-Val-...Por lo tanto GUG o UGU codifica para Cys o Val
- UUCUUCUUCUUCUUC...
 - Phe-Phe-Phe-Phe-... o
 - Ser-Ser-Ser-Ser-... o
 - Leu-Leu-Leu-Leu-...

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Third letter

Traducción (ARN → proteína)





Central Dogma of Molecular Biology

by

FRANCIS CRICK

MRC Laboratory of Molecular Biology,
Hills Road,
Cambridge CB2 2QH

The central dogma of molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that such information cannot be transferred from protein to either protein or nucleic acid.

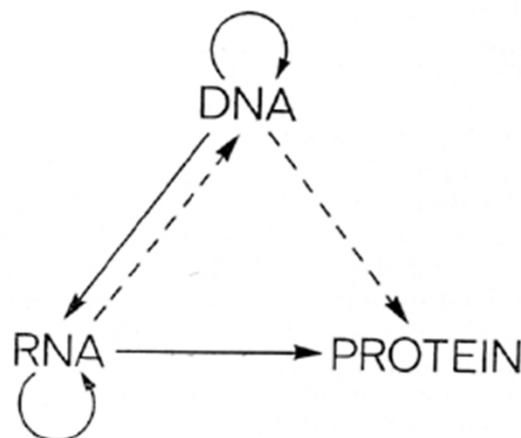


Fig. 2. The arrows show the situation as it seemed in 1958. Solid arrows represent probable transfers, dotted arrows possible transfers. The absent arrows (compare Fig. 1) represent the impossible transfers postulated by the central dogma. They are the three possible arrows starting from protein.

NATURE VOL. 227 AUGUST 8 1970

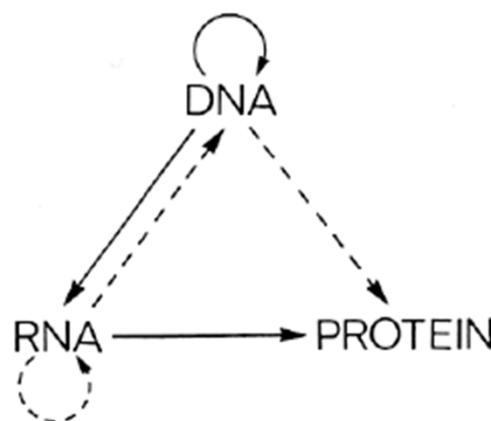


Fig. 3. A tentative classification for the present day. Solid arrows show general transfers; dotted arrows show special transfers. Again, the absent arrows are the undetected transfers specified by the central dogma.

General and Special Transfers

A general transfer is one which can occur in all cells. The obvious cases are

DNA→DNA
DNA→RNA
RNA→Protein

Minor exceptions, such as the mammalian reticulocyte, which probably lacks the first two of these, should not exclude.

A special transfer is one which does not occur in most cells, but may occur in special circumstances. Possible candidates are

RNA→RNA
RNA→DNA
DNA→Protein

At the present time the first two of these have only been shown in certain virus-infected cells. As far as I know there is no evidence for the third except in a special cell-free system containing neomycin⁶, though by a trick it could probably be made to happen, using neomycin, in an intact bacterial cell.

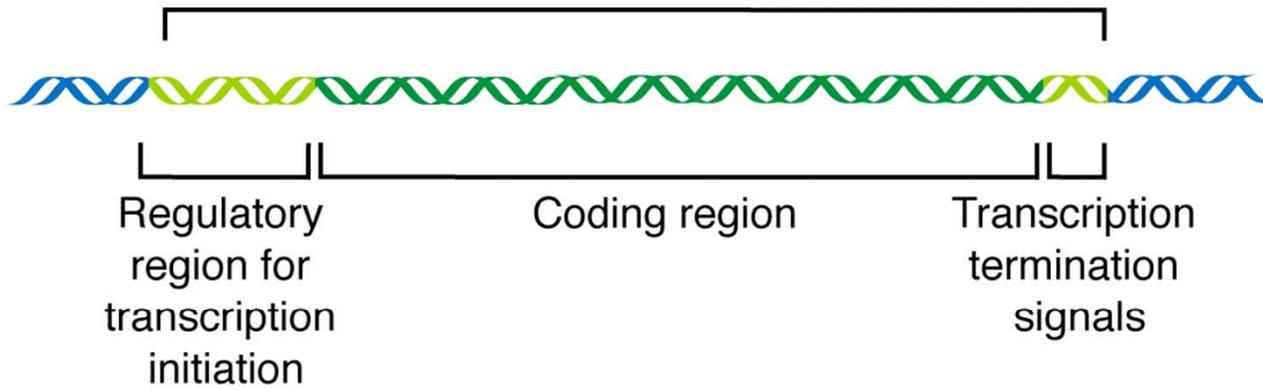
Unknown Transfers

These are the three transfers which the central dogma postulates never occur:

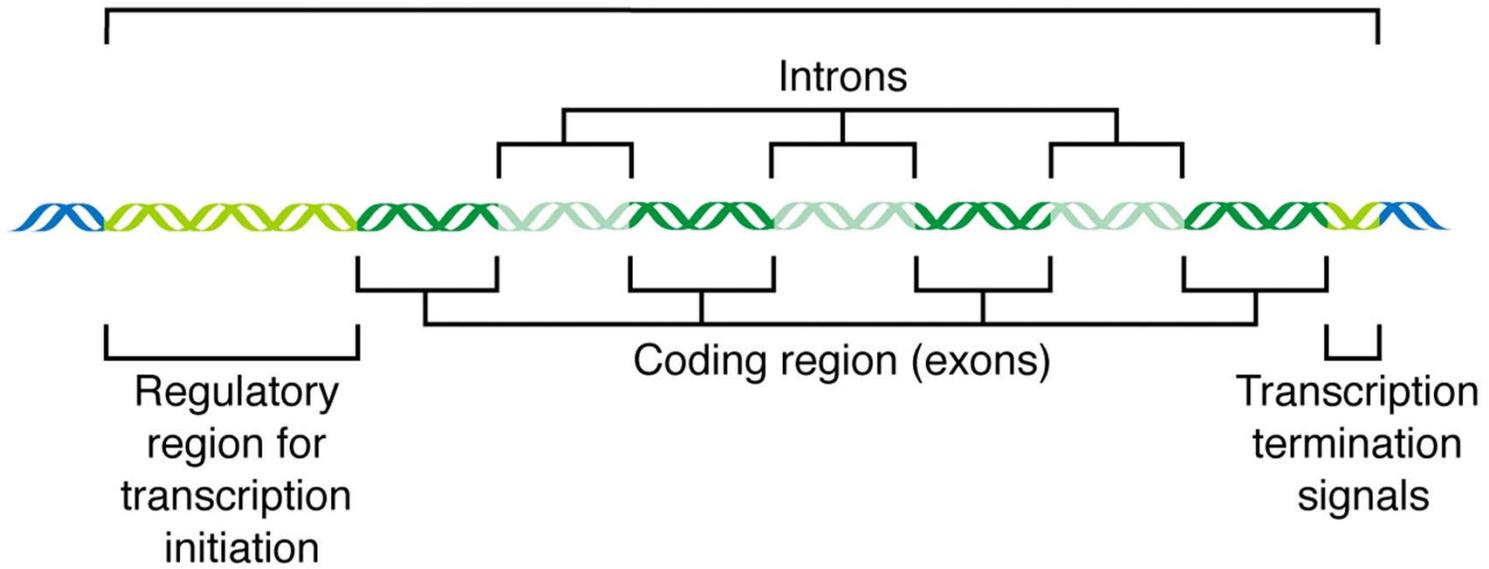
Protein→Protein
Protein→DNA
Protein→RNA

Stated in this way it is clear that the special transfers are those about which there is the most uncertainty. It might indeed have "profound implications for molecular biology"⁷ if any of these special transfers could be shown to be general, or—if not in all cells—at least to be widely distributed. So far, however, there is no evidence for the first two of these except in a cell infected with an RNA virus. In such a cell the central dogma demands that at least one of the first two special transfers should occur—this statement, incidentally, shows the power of the central dogma in making theoretical predictions. Nor, as I have indicated, is there any good theoretical reason why the transfer RNA→DNA should not sometimes be used. I have never suggested that it cannot occur, nor, as far as I know, have any of my colleagues.

Prokaryote gene



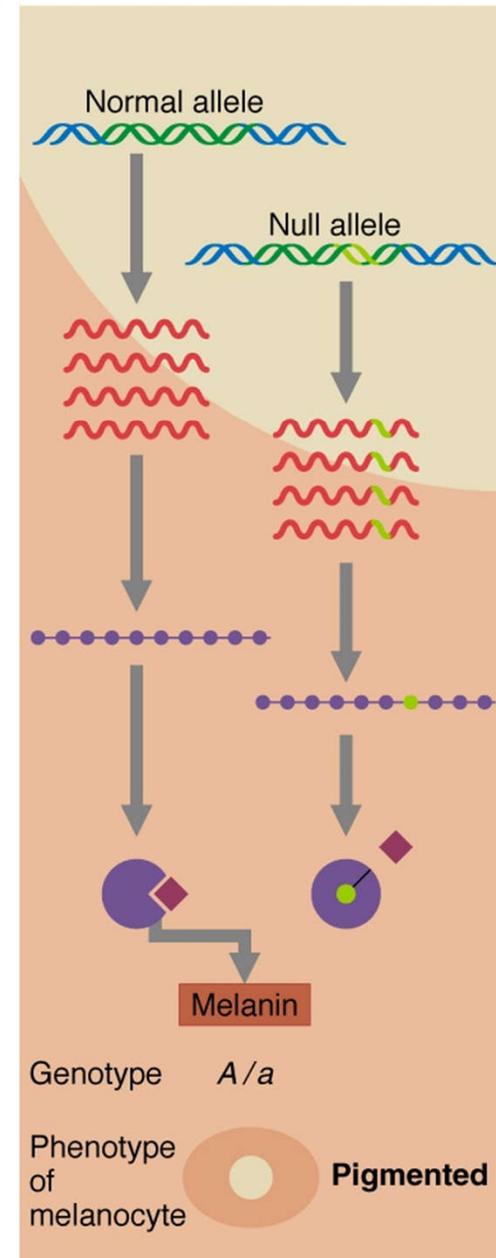
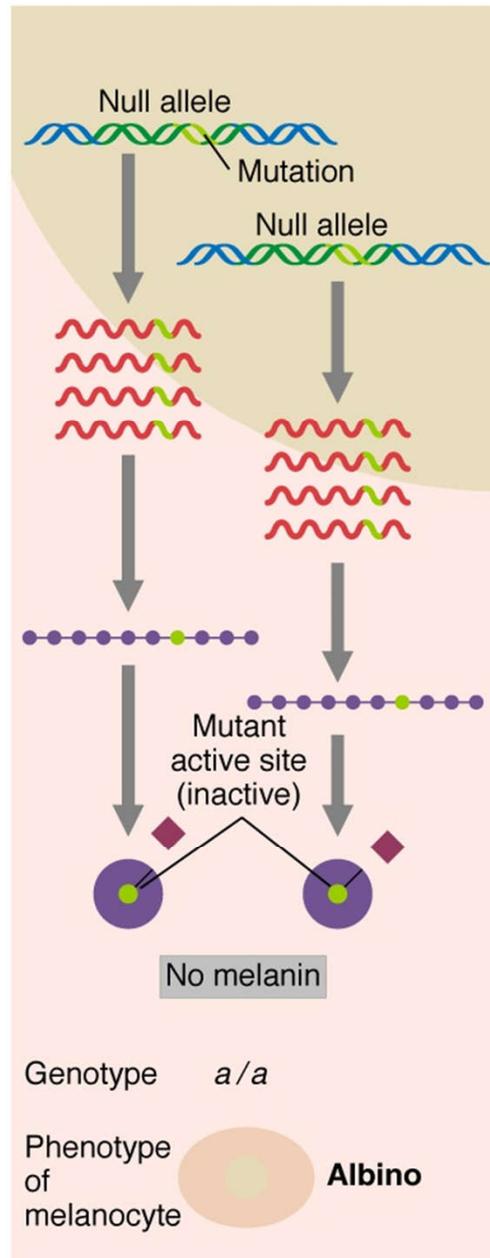
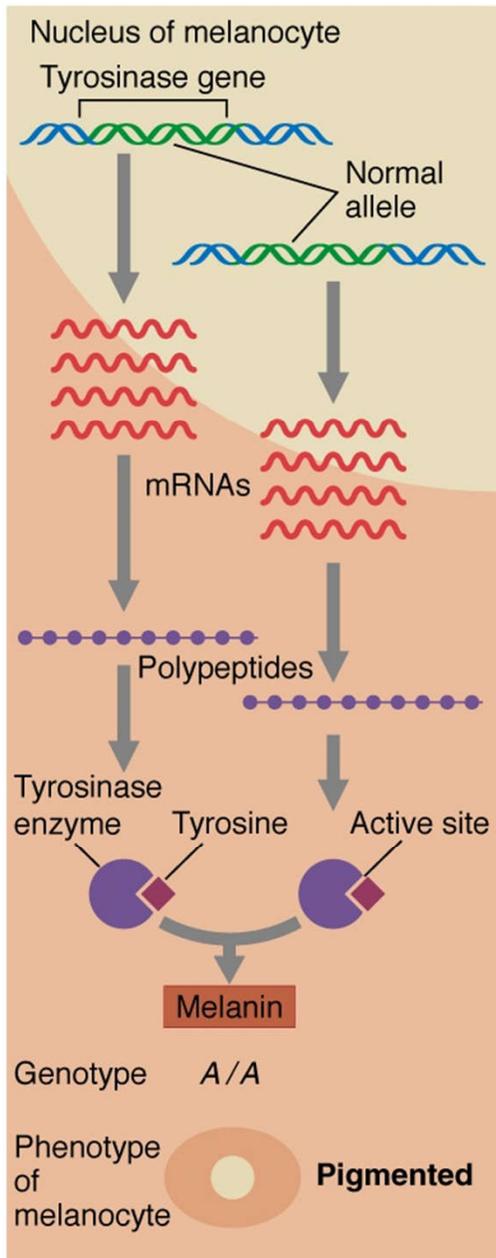
Eukaryote gene





- ¿Cómo pasa la **información** de una generación a la siguiente?
- ¿Cómo fluye esa **información** en un individuo?
- ¿Cómo se regula el flujo de **información**?
- ¿Cómo modifica el ambiente ese flujo de **información**?





Allele *R*



Allele *r*

Mutación

- Cambio hereditario en el ADN
- Las mutaciones son cambios en la secuencia de nucleotidos debidos a multiples causas
 - integracion de transposones
 - mutágenos
 - **Errores de replicacion del ADN**

Genes y mutaciones: Origen y reparación

$R \rightarrow r$

corresponde a

GAATTC → **G**TATTC

RESUMEN

- Una mutación cambia una forma alélica por otra
- Una mutación es un cambio HEREDABLE.
- Las mutaciones son la fuente de variación genética.
- Los estudios genéticos requieren amenudo generar mutaciones.
- Las mutaciones son espontáneas o inducidas.
- Afectan la secuencia de nucleótidos de un gen.
- A veces, las mutaciones son reparadas.
- Las mutaciones pueden ser somáticas o germinales.

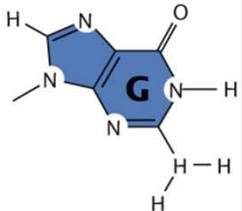
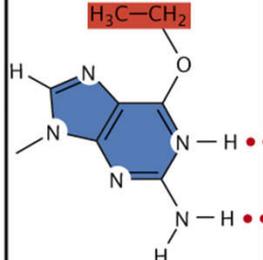
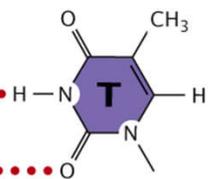
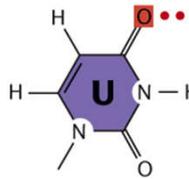
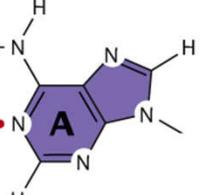
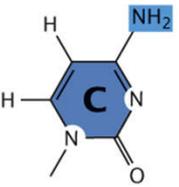
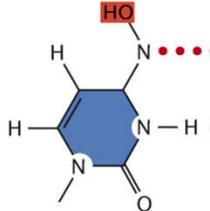
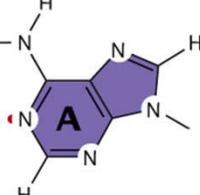
Mutágenos

TABLE 10-1 Mutation Frequencies Obtained with Various Mutagens in *Neurospora*

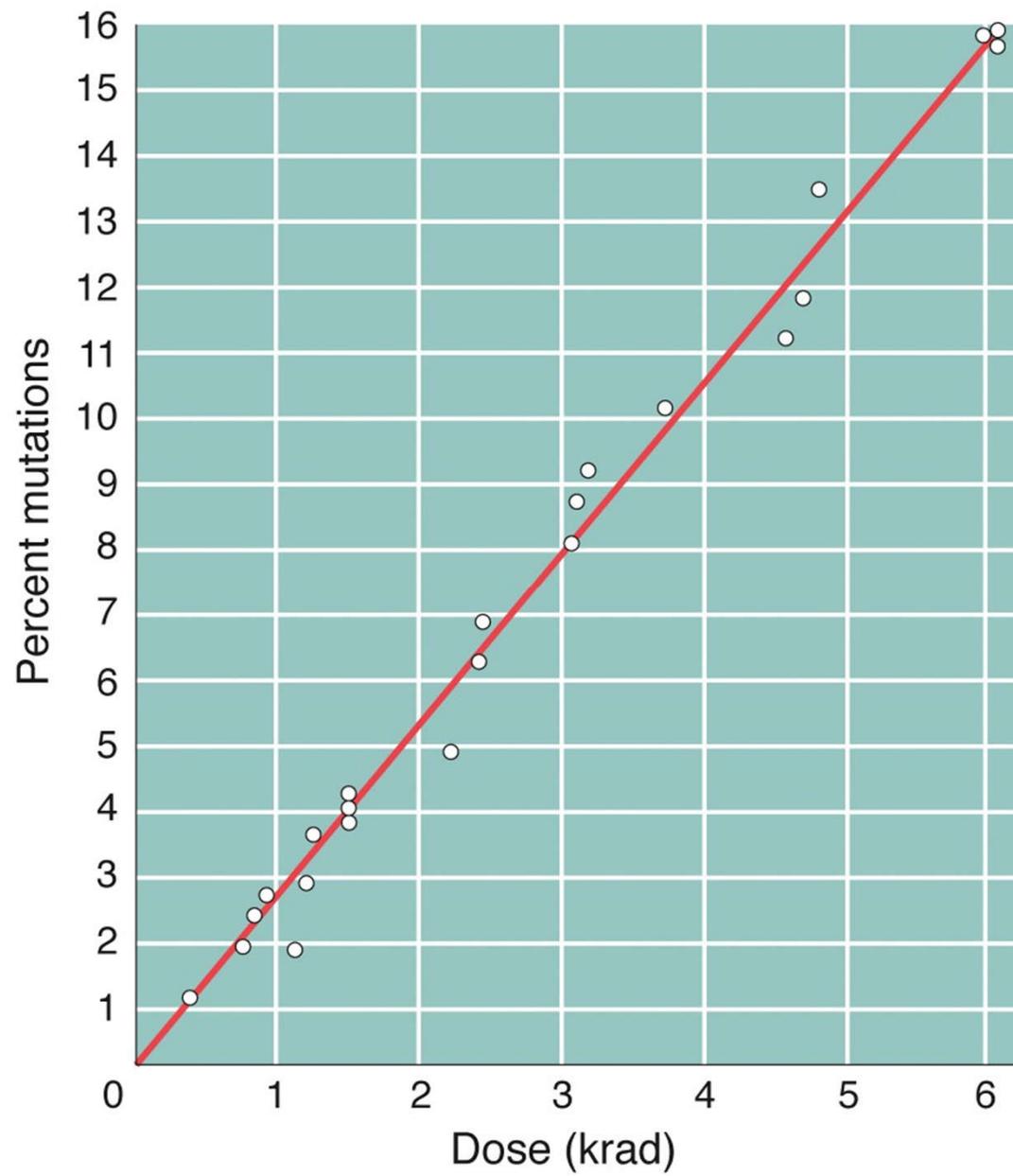
Mutagenic Treatment	Exposure Time (minutes)	Survival (%)	Number of <i>ad-3</i> Mutants per 10 ⁶ Survivors
No treatment (spontaneous rate)	–	100	~0.4
Amino purine (1–5 mg/ml)	During growth	100	3
Ethyl methanesulfonate (1%)	90	56	25
Nitrous acid (0.05 M)	160	23	128
X rays (2000 r/min)	18	16	259
Methyl methanesulfonate (20 mM)	300	26	350
UV rays (600 erg/mm ² /min)	6	18	375
Nitrosoguanidine (25 mM)	240	65	1500
ICR-170 acridine mustard (5 mg/ml)	480	28	2287

Note: The assay measures the frequency of *ad-3* mutants. It so happens that such mutants are red, so they can be detected against a background of white *ad-3*⁺ colonies.

- Agentes intercalantes
 - Moleculas planares que se intercalan entre las bases del DNA afectando la replicacion p. ej. proflavina, naranja de acridina, bomuro de etidio
- Daño de las bases
 - Agentes que alteran las bases y por lo tanto no pueden aparear. Resulta en un bloqueo de la replicacion y la insercion de nuevas bases no especificas.
- Luz UV
 - Produce dimeros de pirimidina. Activa sistemas de reparacion con insercion de bases incorrectas.

	Original base	Mutagen	Modified base	Pairing partner	Type of mutation
(a)	 Guanine	EMS Alkylation	 O^6 -Ethylguanine	 Thymine	CG → TA
(b)	 Cytosine	Nitrous acid (HNO_2) Deamination	 Uracil	 Adenine	CG → TA
(c)	 Cytosine	Hydroxylamine (NH_2OH) Hydroxylation	 Hydroxylamino-cytosine	 Adenine	CG → TA

Fig_17-20 *Genetics, Second Edition* © 2005 W.H. Freeman and Company



Mutaciones puntuales

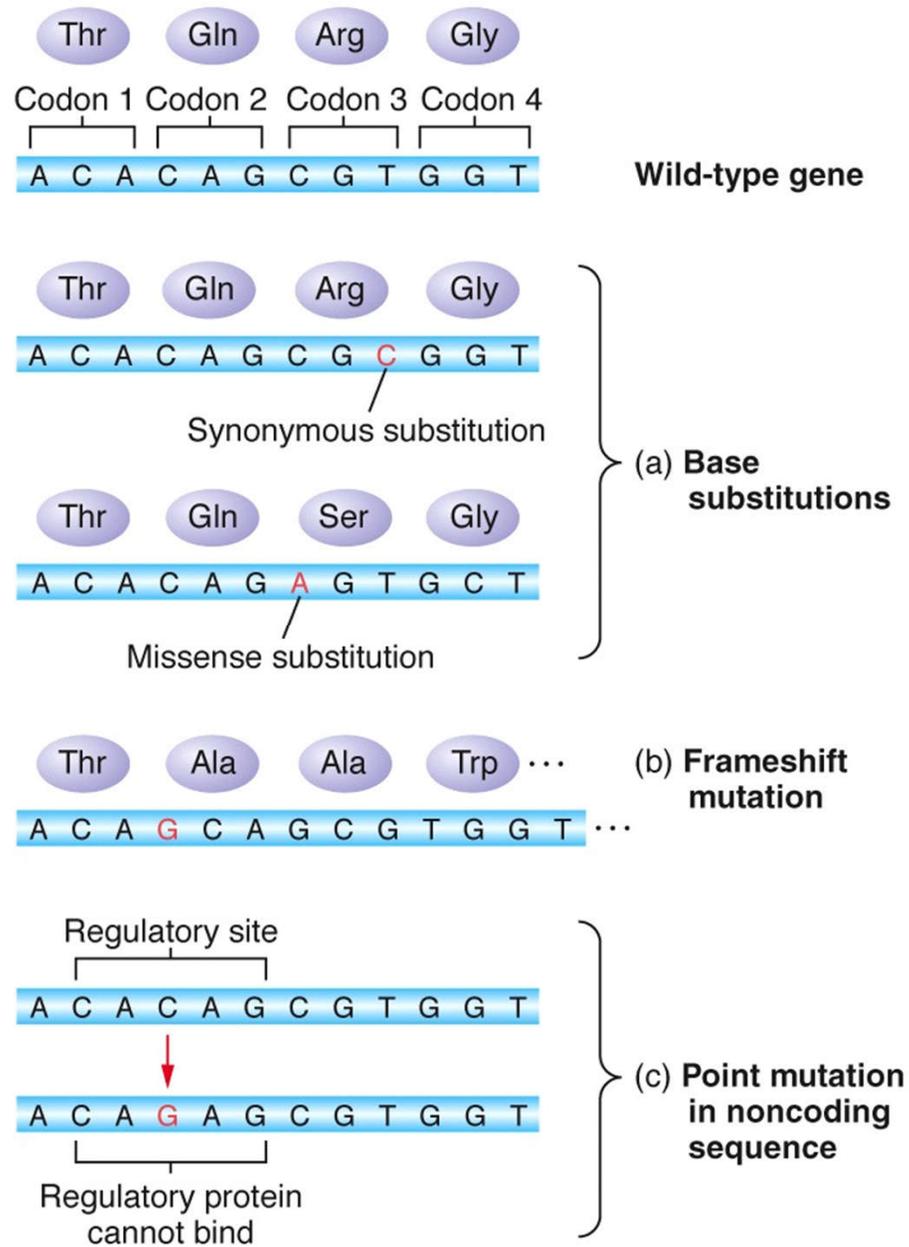
- Cambian una o dos bases
- Origen de las mutaciones
 - Inducidas en el laboratorio
 - Acción de un mutágeno
 - Mutagenesis es el proceso de inducir mutaciones
 - Espontáneas
 - En ausencia de un mutágeno conocido
 - Pueden ser causadas por errores de replicación
 - Proveen la base de la diversidad génica
 - Esenciales para el proceso de evolución

Tipos de mutaciones puntuales

- Sustitución de bases
 - transición
 - $A \leftrightarrow G$ (purina \leftrightarrow purina) ($A \cdot T \leftrightarrow G \cdot C$)
 - $C \leftrightarrow T$ (pirimidina \leftrightarrow pirimidina) ($C \cdot G \leftrightarrow T \cdot A$)
 - transversión
 - purina \leftrightarrow pirimidina ($A \leftrightarrow C$) ($A \cdot T \leftrightarrow C \cdot G$)
- Adición o delección de un par de nucleótidos

Consecuencias moleculares (1)

- Mutación sinonímica
 - Cambia un codón por otro.
 - PERO, no cambia el aminoácido (mutación silenciosa)
- Mutación de cambio de sentido
 - Cambia un codón por otro
 - Y cambia el aminoácido
- Mutación sinsentido
 - Cambia el codón de un aminoácido por un codón de terminación



Consecuencias moleculares (2)

- Las mutaciones de cambio de sentido tienen severidad variable
 - Un cambio *conservativo* altera poco la función.
 - Una sustitución *no* conservativa seguramente alterará la función de la proteína
 - Las consecuencias dependen del contexto ambiental
- Las mutaciones sin sentido alteran las proteínas produciendo polipéptidos truncados, normalmente no funcionales.
- Mutaciones puntuales en regiones no codificantes pueden o no tener efectos visibles.