

2. Genética bacteriana.

Mecanismos de variación genética en las bacterias.

Aunque las bacterias se reproducen por un proceso asexual (fisión binaria), poseen mecanismos para lograr la variabilidad genética que necesitan para adaptarse a un entorno cambiante. En general existen dos formas de cambiar la dotación genética de una bacteria, **las mutaciones** y la transferencia de fragmentos de ADN de unas bacterias a otras con posterior **recombinación** de los fragmentos adquiridos en el cromosoma o en los plásmidos de las bacterias receptoras.

Conocemos dos formas de recombinación: la recombinación homóloga y la transposición. En la **recombinación homóloga** el fragmento de ADN aceptado es muy similar a una parte del genoma de la bacteria y, tras situarse al lado, se intercambian con él por un mecanismo de rotura, entrecruzamiento y reunión de sus cadenas de ADN (figura 2.2). La transferencia previa a este tipo de recombinación puede ocurrir mediante tres vías: la penetración de ADN desnudo directamente a través de la pared de la célula receptora (**transformación**), mediante un bacteriófago que infecta diferentes poblaciones bacterianas (**transducción**), o por transferencia de plásmidos y en su caso de genes cromosómicos arrastrados por plásmidos desde las bacterias donadoras a las receptoras (**conjugación**) (figura 2.2).

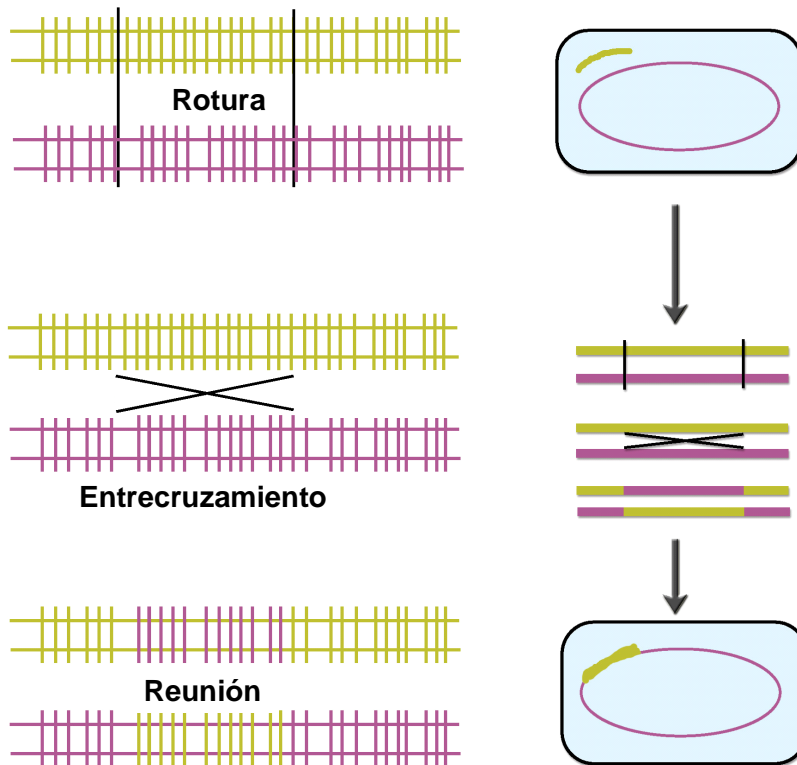
Hoy sabemos que existen también varios tipos de elementos genéticos transferibles (**transposones e integrones**), que pueden integrarse en diversos puntos del cromosoma o en los plásmidos de una bacteria sin necesidad de encontrar fragmentos homólogos, por un mecanismo de transposición o recombinación no homóloga.

Mutaciones

Las mutaciones son **cambios heredables puntuales de la molécula de ADN**. Algunas son sustituciones y, otras, deleciones o adiciones de bases por errores en el proceso de replicación semiconservativa del ADN. Aunque estos errores ocurren con muy baja probabilidad en cualquier proceso de replicación de ADN, para las bacterias son una fuente importante de variabilidad, debido a que son poblaciones muy numerosas con tiempos de generación muy cortos. Además, la mutación de ciertos genes relacionados con la propia replicación (genes mutadores), conduce a un aumento drástico de la tasa de mutación de cualquier otro gen.

Algunas mutaciones no tienen efecto en el fenotipo (mutaciones silentes), pero otras, al modificar una proteína estructural o un enzima, dan lugar a cambios fenotípicos. Las mutaciones que ocurren en bacterias patógenas pueden **modificar su virulencia** si conducen a cambios en antígenos superficiales que no serán reconocidos por la respuesta inmune preexistente. Otras mutaciones importantes son las que **umentan la resistencia** de la cepa mutada frente a uno o varios antimicrobianos.

En todo caso las bacterias mutantes solo serán seleccionadas y sustituirán a la cepa original cuando la característica adquirida por mutación represente una ventaja frente a **condiciones selectivas** del entorno.

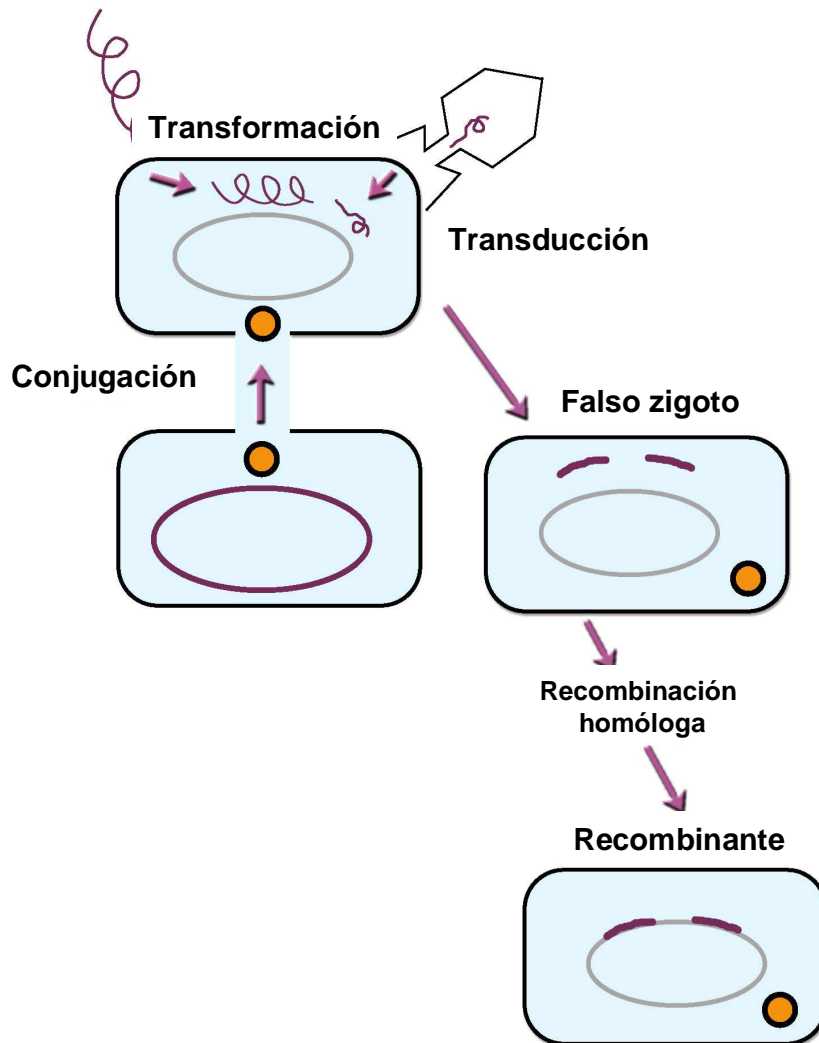


2.1.figura: Mecanismo de recombinación homóloga. Las secuencias homólogas se acercan, sus extremos se rompen, se entrecruzan y se reúnen.

Recombinación homóloga

A través de la recombinación las bacterias pueden adquirir varias características a un tiempo y evolucionar así más rápido que mediante mutaciones.

Para hacer posible la recombinación homóloga previamente han de transferirse los **fragmentos de una bacteria donadora al citoplasma de la receptora** que se convierte en **parcialmente diploide**.



2.2. figura: Bacterias parcialmente diploides (falsos zigotos) pueden obtenerse por transformación, transducción o conjugación.

En todo caso estas recombinaciones son la excepción y no la regla porque cada especie posee sus **sistemas de seguridad** para protegerse de la entrada de de fagos y plásmidos y mantener así su identidad. Se trata de enzimas que introducen modificaciones químicas para marcar y proteger el ADN propio y destruyen toda molécula ajena que no esté marcada por ellas. Estos sistemas restringen el rango de transferencias o intercambios de información entre especies y se denominan **enzimas de restricción**.

En este curso aprendemos a emplear estos enzimas para identificar fragmentos de ADN bacteriano relacionados con la virulencia o con la resistencia a los antibióticos.

Transformación

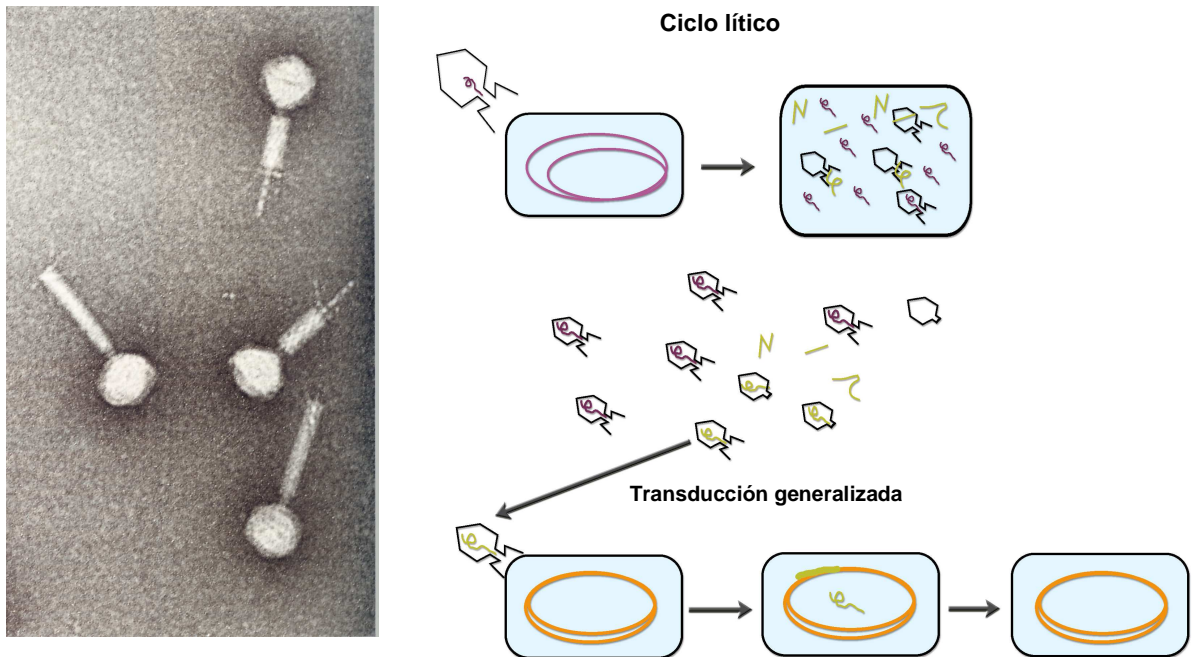
En la transformación la bacteria receptora acepta **moléculas desnudas de ADN** que penetran por su pared desde el medio externo. De forma natural podría ocurrir cuando las bacterias receptoras comparten su ecosistema con una población de bacterias donadoras que muere y cuyos cromosomas se fragmentan. El ADN desnudo es

destruido rápidamente por DNAsas que son enzimas muy frecuentes en muchos medios, por lo que la probabilidad de que ocurran transformaciones naturales es pequeña. Además la pared de la célula receptora debe estar relativamente permeable para dejar pasar fragmentos de ADN. Suelen ser **competentes**, es decir, capaces de sufrir transformación las especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Bacillus*. Sin embargo en el laboratorio puede forzarse la competencia mediante cambios en la concentración de calcio del medio. Esta técnica se emplea para introducir en la bacteria moléculas mixtas de **ADN recombinante** de las que interesa obtener copias (**clonación**).

Transducción

En la transducción son los virus **bacteriófagos** los que llevan un fragmento de ADN de la bacteria donadora hasta el citoplasma de la receptora. Los bacteriófagos son virus que se reproducen en el interior de las bacterias. Para infectarlas inyectan su ADN en el citoplasma dejando fuera la cápside del fago. Después paralizan la replicación de la bacteria, cuyo ADN comienza a degradarse, replican el ADN del virus y traducen la información precisa para sintetizar nuevas cápsides que se ensamblan rodeando a las copias de ADN fágico. Para liberar los nuevos bacteriófagos lisan la bacteria infectada. A veces, durante estos ciclos líticos se introduce por error en una cápside de bacteriófago ADN de la bacteria infectada. Estas partículas pueden iniciar la infección de otra bacteria y le inyectan de forma automática el ADN que portan. Como en estos casos no es inyectado el genoma completo del virus, la bacteria no muere y puede recombinar el fragmento adquirido. Cualquier gen de la bacteria donadora tiene igual probabilidad de ser transducido y posteriormente recombinado a través del proceso descrito que se denomina **transducción generalizada** (figura 2.3.).

Algunos bacteriófagos son capaces de circularizar e integrar su ADN en el cromosoma de la bacteria infectada iniciando así un **ciclo lisogénico**, en el que no hay lisis ni se producen nuevas partículas víricas, pero el genoma del virus se reproduce junto al de la bacteria a la que puede proporcionar nuevos factores de virulencia. Por ejemplo la capacidad de sintetizar las exotoxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y de *Streptococcus pyogenes* depende de que las cepas estén infectadas por fagos lisogénicos. El proceso en todo caso es reversible y de tiempo en tiempo el virus se libera del cromosoma e inicia un ciclo lítico. En este proceso también hay errores y a veces el genoma del **fago lisogénico arrastra consigo alguno de los genes bacterianos adyacentes** a su punto de integración que siempre es el mismo. Por eso los fagos así generados transducen con alta probabilidad estos genes y no otros a través de lo que se denomina **transducción especializada**.

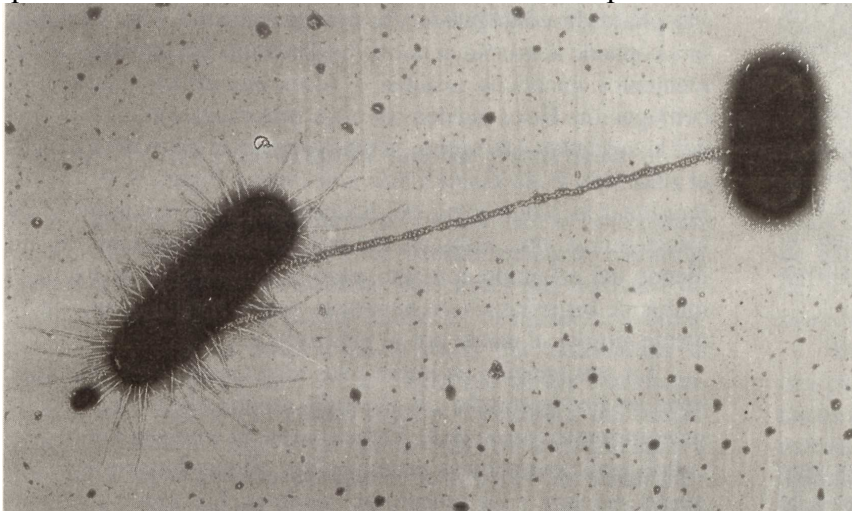


2.3.figura: Bacteriófago inyectando su ADN en el citoplasma de una bacteria (izquierda) y desarrollo de la transducción generalizada (derecha).

La transducción ocurre de forma natural en muchas bacterias patógenas especialmente entre las Gram positivas.

Conjugación

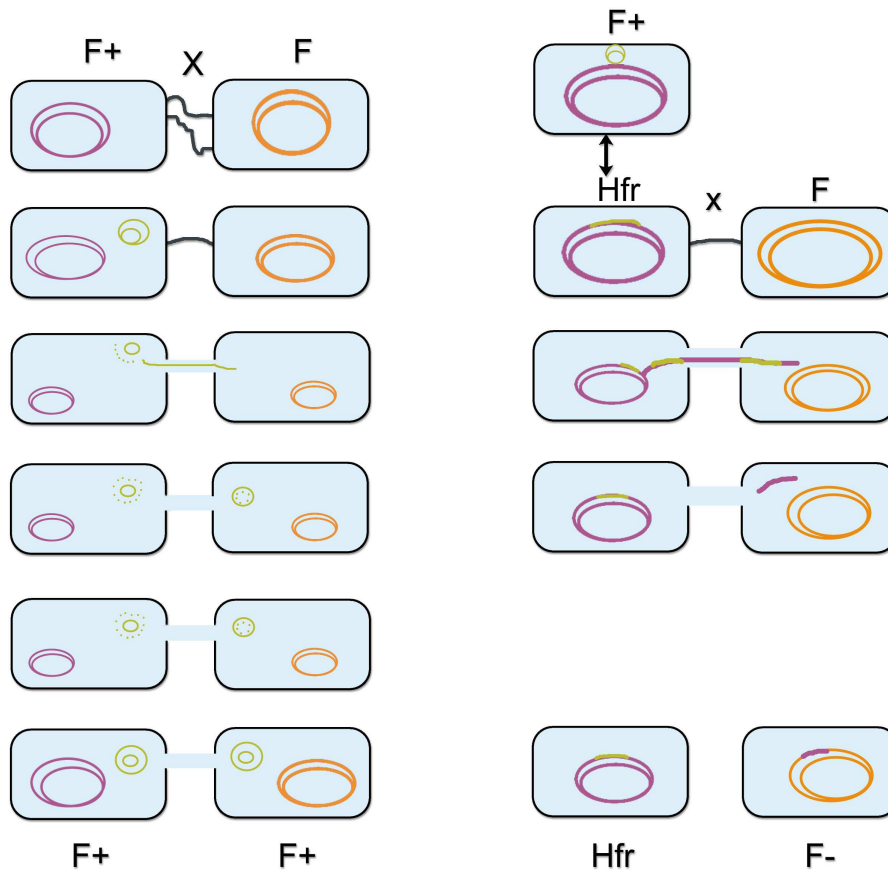
Para conjugar tiene que existir **contacto físico entre la bacteria donadora** de ADN y **la receptora**. La capacidad de donar la proporciona el poseer un plásmido conjugativo que también se denomina factor de fertilidad o plásmido sexual.



2.4.figura: Conjugación de dos bacterias Gram negativas a través de un pili sexual.

La conjugación entre bacterias Gram negativas suele ocurrir a través de **pili sexuales codificados** por el plásmido conjugativo (figura 2.4.). Entre éstos el mejor estudiado es el **plásmido F** de *Escherichia coli*. Las bacterias que lo poseen (F+) sintetizan 2 o 3 pili con los que contactan con bacterias receptoras y se acercan a ellas. Entonces el plásmido F se rompe por un lugar fijo (el origen de transferencia), y una de sus cadenas pasa a través del puente citoplásmico creado por el pili, hasta el citoplasma de la célula

receptora. Mientras tanto la otra gira en el citoplasma de la donadora (mecanismo del círculo rodante). En ambos citoplasmas se van sintetizando las cadena complementarias de forma que al final del proceso ambas bacterias poseen un plásmido F completo (figura 2.5.). Por tanto **la conjugación convierte a la bacteria receptora (F-) a su vez en donadora (F+)**, lo que acelera el proceso de extensión del plásmido, y puede ocurrir entre bacterias de la misma o de diferentes especies relacionadas. Por eso cuando los genes que proporcionan resistencia a los antibióticos están en plásmidos conjugativos **se extienden muy rápidamente** a través de **diversas especies patógenas**.



2.5.figura: Conjugación: transferencia del plásmido F (izquierda), e integración del plásmido F con posterior transferencia del episoma (Hfr) (derecha).

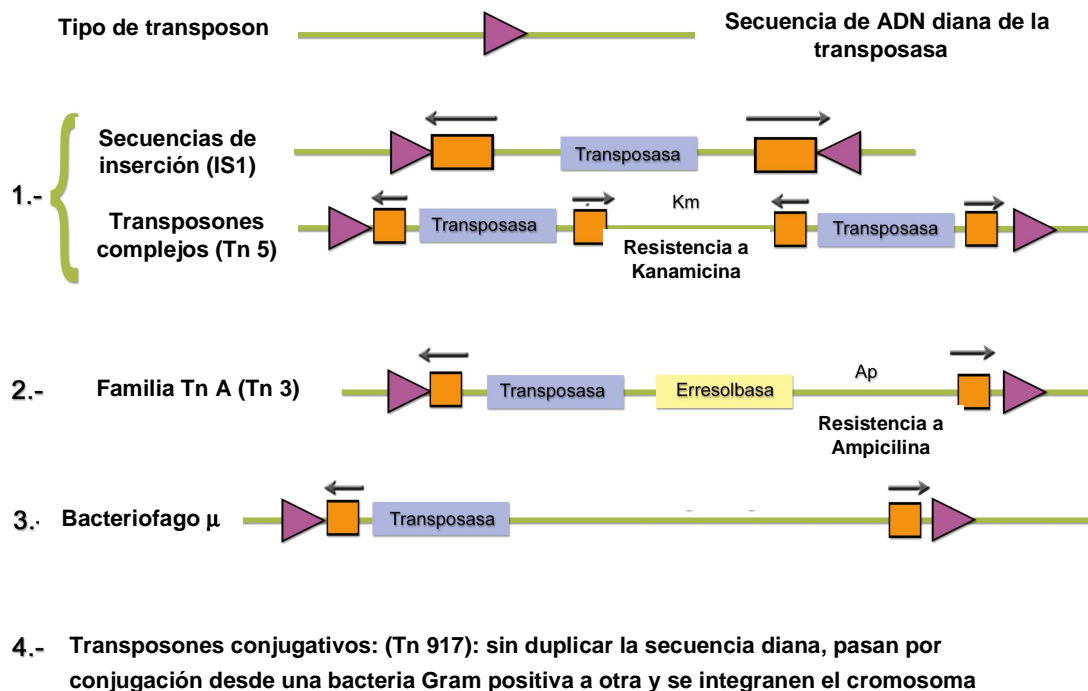
El plásmido F, como otros plásmidos conjugativos, puede integrarse en el cromosoma en forma de **episoma Hfr** (high frequency of recombination). Si estando integrado se inicia un proceso de conjugación, el episoma se abre por su origen de transferencia y comienza a pasar a través del pili sexual arrastrando a su vez los genes cromosómicos próximos a su punto de integración. Como estos puntos (integración y transferencia) no coinciden, pasa primero una parte del plásmido y para que este se complete en la bacteria receptora debería pasar antes el cromosoma completo, lo que tardaría unos 100 minutos en ocurrir. Los puentes citoplásmicos suelen romperse mucho antes por lo que cuando una bacteria Hfr conjuga con una F- no suele convertirla en F+. Sin embargo las donadoras Hfr transfieren **genes cromosómicos, con mayor frecuencia** cuanto mas cerca estén del punto de integración. Este hecho ha permitido realizar **mapas**

cromosómicos basados en experimentos de **conjugación interrumpidos** en diferentes tiempos.

Cuando un episoma Hfr se libera del cromosoma a veces el proceso es impreciso e incluye algún gen cromosómico próximo al punto de integración del plásmido. Así se forman los denominados **plásmidos F'** que en procesos de conjugación se autotransfieren y transfieren siempre los genes cromosómicos arrastrados.

Recombinación no homóloga o transposición

Los **transposones** son fragmentos de ADN capaces de **moverse desde unas moléculas de ADN** a otras siempre que posean determinadas secuencias dianas que permiten su integración, sin necesidad de que exista una homología de secuencias. Pueden encontrarse integrados en cualquier elemento genético replicativo o replicón, tanto en cromosomas como en plásmidos. Todos los transposones poseen al menos la capacidad de provocar su transposición o salto hacia otro elemento genético porque poseen entre otros el gen que codifica una **transposasa**, enzima clave para duplicar la **secuencia diana** y permitir la integración del transposón. A veces la transposición es replicativa y una copia del transposón se queda mientras otra se incluye en la diana. Otras veces no se replica sino que se libera de un replicón y se integra en otro. Algunos transposones incluyen **genes de resistencia a antibióticos** que se extienden así del cromosoma a los plásmidos o de un plásmido a otro lo que **favorece enormemente su diseminación** entre diversas especies de bacterias patógenas.



2.6. figura: Algunos tipos de transposones.

Tipo 1. Pertenecen a este grupo tanto los transposones más simples que son solo **secuencias de inserción (IS)** como transposones complejos relacionados con dichas secuencias IS. Hay secuencias de inserción de diferentes tamaños (780-1500 pares de bases), siempre flanqueadas por **dos extremos cortos repetidos** pero en sentido inverso (15-25 pares de bases). La información incluida entre estos extremos repetidos codifica

para la transposasa. **Los transposones complejos**, como el **Tn5** que codifica la **resistencia a kanamicina**, portan información para otras muchas funciones no relacionadas con la transposición entre dos secuencias de inserción. Este tipo de transposones codifican varias **adhesinas, toxinas y resistencias a antibióticos**.

Tipo 2. Son la familia de los **Tn A**. Tienen **largas secuencias repetidas** en los extremos (35-40 pares de bases) pero sin secuencias de inserción. La información que incluyen entre ellos codifica la transposasa y una resolvasa. Pertenece a esta familia el **Tn 3** que codifica **resistencia a ampicilina**. La extensión de este tipo de transposones en poblaciones de *Haemophilus* y *Neisseria gonorrhoeae* les ha convertido en resistentes a ampicilina a lo largo de las últimas décadas.

Tipo 3. A este grupo pertenece el **bacteriófago mu** y otros **fagos lisogénicos**. El bacteriófago completo se comporta como un transposón y su **transposición es replicativa**.

Tipo 4. En bacterias Gram positivas se ha descubierto otro tipo de transposones que son **conjugativos**. No duplican su secuencia diana al integrarse, se liberan del cromosoma de la bacteria donadora y pasan al citoplasma de la receptora por conjugación, integrándose después en cualquier lugar del cromosoma receptor. A este tipo pertenece el **Tn917** que codifica **resistencia a tetraciclina**.

Expresión de la información genética de las bacterias: regulación

La información contenida en la secuencia de bases de cada gen o grupo de genes relacionados del cromosoma o de los plásmidos se **transcribe** en un **ARN mensajero**; posteriormente, ya en el citoplasma, para expresar esas características en el fenotipo de la bacteria, esa información **se traduce a proteínas** (secuencias de aminoácidos) a través del **código genético**, que relaciona cada triplete de bases con un aminoácido.

La expresión de uno u otro gen está muy bien **regulada** en las bacterias y solo se traducen los genes cuando las correspondientes proteínas son necesarias. Para simplificar esta regulación varios genes implicados por ejemplo en una misma vía metabólica, se colocan uno tras otro en el genoma formando una única unidad de regulación u **operón**. El sustrato a degradar suele ser el que **activa** el operón, de forma que en su presencia se sintetizarán todos los enzimas de la vía y la transcripción de todos estos genes se **inhibirá** a un tiempo, cuando la concentración del producto generado por esa vía sea suficientemente elevada.

Algunos procesos se regulan a un nivel superior, activando o inhibiendo varios operones de forma coordinada. Se dice entonces que estos operones forman **un regulón** (una unidad de regulación superior). Esto permite a bacteria responder rápidamente para adaptarse a un factor que cambia en su entorno porque **un único estímulo** externo (escasez de un nutriente, estrés osmótico,...) o interno (la concentración de determinada proteína o ión) activa o inhibe varios operones. Cuando el estímulo es externo debe ser transmitido por alguna **proteína sensora** capaz de transmitir la señal reguladora a través de la membrana hacia el citoplasma. *Shigella* por ejemplo sintetiza, o reprime, la síntesis de factores de virulencia que le permiten invadir la pared intestinal según la temperatura externa. La escasez de hierro disponible en un tejido activa los genes de virulencia de algunas bacterias patógenas como ocurre con la síntesis de exotoxina A en *Pseudomonas*.

Las proteínas sensoras pueden servir también para recontar efectivos en la población de bacterias patógenas (**quorum** sensing), y mediante **intercambio de señales** intercelulares, los genes relacionados con la virulencia pueden activarse, o reprimirse a la vez en todas las bacterias de una misma población, en función de su tamaño. Esto proporciona a la especie patógena mayor probabilidad de éxito frente a las defensas del huésped cuando inicia un proceso infeccioso.