

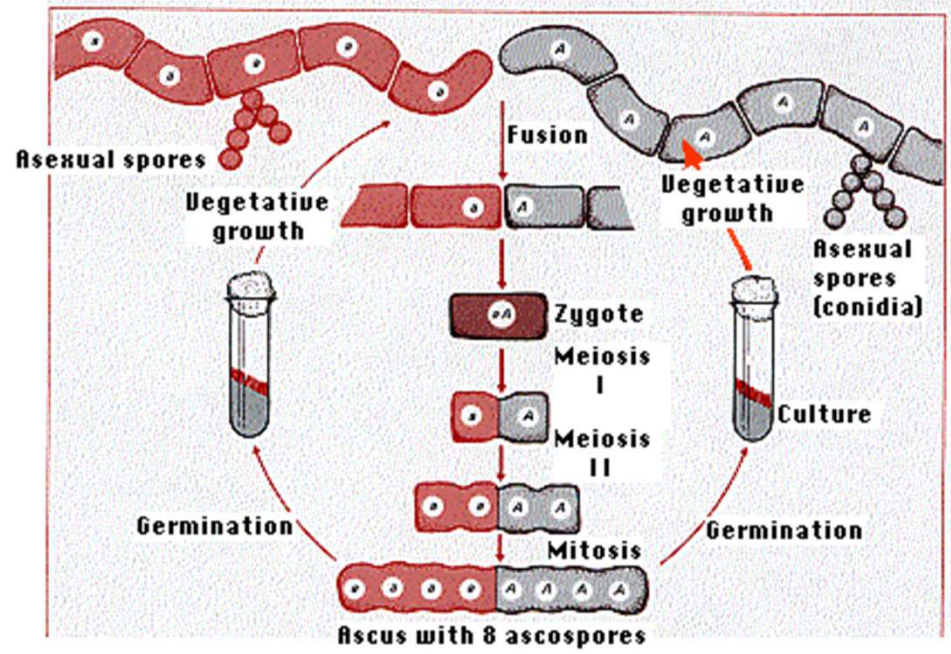
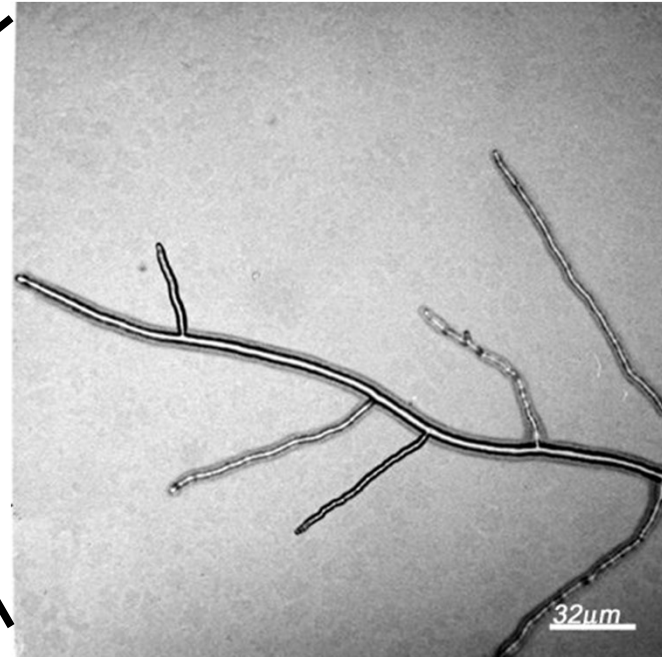
Un Gen, un polipéptido

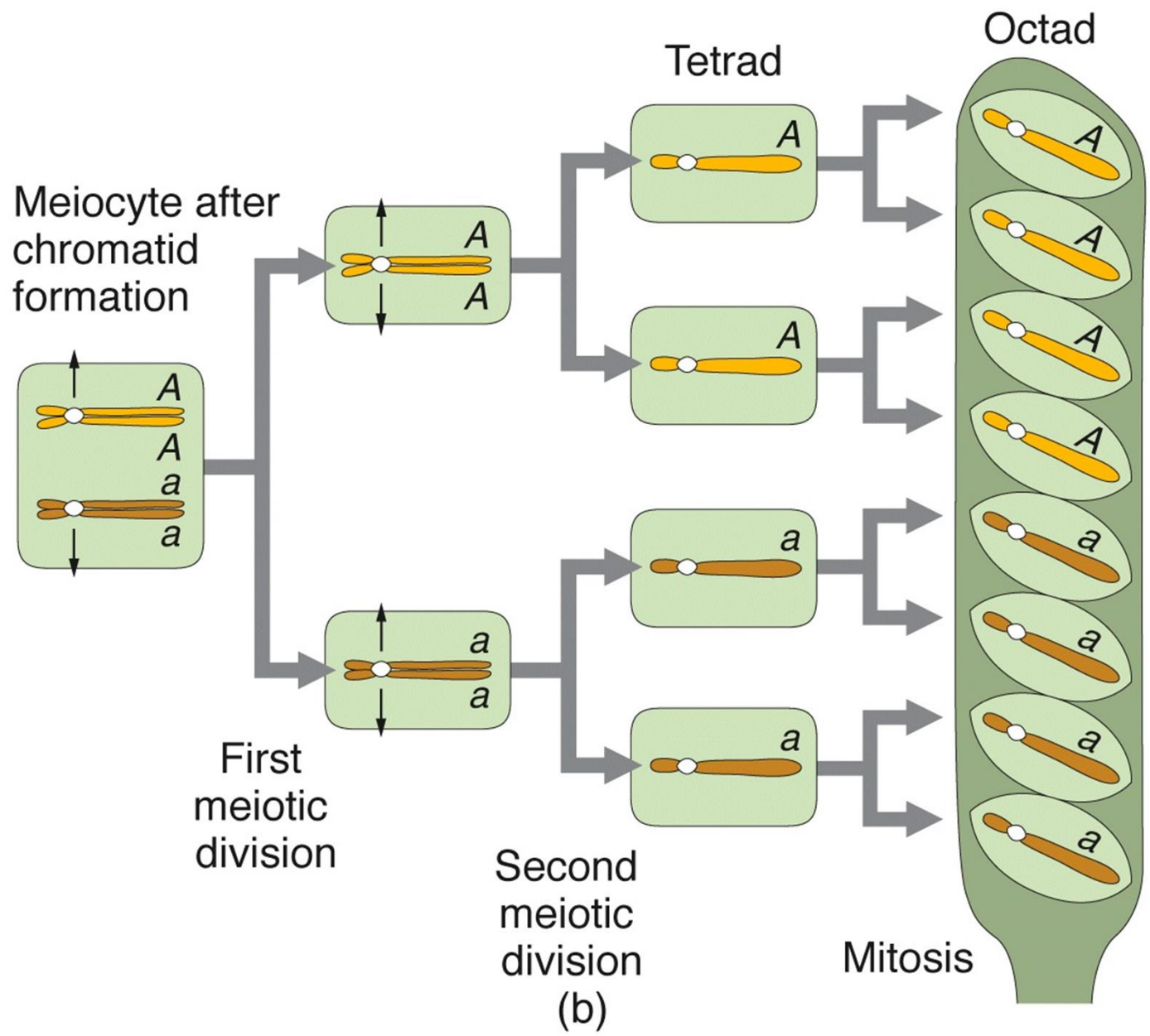
- En la década de 1930, Beadle y Tatum hicieron una serie de experimentos con el fin de entender qué era un gen y qué hace.
- La conclusión de sus experimentos fue “Un gen, una enzima”, concepto que se mantuvo por muchos años.
- Como retomó Crick en la elaboración de su “dogma central” las proteínas hacen casi todos los trabajos celulares y cumplen el rol de moduladores metabólicos, pero también están en procesos como movilidad celular, estructura celular o señalización entre células.
- Hemos visto que el ADN contiene la información genética y que es de algún modo, codificante de las proteínas. Si la secuencia de ADN se hereda, así se heredan las características de las proteínas.



Los experimentos de Beadle y Tatum

- B&T trabajaron con un hongo, *Neurospora crassa*. *N. crassa* crece normalmente como haploide, pero puede ser cruzado para formar organismos diploides (llamados dicariontes). *Neurospora* puede formar esporas haploides.
- *Neurospora* puede crecer en un medio mínimo definido: un conjunto de compuestos químicos que contienen todo lo que el hongo necesita para vivir. A partir de los componentes de ese medio, *Neurospora* sintetiza todo lo que necesita para vivir.
- El razonamiento de B&T: si los genes codifican enzimas, entonces deben existir mutantes que no pueden crecer en medio mínimo y tendrán requerimientos especiales y, en consecuencia, serán AUXOTROFOS. Esos requerimientos indicarán la vía metabólica que afecta ese gen.

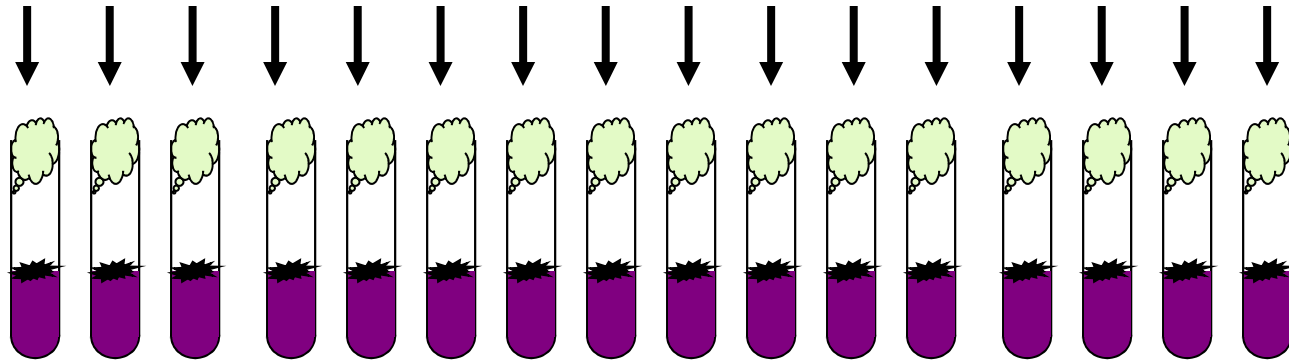
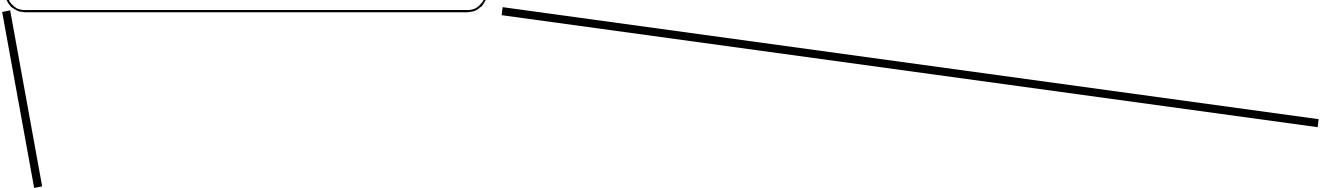
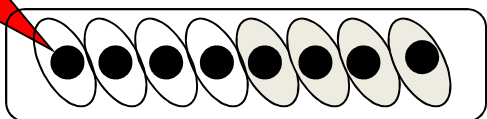
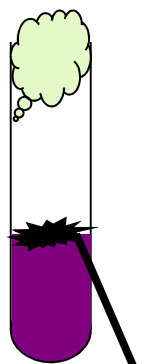
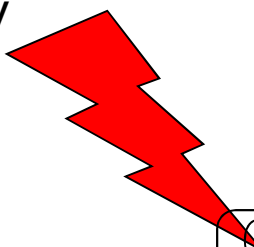




Selección de auxótrofos

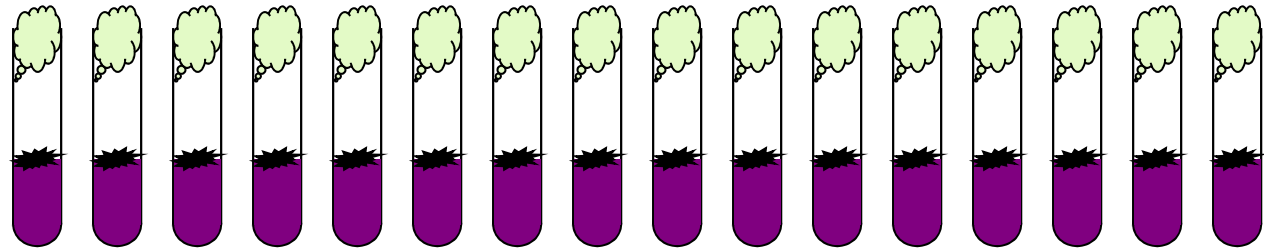
1. B&T irradiaron esporas con luz UV.
2. Separaron las esporas y las crecieron individualmente en un medio que contenía todos los nutrientes (medio RICO). En ese medio, el hongo crece sin problemas.
3. Algunas células de cada tubo se transfirieron a un tubo con medio MÍNIMO. Algunas crecieron en medio mínimo, pero otras no. Estas últimas son las AUXÓTROFAS -> incapaces de sintetizar alguna molécula indispensable.
4. Para determinar qué compuesto necesitaban estas cepas auxótrofas cada una se repicó a medio mínimo suplementado con un aminoácido o vitamina específico.
5. Se aislaron auxótrofos para un requerimiento especial.
6. Los auxótrofos se clasificaron de acuerdo a sus necesidades en grupos, por ejemplo ARG⁻ (necesitan arginina), TRP⁻ (necesitan triptofano), etc.

Rayos X,
Luz UV

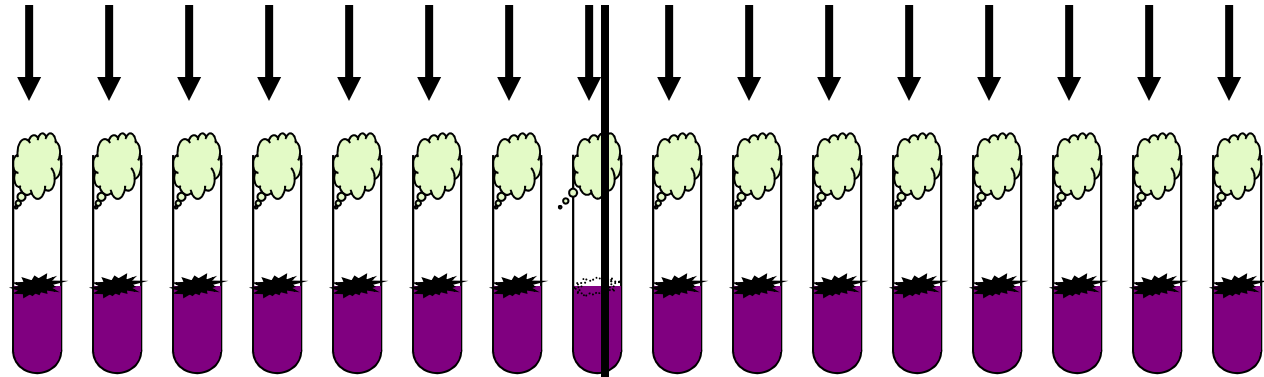


Medio rico

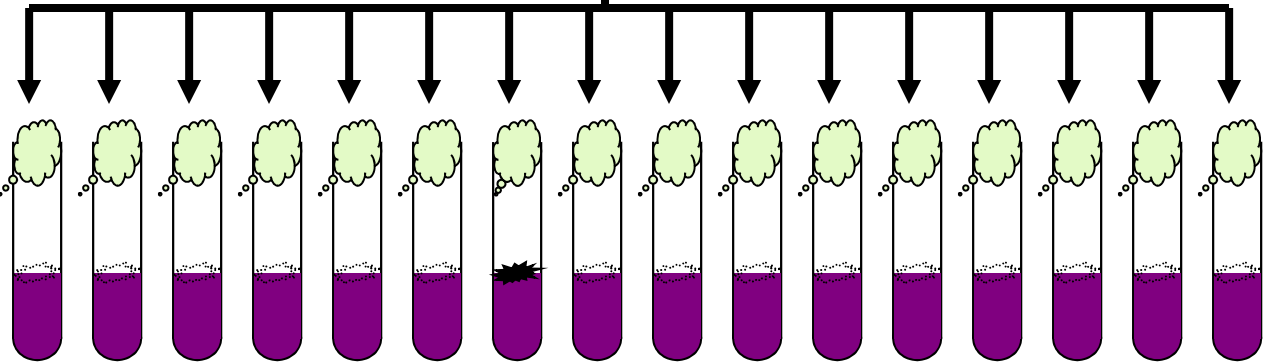
Medio rico



Medio mínimo
(sin aminoácidos)

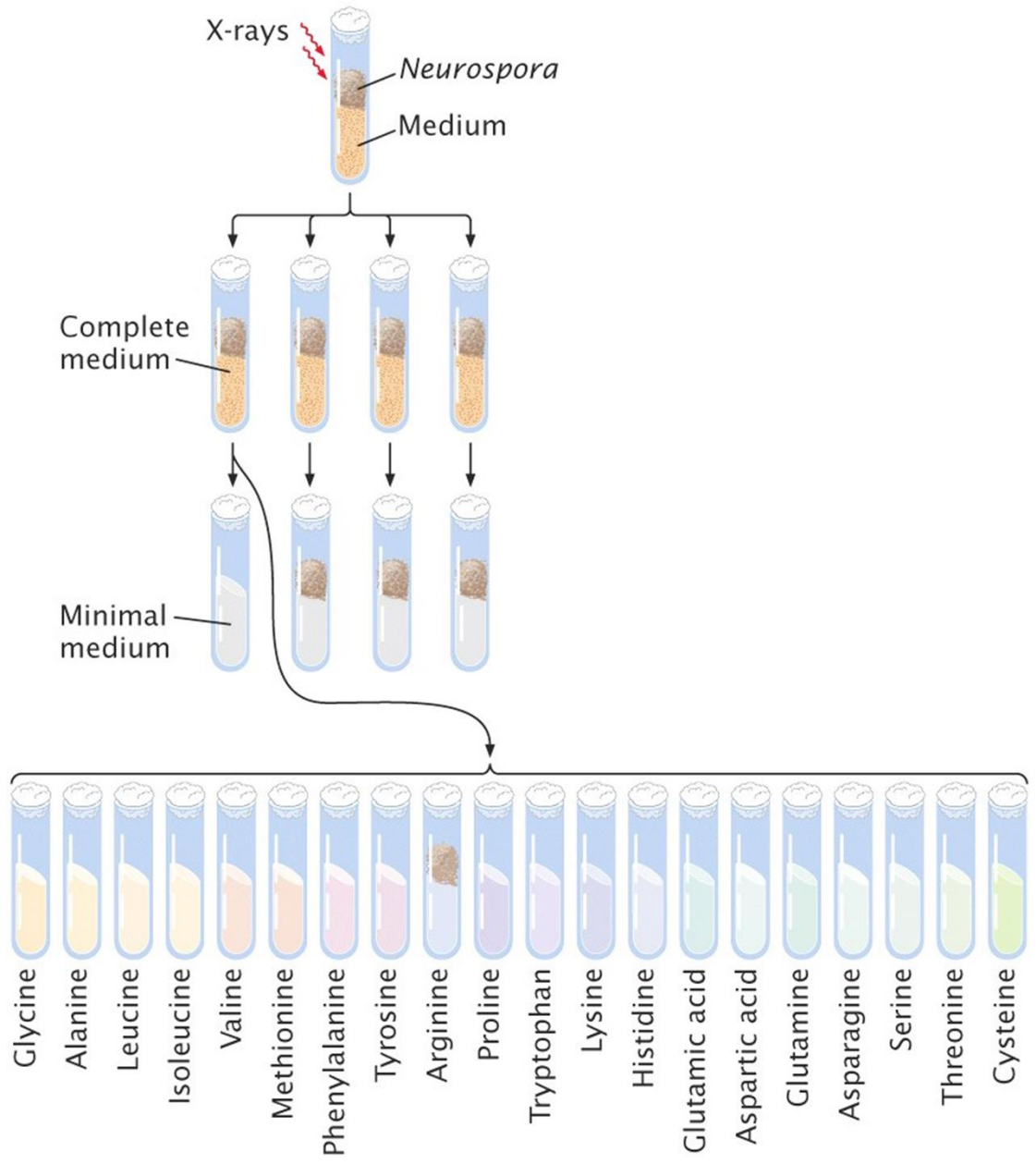


Medio mínimo
+



Aminoácido

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



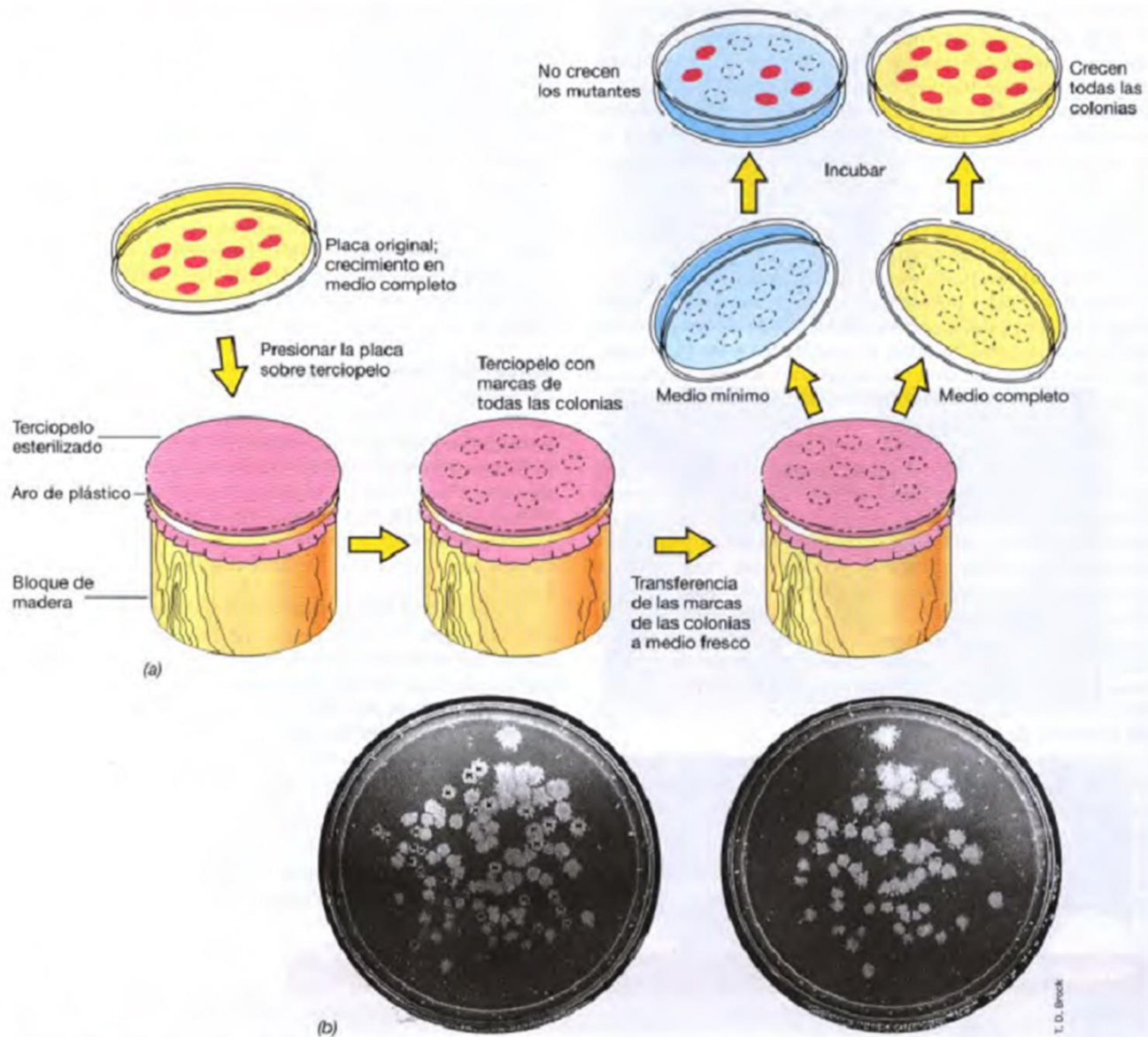


Figura 10.2 (a) Método de la réplica en placa para la detección de mutantes nutricionales. (b) Mutantes nutricionales detectados por el método de la réplica en placa. La fotografía de la izquierda muestra la placa original. Las colonias que no aparecen en la placa replicada están marcadas con una X. La placa réplica carecía de un nutriente (leucina) que estaba presente en la placa original. Por tanto, las colonias marcadas con una X son auxotrofos para la leucina.

Complementación

- B&T mostraron que cada mutante obtenido fue incapaz de sintetizar un compuesto particular.
- Con este sistema fueron capaces de generar miles de mutantes. Estos mutantes se agruparon de acuerdo al aminoácido afectado.
- Luego hicieron lo que se llamó un test de complementación: hicieron diploides de todas las combinaciones de mutantes distintos para un mismo grupo, con dos resultados posibles:
 - 1. El diploide es auxótrofo como cada haploide, esto significa que las dos mutaciones afectan el mismo gen. A esto se lo llama NO COMPLEMENTARIO.
 - 2. El diploide es prototrofo. Esto significa que las mutaciones son en genes distintos y , por lo tanto, se complementan.

Deducción de rutas metabólicas

		Supplements to minimal medium			
		None	Ornithine	Citrulline	Arginine
Group					
Wild type					
I					
II					
III					

Interpretation of data

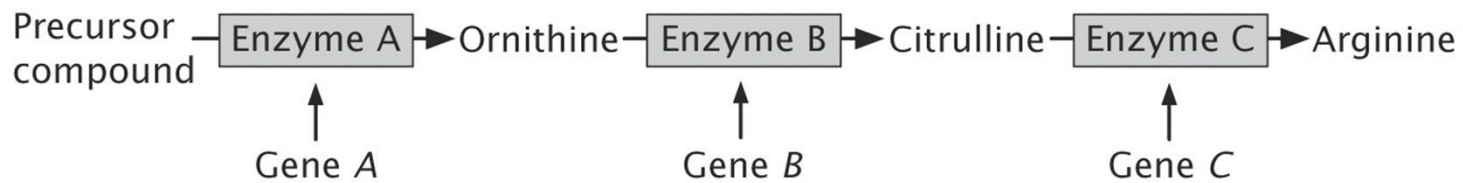


Table 15.1

Growth of arginine auxotrophic mutants on minimal medium with various supplements

Mutant Strain Number	Ornithine	Citrulline	Arginine
Group I	+	+	+
Group II	–	+	+
Group III	–	–	+

Note: + indicates growth; – indicates no growth.

Determinación de vías metabólicas

- El trabajo bioquímico nos permite saber que un aminoácido se sintetiza en etapas sucesivas, con intermediarios.
- Por ejemplo, la arginina se sintetiza a partir de ácido glutámico en las siguientes etapas:

ácido glutámico -> N-acetil glutamato -> ornitina -> citrulina -> arginina.

- Cada etapa es catalizada por una enzima (proteína)
- Cada etapa puede ser bloqueada si destruimos la enzima
- Un mutante puede bloquear una etapa específica
- **Si cualquier etapa es bloqueada, el mutante es auxótrofo para arginina!!!**

Pathway of
arginine
biosynthesis

Mutants

N-Acetylornithine



argE

Ornithine



argF

Citrulline



argG

Arginosuccinate



argH

Arginine

¿Por qué nos podría interesar esto?



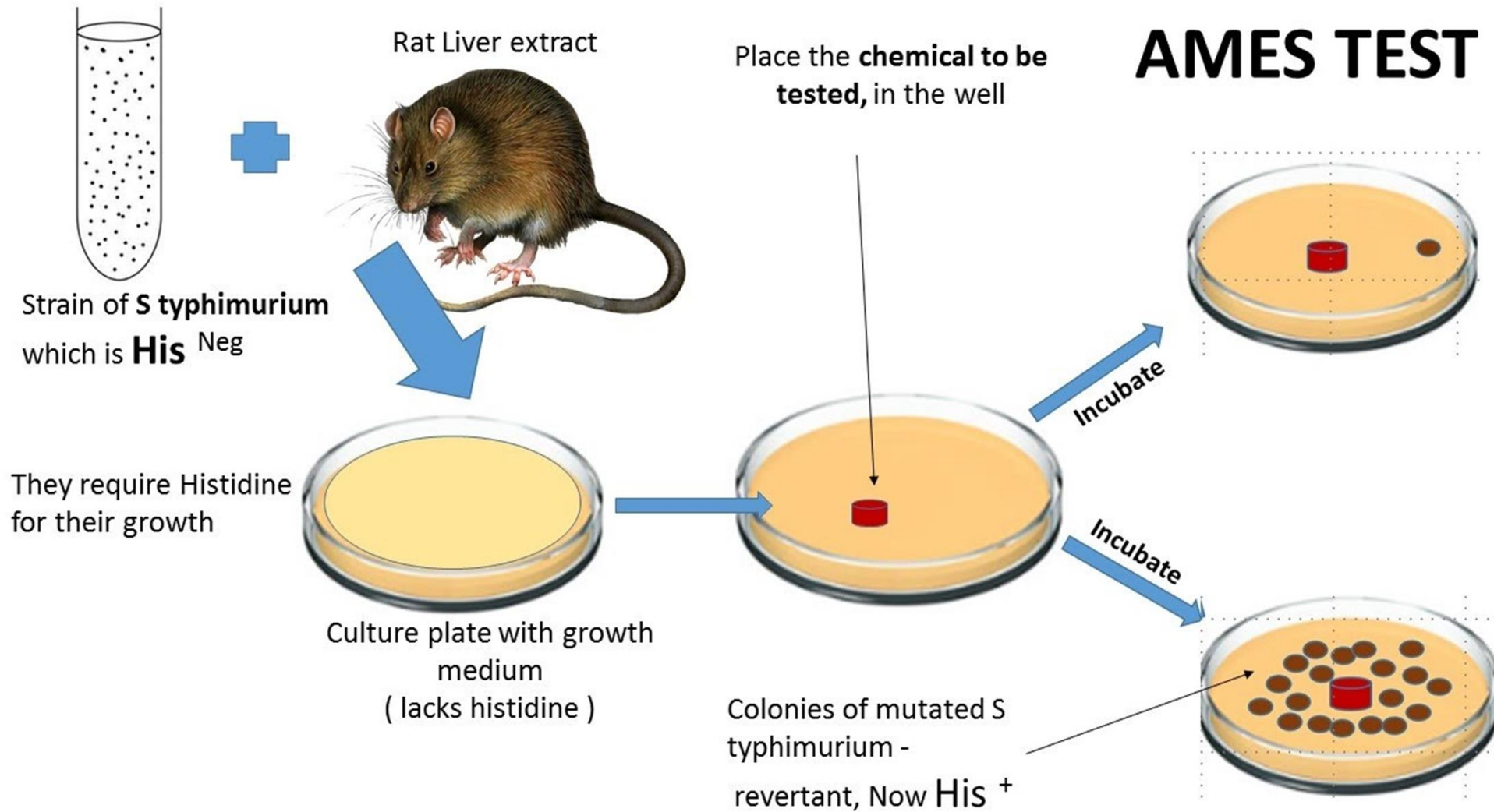
Para detectar mutágenos en el ambiente

Ames, B. N., Sims, P. and Grover, P. L. (1972) Epoxides of Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons are Frameshift Mutagens. *Science* 176, 47-49

Ames, B., F. Lee, and W. Durston. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 782-786.

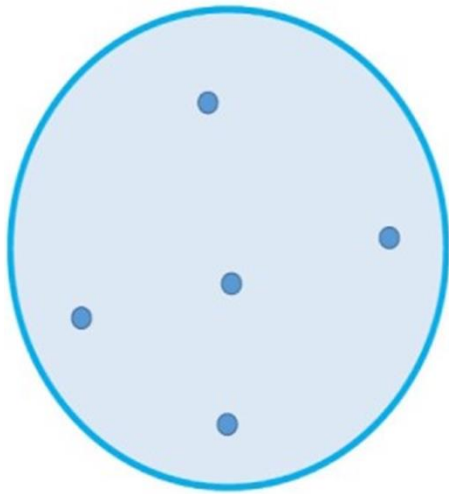
Ames, Bruce N., and Lois S. Gold. "The Causes and Prevention of Cancer: The Role of Environment." *Biotherapy* 11 (1998): 205-220.

Ensayo de Ames



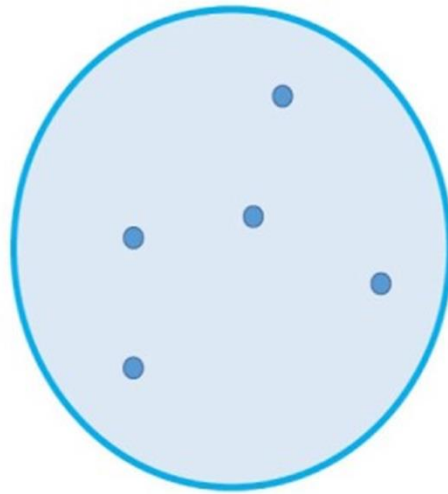
Scenario 1

Plate	# of colonies
A (his ⁻ medium + his ⁻ bacteria)	5
B (his ⁻ medium + his ⁻ bacteria + compound X)	5
C (his ⁻ medium + his ⁻ bacteria + rat liver enzyme)	5
D (his ⁻ medium + his ⁻ bacteria + rat liver enzyme + compound X)	75



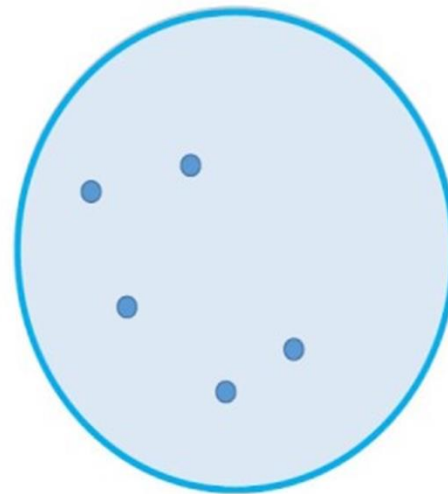
A

His⁻ medium
His⁻ bacteria



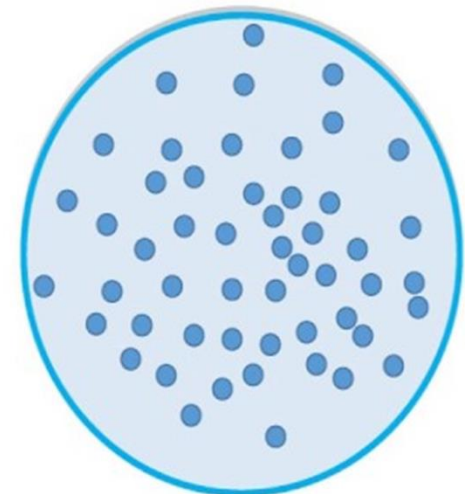
B

His⁻ medium
His⁻ bacteria
Compound X



C

His⁻ medium
His⁻ bacteria
Rat liver enzyme



D

His⁻ medium
His⁻ bacteria
Rat liver enzyme
Compound X

Test de Ames

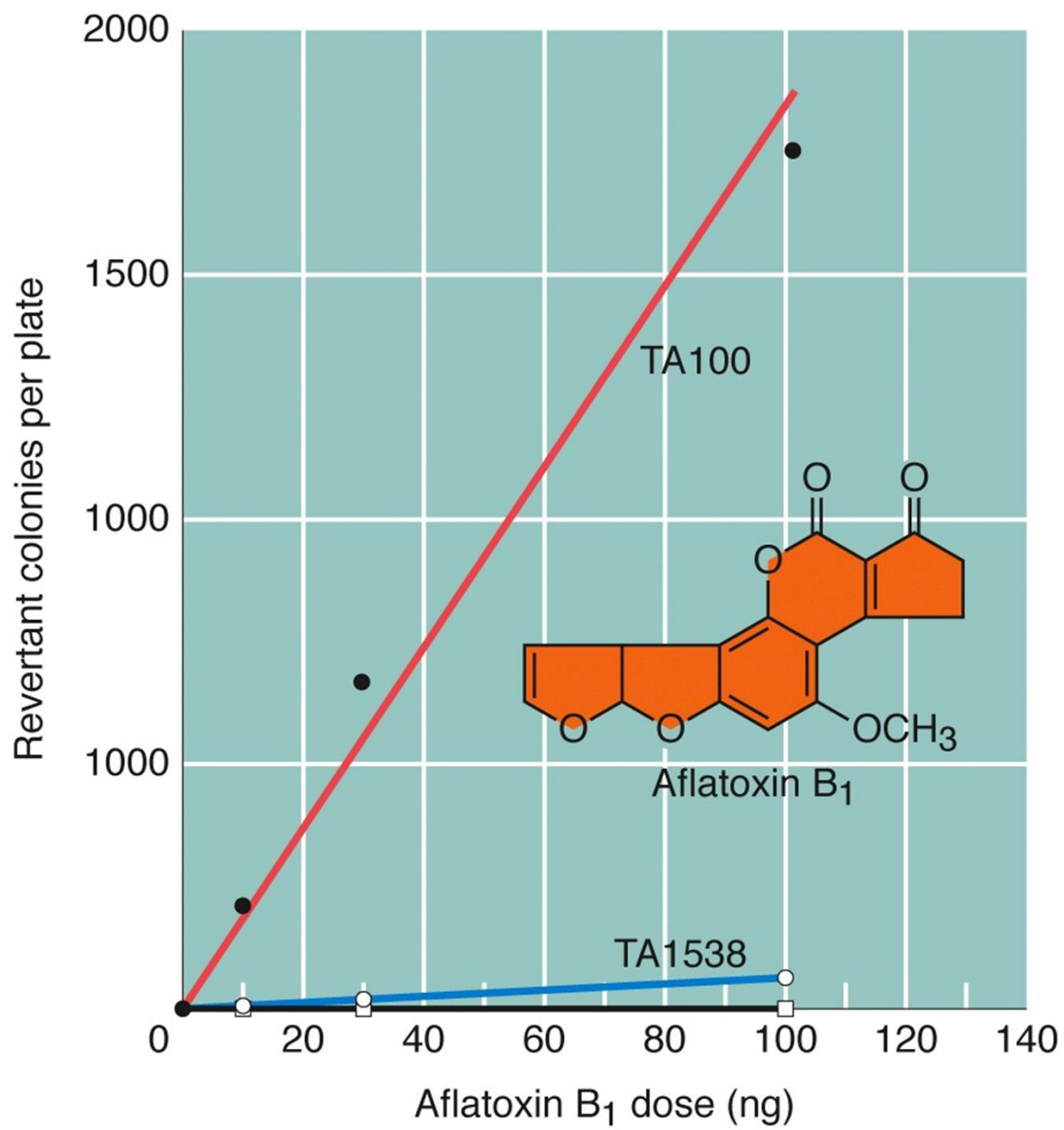
Salmonella typhimurium his(-)



Agente mutagénico



Agente mutagénico = N° mutantes revertidos en presencia del agente debe ser doble al del que existiría en ausencia del mismo



Transferencia Horizontal de Genes



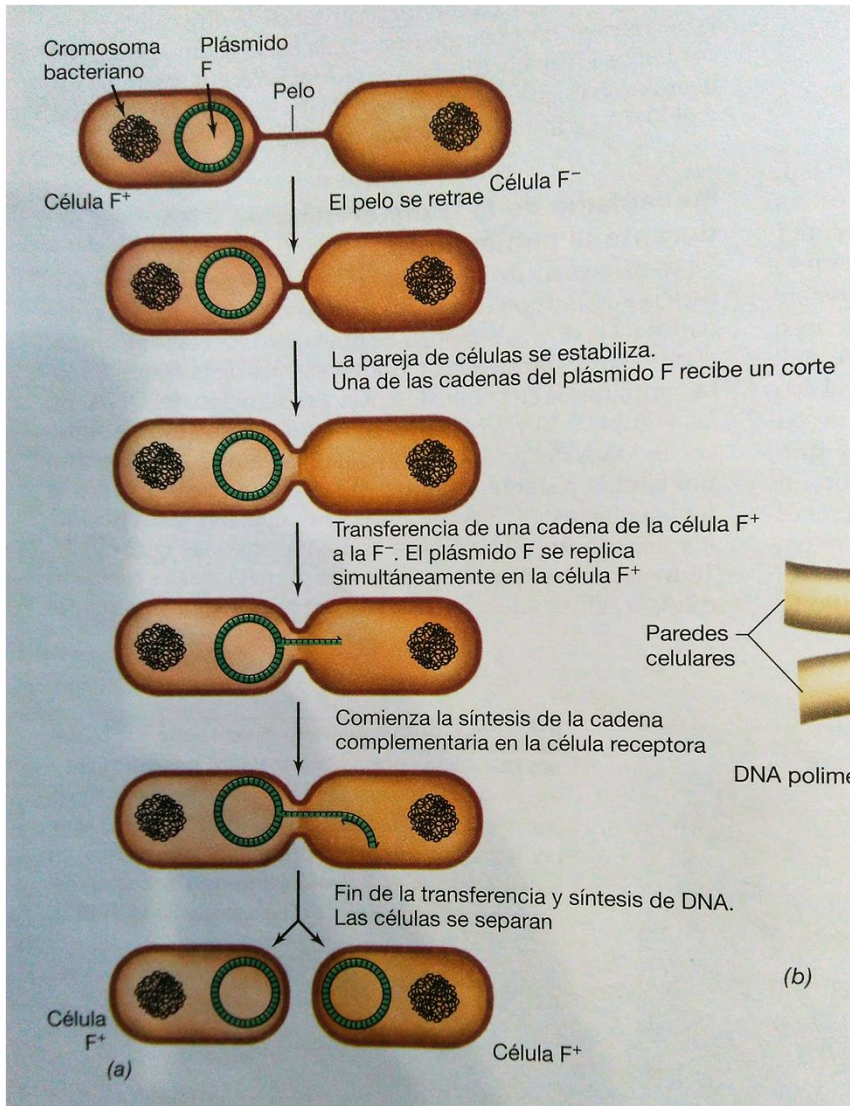
Proceso mediante el cuál un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente.

Es considerado como uno de los mecanismos fundamentales de la **evolución** procariota.

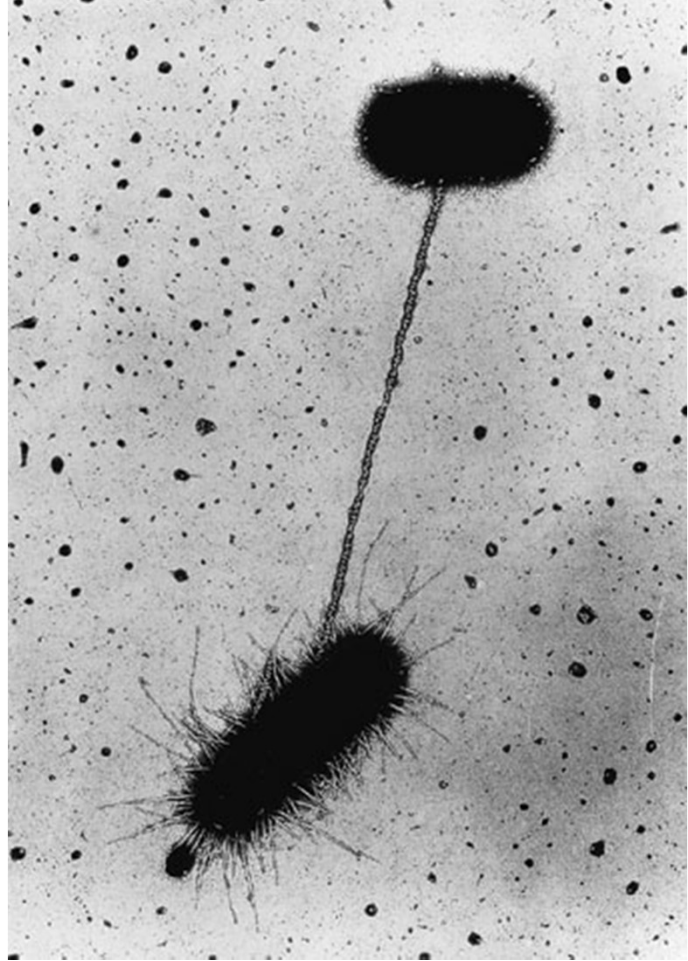
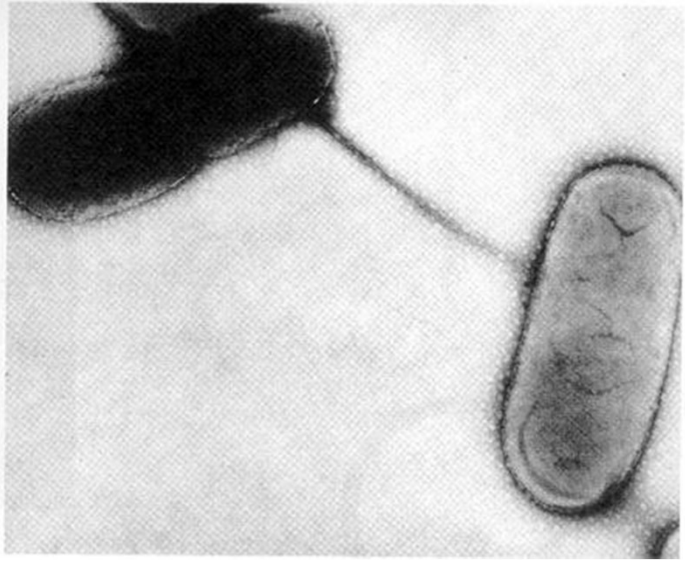
Existen tres mecanismos básicos:

- Conjugación
- Transformación
- Transducción

Conjugación

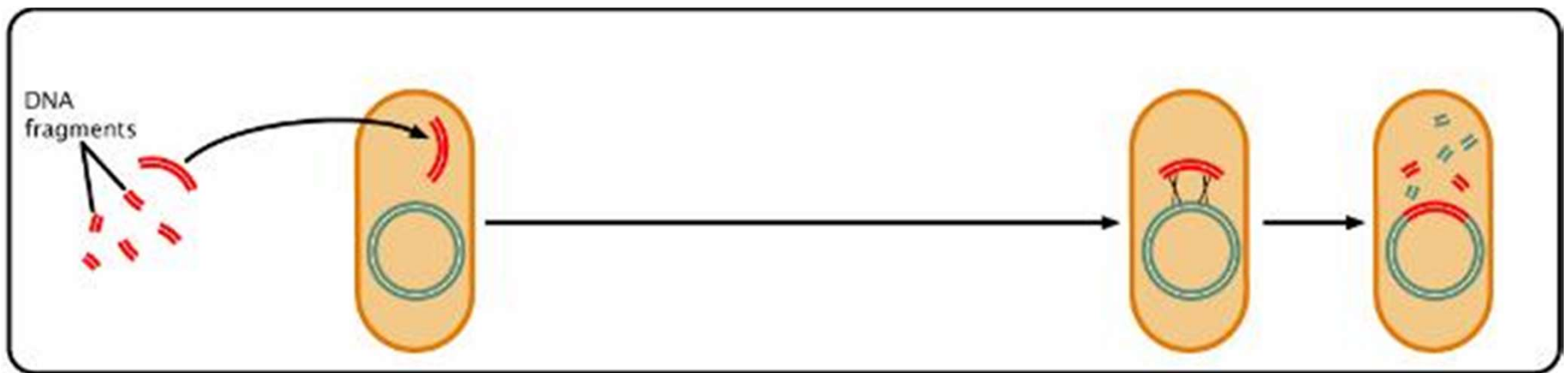


- Transferencia directa de información genética desde F^+ (plásmido conjugativo) a otra célula aceptora (F^-).
- Pelo F como canal de paso del material genético.
- Las especies de las bacterias donadora y aceptora pueden ser diferentes.
- Plásmido F eventualmente se puede introducir por recombinación en el cromosoma bacteriano dando lugar a una célula Hfr.



Transformación

- Captación de material genético libre en el medio ambiente por una célula bacteriana que lo incorpora a su material genético y lo expresa como propio.
- Células Competentes (Naturales o Inducidas).
- El material incorporado puede:
Replicarse autónomamente si posee un origen de replicación (plásmidos) o integrarse por recombinación o perderse al dividirse la célula.

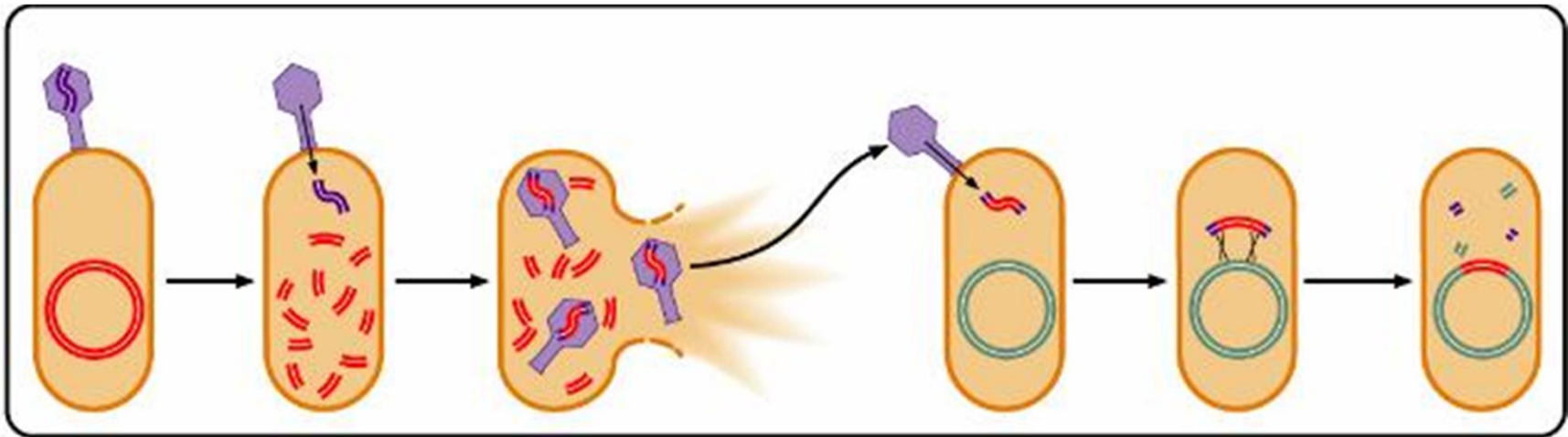


Transducción

Ocurre cuando un Bacteriófago infecta una célula bacteriana y los viriones resultantes incluyen en su material genético parte del de la bacteria.

La transducción puede ser:

- generalizada cuando el fago incluye un fragmento de cualquier parte del genoma de la bacteria
- restringida cuando sólo se incluyen determinadas secuencias



Regulación de la expresión de genes



- Cada célula contiene todo el material genético necesario para su crecimiento y desarrollo.
- Algunos de estos genes se expresan continuamente (genes de procesos bioquímicos vitales por ej. respiración)
- Otros genes son “encendidos” o “apagados” según las necesidades circunstanciales.

Regulación en bacterias: operones

- Varios genes relacionados que están regulados conjuntamente (se transcriben juntos).
- Sólo se encuentran en organismos procariotas
- Generalmente regulan procesos bioquímicos importantes

Componentes básicos de un operón:

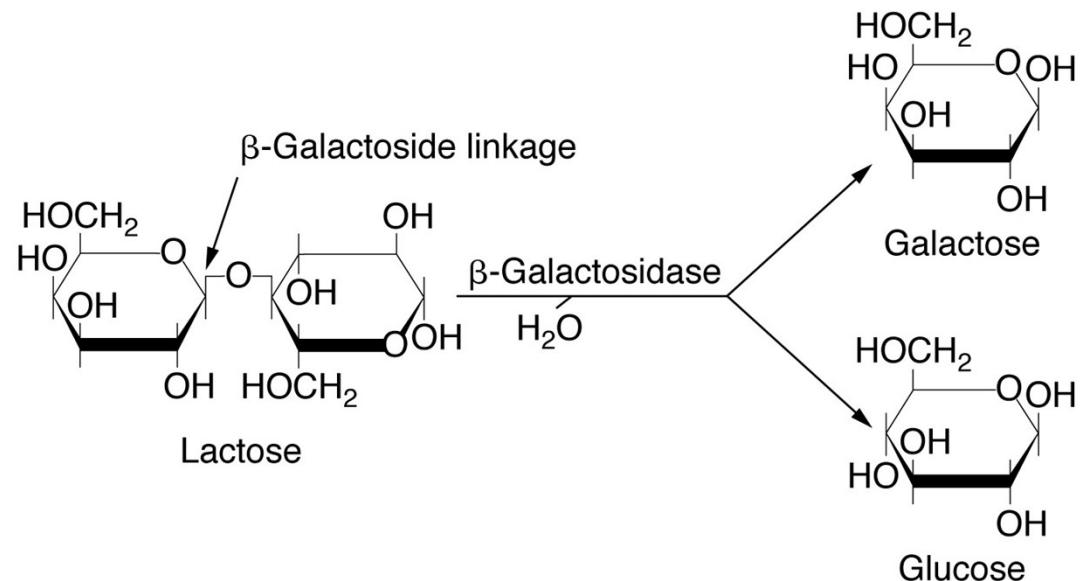
- gen regulador
- operador
- promotor
- genes estructurales (codifican para proteínas)



El operon *lac*

- El operon *lac* consiste en tres genes involucrados en el metabolismo de la lactosa
- Uno de ellos (*lacZ*) es el gen que codifica la enzima **β -galactosidasa**

- Esta enzima hidroliza la lactosa generando glucosa y galactosa.



Según el ambiente...

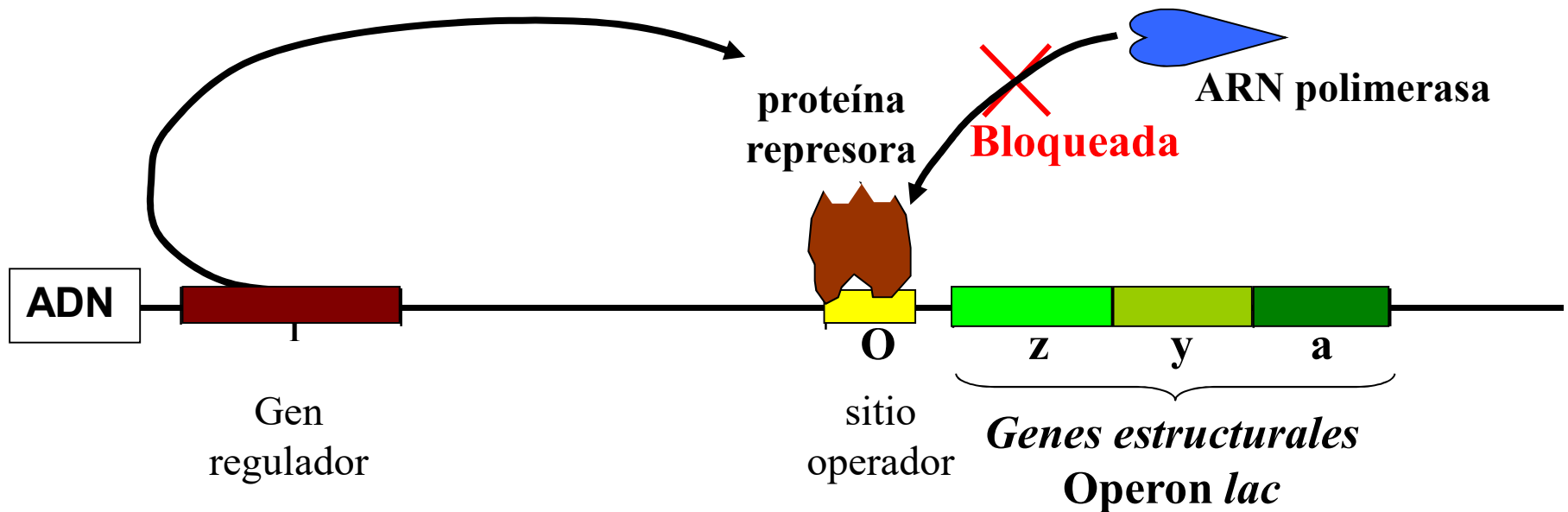
- *E. coli* puede usar glucosa, monosacárido, o lactosa, disacárido.
- Pero la lactosa necesita ser previamente hidrolizada.
- Por eso la bacteria prefiere la glucosa mientras esté presente.

Hay 4 situaciones posibles

1. Cuando hay glucosa **presente** en el medio y ausencia de lactosa *E. coli* **no** produce β -galactosidasa.
2. Cuando hay glucosa y lactosa **presentes** en el medio de cultivo *E. coli* **no** produce β -galactosidasa.
3. Cuando **no hay** glucosa ni lactosa en el medio de cultivo *E. coli* **no** produce β -galactosidasa.
4. Cuando **no hay** glucosa pero está **presente** la lactosa en el medio *E. coli* **produce** β -galactosidasa.

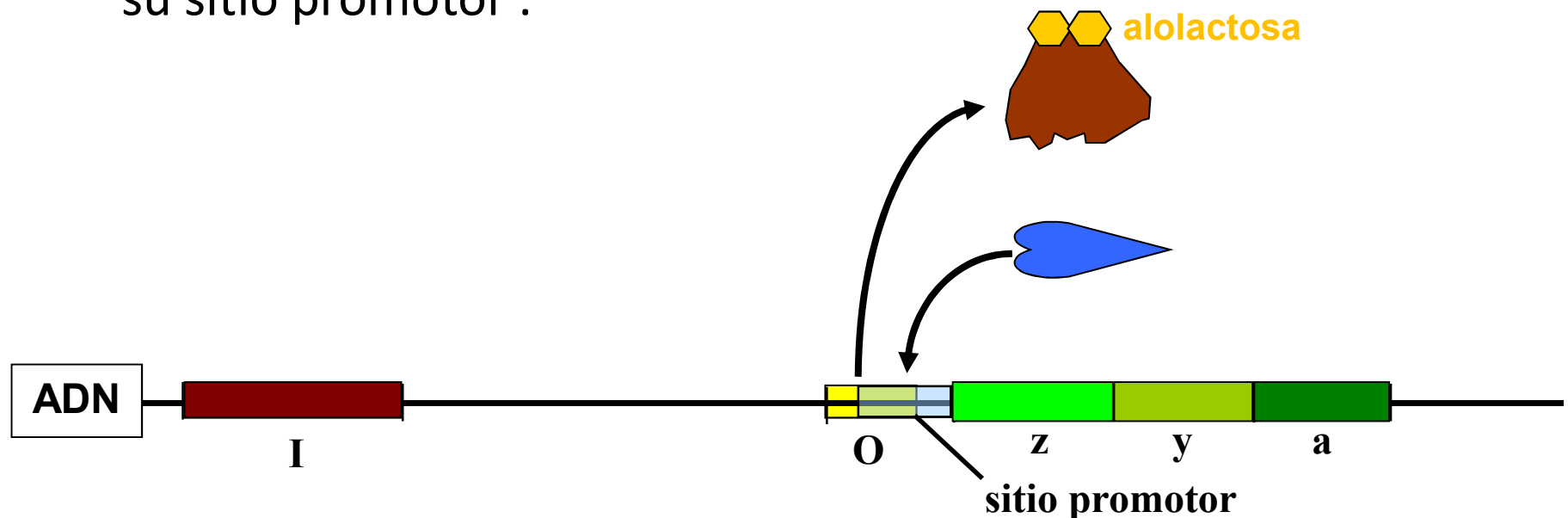
1. Cuando la lactosa esta ausente

- Se sintetiza continuamente la proteína represora. Esta se une a la secuencia de ADN llamada **Operador**, justo antes de los **genes estructurales del operon**.
- La proteína represora bloquea el promotor, por lo tanto, la ARN polimerasa no puede iniciar la transcripción.



2. Cuando la lactosa está presente

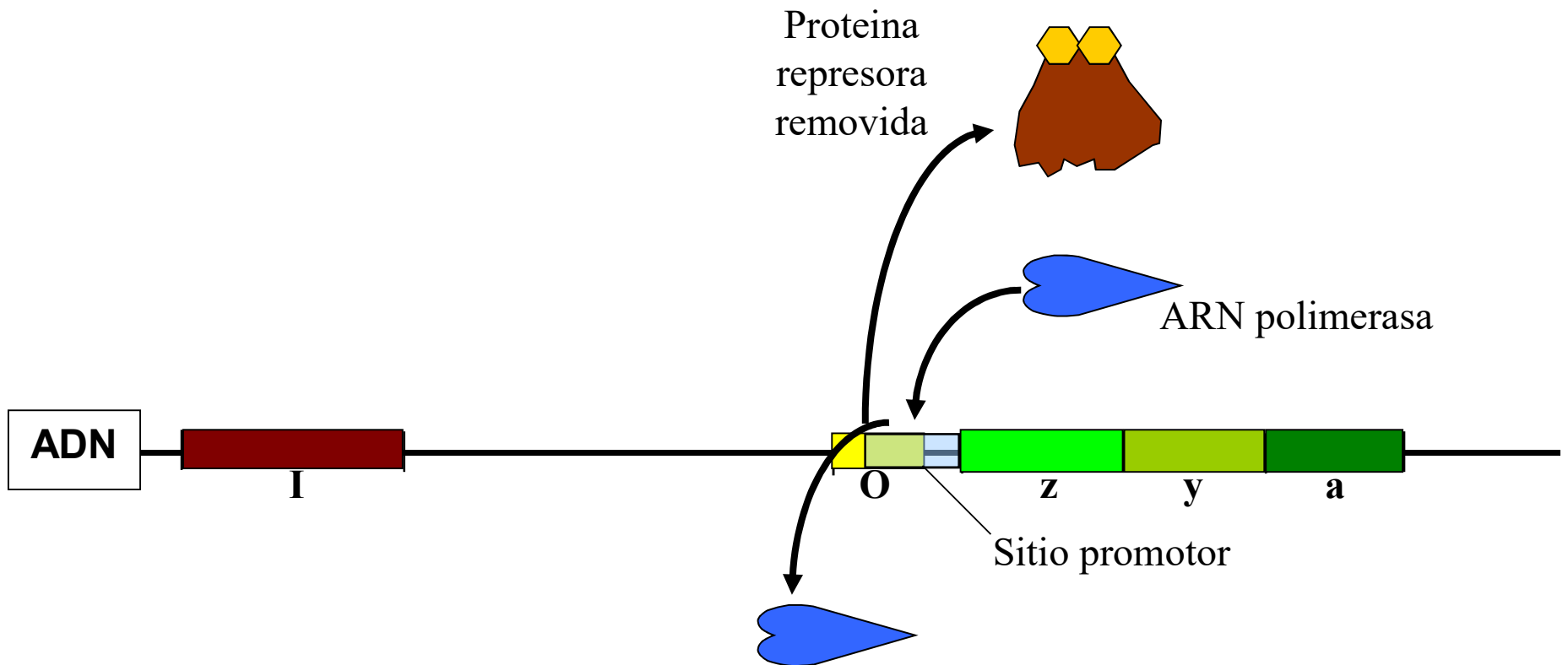
- Se forma una pequeña cantidad de alolactosa dentro de la célula bacteriana. La alolactosa se une a la proteína represora en un sitio alostérico.
- Esto hace que la proteína represora cambie su forma (un cambio conformacional). Ya no se puede unir en el sitio del operador y se suelta. La ARN polimerasa puede ahora alcanzar su sitio promotor.



3. Cuando hay presencia de glucosa y lactosa?

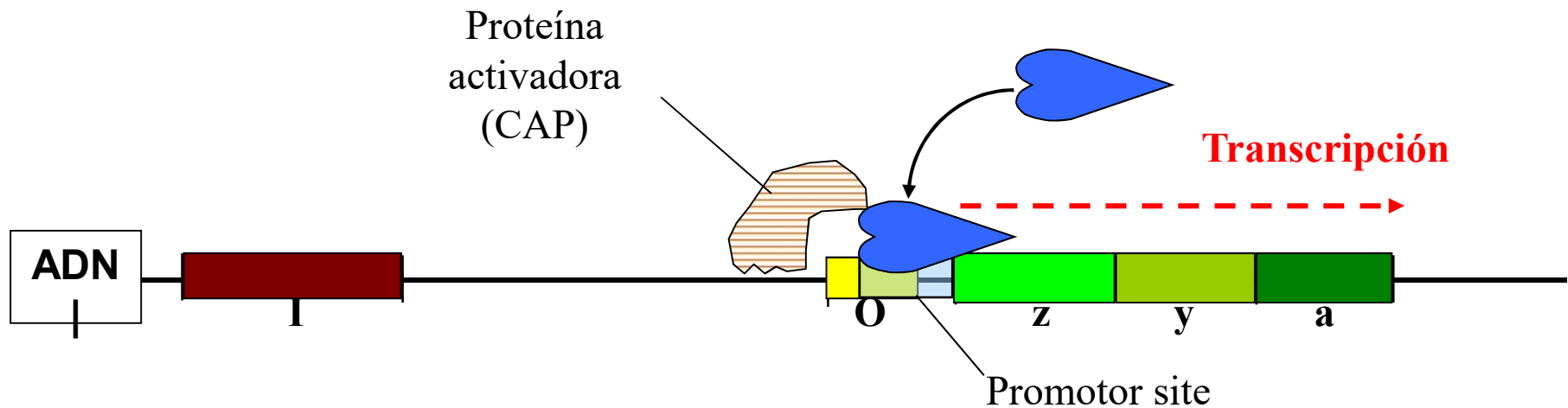
- Lo anterior explica cómo el operón lac está «desreprimido» cuando la lactosa está presente.
- Pero..... no explica por qué el operón no se transcribe cuando la glucosa y la lactosa están presentes.

- Cuando la glucosa y la lactosa están presentes la ARN polimerasa puede unirse al sitio promotor, pero de forma inestable, se suelta.



4. Cuando no hay glucosa pero la lactosa esta presente

- Es necesario otra proteína, una **proteína activadora (CAP)**. Ésta estabiliza a la ARN polimerasa.
- La proteína activadora sólo se produce en ausencia de glucosa. Esto se censa por aumento de cAMP, que une CAP.
- De esta manera, *E. coli* sólo genera enzimas para metabolizar otros azúcares en ausencia de glucosa



Resumen operon *lac*

Carbohidratos	Proteína activadora	Proteína represora	ARN polimerasa	Genes estructurales
+ GLUCOSA + LACTOSA	No se une al ADN	Se suelta del operador	Se suelta del promotor	No hay transcripción
+ GLUCOSA - LACTOSA	No se une al ADN	Se une al sitio operador	Bloqueada por el represor	No hay transcripción
- GLUCOSA - LACTOSA	Se une al ADN	Se une al sitio operador	Bloqueada por el represor	No hay transcripción
- GLUCOSA + LACTOSA	Se une al ADN	Se suelta del operador	Se une al promotor	Transcripción

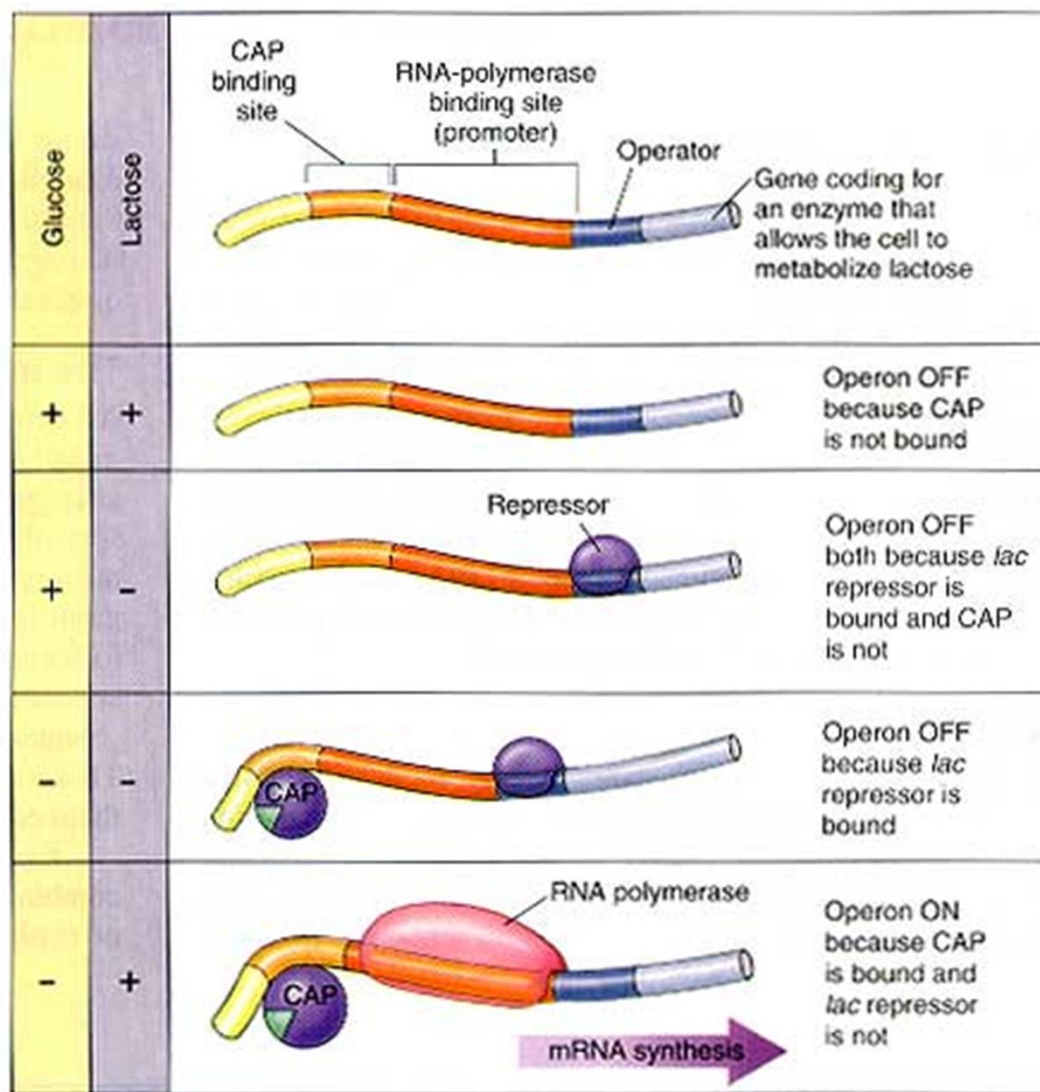


Figure **Activators and repressors at the *lac* operon.**

Together, the *lac* repressor and the activator called CAP provide a very sensitive response to the cell's need for and ability to use lactose-metabolizing enzymes.