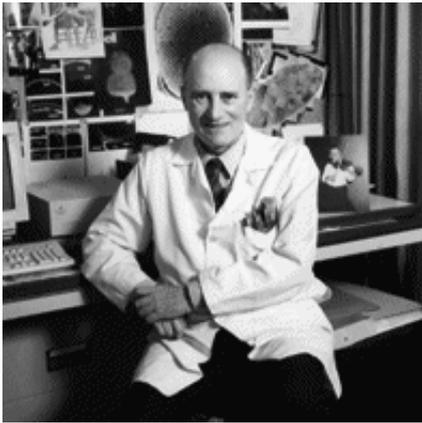
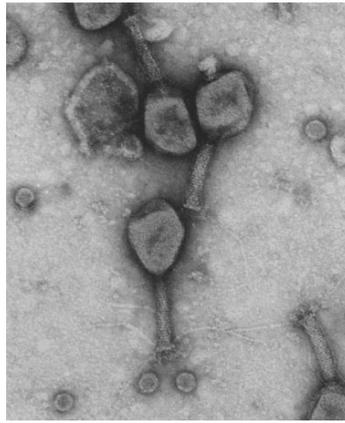


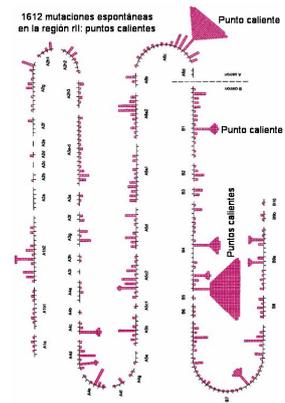
ESTRUCTURA FINA DEL GEN: CONCEPTO DE GEN



Seymour Benzer



Fago T4



Puntos calientes

- Concepto mendeliano de gen
- Concepto molecular de gen
- Experimentos de Benzer con mutantes de lisis rápida del fago T4
 - Unidad de mutación (mutón): puntos calientes.
 - Unidad de recombinación: recombinación intragénica. Mapas de deleciones.
 - Unidad de función: Pruebas de Complementación o Pruebas Cis-Trans.

CONCEPTO MENDELIANO DE GEN

Los factores hereditarios o genes descritos por Mendel en 1865 se han considerado durante mucho tiempo como la unidad de transmisión genética de padres a hijos. Los genes, según el concepto mendeliano, son partículas discretas e indivisibles que se encuentran sobre los cromosomas ordenados linealmente y que pueden reconocerse por ser capaces de **mutar**, existiendo diferentes formas alternativas o diferentes alelos de un mismo gen, por ser capaces de **recombinar** con otros genes diferentes (recombinación intergénica) produciendo nuevas combinaciones de genes, y por ser capaces de **funcionar** dando lugar a fenotipos concretos en los individuos. Esta teoría se la denominó teoría del "**collar de cuentas**". De manera, que el gen era la unidad de mutación, de recombinación y de función.

CONCEPTO MOLECULAR DE GEN

Sin embargo, a partir del conocimiento de que los genes son segmentos más o menos largos de ADN y de que los genes se expresan dando lugar a polipéptidos (teoría un gen - una enzima) se planteó de nuevo el concepto molecular de gen y, como veremos, se llegó a la conclusión de que el gen seguía siendo la unidad de función, pero el gen dejó de ser la unidad de mutación y la unidad de recombinación. La unidad de mutación y de recombinación, como ya en parte sabemos, es un par de nucleótidos.

Cuando Watson y Crick en 1953, propusieron su modelo de la Doble Helice indicaron que una mutación tendría lugar simplemente mediante la alteración de la secuencia de nucleótidos en el ADN. Como hemos podido comprobar, en el capítulo de la base molecular de la mutación, basta un cambio en un solo par de nucleótidos para que se produzca una alteración en el fenotipo de un individuo.

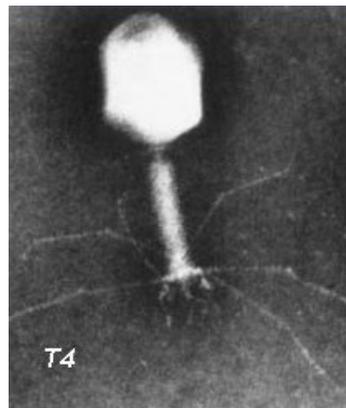
Los experimentos que condujeron a establecer en concepto molecular de gen fueron realizados por Seymour Benzer en 1955 con mutantes de lisis rápida del fago T4.

EXPERIMENTOS DE BENZER CON MUTANTES DE LISIS RÁPIDA DEL FAGO T4

Seymour Benzer (1955, 1957, 1961) analizó 3000 mutantes de lisis rápida (rII-) de la región rII del fago T4. El 80% de los mutantes analizados se debían a mutaciones puntuales y el 20% restante eran mutantes producidos por deleciones o pérdidas más o menos grandes de la región rII del ADN del fago.



S. Benzer en el laboratorio



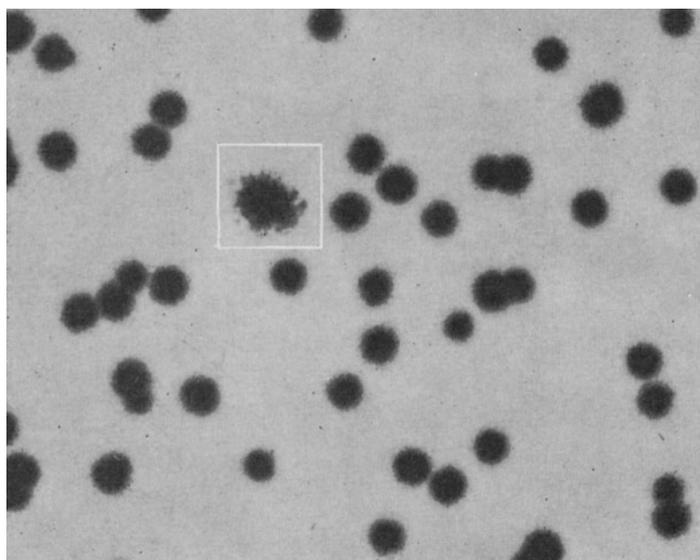
Bacteriofago T4

La principal característica que distingue a los mutantes puntuales de los mutantes por deleción, es que estos últimos no revierten, mientras que los mutantes puntuales revierten aunque con baja frecuencia. Por tanto, los mutantes debidos a deleción **no revierten**. Se recuerda que revertir consiste en volver a recuperar el fenotipo normal. La probabilidad de que en un mutante por deleción se produzca una inserción en el mismo lugar de la deleción, del mismo número de pares de bases y con la misma secuencia, es prácticamente nula.

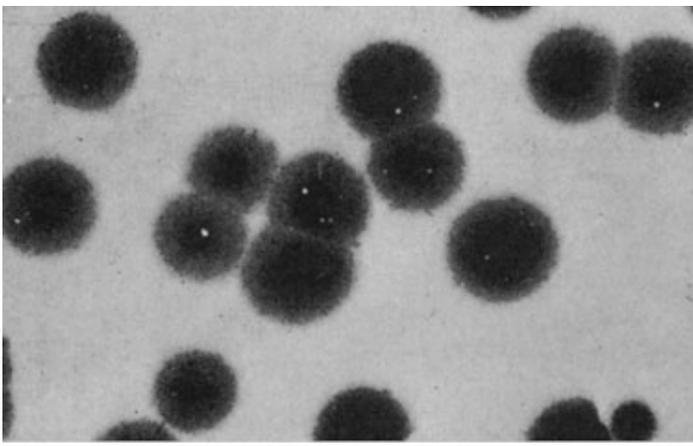
Las principales características que distinguen a los fagos mutantes de lisis rápida (rII-) de los fagos normales (rII+) son las siguientes:

- **Los fagos T4 normales (rII+):** infectan y lisan a las cepas B y K(l) de *E. coli*. En la cepa B producen clavas pequeñas y vellosas.
- **Los fagos T4 mutantes de lisis rápida (rII-):** infectan y lisan a la cepa B de *E. coli* produciendo calvas grandes y nítidas. Infectan a la cepa K(l) de *E. coli* pero no pueden lisarla.

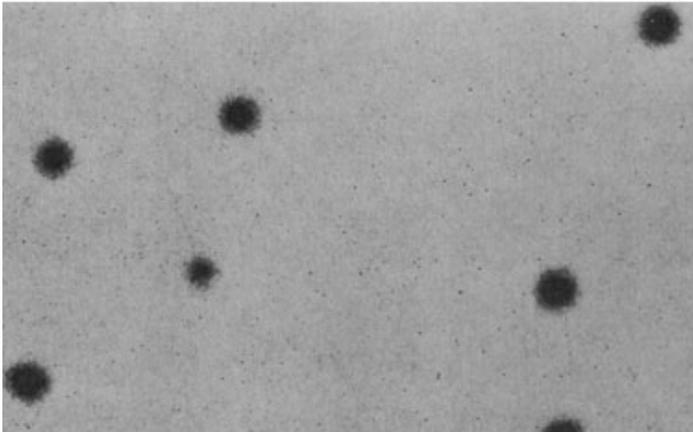
Benzer consiguió reunir los 3000 mutantes observando la morfología o aspecto que presentaban las calvas o halos de lisis producidos por los fagos sobre un cultivo en cesped de *E. coli*. Los halos de lisis que presentaban una morfología o aspecto diferente al normal en la cepa B de *E. coli* se clasificaban como mutantes (halos de lisis grandes). Posteriormente, se comprobaba que dichos mutantes no crecían en la cepa K(l).



Forma en la que Benzer seleccionaba los posibles mutantes de lisis rápida. Halos de lisis o calvas producidas por el fago T4 en la cepa B de *E. coli*. Se puede observar una calva con un aspecto diferente al resto, un tamaño mayor y bordes poco definidos. Los fagos que producían este tipo de valvas se clasificaban como mutantes.



En la parte superior se observan las calvas o halos de lisis producidas por mutantes de lisis rápida rII- sobre un cultivo en césped de la bacteria *E. coli*.



En la parte inferior solamente se observan las calvas producidas por los fagos rII+ en un cultivo en césped de la cepa K(1) de *E. coli*. En esta cepa los fagos rII- mutantes no producen halos de lisis.

Con los mutantes de lisis rápida Benzer llevo a cabo experimentos de recombinación que le permitieron establecer que la unidad de mutación y la unidad de recombinación era un par de nucleótidos. También realizó pruebas de complementación que le permitieron determinar que el gen seguía siendo la unidad de función.

UNIDAD DE MUTACIÓN (MUTÓN): PUNTOS CALIENTES.

Es evidente que a partir del momento en que se determinó que el material hereditario eran los ácidos nucleicos (Avery, McLeod y McCarthy 1944) y que se propuso la estructura de la Doble Hélice para el ADN (Watson y Crick, 1953), el gen dejó de ser indivisible y dejó de ser la unidad de mutación, ya que los genes eran segmentos más o menos largos de ADN. Por tanto, el gen no cambiaba como un todo a uno de sus alelos, de manera que cualquiera de los nucleótidos de un gen podría mutar y producir un nuevo alelo. Watson y Crick cuando propusieron su Modelo de la Doble Hélice indicaron que la mutación tendría lugar por la alteración de la secuencia de nucleótidos de un gen. Por tanto, el gen dejaba de ser una partícula discreta indivisible y dejaba de ser la unidad de mutación. La unidad de mutación a nivel molecular fue llamada por Benzer **mutón** y se corresponde con un par de nucleótidos.

Benzer llegó a estas conclusiones analizando los 3.000 puntos de lisis rápida y de delección que afectaban a la zona rII del fago T4. Para ello, llevo a cabo mapas genéticos extremadamente finos o muy densos de las mutaciones que afectaban a dicha región. Dichos mapas genéticos los llevo a cabo basándose en la frecuencia de recombinación entre dos mutaciones distintas. De manera que cuanto más alejadas están entre sí dos mutaciones cualesquiera, mayor es la probabilidad de que se de un intercambio entre ellas y mayor es la frecuencia con la que aparecen fagos descendientes recombinantes. La frecuencia de recombinación es igual al número de fagos descendientes recombinantes dividido por el total de fagos descendientes (parentales más recombinantes) y se da en tanto por ciento. De manera que un 1% de recombinantes significa 1 fago recombinante en un total de 100 fagos (parentales más recombinantes).

El método empleado por Benzer para construir un mapa detallado de la zona rII fue llevar a cabo infecciones mixtas con pares de mutantes de lisis rápida rII- en condiciones de alta multiplicidad sobre la cepa B de *E. coli*. Se recuerda que la cepa B puede ser infectada y lisada tanto por los fagos normales rII+ como por los fagos mutantes de lisis rápida rII-. Estas infecciones mixtas se realizan de manera tal que cada bacteria de la cepa B sea infectada simultáneamente por cada uno de los dos mutantes de lisis rápida rII- analizados. Para ello en un medio de cultivo líquido se mezclan bacterias de la cepa B y los dos virus mutantes en proporciones tales que haya 5 veces más virus de cada tipo mutante que de bacterias. Es decir, si el cultivo contiene 100 millones de bacterias, se añaden 500 millones de fagos de cada tipo mutante. En el interior de las bacterias infectadas simultáneamente por ambos fagos mutantes, aparecen fagos descendientes de tipo parental, procedentes de que no se haya dado entrecruzamiento y, fagos recombinantes procedentes de que se haya producido entrecruzamiento. Por tanto, los virus descendientes de la infección de la cepa B serán de tipo parental (mutantes de lisis rápida rII-) y de tipo recombinantes (dobles mutantes de lisis rápida rII- y fagos normales rII+*). La frecuencia de los fagos de tipo recombinante dependerá de la distancia a la que se encuentren ambas mutaciones en la zona rII. De los fagos descendientes de esta infección Benzer tomaba dos alícuotas de igual volumen, con una alícuota infectaba de nuevo a la cepa B de *E. coli* y con la otra alícuota infectaba a la cepa K(λ). A la cepa B la infectan todos los descendientes (normales rII+ y mutantes rII-) en ella se puede estimar el total de fagos descendientes después de la infección. A la cepa K(λ) solamente la infectan y lisan los recombinantes normales rII+.

Los mutantes por delección fueron muy importantes en los estudios de recombinación y construcción de mapas, ya que dichas mutaciones no revierten mientras que las mutaciones puntuales si lo hacen, y además las delecciones permiten dividir la zona rII del fago T4 en varias regiones más pequeñas en las que se pueden ir localizando mutaciones puntuales. Para llevar a cabo mapas con delecciones es importante tener claros los siguientes conceptos:

- Si dos mutantes por delección diferentes de lisis rápida (rII-) no solapan, pueden dar lugar a fagos recombinantes normales. Es decir, si no hay regiones pérdidas comunes en el ADN de ambos fagos mutantes puede aparecer en la descendencia de estos fagos un virus con normal con la región rII completa, es decir un virus rII+.
- Si dos mutantes por delección diferentes de lisis rápida (rII-) solapan, no pueden dar lugar a fagos recombinantes normales. Es decir, si hay regiones pérdidas comunes en el ADN de ambos fagos, no es posible obtener entre sus descendientes virus normales con la región rII completa.

Imaginemos que estamos estudiando dos mutantes rII- que poseen delecciones que solapan. Estas delecciones definen tres regiones en la zona rII, la región exclusiva de la delección 1, la región exclusiva de la delección 2 y la región común ausente en ambas delecciones. Las delecciones 1 y 2 no pueden dar lugar a recombinantes normales ya que solapan. Si ahora pensamos en otro mutante (el número 3) por delección que solape en parte solamente con la delección 1, podemos definir dos regiones más en la zona rII, la región exclusiva de la delección 3 y la región común a las delecciones 1 y 3. Las delecciones 1 y 3 no pueden dar lugar a recombinantes normales ya que solapan. Sin embargo, las delecciones 2 y 3 sin pueden originar recombinantes normales ya que no solapan. Por tanto, la estrategia lógica para realizar un mapa fino de la zona rII, consiste primero en dividirla en regiones más pequeñas empleando para ellos diferentes mutantes por delección.

| |
|--|
| |
| |

El siguiente paso sería localizar los mutantes puntuales en las distintas regiones de la zona rII. Para ello simplemente averiguaríamos si los mutantes puntuales analizados producen recombinantes normales rII+ con los mutantes por delección utilizados para subdividir la zona rII.

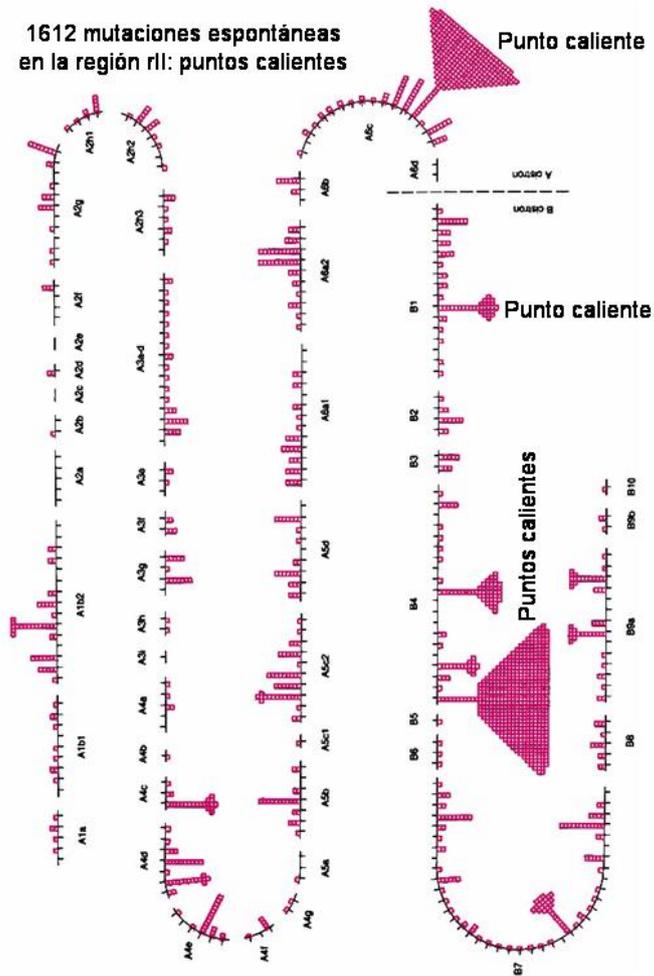
- Si un mutante puntual da lugar a fagos recombinantes normales rII+ con un mutante por delección, significa que la mutación puntual no solapa con la región ausente de la delección. Es decir, el mutante puntual no se encuentra en la zona de ADN pérdida en la delección.
- Si un mutante puntual no da lugar a fagos recombinantes normales rII+ con un mutante por delección, significa que la mutación puntual solapa con la región ausente en la delección. Es decir, el mutante puntual afecta a la zona de ADN pérdida en la delección.

De esta manera se pueden ir localizando en una misma región muchas mutaciones puntuales. El siguiente paso consiste en ordenar todas las mutaciones puntuales que afectan a la misma región. El criterio empleado en este caso es la frecuencia de recombinación, a mayor frecuencia de recombinación mayor distancia, a menor frecuencia de recombinación menor distancia. Por último, con el sistema de análisis utilizado por Benzer, es posible saber si dos mutantes puntuales están afectando al mismo par de nucleótidos, o si afectan un par de nucleótidos distintos.

- Si dos mutantes puntuales afectan a un par de nucleótidos diferentes aunque muy próximos, podremos obtener recombinantes normales rII+, ya que no solapan.
- Si dos mutantes puntuales afectan al mismo par de nucleótidos, no podremos obtener recombinantes normales rII+, ya que solapan.

Con este criterio Benzer podía averiguar si las mutaciones que afectaban a la zona rII se producían al azar, con igual probabilidad en cualquier par de nucleótidos o en cualquier región de la zona II, o si por el contrario existían pares de nucleótidos o regiones dentro de rII en las que la frecuencia de mutación era muy superior a la esperada por azar. Los resultados que Benzer obtuvo, indicaban que en la zona rII existían "puntos calientes" en las que la frecuencia de mutación era mucho mayor de la esperada por azar.

1612 mutaciones espontáneas
en la región rII: puntos calientes



Puntos calientes en la zona rII del fago T4

