

Genética IV: Genética bioquímica

§1. Genética de poblaciones

Disciplina precedida por las leyes propuestas por Hardy y Weinberg (1908).

Supongamos que en una población hay 2 alelos para un mismo gen: A y a.

Alelos: A a

Sólo hay 2 alelos por gen por lo que:

Frecuencia: p q

$$p + q = 1$$

Frecuencia con la que un alelo "A" está en el óvulo (en la hembra) = p

Frecuencia con la que un alelo "a" está en el óvulo = q

		Óvulo			
		A	a		
Esperma	A	AA	Aa	pp	pq
	a	Aa	aa	pq	qq

$$AA = p^2$$

$$Aa = 2pq$$

$$aa = q^2$$

$$AA :$$

$$2pq$$

$$aa$$

$$q^2$$

Ésta es la distribución equilibrada, denominada "equilibrio Hardy-Weinberg".

Si se conocen las frecuencias alélicas, se pueden calcular las frecuencias genotípicas:

$$(p+q)^2 = 1 \quad \boxed{p^2} + 2pq + q^2 = 1$$

En el equilibrio Hardy-Weinberg:

$$AA = p^2$$

$$Aa = 2pq$$

$$aa = q^2$$

Suponiéndolas en equilibrio, las frecuencias alélicas (y, por tanto, las frecuencias genotípicas) no varían con el paso del tiempo. Las frecuencias alélicas tienden a "permanecer constantes" en las poblaciones.

Ejemplo: fibrosis cística (enfermedad autosómica recesiva)

La frecuencia de incidencia de la fibrosis cística en una población es de 1/2000.

Si A = alelo normal o de tipo salvaje y a = alelo de fibrosis cística (enfermedad):

q^2 (individuos afectados) = 1/2000, entonces $q = \frac{1}{44}$, por tanto, $p = 43/44$

Frecuencia de portadores: $2pq = 2(43/44)(1/44) \sim .044 = 1/22$

Por lo tanto, en torno al 5% de la población es portadora.

¿Por qué enfermedades como la fibrosis cística (fc) prevalecen todavía en ciertas poblaciones?

Los heterocigotos portan el alelo mutado. Pueden tener una cierta ventaja, como, por ejemplo, resistencia a la infección del cólera. Por lo tanto, el alelo "a" persiste en la población.

§2. Genética bioquímica

- Archibald Garrod unió un defecto genético a un defecto enzimático.
- La genética bioquímica utiliza la genética experimental para diseccionar la bioquímica.

Sistema experimental:

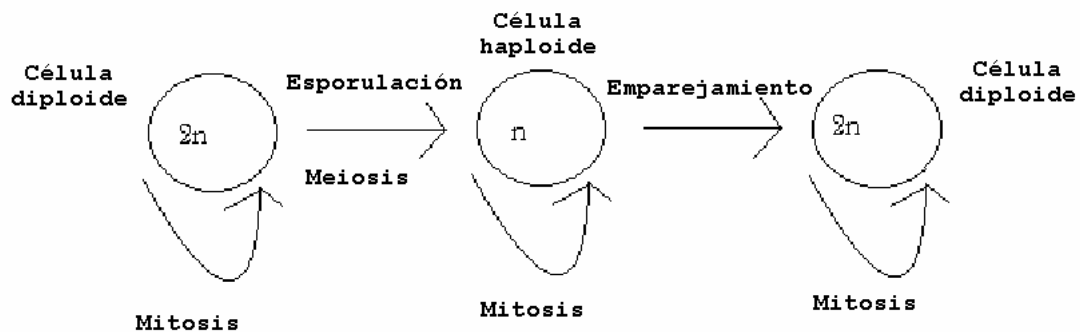
Levadura: hongo unicelular, eucariota (posee núcleo).

Tome una suspensión de células de levadura y colóquelas en un medio sólido de agar en una placa de Petri provista de nutrientes. Con el tiempo, estas células se multiplican dentro del agar formando aglutinaciones visibles denominadas colonias. Cada colonia representa un conjunto de células idénticas que descienden de una célula única colocada en la placa en esa posición.

El ciclo vital de la levadura

La levadura puede crecer como diploide (2n) o como haploide (n).

(n=16 cromosomas presentes en la levadura)



Requisitos de crecimiento:

- La levadura puede cultivarse en un medio mínimo: medio líquido o sólido que contiene una fuente de carbono (un azúcar fermentable como la glucosa, la fructosa o la lactosa), nitrógeno, fósforo y sales.
- La levadura tiene medios biosintéticos para fabricar todos los componentes biológicos que necesita a partir de los nutrientes básicos que le proporciona el medio mínimo.
- La levadura también puede cultivarse en un medio rico: un medio líquido o sólido que contenga nutrientes y macromoléculas complejas. En este caso, las células de la levadura tomarán estos nutrientes del medio en lugar de sintetizarlos.

La levadura puede prescindir de sus mecanismos sintéticos y utilizar aquello que está disponible en su medio mediante la regulación de ciertas enzimas implicadas en dichos mecanismos.

- La levadura puede sintetizar lo que necesita.
- La levadura también puede tomar nutrientes de su medio circundante.

Para comprender estos mecanismos biosintéticos, necesitamos caracterizar las levaduras que carecen de ciertas enzimas, y que por lo tanto no pueden cultivarse bajo determinadas condiciones. Por ejemplo:

¿Cómo aislaría los genes / proteínas implicados en la síntesis de aminoácidos (Ej.: la síntesis de la arginina)?

Podría tratar de encontrar una levadura incapaz de sintetizar arginina: una levadura mutada incapaz de multiplicarse si no se le añade arginina a su medio de cultivo.

Estrategia de búsqueda de la levadura mutada:

- Comience con las células de levadura de tipo salvaje.
- Mute estas células con sustancias químicas o radiación para alterar el ADN.
- Coloque las células mutadas en una placa de Petri en un medio rico en nutrientes.
- Transfiera colonias de levadura a un medio mínimo.
- Busque colonias incapaces de crecer en un medio mínimo, esto es, un mutante que tenga algún tipo de defecto en algún mecanismo biosintético.
- El modo en el que diseñe su búsqueda de la levadura mutada determinará qué tipo de mutantes encuentre.

Una vez haya obtenido una colección de mutantes incapaces de multiplicarse en un medio mínimo sin un suplemento de nutrientes, tiene que determinar cuál es el componente (suplemento nutricional) que necesitan los mutantes para poder crecer en un medio mínimo. Por ejemplo, busque una variedad mutante que no pueda sintetizar arginina:

Colocar la levadura en una placa en un medio rico transferir a un medio mínimo transferir a un medio mínimo CON arginina.

Todas las células crecen y se multiplican en un medio rico. Todas las colonias excepto aquellas que son deficientes en un mecanismo biosintético pueden crecer y multiplicarse en un medio mínimo. Las colonias deficitarias en el mecanismo de síntesis de la arginina pueden crecer en un medio mínimo provisto de arginina. (También podría hacerse selección en un medio rico sin arginina. Las colonias incapaces de crecer en este medio serían mutantes que no pueden sintetizar arginina).

Si hiciésemos pruebas de cultivos de levadura en medios ricos y mínimos, respectivamente, podríamos obtener una variedad de mutantes denominados "auxótrofos".

Definiciones:

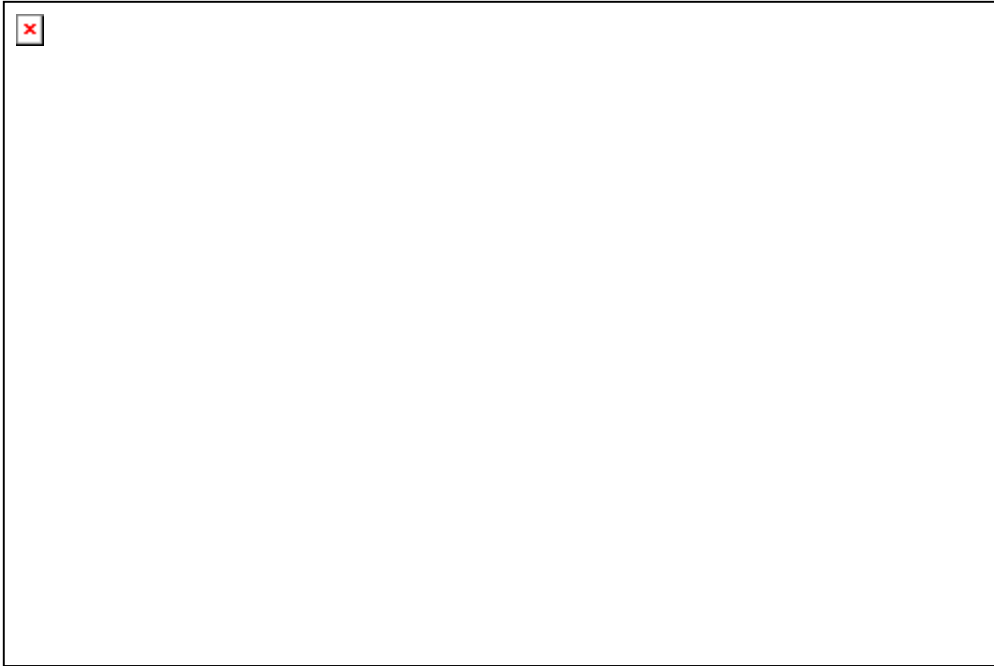
Protótrofos: cepa de tipo salvaje que puede crecer en un medio mínimo.

Auxótrofos: cepa mutante que ha perdido la habilidad para crecer en un medio mínimo.

Los mutantes que fueron aislados y que no pueden crecer en un medio mínimo, pero sí en un medio mínimo provisto de arginina se denominan auxótrofos para la arginina. Pero para analizar un amplio número de células, necesitamos una manera más eficaz para poner a prueba el crecimiento, en función de sus condiciones, y detectar mutantes.

Esther Lederberg desarrolló una técnica denominada replicación en placa (*replica plating*).

Esta técnica consiste en la transferencia de réplicas de colonias (colonias idénticas) entre dos placas colocando un tampón de terciopelo entre ambas placas y presionando ligeramente. Se puede realizar este tipo de criba o búsqueda para aislar mutantes con pérdida de funciones.



Existen dos tipos de procedimientos para buscar colonias con una propiedad o función específica:

1. Cribaje genético: Ver todas las colonias que se reproducen y luego buscar las bacterias incapaces de reproducirse en un medio específico. Búsqueda de mutantes que han "perdido una función" - la habilidad de reproducirse bajo determinadas condiciones.

2. Selección genética: busca colonias capaces de reproducirse en un medio específico. Selección de mutantes que han "adquirido una función": la habilidad de reproducirse bajo determinadas condiciones (condiciones que normalmente no permitirían la reproducción, como la resistencia a los fármacos).

Para estudiar mutantes incapaces de reproducirse en arginina, hay que hacer una colección de auxótrofos para la arginina: mutantes que sólo necesitan arginina para reproducirse en un medio mínimo.

Para obtener estos mutantes, hay que emplear células haploides de levadura: aquellas que sólo tienen una copia (n) de cada gen. No se pueden emplear células diploides ($2n$) porque una mutación en uno de los dos genes no es suficiente para la auxotrofia. Esto se debe a que el nivel de enzimas que se pueden producir a partir de una copia del gen (la mitad de los niveles normales) es suficiente para alcanzar un funcionamiento normal.

Compare las levaduras haploide y diploide:

Haploide: 1 mutación en el gen de la arginina conduce a auxotrofia para la arginina.

Diploide: 1 mutación en el gen de la arginina no conduce a arg auxotrophy ya que el otro gen es wt.

Para ser auxótrofas para la arginina, ambas copias del gen de la arginina tienen que estar mutadas; no es habitual encontrar levadura diploide con dos mutaciones en el mismo gen.

§3. La caracterización de los mutantes

Junte muchas cepas de levadura mutante que sean auxótrofas para la arginina – denomínelas Arg1, Arg2, Arg3, etc.

A continuación, pregúntese lo siguiente: ¿están estos mutantes en el mismo gen o en genes diferentes?

Para saberlo, en primer lugar, pruebe si las mutaciones están causando un fenotipo recesivo.

1. Test de recesividad:

- La pérdida de la función de la encima es normalmente recesiva con respecto al fenotipo salvaje.
- Normalmente, el 50% del producto de un gen es suficiente para mostrar un fenotipo wt con defecto enzimático: normalmente, una copia wt del gen basta para mostrar un fenotipo wt.

Empareje 2 cepas haploides, Arg1 con wt, para generar una célula diploide. Si el fenotipo de la célula diploide resultante es salvaje, entonces el fenotipo asociado con el mutante Arg1 es recesivo con respecto a wt.

2. Test de complementación

Lleve a cabo un test de complementación para determinar si las dos mutaciones diferentes están en el mismo gen o en genes diferentes. Mate dos mutantes haploides para generar una célula diploide y observe el fenotipo del **diploide**.

a) Si las mutaciones están en el mismo gen (esto es, si el gen defectuoso en el mutante Arg1 es el mismo gen que está defectuoso en el mutante Arg2) entonces el diploide resultante será incapaz de reproducirse en medio mínimo. Dado que ambos mutantes portan mutaciones en el mismo gen, el diploide carece de una enzima funcional: el diploide no puede reproducirse si no se le añade arginina a su medio.

**Cuando Arg1 y Arg2 portan mutaciones en el mismo gen y el diploide resultante muestra un fenotipo mutante, entonces los mutantes Arg1 y Arg2 no se complementan mutuamente. Se dice que están en el mismo grupo de complementación.

b) Si las mutaciones están en genes diferentes (esto es, si el gen defectuoso en el mutante Arg1 es un gen diferente al defectuoso en el mutante Arg2), entonces el diploide resultante se reproducirá en medio mínimo. Cada mutante tiene una mutación en un gen diferente; por lo tanto, el mutante posee todas las encimas funcionales y puede reproducirse en medio mínimo.

**Cuando Arg1 y Arg2 portan mutaciones en genes diferentes y el diploide resultante muestra un fenotipo salvaje, entonces los mutantes Arg 1 y Arg2 se complementan mutuamente. Se dice que están en grupos de complementación diferentes.

En general, las mutaciones en genes diferentes se complementan entre sí, se restaura la prototrofia en el diploide (cada mutante rescata el defecto de los otros).

Se puede realizar un test de complementación entre diferentes haploides y crear una tabla:

	Wt	Arg1	Arg2	Arg3	Arg4
Wt	+	+	+	+	+
Arg1	+	-	-	+	+
Arg2	+	-	-	+	+
Arg3	+	+	+	-	-
Arg4	+	+	+	-	-

"+" significa complementación, el diploide tiene fenotipo salvaje.

"-" significa no complementación, el diploide tiene fenotipo mutante.

*Observe que todos los mutantes son recesivos con respecto al tipo salvaje.

Los mutantes 1 y 2 no se complementan: por lo tanto, están dentro del mismo grupo de complementación y se supone que están en el mismo gen.

Los mutantes 3 y 4 no se complementan: por lo tanto, están en grupos de complementación diferentes y se supone que están en el mismo gen.

Los mutantes 1 y 4 se complementan: por lo tanto, se supone que están en genes diferentes.

La tabla anterior sugiere que hay dos grupos de complementación o, probablemente, dos genes implicados en la síntesis de la arginina.