

Los microbios encapsulados y el factor transformador

Para rastrear el comienzo de la hipótesis alternativa, la que finalmente demostró ser la correcta, es necesario retroceder a 1928 y retomar un importante hilo en la historia de la biología moderna. En ese año se desarrolló un experimento que, en ese momento, pareció de poca importancia para el campo de la genética. Frederick Griffith, un bacteriólogo de salud pública de Inglaterra, estaba estudiando la posibilidad de desarrollar vacunas contra *Streptococcus pneumoniae*, un tipo de bacteria que causa una forma de neumonía. En aquellos días, antes del desarrollo de los antibióticos, la neumonía bacteriana era una enfermedad grave.

Como sabía Griffith, estas bacterias, llamadas comúnmente neumococos, poseían formas virulentas —causantes de la enfermedad— y formas no virulentas o inocuas. Las virulentas estaban cubiertas por una cápsula de polisacáridos y las no virulentas carecían de cápsula; la presencia de la cápsula interferiría con la fagocitosis que efectúan los glóbulos blancos del hospedador. La producción de la cápsula y su constitución son determinadas genéticamente, es decir, son propiedades hereditarias de las bacterias. En la actualidad, se sabe que los neumococos no encapsulados son una forma mutante; pero en la época de Griffith, el vocablo mutante no se aplicaba a las bacterias.

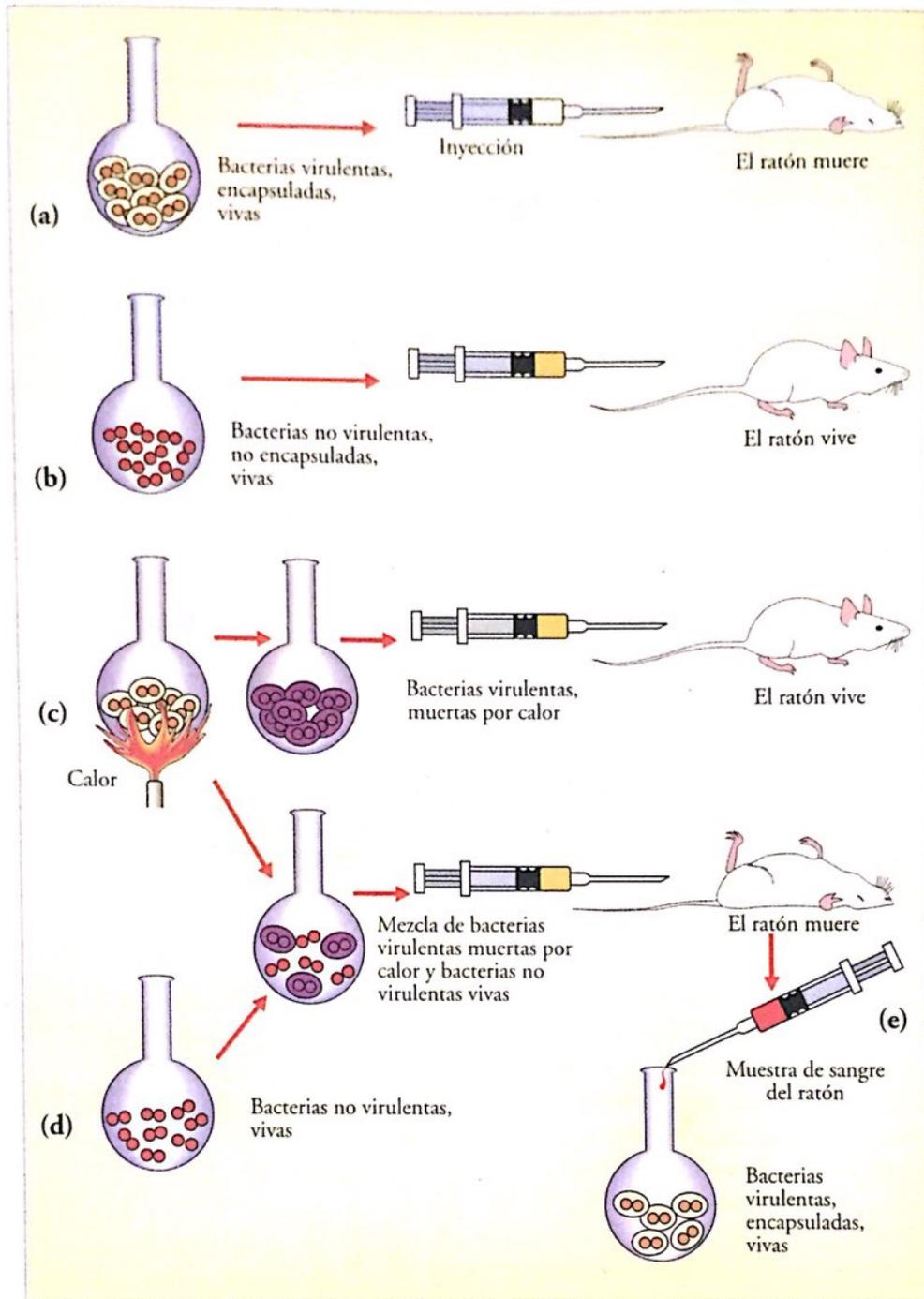
Griffith estaba interesado en descubrir si las inyecciones de neumococos virulentos muertos por calor, que no causaban la enfermedad, podrían utilizarse para inmunizar contra la neumonía. En el curso de varios experimentos, realizó uno que le dio resultados muy desconcertantes. Simultáneamente inoculó ratones con bacterias virulentas muertas por calor y bacterias no virulentas vivas; cada una de ellas por separado era inofensiva pero, al inocularlas juntas, todos los ratones murieron. Cuando Griffith efectuó las autopsias, encontró que los cuerpos tenían gran cantidad de bacterias encapsuladas vivas y, por lo tanto, virulentas (fig. 14-2). ¿Habían revivido las bacterias virulentas muertas, o algo había sido transferido desde ellas a las células vivas no virulentas que las capacitaba para hacer cápsulas y, así, transformarse en virulentas?

En los años siguientes se demostró que el mismo fenómeno podía reproducirse en un tubo de ensayo y que estas preguntas podían ser contestadas. Se encontró que, cuando los extractos de las bacterias encapsuladas muertas se agregaban a los cultivos de las bacterias vivas inocuas, podían convertir a estas últimas en el tipo virulento, dotándolas de la capacidad para producir cápsulas. Además, una vez transformadas, podían transmitir esa característica a la progenie. Este fenómeno se conoció como **transformación** y lo que causaba la conversión se llamó *factor transformador*.

En 1943, casi una década después de un paciente trabajo de aislamiento y análisis químico, el grupo de O. T. Avery de la Universidad Rockefeller, EE.UU., concluyó que el factor transformador era el DNA. Los experimentos subsiguientes demostraron que una variedad de factores genéticos podían ser transmitidos de las células de una cepa bacteriana a otra cepa similar por medio de DNA aislado.

La naturaleza del DNA

El DNA había sido aislado por primera vez en 1869 por un bioquímico suizo llamado Friedrich Miescher, en la misma década notable en la cual Darwin publicó *El Origen de las Especies* y Mendel presentó sus resultados a la Sociedad de Historia Natural de Brünn. La sustancia que Miescher aisló era blanca y azucarada, ligeramente ácida y contenía fósforo. Dado que la halló sólo en el núcleo de



las células, la llamó “nucleína”, nombre que luego se transformó en ácido nucleico y mucho después en ácido desoxirribonucleico (DNA), para distinguirlo de otro compuesto químico que también se encuentra en la célula, el ácido ribonucleico (RNA).

Desde que Miescher aisló la sustancia posteriormente conocida como ácido nucleico, poco se había avanzado en la determinación de su estructura molecular hasta que, en 1885, el bioquímico alemán A. Kossel eliminó las proteínas asociadas a los ácidos nucleicos y obtuvo por separado los distintos tipos de bases nitrogenadas. Kossel concluyó que en los ácidos nucleicos también estaba presente un azúcar, pero no pudo precisar cuál. Por estos trabajos, Kossel recibió el Premio Nobel en 1910.

En 1914, otro alemán, Robert Feulgen, descubrió que el DNA tenía una atracción inusualmente fuerte por un colorante rojo llamado fucsina. Feulgen consideró su hallazgo tan poco importante que no se molestó en comunicarlo duran-

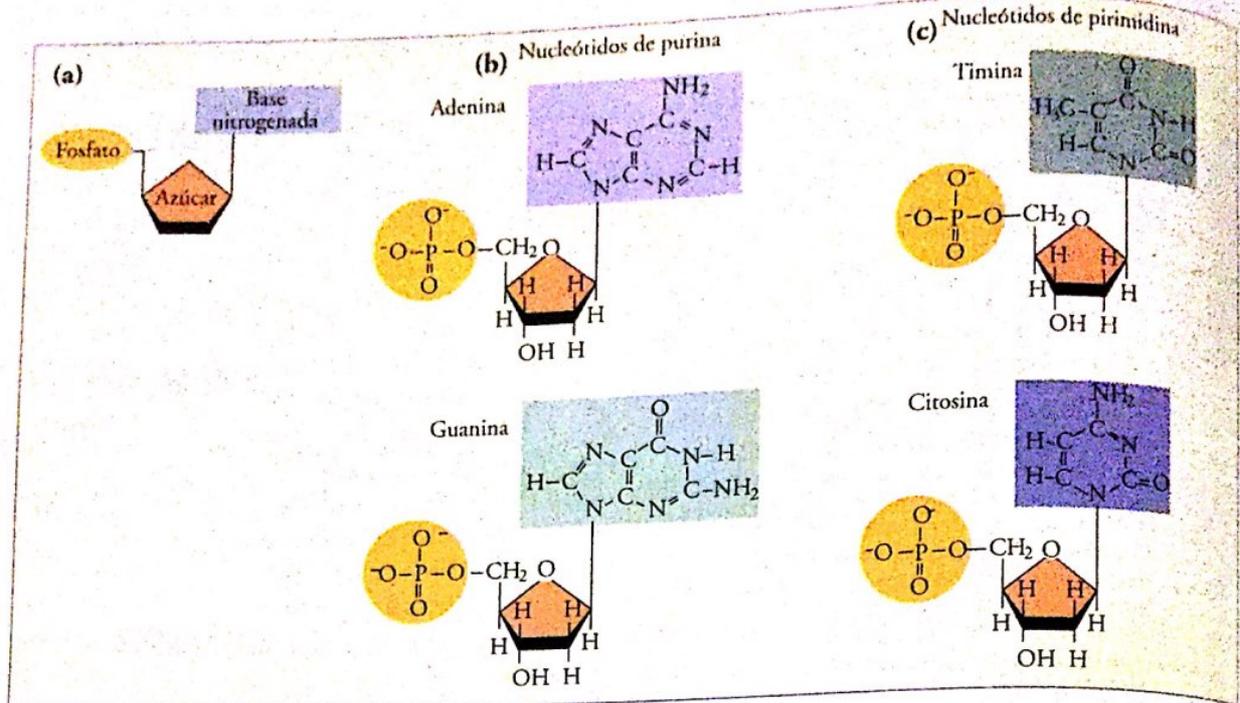


Fig. 14-3. a) Un nucleótido está constituido por tres componentes diferentes: una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. b) y c) Los cuatro tipos de nucleótidos que se encuentran en el DNA. Cada nucleótido consiste en una de las cuatro bases nitrogenadas posibles, un azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato.

te una década. La coloración de Feulgen, como fue llamada cuando finalmente se la comenzó a usar, mostró que el DNA está presente en todas las células y que se ubica en los cromosomas.

Sin embargo, durante las pocas décadas siguientes no hubo un interés particular en el DNA, dado que no se había sugerido ningún papel para él en el metabolismo celular. Durante la década de 1920, la mayoría de los trabajos sobre su estructura química fueron desarrollados en un solo laboratorio por el eminente bioquímico ruso-norteamericano P. A. Levene. Éste mostró que el DNA podía ser degradado en un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa), un grupo fosfato y cuatro bases nitrogenadas: adenina y guanina (purinas) y timina y citosina (pirimidinas). De las proporciones de estos componentes, Levene hizo dos deducciones, una correcta y otra incorrecta:

1. Cada base nitrogenada está unida a una molécula de azúcar que, a su vez, está unida a un grupo fosfato formando una molécula única, un nucleótido (fig. 14-3). Esta deducción era correcta.
2. Dado que en todas las muestras que él analizó, las proporciones de las bases nitrogenadas eran aproximadamente iguales, Levene concluyó que las cuatro bases nitrogenadas debían estar presentes en el ácido nucleico en cantidades iguales. Más aún, supuso que estas moléculas debían estar agrupadas en ramilletes de cuatro, un tetranucleótido, según lo llamó, que se repetía una y otra vez a lo largo de la molécula. Aunque esta deducción era incorrecta, dominó el pensamiento científico sobre la naturaleza del DNA por más de una década.

Levene tenía un gran renombre como bioquímico, por lo que sus trabajos tuvieron un gran peso. Por esta razón, los biólogos tardaron en reconocer la importancia de la demostración que hizo Avery posteriormente, que el DNA es el fac-

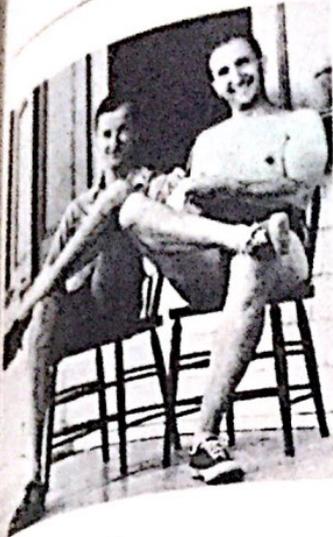


Fig. 14-4. Max Delbrück y Salvador Luria en el laboratorio de biología cuantitativa de la Universidad de Spring Harbor en 1953. Compartieron el premio Nobel con A. D. Hershey en 1969 por sus descubrimientos vinculados al mecanismo de replicación y a la estructura genética de los virus.

tor transformador en las bacterias. Esta falta de reconocimiento se debió, en parte, a que las bacterias, por ser procariotas, eran consideradas "inferiores" y "diferentes" y, en parte, a que la molécula de DNA, constituida por sólo cuatro unidades estructurales (los nucleótidos), parecía demasiado simple para la tarea enormemente compleja de contener la información hereditaria. Avery, al igual que Mendel años atrás, era "un viajero cuyo extraño relato no concordaba con los conceptos aceptados en esa época".

Experimentos con bacteriófagos

En 1940, los microbiólogos Max Delbrück (de origen alemán) y Salvador Luria (de origen italiano) iniciaron una serie de estudios sobre el papel del DNA (fig. 14-4). Estos científicos, que adoptaron la nacionalidad norteamericana, habían abandonado Europa en 1930, cuando los nazis comenzaban a ganar poder. Trabajaron con un material que resultaría tan importante para la investigación genética como el guisante de jardín usado por Mendel y la mosquita de la fruta elegida por Morgan. Este "material adecuado" era un grupo de virus que atacan a las células bacterianas y, por lo tanto, se denominan **bacteriófagos** ("comedores de bacterias") o **fagos**, para abreviar. Cada tipo conocido de célula bacteriana es atacado por un tipo particular de virus bacteriano y, a su vez, muchas bacterias son hospedadores de muchos tipos diferentes de virus. Delbrück, Luria y el grupo que se les unió en estos estudios, acordaron concentrar sus investigaciones en una serie de siete virus relacionados que atacan a *Escherichia coli*, la bacteria que habita normalmente el intestino de los seres humanos sanos. Estos virus fueron numerados T1 a T7, donde T simplemente significa "tipo". La mayor parte de los primeros trabajos fueron hechos en virus T2 y T4, que se conocieron como bacteriófagos T pares.

Estos virus eran poco exigentes y fáciles de mantener en el laboratorio ya que no necesitaban mucho espacio ni instrumental complejo. Más aún, eran fenomenales para reproducirse. Veinticinco minutos después de que un solo virus infectaba una célula bacteriana, esa célula estallaba, liberando una centena o más de virus nuevos, todos copias exactas del original. Otra ventaja (que no se descubrió hasta después de comenzada la investigación) fue que este grupo de bacteriófagos tiene una forma altamente distintiva (fig. 14-5) que permite identificarlos fácilmente con el microscopio electrónico.

De acuerdo con los estudios de microscopia electrónica de células de *E. coli* infectadas (y rotas a intervalos regulares después de la infección), los bacteriófagos no se multiplican como las bacterias. A excepción de unos pocos fragmentos, los fagos "desaparecen" un momento después de la infección; durante los primeros 10 a 11 minutos del ciclo de infección, no se ve ni un solo virus dentro de la célula bacteriana. Luego, según en qué momento se rompa la célula durante el curso de la infección, se ven cantidades crecientes de bacteriófagos completos y, mezclados con ellos, trozos diversos que parecen ser fragmentos de bacteriófagos.

El análisis químico de los bacteriófagos reveló que consisten sencillamente en DNA y proteína, los dos contendientes prominentes que se disputaban, en ese momento, el papel de portador del material genético. La simplicidad química del bacteriófago ofreció a los genetistas una oportunidad notable. Los genes virales, el material hereditario que dirige la síntesis de nuevos virus dentro de las células bacterianas, debían ser llevados o bien por la proteína o bien por el DNA. Si podía determinarse cuál de los dos contenía la información genética, entonces podía conocerse la identidad química del gen.

En 1952, un conjunto de experimentos simples, pero ingeniosos, fueron llevados a cabo por los bioquímicos norteamericanos Alfred D. Hershey y Martha

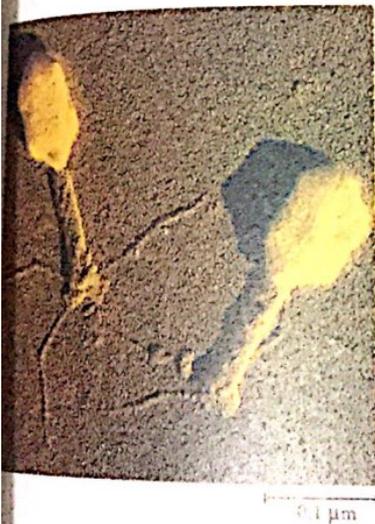
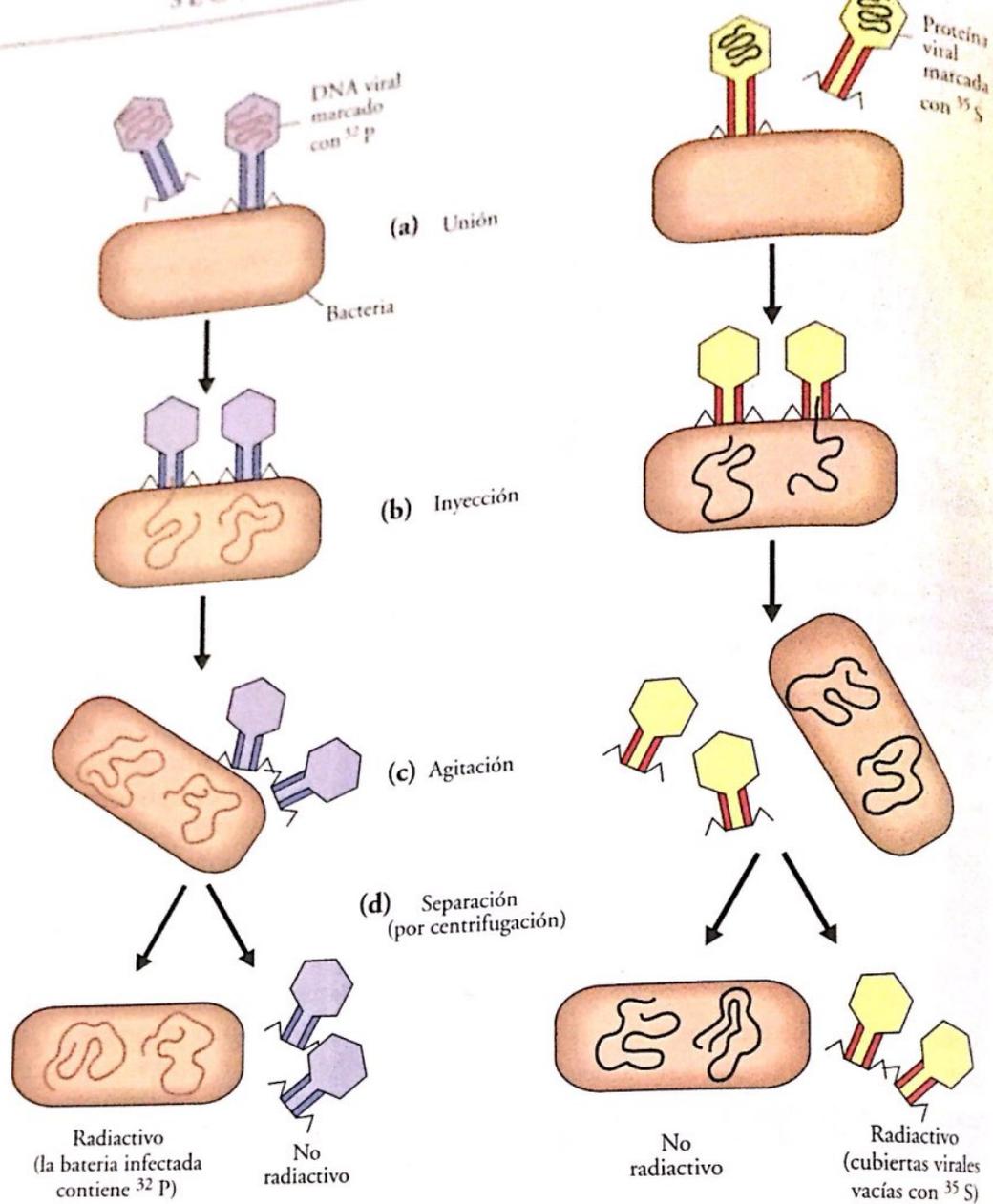
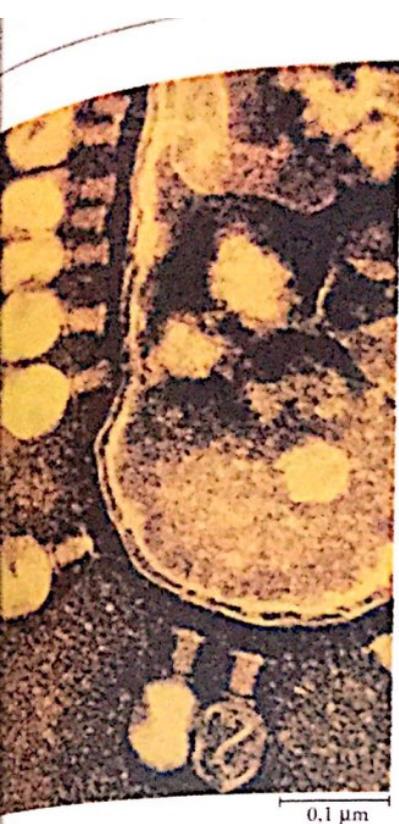


Fig. 14-5. Bacteriófagos T4, como los muestra una microfotografía electrónica de transmisión de una réplica preparada por el método "véase cap. 4, pág. 122". Nótese su forma de "renacuajo" altamente distintiva. Cada bacteriófago está formado por una cabeza que en las fotomicrografías electrónicas se ve hexagonal, y un ensamble complejo en la cola. Estos bacteriófagos se unen a las células de *E. coli* por medio de fibras delgadas, que se desprenden desde el ensamble de la cola.



Chase (fig. 14-6). Ellos prepararon dos muestras separadas de virus, una contenía DNA marcado con un isótopo radiactivo del fósforo, ^{32}P ; la otra contenía proteína marcada con un isótopo radiactivo del azufre, ^{35}S . Cada tipo de virus se obtuvo cultivando el hospedador *E. coli* en un medio que contenía el isótopo radiactivo apropiado. Después de un ciclo de multiplicación, todos los virus recién formados contenían parte del isótopo radiactivo, en lugar del isótopo no radiactivo común. Si se recuerda la estructura química de los ácidos nucleicos y de las proteínas, se verá que el DNA contiene fósforo pero no azufre, mientras que los aminoácidos que componen las proteínas no contienen fósforo, aunque dos aminoácidos (metionina y cisteína) contienen azufre. Así, ^{32}P y ^{35}S pueden servir como marcas radiactivas específicas que distinguen el DNA de las proteínas.

El paso siguiente fue infectar un cultivo de bacterias con fagos marcados con ^{32}P y otro cultivo similar con fagos marcados con ^{35}S . Una vez infectadas, las células fueron incubadas y luego centrifugadas para separarlas de cualquier material viral extracelular. Las dos muestras, la del material extracelular y la del material intracelular, se analizaron en busca de radiactividad. Hershey y Chase encontraron que el ^{35}S había permanecido fuera de las células bacterianas, en las cubiertas virales vacías, y que el ^{32}P había entrado a las células, las había infectado y había causado la producción de nueva progenie viral. Concluyeron, entonces, que el material genético viral era el DNA y no la proteína.



14-7. Microfotografía electrónica de bacteriófagos T4 atacando a una célula de *E. coli*. Los virus se adhieren a la célula bacteriana por sus fibras caudales; el DNA viral, contenido en la cabeza del virus, es inyectado a través de la cola dentro de la célula. Como puede verse, las cabezas de algunos de los virus están vacías, indicando que el proceso de inyección ya ha ocurrido. Un ciclo completo de replicación viral emplea sólo unos 25 minutos. Al final de este período, alrededor de 100 células virales nuevas son liberadas de la

Las microfotografías electrónicas confirmaron que el bacteriófago T4 se adhiere a la pared celular bacteriana por medio de las fibras de su cola y que inyecta su DNA en la célula, dejando afuera la cubierta de proteína vacía (fig. 14-7). En síntesis, la proteína es sólo un "envase" para el DNA del bacteriófago. Es el DNA del bacteriófago el que penetra en la célula y lleva el mensaje hereditario completo de la partícula viral, dirigiendo la formación de nuevo DNA viral y de las nuevas proteínas virales.

Evidencia adicional en favor del DNA

El papel del DNA en la transformación bacteriana y en la replicación viral constituyó una evidencia muy convincente de que el DNA es el material genético. Otras dos líneas de trabajo experimental ayudaron también a dar peso al argumento. Primero, Alfred Mirsky, en una larga serie de cuidadosos estudios llevados a cabo en la Universidad Rockefeller, mostró que, en general, las células somáticas de cualquier especie dada contienen cantidades iguales de DNA y que los gametos contienen precisamente la mitad de DNA que las células somáticas. Esto es coherente con el resultado de la meiosis (véase cap. 11), en la cual el número diploide de cromosomas se reduce al número haploide.

Los resultados de Chargaff

Una segunda serie importante de contribuciones fue hecha por Erwin Chargaff de la Universidad de Columbia. Chargaff rompió moléculas de ácidos nucleicos en sus bases constitutivas y las separó mediante cromatografía en papel. De esta manera, pudo analizar el contenido de purinas y pirimidinas del DNA de muchos tipos diferentes de seres vivos y encontró que, contrariamente a las conclusiones de Levene (pág. 350), las bases nitrogenadas *no* siempre aparecían en proporciones iguales. Las proporciones de las cuatro bases nitrogenadas son iguales en todas las células de todos los individuos de una especie dada, pero varían de una especie a otra. Por lo tanto, las variaciones en la composición de bases bien podrían proporcionar un "lenguaje" en el cual estarían escritas las instrucciones que controlan la actividad celular. Parte de los resultados de Chargaff se reproducen en el cuadro 14-1. ¿Nota usted, examinando estas cifras, algo interesante acerca de las proporciones de las purinas y las pirimidinas?

Cuadro 14-1. Composición porcentual del DNA en varias especies

Fuente	Purinas		Pirimidinas	
	Adenina	Guanina	Citosina	Timina
Ser humano	30,4	19,6	19,9	30,1
Buey	29,0	21,2	21,2	28,6
Espermatozoide de salmón	29,7	20,8	20,4	29,1
Germen de trigo	28,1	21,8	22,7	27,4
<i>E. coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6
Erizo de mar	32,8	17,7	17,3	32,2

La hipótesis se confirma

Tomados en conjunto, todos los estudios que hemos relatado hasta aquí suministraban evidencias convincentes de que el DNA es el material genético. A pesar de ello, quedaba sin respuesta una pregunta crítica: ¿De qué manera está contenida la información en el DNA? Como veremos, la respuesta a esta pregunta iba a ser hallada en la estructura de la propia molécula de DNA, que sería develada por J. Watson y F. Crick.

Para desempeñar su función biológica, el material genético debe satisfacer, por lo menos, cuatro requisitos:

1. Llevar la información genética de célula madre a célula hija y de generación en generación. Más aún, debe llevar una gran cantidad de información. (Consideremos cuántas instrucciones deben estar contenidas en el conjunto de genes que dirigen, por ejemplo, el desarrollo de un elefante, de un árbol, o aun de un paramecio.)
2. Contener información para producir una copia de sí mismo, dado que se copia en cada división celular y con gran precisión.
3. Ser químicamente estable; de otro modo, no podría llevar información idéntica de generación en generación y la progenie no se parecería a sus progenitores.
4. Por otra parte, ser capaz de mutar. Cuando un gen cambia, o sea cuando se comete un "error", ese "error" debe ser copiado tan fielmente como el original. Ésta es una propiedad muy importante, dado que sin la capacidad para replicar los "errores", no habría variación genética. En consecuencia, no habría evolución por selección natural (véase la Sección 4).

Cuando se encontró que la molécula de DNA tenía el tamaño, la configuración y la complejidad necesarios para satisfacer estos requisitos, se la aceptó universalmente como el material genético. El hallazgo de Watson y Crick, por el que recibieron el Premio Nobel en 1962, es uno de los hitos de la historia de la ciencia.