

## CONJUGACIÓN BACTERIANA

Tenemos una cepa receptora junto con material genético que aporta otra célula, de forma que a partir de ahí, puede producirse la conjugación, que es la transferencia de material; aunque para que sea viable, debe darse la recombinación gracias al proceso del entrecruzamiento. El intercambio genético no tiene lugar entre dos genomas completos como ocurre en eucariota, sino que, tiene lugar entre un genoma completo (F<sup>-</sup>) que se denomina **endogenote**, y otro incompleto, del donante, denominado **exogenote**. Obtendremos un **merocigoto** (diploide parcial). La genética bacteriana es la genética de la merocigosis.

Para que la **recombinación** dé algún cromosoma viable (que podrá ser circular), debe producirse un número par de entrecruzamientos, puesto que si no, no obtendremos ningún producto viable, sino un cromosoma largo lineal y extraño, parcialmente diploide. Si se da este número par de entrecruzamientos, obtendremos dos productos, uno que se perderá durante el crecimiento celular y otro que será viable.

**Producción del proceso:** podemos usar los datos de la **conjugación interrumpida** para realizar un mapa con frecuencias de recombinación, usando la conjugación, primero tenemos que asegurarnos de que los marcadores han pasado al cromosoma receptor, teniendo en cuenta que gracias al **gradiente de transferencia natural**, pasan con mayor frecuencia y facilidad, aquellos marcadores que se encuentran más cerca del punto de entrada. Esto es debido a que el apareamiento entre las bacterias suele interrumpirse espontáneamente, de forma que la transferencia de los marcadores suele ocurrir en el orden en que estos están presentes en el DNA a partir del punto de inicio de la transferencia del mismo factor F. Nosotros seleccionamos para un determinado marcador, teniendo que controlar qué marcadores pasan, pudiendo estimar que se produce un punto de entrecruzamiento hacia el último marcador. Podemos deducir el orden de los genes que entran gracias a las frecuencias relativas de recombinantes en cruzamientos recíprocos entre los genotipos parentales.

Podemos encontrar procesos relacionados con la conjugación, tales como la **sexducción**, en el que se usan elementos F' para crear diploides parciales. El F' es un caso de **factor F** modificado, encontrándose en algunas cepas **Hfr**. Podemos obtener estirpes F' con fragmentos muy grandes del cromosoma bacteriano. Los factores F' son más fáciles de recombinar porque poseen más puntos para recombinar.

## TRANSFORMACIÓN

Es la incorporación de DNA extracelular en el interior de una bacteria. Es otro método distinto de transferir material genético de una célula a otra. En una ocasión vimos este proceso, cuando Griffith demuestra que el material genético es el DNA.

En este caso, también hablaremos de **endogenote** y **exogenote**, de forma que el proceso es similar al que ocurría con la conjugación. Una vez entra una hebra (de las dos) del DNA donador en la bacteria receptora, debe producirse recombinación mediante un doble entrecruzamiento, obteniendo una región cromosómica constituida por DNA heterólogo. Cuando esta bacteria se divida, obtendremos la mitad de bacterias no transformantes y la otra mitad transformantes.

El que se pueda dar la transformación depende de la permeabilidad de la pared celular, si la membrana es permeable, es más fácil que el DNA atraviese la misma, aunque el éxito también depende de la actividad de las endonucleasas que degradan el DNA. E. Coli, genera enzimas que degradan rápidamente los fragmentos de DNA extraños. Podemos hacer una célula con la membrana poco permeable **competente**, facilitando el proceso de la transformación.

Pocas células sufren la transformación, puesto que no siempre se produce la recombinación. Además, con este método, únicamente podemos introducir fragmentos del orden de 1000–20000 pares de bases. Así, podemos

determinar si dos genes están cercanos o no, e incluso podemos determinar el orden de los mismos. Si dos genes están muy separados en un cromosoma, será difícil que entren juntos en el mismo fragmento. En esta situación, la probabilidad de que una bacteria receptora se vea transformada para las dos características (**cotransformación**), será el producto de las probabilidades de que esta bacteria sea transformada para cada una de ellas, teniendo en cuenta que son sucesos independientes. Si la probabilidad de tener una bacteria transformada es de 0.001, entonces, la probabilidad de tener un doble transformante, será 0.000001, aunque puede ocurrir que los genes se encuentren tan cerca que sean transportados por el mismo fragmento de DNA. En este caso, la frecuencia de **cotransformación** estará próxima a la de **transformación** de un único gen. Es decir, que una frecuencia de cotransformación para dos genes superior al producto de dos frecuencias de transformación únicas, pone de manifiesto que los genes están relativamente cercanos entre sí. Así, cuando dos genes pueden ser cotransformados, es cuando se dice que están ligados, de forma que en este caso, con ligamiento, nos referimos a genes próximos y no en el mismo cromosoma, como ocurre con eucariota. Una vez sepamos la distancia entre los genes, podemos hacer un mapa de ligamiento. Podemos obtener una frecuencia de recombinantes doble o simple, de forma que si trabajamos con dos genes, podemos obtener un transformante doble que transforme para dos marcadores, aunque también pueden haber transformantes simples o nulos, obteniendo el elemento inicial.

La estimación de frecuencias de recombinación la realizaremos observando los productos transformantes sencillos y dobles, desechando los no transformantes. Podemos estimar frecuencias entre más marcadores usando la relación *frecuencia recombinación = n° de transf. simples/n° total de transf.*

## TRANSDUCCIÓN

Es la transferencia de material genético entre bacterias, usando como vehículo un bacteriófago. No todos los ciclos virales son iguales, pudiendo destacar dos ciclos principales, el **lisogénico** y el **lítico**. Si la respuesta es **lítica**, el virus se va replicando, formando una serie de nuevos fagos a la vez, que usan a la bacteria como elemento parasitado, hasta que son capaces de parasitar ya por ellos mismos. La segunda respuesta que podemos encontrar es la **lisogénica**, en la que el genoma del fago se integra en el de la bacteria, de forma que puede permanecer en este estado estacionario bastante tiempo hasta que se produzca el ciclo lítico.

Este proceso es similar a la integración o desintegración del **factor F**, aunque la diferencia es que en la transducción, la integración del profago siempre es en el mismo punto del cromosoma bacteriano, mientras que el factor F podía integrarse en más de un punto determinado.

Podemos encontrar transducción especializada y generalizada, estando relacionadas con el ciclo que acabamos de ver.

**Transducción generalizada:** Cuando se va a replicar un fago, se produce la lisis de la bacteria para que los fagos puedan abandonar la bacteria. Esto provoca que pueda existir el intercambio de material genético entre bacterias sin que haya contacto celular. La formación de bacterias recombinantes a partir de las originales, puede darse gracias a la acción de un agente filtrable que debía transportar los marcadores entre bacterias. Este agente es un fago, y podemos destacar el fago **P22**, que fue el que usaron **Zinder** y **Lederberg** en 1952 para sus primeras experiencias de transducción.

La degradación del cromosoma bacteriano durante el ciclo lítico, posibilita el que algunos trozos de este cromosoma (siempre que sean de la longitud correcta), sean empaquetados por error dentro de cápsidas víricas, lo que provocará que cuando este fago vuelva a infectar una bacteria, introduzca el fragmento erróneo de cromosoma. Así es como se produce la transducción. Este tipo de fagos se denomina **fagos transductantes** y los cuales, aunque son minoritarios (1/100000), cuando infectan nuevas bacterias, pueden producir la integración de los marcadores genéticos que llevan en el cromosoma bacteriano receptor y generar **bacterias transductantes**. Como en la conjugación, estas bacterias recombinantes se producen por doble entrecruzamiento entre el **segmento de DNA dador** y la **región homóloga** del cromosoma receptor.

El fragmento de DNA introducido en la bacteria puede ser, de nuevo, diferente al de la propia bacteria infectada, pudiendo producirse recombinación entre los marcadores, lo que nos llevará a obtener un **diploide parcial** o **merocigoto**. Hablamos de transducción generalizada porque teóricamente puede transducirse cualquier fragmento del cromosoma bacteriano. Podemos seleccionar bacterias transductantes para uno de los marcadores utilizados y luego, analizarlos para la presencia o no de los otros marcadores de la bacteria donadora. Teniendo en cuenta que sólo puede transducirse un 2–2,5% del genoma bacteriano, los genes sólo podrán ser introducidos conjuntamente en la partícula transductante si se encuentran próximos en el cromosoma, de forma que podrán generarse **bacterias cotransductantes**, o bacterias transductantes para los dos caracteres en cuestión. El cálculo de las frecuencias relativas de **cotransducción** entre dos o más marcadores genéticos es una buena estimación del grado en el que se encuentran ligados en el cromosoma bacteriano. Esta frecuencia podemos definirla como la proporción en que dos marcadores analizados aparecen conjuntamente en la progenie de las células receptoras.

Podemos usar las frecuencias de cotransducción para determinar el orden de los genes, trabajando con distancias cortas, pues los fragmentos que admite la transducción son pequeños. Por tanto, la probabilidad de que dos genes bacterianos se incorporen independientemente en el fago, será proporcional a la distancia que los separa, siendo este método válido para genes que estén muy cerca en el cromosoma bacteriano. El ligamiento se expresa como ***nº de cotransd. / nº total de transducciones***. Podemos tener los siguientes datos:

Como podemos observar, la especie menos frecuente será originada por el suceso menos probable, que es la incorporación de los dos marcadores situados en posiciones extremas, de forma que necesitamos cuatro puntos de entrecruzamiento, así podemos determinar el orden real, que es ABC. Las frecuencias relativas de cotransducción son:  $fr(A,B)=308+54/473=0.765$  y  $fr(A, C)=54+1/473=0.116$ .

Como podemos observar, los datos no pueden usarse para determinar la frecuencia relativa de cotransducción entre c y B, pues son datos que corresponden a colonias seleccionadas para el marcador A, no siendo los datos totales. No están representadas todas las posibles clases cotransductantes, como la clase ***aBC***. En la transducción mediremos directamente la frecuencia en que se presentan dos alelos juntos, y cuanto más próximos se encuentran dos genes, más probable es que sean cotransducidos. Es decir, que la **frecuencia de cotransducción** es inversamente proporcional a la distancia física entre genes. Aunque a mayor índice de cotransducción, tendremos más juntos los loci. Por último, destacar que en eucariota, a mayor frecuencia de recombinación implica más lejanía de los genes, cosa contraria a lo que acabamos de ver.

**Transducción especializada:** se da gracias a la acción de algunos fagos que se insertan en regiones concretas del cromosoma bacteriano, de forma que solamente pueden transducir genes que se encuentran alrededor de estos. Un ejemplo es el **fago**, que se integra por recombinación en una región denominada **att** del fago y otra homóloga perteneciente al cromosoma bacteriano y situada entre los genes **gal** y **bio**.

En un momento determinado, una cepa bacteriana **gal+** y **bio+** puede verse **lisogenizada** por el fago lambda, e integrarse en su cromosoma como un profago. Cuando se inicia el ciclo lítico, el fago se libera del cromosoma por entrecruzamiento entre las regiones **att** /**att**. Esta escisión suele ser precisa, de forma que suele reconstruirse el fago, pero puede ocurrir que el punto de entrecruzamiento no se de entre las regiones comentadas, sino entre otras, originándose un DNA circular anormal. Puede entonces perderse una parte del cromosoma del fago, pero en cambio se gane un trozo del cromosoma bacteriano con **gal+**. Así obtendremos una progenie de **fagos transductantes**, que reciben el nombre de **dgál+**, los cuales han perdido una parte de los genes esenciales para el establecimiento del ciclo lítico. Estos fagos necesitarán la ayuda de fagos no defectuosos ayudantes, gracias a los cuales suplirán las funciones requeridas para replicarse activamente.

Ocurrirá lo mismo si el fago se lleva el gen **bio** cuando se libera del cromosoma bacteriano, perdiendo una parte de los genes de su región reguladora necesaria para establecer la lisogenia, pero no del ciclo lítico, de forma que obtenemos fagos transductantes que se pueden replicar líticamente, denominados **pbio+**, en el que la **p** indica la capacidad de formar placas. Esto son **lisados transductantes de baja frecuencia**, porque este

tipo de fagos se obtienen con baja frecuencia. Cuando este tipo de fagos infecta bacterias *gal*<sup>-</sup> produce dos tipos de transductantes. Unos que son **inestables**, en los que un fago *dgal*<sup>+</sup> se integra en el sitio *att* bacteriano y un segundo fago **transductante** normal se integra por entrecruzamiento entre regiones *att* suyas y la del cromosoma bacteriano originada a consecuencia de la inserción previa del fago *dgal*<sup>+</sup>. Quedan así integrados en el cromosoma ambos tipos de fagos, y la bacteria se presenta como heterocigoto *gal*<sup>+/gal</sup><sup>-</sup>.

Se pueden producir un segundo tipo de **transductantes estables**, cuando tan sólo está presente el fago *dgal*<sup>+</sup> y este se integra en la región *att* bacteriana o posibilita el intercambio del gen *gal*<sup>+</sup> por el gen *gal*<sup>-</sup> bacteriano mediante un doble entrecruzamiento.

Partiendo de los transductantes inestables, si se da la inducción de esta cepa, se producen fagos *dgal*<sup>+</sup> en una frecuencia elevada y se obtiene el denominado **lisado transductante de alta frecuencia**. Si usamos este lisado para infectar bacterias no lisogénicas *gal*<sup>-</sup> de forma que sólo un fago infecte a una bacteria, la integración del fago en la zona *att* o por entrecruzamiento entre las regiones *gal* homólogas, produce un transductante *gal*<sup>+/gal</sup><sup>-</sup> estable, ya que falta una parte de los genes del fago encargados de establecer el ciclo lítico.

## RECOMBINACIÓN EN BACTERIÓFAGOS

Si dos fagos infectan a una misma bacteria, se dan las condiciones propicias para poder obtener entrecruzamientos y recombinación en el genoma vírico. Este fenómeno suele denominarse **coinfección**. Obtendremos en la progenie virus que poseerán el **fenotipo parental** y otros individuos que serán recombinantes.

Cuando ocurre la coinfección, si los genomas no mantienen contacto, entonces no podrá darse entrecruzamiento. Podemos hacer mapas según los datos de recombinantes que obtengamos. Usaremos la relación de siempre, **fagos recombinantes/número total de fagos**.

Para determinar esta frecuencia de recombinación debemos introducir las bacterias en un medio líquido, para aumentar la probabilidad de que los fagos entren en la bacteria. Una vez se produce la recombinación, debemos detectarlos, cosa que haremos cogiendo el lisado y poniéndolo en placas sólidas, para observar el fenotipo de la progenie. Observaremos **placas de lisis** o **calvas** (que es la zona donde el fago lisa).

Cabe destacar una diferencia entre procariota y eucariota con el fago, que es que a veces encontramos coeficientes de coincidencia mayores de 1, porque tenemos interferencia negativa. Esto implica que el que se produzca un entrecruzamiento favorece el establecimiento de otro en otro lugar.

Para determinar las **frecuencias de recombinantes**, es conveniente utilizar fenotipos que sean fácilmente identificables, tales como aquellos que producen diferentes placas de lisis.

Uno de los primeros estudios sobre recombinación en fagos, fue llevado a cabo por **Hersey y Rotman** al final de los años cuarenta. Estudiaron fagos **T2** que se diferenciaban en dos características principales; la morfología de las **placas de lisis** (*r*) y el **rango del hospedador** (*h*). Una de las cepas era *h*<sup>+</sup> *r*<sup>-</sup>, mientras que otra era *h*<sup>-</sup> *r*<sup>+</sup>. El alelo *h*<sup>+</sup> capacita para **lisar** sólo la cepa B de E. Coli, mientras que el alelo mutante amplía esta capacidad a la cepa B/2. Por otro lado, el alelo *r*<sup>+</sup> provoca capas de lisis pequeñas y de contornos difusos, mientras que el alelo *r*<sup>-</sup> produce placas de lisis más grandes y de contornos nítidos. Así, al infectar bacterias de un césped formado por una mezcla tanto de tipo B como de B/2, los fagos *h*<sup>-</sup> dan lugar a placas de lisis claras, al infectar y destruir los dos tipos bacterianos, mientras que los fagos *h*<sup>+</sup> producen placas oscuras, porque tan sólo destruyen las bacterias de tipo B.

Para calcular la distancia entre los dos genes, hace falta realizar un experimento de coinfección con las dos cepas. Añadimos a un cultivo bacteriano líquido en concentraciones elevadas para que una gran proporción de bacterias se vean infectadas por los dos tipos de fagos. Una vez dentro de la bacteria, los dos genomas, cuando

se repliquen muchas veces, aumentarán su número y cuando se pongan en contacto podrán producir un fenómeno de entrecruzamiento que, de tener lugar en un punto situado entre los dos genes analizados, dará como resultado dos genomas recombinantes,  $h- r-$  y  $h+ r+$ . Cuando ha finalizado el ciclo, se plaquea la progenie de fagos obtenidos sobre un césped de bacterias para caracterizar el genotipo. En este ejemplo y dadas las características analizadas, el césped ha de contener una mezcla de los dos tipos bacterianos (B y B/2) y a una concentración tal que cada fago infecte una bacteria diferente. Así, cada placa de lisis resultante tendrá el origen en un único fago de la progenie. Solamente hará falta analizar cuantas placas de lisis hay de cada uno de los cuatro tipos, dos parentales y dos recombinantes, los cuales, son fácilmente distinguibles.

Ahora podemos calcular la frecuencia de recombinación como la proporción de placas debidas a genotipos recombinantes respecto al total de placas, y suponiendo que los entrecruzamientos han tenido lugar aleatoriamente a lo largo de todo el cromosoma, esta frecuencia, expresada como porcentaje, puede considerarse como la distancia entre los dos genes.

<b><i>Abc</i></b>	<b>110</b>
<b><i>ABc</i></b>	<b>308</b>
<b><i>AbC</i></b>	<b>1</b>
<b><i>ABC</i></b>	<b>54</b>