UnADM
UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO

Programa de la asignatura:

Genética molecular bacteriana

U1 Transferencia de material genético

DCSBA

BIOTECNOLOGÍA

Índice

Presentación 2
Propósitos 3
Competencia específica 3
Ruta de aprendizaje 4
1.1 Conjugación 5
1.1.1 Etapas de la conjugación 6
1.1.2 Conjugación en otras bacterias 12
1.1.3 Transposones conjugativos 13
1.2 Fenómenos involucrados en la transferencia de material genético 15
1.2.1 Recombinación 16
1.2.2 Segregación cromosómica 21
Actividades 25
Autorreflexiones 26
Cierre de la Unidad 26
Para saber más 27
Fuentes de consulta 28

Presentación

Dentro del dominio bacteria se incluye una diversidad de microorganismos que residen en diferentes ambientes. Entre sus características de sobrevivencia, destaca su plasticidad adaptativa y la capacidad de responder a condiciones de estrés.

Desde mediados del siglo XX, con el auge de disciplinas como la genética y la tecnología del DNA recombinante, se inició el estudio de la genética bacteriana como una de las alternativas para comprender cómo las bacterias responden a estímulos de estrés. Desde este punto de vista, los trabajos de investigadores como Avery-MacLeod-Mcarty y Watson-Crick-Franklin-Wilkins, entre muchos otros, sirvieron como bases de los paradigmas de la genética molecular bacteriana.

Una de los mecanismos que más se han estudiado en las bacterias es la conjugación, la cual permite la transferencia de material genético de forma horizontal y que estudiaremos en esta unidad; además, analizaremos los mecanismos mediante los cuales los transposones conjugativos pueden modificar y transferir material genético en estos microorganismos.

Una vez que se ha transferido nuevo material genético a una célula bacteriana, éste puede recombinarse con el cromosoma o perderse durante la segregación, lo que puede ocasionar la adquisición permanente de genes que le sean útiles para su sobrevivencia o la pérdida de información que no requiera en ése momento. Estos dos mecanismos son muy importantes para la comprensión de los eventos de transferencia de material genético por lo que también serán estudiados en esta unidad.

Propósitos

Esta unidad tiene los propósitos de:

- **Identificar** los factores que intervienen en la conjugación bacteriana.
- **Describir** las etapas involucradas en el proceso de conjugación.
- **Definir** la función de los transposones conjugativos.
- **Describir** las teorías de la recombinación bacteriana.
- **Mencionar** los factores que intervienen en la curación de plásmidos.

Competencia específica de la unidad

Aplicar los eventos de transferencia de material genético para la obtención de bacterias recombinantes mediante el uso de tecnologías de ingeniería genética.

¿Qué debo aprender en esta unidad?
Unidad 1. Transferencia de material genético
1
Identificar los factores que intervienen en la conjugación.
2
Describir las etapas de la conjugación bacteriana.
3
Definir la función de los transposones conjugativos.
4
Describir las teorías de la recombinación bacteriana.
5
Definir el proceso de curación bacteriana.
6
Identificar los factores que intervienen en la curación de plásmidos.

1.1 Conjugación

Antes de sumergirnos en el contenido de la asignatura, revisa la infografía que se muestra en la página anterior y que te permitirá tener un panorama completo de los contenidos que revisaremos en esta unidad, en caso de que tengas alguna pregunta o inquietud, consúltalo con tu docente en línea.

Los procariontes son microorganismos que sobresalen en cuanto a su fascinante capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, además son instrumentos de fácil manejo en el laboratorio, por lo que se ha visto favorecido su uso para la síntesis de productos útiles para distintos sectores (Betancor et. al. 2006).

Además de las estrategias de transformación bacteriana que hemos estudiado en otras asignaturas, las bacterias, tienen mecanismos distintos que son de sumo interés para la generación de organismos genéticamente modificados y que vamos a estudiar en esta unidad.

Conjugación

Es un mecanismo de transferencia directa de material genético entre células bacterianas, mediado por plásmidos, lo que permite una transferencia horizontal de genes, ya que no necesariamente se lleva a cabo entre miembros de la misma especie. (Betancor et al. 2006).

Para que se lleve a cabo la conjugación se requiere que la cepa donadora presente un plásmido denominado F o factor F, el cual contienen más de 20 genes cuyos productos están implicados en la transferencia de la información genética, incluyendo los genes *traA* que codifican para la proteína pilina, la cual es la subunidad que conforma el pili sexual. Las células que contienen este plásmido son llamadas células F^+ y las que no lo presentan y son potenciales receptoras se denominan F^-. Además de esta información el plásmido F puede contener genes de resistencia a antibióticos o de otro tipo que le confieran características fenotípicas a la bacteria que le permitan sobrevivir.

La conjugación en bacterias Gram negativas es mediado por el sistema de secreción tipo IV (T4SS), un complejo macromolecular involucrado en el transporte de sustratos y en la

biogénesis del pili. El T4SS no está implicado solamente en la conjugación bacteriana, sino también en la secreción de factores de virulencia.

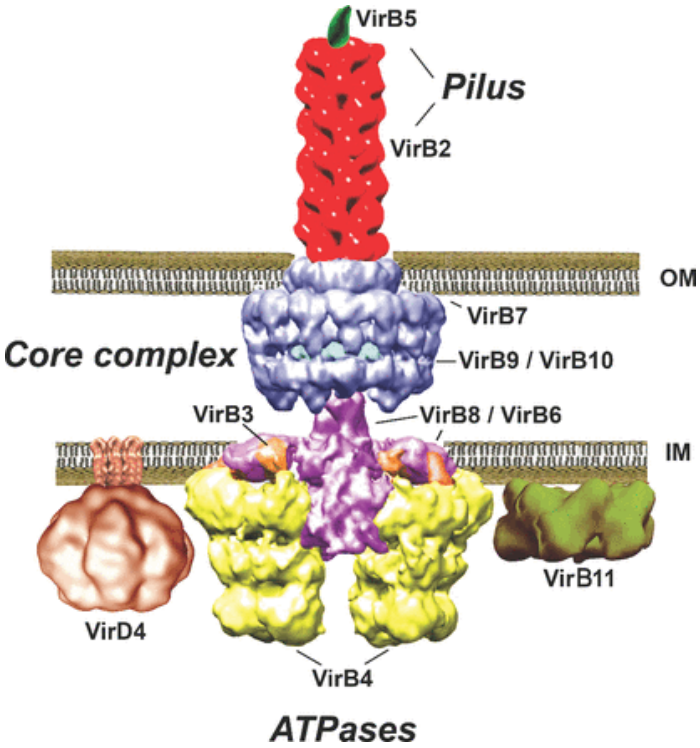

Figura 1. Estructura del T4SS. *Se distinguen cuatro dominios: el pili, el core, la plataforma de membrana interna y la ATPasa citoplásmica. El pili está formado por moléculas ensambladas de pilina (VirB2) en forma helicoidal, mostradas de rojo, con moléculas adhesinas (VirB5) de color verde en el extremo distal.*

Tomado de:
http://femsre.oxfordjournals.org/content/early/2014/11/27/1574-6976.12085

1.1.1 Etapas de la conjugación

En el proceso de conjugación están involucradas distintas etapas que analizaremos a continuación:

Conjugación

1. Adherencia del pili a la célula receptora.
2. Movilización del material genético.
3. Duplicación del material genético en la célula receptora y donadora.

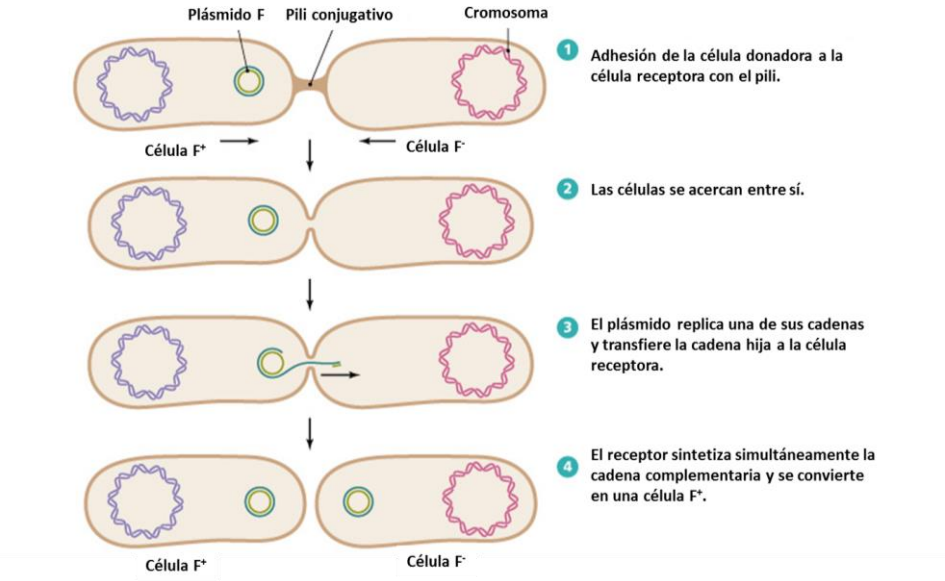

Figura 2. Proceso de conjugación. *1) Las células se adhieren entre sí a través del plásmido conjugativo. 2) Las células se acercan entre sí. 3) El plásmido replica una de sus cadenas que transfiere a la célula receptora. 4) El receptor sintetiza la cadena complementaria del plásmido y se convierte en F+.*

Modificado de http://www2.bakersfieldcollege.edu/aperez/7_lecture_Microbial_Genetics.htm

1. Adherencia

Para que pueda llevarse a cabo la conjugación debe existir un acercamiento físico entre ambos tipos celulares, lo cual se alcanza a través del pili y uno de sus objetivos es identificar y promover el acercamiento a la célula receptora, además de que proveerá el puente a través del cual se transferirá el material genético. El pili sexual está conformado por dos o tres subunidades polimerizadas en un cilindro hueco de 8 nm de diámetro.

Otros productos de los genes *tra* presentes en el plásmido F, actúan estabilizando la unión entre el pili y la célula receptora, además, tienen un efecto llamado de exclusión de superficie que hace que una misma célula no pueda ser conjugada por más de una célula al mismo tiempo.

Los pilis hacen contacto con receptores sobre la superficie de la células, así forman las parejas de apareamiento. El pili, por tanto, atrae la célula para un contacto íntimo y hace un canal o un poro por medio del cual el DNA pasa del donador al receptor.

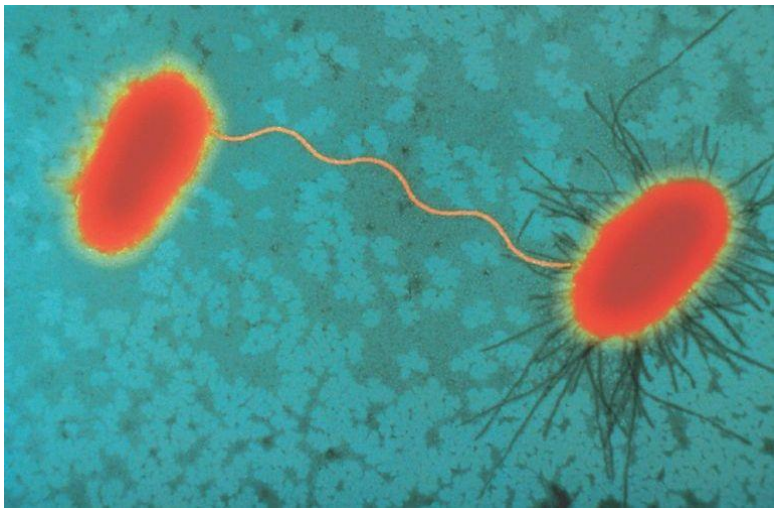

Figura 3. Etapa de adhesión. Se observa las células donadora (derecha) y receptora (izquierda) unidas a través del pili.

*Tomado de: http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch06/pilus.html*http://www.bancodeimagenes/imagenmuestra01.jpg*

2. Movilización del material genético

El proceso de transferencia del plásmido inicia cuando la proteína TraM reconoce que se ha formado una unión con una célula receptora, entonces TraY se une cerca del oriT o sitio de iniciación y ocasiona que se una TraI, la cual es una proteína relaxasa que también se une al oriT y forma un enlace covalente en el extremo 5´ que se ha generado TraI también funciona como una helicasa desenrollando aproximadamente 200 pb del DNA.

Este puente formado entre las células permite que una cadena de plásmido F, sintetizada por el donador, pasa hacia el receptor, donde se va a sintetizar una cadena de DNA complementario. De tal forma que ahora tanto la célula receptora como la donadora tienen una copia idéntica del plásmido.

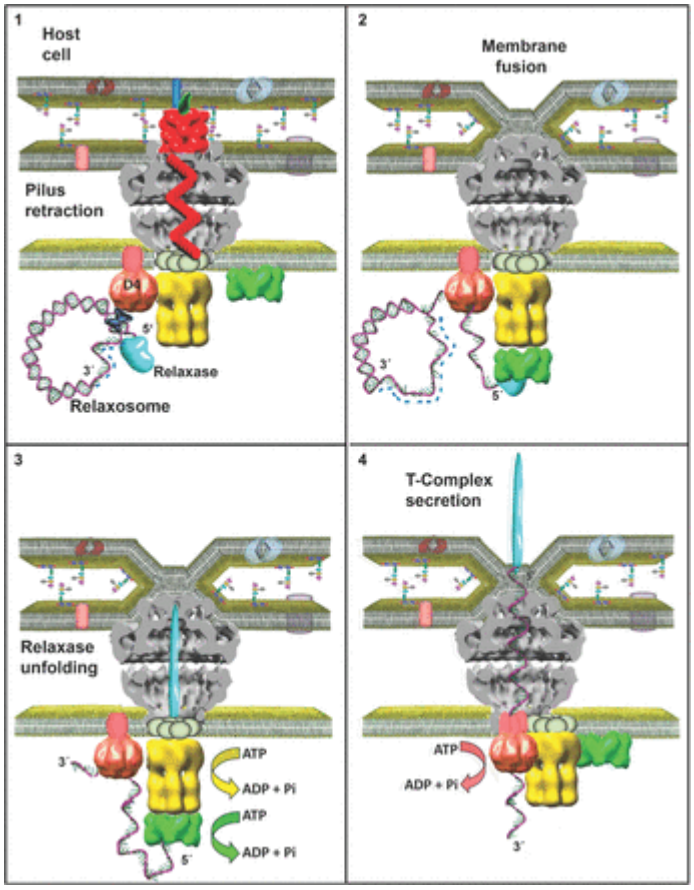

Figura 4. Transporte de nucleoproteína por T4SS. *1) La célula donadora hace contacto con la receptora mediante el pili. 2) La retracción del pili facilita la interacción entre membranas, resultando en un proceso de fusión de membranas y las proteínas llevan al relaxosoma a través del canal de secreción. 3) La nucleoproteína es transferida, la relaxasa se desdobla y trasloca a través del canal unido covalentemente al DNA. 4) Proteínas ayudan a la translocación del DNA en la dirección 5´-3´.*

Una vez que se lleva a cabo la conjugación, el plásmido F confiere ciertas características a la célula receptora, que incluyen: el pili sexual y proteínas multiméricas extracelulares que se unen a las células del donador. El plásmido F puede integrarse en numerosos locus en los cromosomas de las células donadoras. El plásmido integrado crea donadores con recombinaciones de alta frecuencia (Hfr del inglés *high frequency recombination*) que transfieren DNA cromosómico (del sitio de inserción) hacia una dirección determinada por la orientación de la inserción (Klug *et al.*, 2006).

Cuando un plásmido es transferido de una célula a otra por conjugación, el plásmido completo ha sido transferido. En contraste, la transferencia cromosómica no involucra una copia intacta debido a que el contacto entre las bacterias se rompe antes de que se haya transferido el DNA completo ya que toma mucho más tiempo el transferir todo el material genético. El proceso de transferencia de todo el cromosoma podría tomar 100 min (en *E. coli*) y la pareja de apareamiento muy raramente permanece junta por tanto tiempo. En contraste, un plásmido de unos 40 kb es equivalente al 1% del tamaño del cromosoma, así la transferencia del plásmido podría esperarse que se complete en 1 min. La transferencia incompleta del DNA cromosómico significa que esto no constituye un replicón intacto de la célula receptora (Dale y Park, 2004).

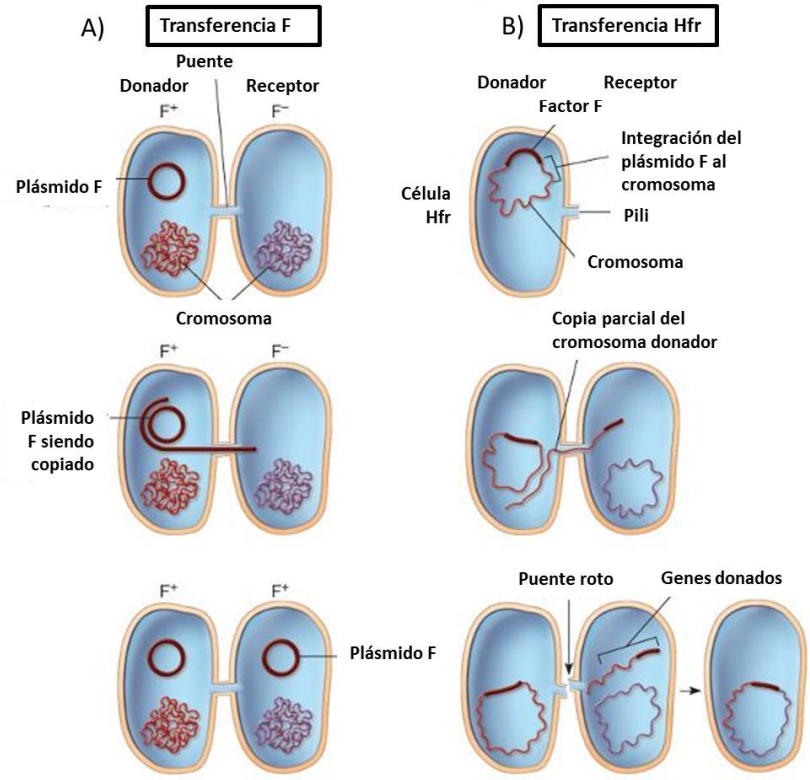

Figura 5. Comparación entre transferencia de células F+ y Hfr. *A) En las células F+ se transfiere el plásmido completo a la célula receptora. B) En las células Hfr el plásmido F ha sido insertado al cromosoma, de manera que en la transferencia se pasa un fragmento del cromosoma a la célula receptora, hasta que se rompe el puente de unión entre las células.*

Modificado de http://theamazingmedicine.blogspot.mx/2013/07/microbiology-iv-domain-bacteria.html

Como resultado, la probabilidad de que una región del cromosoma bacteriano sea transferido depende de su distancia del *oriT*. Los genes bacterianos localizados cerca del sitio de la integración entran primero a la bacteria, y son encontrados en mayor frecuencia que aquellos que se localizan más lejos y entran después. Esto da lugar a un gradiente de frecuencia de transferencia alrededor del cromosoma, partiendo de la posición del sitio de integración (Lewin, 2008). Bajo este principio es que se ha podido construir un mapa genético de *E. coli*, en el cual se mide la distancia entre los locus en el número de minutos necesarios para la transferencia en el conjugación (Jawetz *et al.*, 2014).

La integración del plásmido F se produce por recombinación entre una secuencia en el plásmido y un sitio cromosómico al azar. Después de la integración, el plásmido F se encuentra en una forma lineal en el sitio de integración y en este momento la integración es reversible ya que la recombinación entre los sitios en los extremos del plásmido integrado dará lugar a su escisión del cromosoma como una molécula circular independiente y si esto sucede, el plásmido resultante habrá incorporado una pequeña cantidad de DNA bacteriano. Esta forma se le conoce como una plásmido F'.

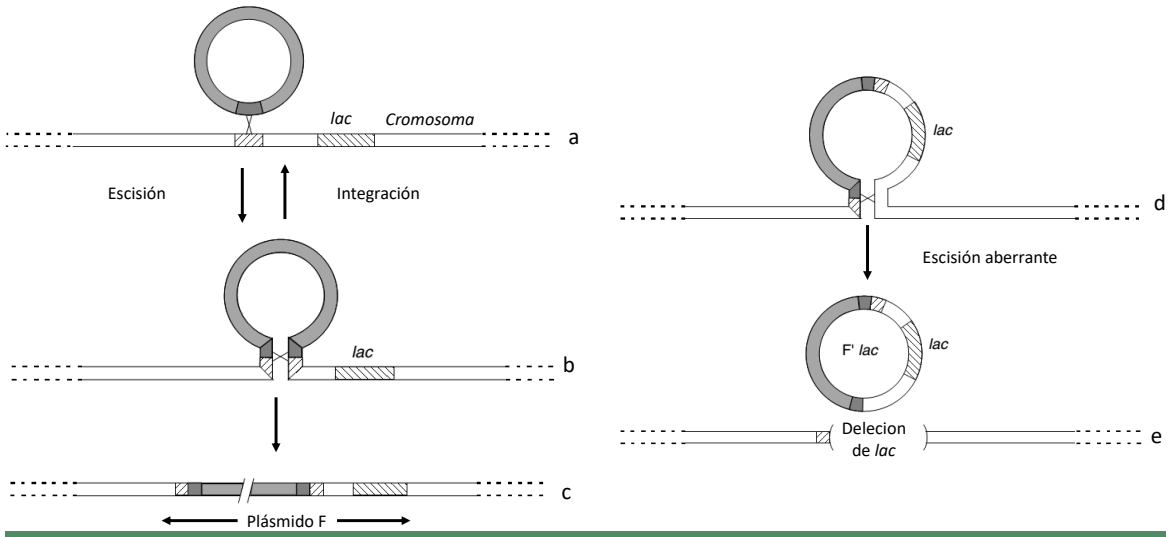

Figura 6. Integración y la escisión del plásmido F. *La integración se produce mediante recombinación con un sitio cromosómico (a-c). Escisión exacta se produce por recombinación en el mismo sitio, pero la recombinación con diferentes sitios cromosómicos resulta en la incorporación de ADN cromosómico adyacente (en este caso el gene lac) dentro del plásmido (d, e), formando un plásmido F' y causando una deleción cromosómica.*

Tomado de: Dale y Park 2004

Antes de la llegada de la clonación de genes, los plásmidos F' fueron útiles en muchas formas, incluyendo el aislamiento de genes específicos y su transferencia a otras cepas

huésped. Esto permitió la creación de *diploides parciales*, es decir, cepas con una copia de un determinado gen en el plásmido además de la copia cromosómica.

Entre las bacterias donde la conjugación se presenta con mayor frecuencia, se encuentran miembros de las Enterobacterias, como los vibrios y las *Pseudomonas spp*. Varios géneros de bacterias Gram positivas poseen sistemas de conjugación razonablemente bien caracterizados. Estos sistemas caracterizados incluyen las especies *Streptomyces*, que tienen importancia comercial como los mayores productores de antibióticos; así como los estreptococos lácticos, que también tienen importancia comercial por sus aplicaciones en varios aspectos de la industria láctea.

En algunos casos los plásmidos conjugativos son capaces de promover la transferencia (movilización) de un segundo plásmido no conjugativo de la misma célula donadora. Esto no sucede por casualidad y no todos los plásmidos no conjugativos pueden ser movilizados.

La movilización involucra un gene *mob*, el cual codifica una nucleasa específica, y el sitio *bom* (*oriT,* origen de transferencia), donde la nucleasa *mob* hace un corte en el DNA. ColE1 tiene los genes para la transferencia de DNA, pero no trae consigo los genes requeridos para la formación de una pareja de apareamiento. La presencia de otro plásmido (conjugativo) permite que el donador pueda formar una pareja de apareamiento con la célula receptora y así puede usar su propia maquinaria para acarrear el DNA transferido.

Algunos plásmidos pueden ser movilizados sin importar el gene *mob*, dicha movilización depende de la habilidad de la nucleasa *mob* del plásmido conjugativo, para reconocer el sitio *bom* del plásmido a ser movilizado. Esto sólo funciona si los dos plásmidos están estrechamente relacionados. Por otro lado, el sitio *bom* es esencial para la movilización. Este es un factor importante durante la modificación genética promovida por la conjugación, la remoción del sitio *bom* de un vector plasmídico asegura que el plásmido modificado no podrá ser transferido a otras cepas bacterianas.

1.1.2 Conjugación en otras bacterias

La descripción anterior de la conjugación se aplica principalmente a bacterias Gram-negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas*. Muchas de las especies Gram-positivas, que van desde *Streptomyces* a *Enterococcus*, también poseen plásmidos que son transmisibles por conjugación y en muchos casos, el mecanismo de transferencia de DNA es bastante similar a lo descrito anteriormente. Sin embargo, hay diferencias sustanciales en los demás aspectos.

En general, el número de genes necesarios para la transferencia por conjugación es de sólo cinco genes, y es mucho menor que en las bacterias Gram-negativas, donde se

necesitan 20 o más genes. El número de plásmidos conjugativos en bacterias Gram positivos, pueden ser considerablemente más pequeño. Una de las razones para que se requiera un menor número de genes es que al parecer no hay necesidad para producir un pili, esto debido probablemente a la arquitectura de la pared celular que carece de la membrana exterior.

Un grupo de bacterias Gram-positivas, donde los sistemas de conjugación han sido estudiado en detalle son los enterococos, principalmente *Enterococcus faecalis*. Algunas cepas de *E. faecalis* secretan péptidos difusibles que tienen una acción similar a las feromonas que puede estimular la expresión de los genes de transferencia (*tra*) de un plásmido específico en una célula vecina. Hay que hacer notar que, de manera sorprendente es la célula receptora la que produce las feromonas. La célula donante, que lleva el plásmido, tiene un receptor plásmido codificado en la superficie celular al que se une la feromona.

Después de que la feromona se ha unido al receptor de la superficie celular, es transportado al citoplasma por una proteína de transporte específica, donde interacciona con la proteína TraA. Esta proteína es un represor de los genes *tra* en el plásmido y la unión del péptido alivia aquella represión, estimulando de este modo la expresión de los genes *tra*. Un resultado es la formación de productos de agregación que causan la formación de un agregado de acoplamiento que contiene unidas las células donantes y receptoras. Una consecuencia adicional de la expresión de los genes *tra* es la estimulación de los eventos necesarios para la transferencia del plásmido, que se produce por un mecanismo similar al descrito anteriormente.

Una ventaja de este sistema es que las células que contienen el plásmido no expresan los genes necesarios para la transferencia de plásmido a menos que exista un receptor adecuado en las proximidades. Esto no sólo reduce la carga metabólica en la célula, sino que también significa que no están expresando antígenos de superficie (tales como pili conjugativo) que podrían ser reconocidas por el sistema inmune del huésped.

1.1.3 Transposones conjugativos

E. faecalis también proporciona un ejemplo de una excepción a la regla general de que la conjugación es mediada por plásmidos. Algunas cepas de *E. faecalis* contienen un transposón conocido como Tn916. Lo que diferencia a Tn916 de otros transposones es su capacidad de transferirse de una célula a otra por conjugación, se replican y heredan como parte del cromosoma y no tiene replicación independiente.

Tn916 es el prototipo de una familia de transposones conjugativos relacionados que son especialmente extendido en cocos Gram-positivos, aunque los elementos relacionados

también se producen en bacterias Gram-negativas como los Bacteroides. Para muchos de estos elementos, incluyendo Tn916, la transmisión conjugativa es promiscua ya que se puede transferir a otras especies o géneros. Es de suponer, pues, que los transposones conjugativos han jugado un papel importante en la difusión de material genético, incluidos los genes de resistencia a antibióticos en todo el reino bacteriano. En particular, muchos de estos transposones, incluyendo Tn916, llevan un gen de resistencia a tetraciclina (*tetM*) que se encuentra en una amplia gama de especies bacterianas, lo que sugiere que han desempeñado un papel en la dispersión de este gen en particular.

Sin embargo, una inspección más detallada del método de transferencia (Figura 7) muestra que existe una similitud significativa a la transferencia de un plásmido. En particular, Tn916 contiene un origen de transferencia (*oriT*) que es bastante similar al que se encuentra en muchos plásmidos. El primer paso en la transferencia es la escisión del transposón a partir del cromosoma, usando enzimas transposón-codificadas (Int y Xis) que están relacionadas con los responsables de la integración y la escisión del bacteriófago lambda. Produce una molécula circular que se asemeja a un plásmido en todos menos un rasgo vital, que no tiene un origen de replicación, por lo que es incapaz de ser copiado en la forma normal. Sin embargo, ya que tiene un sitio *oriT* y lleva los genes *tra* necesarios para la transferencia conjugacional, es como puede ser transferido a una célula receptora.

Al igual que con los sistemas de transferencia de plásmido descrito anteriormente, la transferencia de Tn916 implica la síntesis de DNA de hebra sencilla iniciado en *oriT* y ésta se transfiere al receptor. Esta única hebra se circulariza y convierte a una doble cadena que se inserta aleatoriamente en el cromosoma receptor por la acción de la integrasa.

Una característica adicional de Tn916 que vale la pena considerar es, si la transferencia se produjo sin la escisión a partir del cromosoma entonces, se esperaría que la movilización del cromosoma ocurriera con la transferencia incompleta del transposón. Transferencia comienza a partir de *oriT* y tendría que trabajar justo a la vuelta del cromosoma antes de llegar al resto del transposón. Esto no parece suceder. La razón es que el promotor para la expresión de los genes *tra* se encuentra hacia el extremo izquierdo del transposón y se encuentra lejos de los genes *tra*. En la forma lineal no se pueden expresar estos genes, sin embargo, cuando el transposón se escinde del cromosoma y es circularizado, esto trae al promotor a la posición y orientación correcta para la transcripción de los genes *tra*. Por lo tanto, se expresan a partir del intermediario circular, pero no de la forma lineal. Esto asegura que el sistema de transferencia sólo se activará después de haberse producido la escisión.

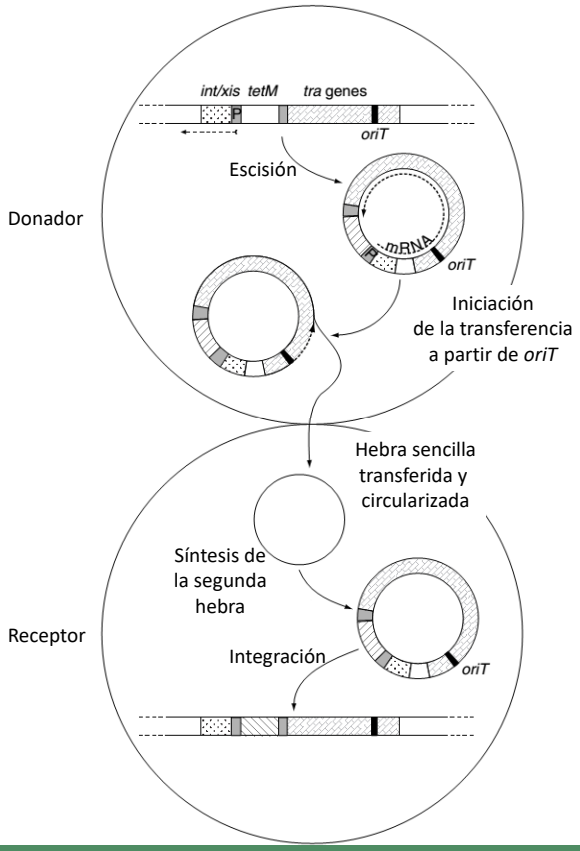

Figura 7. Transferencia del transposón conjugativo Tn916. *El transposón se escinde del cromosoma, usando las enzimas Int y Xis y posteriormente es circularizado. Esto permite a los genes tra ser expresados a partir del promotor mostrado y la transferencia por conjugación se inicia a partir de oriT. En el receptor, el DNA transferido es circularizado, la segunda hebra se hace y el transposón se integra en el cromosoma.*

Tomado de: Dale y Park 2004.

1.2 Fenómenos involucrados en la transferencia de material genético

Existen dos fenómenos que pueden suceder dentro de las bacterias una vez que han adquirido nuevo material genético: **recombinación** o **segregación cromosómica**. A continuación vamos a analizar cada uno de esos procesos.

1.2.1 Recombinación

El proceso de recombinación da como resultado, en algunos casos, que se adquiera una nueva función que le permita una mejor adaptación a los cambios ambientales, lo cual genera un evento evolutivo de gran importancia. En los procariontes, a diferencia de los eucariontes, la recombinación comprende una serie de mecanismos que son independientes de su reproducción sexual.

Recombinación

Es un proceso que combina elementos genéticos contenidos en los genomas de diferentes individuos.

El evento de recombinación del DNA se puede llevar a cabo bajo dos circunstancias:

- Después de la conjugación o transducción.
- Inmediatamente después de la replicación y durante la reparación de huecos en el DNA creados por fallos en la replicación.

Existen diferentes formas de recombinación:

- **Homóloga**. Se refiere a que ambos fragmentos de DNA proceden del mismo tipo de especie o bien muy cercana, es decir son muy similares, aunque no tienen que ser idénticos.
- **Sitio específica**. Es un evento entre pares de bases específicas de una secuencia.

En la recombinación homóloga el fragmento da DNA aceptado es muy similar a una parte del genoma del a bacteria y, tras situarse al lado, se intercambian con él por un mecanismo de rotura, entrecruzamiento y reunión de sus cadenas de DNA.

Existen dos modelos para explicar la recombinación homóloga en bacterias, pero en ambos casos participan dos moléculas de DNA de distinta procedencia, pero homólogas:

- El modelo de Hollyday
- El modelo de Meselson-Randing.

En el proceso de recombinación de procariotas intervienen una serie de enzimas sin cuya colaboración no sería posible llevar a cabo esta compleja maquinaria de intercambio de material genético. En bacterias se han descrito entre 10 y 20 loci cuyas mutaciones generan individuos deficientes en recombinación. Participan enzimas generales como DNA

polimerasas, DNA ligasas, topoisomerasas y proteínas SSB, así como otras más específicas de la recombinación como las RecA, RecBCD, o RecG, cuyas letras implican el orden en el que se descubrieron, no siempre coincidente con el orden de actuación. También intervienen enzimas que se descubrieron en estudios de reparación del DNA como las Ruv AB y Ruv C.

Vamos a estudiar primero el modelo de Holliday el cual se puede dividir en las siguientes etapas:

Modelo de Holliday

1. Apareamiento de dos hebras de DNA homólogo.

En esta etapa las dos hebras de DNA se alinean en la región homóloga donde se llevará a cabo la recombinación.

2. Corte de las hebras.

En esta etapa sucede la ruptura de dos de las cuatro hebras de DNA de hebra sencilla que participan. El corte ocurre aproximadamente a la misma altura y las hebras implicadas poseen la misma polaridad. Esto sucede gracias a la enzima Rec BCD cuya misión es la de crear regiones de DNA de hebra sencilla con extremos libres 3´. Este complejo enzimático de varias subunidades (B, C y D) se introduce en el DNA allí donde haya una doble ruptura y se desplaza a una velocidad de unas 100 pb/seg en la dirección 5´-3´ hasta encontrar una secuencia *chi* (del inglés: *cross-over hot spot instigado*r: 5´GCTGGTGG3´), donde se detiene unos 10 seg. Las secuencias *chi* favorecen la recombinación, por lo que se consideran puntos calientes recombinacionales, se encuentran por puro azar cada 5 a 10 kb pero no son imprescindibles.

3. Desplazamiento de las hebras.

En esta fase cada hebra rota deja a su otra mitad, cruza y se aparea con su complementaria del DNA homólogo, desplazando a su equivalente. Esto sucede porque Rec BCD se engancha a una doble mella en el DNA y se desplaza desenrollando y desapareando el DNA con su actividad helicasa; con su actividad exonucleasa degrada parcialmente el DNA de hebra sencilla con el extremo 3´.

4. Ruptura doble.

Al llegar Rec BCD a una segunda secuencia *chi*, se detiene y rompe la hebra superior del DNA a una distancia entre 4 y 6 pb de *chi*, donde reconoce la hebra superior de la secuencia *chi* desapareada y libera la subunidad D (nucleasa), Rec BC sigue avanzando más despacio como helicasa.

Modelo de Holliday (Continuación)

5. Invasión de cadenas

La presencia del extremo 3´ libre permite e incentiva la llegada de Rec A que se une al extremo y facilita la invasión de una molécula de hebra simple a otra de doble hebra con desplazamiento de su idéntica. El intercambio de hebras es recíproco y se van generando moléculas híbridas (heteroduplex) a medida que el entrecruzamiento avanza en una dirección.

6. Formación de la encrucijada

El desplazamiento de las cadenas puede ocurrir en cualquiera de las dos direcciones posibles durante una distancia muy variable formando la encrucijada.

5. Resolución de la encrucijada

Seguidamente interviene el sistema Ruv (enzimas de reparación de los daños provocados por luz ultravioleta) que actúa y resuelve la encrucijada de Holliday: Ruv A reconoce los entrecruzamientos y cada una de sus 4 subunidades se une a una hebra del DNA; Ruv B es un exámero que forma una especie de anillo alrededor de la molécula de DNA, es en realidad una helicasa con actividad ATPasa que facilita el desplazamiento del punto de intersección de los cromosomas. La presencia del complejo Ruv AB permite al quiasma viajar a una velocidad de 10 a 20 pb por segundo y desplazar a las moléculas de Rec A que pudieran quedar en el DNA. La endonucleasa Ruv C reconoce específicamente encrucijadas de tipo Holliday y produce los cortes que resuelven el proceso los cuales pueden ocurrir en dos formas: 1) que participen las mismas hebras que han sufrido el primer corte o 2) que participen las dos hebras que aún permanecen intactas. En el primer caso volvemos al estado inicial devolviendo a sus sitio las hebras que habían intercambiado pareja y como resultado tendremos dos heteroduplex, que no recombinante, ya que sólo una de las dos hebras ha participado en el intercambio. Por el contrario si las rupturas afectan a las hebras aún intactas, se repetirán los eventos ya explicados para las dos hebras intercambiadas y tendremos un segundo entrecruzamiento que, de ir en la misma dirección que el primero, irá generando un intercambio recíproco de las dos hebras de DNA de un cromosoma con las de su homólogo, hasta el final del cromosoma.

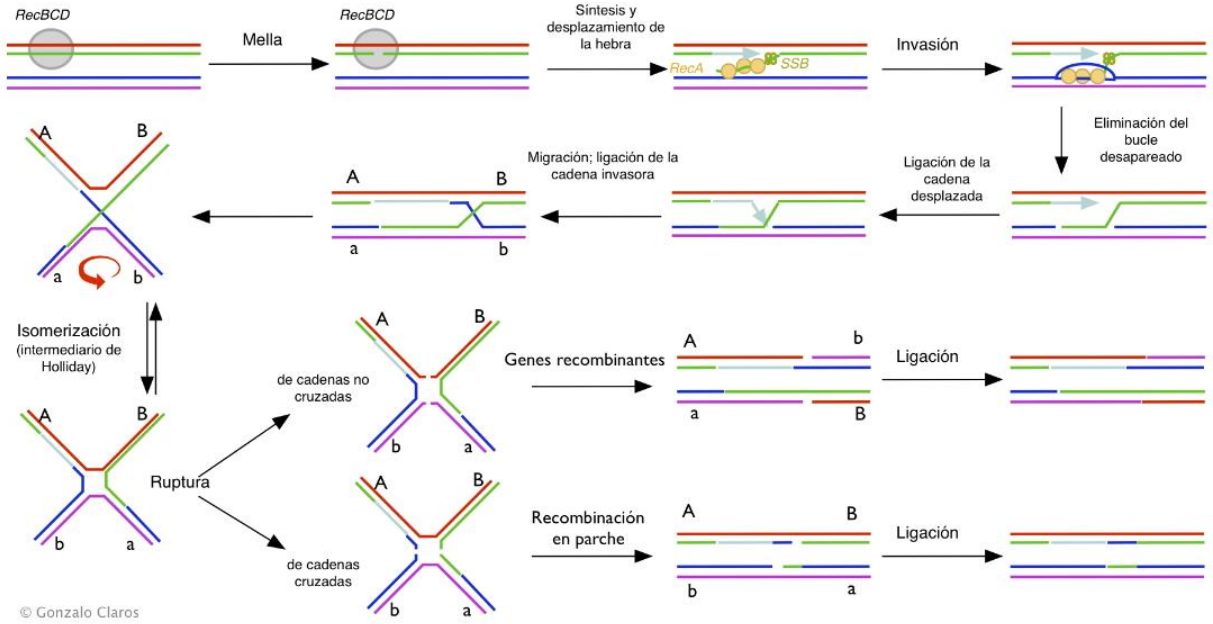

Figura 8. Modelo de Holliday. *Se muestran las etapas de ruptura e invasión de las cadenas, para formar la encrucijada de Holliday cuya ruptura puede generar genes recombinantes o una recombinación en parche.*

Tomado de: http://www.biorom.uma.es/contenido/av_bma/apuntes/t8/t8_recomb.htm

En algunos plásmidos y adenovirus, fotografiados al microscopio electrónico en el momento de la recombinación homóloga, se aprecia una estructura de forma cruciforme denominada la encrucijada de Holliday. La estructura representa el resultado de una apertura en las hebras que están intercambiando material genético, seguido de una rotación. La representación de esta estructura en el plano, y dependiendo de que las segundas rupturas ocurran en horizontal o en vertical, nos permite visualizar el resultado previsto cuando se implican las mismas hebras de la ruptura inicial o las que permanecían intactas. En el primer caso se liberarían heteroduplex, y en el segundo, recombinantes.

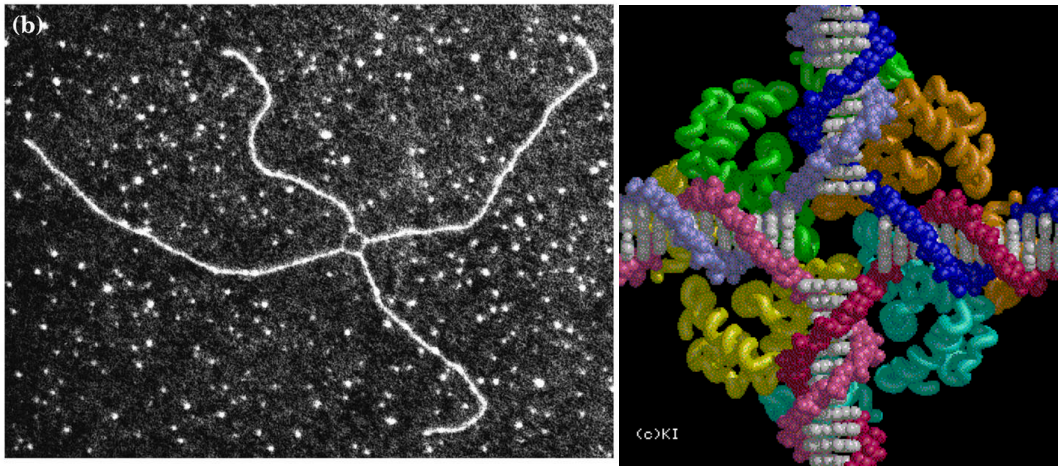

Figura 9. Encrucijada de Holliday. Se muestra del lado izquierdo una micrografía electrónica de la estructura y del lado derecho una animación informática.

Tomado de:
http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/12DNA/Hjunctionfoto.jpg y
http://www.biorom.uma.es/contenido/av_bma/apuntes/t8/t8_recomb.htm

El modelo de Meselson-Radding supera uno de los puntos más débiles del modelo de Holliday que es el doble corte inicial a la misma altura en dos hebras de DNA homólogas. Este modelo postula una sola mella inicial en el DNA: el extremo 3´OH generado es enganchado por la DNA polimerasa que realiza la síntesis de DNA, mientras que el extremo 5´fosfato libre invade y ataca la cadena contraria no cortada. Se forma un bucle al desplazar la cadena autóctona que se elimina seguidamente al formarse el quiasma y ligarse la hebra invasora.

En este punto el modelo prosigue, en coincidencia con la propuesta de Holliday, con la formación de la encrucijada y resolución con un segundo doble corte en horizontal o vertical. Una vez que se ha formado el quiasma y avanza, ya no hay distinción entre los distintos modelos.

1.2.2 Segregación cromosómica

Si los plásmidos no logran recombinarse con el cromosoma bacteriano, entonces permanecen como unidad independiente autoreplicativa, sin embargo, éste puede perderse, proceso al que denominamos **curación.**

Curación

Proceso de pérdida del plásmidos en una célula.

Muchos de los plásmidos no suelen ser indispensables para la viabilidad de la bacteria, y muchos de ellos se pierden en ausencia de una presión selectiva.

La curación puede ocurrir de dos maneras:

- **Artificial.** Por agentes químicos o físicos (incubando las bacterias a temperaturas cercanas a la máxima o utilizando naranja de acridina, que se insertan entre las bases del DNA). En este caso, los tratamientos interfieren con la replicación del plásmido sin afectar la del cromosoma. Esto hace que en sucesivas divisiones de una bacteria, el plásmido se vaya "diluyendo" en la población resultante.

- **Espontánea.** Por una mala distribución del material genético durante la replicación celular, por requerir un tiempo de replicación mayor al de la célula, o por incompatibilidad entre plásmidos.

Cada clase de plásmido se mantiene en la bacteria hospedadora en un número de copias característico. Los plásmidos unicopia mantienen la paridad con el cromosoma bacteriano, pero los plásmidos multicopia se presentan en un número característico de ejemplares (típicamente 10 a 20) por cromosoma bacteriano.

El número de copias es sobre todo una consecuencia del tipo de regulación de la replicación. El sistema responsable de iniciar la replicación determina el número de orígenes que pueden estar presentes en la bacteria. Como cada plásmido consta de un solo replicón, el número de orígenes es igual al de copias del plásmido. La replicación de los plásmidos unicopia tiene una regulación parecida a la del cromosoma bacteriano. Cada origen se puede replicar una vez; los orígenes hijos se segregan o reparten a células hijas diferentes.

El fenómeno de **incompatibilidad plasmídica** está relacionado con la regulación del número de copias del plásmido y con la compatibilidad entre los orígenes de replicación de distintos plásmidos presentes en una misma célula. Se dice que dos plásmidos son incompatibles cuando no pueden coexistir establemente en la misma bacteria en ausencia de una presión selectiva permanente.

Los plásmidos son incompatibles porque en alguna operación esencial para su

mantenimiento, que podría ser la replicación del DNA o la segregación, no pueden distinguirse unos de otros.

La hipótesis de una regulación negativa en la incompatibilidad de plásmidos se basa en la idea de que el número de copias está determinado por la síntesis de un represor que mide el número de orígenes.

Grupo de incompatibilidad

Se define como el conjunto de los plásmidos que no pueden coexistir en la misma célula bacteriana.

Tabla 1. Grupos de incompatibilidad

Incompatibility Group	Plasmids
FI	F, R386
FII	R1
FIII	Col B-K99, Col B-K166
FIV	R124
I	R62, R64, R483 (at least 5 subgroups)
J	R391
N	R46
O	R724
P	RP4, RK2
Q	RSF1010
T	R401
W	R388, S-a

Analiza esta clasificación de grupos de incompatiblidad e investiga sus orígenes de replicación. Tomado de https://www.google.com/patents/EP2597943A2?cl=en

Cada plásmido, dentro de la amplia diversidad de los que se conocen, se suele clasificar según el grupo de incompatibilidad al que pertenece. Los grupos de incompatibilidad se suelen denominar con las siglas Inc seguidas de una letra mayúscula (por ejemplo: IncP, IncFII, etc.).

La replicación es imposible en el caso de plásmidos que presentan el mismo origen de replicación, por ello la replicación se detiene hasta que se hayan repartido los dos plásmidos a células diferentes para dar lugar al número de copias correcto antes de la replicación.

El sistema de replicación de los plásmidos multicopia permite la coexistencia de varios orígenes. Sin embargo, el número total está controlado y tiene que haber un procedimiento de reparto de los plásmidos a las células hijas para que el plásmido sobreviva en la población bacteriana.

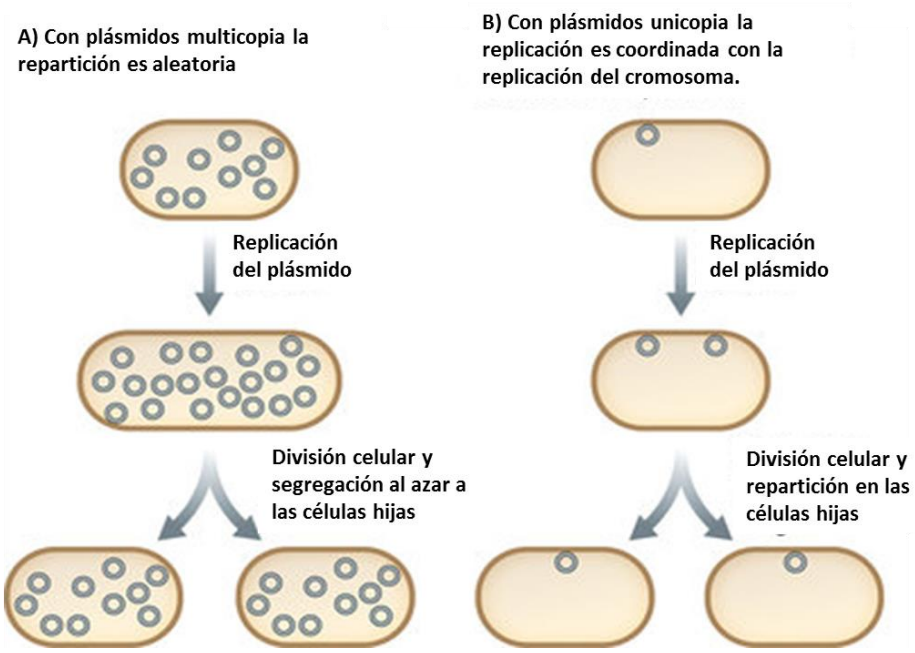

Figura 10. Repartición plasmídica. *Se muestra la repartición al azar de plásmidos multicopia A) y la repartición coordinada con la replicación del cromosoma en los plásmidos unicopia B).*

Modificado de: http://www.wwnorton.com/college/biology/microbiology2/ch/07/etopics.aspx

Muchos plásmidos poseen sistemas de reparto, que tienden a asegurar que una vez que el plásmido ha sido replicado, cada una de las células hijas va a recibir al menos una copia. A falta de un sistema tal, y si el reparto fuera aleatorio, de vez en cuando, las propias fluctuaciones de la segregación aleatoria harían que parte de la progenie no recibiera una copia, con lo que quedaría curada de ese plásmido.

El reparto de las copias a las células hijas se suele deber a las llamadas funciones *par*, que están cerca de los genes *rep* y de la zona *ori*. Se trata de cortas secuencias de DNA que de alguna manera deben unirse a alguna zona de la membrana de la bacteria que se duplica durante la división celular, de modo que cada copia, unida a una de esas zonas, se segrega a una célula hija.

Existen algunas estrategias que se pueden seguir para tratar de evitar la curación de un plásmido durante el cultivo de la bacteria, entre las que se incluyen:

- Introducir genes de resistencia a antibióticos en el plásmido y crecer a la bacteria siempre en presencia del antibiótico, para generar una necesidad de la célula por el plásmido.
- Introducir genes de recombinación en el plásmido para que sean integrados al cromosoma y ya no haya riesgo en la segregación.
- Emplear plásmidos de un alto número de copias.
- Remover genes esenciales en el cromosoma bacteriano que estén presentes en el plásmido, para que éste sea vital para la célula.
- Con un mecanismo toxina-antitoxina. El plásmido codifica para una toxina letal para la célula y él mismo codifica para la antitoxina, de tal manera que si una célula hija se ha quedado sin el plásmido inicialmente tendrá niveles balanceados de toxina y antitoxina, pero la antitoxina se degrada con mayor rapidez por lo que se rompe el balance y habrá un efecto tóxico sobre la célula. Algunos de estos sistemas son bactericidas y otros bacteriostáticos.

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu docente en línea, mismo que te indicará, a través de la *Planificación de actividades*, la dinámica que tú y tus compañeros (as) llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Para el envío de tus trabajos usarás la siguiente nomenclatura: BGMB _U1_A1_XXYZ, donde BGMB corresponde a las siglas de la asignatura, U1 es la unidad de conocimiento, A1 es el número de actividad, el cual debes sustituir considerando la actividad que se realices, XX son las primeras letras de tu nombre, Y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.

Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes responder las *Preguntas de Autorreflexión* indicadas por tu docente en línea y enviar tu archivo. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación.

Para el envío de tu autorreflexión utiliza la siguiente nomenclatura: BGMB _U1_ATR _XXYZ, donde BGMB corresponde a las siglas de la asignatura, U1 es la etapa de conocimiento, XX son las primeras letras de tu nombre, y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno

Cierre de la Unidad

En esta primera unidad nos adentramos en el mundo de la genética molecular bacteriana, estudiando dos fenómenos que son característicos de las bacterias: la conjugación mediada por plásmidos y por transposones. Esto nos permite comprender los primeros experimentos de biología molecular que fueron descritos, ya que el manejo sencillo de los microorganismos ha permitido el estudio de las bases y mecanismos genéticos.

Por otro lado, estudiamos el proceso de recombinación y segregación bacteriana, fundamentos que te serán muy útiles en el desarrollo de bacterias genéticamente modificadas, tema que tocaremos en la siguiente unidad.

Con los temas estudiados en esta unidad y los fundamentos que ya has estudiado en otras asignaturas, tienes las bases para comprender todos los fenómenos genéticos que hasta ahora se han descubierto en los organismos vivos; sin embargo, las investigaciones que se llevan a cabo de forma rutinaria, permiten que se descifren nuevos secretos sobre mecanismos genéticos, por lo que siembre tienes que estar actualizándote.

Para saber más

Conjugación bacteriana Transferencia de un plásmido
https://www.youtube.com/watch?v=YJlGE5h6coI
Recombinación homóloga
https://www.youtube.com/watch?v=-v9vrMMTmeg
Recombinación de DNA
https://www.youtube.com/watch?v=niGW30UFklE

Genética bacteriana
http://cvb.ehu.es/open_course_ware/castellano/salud/tecnicasmol/tema2pdf.pdf
Conjugación bacteriana I
http://www.unioviedo.es/esr/pp/mgb1.pdf
Elementos genéticos transferibles: plásmidos, transposones e integrones
http://cvb.ehu.es/open_course_ware/castellano/salud/tecnicasmol/tema-8-elementos-geneticos-transferibles-plasmidos-transposones-e-integrones.pdf

Recombinación de DNA
https://gen5fq.files.wordpress.com/2010/04/clase-15-tema-iv-recombinacion-de-dna.pdf

Recombinación genética

http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2009/GenMol/clase6.pdf

Modelos, mecanismos y consecuencias biológicas de la conversión génica

http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/viewFile/133/132

Genética bacteriana

http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/licenciatura/biotecnologia/2010/MicroBiol/GeneticaBacteriana.pdf

Fuentes de consulta

Betancor, L., Gadea, P., Flores, K. (2006). *Genética Bacteriana. Temas de Bacteriología y virología médica*. 2ª Edición. Uruguay: Universidad de la Republica.

Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C.A. (2008). España. *Conceptos de Genética*. Pearson Education.

Lewin, B. (traducción Villa, H.B., García, F.). (2008). *Genes IX*. (9ª edición). D.F., México: McGraw-Hill/Interamericana. 892 pp.