

Contingut de les classes de Microbiologia. Primer curs.

# Genètica bacteriana. Tecnologia del DNA i genòmica.

Grau de Ciència i Tecnologia dels aliments i Grau de Veterinària

F. Javier Cabañes

Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.

## Contingut

<b>Metodologia docent de les classes teòriques .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Genètica bacteriana.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Introducció i avenços històrics .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Estructura i funció del gen bacterià .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Cromosoma bacterià, genoma i genotip .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Mutacions: tipus i efectes.....</b>	<b>6</b>
1.4.1. Mutacions puntuals.....	7
1.4.2. Mutagènesis i detecció i aïllament de mutants.....	8
1.4.3. Mutàgens químics .....	9
1.4.4. Mutàgens físics: radiacions i reparació del DNA .....	10
<b>1.5. Regulació de l'expressió gènica .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Intercanvi genètic entre bacteris.....</b>	<b>12</b>
1.6.1. Transformació.....	12
1.6.1.1. Transformació natural .....	12
1.6.1.2. Transformació artificial.....	13
1.6.2. Transducció.....	13
1.6.2.1. Transducció generalitzada .....	13
1.6.2.2. Transducció especialitzada.....	14
1.6.3. Conjugació .....	14
<b>1.7. Plasmidis .....</b>	<b>14</b>
1.7.1. Plasmidis conjugatius .....	15
1.7.2. Plasmidis de resistència.....	15
1.7.3. Altre tipus de plasmidis .....	15
<b>1.8. Transposons .....</b>	<b>16</b>
<b>1.9. Recombinació genètica.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Tecnologia del DNA recombinant .....</b>	<b>17</b>
2.1. Enzims de restricció.....	17
2.2. Construcció i clonació de plasmidis recombinants .....	18
2.3. Transcriptasa inversa .....	18
2.4. Vectors de clonació .....	19

2.5. Polimerasa Taq i PCR.....	19
3. CRISPR-cas9: una nova tecnologia d'enginyeria genètica .....	19
4. Genòmica i microorganismes .....	20
4.1. Determinació de les seqüències del genoma .....	20
4.2. Anotació dels genomes .....	20
Bibliografia.....	21
Exemples de preguntes de tipus test.....	22

### **Metodologia docent de les classes teòriques**

En aquest curs, a les classes teòriques es realitzarà una introducció a la classe inversa, en el que s'inclouran dubtes o preguntes que els estudiants o els professors vulguin realitzar sobre els temes tractats. Els resums dels continguts a tractar en els diferents blocs es depositaran al Campus virtual abans de les diferents classes programades. Aquests resums poden incloure preguntes, recomanacions bibliogràfiques concretes dels llibres que els estudiants tinguin en obert, així com de altres fonts com publicacions i pàgines web, que es puguin consultar en obert. Els estudiants després de rebre aquesta informació la treballen i l'assimilen individualment. A la classe els estudiants proposen als professors els seus dubtes i preguntes sobre el material rebut. També poden donar respostes a les preguntes prèviament plantejades pel professor. El professor explica el contingut del tema i dona resposta als dubtes i preguntes dels estudiants.

**Important: Tots els vostres dubtes, les preguntes, les figures i els experiments, els podem comentar a la sessió d'aula corresponent.**

## 1. Genètica bacteriana.

### 1.1. Introducció i avenços històrics

Podríem assenyalar un gran nombre d'avenços històrics des de que Mendel entre d'altres, varen iniciar la disciplina de la genètica. Aquesta ciència estudia els fenòmens de la herència i la variació de les espècies. En aquest camp, són ben coneguts els estudis que va realitzar Mendel amb pèsols en el segle XIX. Potser alguns dels avenços posteriors més destacables són la determinació de la estructura del DNA per Watson i Crick i la elucidació del codi genètic per diferents investigadors a mitjans del segle XX.

A finals del segle XX, la introducció de les tècniques de seqüenciació ràpida (1977) i automatitzada del DNA (1986) són també fites destacables. No obstant, malgrat el seu nom, aquestes tècniques de seqüenciació eren tedioses i no gaire ràpides. Actualment un dels avenços que està revolucionant moltes disciplines científiques es relaciona amb les millores aconseguides en les tècniques de seqüenciació, que ens permeten conèixer amb precisió i en poc temps els genomes complets de diferents tipus de cèl·lules i virus.

El primer genoma cel·lular va ser seqüenciat al 1995 amb una tècnica anomenada seqüenciació aleatòria de genomes complets ("whole-genome shotgun sequencing") que permetia per primera vegada la seqüenciació de fragments llargs de DNA. Es va realitzar amb el bacteri *Haemophilus influenzae* i contenia 1,8 milions de parells de bases (Mb). Uns anys després, al 2000, es va presentar la seqüència esborrany del genoma humà. Aquesta tasca es va realitzar amb la col·laboració de diferents laboratoris, principalment dels EEUU, va durar uns 13 anys i va costar més de 2.000 milions d'euros. En aquest cas el genoma contenia aproximadament uns 3.000 Mb.

[Pregunta 1. Per què van ser importants els microorganismes per aconseguir la seqüenciació del genoma de l'home amb aquesta tècnica?](#)

Avui en dia podem seqüenciar el genoma d'una persona en unes poques hores i per menys de 1.000 euros. Les tècniques utilitzades actualment són variades i molt diferents a la tècnica anterior. Reben el nom comú de seqüenciació de nova generació, massiva o d'alt rendiment ("Next generation sequencing").

Per emmagatzemar tota aquesta gran quantitat d'informació, generada amb la seqüenciació de gens i genomes de milers d'espècies de organismes, és necessària l'existència de les bases de dades públiques, un altre avenç destacat en aquest camp. Són exemples el GenBank (EEUU), el DDBJ (Japó) i el EMBL (Europa).

Són moltes les fites aconseguides en el camp de la genètica utilitzant els bacteris com a model d'estudi. Algunes d'aquestes les estudiarem en aquest bloc. Entre els avantatges de treballar amb bacteris per fer estudis genètics podem destacar el fet que presenten un baix temps de generació, en comparació amb d'altres models, com els pèsols o les mosques del vinagre, i a més a més, tenen un material genètic molt més senzill. A partir d'una cèl·lula bacteriana, en poques hores podem tenir una població de milers de cèl·lules "idèntiques", que anomenem clon o soca.

**Pregunta 2.** Encara que la definició de clon o soca inclou el fet de que aquesta població estigui formada per cèl·lules idèntiques, ¿realment poden ser tan idèntiques totes les cèl·lules d'un clon o soca?

Entre els inconvenients de treballar amb bacteris en estudis genètics podem destacar que degut a la mida petita que presenten hem d'estudiar poblacions. També, com veurem més endavant, no presenten una reproducció sexual convencional, com sí tenen altres models eucariotes utilitzats per fer aquest estudis. Aquesta reproducció sexual no convencional, la hem d'entendre com el intercanvi de material genètic que es produeix entre els bacteris.

Per poder continuar amb aquests temes hem de recordar i repassar alguns conceptes bàsics sobre la estructura i funció del DNA i el RNA, que ja coneixeu. Breument, el DNA està format per dos cadenes formades per seqüències complementaries de 4 nucleòtids diferents, adenina (A), guanina (G), timina (T) i citosina (C). D'aquesta forma, una cadena pot servir de motlle per formar la cadena complementaria. El RNA és similar al DNA. En aquest cas, la desoxiribosa es substitueix per ribosa i T per uracil (U), sent en aquest cas U la base complementària de A. Per un altre banda, la seqüència de triplets de nucleòtids del DNA codifica la seqüència d'aminoàcids en les proteïnes i determina el codi genètic.

**Pregunta 3.** Què vol dir que existeix una degeneració del codi genètic?

També hem de recordar el dogma de la biologia molecular proposat per Crick al 1958, que detalla com funciona el flux de la transmissió de la informació genètica. Aquesta informació va de DNA a RNA, per un procés que s'anomena transcripció i de RNA a proteïnes, pel procés de traducció. Així mateix, del DNA s'obtenen còpies pel mecanisme de replicació, que permet que la informació genètica passi d'una generació a la següent. No obstant, avui en dia coneixem que els virus de RNA també es repliquen perquè la seva informació genètica passi d'una generació a la següent, i alguns d'ells, com els retrovirus, passen la informació de RNA a DNA.

## **1.2. Estructura i funció del gen bacterià**

Si bé la definició clàssica de que un gen conté la informació per la síntesi d'una proteïna és prou gràfica i aclaridora, hem de pensar que les proteïnes poden estar formades per diferents polipèptids, productes de diferents gens. Una definició més actual seria aquella en la que un gen es defineix com aquella seqüència de nucleòtids que codifica un producte funcional com un polipèptid, rRNA o tRNA. Com ja veurem més endavant, conté seqüències que ni es transcriuen ni es tradueixen, que estan relacionades amb funcions de control (p.e. regions reguladores, promotors,...).

La estructura gènica dels procarïotes i els virus és molt diferent de la dels eucariotes. En el cas dels bacteris, la informació normalment es continua, sense incloure seqüències no codificants, anomenades introns, que són freqüents en els eucariotes. Es pot produir la transcripció de dos gens adjacents conjuntament, formant un mRNA policistrònic o poligènic (Veure figura 4.25 del llibre 2). Posteriorment, els dos polipèptids es separen en el procés de traducció. En el cas dels eucariotes, moltes vegades els gens contenen la informació codificant (exons) interrompuda per introns. La transcripció produeix un pre-mRNA inicial que inclou exons i introns. Mitjançant un procés de tall i

unió, els introns s'han d'eliminar per formar el mRNA, abans de que es produeixi la traducció (veure figura 4.29 del llibre 2).

Consulta i analitza la figura 13.20 del llibre 1. En aquesta figura es detalla la estructura i funció d'un gen típic bacterià que codifica una proteïna. De les dos cadenes de DNA, només una conté la informació codificadora del gen (cadena codificadora) i té la mateixa seqüència que el mRNA. L'altre cadena (cadena motlle) es complementària i s'utilitza com a motlle per la síntesi del mRNA, durant la transcripció en el sentit 3'--5'. Per exemple:

5' CGCTAAATTCG 3' DNA cadena codificadora

3' GCGATTTAAGC 5' DNA cadena motlle

5' CGCUAAAUCG 3' mRNA

Al principi del gen, es troba un lloc molt important que s'anomena promotor. Aquest lloc té la zona de reconeixement i unió (caixa Pribnow) de la RNA polimerasa, l'enzim que sintetitzarà el mRNA. El promotor té la funció d'orientar aquest enzim a una distància específica del primer nucleòtid on s'inicia la transcripció (+1). Aquesta seqüència del promotor ni és transcrita ni traduïda. També té altres funcions relacionades amb la regulació i l'expressió dels gens. Al final del gen, les seqüències de remolc i de terminació indiquen a la RNA polimerasa el final de la transcripció i es separa del gen.

La seqüència líder del mRNA no es tradueix, però incorpora una seqüència anomenada Shine-Dalgarno que és molt important per determinar l'origen de la traducció del mRNA, orientant la seva unió als ribosomes. La regió codificadora comença sempre amb el triplet AUG, que en els bacteris codifica un aminoàcid modificat que s'anomena N-formilmetionina, que s'utilitza per iniciar la síntesi de proteïnes. La regió codificadora finalitza amb un codó de terminació o sense sentit ("stop") que indica el final de la síntesi de la proteïna i atura la traducció al ribosoma. Situada a continuació, la seqüència remolc no es tradueix però és necessària per la correcta expressió de la regió codificadora del gen.

Els gens poden presentar diferents formes alternatives que s'anomenen al·lells. L'al·lel més habitual que es troba normalment a la natura s'anomena al·lel salvatge. Depenent de la degeneració del codi genètic, un canvi en una única base del gen pot produir que s'incorpori un aminoàcid diferent en la proteïna. Per exemple, es pot donar un canvi de C per T: en el codó al·lel salvatge: CCC (codifica prolina), codó al·lel mutant: CTC (codifica leucina). Un polimorfisme de nucleòtid únic ("SNP: Single Nucleotide Polymorphism") són les formes que presenta un gen degudes a la variació d'una única base i que es presenten amb una determinada freqüència en la població. De vegades aquest petit canvi pot arribar a ocasionar un fenotip diferent i fins i tot una malaltia.

### 1.3. Cromosoma bacterià, genoma i genotip

El cromosoma bacterià és el principal element genètic dels procariotes i conté la major part de la informació de la cèl·lula. Normalment els procariotes tenen un únic cromosoma circular que conté la majoria dels gens. No obstant, alguns contenen dos o tres cromosomes i altres presenten cromosomes linears. Consulta la (figura 4.9, llibre 2). En aquesta fotografia s'observa la gran quantitat de fibres de

DNA alliberades d'una cèl·lula d'*E. coli*, que formen el seu cromosoma. Per fer-nos una idea de les mides d'aquestes estructures, una cèl·lula d'*E. coli* pot tenir aproximadament 1-2µm de llarg per 0,5 µm d'ample. Si estiréssim aquests fils de DNA, mesurarien uns 1-1,5 mm. A la part inferior esquerra, es poden veure dos elements genètics circulars molt petits, que no formen part del cromosoma bacterià. Són plasmidis.

En canvi el genoma d'un bacteri conté tots els gens o material genètic que presenta. Inclou doncs, el cromosoma i els plasmidis, entre altres elements genètics. El genoma d'una cèl·lula d'*E. coli* pot incloure aproximadament 4-5 Mb i uns 3.200 gens. En el cas d'una cèl·lula eucariota, inclouria els cromosomes i els gens dels mitocondris o cloroplasts, entre d'altres elements genètics.

Un concepte relativament nou és el de pangenoma. El pangenoma inclou tots els gens de les diferents soques d'una espècie. Depenent de les espècies, les soques d'una mateixa espècie poden variar considerablement en els gens que contenen. Generalment, el nombre de gens augmenta a mesura que es coneixen els genomes de noves soques d'una determinada espècie. Per exemple, el pangenoma *E. coli* conté aproximadament 20.000 gens. El seu genoma central, o sigui aquells gens presents en totes les soques, està format per menys de 2.000 gens. No obstant, hi ha gens únics, que són aquells que només estan presents en una soca. Per exemple, una soca d'una *E. coli* comensal té 20-30 gens únics. En canvi una soca d'una *E. coli* patògena pot tenir 200-300 gens únics.

#### Pregunta 4. Què poden codificar els gens únics d'una soca patògena d'*E. coli*?

Un altre concepte a recordar és el de genotip. En aquest cas es tracta de la informació genètica o conjunt de gens d'una determinada soca d'un bacteri o d'un individu. En canvi el fenotip és el conjunt de característiques observables d'un organisme. En funció d'aquests conceptes podem diferenciar entre variacions genotípiques, també anomenades mutacions, que són aquelles que afecten a la seqüència del DNA i variacions fenotípiques, que són canvis que es produeixen deguts a l'ambient. La utilització de la lactosa per *E. coli* és un clar exemple de variació fenotípica. Tot i tenir el mateix genotip, quan hi ha lactosa en el medi aquest bacteri produeix l'enzim β-galactosidasa, i si no hi ha lactosa en el medi, no es detecta aquest enzim. És un canvi de tipus enzimàtic. També es un clar exemple de regulació de l'expressió gènica que enllaça el genotip d'un organisme amb el seu fenotip i que tractarem més endavant. Aquests canvis deguts al ambient poden ser també de tipus morfològic.

#### Pregunta 5. Pots comentar alguna variació fenotípica de tipus morfològic que hagis detectat a les pràctiques quan has fet l'observació de tincions de bacteris?

### 1.4. Mutacions: tipus i efectes

Les mutacions són canvis permanents i heretables que es produeixen en la seqüència del DNA. Aquests canvis poden produir efectes positius, negatius o no detectables en les característiques que presenta un organisme. També aquests efectes estan en funció de la importància que tingui per la cèl·lula el gen o gens afectats. Podem diferenciar segons el seu origen dos tipus de mutacions. Les mutacions espontànies són les que apareixen a l'atzar en totes les cèl·lules, sense un tractament conegut. Una de

les característiques més destacables és la seva raresa, ja que apareixen en molt baixa freqüència (un mutant per  $10^7$ - $10^{11}$  cèl·lules). Es relacionen principalment amb els errors que apareixen en la replicació del DNA. Altres causes es poden relacionar amb el dany o les alteracions produïdes en el DNA per les radiacions, per els mutàgens endògens generats en el metabolisme cel·lular i per els transposons. Aquests últims, són uns elements genètics que estudiarem més endavant.

Al contrari, les mutacions induïdes són aquelles generades per un tractament amb agents mutàgens. Aquests agents provoquen un dany de forma directa en el DNA, alteren la seva química o interfereix d'alguna forma en el seu funcionament, induint mutacions.

Si el grau d'afectació del DNA és gran, les mutacions s'anomenen macrolesions. Es poden produir per grans delecions, inversions, duplicacions i translocacions en el DNA. Si afecta a un o dos parells de bases, les mutacions poden rebre el nom de microlesions. Les substitucions, delecions o insercions d'un únic parell de bases són les més freqüents i s'anomenen mutacions puntuals.

#### **1.4.1. Mutacions puntuals**

Si la mutació és per substitució d'una única base i el canvi es produeix per una base del mateix tipus químic (p.e. purina per purina o pirimidina per pirimidina) s'anomenen transicions. Són transicions els canvis de G per A o A per G, i C per T o T per C. Una transversió es produeix quan canvia el tipus químic de la base (p.e. purina per pirimidina o a l'inrevés).

Els efectes o conseqüències d'aquestes mutacions en les proteïnes, poden ser diversos, des de no detectar-se fins a arribar a ser no funcional. Depèn de la importància de la proteïna en la cèl·lula, del lloc que es vegi afectat, etc. També pot dependre del tipus de base que s'hagi canviat, en funció de la degeneració del codi genètic. A continuació destaquem alguns tipus.

En una mutació silenciosa canvia la seqüència d'un codó, però no es modifica l'aminoàcid que s'incorpora. Per aquest motiu no detectem cap canvi a la proteïna. Per exemple, un canvi de AGG per CGG codifica el mateix aminoàcid, l'arginina.

En una mutació neutra canvia la seqüència d'un codó i s'inclou un nou aminoàcid. Podem detectar el canvi a la proteïna, però si el nou aminoàcid té la mateixa funció a la proteïna, aquesta no es veurà afectada. Per exemple, un canvi de AAA, que codifica lisina, per AGA, que codifica arginina. Aquests dos aminoàcids tenen la mateixa funció a la proteïna.

En una mutació sense sentit, el nou aminoàcid té un altre funció. Els efectes a la proteïna dependran d'on es produeixi el canvi. No sempre s'afecta la funcionalitat de la proteïna. En una mutació en sentit erroni s'incorpora un codó de terminació. Aquest fet provocarà una aturada primerenca de la traducció, produint-se un polipèptid incomplet.

Algunes mutacions puntuals es produeixen per delecions o insercions d'una única base. Aquestes provoquen el desplaçament del marc de lectura i alteren substancialment la seqüència primària del polipèptid codificat. Per poder entendre els efectes d'aquestes mutacions podem plantejar el següent exemple que utilitza una frase amb paraules de tres lletres en lloc de codons de bases:



**UNAOCAQUECAUDEL CIM**

Descodifiquem

**UNA OCA QUE CAU DEL CIM**

**UNAOCAQUECAUDEL CIM**

Deleció de la lletra **A**

**UNOCAQUECAUDEL CIM**

Descodifiquem

**UNO CAQ UEC AUD ELC IM.**

Es perd el significat

Però, de la mateixa forma, amb una altra mutació addicional podem recuperar en part el sentit inicial de la frase, i en el cas del DNA la seqüència inicial de la proteïna.

**UNOCAQUECAUDEL CIM**

Inserció de la lletra **I**

**UINOCAQUECAUDEL CIM**

Descodifiquem

**UIN OCA QUE CAU DEL CIM**

Es recupera en part el significat

Pregunta 6. Quins canvis produiria a la seqüència d'aminoàcids, la deleció de la primera A de la seqüència de DNA: GACATGAAACATCCC?

#### 1.4.2. Mutagènesi i detecció i aïllament de mutants

Pregunta 7. Amb els coneixements teòrics i pràctics de microbiologia que tens, ¿què faries per detectar i aïllar un bacteri mutant resistent a un antibiòtic?

Hi ha diferents formes de detectar i seleccionar mutants amb més o menys facilitat. Com ja hem vist la freqüència d'obtenció de mutants per mutació espontània es molt baixa (un mutant per  $10^7$ - $10^{11}$  cèl·lules). Per tal d'augmentar la freqüència de mutació s'utilitzen tècniques que inclouen l'ús d'agents mutàgens. Entre els més utilitzats destaquen diferents agents químics o físics, com les radiacions que provoquen diferents tipus de danys al DNA. Al utilitzar mutàgens, la freqüència de mutació es pot incrementar fins a obtenir un mutant per  $10^3$ - $10^6$  cèl·lules. [Consulta i analitza la figura 16.6, del llibre 1,](#) que detalla la obtenció de mutants auxòtrofs per la lisina mitjançant la tècnica de rèplica en placa.

Una vegada hem obtingut el mutant podem aplicar una segona mutació per veure com reverteixen i es recupera el fenotip inicial. Seguint amb l'exemple anterior, podríem obtenir mutants revertents que poden sintetitzar lisina (protòtrofs) a partir d'un nou tractament amb mutàgens dels mutants auxòtrofs per la lisina prèviament obtinguts.

Podem estudiar a nivell molecular com es poden produir aquestes reversions. Per simplificar aquest estudi utilitzarem només un parell de bases. Es produeix una reversió veritable quan el revertent recupera el mateix parell de bases que tenia la soca salvatge:

Tipus salvatge...mutació 1...Mutant...mutació 2...Revertent  
(GC)                      (AT)                      (GC)

Si en el revertent presenta un nou parell de bases, el fenotip original es pot recuperar per la producció d'una mutació silenciosa o una mutació neutra.

També es pot revertir si es produeix una mutació supressora. En aquest cas la segona mutació compensa els efectes de la mutació inicial. Un exemple de mutació supressora serien aquelles que provoquen el desplaçament del marc de lectura, que ja hem estudiat. En aquest cas es tracta d'una mutació supressora intragènica, ja que la segona mutació es produeix en el mateix gen on es va produir la primera mutació de la soca salvatge. A les mutacions supressores extragèniques, la segona mutació es produeix en un gen diferent.

**Pregunta 8.** Com es pot compensar la mutació inicial en un gen amb una mutació supressora extragènica? Descriu un exemple real.

### 1.4.3. Mutàgens químics

Qualsevol agent que alteri el DNA o interfereixi en el seu funcionament pot induir mutacions. A continuació destacarem alguns dels principals agents mutàgens químics i el seus mecanismes d'acció. Els anàlegs de bases són semblants a les bases del DNA però tenen les seves propietats d'emparellament alterades (veure figura 10.7, llibre 2). Per exemple, el 5-bromuracil (5BrU) és un anàleg de la T que pot emparellar-se amb A o G, degut a que la seva molècula pot presentar amb freqüència canvis tautomèrics (formes ceto i enol). Si el 5BrU s'incorpora al DNA durant la multiplicació d'un bacteri pot arribar a produir transicions estables (p.e. de AT a GC: (A T)...(A 5BrU)...(G 5BrU)...(G C)).

Els agents intercalants distorsionen el DNA al inserir-se entre dos bases de la mateixa cadena. Durant la replicació, aquesta distorsió de la cadena provoca l'aparició d'insercions o delecions. Són exemples d'aquests tipus d'agents les acridines i el bromur d'etidi.

Altres agents reaccionen amb el DNA provocant canvis directes a les bases. Per exemple, l'àcid nitrós desamina les bases de DNA. Pot desaminar A i transformar aquesta base a hipoxantina (H) directament a la mateixa cadena. Quan es repliqui el DNA, en dos cicles pot produir una transició: (A T)-(H T)...(H C)...(G C). Altres tipus que podem destacar són els agents alquilants. La metil-nitrosoguanidina és un agent alquilant monofuncional molt potent que afegeix un grup metil a la G i fa que aquesta base

modificada s'aparelli amb T (veure figura 16.4 del llibre 1). També pot funcionar com agent alquilant bifuncional, entrecruant les cadenes del DNA amb enllaços covalents. Altres agents d'aquest tipus són les mostasses nitrogenades i la mitomicina. La cèl·lula, per desfer-se dels efectes d'aquestes mutacions i poder multiplicar-se, ha d'activar enzims que degradin les zones bloquejades del DNA. Aquest mecanisme de reparació del DNA provoca tot tipus de mutacions: transicions, transversions, desfases i macrolesions.

#### 1.4.4. Mutàgens físics: radiacions i reparació del DNA.

Si bé les radiacions ionitzants (p.e. raigs X, raigs gamma) poden produir moltes mutacions a més a més d'altres efectes biològics, la radiació ultraviolada (UV) de 260 nm és fortament absorbida pel DNA. Una de les alteracions que provoca és la formacions de dímers de pirimidines adjacents en la mateixa cadena, habitualment dos T unides per enllaços covalents (T=T) (veure figura 16.5 del llibre 1). Quan el DNA es replica, la DNA polimerasa no sap quina base incorporar en la posició que es troben aquests dímers i es produeixen errors que provoquen moltes mutacions que causen la mort dels bacteris. Si les cèl·lules després de ser irradiades amb radiació ultraviolada de 260 nm, s'irradien immediatament amb llum visible aquestes mutacions es reparen i les cèl·lules tornen a ser viables. Aquest mecanisme de reparació s'anomena fotoreactivació. La llum visible activa la fotoliasa i aquest enzim trenca els enllaços covalents entre les dos bases que desfà els dímers de pirimidina, deixant el DNA intacte. Aquesta reparació està lliure d'errors.

Hi ha molts altres mecanismes de reparació a les cèl·lules. Com alguns d'aquests mecanismes no necessiten la presència de llum s'anomenen de reparació fosca. Entre ells podem destacar les reparacions per escissió. Hi ha dos tipus, la reparació per escissió de nucleòtids i la de bases. Tots dos tipus utilitzen un enfocament semblant: eliminar la part danyada de la cadena DNA mitjançant una endonucleasa i utilitzar la cadena complementaria intacta com a motlle per la síntesi del fragment eliminat de l'altre cadena. [Consulta i analitza la reparació per escissió de nucleòtids \(veure figura 16.9 del llibre 1\)](#). Es considera també un mecanisme lliure d'errors.

La reparació per recombinació (veure figura 16.11 del llibre 1) es produeix quan s'està produint la replicació del DNA i les dos cadenes ja estan separades. Si una de les cadenes té un dímer de T, la DNA polimerasa no pot llegir aquest fragment de la cadena i deixa un forat. La proteïna RecA s'encarrega de tallar el fragment homòleg format en la replicació de l'altre cadena, per omplir el forat que ha deixat el dímer de T. Després el dímer de T es pot corregir pel mecanisme de fotoreactivació, o pel d'escissió.

De vegades els danys que han provocat les mutacions en el DNA són tan grans que és necessari que la cèl·lula activi el mecanisme de resposta global SOS. Participen aproximadament 40 gens (*recA*, *lexA*, *uvrA*, *umuCD*,...). Si l'afectació del DNA és molt gran, els enzims activats eliminen molts fragments de les cadenes. Per reparar aquests fragments ja no existeix la cadena motlle i s'han d'incorporar bases a l'atzar per sintetitzar de nou les cadenes. Això provoca molts errors i conseqüentment moltes mutacions.

#### 1.5. Regulació de l'expressió gènica.

Quan parlàvem de les variacions fenotípiques, hem comentat que la utilització de la lactosa per *E. coli* és un clar exemple de regulació de l'expressió gènica. Quan hi ha lactosa en el medi aquest bacteri

produceix l'enzim  $\beta$ -galactosidasa i si no hi ha lactosa en el medi, no es detecta aquest enzim. D'alguna forma s'han d'activar i desactivar els gens que participen en aquest catabolisme. Per arribar ha conèixer com funcionaven aquest mecanismes de regulació, Monod i col·laboradors al 1940 van fer un munt d'experiments amb *E. coli*, induint mutacions als diferents gens implicats i arribant finalment al concepte de l'operó. Un operó és una unitat d'expressió gènica coordinada dels gens que participen en el catabolisme o biosíntesi d'enzims.

En el cas de l'operó lactosa participen diferents gens: un gen regulador (*lacI*) que sintetitza una proteïna repressora (repressor actiu), un promotor (*lacP*), un operador (*lacO*) i els gens estructurals que codifiquen diferents enzims. Aquest últims són els que codifiquen la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) que transforma lactosa en glucosa i galactosa, una permeasa (*lacY*) responsable de la captació de lactosa i una acetilasa (*lacA*). [Consulta i analitza el funcionament de l'operó lactosa a la figura 14.7 del llibre 1.](#) És un clar mecanisme d'inducció gènica típic dels enzims inclosos en processos catabòlics. En aquests casos els enzims que participen són induïbles ja que només són necessaris quan el substrat està disponible. No es detecten quan el substrat no està disponible i per tant no hi ha inductor. En el cas de l'operó lactosa l'inductor es l'al·lactosa, que es forma quan hi ha lactosa a l'interior de la cèl·lula ([figura 14.2 del llibre 1](#)). L'inductor bloqueja l'acció del repressor i deixa lliure la transcripció dels gens estructurals.

En el cas dels enzims que participen en processos de biosíntesis, com per exemple en la síntesis d'aminoàcids, aquest control és una mica diferent. [Consulta i analitza el funcionament de l'operó triptòfan a la figura 14.8 del llibre 1.](#) Es tracta d'un procés de repressió gènica, on els enzims són reprimibles quan el producte final de la síntesis està en excés (p.e. triptòfan) i no es necessita més quantitat per la síntesis de proteïnes. En aquest cas el repressor que produeix el gen regulador és inactiu i s'activa quan hi ha triptòfan de més, molècula que funciona com a corepressor.

Alguns enzims, que s'anomenen constitutius, es sintetitzen contínuament a una taxa constant, ja que es necessiten sempre. Per exemple els enzims de la glucòlisi, que participen en el catabolisme de la glucosa, font de carboni i energia àmpliament utilitzat a la natura.

**Pregunta 9.** Amb el que hem explicat fins ara sobre la regulació gènica, ¿quin sucre utilitzaria primer una soca de *E. coli* si en el medi de cultiu hi ha glucosa i lactosa?

Hi ha molts més mecanismes de regulació que actuen a diferents nivells (p.e. transcripció, traducció). Alguns són sistemes de regulació global que afecten a molts gens i moltes vies simultàniament. El mecanisme de repressió per catabòlit dona resposta a la pregunta 9. Si una soca de *E. coli* creix en un medi de cultiu amb glucosa i lactosa, utilitzarà primer la glucosa fins que s'esgoti i després continuarà amb la lactosa, activant-se la síntesi de la  $\beta$ -galactosidasa. Aquest patró de creixement s'anomena diàuxic ([veure figura 7.13, llibre 2](#)) i el mecanisme de regulació que participa és el de repressió per catabòlit. La glucosa, la millor font d'energia i carboni per aquest bacteri, s'utilitza primer perquè els enzims que participen a la glucòlisi són constitutius i perquè l'operó lactosa està inhibït per la repressió per catabòlit. Aquest mecanisme inhibeix l'expressió de l'operó quan hi ha molta glucosa en el medi, encara que hi hagi lactosa.

[Consulta i analitza la regulació de l'operó lactosa per la repressió per catabòlit \(figura 14.18 del llibre 1\).](#) El monofosfat d'adenosina cíclic (cAMP) participa com a senyal metabòlica. Quan hi ha molta

glucosa baixa el nivell de cAMP i si baixa el cAMP es produeix la repressió de l'operó lactosa. També participa la proteïna activadora per catabòlit (CAP) que és la receptora de cAMP. Si augmenta el cAMP (nivells baixos de glucosa), la CAP capta cAMP i s'uneix al lloc CAP. Aquest lloc està situat a prop del promotor. La unió del complex CAP-cAMP en aquest lloc, facilita la unió de la RNA polimerasa, estimulament d'aquesta forma la transcripció a nivells màxims. Si no hi ha cAMP (nivells alts de glucosa), no hi ha unió de la CAP amb el cAMP, la CAP està inactiva i no s'uneix al lloc CAP. El nivell de transcripció és baix.

## 1.6. Intercanvi genètic entre bacteris.

A diferència dels eucariotes, els bacteris no presenten reproducció sexual ni meiosis. No obstant, poden incrementar la seva variació genètica utilitzant diferents mecanismes d'intercanvi genètic. Els més coneguts són la transformació, la transducció i la conjugació. Aquests mecanismes s'anomenen col·lectivament transferència horitzontal de gens i són molt importants en els processos d'adaptació i evolució de les espècies.

Durant aquests processos, una porció del DNA de la cèl·lula donadora, l'exogenot, és transferit a la cèl·lula receptora ([consulta i estudia la Figura 16.12 del llibre 1](#)), formant un merocigot, o diploide parcial temporal. El destí de l'exogenot a la cèl·lula receptora pot variar. Es pot integrar a l'endogenot produint un clon de cèl·lules que incorporen aquest nou fragment. Si no s'integra, i té la capacitat de replicar-se a l'interior de la cèl·lula receptora, formarà un clon parcialment diploide. Si no s'integra, i no té la capacitat de replicar-se a l'interior de la cèl·lula receptora, només aquesta última serà un diploide parcial. Per últim, l'exogenot pot ser degradat per nucleases de la cèl·lula receptora. Aquest procés s'anomena restricció d'hoste.

### 1.6.1. Transformació

En aquest tipus d'intercanvi genètic, el fragment de DNA de la cèl·lula donadora està lliure en el medi. Es pot trobar DNA lliure en molts ambients, ja que s'allibera després de la lisi dels bacteris. Com aquest procés és aleatori, qualsevol fragment de DNA pot arribar a posar-se en contacte amb la cèl·lula receptora. Una altra cosa és que arribi a entrar i transformi la cèl·lula receptora. Això depèn del tipus de transformació. Hi ha diferents tipus de transformació. Detallarem un procés de transformació natural i un d'artificial.

#### 1.6.1.1. Transformació natural

Els experiments de Griffith realitzats al 1928 sobre la transferència de virulència en *Streptococcus pneumoniae* són un bon exemple de transformació natural ([consulta i estudia la Figura 13.1 del llibre 1](#)). També van ser pioners aquests estudis per a senyalar que a les cèl·lules hi havia un material que dirigia funcions i que Griffith va anomenar principi transformador. Anys després es va veure que aquest principi transformador era el DNA. En aquests experiments, quan s'injectava una combinació de bacteris virulents morts (soca S, amb càpsula) i una soca no virulenta viva (soca R, sense càpsula), els ratolins morien, i d'aquests animals morts es podien recuperar bacteris virulents vius S. Algunes cèl·lules R s'havien transformat en S. El responsable era un fragment de DNA lliure en el medi que

provenia de les cèl·lules S que codificava la síntesi de càpsula. Aquesta estructura és la responsable de la virulència d'aquesta espècie.

En aquest tipus de transformació natural es necessita que la cèl·lula sigui competent i *S. pneumoniae* ho és. Això vol dir, que aquesta espècie capta DNA lliure i es transforma. No tots els bacteris són competents. Per exemple, *E. coli* no ho és.

En el model de *S. pneumoniae*, les cèl·lules entren en un estat de competència per captar DNA i transformar-se. Per arribar a aquest estat es noten uns canvis en les cèl·lules i s'expressen determinats gens ([consulta la Figura 16.26 del llibre 1](#)).

### 1.6.1.2. Transformació artificial

Encara que *S. pneumoniae* sigui un bon model de transformació natural, no és útil per fer transformacions al laboratori.

**Pregunta 10.** Per què no és útil treballar amb aquest model al laboratori?

En el laboratori podem treballar amb *E. coli* amb un model de transformació artificial. Per millorar els rendiments d'obtenció de cèl·lules transformades s'utilitzen plasmidis, que són més estables que els fragments de DNA lliures, i medis amb  $\text{CaCl}_2$  que fan més permeables les membranes de les cèl·lules al DNA. També es pot augmentar la permeabilitat de les membranes tractant les cèl·lules amb polsos elèctrics d'alt voltatge amb la tècnica de la electroporació. Aquests polsos creen microporus en les membranes que permeten el pas dels plasmidis. Quan acaba la descàrrega, la membrana recupera la seva integritat.

### 1.6.2. Transducció

En aquest cas, l'exogenot passa de la cèl·lula donadora a la receptora mitjançant un bacteriòfag. Per entendre aquest mecanisme de transferència de gens hem de revisar el cicle lític i el cicle lisogènic dels bacteriòfags ([consulta i estudia la Figura 6.16 del llibre 1](#)). Hi ha dos tipus, la transducció generalitzada i la transducció especialitzada.

#### 1.6.2.1. Transducció generalitzada

En aquest cas qualsevol gen de la cèl·lula donadora pot passar a la cèl·lula receptora. Es relaciona amb el cicle lític dels bacteriòfags ([consulta i estudia la Figura 16.28 del llibre 1](#)). En el procés de formació dels bacteriòfags es pot produir un error i un fragment del cromosoma degradat de la cèl·lula donadora s'inclou en un nou bacteriòfag que s'anomena partícula transductora. Aquest bacteriòfag no té la informació genètica del virus i no pot produir un procés lític. Funciona doncs com un transportador de gens des de la cèl·lula donadora. Quan surt d'aquesta, infectarà la cèl·lula receptora amb l'exogenot i es produirà la transducció quan es recomбини amb l'endogenot. La quantitat de DNA bacterià transportat depèn principalment de la mida de la càpsida del bacteriòfag.

### 1.6.2.2. Transducció especialitzada

En aquest cas només alguns gens de la cèl·lula donadora poden passar a la cèl·lula receptora. Es relaciona amb el cicle lisogènic dels bacteriòfags (consulta i estudia la Figura 16.20 del llibre 1). En el procés d'escissió del pròfag del cromosoma de la cèl·lula donadora es pot produir un error i un fragment contigu d'aquest cromosoma (exogenot) substitueix una part del genoma del fag. Els gens que es pugui emportar depèn d'entre quins gens s'integri el pròfag en el cromosoma de la cèl·lula donadora. Quan aquest fag es formi i surti de la cèl·lula donadora, pot arribar a infectar una cèl·lula receptora. Es produirà la transducció quan es recomбини amb l'endogenot.

Podem veure en detall aquest procés a la Figura 16.30 del llibre 1, on es descriu una escissió normal i una amb error en el cas de la lisogènia produïda pel fag lambda i *E. coli*. El pròfag en aquest cas s'integra entre els gens *gal* i *bio* mitjançant la localització i unió en el lloc *att* ("attachment"). Si es produeix un error d'escissió, el fag només es pot emportar algun d'aquests dos gens a costa de perdre part del seu propi genoma. Per aquest motiu aquests fags lambda s'anomenen defectius i poden transportar gens *bio* o *gal* ( $\lambda dgal$  o  $\lambda dbio$ ). Aquests fags quan surtin de la cèl·lula donadora podran infectar una cèl·lula receptora. Es produirà la transducció quan els gens s'integrin amb l'endogenot.

### 1.6.3. Conjugació

En el cas d'*E. coli*, la transferència de gens es pot fer per contacte directe entre dues cèl·lules mitjançant un pèl sexual (pilus) (veure la Figura 16.17 del llibre 1) i un sistema de secreció de tipus IV. Podem distingir dos tipus de cèl·lules donadores, les Hfr ("High Frequency of Recombination") i les F<sup>+</sup>. Aquestes cèl·lules contenen un plasmidi anomenat factor F (F de fertilitat), integrat en el cas de les Hfr i lliure en el cas de les F<sup>+</sup>. Les cèl·lules receptores no tenen aquest plasmidi i s'anomenen F<sup>-</sup>. Una F<sup>+</sup> es pot transformar en Hfr quan el plasmidi F s'integra en el seu cromosoma.

Quan una F<sup>+</sup> es creua amb una F<sup>-</sup>, el plasmidi es replica en F<sup>+</sup> i una còpia passa a la F<sup>-</sup>, convertint-se en F<sup>+</sup> (veure la Figura 16.19 del llibre 1). Quan una Hfr es creua amb una F<sup>-</sup>, com el plasmidi està integrat en el seu cromosoma, mobilitza la transferència de gens fent una còpia dels mateixos i els passa a la F<sup>-</sup> (veure la Figura 16.23 del llibre 1). El nombre de gens que passen de Hfr a F<sup>-</sup> depèn de la durada de la conjugació. La F<sup>-</sup> guanya informació genètica però no es converteix en F<sup>+</sup> o Hfr.

### 1.7. Plasmidis.

Els plasmidis són petits elements genètics que estan formats per una doble cadena de DNA i poden existir de forma independent al cromosoma (veure la Figura 4.9 del llibre 2). Una característica important és que tenen la capacitat de replicar-se de forma autònoma. Aquests elements contenen pocs gens (en general menys de 30) i la informació que contenen no és essencial pel bacteri. No obstant, aquest gens poden conferir una avantatge selectiva en certs ambients. Poden trobar-se des d'una còpia a moltes per cèl·lula. Alguns plasmidis poden integrar-se en el cromosoma i es repliquen amb el cromosoma. Aquests s'anomenen episomes. No tots els plasmidis poden transferir-se d'una cèl·lula a una altra. Comentarem breument alguns tipus.

### 1.7.1. Plasmidis conjugatius.

Els plasmidis conjugatius (plasmidi F) són transmissibles entre bacteris pel procés d'intercanvi genètic de conjugació que acabem d'estudiar. Tenen una mida aproximada de 100 Kb. Aquests plasmidis contenen gens que codifiquen la síntesi del pilus sexual i un sistema de secreció de tipus IV que controlen la replicació i transferència de la informació genètica de la cèl·lula donadora a la receptora. A més a més, contenen seqüències d'inserció (IS) que permeten la integració del plasmidi F en el cromosoma (veure la Figura 16.18 del llibre 1). Aquestes IS poden recombinar-se amb seqüències semblants que es troben en el cromosoma de la cèl·lula i permetre aquesta integració. Les IS proporcionen petites regions d'homologia entre el DNA del plasmidi i del cromosoma, ja que aquests dos elements genètics presenten seqüències de DNA molt diferents.

### 1.7.2. Plasmidis de resistència.

Al 1953, al Japó es va produir una epidèmia per *Shigella dysenteriae*. Aquest bacteri es va fer resistent a molts antibiòtics en un període molt curt de temps. En poc temps es va descobrir un nou tipus d'elements genètics que eren la causa d'aquesta multiresistència: els plasmidis.

**Pregunta 11.** Per què aquesta multiresistència no podia estar produïda per mutacions espontànies?

Els plasmidis de resistència (R) contenen gens que codifiquen la síntesi d'enzims que inactiven l'acció de determinats antibiòtics o els transporten fora de la cèl·lula. També poden desactivar l'acció de determinats metalls que afecten als bacteris. Alguns poden ser conjugatius. Els mecanismes que utilitzen per desactivar els antibiòtics i metalls tòxics són variats. Per exemple, per inactivar la penicil·lina, alguns plasmidis codifiquen una  $\beta$ -lactamasa, que és un enzim que trenca l'anell betalactàmic de la molècula d'aquest antibiòtic (veure la Figura 27.25 del llibre 2). En el cas del metalls poden ser tòxics pels bacteris a determinades concentracions (p.e. Hg). Alguns plasmidis codifiquen enzims, com la reductasa, que redueixen les formes tòxiques oxidades ( $Hg^{2+}$ ) d'aquest metall a  $Hg^0$  que es menys tòxic i volàtil.

Un únic plasmidi R pot contenir diferents gens que codifiquin resistència (determinants de resistència) a diferents agents antimicrobians (p.e. cloramfenicol, sulfamida, estreptomina, ampicil·lina, kanamicina) (veure la Figura 16.31 del llibre 1), i inclús a metalls, com el plasmidi R100 (p.e. Hg) (veure la Figura 4.10 del llibre 2). Quan són conjugatius una part del plasmidi conté els gens que codifiquen la seva transferència (factor de transferència de resistència: RTF; gen *tra* en el plasmidi R100).

### 1.7.3. Altres tipus de plasmidis.

Alguns plasmidis codifiquen bacteriocines, que són proteïnes produïdes per bacteris que inhibeixen o destrueixen altres bacteris estretament relacionats (p.e. soques de la mateixa espècie). Per exemple, els plasmidis Col codifiquen colicines dirigides contra *E. coli*. Algunes colicines s'uneixen a receptors específics i causen la lisi cel·lular. Poden donar un avantatge competitiu al bacteri que els conté. Els plasmidis de virulència contenen gens que codifiquen la síntesi de toxines o que augmenten la



capacitat de resistir les defenses de l'hoste (p.e. soques enterotoxígenes de *E. coli*, toxina tetànica de *Clostridium tetani*, toxina del carboncle de *Bacillus anthracis*).

Els plasmidis metabòlics contenen gens que codifiquen enzims que degraden diferents substàncies (p.e. pesticides, petroli). Poden ser interessants per degradar alguns compostos contaminants a la natura en processos de bioremediació.

### 1.8. Transposons.

Els transposons són segments de DNA que tenen la capacitat de desplaçar-se (saltar) pel genoma de procarïotes i eucariotes. Els més senzills s'anomenen seqüències d'inserció (IS) i contenen només gens necessaris per la seva transposició. Les IS tenen uns 750-1.600 bp necessaris per codificar una transposasa (veure la Figura 10.24 del llibre 2). Es poden detectar per presentar seqüències inversament repetides en els extrems (IR) de uns 10-50 bp. El nombre d'IS en un bacteri varia. Per exemple, determinades soques de *E. coli* tenen fins a 10 còpies. Com ja hem comentat alguns plasmidis també tenen IS.

Els transposons compostos tenen uns 10-15 Kb perquè contenen més gens, a més a més del de la transposasa. També tenen seqüències inversament repetides en els extrems o IS. Poden codificar gens de resistència als antibiòtics, toxines, etc (veure la Figura 10.24 del llibre 2).

La transposició pot ser conservativa o simple quan el transposó, mitjançant la transposasa, s'escindeix d'un lloc del cromosoma i s'insereix en un altre. Només trobaríem una còpia d'aquest tipus de transposó en el cromosoma. En la transposició replicativa, el transposó primer es replica i després salta a un altre lloc del cromosoma. Els llocs diana on s'integren són seqüències específiques d'uns pocs parells de bases (5-9 bp).

Els transposons poden produir diversos efectes importants. Poden produir mutacions al inserir-se en un gen determinat (veure la Figura 10.27 del llibre 2). Participen en la formació dels plasmidis i en la disseminació ràpida de la informació genètica (veure la Figura 16.31 del llibre 1). De fet els plasmidis de resistència múltiple als antibiòtics poden formar-se per l'acumulació de transposons que inclouen gens de resistència diferents, com es pot veure en aquesta figura. Poden saltar d'un plasmidi a un cromosoma i també d'una cèl·lula a una altra, si es de tipus conjugatiu.

### 1.9. Recombinació genètica.

La recombinació genètica és el procés en el que un o més segments de DNA es reorganitzen o combinen i formen una nova seqüència de nucleòtids. Hi ha diferents tipus. Per exemple, en la transformació d'alguns bacteris es produeix un model de recombinació general o homòloga que es dona entre seqüències molt semblants, que s'anomenen homòlogues, en qualsevol lloc del genoma. La regulen els gens *rec* del cromosoma de la cèl·lula.

La recombinació específica de lloc és aquella que es dona en la integració de genomes virals en bacteris (veure punt 1.6.2.1. Transducció especialitzada). Al no existir homologia entre els genomes virals i els dels bacteris, la integració es produeix mitjançant els llocs *att* o d'unió. Aquests llocs són unes seqüències molt petites i homòlogues que presenten tant els fags com els bacteris. En aquest tipus de recombinació intervien enzims codificats pel fag.

La recombinació replicativa és aquella que es dona en el procés de la transposició (veure punt 1.8. Transposons). En aquest tipus de recombinació intervenen enzims codificats pel propi transposó. En aquest cas tampoc és necessari que hi hagi homologia entre els dos tipus de segments de DNA que es recombinen.

## 2. Tecnologia del DNA recombinant

En aquest punt destacarem el paper que tenen els microorganismes en el desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant i l'enginyeria genètica. En primer lloc definirem breument alguns conceptes relacionats que de vegades s'utilitzen indistintament de forma errònia.

-Enginyeria genètica: Modificació deliberada de la informació genètica d'un organisme mitjançant l'alteració directa del genoma.

-Tecnologia del DNA recombinant: Algunes de les tècniques utilitzades a l'enginyeria genètica que es basen en fusionar gens amb vectors per després clonar-los en cèl·lules hoste.

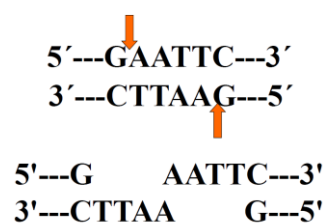
-Biotecnologia: Manipulació d'organismes per obtenir productes útils.

Molts dels reactius utilitzats a la tecnologia del DNA recombinant provenen dels microorganismes. A continuació destacarem alguns d'ells.

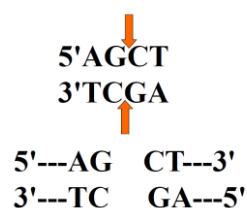
### 2.1. Enzims de restricció.

Per la tecnologia del DNA recombinant ens interessen especialment uns enzims que reconeixen i tallen seqüències específiques d'una longitud de 4-8 pb, que són útils per obtenir clonació de gens. Reben els noms del bacteri productor: p.ex. *EcoRI* (*Escherichia coli*; soca R; enzim I). Veiem un parell d'exemples:

#### Exemple 1: Seqüència i lloc de tall per *EcoRI*.



#### Exemple 2: Seqüència i lloc de tall per *Alu I*.



Pregunta 12. Quines diferències veieu entre aquests dos exemples?

## 2.2. Construcció i clonació de plasmidis recombinants

Consulta i estudia la Figura 17.4 del llibre 1.

Amb **EcoRI** podem tallar un plasmidi i també DNA d'un bacteri per generar els inserts que puguin ser inclosos en els plasmidis vectors. Posteriorment per transformació artificial incloure aquests plasmidis a les cèl·lules de *E. coli*.

Pregunta 13. Amb un plasmidi que només tingués un marcador de resistència a l'ampicil·lina, ¿podríem saber si l'insert s'ha incorporat a la cèl·lula bacteriana?

Existeixen diferents tècniques per detectar si l'insert s'ha incorporat a la cèl·lula bacteriana. Per exemple podem utilitzar el Plasmidi pUC19, que conté dos marcadors: AmpR i lacZ, i el medi Xgal (consulta Figura 17.6 del llibre 1). Com pots veure en aquesta figura el plasmidi té dos marcadors, un gen de resistència a l'ampicil·lina i el gen *lacZ* que codifica l'enzim  $\beta$ -galactosidasa.

Una vegada feta la transformació en cèl·lules de *E. coli*, en el medi Xgal creixen dos tipus de colònies: blaves i blanques.

Pregunta 14. Quines d'aquestes colònies contenen l'insert? Per què?

D'aquesta forma podem obtenir genoteques amb èxit que incloguin diferents inserts que poden representar diversos gens d'interès.

Pregunta 15. Què és una genoteca?

Pregunta 16. En aquest cas, ¿què emmagatzemaria aquesta genoteca?

## 2.3. Transcriptasa inversa

No seria útil fer aquest tipus de clonació amb DNA d'una cèl·lula eucariota.

Pregunta 17. Per quin motiu no seria útil fer-ho?

Pregunta 18. Si ho féssim ¿quin tipus d'inserts obtindríem?

Pregunta 19. Com serien les genoteques?

Per resoldre aquest problema podem utilitzar transcriptasa inversa que és un enzim típic dels retrovirus. Serveix per transformar el seu genoma de RNA a DNA.

Podem utilitzar el mRNA corresponent del gen que ens interessa i com a reactiu previ la transcriptasa inversa, per transformar-lo a cDNA (DNA complementari). Ara sí que podríem fer-ho.

## 2.4. Vectors de clonació

Serveixen per clonar gens i cadascun d'aquest tipus de vectors pot incorporar un insert de diferent mida. A més a més dels plasmidis, s'utilitzen altres vectors com el fag lambda (veure Figura 11.20 del llibre 2), els còsmids, que són vectors plasmídics que contenen el lloc cos del genoma del fag lambda, i els cromosomes artificials bacterians (BAC) (veure Figura 11.21 del llibre 2) i de llevat (YAC) (veure Figura 11.22 del llibre 2). Fixa't amb la diferència de mida les inserts que poden incorporar cadascun d'aquests vectors.

**Pregunta 20.** Quins d'aquest tipus de vectors han estat particularment útils en la seqüenciació del genoma humà?

## 2.5. Polimerasa Taq i PCR (Reacció en cadena de la polimerasa)

Com ja sabeu aquesta tècnica permet sintetitzar grans quantitats d'un fragment de DNA de entre 100 i 5000 parells de bases sense clonar-lo (veure Figura 17.8 del llibre 1). Per fer-ho necessitem, el DNA diana (20 nucleòtids), encebadors en excés, les bases (A,T,G,C) en forma de dNTPs, una DNA polimerasa termostable i un aparell anomenat termociclador. Aquest aparell escalfa i refreda de forma molt ràpida i precisa aquesta barreja de reactius. Al termociclador la temperatura s'eleva per sobre dels 90°C per desnaturalitzar el DNA i separar les cadenes complementaries.

**Pregunta 21.** ¿Podríem utilitzar una DNA polimerasa d' *Escherichia coli* a la PCR?

Necessitem una DNA polimerasa dependent de DNA que sigui resistent a temperatures elevades per copiar el DNA. Per exemple la Taq polimerasa, de *Thermus aquaticus*, bacteri que viu a temperatures superiors a 100°C.

## 3. CRISPR-Cas9: una nova tècnica d'enginyeria genètica.

Les sigles CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) fan referència a unes petites seqüències de DNA que tenen els bacteris i que podem traduir com "repeticions palindròmiques curtes agrupades i regularment espaiades". Aquestes seqüències juntament amb d'altres gens associats, proporcionen un sistema de defensa en els bacteris i arqueus contra la infecció dels virus i altres elements genètics, basat en un mecanisme d'interferència viral. Les petites

seqüències localitzades a CRISPR són un banc de memòria de seqüències específiques de virus, recopilades d'infeccions anteriors, d'uns 20-50 parells de bases.

Aquestes seqüències CRISPR tenen uns gens associats que s'anomenen Cas (CRISPR-associated genes). De forma molt resumida, quan un virus entra en el bacteri es posa en marxa un dels diferents sistemes CRISPR-Cas que existeixen. Alguns d'aquests sistemes serveixen per captar les seqüències dels virus que s'inclouran a CRISPR. Si el virus que entra ja està inclòs en aquesta base de memòria CRISPR, s'expressa una guia de RNA (gRNA) que reconeix el DNA forà i indica per on ha de tallar i degradar la nucleasa Cas9 a aquest DNA, impedit d'aquesta forma la infecció del virus (veure figura 10.28, llibre 2).

Inspirant-se en el sistema CRISPR-Cas9, a l'any 2012 les investigadores E. Charpentier i J. A. Doudna van dissenyar una nova forma de tallar i editar específicament DNA. Es basa en utilitzar un complex gRNA-nucleasa Cas9, complementari d'una seqüència de DNA que es vol tallar. Aquest complex actuaria com unes tisores moleculars en aquesta seqüència (veure Figura 17.13 del llibre 1). Aquestes científiques van rebre el premi Nobel de Química 2020 per aquest descobriment.

#### 4. Genòmica i microorganismes

La genòmica és l'estudi de l'organització molecular dels genomes, el contingut de la seva informació i dels productes gènics que codifiquen.

Hi ha diferències notables entre el genomes dels diferents éssers vius. La grandària del genoma no implica sempre més complexitat en els éssers vius. Per exemple, *E. coli* té un genoma de 4,6 Mb que inclou uns 3.200 gens. Un altre microorganisme, en aquest cas eucariota com *Saccharomyces cerevisiae* té aproximadament 12 Mb i uns 6.000 gens. El genoma de l'home té uns 3.200 Mb i uns 25.000 gens, però no és el que té la mida més gran. Per exemple, el genoma del fong mucós ameboide *Dictiostelyum discoideum* té uns 34.200 Mb i uns 13.300 gens.

La genòmica inclou diverses àrees. La genòmica estructural és l'estudi de la naturalesa física dels genomes; el seu principal objectiu és determinar i analitzar la seqüència de DNA del genoma. La genòmica funcional estudia com funciona el genoma. Per exemple, examina el conjunt de proteïnes codificades, vies metabòliques, sistemes de transport, etc. En la genòmica comparada es comparen genomes de diferents organismes per buscar diferències i similituds. Per exemple, ens pot donar informació sobre l'evolució dels microorganismes.

##### 4.1. Determinació de les seqüències del genoma

Actualment disposem de diferents tècniques per seqüenciar el DNA. Des de la tècnica més clàssica com la de Sanger, fins a les més noves que s'engloben en les anomenades tècniques de seqüenciació d'alt rendiment o massives.

En el cas de la obtenció dels primers genomes de bacteris (p.e. *Haemophilus influenzae*) i del genoma humà es va utilitzar el mètode de seqüenciació aleatòria de genomes complerts (whole-genome shotgun sequencing) i es va iniciar l'era de la genòmica. De forma molt resumida, aquest mètode consisteix en trencar aleatòriament el genoma en una col·lecció de petits fragments de DNA mitjançant ones ultrasòniques per obtenir una genoteca. Posteriorment, utilitzant tècniques bioinformàtiques es

busquen coincidències en les seqüències de DNA per tal de col·locar els fragments individuals en l'ordre correcte per a reconstruir el genoma. Per entendre de forma simplificada com s'obté l'alineament i assemblatge dels fragments podeu consultar la [figura 6.5 del llibre 2](#). La complexitat real en aquest cas radica en el fet de que, en lloc d'alinear i assemblar unes poques bases com les d'aquest exemple, els programes bioinformàtics analitzen fragments de DNA de milers de bases, per obtenir genomes que contenen milions de bases.

#### 4.2. Anotació dels genomes

L'anotació dels genomes és l'estudi de la localització i natura dels gens potencials codificadors de proteïnes, rRNA i tRNA que es troben en el genoma.

Per tenir una idea de com funcionen els programes bioinformàtics, algunes de les instruccions que es donen estan basades en l'estructura bàsica d'un gen (consultar punt 1.2, bloc C1). Determinen marcs oberts de lectura (ORF, open reading frame), seqüències que potencialment poden codificar un polipèptid. Exemples d'instruccions:

- 1) Detecta codons d'inici
- 2) Detecta codons de stop
- 3) Compta codons entre aquests dos tipus de codons (>100 codons, possible ORF)
- 4) Troba seqüències Shine-Dalgarno
- 5) Busca similituds al Genbank

#### Bibliografia

##### Llibres de consulta:

Per poder consultar aquest llibre des de casa podeu utilitzar el servei ARE. El servei ARE permet accedir des de qualsevol dispositiu amb connexió a internet situat fora de la UAB als recursos electrònics subscrits:

<https://www.uab.cat/web/que-oferim/acces-als-recursos-electronics-des-de-fora-de-la-uab-1345727672556.html>

**Llibre 1:** Willey JM, Sandman KM, Wood D. 2020. 11a ed. "Prescott's Microbiology". McGraw-Hill Higher Education.

[https://www-ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB\\_Escritorio\\_Visualizar?cod\\_primaria=1000193&libro=11835](https://www-ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB_Escritorio_Visualizar?cod_primaria=1000193&libro=11835)

**Llibre 2:** Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2015. 14a ed. "Brock Biología de los microorganismos". Pearson Educación, S.A.

[https://www-ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB\\_BooksVis?cod\\_primaria=1000187&codigo\\_libro=5850](https://www-ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=5850)

### Exemples de preguntes tipus test

- En els bacteris els gens que codifiquen polipèptids estan intercalats per introns.
- Les mutacions induïdes es caracteritzen perquè apareixen en absència d'un mutagen conegut.
- Quan una purina és substituïda per una altre purina, la mutació s'anomena transició.
- En el plasmidi R, el RTF conté els gens que codifiquen la resistència als antibiòtics.
- La repressió gènica es un mecanisme de regulació típic de les vies catabòliques.
- Un procés de transformació s'atura a l'afegir DNasa al medi.
  
- El repertori genètic d'una espècie s'anomena :
  - A) Pangenoma      B) Genoteca      C) Genotip      D) Genòfor
- La tècnica que permet sintetitzar grans quantitats d'un fragment de DNA sense clonar-lo s'anomena:
  - A) CRISPR-Cas      B) PCR      C) BAC      D) YAC
- En el procés de reparació per fotorreactivació de les mutacions provocades per la llum ultraviolada poden actuar els següents mecanismes:
  - A) Sistema SOS    B) Escissió amb endonucleasa *uvrABC*    C) Recombinació amb la proteïna *recA*
  - D) Acció de la fotoliasa
- *Thermus aquaticus* és un bacteri fonamental pel desenvolupament de:
  - A) Còsmids    B) PCR    C) Genoteques cDNA    D) Clonació de plasmidis
- El sistema CRISPR-Cas:
  - A) Inclou un sistema de defensa contra virus    B) Es pot utilitzar per editar proteïnes
  - C) Es va descobrir en virus    D) Inclou un sistema de defensa contra bacteris
- Després d'un procés de conjugació entre una cèl·lula donadora de tipus Hfr i una receptora (F):
  - I) La cèl·lula donadora es torna F<sup>-</sup>    II) La receptora es torna F<sup>+</sup>    III) La cèl·lula donadora segueix sent Hfr    IV) La receptora guanya informació genètica
  - A) I i II      B) I i IV      C) II i III      D) III i IV