N U C L E O I D E

DEFINICION: Es la entidad estructural y funcional que contiene la información genética bacteriana, usualmente localizada en la región central del cuerpo celular y llega a constituir hasta el 2% de su peso seco y ocupa el 10% de su volúmen

ESTRUCTURA: Al microscopio de luz, la visualización del nucleoide se logra con la aplicación de técnicas tintoriales como la de Feulgen o Giemsa, o con el empleo de colorantes fluorescentes tales como la naranja de acridina, el bromuro de etidio o el DAP 1.

Para su observación al microscopio electrónico se ha empleado convencionalmente el procedimiento de Ryter-Kellenberger que incluye un tratamiento de prefijación directamente en el medio de cultivo utilizando OsO_4. Bajo las condiciones de este procedimiento, el nucleoide de B. subtilis al igual que el de otras bacterias grampositivas aparece como una area transparente a los electrones con una forma más confinada y una textura mas compacta que la de Escherichia coli, así como un límite bien definido entre el DNAplasma y el citoplasma, sin llegar a observarse una membrana envolvente. El DNAplasma presenta fibrillas organizadas en mechones retorcidos como se muestra en la Figura 1.

Fig.1. Esquema que muestra una bacteria conteniendo una area clara ecuatorial, con apariencia fibrilar correspondiente al nucleoide.

La apariencia del cuerpo nuclear depende tanto de los procedimientos de fijación y tinción empleados, como de la cepa bacteriana. En 1985 J.A Hobot y asociados diseñaron un procedimiento para microscopia electrónica en el que las bacterias después de ser congeladas ultrarapidamente eran sustituidas a bajas temperaturas en OsO_4 al 1% en acetona y embebidas en Epon., con esta técnica el nucleoide aparece como espacios libres de ribosomas, llenos de material granular con un diámetro de hasta 15 nm, entremezclados con segmentos de fibrillas con un diámetro de 4 -6 nm.

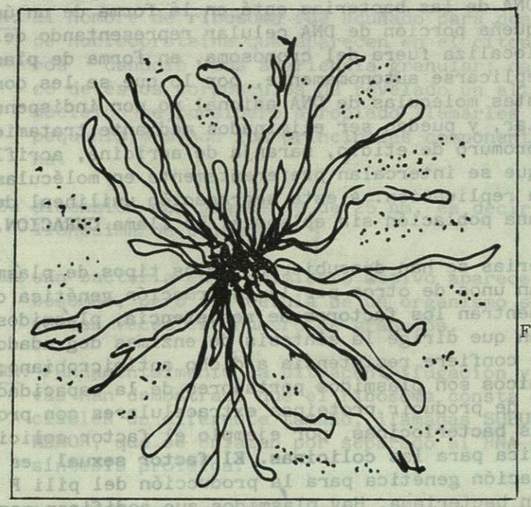

Fig.2. Molécula de nucleoide bacteriano aislada, mostrando asas o dominios.

COMPOSICION QUIMICA: El nucleoide está constituido principalmente por una molécula de DNA de doble cadena, circular y covalentemente cerrada, cuya longitud en E. coli es de 1.1 - 1.4 mm, su peso molécular es ~3 x 10^9 daltones, y la información genética que alberga está contenida en 5 x 10^6 pares de bases. Además el nucleoide contiene RNA y RNA polimerasa, esta enzima representa la principal proteina asociada. El RNA constituye el 30% del peso del nucleoide y un 4% de él es RNA ribosomal.

Con frecuencia el DNA bacteriano además de las cuatro bases nitrogenadas principales, contiene pequeñas cantidades de bases metiladas en el orden del 0.05 - 1% de las bases totales, entre ellas la 6 metilaminopurina y la 5 metilcitosina, a este grupo de bases nitrogenadas se les designa como bases menores.

La cantidad de DNA celular depende de la velocidad de crecimiento, lo cual se refleja en el numero de nucleoides por celula. Así, las células en crecimiento lento poseen 1 o 2 nucleoides y las de crecimiento rápido presentan dos ó mas moléculas de DNA por celula.

La forma del DNA es superenrolllada y presenta un gran numero de asas ó dominios (~140), la más larga llega a medir hasta 20 nm de longitud. En el centro de la estructura aparece un material electrodenso que por su susceptibilidad a la RNAasa se ha identificado como RNA.

Cuando los nucleoides aislados se tratan con RNAasa, su densidad cambia de 1600S a 4 - 500S y ocurre un incremento concomitante en su viscosidad.

No todo el DNA de las bacterias está en la forma de un único cromosoma circular; una pequeña porción de DNA celular representando del 0.1 al 0.2% del DNA total se localiza fuera del cromosoma, en forma de **plasmidos** o **episomas** , capaces de replicarse autonomamente, por lo que se les conoce también como replicones. Estas moleculas de DNA adional no son indispensables para la viabilidad celular, y pueden ser eliminados mediante tratamientos con sustancias como el bromuro de etidio, naranja de acridina, acriflavina o iones cobalto, agentes que se intercalan preferentemente en moléculas pequeñas de DNA bloqueando su replicación. A esta segregación unilineal de las células con episoma en una población sin episomas, se llama **CURACION.**

En las bacterias se han descubierto varios tipos de plásmidos, los cuales se diferencian unos de otros por la información genética que portan, entre ellos se encuentran los **factores de resistencia**, plásmidos portadores de una información que dirige la síntesis de enzimas degradadoras de antibióticos, lo cual le confiere resistencia a dicho antimicrobiano; **los factores bacteriocinogénicos** son plásmidos portadores de la capacidad que ostentan ciertas bacterias de producir proteinas extracelulares con propiedades antibioticas llamadas **bacteriocinas**, por ejemplo el factor colicinogénico de E. coli que codifica para las **colicinas. El factor sexual** es el plasmido que lleva la información genética para la producción del pili F que hace posible la conjugación bacteriana. Hay plásmidos que codifican para la producción de pili comunes como el Plásmido K99, K88, CFA-I y CFA-II. Ciertos plasmidos dan resistencia a metales como el plomo,cadmio o mercurio y otros designados como **plásmidos criptico**s cuya función se desconoce.

FUNCIONES: La principal función del nucleoide bacteriano es almacenar la información genética y trasmitirla a sus descendientes.

BIBLIOGRAFIA:

1.- Dawes, I.W. y I.W. Sutherland. 1978. Fisiologia de los microorganismos. H. Blume Ediciones. Madrid. 1a. Edición.

2.- Hobot, J.A., W.Villiger., J. Escaig., M.Maeder., A. Ryter y E. Kellenberger. 1985. Shape and Fine Structure of Nucleoids Observed on Sections of Ultrarapidly Frozen and Cryosubstituted Bacteria. J. Bacteriol. 162 (3): 960-971.

3.- Rogers H. J. 1983. Bacterial Cell Structure. American Society for Microbiology.

4.-Rose A.H. 1977, Microbiologia Quimica. Editorial Alhambra. 2a. Edición.

5.- Schlegel, H.G. 1975. Microbiolgia General. Ediciones Omega. Barcelona.

R I B O S O M A S

DEFINCION: El nombre de **ribosoma** fué acuñado para designar aquellas partículas de nucleoproteína que aparecen en el citoplasma como gránulos oscuros dandole una apariencia granular; dado que el análisis químico de éstos corpúsculos ha revelado un alto contenido de acido ribonucleico se consideró apropiado llamarles ribosomas. Estos cuerpos pequeñísimos son los principales componentes de la célula bacteriana.

TAMAÑO: Su dimensión más grande es de 25 nm, es decir aproximadamente una millónesima de pulgada.

NUMERO: En una bacteria en crecimiento activo aparecen alrededor de 20,000 ribosomas, pero una célula de un organismo superior puede albergar varias veces ese número de gránulos.

ESTRUCTURA: Fundamentalmente la ultracentrifugación y otras técnicas preparativas han demostrado que el ribosoma consta de **dos subunidades** disociables de diferente tamaño, llamadas **SUBUNIDAD MAYOR y SUBUNIDAD MENOR**, que se enlazan por separado al RNA mensajero al iniciarse la síntesis proteíca.

A partir de micrografías electrónicas, James A. Lake ha construído un modelo tridiemensional de la máquina intracelular que sintetiza proteínas. Este modelo del ribosoma considera una forma asimétrica de las dos subunidades, y sus características estructurales son como sigue:

La subunidad pequeña tiene una forma aplanada y asimétrica, sus dimensiones son ~5.5 x 22 x 22 nm, consiste de una **cabeza** que constituye aproximadamente un tercio de la masa corporal, los otros dos tercios corresponden a la **base.** Posee además una **plataforma** separada de la cabeza por una cavidad denominada **hendidura.** El cuerpo de la subunidad pequeña presenta una constricción que delimita la **cabeza** de la **base.**

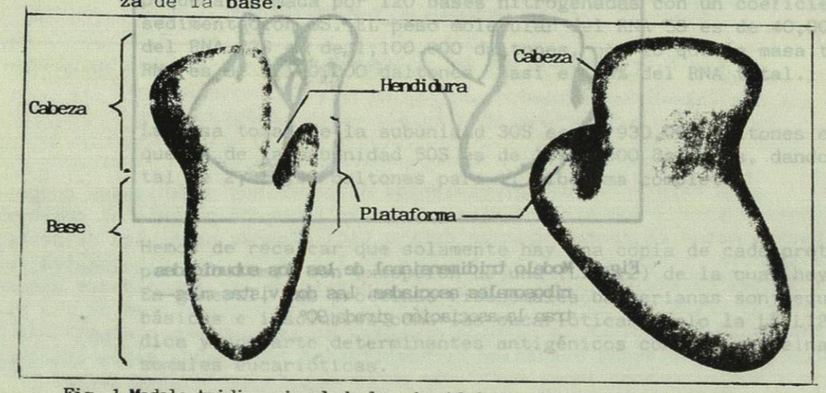

Fig. 1.Modelo tridimensional de la subunidad pequeña. En las dos vistas se representa la subunidad girada 90°

La subunidad grande tiene un cuerpo más o menos compacto, casi esférico, sus dimensiones son ~ 15 x 20 x 20 nm . De él sobresale una proyección denominada **protuberancia central** flanqueada por dos proyecciones a cada lado, la proyección más alargada se llama **tallo** y la otra **cresta**. El espacio entre la protuberancia central y la cresta se conoce como **valle**.

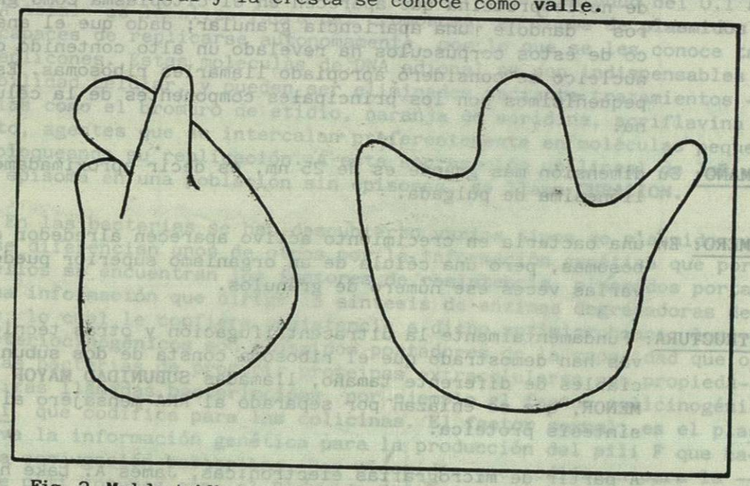

Fig. 2 .Modelo tridimensional de la subunidad grande. En

Cuando las subunidades se unen, el tallo de la subunidad 50S -- tiene su base cerca de la constricción de la subunidad pequeña, y la cabeza de la subunidad 30S se alinea con la protuberancia-central de la subunidad grande como se muestra en la Figura 3; allí podría haber un espacio o una especie de túnel entre ellas y posiblemente en ese canal se fije el RNA mensajero durante la síntesis de proteínas. Los RNA's de transferencia son bastante-grandes en relación al ribosoma completo por lo que probablemente se inserten en las hendiduras de la superficie.

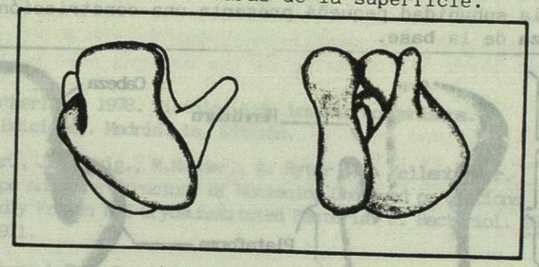

Fig.3. Modelo tridimensional de las dos subunidades ribosomales asociadas. Las dos vistas muestran la asociación girada 90°

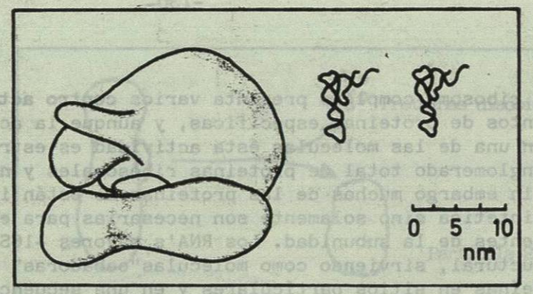

Fig.4. Esquema que muestra la relacion en teamaño entre el ribosoma bacteriano y los RNA de transferencia.

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION: El coeficiente de sedimentación de un **ribosoma completo** es **70 S** en tanto que el de la **subunidad pequeña y grande** es de **30S** y **50S** respectivamente.

COMPOSICION QUIMICA: Cada partícula ribosomal está constituida en un **66% de-RNA** y en un **34% de proteina.** El total de partículas contienen el-10% de la proteína total bacteriana y casi el 80% del RNA total.

La subunidad pequeña consta de **21 moléculas de proteínas** diferentes con pesos moleculares que oscilan entre 10,700 y 65,000 daltones, las cuales se han designado como **proteinas S1 a S21**; constituyendo una masa total de **370,000 daltones** aproximadamente el 40% de la proteina ribosomal total. Además contienen 1 molécula de - **RNA 16S** integrado por 1541 bases nitrogenadas y con un peso molecular de **560,000** daltones equivalente al 30% del RNA total.

La subunidad grande consta de 31 moléculas de proteína diferentes con pesos moleculares en el rango de 10,000 a 40,000 daltones denominadas proteínas **L1** a la **L34** debido a una asignación erronea - preeliminar. La masa total de proteina en esta subunidad es de -- **487,000** daltones aproximadamente el 60% de la proteina ribosomal-total. Además contiene 2 moléculas de **RNA** la más grande con 2904 bases nitrogenadas y un coeficiente de sedimentación **23S** y la más pequeña formada por 120 bases nitrógenadas con un coeficiente de-sedimentación 5S. EL peso molecular del RNA 5S es de 40,000 y el-del RNA 23S es de 1,100,000 daltones, por lo que la masa total de RNA es de 1,140,000 daltones, casi el 70% del RNA total.

La masa total de la subunidad 30S es de 930,000 daltones en tanto que la de la subunidad 50S es de 1,590,000 daltones, dando un total de 2,520,00 daltones para el ribosoma completo.

Hemos de recalcar que solamente hay una copia de cada proteina -- por ribosoma, con excepción de una (L7/L12) de la cual hay cuatro. En general, las proteinas ribosomales bacterianas son pequeñas, - básicas e insolubles como las eucarióticas, solo la L7/L12 es ácidica y comparte determinantes antigénicos con las proteinas ribosomales eucarióticas.

El ribosoma completo presenta varios **centro activos** construidos - por agrupamientos de proteinas específicas, y aunque la actividad catalítica reside solo en una de las moléculas ésta actividad es estrictamenente dependiente del conglomerado total de proteinas ribosomales y no de proteinas individuales; sin embargo muchas de las proteínas no están involucradas en la-reacción biosintética sino solamente son necesarias para el **ensamblamiento** - de los componentes de la subunidad. Los RNA's mayores -16S y 23S- desempeñan un papel estructural, sirviendo como moléculas"cebadoras" a las cuales se -- les unen proteínas en sitios partículares y en una secuencia específica conduciendo al ensamblamiento de la entidad ribosomal completa.

Al inicio de la actividad ribosómica, la subunidad 30S une al RNA mensajero , al tRNA iniciador y al factor de iniciación, a este complejo se-le asocia la subunidad 50S. Una vez formado el ribosoma funcionalmente activo pueden reconocerse tres sitios funcionalmente distintos, **el sitio A, el si-- tio P y el sitio R.** El sitio A y el sitio P son los lugares donde se unen -- los RNA's de transferencia, el primero de ellos se localiza en la plataforma de la subunidad pequeña. El centro **peptidil transferasa** es llevado en la -- subunidad 50S. El sitio de unión del factor de alargamiento G (EF-G) y de -- aquí la responsabilidad de la **translocación** es llevado en la **subunidad 50S. El sitio R** mejora la precisión de la interacción entre codón y anticodón, se encuentra expuesto al citoplasma en la parte externa del ribosoma.

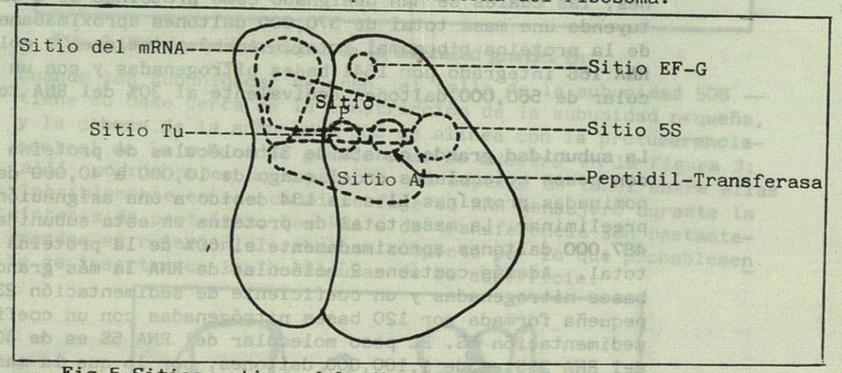

Fig.5.Sitios activos del ribosoma.

La existencia de agrupamientos de proteinas organizadas coope-- rativamente en las subunidades ribosomales se ha hecho patente al observar que cuando estas se centrifugan en CsCl o LiCl algunas moléculas de proteí na se disocian quedando solo los núcleos de las particulas ribosomales con coeficientes de sedimentación 23S y 42S a partir de las subunidades pequeña y grande respectivamente. El incremento en la concentracion de las sales mencionadas ocasiona la pérdida sucesiva de las demás proteínas. Sin - embargo las subunidades pueden ser reconstituidas removiendo el agente disociante y suministrando iones Mg^{2+}, sin menoscabo en su funcionalidad.

*

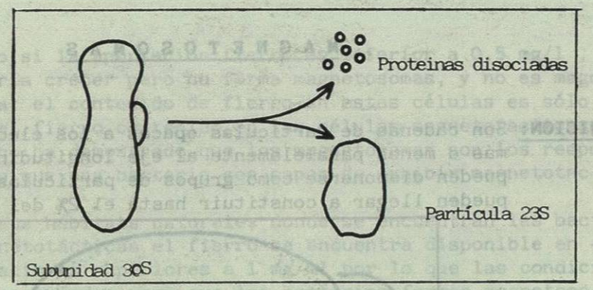

Fig.6.Disociación de la subunidad 30S por efecto del CsCl

La reconstituciónde la subunidad pequeña se inicia con el ensamblamiento en frío del RNA ribosomal 16S y 16 moléculas de proteína, dando - lugar a un agregado llamado **particula R1**, las cuales por calentamiento - sufren un rearreglo unimolecular generando **particulas R1*** con un coefi-- ciente de sedimentación 21S; a estas partículas se le asocian finalmente las 6 proteinas restantes para formar la subunidad 30S completa.

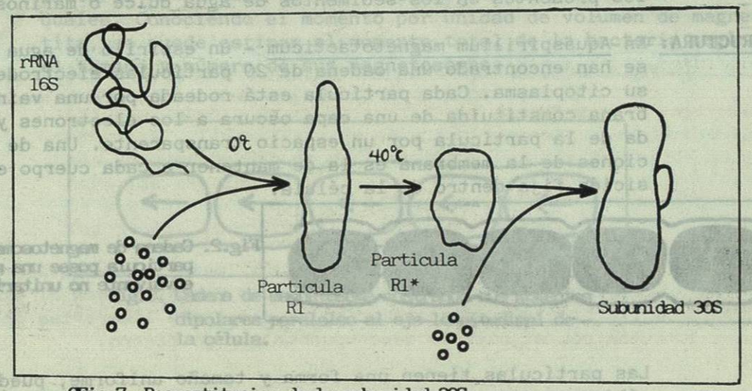

Fig.7. Reconstitucion de la subunidad 30S

FUNCION: Los ribosomas reciben instrucción genéticas a través de los RNA mensajeros, y la traducen en proteínas. Es decir, son los sitios responsables de la síntesis de proteinas.

BIBLIOGRAFIA:

1.- Engelman, D.M. y P.B. Moore. 1976. Estudios sobre los ribosomas emdiante dispersion de neutrones. Investigación y Ciencia. Num. 3 pp 28-39.

2.- Lake, J.A. 1981. The ribosome. Scientific American 245 (2): 84-97.

3.- Lewin, Benjamin. 1985. Genes. John Wiley & Sons. 2a. Edición pp 136-150.

4.-Roger, H.J. 1983. Bacterial Cell Structure. American Society for Microbiology.