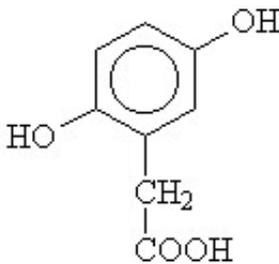
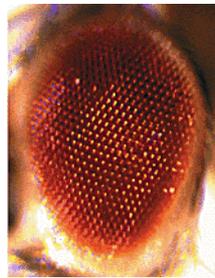
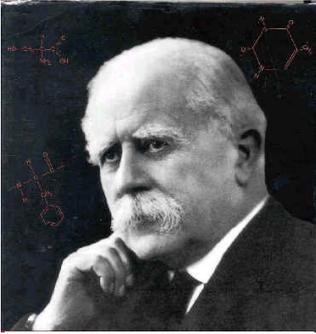


EL MATERIAL HEREDITARIO COMO PORTADOR DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA



- [Introducción. La genética bioquímica. Archibald Garrod \(1902\).](#)
- [Hipótesis un gen-una enzima: Experimentos de Beadle y Ephrussi \(1937\) y de Beadle y Tatum \(1941\).](#)
- [La relación entre los genes y las enzimas es de tipo informacional. Las hemoglobinas humanas.](#)
- [Enfermedades humanas producidas por alteraciones en el metabolismo.](#)
- [Hipótesis de la secuencia \(Crick, 1958\).](#)
- [Demostración de la hipótesis de la secuencia: Principio de colinealidad \(Yanofsky y col., 1964, Sarabhai y col. 1964\).](#)

INTRODUCCIÓN. ARCHIBALD GARROD (1902). GENÉTICA BIOQUÍMICA

A partir de 1900, año en el que se redescubrieron los experimentos que Mendel había realizado en 1865, y hasta 1930 - 1940, se desarrolló la Genética de la transmisión en diferentes especies animales y vegetales. Durante este período se averiguó como se transmitían los genes o factores hereditarios, se encontraron excepciones a las Leyes de Mendel, se analizaron caracteres cualitativos y cuantitativos y se desarrollo la genética de poblaciones.

Una vez conocido cómo se transmitían los genes, se plantearon dos cuestiones importantes:

- ¿Qué molécula contenía la información genética?, es decir, ¿Quién es el material hereditario?.
- ¿Cómo funcionaban los genes?

La respuesta a la primera pregunta ya la hemos visto en los capítulos anteriores y se puede resumir diciendo que el material hereditario o los genes son ácidos nucleicos.

Resulta conveniente definir antes de continuar con la introducción dos términos ampliamente empleados en genética.

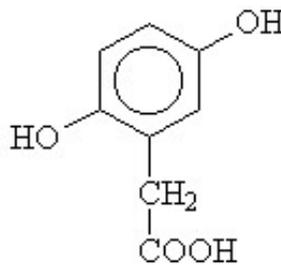
- Genotipo: constitución genética o alélica de una célula o individuo habitualmente referida a un gen o unos pocos genes y rara vez referida a todos los genes o al genoma completo.
- Fenotipo: se define como la forma o aspecto externo que tiene un determinado carácter o grupo de caracteres en un individuo. El Fenotipo es, por consiguiente, la expresión externa del genotipo para un determinado gen o genes en un ambiente concreto.

Los caracteres o fenotipos que se venían analizando en los estudios genéticos durante estos años (desde 1900 a 1930-1940) estaban demasiado alejados del genotipo de los individuos, de manera que entre el fenotipo y el genotipo había una compleja serie de procesos metabólicos y fisiológicos. Por tal motivo, para responder a la segunda pregunta (¿Cómo funcionaban los genes?), fue necesario cambiar el tipo de caracteres que se estaban analizando y fijarse en características que estuvieran más cerca del genotipo. Como consecuencia se comenzaron a estudiar caracteres cuyo fenotipo fuera más fácilmente analizable en términos de procesos metabólicos y de reacciones químicas. De esta forma, nació la Genética Bioquímica o rama de la genética que estudia el control genético de las rutas metabólicas y reacciones químicas.

El primer caso conocido de una alteración en un gen que producía una alteración en una ruta metabólica fue descrito por un médico, Archibald Garrod en 1902. Se trataba de la enfermedad humana de la *alcaptonuria* que produce artritis acompañada de excreción de orina coloreada. Además, los cartílagos y huesos de estas personas se vuelven oscuros con el paso del tiempo debido a la acumulación de un pigmento derivado del ácido homogentísico (ocronosis).



Manchas oscuras en la esclerótica (Ocronosis)

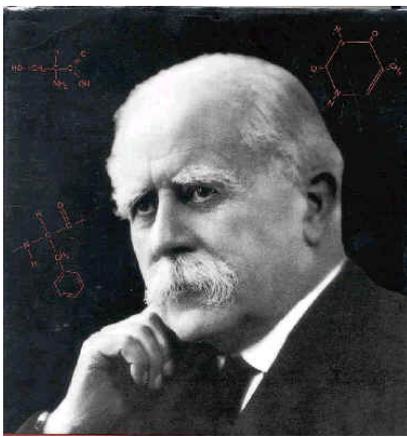


Ácido homogentísico



Manchas de color azulado en las orejas (Ocronosis)

Esta enfermedad se debe a un gen recesivo situado en un autosoma que se hereda de forma mendeliana en las familias afectadas por dicha alteración. El genetista, Willian Bateson se dio cuenta de que la *alcaptonuria* solía detectarse con mayor frecuencia en los hijos de individuos emparentados (primos hermanos). La colaboración entre Garrod (médico) y Bateson (Biólogo) condujo a determinar por primera vez que la alteración de un gen que se heredaba de forma mendeliana provocaba una alteración en una ruta metabólica, de manera, que los individuos con *alcaptonuria* tenían un paso metabólico bloqueado que producía la acumulación del ácido homogentísico o alcapción en su orina. El ácido homogentísico acumulado en su orina se oscurecía al entrar en contacto con el aire y oxidarse. Garrod propuso que este paso metabólico alterado debía ser realizado por un enzima especial que no funcionaría en los individuos afectados o cuyo funcionamiento debía estar alterado. El paso metabólico bloqueado era la conversión del ácido homogentísico en ácido maleilacetoacético y la enzima encargada de realizarlo es la *Oxidasa del ácido homogentísico*.



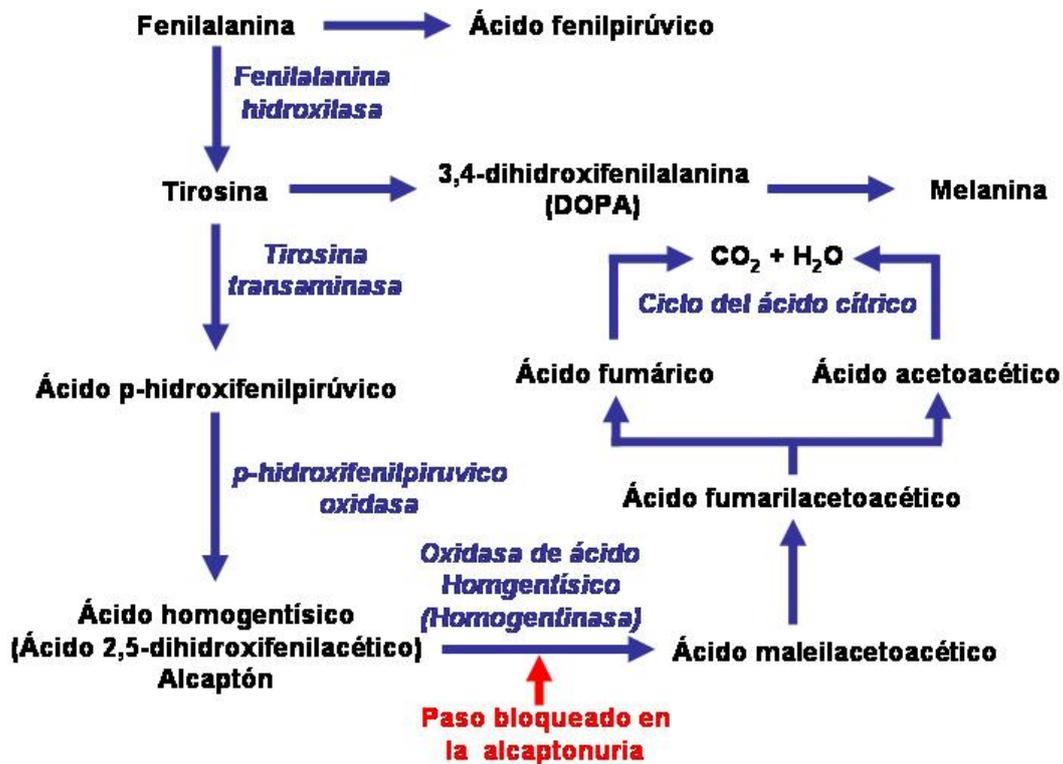
Archibald Garrod



William Bateson

A este tipo de alteraciones enzimáticas determinadas genéticamente Garrod las denominó "errores congénitos del metabolismo". A Garrod se le considera el fundador de la Genética Bioquímica. William Bateson ayudó a Garrod a realizar el análisis genético de otras tres alteraciones del metabolismo: albinismo, cistinuria y pentosuria.

En el siguiente esquema se pueden observar algunas de las alteraciones del metabolismo de la fenilalanina y las enzimas cuyo funcionamiento se ve alterado en cada caso.



Alteraciones del metabolismo de la fenilalanina. Paso bloqueado en la alcaptonuria.

Después de los trabajos de Garrod a principios del siglo XX, los primeros trabajos en Genética Bioquímica se realizaron estudiando los pigmentos responsables de la coloración de las flores y del color de ojos de los insectos. Seguidamente vamos a estudiar más detenidamente dos experimentos que condujeron a la determinación de la Hipótesis "un gen . una enzima".



HIPÓTESIS "UN GEN - UNA ENZIMA": EXPERIMENTOS DE BEADLE Y

EPHRUSSI (1937) Y DE BEADLE Y TATUM (1941).

Los principales experimentos que han conducido a la formulación de la [hipótesis "un gen - una enzima"](#) son los siguientes:

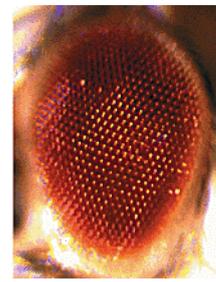
- [Experimentos de Beadle y Ephrussi \(1937\)](#): pigmentación del color de los ojos en *Drosophila melanogaster*, técnica de trasplante de "discos imaginales".
- [Beadle y Tatum \(1941\)](#): estudio de rutas metabólicas utilizando mutantes nutricionales en el moho rojo del pan *Neurospora crassa*.

EXPERIMENTOS DE BEADLE Y EPHRUSSI (1937).

En sus trabajos analizaron 24 mutantes distintos que afectaban al color de los ojos en *D. melanogaster*. El color normal o salvaje de los ojos compuestos de este díptero es rojo oscuro. Este color es el resultado de la mezcla de dos tipos de pigmentos distintos, los pigmentos de color rojo o pterinas y los pigmentos de color marrón u onmocromos. De los 24 mutantes inicialmente utilizados estudiaron más detenidamente dos, el mutante *vermillion* (*v*) y el mutante *cinnabar* (*cn*) con color de ojos bermellón y rojo cinabrio, respectivamente. Ambos mutantes afectaban a la ruta de formación del pigmento marrón o xantomatina.



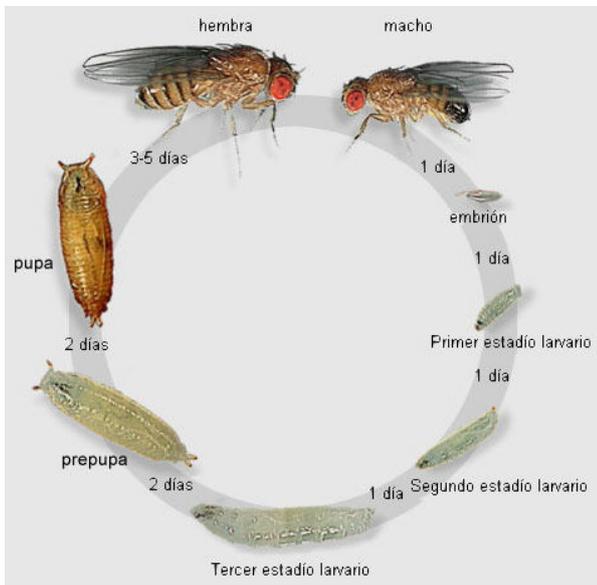
Hembra de *Drosophila melanogaster*



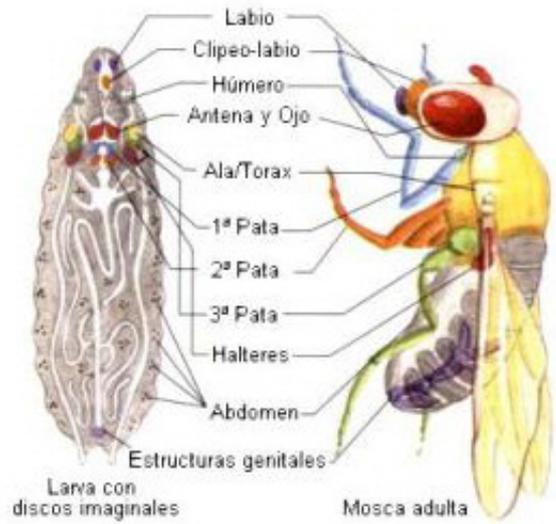
Ojo compuesto de color rojo normal

Para llevar a cabo sus experimentos desarrollaron una técnica de trasplante de "discos imaginales". El desarrollo de *D. melanogaster* en condiciones óptimas de laboratorio puede realizarse entre 12 y 14 días. Las hembras fecundadas de este díptero ponen sus huevos en el medio de cultivo, dos días después sale un larva, cinco días después las larvas se transforman en pupas y en cinco días más emerge una mosca adulta o imago. Durante este proceso de desarrollo el individuo adulto se forma a partir de determinados grupos de células de la larva y el resto de las células de la larva se histolizan. Cada uno de los grupos de células de la larva que están determinados para formar una determinada estructura del individuo adulto se denomina "disco imaginal". Existe un "disco imaginal" para los ojos, otro para el primer par de patas, otro para el segundo par de patas, otro para tórax y alas, etc....

En las siguientes figuras se muestran el ciclo de vida de *D. melanogaster* y las estructuras adultas que se originan a partir de los diferentes "discos imaginales" de la larva.



Ciclo de vida de *D. melanogaster*

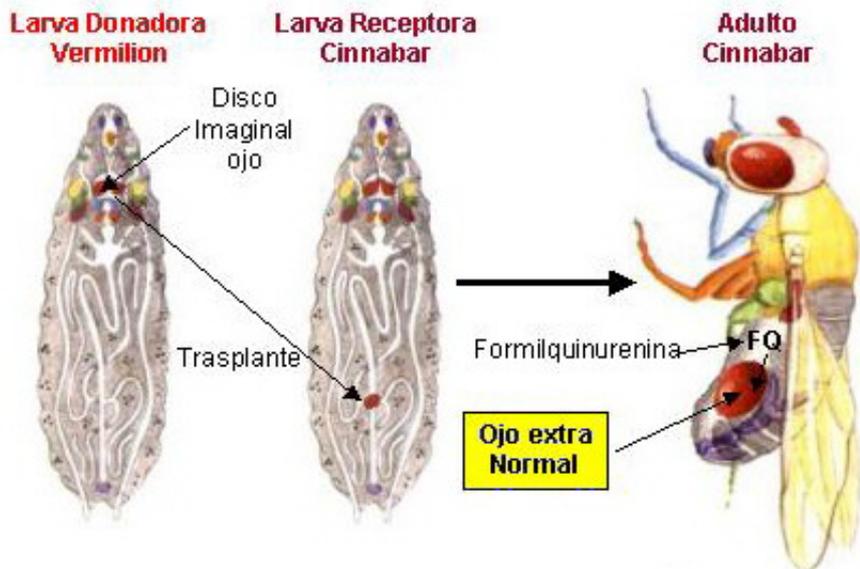


Discos imaginales y estructuras adultas

La técnica que desarrollaron consistió en tomar "*disco imaginal*" de ojo de una larva donadora y trasplantarlo a una larva receptora, en una región de la larva receptora que va a dar lugar al abdomen. Como consecuencia, cuando la larva receptora del injerto termina su desarrollo y se convierte en imago, el adulto resultante tiene un ojo extra o supernumerario en el abdomen.

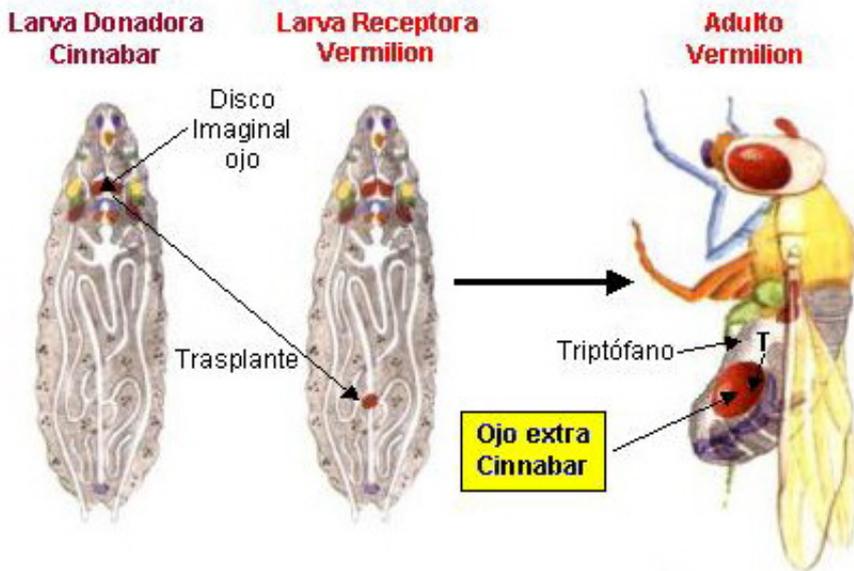
Seguidamente trasplantaron "*disco imaginal*" de ojo de larvas donadoras *vermilion* a larvas receptoras normales y también trasplantaron "*disco imaginal*" de ojo de larvas donadoras *cinnabar* a larvas receptoras normales. En ambos casos, los individuos adultos resultantes presentaban un ojo extra en el abdomen de color normal.

También trasplantaron "*disco imaginal*" de ojo de larvas donadoras *vermilion* a larvas receptoras *cinnabar* y el adulto resultante presentó un ojo extra en el abdomen de color normal. Sin embargo, cuando trasplantaron "*disco imaginal*" de ojo de larva donadora *cinnabar* sobre larva receptora *vermilion*, el adulto resultante tenía un ojo extra en el abdomen de color *cinnabar*.



Ephrussi y Beadle

Trasplante de "*disco imaginal*" *vermilion* sobre larva *cinnabar*



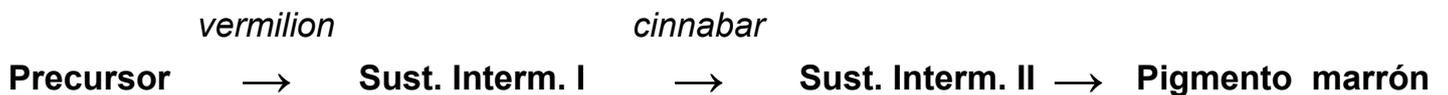
G. Beadle

Trasplante de "disco imaginal" *cinnabar* sobre larva *vermilion*

Beadle y Ephrussi supusieron que los mutantes *vermilion* y *cinnabar* tenían bloqueado algún paso de la ruta que conduce a la formación de los pigmentos del ojo. Además, pensaron que en el abdomen de las larvas receptoras había sustancias que podían difundir hacia las células del "disco imaginal" injertado. Por este motivo, las células de los "discos imaginales" procedentes de los mutantes *vermilión* y *cinnabar* trasplantadas a larvas receptoras normales daban lugar a un ojo extra de color normal. La larva receptora podía suministrar sustancias posteriores al punto de bloqueo de estos mutantes.

Cuando analizaron los trasplantes entre *vermilion* y *cinnabar*, vieron que el abdomen de la larva receptora *cinnabar* podía suministrar al "disco imaginal" de ojo *vermilion* una sustancia posterior a su punto de bloqueo, de manera que este podía proseguir la ruta y producir el pigmento marrón, apareciendo un ojo extra normal. Sin embargo, las células del abdomen de la larva receptora *vermilion* no pueden suministrar al "disco imaginal" de ojo de *cinnabar* una sustancia posterior a su punto de bloqueo, de forma que no puede proseguir en la ruta y el ojo extra es *cinnabar*.

Como conclusión indicaron que el mutante *vermilión* bloqueaba la ruta de formación del pigmento marrón en un punto anterior al del bloqueo del mutante *cinnabar*. La ruta propuesta para la formación del pigmento marrón fue la siguiente:



En trabajos posteriores llegaron a la conclusión de que el precursor de la ruta era Tryptófano, la sustancia intermedia I era Formilquinurerina, la sustancia intermedia II era Hidroxiquinurerina y el pigmento final marrón era la xantomatina.



Por tanto, la mutación *vermilión* bloqueaba el paso entre triptófano y formilquinurenina, mientras que la mutación *cinnabar* bloqueaba entre formilquinurenina e hidroxiquinurenina.

↑ Inicio

EXPERIMENTOS DE BEADLE Y TATUM (1941).

Beadle y Tatum estudiaron mutantes nutricionales del moho rojo del pan (*Neurospora crassa*).

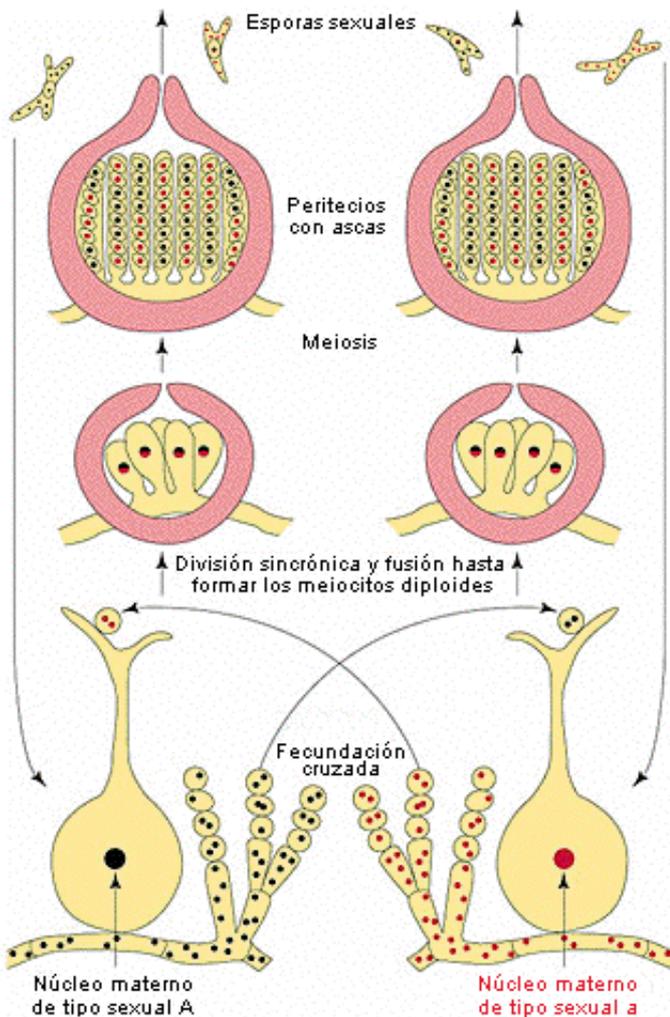


Neurospora crassa: moho anaranjado del pan.



Hifas vegetativas y esporas asexuales a la izquierda, ascas con esporas sexuales a la derecha. *Neurospora crassa*

Antes de comenzar con los experimentos realizados por Beadle y Tatum creo que es conveniente repasar el ciclo biológico de *Neurospora crassa*, organismo haploide.

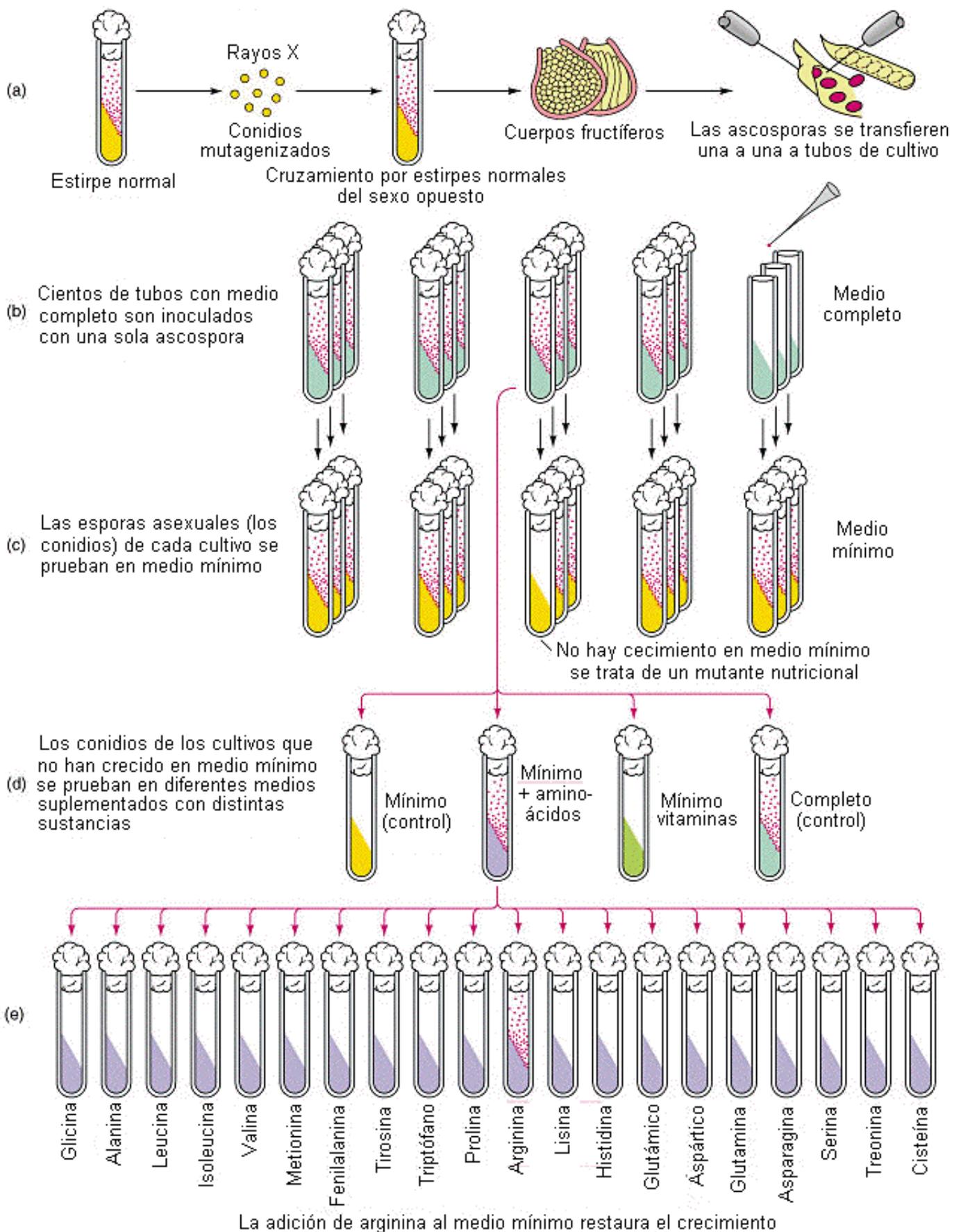


Neurospora crassa es un organismo haploide, con un solo juego de cromosomas, que en un determinado momento de su ciclo vital pasa por un estado diploide, con dos juegos de cromosomas, y sufre la meiosis para originar las esporas sexuales. Es un organismo multicelular en el que las células se unen por sus extremos para formar cadenas de células o hifas. Las hifas penetran en el sustrato y también envían ramas aéreas que contienen unas células llamadas conidios (esporas asexuales). Las esporas sexuales o ascosporas son expulsadas por el cuerpo fructífero o peritecio de manera que cada una de ellas puede originar por mitosis un nuevo individuo (hifas). Las esporas asexuales se desprenden o dispersan para formar nuevas colonias o, alternativamente, actúan como gametos masculinos. La autofecundación no es posible en esta especie. Existen dos tipos sexuales determinados por los alelos A y a de un gen. Un cruzamiento solamente puede tener éxito si es del tipo A x a. Una espora asexual del sexo opuesto se fusiona con un pelo receptivo, y el núcleo haploide de la espora desciende por el pelo hasta emparejarse con un núcleo haploide del nódulo. Seguidamente los núcleos emparejados sufren una serie de divisiones sincrónicas y finalmente se fusionan los núcleos y aparecen los meiocitos diploides. Estos meiocitos sufren la meiosis y dan lugar a las ascas que contienen las ascosporas (esporas sexuales).

Los mutantes nutricionales son incapaces de crecer en *medios mínimos*, mientras que las cepas normales de *Neurospora* pueden crecer en *medios mínimos* que contienen sustancias simples como azúcar, algunas sales y ácidos orgánicos, una fuente de nitrógeno (nitrato y tartrato amónicos) y la vitamina biotina. Las estirpes mutantes nutricionales incapaces de vivir en *medio mínimo* también se las denomina cepas *auxótrofas*. Las cepas mutantes nutricionales necesitan para poder crecer que se añadan al *medio mínimo* determinadas sales, vitaminas, aminoácidos u otras sustancias. Los medios mínimos a los que se les ha añadido alguna sustancia se les denomina *medios suplementados*. Todas las cepas mutantes son capaces de crecer en *medios completos* que contienen todos los compuestos anteriormente citados.

Desarrollaron un método de enriquecimiento de mutantes para obtener gran cantidad de estirpes con mutaciones en diferentes pasos de las rutas metabólicas que consistía en irradiar las esporas de *Neurospora crassa* con luz ultravioleta o con rayos X para producir mutaciones. Las esporas irradiadas se hacían crecer en un *medio mínimo*. En dicho medio solamente crecen aquellas esporas que carezcan de alteraciones en las rutas metabólicas, es decir, las esporas normales (*prototrofas*), mientras que las esporas mutantes *auxótrofas* no generan hifas. Después, de haberlas dejado crecer en el *medio mínimo* se pasan a través de una malla o tamiz que retiene a las esporas normales (las que han generado hifas) y deja pasar a las mutantes que no han generado hifas. De esta forma tan simple conseguían separar las esporas normales de las mutantes.

Seguidamente, cada espora se ponía a crecer en un *medio completo* y se cruzaba por una estirpe normal. Estudiaban el tipo de herencia y comprobaban que la alteración de la cepa mutante se debía a un gen con herencia mendeliana, y además conseguían obtener en la descendencia una gran cantidad de esporas mutantes con la misma alteración, con el mismo paso metabólico bloqueado.



El siguiente paso consistía en averiguar el paso metabólico bloqueado de cada estirpe mutante. Para ello tomaban esporas individuales (normales y mutantes) descendientes de los cruzamientos y las crecían en primer lugar en *medio completo* para multiplicarlas, a continuación replicaban las muestras en *medio mínimo* (solo crecen las normales), identificando como mutantes las cepas que no crecen en el medio mínimo. Las estirpes mutantes se sembraban a continuación en *medio mínimo*, en medio mínimo suplementado con todos los

aminoácidos, en medio mínimo suplementado con todas las vitaminas y en *medio completo*. De esta manera identifican si el paso bloqueado pertenecía a alguna ruta de síntesis de aminoácidos o de vitaminas. Si la estirpe mutante solo crecía en el medio completo y en el suplementado con todos los aminoácidos, deducían que el bloqueo se encontraba en alguna ruta de síntesis de aminoácidos. Posteriormente, crecían la cepa mutante en *medio mínimo* y en medios suplementados con cada uno de los 20 aminoácidos. Así identificaban el aminoácido que no podían sintetizar y que necesitaban para crecer. Una vez identificado el aminoácido probaban otras sustancias relacionadas con él. Por ejemplo, Beadle y Tatum encontraron tres mutantes distintos que necesitaban para crecer arginina (*arg1*, *arg2* y *arg3*) y probaron si eran capaces de crecer en medios suplementados con ornitina y citrulina (compuestos relacionados con la arginina). Comprobaron que el mutante *arg1* necesitaba para crecer o bien arginina, o bien ornitina o bien citrulina. El mutante *arg2* sólo podía crecer o con ornitina o con arginina pero no crecía cuando se añadía citrulina. El mutante *arg3* solamente crecía cuando se suplementaba con arginina.

Para resolver esta situación supusieron que cada mutante tenía un paso metabólico bloqueado distinto. Supusieron que cuando se suplementa el medio mínimo con un compuesto posterior al punto de bloqueo el mutante puede producir el compuesto final y crecer, mientras que si se suplementa con un compuesto anterior al punto de bloqueo no puede crecer. Igualmente, razonaron que cuantos más mutantes crecían con un determinado compuesto de la ruta, tanto más hacía el final de la ruta debería estar el compuesto añadido. De la misma forma, cuantos menos mutantes crecen con una sustancia tanto más hacia el principio de la ruta estará esa sustancia. La tabla de crecimiento obtenida con los mutantes que afectaban a la síntesis de arginina fue la siguiente:

Crecimiento de las cepas mutantes en respuesta a distintas sustancias			
	Suplemento: sustancia añadida al medio mínimo		
Estirpe mutante	Ornitina	Citrulina	Arginina
<i>arg1</i>	+	+	+
<i>arg2</i>	-	+	+
<i>arg3</i>	-	-	+

+ = crecimiento, - = no crecimiento

Llegaron a la siguiente conclusión, la arginina debe ser el compuesto final de la ruta ya que los tres mutantes crecen cuando se añade al medio mínimo. La citrulina debe ser anterior a la arginina, ya que hay dos mutantes que crecen con ella, mientras que la ornitina debe ser anterior a citrulina ya que solamente un mutante crece cuando se añade. El primer compuesto de la ruta sería un precursor. El mutante *arg3* debe estar bloqueado entre citrulina y arginina, ya que crece con un compuestos posteriores al bloqueo (arginina) pero no lo hace con los anteriores (citrulina y ornitina). El mutante *arg2* debe estar bloqueado entre ornitina y citrulina pues crece con los compuestos posteriores (citrulina y arginina) pero no crece con los anteriores (ornitina). Por último, el mutante *arg1* debe estar bloqueado en un paso anterior a ornitina, ya que crece con todas las sustancias posteriores (ornitina, citrulina y arginina).

arg1
arg2
arg3
 Precursor → Ornitina → Citrulina → Arginina



Beadle y Tatum recibieron el Premio Nobel en 1958 por sus trabajos con los mutantes

nutricionales de *Neurospora crassa* y por la formulación de la Hipótesis "un gen - una enzima".



George W. Beadle



Edward L. Tatum

El estudio de las rutas metabólicas desde el punto de vista genético responde a los siguientes principios básicos:

- El bloqueo de una reacción o paso de una ruta metabólica, por falta del enzima o fallo en el funcionamiento del enzima que controla ese paso, produce la acumulación en las células del compuesto inmediatamente anterior al paso alterado.
- El suministro de una sustancia o compuesto posterior al paso metabólico bloqueado permite que el individuo mutante supere el bloqueo y pueda completar la ruta, llegando a fabricar el producto final.
- Cuantos más mutantes crecen con un determinado compuesto, tanto más hacia el final de la ruta estará el compuesto añadido.
- Cuantos menos mutantes crecen con una sustancia tanto más hacia el principio de la ruta estará esa sustancia.

La Hipótesis "un gen - una enzima" dice que existe una relación entre los genes y las enzimas que gobiernan los pasos metabólicos, de manera que la alteración en un gen produce el bloqueo de un determinado paso metabólico que está controlado por un enzima. Faltaba por determinar si la relación entre los genes y las enzimas es de tipo informacional, es decir, el gen contiene la información para producir el enzima que actúa en el paso metabólico alterado, o si la relación entre el gen y la enzima consiste simplemente en que el gen permite o impide el funcionamiento de una determinada enzima pero sin llevar información para ella.

La hipótesis "un gen-una enzima" se basa en el siguiente modelo de relación entre el genotipo (los genes) y el fenotipo (rasgos característicos de un individuo).

- Los rasgos característicos de un individuo están determinados por el fenotipo de las distintas partes que lo componen.
- El fenotipo de las distintas partes que componen un individuo está determinado a su vez por el fenotipo de sus células.
- Las características de una célula (su fenotipo) a su vez están producidas por su metabolismo interno, que está controlado por las enzimas que intervienen en los distintos pasos metabólicos.
- La función de las enzimas depende de su estructura tridimensional que está determinada por su estructura primaria o secuencia de aminoácidos.
- Las proteínas estructurales y las enzimas de las células están determinadas por el genotipo (los genes) de las células.

- Los genes son los responsables (llevan la información) para la secuencia lineal de aminoácidos de las proteínas y enzimas, determinando en última instancia y a través de su interacción con el ambiente los fenotipos (rasgos característicos de un organismo).



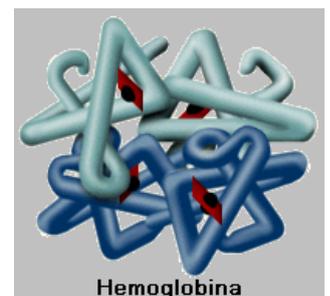
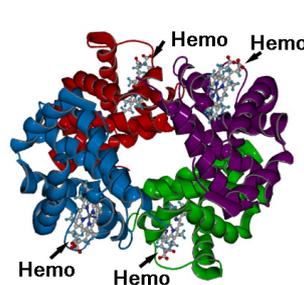
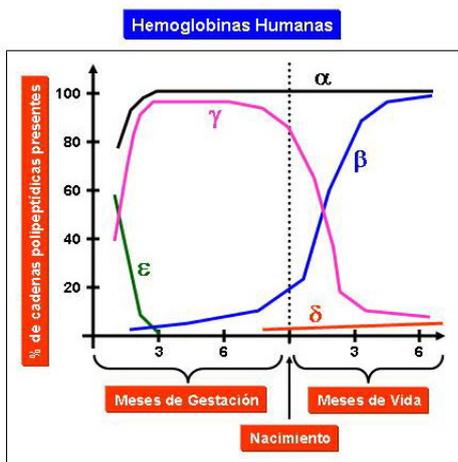
LA RELACIÓN ENTRE LOS GENES Y LAS ENZIMAS ES DE TIPO INFORMACIONAL. LAS HEMOGLOBINAS HUMANAS.

La demostración de que la relación entre los genes y las enzimas es de tipo informacional, es decir, el gen lleva la información o codifica para una enzima, tardó varios años en realizarse. Una buena parte de estos trabajos se realizaron estudiando las hemoglobinas humanas, por lo que antes de comenzar con estos trabajos vamos a repasar las hemoglobinas humanas.

Las hemoglobinas humanas son tetrámeros, están formados por cuatro cadenas polipeptídicas. Los glóbulos rojos contienen varios tipos de hemoglobinas:

- Hemoglobina adulta mayoritaria (HbA): $\alpha_2\beta_2$ formada por dos cadenas de tipo α (141 aminoácidos) y dos cadenas de tipo β (146 aminoácidos).
- Hemoglobina adulta minoritaria (HbA₂): $\alpha_2\delta_2$ formada por dos cadenas de tipo α y dos cadenas de tipo δ (146 aminoácidos). La secuencia de aminoácidos de δ difiere solamente en 10 residuos con la cadena β . Constituye el 2,5% de la hemoglobina adulta y se encuentra junto con la hemoglobina HbA.
- Hemoglobina fetal (HbF): $\alpha_2\gamma_2$ formada por dos cadenas de tipo α y dos cadenas de tipo γ (146 aminoácidos). La cadena γ difiere en 39 aminoácidos con la cadena β y en 41 aminoácidos con la cadena δ . Constituye entre el 70 y el 80% de la hemoglobina total del recién nacido y desaparece entre los 6 y 12 meses de vida extrauterina.
- Hemoglobinas embrionicas (HbE): pueden tener cuatro cadenas ϵ (ϵ_4), dos cadenas α y dos ϵ ($\alpha_2\epsilon_2$) o bien dos cadenas γ y dos ϵ ($\gamma_2\epsilon_2$). Se encuentran en el desarrollo embrionario, aunque ocasionalmente pueden aparecer en el período fetal.

En la siguiente gráfica se muestran los momentos del desarrollo en los que se sintetizan los diferentes tipos de cadenas polipeptídicas de las hemoglobinas y la estructura cuaternaria tetrámerica que poseen.



Síntesis de las cadenas de las hemoglobinas

Estructura de la hemoglobina: tetrámeros

La similitud de las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas α , β , γ , y δ sugiere un origen común de los genes que las codifican a partir de una secuencia ancestral mediante el mecanismo de duplicación.

La anemia falciforme es una enfermedad con herencia autosómica recesiva en la que los individuos afectados presentan glóbulos rojos en forma de hoz (falciformes). Esta enfermedad también recibe el nombre de *drepanocitosis*. Las personas enfermas presentan crisis hemolíticas (destrucción de glóbulos rojos), ulceraciones en las piernas, hepatosplenomegalia (hígado y bazo excesivamente grandes) y hematuria (sangre en la orina).



Glóbulo rojo falciforme (forma de hoz)



Glóbulos rojos normales y falciformes



Úlcera en el pie de una persona afectada

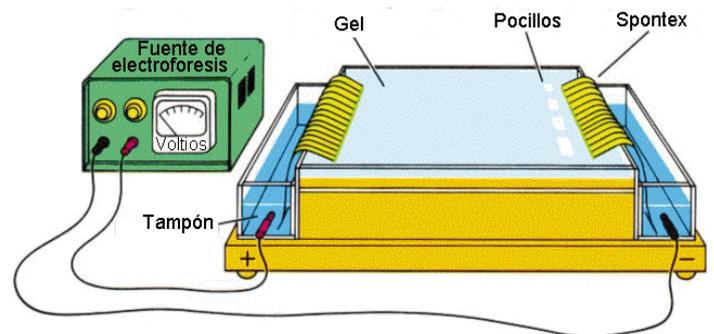


Niño con esplenomegalia

Pauling y colaboradores en 1949 encontraron que la hemoglobina adulta mayoritaria de los individuos que padecían *anemia falciforme* se podía distinguir mediante electroforesis de la hemoglobina de los individuos sanos. Dicho resultado indicaba que diferían en sus propiedades físicas y, por tanto, probablemente diferían en su estructura. La técnica de electroforesis permite separar las moléculas, entre otras las proteínas, haciéndolas migrar en un campo eléctrico. En estas condiciones las proteínas se separan en base a su tamaño y carga eléctrica.



Eritrocitos en forma de hoz y normales de una persona sana heterocigótica



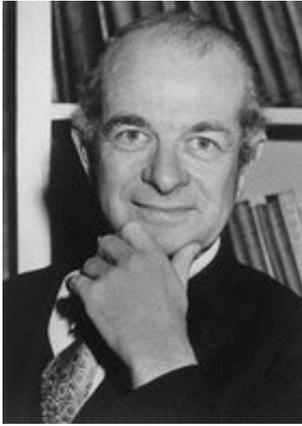
Técnica de electroforesis: permite separar las hemoglobinas en un campo eléctrico

Neel (1949) y Beet (1949) demostraron que la *anemia falciforme* tenía una herencia de tipo autosómico recesivo, de manera que los individuos enfermos eran homocigóticos recesivos y los individuos sanos que presentaban glóbulos rojos falciformes y normales eran heterocigóticos.

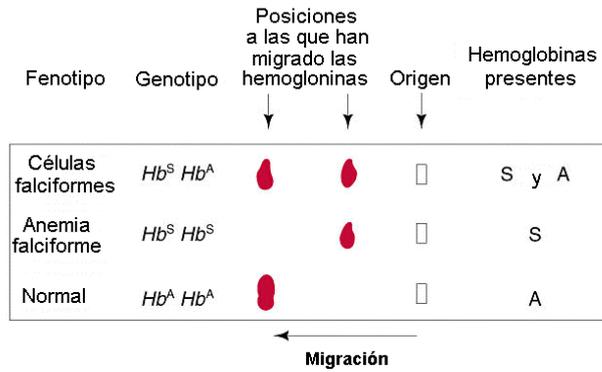
Pauling y colaboradores encontraron utilizando la técnica de electroforesis que los individuos sanos que tenían glóbulos rojos en forma de hoz (falciformes) y glóbulos rojos normales tenían dos tipos de hemoglobinas, hemoglobina normal (HbA) y hemoglobina falciforme (HbS). Estos individuos eran heterocigotos. Mientras que los individuos con anemia falciforme (homocigóticos recesivos) solo tenían hemoglobina falciforme (HbS) y los individuos sanos sin glóbulos rojos falciformes solamente tenían hemoglobina normal (HbA) y eran homocigóticos dominantes.

En la siguiente figura se muestra un esquema de los resultados obtenidos al separar mediante electroforesis las hemoglobinas de diferentes individuos sanos homocigóticos (*HbAHbA*), sanos

heterocigóticos (*HbA^hS*) y enfermos homocigóticos (*HbS^hS*).



Linus Pauling



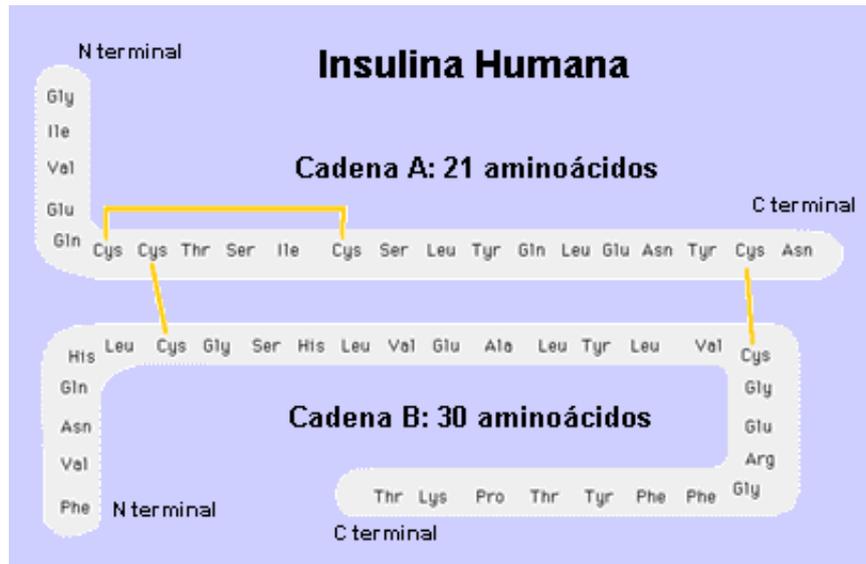
Los enfermos poseen hemoglobina S, los sanos homocigóticos tienen hemoglobina A, y los sanos heterocigóticos tienen hemoglobinas A y S.

Separación de las hemoglobinas mediante electroforesis

Estudios realizados por Sanger en 1955 con la *insulina* pusieron de manifiesto que las propiedades específicas de las proteínas estaban determinadas por su estructura primaria o secuencia de aminoácidos. Sanger además desarrolló las técnicas de secuenciación de proteínas y determinó la secuencia de aminoácidos de la *insulina* humana.



Frederick Sanger



Secuencia de aminoácidos de la Insulina humana

Pauling recibió el Premio Nobel en 1954 por sus investigaciones sobre la naturaleza de los enlaces químicos y su aplicación en la elucidación de la estructura de las sustancias complejas. También recibió el otro Premio Nobel de la Paz en 1962 por su lucha contra el desarrollo de las armas nucleares.

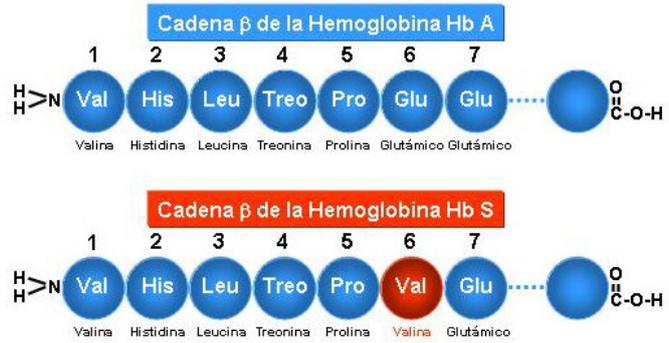
Sanger recibió el Premio Nobel en 1958 por sus investigaciones sobre la estructura de las proteínas, especialmente de la insulina. En 1980 recibió otro Premio Nobel por sus contribuciones a la determinación de las secuencias de bases en los ácidos nucleicos.

Por último, en 1956 Ingram demostró mediante técnicas de secuenciación de proteínas, que la diferencia entre la hemoglobina normal (*HbA*) y la hemoglobina falciforme (*HbS*) se debía solamente al un aminoácido situado en la posición sexta de la cadena β de las hemoglobinas, dicho aminoácido es ácido glutámico en la *HbA* mientras que en la *HbS* es valina. Por consiguiente, se trata de un cambio de un aminoácido ácido por un aminoácido neutro, lo que provoca un cambio en la estructura primaria de la cadena β y en la carga eléctrica neta de la hemoglobina. Este cambio es el responsable de la diferente migración electroforética observada entre las hemoglobinas A y S.

La siguiente figura muestra la secuencia de los primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de la cadena β de las hemoglobinas A y S.



Ingram a la izquierda



Secuencia de aminoácidos de la cadena b de las hemoglobinas HbA y HbS

Por consiguiente, Ingram (1956) demostró que una alteración en un gen con herencia autosómica recesiva en la especie humana, producía una alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína (hemoglobina), de forma que la relación entre los genes y las enzimas era de tipo informacional, un gen llevaba información o codificaba para una enzima.



ENFERMEDADES HUMANAS PRODUCIDAS POR ALTERACIONES EN EL METABOLISMO

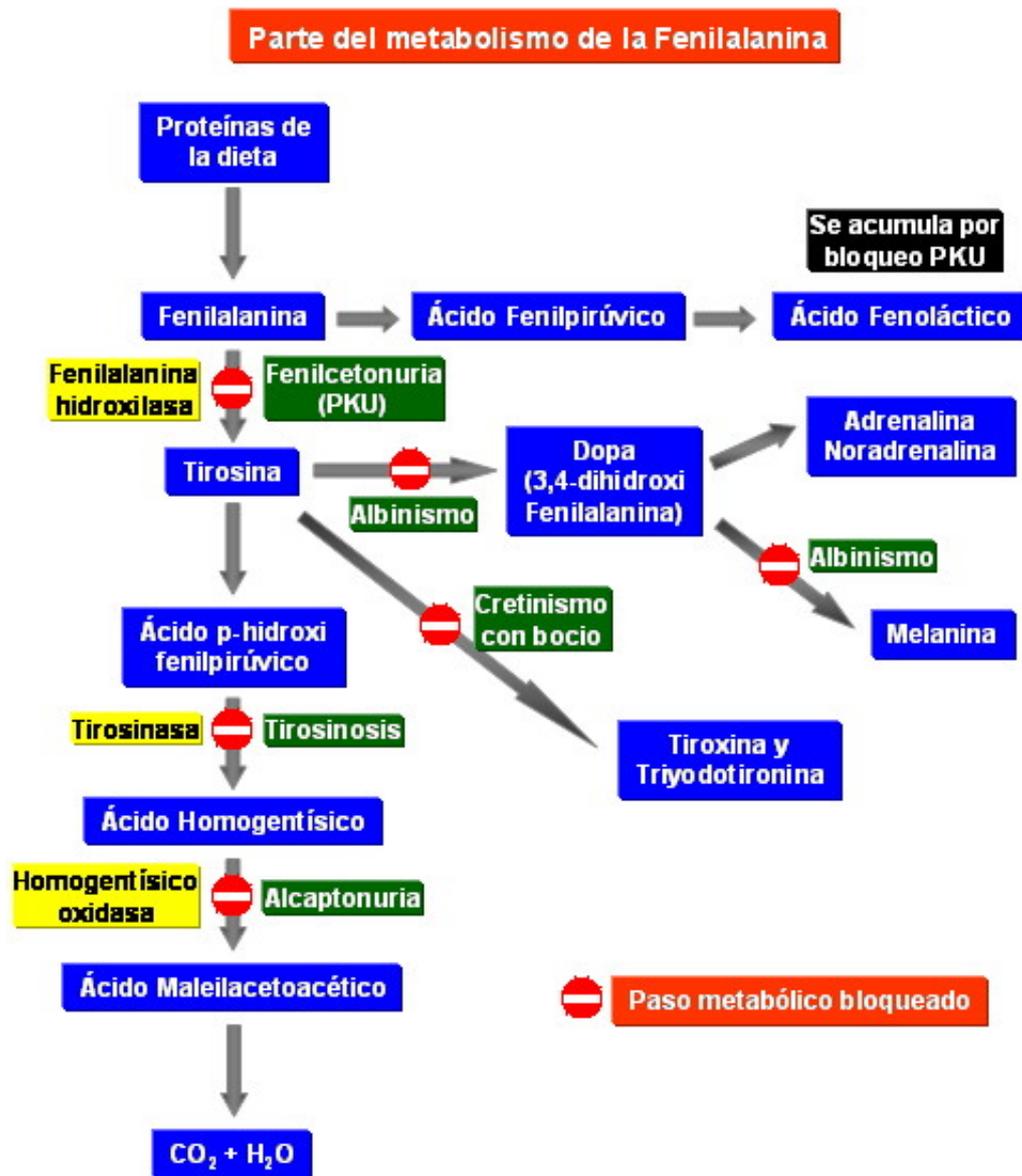
Existen muchas enfermedades que se producen por fallos en las enzimas que actúan en distintas pasos del metabolismo. A dichas alteraciones Garrod las denominó "errores congénitos del metabolismo". Cada paso metabólico esta controlado por un enzima y a su vez cada enzima está codificada por un gen. Una alteración en un gen tiene como lugar una alteración en el enzima correspondiente y el fallo de un paso metabólico determinado.

Existen muchos ejemplos de enfermedades humanas producidas por alteraciones en genes que codifican enzimas que intervienen en el metabolismo. En el siguiente cuadro se indican algunos de estos ejemplos.

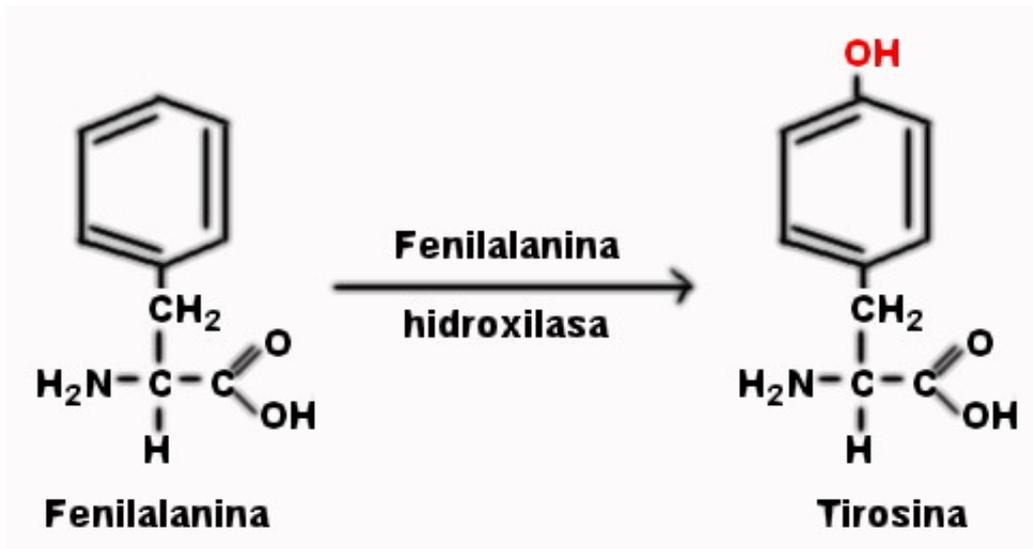
Enfermedad	Enzima afectada	Enfermedad	Enzima afectada
Acatasia	Catalasa	Enfermedad de Sandhoff (Gangliosidosis GM ₂ , tipo II)	Hexosaminidasa A y B
Aciduria arginosuccínica	Arginosuccinasa	Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A
Albinismo	Tirosinasa	Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida
Alcaptonuria	Oxidasa de ácido homogentísico	Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Apnea inducida por medicamentos	Pseudocolinesterasa	Galactosemia	Galactosa 1-fosfato uridil transferasa
Argininemia	Arginasa	Gangliosidosis GM1, tipo II (forma juvenil)	β-galatosidasa B, C
Ataxia, intermitente	Piruvato descarboxilasa	Granulomatosis	Oxidasa de NADPH reducido
Citrulemia	Arginosuccínico sintetasa	Hidroxirolinemia	Oxidasa de hidroxirolina
Cistationuria	Cistationasa	Hiperlisinemia	Reductasa de la lisina-cetoglutarato

Enfermedad de Krabbe	β -galactosidasa de la galatosilceramida	Hipofosfatasa	Fosfatasa alcalina
Enfermedad orina con olor a jarabe de arce	Cetoácido decaroxilasa	Ornitinemia	Aminotransferasa del cetoácido de la ornitina
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Pentosuria	Deshidrogenasa de xilitol (reductasa de la L-xilulosa)
Enfermedad de Refsum	Oxidasa del ácido fitánico	Síndrome de Crieger-Najjar	Transferasa de glucoronilo

En la siguiente figura se indican algunos de los pasos metabólicos bloqueados en el metabolismo de la fenilalanina.



La *fenilcetonuria* (PKU) o *idiotez fenilpirúvica* se debe a una alteración de la enzima fenilalanina hidroxilasa que convierte la fenilalanina en tirosina. Presenta un tipo de herencia autosómico recesivo. El bloqueo de este paso hace que la ruta se desvíe hacia la síntesis de ácido fenilpirúvico.

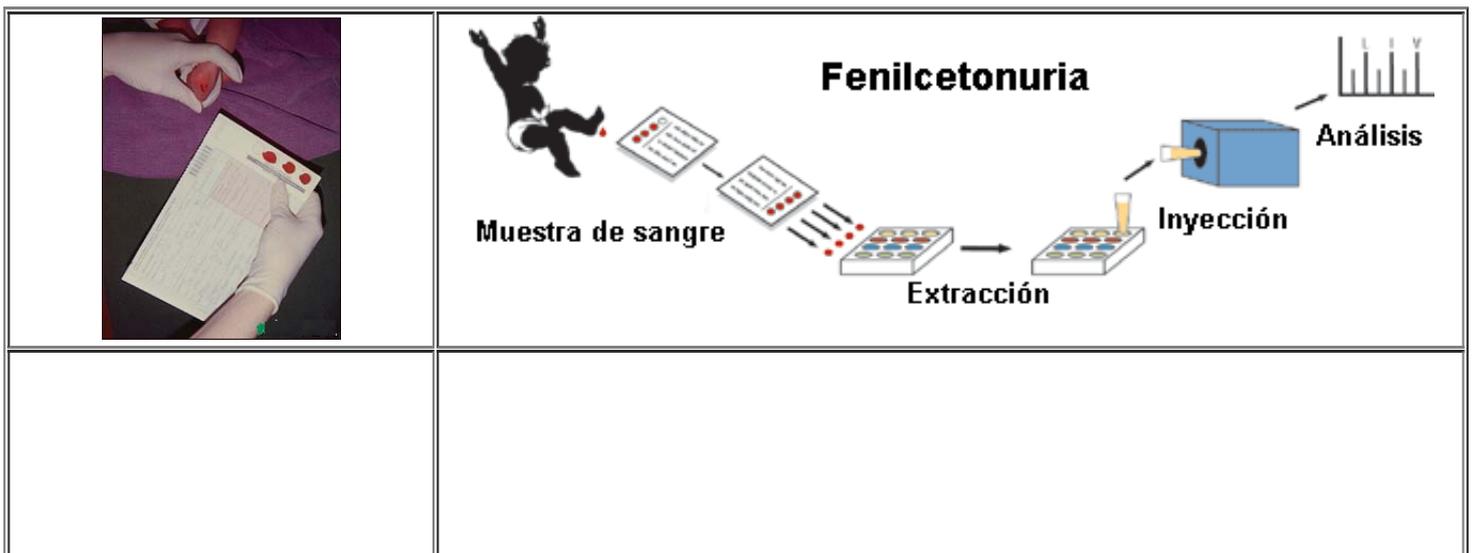


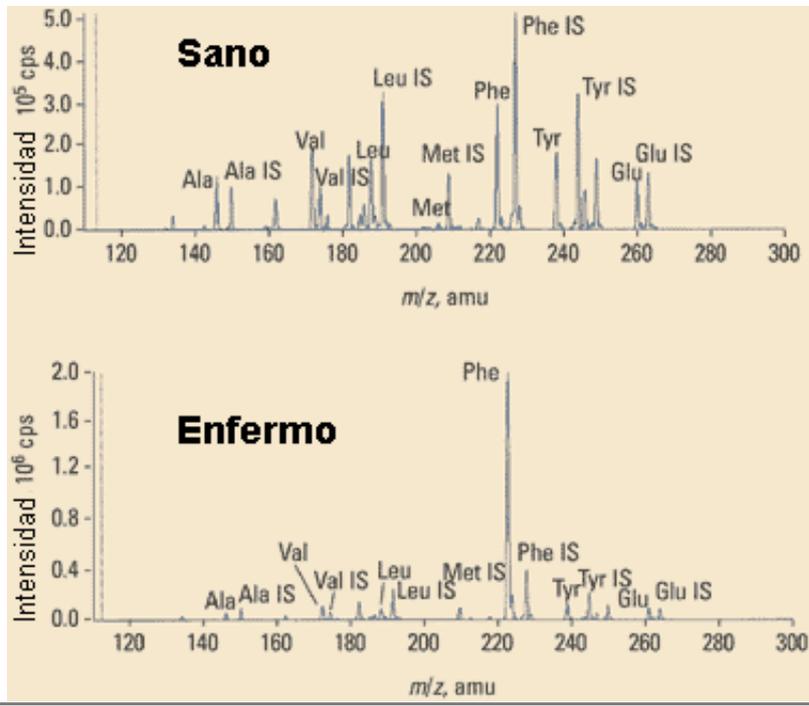
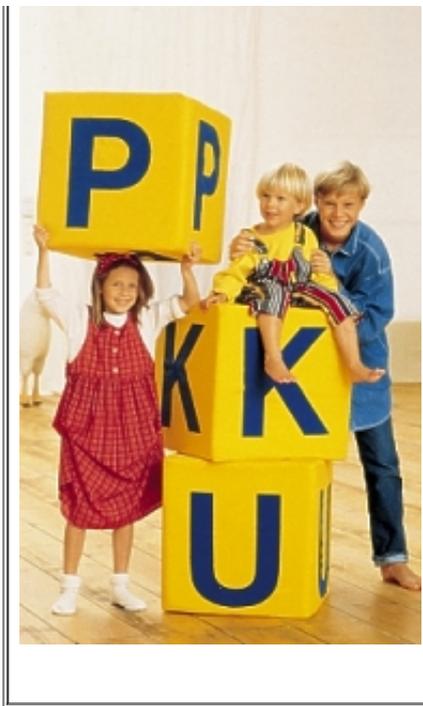
Paso metabólico bloqueado en la Fenilcetonuria (PKU)

Los individuos afectados tienen problemas neurológicos variados, como exaltación de los reflejos, crisis convulsivas y retraso mental. Además, el color de su piel es más claro que el de sus hermanos, ya que la melanina es uno de los productos de la vía metabólica interrumpida. Las consecuencias de esta enfermedad se deben a la acumulación de fenilalanina y ácido fenilpirúvico. La acumulación de fenilalanina durante el desarrollo del cerebro interrumpe la captación de otros aminoácidos como tirosina, leucina, isoleucina, valina, triptófano, histidina y metionina. Este desequilibrio en las concentraciones de aminoácidos produce lesiones cerebrales, retraso mental y los síntomas neurológicos asociados. Los recién nacidos con PKU no están afectados ya que el exceso de fenilalanina ha sido metabolizado por las enzimas de la madre. Los lactantes se vuelven retrasados cuando se les alimenta con una dieta normal. Sin embargo, si se controla la fenilalanina de la dieta se evita el retraso mental y las lesiones del resto del sistema nervioso, desarrollándose de manera bastante normal.

Hoy día, en los países desarrollados se realizan pruebas a todos los recién nacidos para comprobar si están afectados por la fenilcetonuria. La incidencia de esta enfermedad es de 1 cada 12.000 nacimientos. Se toma una pequeña muestra de sangre, unas gotas del talón de los recién nacidos, que se depositan en un papel de filtro y después se analiza si existen elevados niveles de fenilalanina.

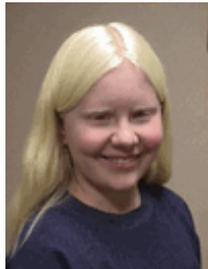
En la siguiente figura se observa la toma de unas gotas de sangre del talón de un recién nacido, el análisis posterior de las muestras recogidas en el papel, y el resultado del análisis de aminoácidos en un individuo sano y en otro afectado por la enfermedad. Se puede observar que el individuo afectado posee una cantidad excesiva de fenilalanina.





El albinismo es otra de las alteraciones más conocidas y que se debe a un fallo en el enzima tirosinasa que actúa en dos pasos metabólicos, en el paso de tirosina a DOPA y en el paso de DOPA a dopaquinina, un precursor de la melanina. La forma más frecuente de albinismo en la especie humana es el *albinismo oculocutáneo* (AOC), que tiene una herencia autosómica recesiva y que tiene como consecuencia la ausencia el pigmento (melanina) en la piel., el pelo y los ojos.

El albinismo aparece en una gran cantidad de especies distintas. En la siguiente figura aparecen casos de albinismo en la especie humana, en pájaros, gorilas, serpientes, pingüinos y gatos.



Niña albina



Ojos de albina



Negro albino



Pajaro albino



Gorila albino



Boa albina



Gato albino



Pinguino albino

El cretinismo con bocio es otra de las enfermedades hereditarias del metabolismo de la fenilalanina. La ruta de la tirosina conduce a la formación de tiroxina y triyodotironina, el bloqueo de esta ruta produce el cretinismo con bocio. El recién nacido no está afectado por esta enfermedad debido a que las hormonas tiroideas de la madre atraviesan la placenta, pero pocas semanas después el desarrollo se hace lento, aparece retraso mental y la glándula tiroides aumenta mucho de tamaño. Esta alteración se produce por la ausencia del producto final de la ruta, una hormona, no se debe a la acumulación de un metabolito intermediario. Esta

enfermedad se puede tratar suministrando el producto final a los afectados, la hormona tiroidea de origen animal.

 Inicio

HIPÓTESIS DE LA SECUENCIA (CRICK 1958)

En 1958, basándose en los siguientes experimentos previos, Francis Crick formuló la Hipótesis de la secuencia:

Relación gen-proteína:

- Beadle y Ephrussi (1937): trasplante de discos imaginales de ojo en *D. melanogaster*.
- Beadle y Tatum (1941): estudio de mutantes nutricionales en *Neurospora crassa*. Hipótesis "un gen - una enzima".
- Pauling (1949): hemoglobinas normal y falciforme.
- Neel (1949) y Beet (1949): herencia autosómica recesiva de la anemia falciforme.

Especificidad funcional de las proteínas:

- Sanger (1955): las propiedades específicas de la insulina residen en su estructura primaria (secuencia de aminoácidos).
- Ingram (1956, 1957): La diferencia entre la HbA y la HbS se debe a un cambio de un solo aminoácido de la posición sexta de la cadena β .

Comparación de las estructuras de los genes y de las proteínas:

- Avery y colaboradores (1944): El ADN es el material hereditario en bacterias. Los genes son ADN.
- Watson y Crick (1953): Modelo de la Doble Hélice. La información reside en la secuencia de nucleótidos.

Hipótesis de la secuencia (Crick, 1958) propone lo siguiente: "Existe una relación entre la ordenación lineal de los nucleótidos en los ácidos nucleicos (ADN) y la ordenación lineal de los aminoácidos en las proteínas".

La hipótesis de la secuencia fue admitida inmediatamente por la comunidad científica a pesar de que no estaba demostrada.

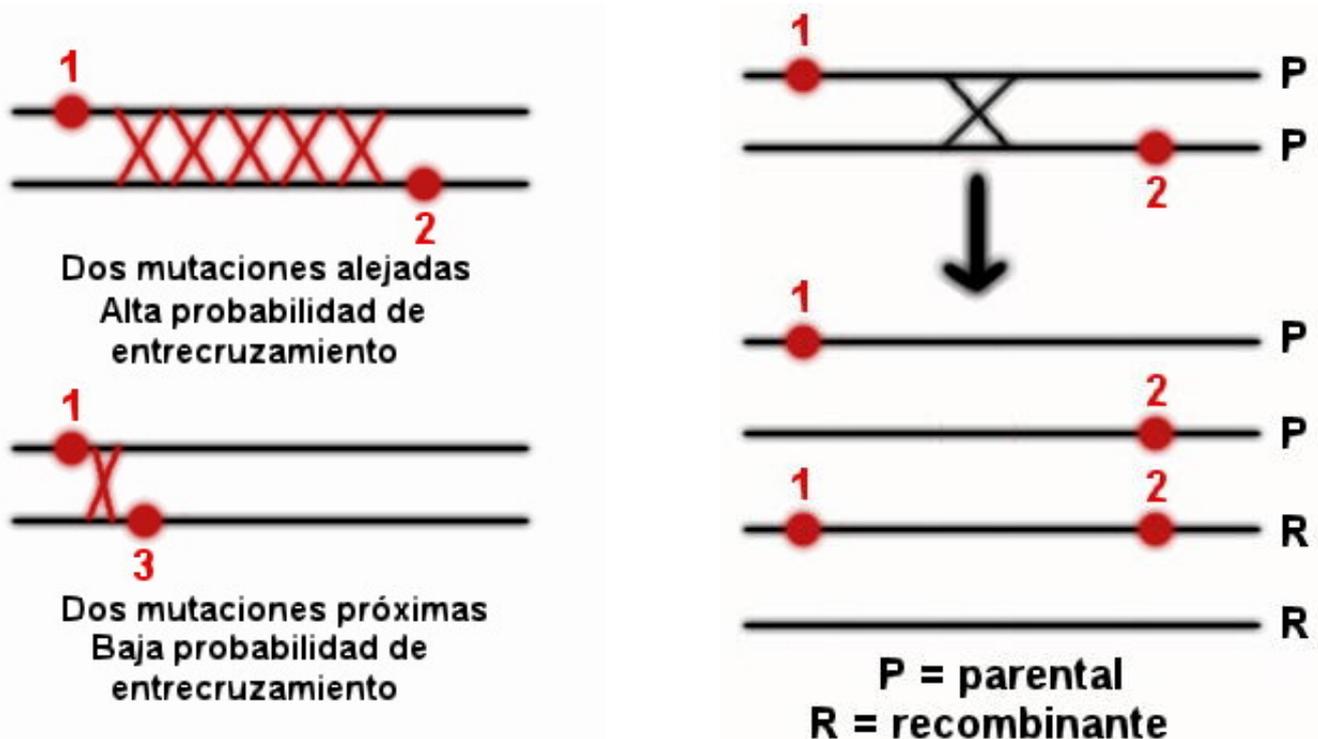
 Inicio

DEMOSTRACIÓN DE LA HIPÓTESIS DE LA SECUENCIA: PRINCIPIO DE COLINEALIDAD (YANOFSKY Y COL., 1964, SARABHAI Y COL. 1964).

La demostración de la hipótesis de la secuencia se realizó varios años después de su formulación por Crick, en 1964 dos grupos de investigación publicaron resultados que la confirmaban. La demostración de la hipótesis de la secuencia se ha denominado "Principio de colinealidad".

La demostración de la hipótesis de la secuencia requiere comparar la secuencia de nucleótidos en el ADN con la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Sin embargo, en la época en que se formuló aún no se habían desarrollado las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos, por tanto, fue necesario utilizar un sistema diferente para comparar los cambios o mutaciones en el ADN con los cambios en la proteína. Lo que si se podía hacer en aquella época era construir un mapa genético de las mutaciones en el ADN.

Los mapas genéticos permiten ordenar las mutaciones en el ADN y averiguar la distancia genética a la que se encuentran dos mutaciones. La distancia genética no es una distancia física en pares de bases, pero está íntimamente relacionada con la distancia física. La distancia genética se basa en la frecuencia con la que aparecen recombinantes (individuos con nuevas combinaciones) entre los descendientes de un cruzamiento, de manera que cuanto más alejadas están entre sí dos mutaciones en el ADN mayor es la frecuencia de entrecruzamiento entre ellas y mayor la frecuencia de descendientes recombinantes (con ambas mutaciones o sin ninguna de ellas). Cuanto mas cerca están dos mutaciones en el ADN menor es la probabilidad de entrecruzamiento entre ambas y menor es la frecuencia de descendientes recombinantes. De esta forma es posible construir un mapa de las mutaciones en el ADN y compararlo con un mapa de los aminoácidos alterados en la proteína correspondiente. Dado que las técnicas de secuenciación de proteínas si estaban disponibles en la esa época, era posible averiguar el aminoácido alterado por cada mutación.



La probabilidad de entrecruzamiento entre dos mutaciones muy cercanas es muy baja

Cuanto más alejadas están dos mutaciones mayor es la frecuencia de recombinantes

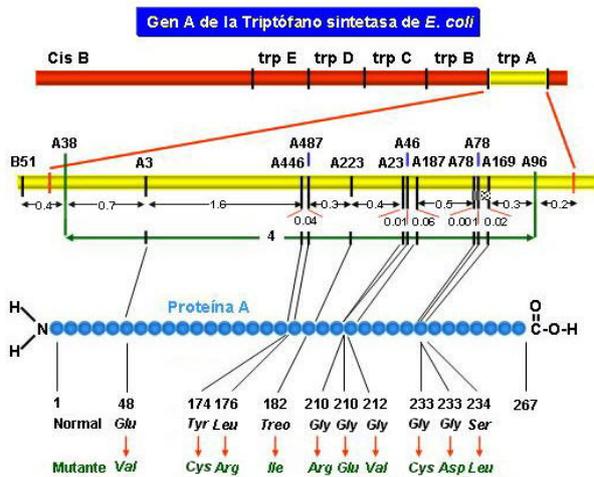
Las dos demostraciones existentes de la hipótesis de la secuencia se basaron en el procedimiento anteriormente descrito y son las siguientes:

- [Yanofsky y colaboradores \(1964\)](#): Trabajando con el gen A que codifica para la proteína A de la triptófano sintetasa de E. coli.
- [Sarabhai y colaboradores \(1964\)](#): Trabajando con mutantes de terminación ámbar del fago T4 que afectan a la proteína de la cápside del virus.

EXPERIMENTO DE YANOSFKY Y COL. (1964)

Yanofsky y col (1964) trabajaron con el gen A de la triptófano sintetasa de *E. coli* que codifica para la polipéptido A. Estudiaron 16 mutantes distintos que tenían alterado un aminoácido diferente del polipéptido A de la triptófano sintetasa. Mediante técnicas secuenciación de proteínas consiguieron averiguar el aminoácido alterado de la secuencia del polipéptido y elaboraron un mapa de polipéptido en el que se indicaba el orden los aminoácidos cambiados en cada mutante. Además, elaboraron otro mapa genético en el que figuraba el orden de las mutaciones en el ADN y la distancia genética entre ellas. Este mapa genético lo realizaron mediante transducción, proceso por el que un bacteriofago lleva información (ADN) de una bacteria a otra. Posteriormente, compararon el mapa genético con el orden de las mutaciones en el ADN y el mapa del polipéptido con el orden de los aminoácidos alterados. Como conclusión encontraron que el orden de las mutaciones en el ADN y de los aminoácidos alterados en el polipéptido era el mismo, por tanto, existía colinealidad. Además, las frecuencias de recombinación genética (distancias genéticas) entre los mutantes en el ADN eran "representativos" de las distancias entre los aminoácidos alterados en el polipéptido correspondiente.

En la siguiente gráfica se ha representado en la parte superior el orden de los genes del operón triptófano e inmediatamente debajo el mapa genético, orden de las mutaciones en el ADN y valores de la frecuencia de recombinación entre mutaciones. En la parte inferior se ha representado el mapa del polipéptido con los los aminoácidos alterados por cada mutación.



Resumen de los resultados de Yanofsky y col (1964)

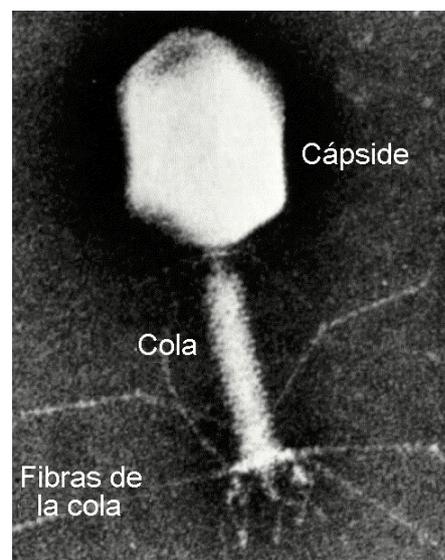
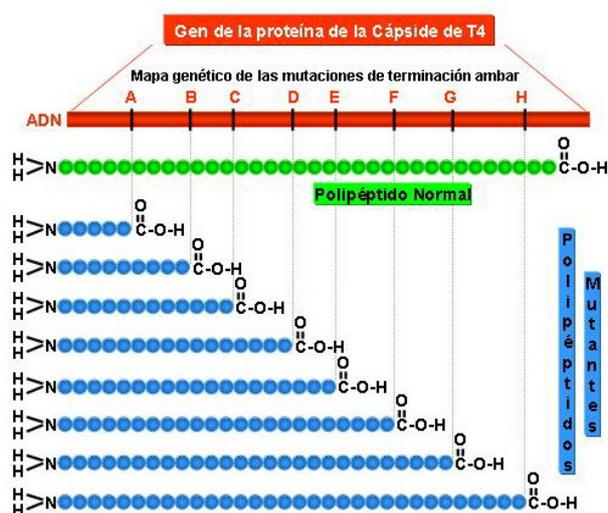
Yanofsky

Se puede comprobar que cuando la frecuencia de recombinación entre dos mutaciones en el ADN es alta (1.6), por ejemplo, A3 y A446, la distancia entre los aminoácidos cambiados es mayor (A3 cambia glu por val y A446 cambia tyr por cys). Mientras que cuando la frecuencia de recombinación es pequeña (0.04), por ejemplo, A446 y A487, la distancia entre los aminoácidos alterados es también muy pequeña (A446 cambia tyr por cys y A487 cambia leu por arg).

Una curiosidad que se produce en algunos casos, en bacterias como *E. coli*, es que el orden en el que se encuentran los genes en el operón triptófano coincide con el orden de actuación de los polipéptidos en cada uno de los pasos de la ruta de síntesis del triptófano.

EXPERIMENTO DE SARABHAI Y COL. (1964)

Trabajaron con mutantes de terminación ámbar del en el fago T4. Estos mutantes afectaban al gen que codifica para la proteína de la cápside del virus. Se trata de mutaciones que provocan la aparición de un triplete sin sentido o triplete de FIN prematuro, en una posición anterior a la habitual, de manera que el polipéptido que aparece presenta una longitud menos a la normal. Dichos investigadores realizaron un mapa de la mutaciones en el ADN, indicando su posición y la distancia genética y también elaboraron un mapa del polipéptido de la cápside, ordenando por longitudes de menor a mayor tamaño, los polipéptidos producidos por cada uno de los mutantes analizados. Compararon ambos mapas (ADN y polipéptidos) y, al igual que Yanosfky y col., encontraron existencia de colinealidad entre orden lineal de las mutaciones en el ADN y las longitudes de los polipéptidos mutantes. En el siguiente gráfico se representa el ADN del gen del pilipéptido de la cápside de T4 y en la parte inferior el polipéptido normal y los polipéptidos de los diferentes mutantes analizados ordenados de mayor a menor longitud.



Resumen de los experimentos de Sarabhai y col (1964)

Virus T4

La demostración de la Hipótesis de la secuencia se ha llamado Principio de colinealidad. Dicha hipótesis fue totalmente aceptada por la comunidad científica a pesar de que no había sido demostrada e inmediatamente se plantearon dos cuestiones:

- ¿Existe algún código o clave que permite pasar de la secuencia de nucleótidos en el ADN a la secuencia de aminoácidos en las proteínas?
- ¿Cómo se convierte la información contenida en la secuencia de ADN en una estructura química de proteína?

La solución a dichas cuestiones las veremos en el siguiente tema.

