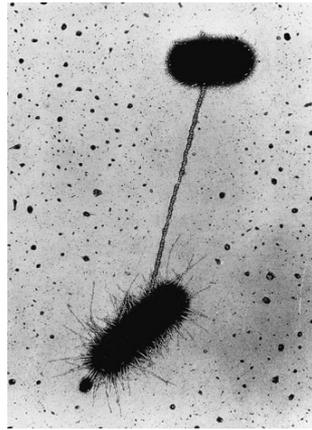
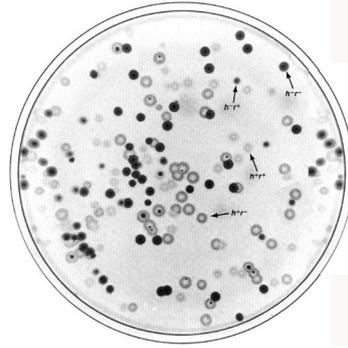


# LA RECOMBINACIÓN GENÉTICA EN PROCARIONTES



Conjugación



Calvas o halos de lisis

- Introducción
- Transformación
- Conjugación
- Transducción
- Recombinación en virus

## INTRODUCCIÓN

El requisito indispensable para llevar a cabo cualquier análisis genético es la existencia de variabilidad genética, la mutación es la fuente primaria de variabilidad genética. Otra característica importante del material hereditario es la recombinación. La recombinación consiste en la producción de nuevas combinaciones genéticas a partir de las generadas inicialmente por la mutación. Dos moléculas de ADN que posean distintas mutaciones pueden intercambiar segmentos y dar lugar a la aparición de nuevas combinaciones genéticas. Las bacterias y los virus, al igual que los organismos eucarióticos también tienen mecanismos de recombinación. En el caso de las bacterias existen tres mecanismos de recombinación: transformación, conjugación y transducción. La existencia de estos mecanismos permite la construcción de mapas genéticos en bacterias.

**Transformación:** en determinadas condiciones fragmentos de ADN exógeno pueden entrar en el interior de las bacterias. El ADN exógeno puede intercambiar segmentos con el ADN del cromosoma principal bacteriano.

**Conjugación:** transferencia del material hereditario (ADN) de una bacteria donadora a otra receptora. Requiere el contacto físico entre las dos estirpes bacterianas, la donadora y la receptora. El contacto físico se establece a través de los pili-F de la bacteria donadora formándose un tubo de conjugación. El ADN de la bacteria receptora puede intercambiar segmentos con el ADN de la donadora.

**Transducción:** no necesita del contacto físico entre dos estirpes bacterianas. El vehículo o vector que transporta ADN de una bacteria a otra es un virus.

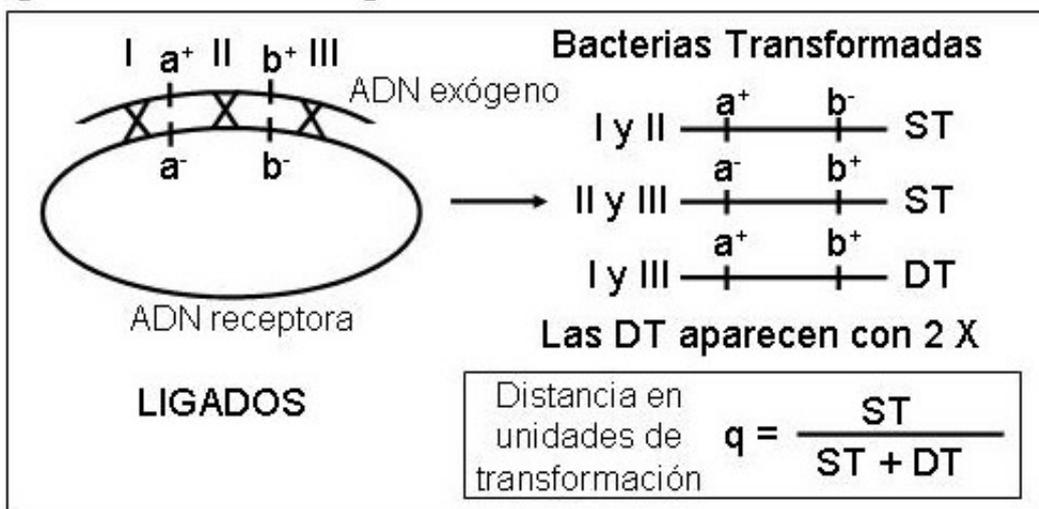
Al igual que las bacterias, también existen mecanismos que originan recombinación en virus. Cuando dos virus diferentes infectan a la misma bacteria, sus ADNs pueden intercambiar segmentos y, como consecuencia, pueden aparecer partículas virales recombinantes con nuevas combinaciones genéticas.

## TRANSFORMACIÓN

En determinadas condiciones fragmentos de ADN exógeno o ADN transformante (tamaño superior a  $3 \times 10^5$  dalton y longitud comprendida entre  $5 \times 10^6$  y  $15 \times 10^6$ , que equivale a 200.000 pares de bases) con estructura helicoidal intacta pueden unirse a células bacterianas competentes y entrar en su interior. La entrada de estos segmentos necesita de la presencia de iones de  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ . El ADN entra en el espacio periplasmático, entre la pared celular y la membrana plasmática, allí una endonucleasa corta las dobles hélices en fragmentos de menor tamaño, posteriormente se degrada una de las dos hélices, de manera que lo que entra en el citoplasma es ADN de una hélice (monocatenario). Estos fragmentos de ADN monocatenario o ADN transformante pueden sustituir a fragmentos de ADN homólogo del cromosoma principal bacteriano mediante un mecanismo especial de recombinación. La recombinación genética tiene lugar entre el ADN transformante y el ADN de la bacteria receptora y se detecta por la aparición de bacterias descendientes transformadas para algún carácter. La existencia de este mecanismo permite construir Mapas genéticos de transformación.

**Concepto de ligamiento en experimentos de transformación:** dos genes o dos marcadores o dos loci cualesquiera se consideran como ligados cuando van juntos en el mismo segmento de ADN transformante o exógeno. En este caso, la frecuencia con la que aparecen las bacterias descendientes dobles transformadas DT (han cambiado para los dos genes o loci estudiados con respecto a la bacteria receptora) es mayor que la frecuencia de las bacterias descendientes simples transformadas ST (han cambiado para un solo gen o un solo locus con respecto a la receptora).

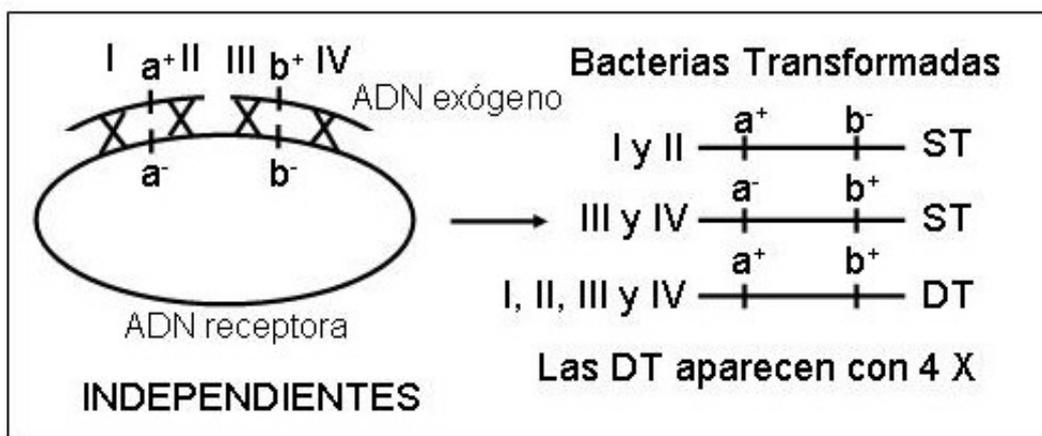
Supongamos que tenemos una bacteria receptora auxotrofa ( $a^- b^-$ ), incapaz de sintetizar los compuestos a y b. Por tanto, para crecer necesita que se añadan al medio dichas sustancias. Supongamos que el ADN transformante o exógeno procede una bacteria prototrofa ( $a^+ b^+$ ) que si es capaz de sintetizar los compuestos a y b, por tanto, no necesita que se añadan al medio dichas sustancias. Si los dos genes implicados en la producción de a y b están ligados y van en el mismo segmento de ADN transformante, podemos considerar tres regiones (I, II y III) en las que se puede dar entrecruzamiento. Un cuestión importante a tener en cuenta, es que el número de entrecruzamientos (sobrecruzamientos) a considerar debe ser siempre par (2, 4, 6, etc), ya que si se diera un entrecruzamiento, tres o cinco, el cromosoma principal de la bacteria receptora quedaría abierto dejando de ser circular. El número de sobrecruzamientos necesario para que aparezca una bacteria DT es dos, uno en la región I y otro en la región III.



Cuanto más cerca estén los dos genes analizados en el mismo segmento de ADN transformante más difícil será que se de entrecruzamiento entre ellos y, por tanto, mayor será la probabilidad de que aparezcan bacterias dobles transformadas (DT) y menor la probabilidad de que aparezcan simples transformadas (ST). Si queremos obtener una estima de la distancia genética entre los dos genes considerados solamente tenemos que fijarnos en las bacterias descendientes que proceden de que se haya producido entrecruzamiento entre a y b, en la región II. Las bacterias que proceden de que se haya dado entrecruzamiento en la región II son las simples transformadas (ST).

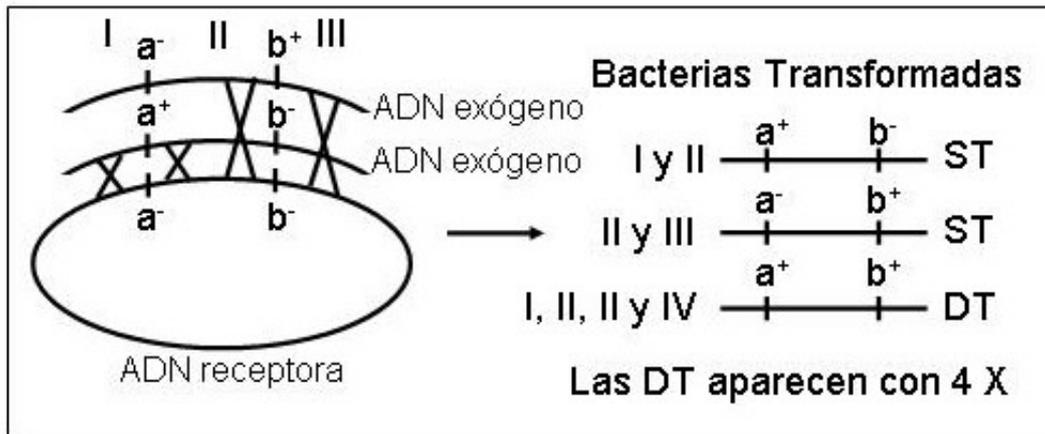
Por tanto, la distancia (q) en unidades de transformación será:  $q = ST / (ST + DT)$ .

**Concepto de independencia en un experimento de transformación:** dos genes o dos marcadores o dos loci cualesquiera se consideran independientes cuando van separados en dos fragmentos de ADN transformante distintos. Ahora, el número de regiones en las que se puede dar entrecruzamiento es cuatro: I, II, III y IV. En este caso, la aparición bacterias DT necesita de cuatro entrecruzamientos, uno en cada una de las regiones I, II, III y IV. Sin embargo, la aparición de bacterias ST necesita solamente dos entrecruzamientos. Uno en la región I y otro en la región II, o bien uno en la región III y otro en la IV. La probabilidad de entrecruzamiento suele ser inferior a la unidad, por tanto, la probabilidad de 4 entrecruzamientos (X) es bastante inferior a la de dos entrecruzamientos.



A veces, en un experimento de transformación, no se dispone de ADN transformante procedente de una cepa donante que sea prototrofa simultáneamente para a y b ( $a^+ b^+$ ), pero se dispone, de dos cepas donadoras, una prototrofa solo para a ( $a^+ b^-$ ) y otra solo para b ( $a^- b^+$ ).

b<sup>+</sup>). En esta situación, a pesar de que los dos genes analizados van en el mismo segmento de ADN transformante, al no disponer de un ADN transformante que sea simultáneamente prototrofo para a y b (a<sup>+</sup> b<sup>+</sup>), los genes considerados se comportan como independientes, ya que la aparición de cepas descendientes dobles transformadas (DT) necesita de 4 entrecruzamientos, mientras que las simples transformadas (ST) se obtienen con solo dos entrecruzamientos.



En la siguiente tabla, se puede observar los resultados obtenidos en un experimento de transformación en *Bacillus subtilis*, según Nester y col (1963). Como se puede ver en el segundo caso las DT aparecen con mucha mayor frecuencia.

ADN transformante	Cepa receptora	Clases transformadas	Nº de colonias
<b>Mezcla de trp<sup>+</sup> tyr<sup>-</sup> y trp<sup>-</sup> tyr<sup>+</sup></b>	<b>trp<sup>-</sup> tyr<sup>-</sup></b>	<b>trp<sup>+</sup> tyr<sup>-</sup> ST</b>	<b>190</b>
		<b>trp<sup>-</sup> tyr<sup>+</sup> ST</b>	<b>256</b>
		<b>trp<sup>+</sup> tyr<sup>+</sup> DT</b>	<b>2</b>
<b>trp<sup>+</sup> tyr<sup>+</sup></b>	<b>trp<sup>-</sup> tyr<sup>-</sup></b>	<b>trp<sup>+</sup> tyr<sup>-</sup> ST</b>	<b>196</b>
		<b>trp<sup>-</sup> tyr<sup>+</sup> ST</b>	<b>328</b>
		<b>trp<sup>+</sup> tyr<sup>+</sup> DT</b>	<b>367</b>

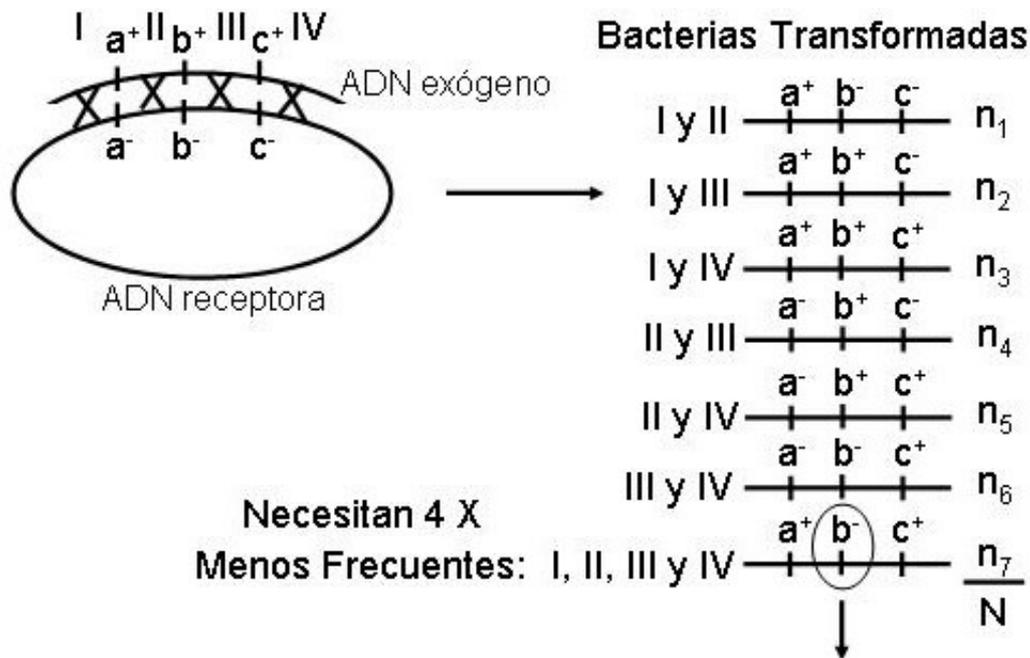
También es posible, con los datos procedentes del segundo experimento de la tabla anterior, calcular la distancia en unidades de transformación entre trp y tyr, dicha distancia (q) sería:

$$q = \text{ST} / (\text{ST} + \text{DT}) = (196 + 328) / (196 + 328 + 367) = 0.5$$

**Problema de los Tres Puntos en Transformación:** también es posible ordenar genes o marcadores o loci, al igual que se lleva a cabo en eucariontes, mediante el estudio semejante al del Problema de los Tres Puntos.

Supongamos una bacteria receptora auxotrofa para a, b y c (a<sup>-</sup> b<sup>-</sup> c<sup>-</sup>) y un ADN transformante o exógeno prototrofo para los mismos marcadores (a<sup>+</sup> b<sup>+</sup> c<sup>+</sup>). En el caso de que los tres marcadores estén ligados, podemos considerar cuatro posibles regiones en las que puede darse entrecruzamiento: I, II, III y IV. Las bacterias transformadas descendientes, como se puede observar en la figura siguiente pueden ser de siete clases distintas

## PROBLEMA DE TRES PUNTOS



El locus b no ha variado con respecto a la cepa receptora, es b<sup>-</sup>. Por tanto, b es el central

Distancia en unidades de transformación  $q = \frac{ST}{ST + DT}$

$$q_{a-b} = \frac{n_1 + n_4 + n_5 + n_7}{N - n_6}$$

$$q_{a-c} = \frac{n_1 + n_2 + n_5 + n_6}{N - n_4}$$

$$q_{b-c} = \frac{n_2 + n_4 + n_6 + n_7}{N - n_1}$$

**Determinación del locus central:** la clase que aparece con menos frecuencia es aquella que procede de que se hayan dado 4 entrecruzamientos (4X). Cuando se analiza la clase menos frecuente (a<sup>+</sup> b<sup>-</sup> c<sup>+</sup>) se observa que el único marcador o locus que no ha cambiado con respecto a la cepa receptora es el central. Es decir, el marcador b en la clase menos frecuente sigue teniendo signo - lo mismo que la cepa receptora (a<sup>-</sup> b<sup>-</sup> c<sup>-</sup>).

Una vez determinado el locus central, se pueden calcular las distancias en unidades de transformación entre el locus central y cada uno de los dos loci extremos (q<sub>a-b</sub> y q<sub>b-c</sub>), y también la distancia entre los dos loci extremos (q<sub>a-c</sub>). La forma de estimar estas distancias es la misma utilizada anteriormente, es decir, q = ST/(ST+DT). Es importante, no olvidar que hay que dividir por el total de cepas transformadas (ST+DT) para los dos loci estudiados y no dividir por el total de bacterias descendientes. Por ejemplo, cuando se estima q<sub>a-b</sub> = ST/(ST+DT), las cepas descendientes (a<sup>-</sup> b<sup>-</sup> c<sup>+</sup>), no se tienen en cuenta en el cálculo, ya que no se han transformado ni

para a ni para b, es decir, siguen auxotrofas para a y b como la cepa receptora.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos en *Bacillus subtilis* al realizar un experimento de transformación con una cepa receptora auxotrofa (*trp-tyr-his-*) y ADN exógeno o transformante procedente de una cepa prototrofa (*trp+tyr+his+*).

	Tipo y número de colonias transformadas						
<i>trp</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>tyr</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>his</i>	-	+	+	-	-	+	+
	<b>685</b>	<b>418</b>	<b>3660</b>	<b>2600</b>	<b>107</b>	<b>1180</b>	<b>11940</b>

En la clase menos frecuente (*trp+tyr+his-*) con 107 colonias, el locus *his* sigue teniendo signo -, no ha cambiado con respecto a la cepa receptora. Por tanto, el locus central es *his*.

Las estimaciones de las distancias en unidades de transformación se llevarían a cabo de la forma indicada en la siguiente tabla:

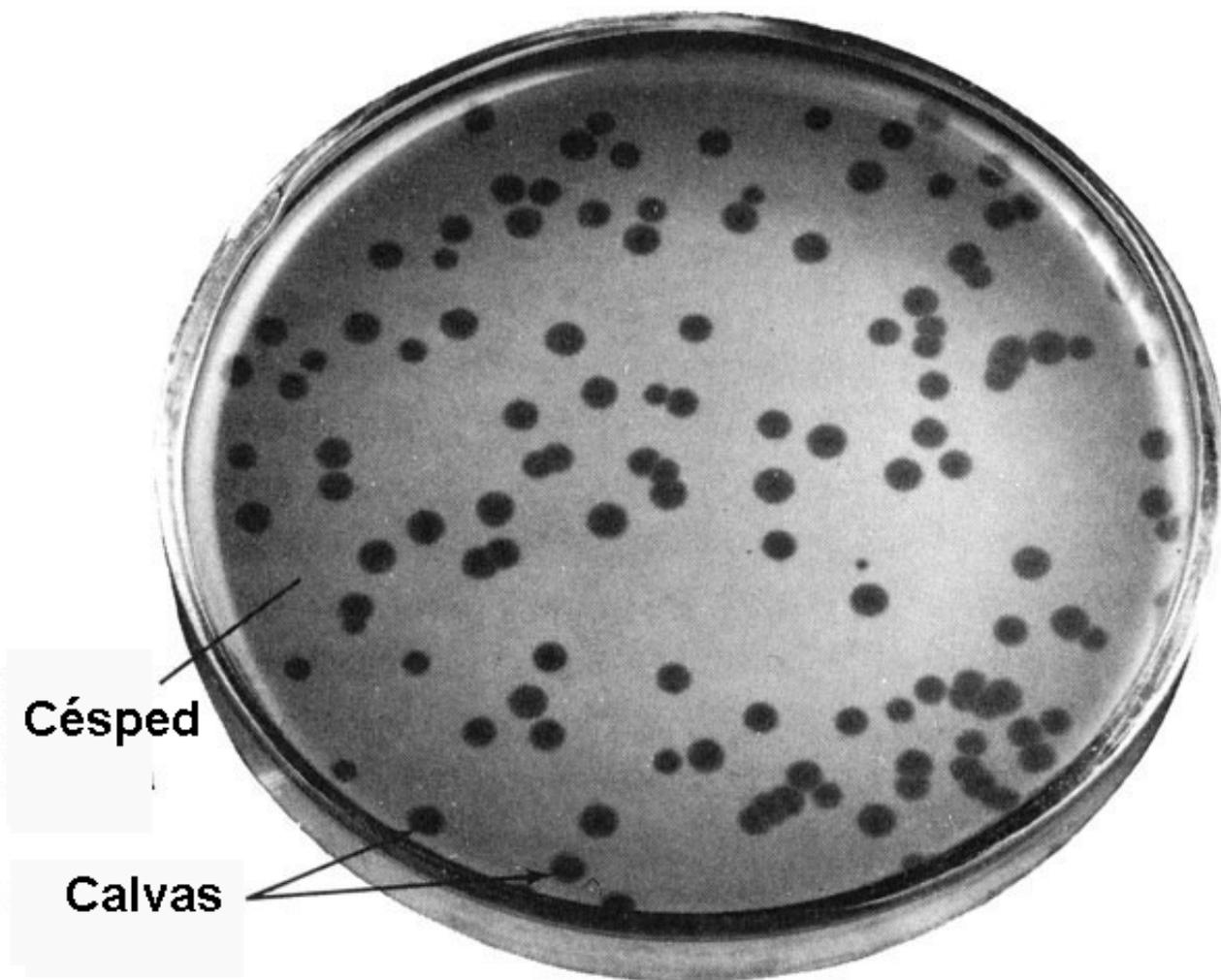
Loci considerados	Clases transformadas	Nº de colonias	Distancia en unidades de transformación
<i>trp-his</i>	<i>trp+his-</i> ST	2600 + 107	q= 6785/19905 q=0.34
	<i>trp-his+</i> ST	418 + 3660	
	<i>trp+his+</i> DT	1180 + 11940	
<i>his-tyr</i>	<i>his+tyr-</i> ST	418 + 1180	q=2390/17990 q=0.13
	<i>his-tyr+</i> ST	685 + 107	
	<i>his+tyr+</i> DT	3660 + 11940	
<i>trp-tyr</i>	<i>trp+tyr-</i> ST	266 + 1180	q=8125/20172 q=0.40
	<i>trp-tyr+</i> ST	685 + 3660	
	<i>trp+tyr+</i> DT	107 + 11940	

Como es lógico, la distancia mayor (0.40) es la que se obtiene entre los loci extremos (*trp* y *tyr*). También, se observa que la suma de las distancias entre el locus central y los dos loci extremos no es igual a la distancia entre los dos loci extremos, indicando que existen fenómenos de interferencia.

## CONJUGACIÓN

### RECOMBINACIÓN EN VIRUS

La recombinación en virus se descubrió por Delbrück, Bailey y Hershey en 1946. Este hallazgo fue posible a la existencia de variabilidad originada por mutación en caracteres de los virus fácilmente observables en los medios de cultivo. Dentro de este tipo de mutaciones están los caracteres de placa, el rango de hospedador, la sensibilidad a la temperatura, etc.). Entre los caracteres de placa que se pueden analizar están la morfología de las calvas o halos de lisis que producen los virus al matar a las bacterias de cultivo en césped.



Césped de bacterias y calvas o halos de lisis producidos por virus que matan a las bacterias

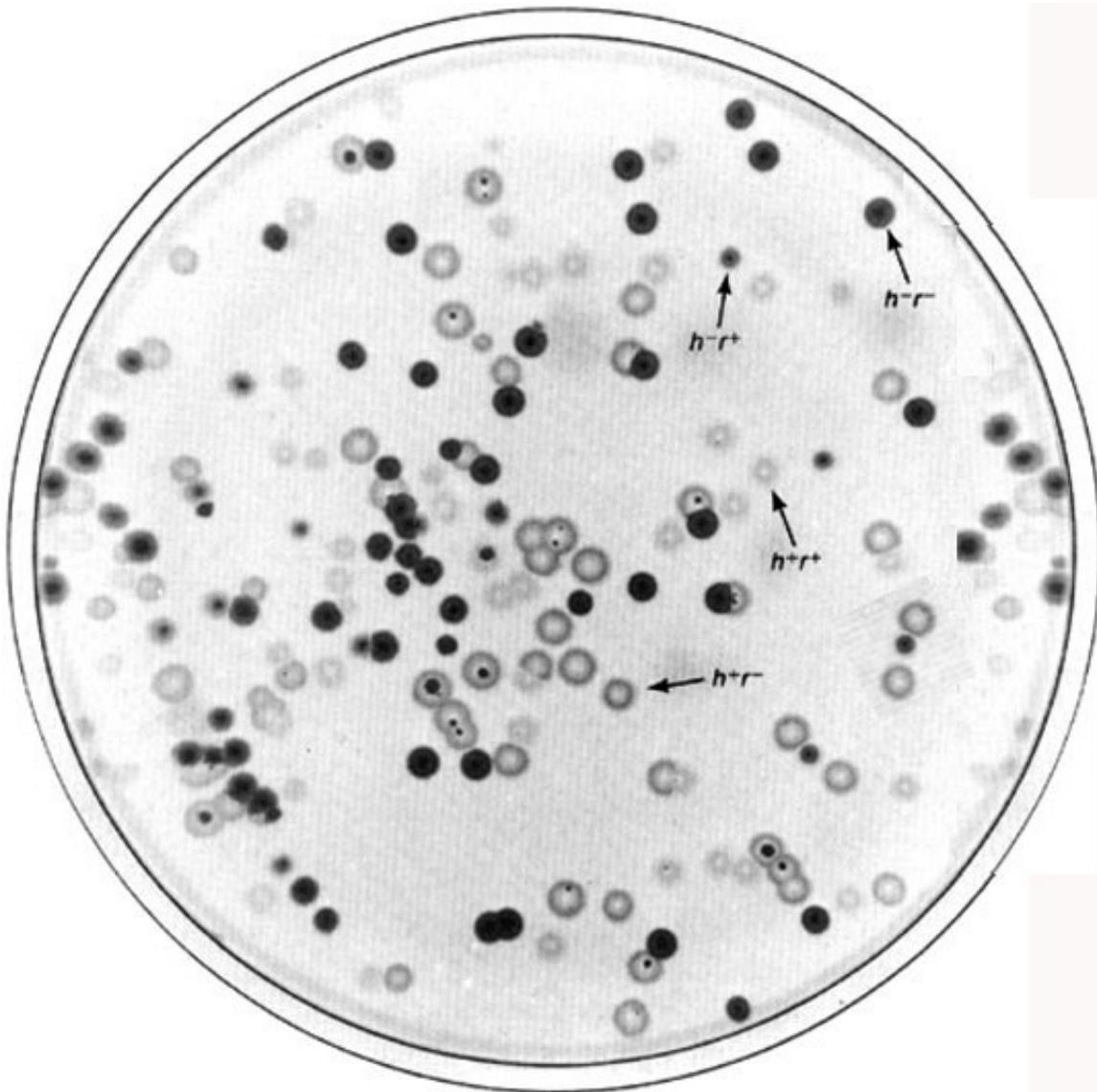
El primer estudio completo de la recombinación en virus se llevó a cabo por Hershey y Rotman (1949) en el virus T2 analizando virus normales y dobles mutantes. Para ello utilizaron el sistema de infección mixta en condiciones de alta multiplicidad, consistente en asegurarse de que cada bacteria del medio del cultivo es infectada simultáneamente por los dos tipos de virus, el normal y el doble mutante. Para ello, se suele realizar la infección de forma que haya cinco veces más de cada uno de los dos tipos de virus que de bacterias. Además, las mutaciones que analizaron en el fago T2 fueron las siguientes:

- Mutantes de lisis rápida ( $r^-$ ) que producen calvas o halos de lisis grandes y de bordes nítidos, mientras que los virus T2 normales ( $r^+$ ) dan lugar a calvas pequeñas y de bordes difusos.
- Mutantes ( $h^-$ ) con un distinto rango de hospedador que son capaces de lisar tanto a la cepa B como a la cepa B/2 de *E. coli*. Los fagos T2 normales solamente lisar o matan a la cepa B de *E. coli*.

Hershey y Rotman (1949) infectaron simultáneamente con fagos normales ( $r^+h^+$ ) y con fagos dobles mutantes ( $r^-h^-$ ) un cultivo bacteriano, con los descendientes de esta infección volvieron a infectar un cultivo en césped formado por una mezcla de las cepas B y B/2. Los tipos de calvas o halos de lisis que se observaron fueron los siguientes:

- $r^-h^-$ : Calvas grandes con bordes nítidos y sin turbidez.
- $r^+h^+$ : Calvas pequeñas con bordes difusos y con turbidez.
- $r^-h^+$ : Calvas grandes con bordes nítidos y turbidez.

-  $r+h$ -: Calvas pequeñas con bordes difusos y sin turbidez.



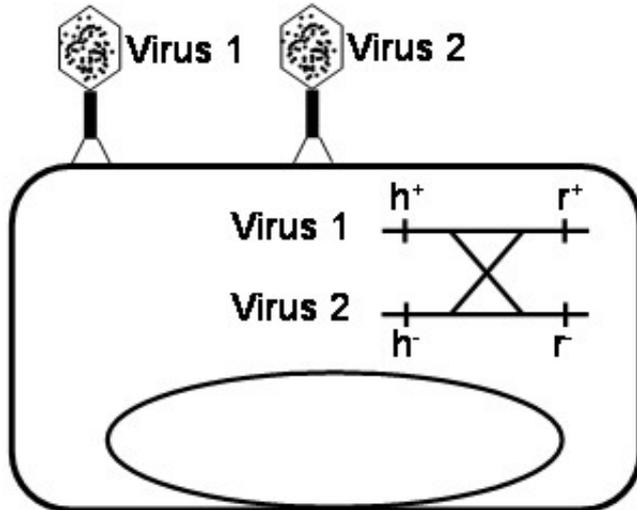
Tipos de calvas o halos de lisis producidos en un césped de bacterias de las cepas B y B/2

La ausencia de turbidez se debe a que el virus ha matado a los dos tipos de cepas bacterianas la B y la B/2, mientras que la presencia de turbidez se debe a que el virus a matado solamente a la cepa B pero no a la cepa B/2.

En el siguiente esquema se indican los diferentes tipos de virus descendientes y los tipos de calvas o halos de lisis detectados.

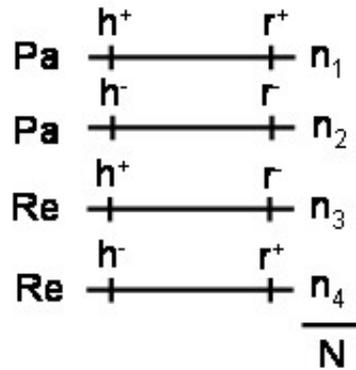
Hershey y Rotman 1949

Virus T2 {  $h^+$  lisa a la cepa B de *E. coli*  
 $h^-$  lisa a las cepas B y B/2 de *E. coli*  
 $r^+$  calvas pequeñas  
 $r^-$  calvas grandes, lisis rápida

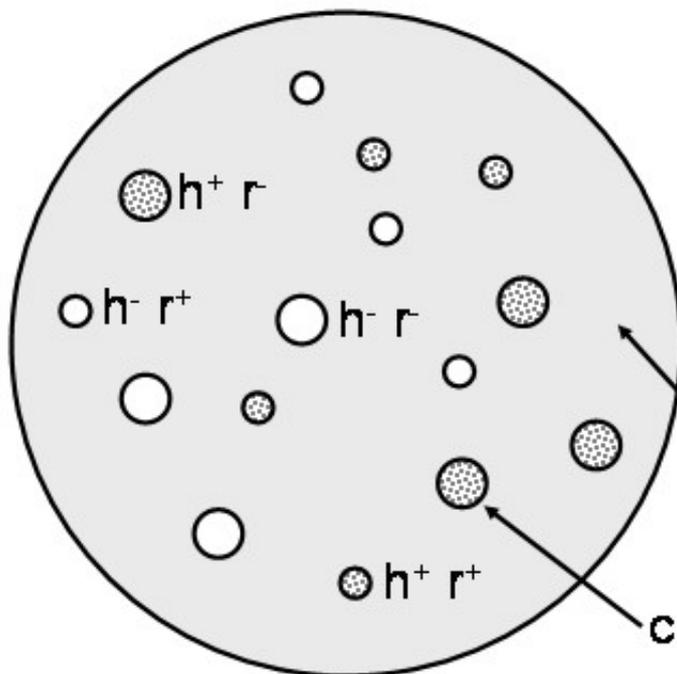


Infección Mixta: Alta Multiplicidad

Virus Descendientes



$$Fr = \frac{n_3 + n_4}{N} \times 100$$



Placa "petri" con los distintos tipos de halos de lisis

Césped de bacterias B y B/2

Calva o halo de lisis

Cuando se lleva a cabo la infección mixta anterior, aparecen virus descendientes de tipo parental (dobles mutantes y normales) y virus descendientes de tipo recombinante ( $r+h^-$  y  $r-h^+$ ). Cada vez que se da un entrecruzamiento entre los loci analizados aparece un virus recombinante  $r+h^-$  y otro virus  $r-h^+$ . De forma que el número de virus descendientes  $r+h^-$  debe ser aproximadamente igual que el de virus  $r-h^+$ . Lo mismo sucede con los virus de tipo parental, se espera que existan aproximadamente igual cantidad de descendientes  $r+h^+$  que de virus  $r-h^-$ .

Cuanto más lejos estén dos loci en el genoma viral o ADN del virus más probable es que se de un entrecruzamiento entre ambos y la frecuencia de recombinación ( $Fr$ ) será mayor. Cuanto más cerca estén dos genes menor será la probabilidad de entrecruzamiento y menor será la

frecuencia de recombinación.

La forma de estimar la frecuencia de recombinación es, por consiguiente, semejante a la manera empleada en eucariontes. La frecuencia de recombinación es igual a la frecuencia con la que aparecen virus recombinantes en los descendientes multiplicada por cien.

$$Fr = (\text{Recombinantes/Total}) \times 100$$

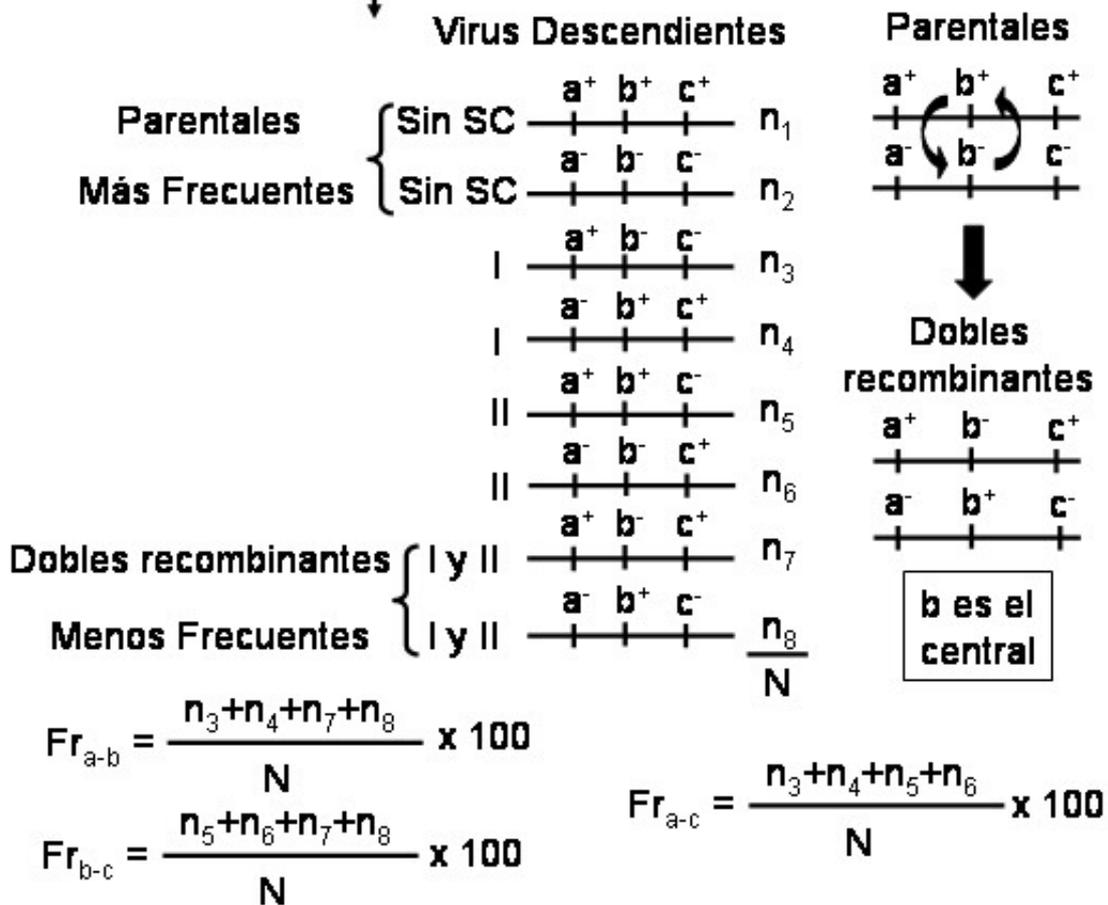
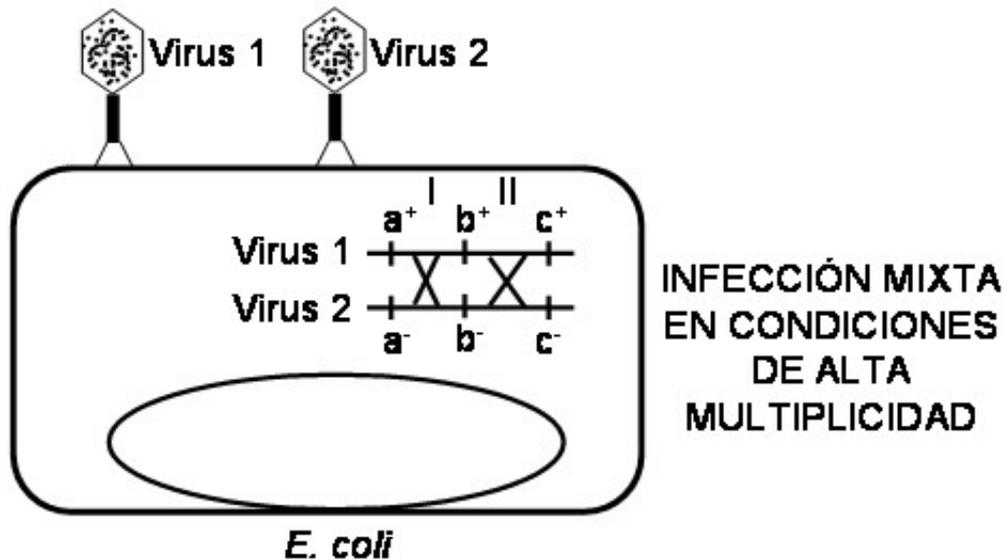
**Problema de los tres puntos en virus:** también es posible llevar a cabo infecciones mixtas en condiciones de alta multiplicidad con dos virus que difieran en tres loci, un virus ( $a^+ b^+ c^+$ ) y otro virus ( $a^- b^- c^-$ ). En estos casos podemos averiguar el locus central y calcular las frecuencias de recombinación entre los tres loci.

Los razonamientos empleados son semejantes a los descritos en organismos eucariontes. En estas infecciones pueden aparecer ocho tipos de virus descendientes. Se observan virus de tipo parental ( $a^+ b^+ c^+$ ) y ( $a^- b^- c^-$ ) procedentes de que no se haya dado entrecruzamiento ni en la región I ni en la región II. También hay virus recombinantes solamente en la región I pero no en la II ( $a^+ b^- c^-$ ) y ( $a^- b^+ c^+$ ). Se encuentran virus procedentes de que solo se haya dado entrecruzamiento en la región II, es decir, recombinantes en la región II que son ( $a^+ b^+ c^-$ ) y ( $a^- b^- c^+$ ). Por último, se observan virus dobles recombinantes, procedentes de que se haya producido entrecruzamiento en las regiones I y II simultáneamente, como son los virus ( $a^+ b^- c^+$ ) y ( $a^- b^+ c^-$ ).

**Determinación del locus central:** los virus dobles recombinantes son los que aparecerán con menor frecuencia, mientras que los virus parentales serán los más frecuentes. Una vez identificados ambas clases de virus, el locus central cumple la propiedad de que el intercambio de alelos en ese locus entre las clases dobles recombinantes reconstruye las ordenaciones parentales. Otra manera de averiguar el locus central es comparar las frecuencias de recombinación (Fr), de forma que la mayor frecuencia de recombinación corresponderá a los loci más alejados.

En el siguiente esquema se indican los tipos de virus descendientes, la determinación del locus central y la estimación de las frecuencias de recombinación entre los tres loci.

### TRES PUNTOS EN VIRUS



Al igual que sucede en organismos eucariontes, la suma de las frecuencias de recombinación entre el locus central y cada uno de los loci extremos no coincide con la frecuencia de recombinación entre los dos loci extremos. Además, también existe interferencia.

$$Fr_{a-c} = Fr_{a-b} + Fr_{b-c} - 2cFr_{a-b}Fr_{b-c}$$

