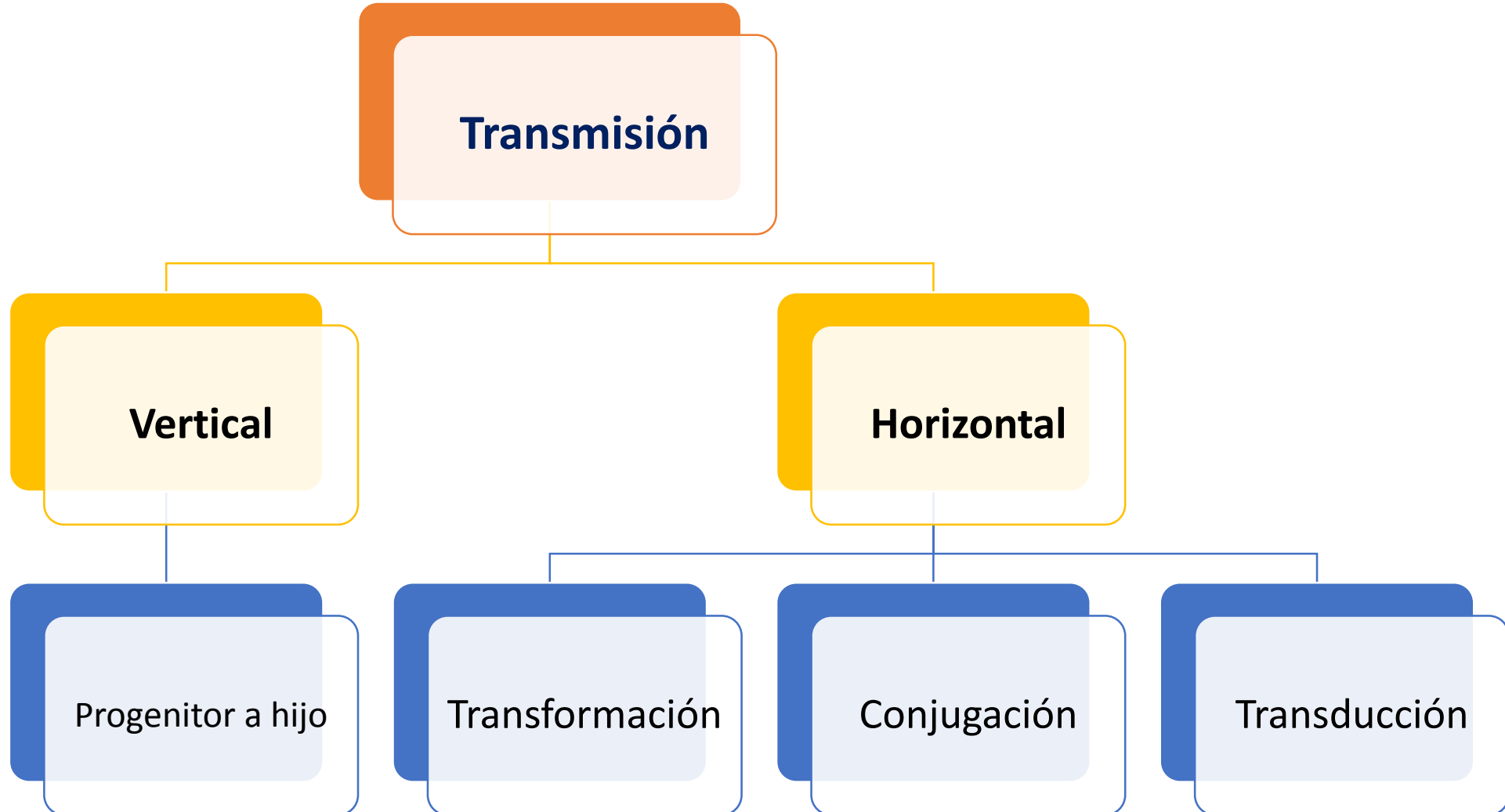


ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Transferencia de material genético

Conjugación y Transformación

Mecanismos naturales de transferencia



Destino del DNA transferido

El DNA introducido tiene tres destinos posibles:

- Degradación
- Auto-replicación
- **Recombinación**

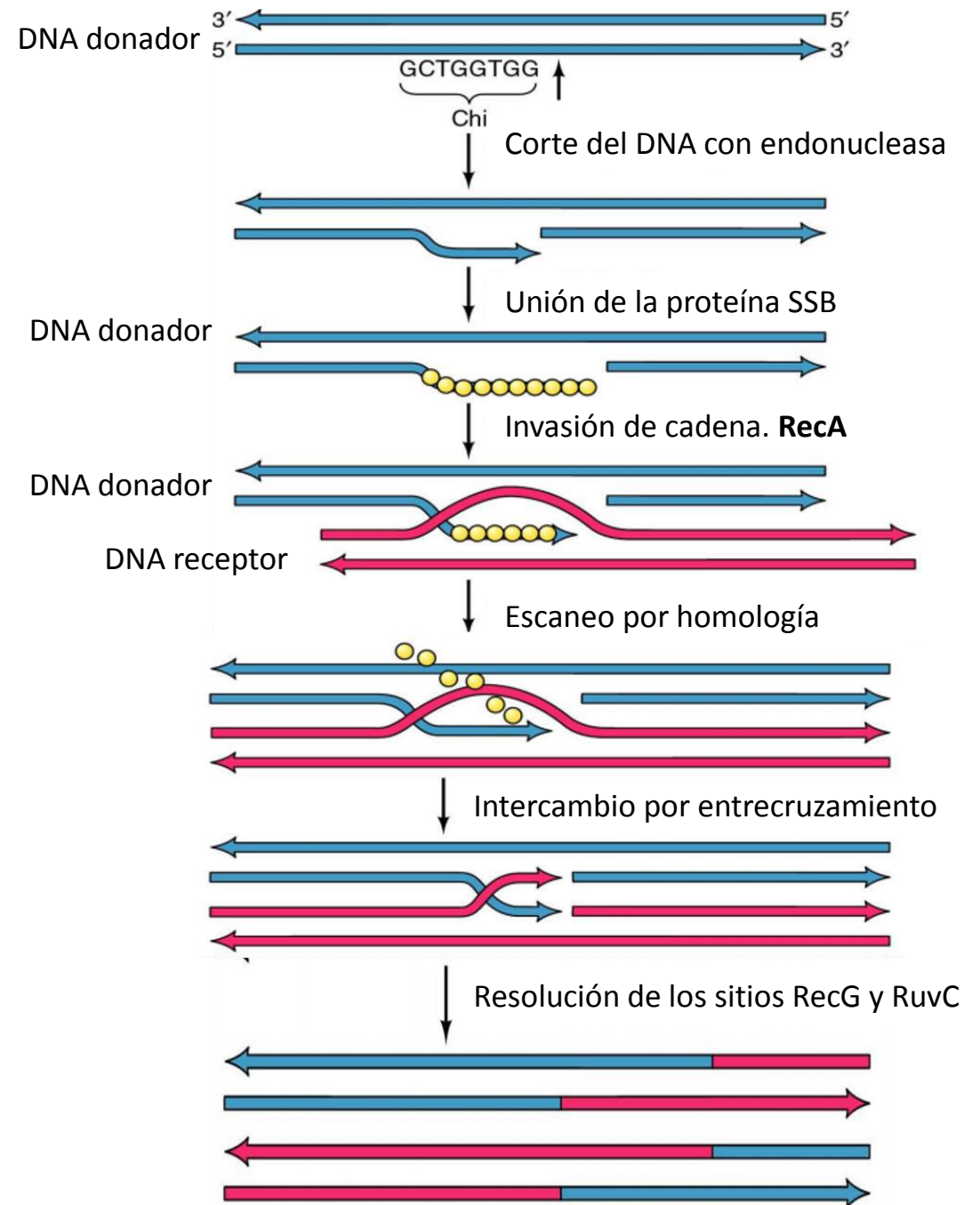
RECOMBINACIÓN: se refiere al intercambio físico de DNA entre elementos genéticos.

- Meiosis en células eucarióticas
- Integración de elementos extra-cromosomales dentro del genoma del hospedero

Otorga una ventaja evolutiva

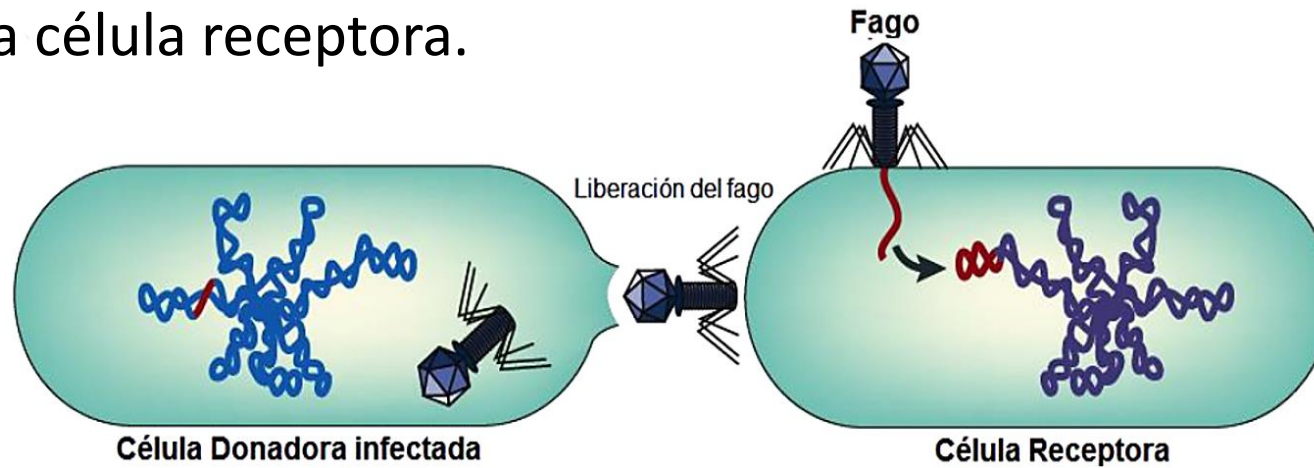
Recombinación homóloga

1. Muesca, escisión de DNA generada por endonucleasa
2. Separación de cadenas por actividad helicasa
3. Unión de proteína SSB a cadena sencilla
4. Invasión de la hebra
5. Enlace a RecA. Facilita alineamiento con secuencia complementaria
6. Intercambio de DNA homólogo (migración)
7. Resolución de hebras por resolvasas



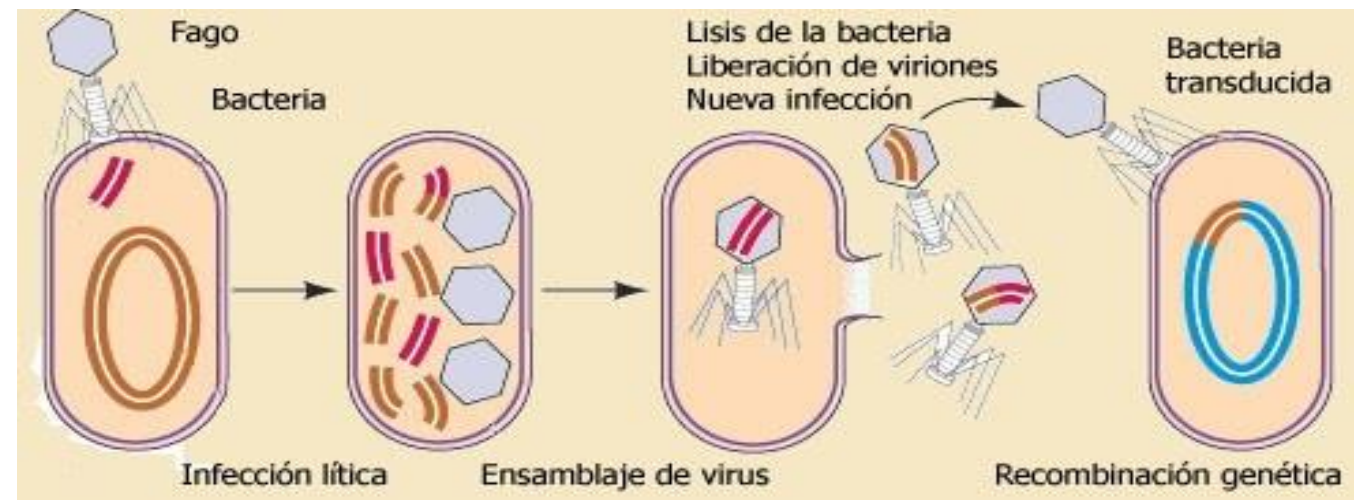
Transducción

En la transducción, un virus bacteriano (**bacteriófago**) transfiere el DNA de una célula donadora a una célula receptora.



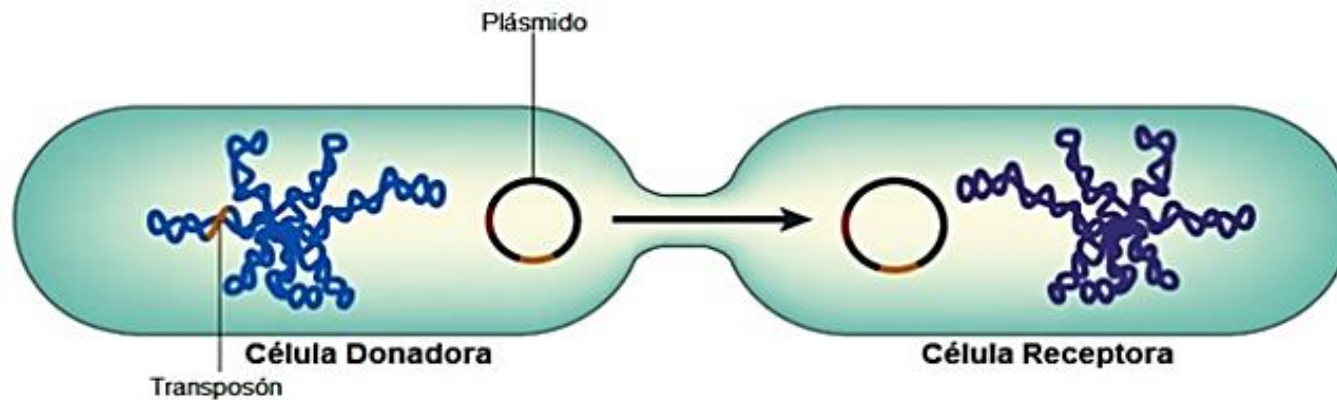
La transferencia de genes del hospedador puede ocurrir de dos maneras:

- Transducción generalizada
- Transducción especializada



Conjugación

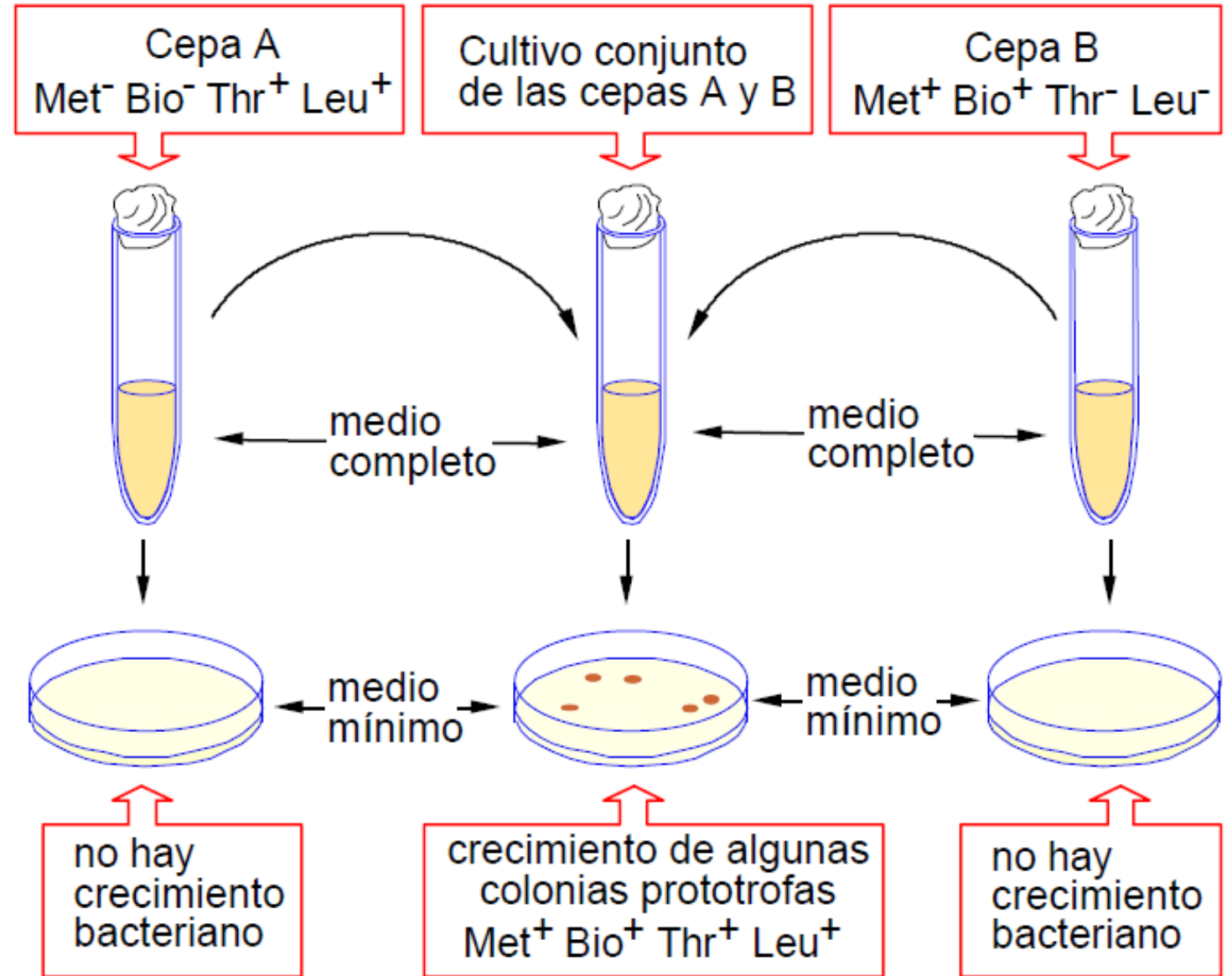
La conjugación bacteriana es un mecanismo de transferencia de DNA que implica el **contacto entre células** y la presencia de un **plásmido conjugativo**.



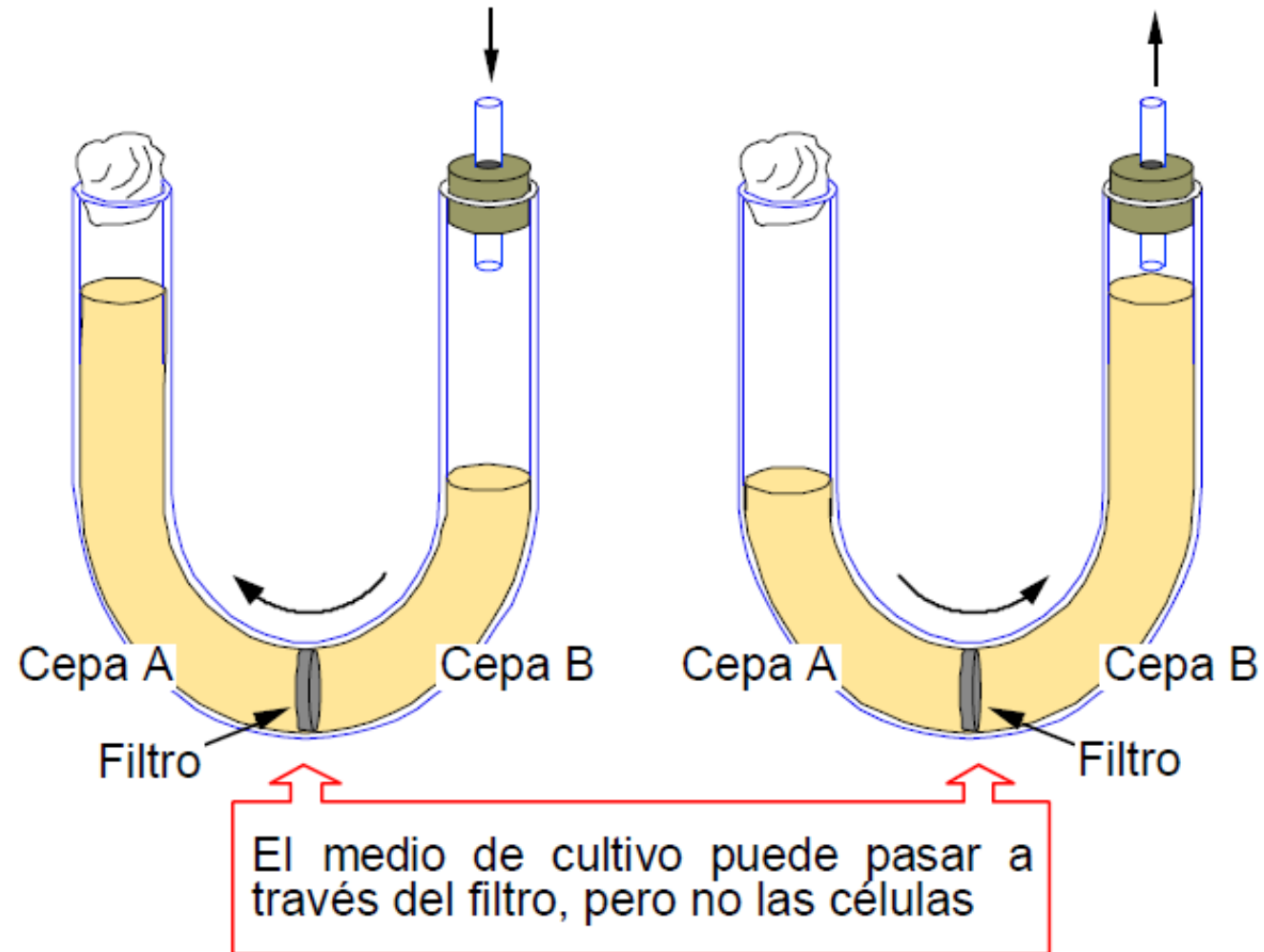
El proceso de conjugación implica una **célula donadora**, que contiene el plásmido conjugativo, y una **célula receptora**, que no lo contiene.

Descubrimiento

- Fue descubierta en 1946 por Lederberg y Tatum.
- Emplearon dos cepas auxótrofas.
- Se cultivaron juntas en medio completo.
- Se sub-cultivaron en medio mínimo.
- Vieron crecimiento de colonias en medio mínimo.



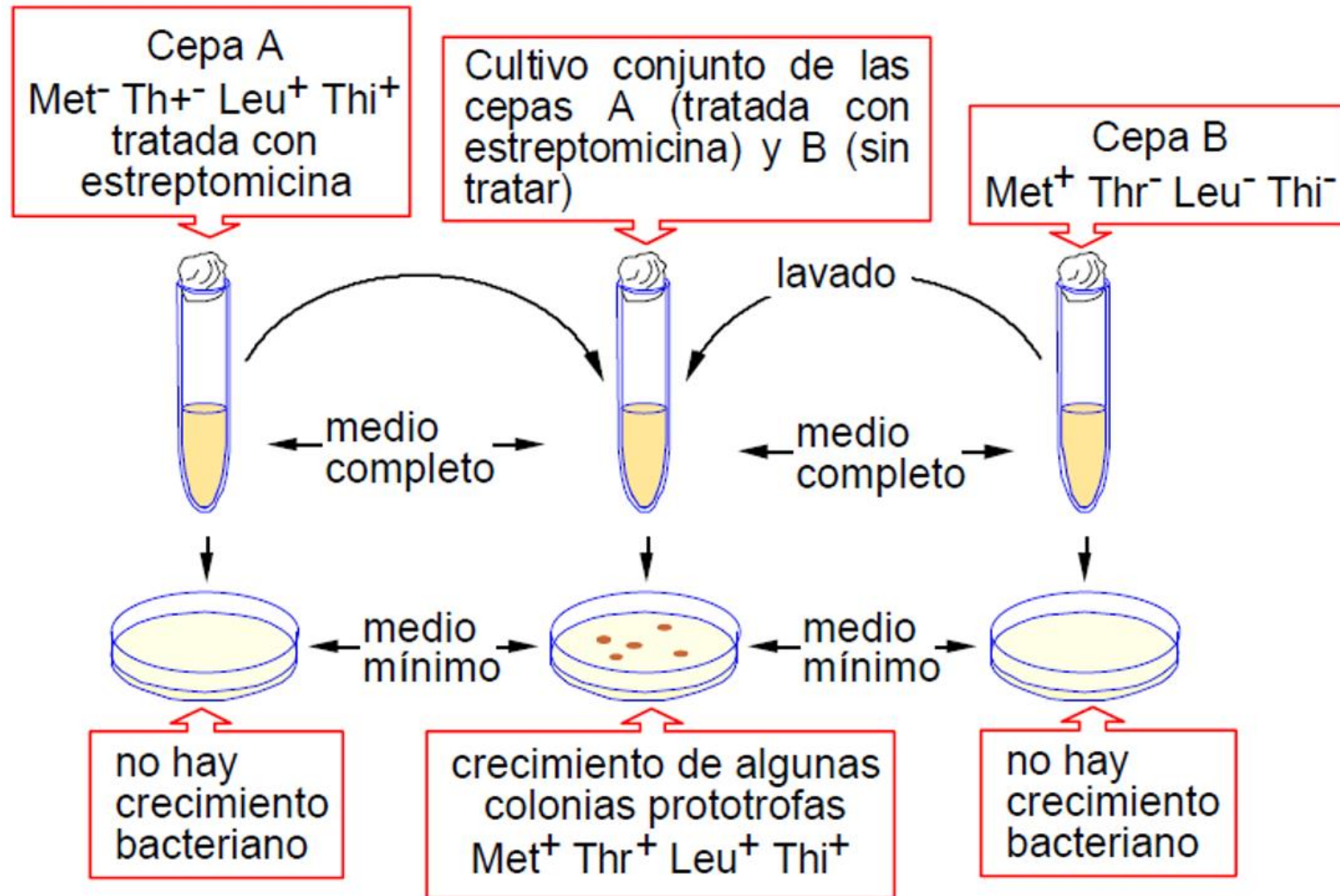
Necesidad de contacto físico entre células para que se lleve a cabo la conjugación



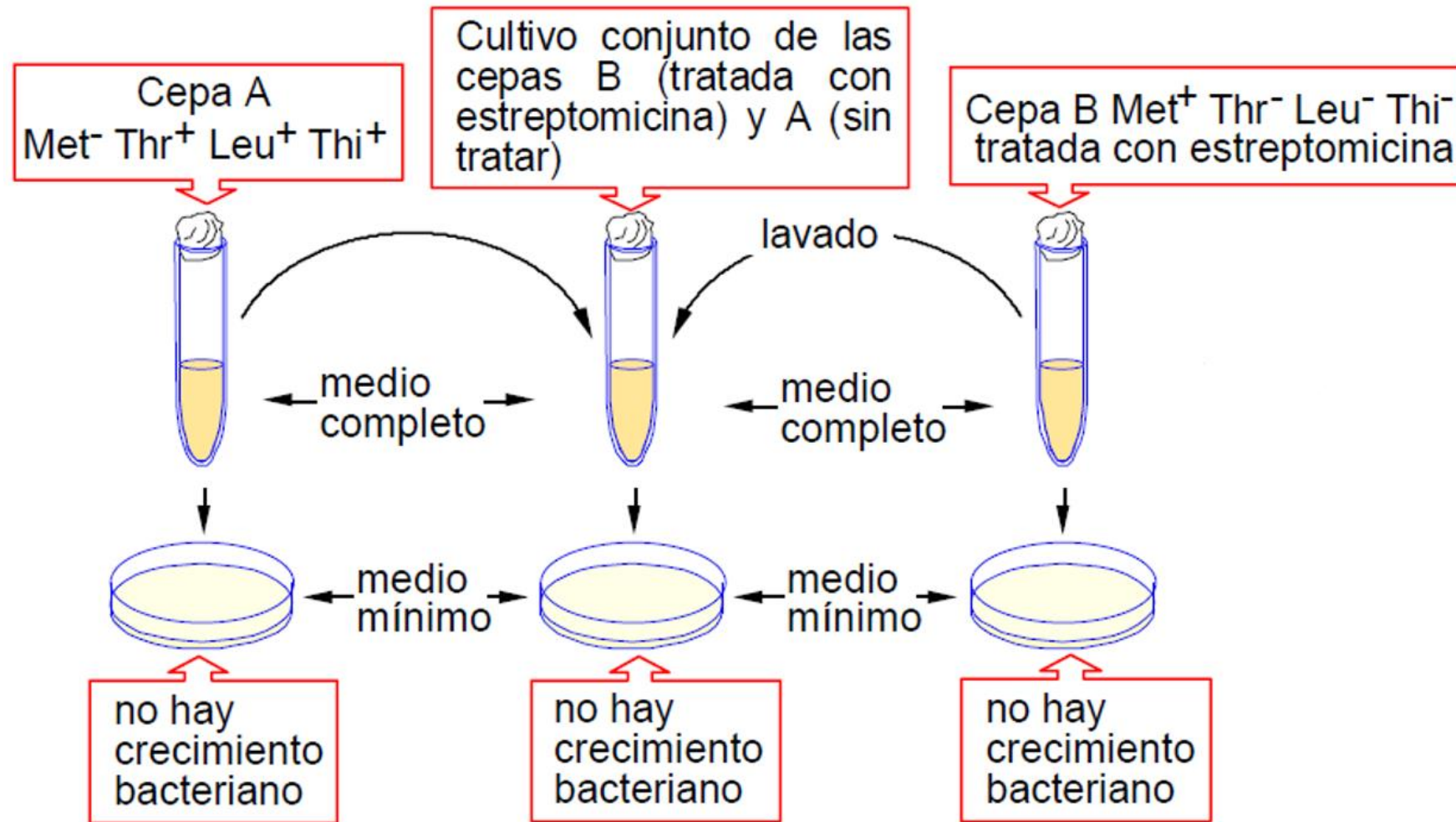
Bernard Davis (1950) demostró que se necesitaba el contacto físico entre bacterias para la complementación bacteriana.

Participación desigual de las células en el proceso de conjugación

William Hayes (1953) determinó que la transferencia genética ocurría en una sola dirección



Participación desigual de las células en el proceso de conjugación



En la transferencia de material genético, una célula actúa como “**donante**” y la otra como “**receptora**”

William Hayes y la transferencia del factor de fertilidad F

- Descubrió casualmente que una variante de una cepa donadora no producía bacterias recombinantes cuando la cruzaba con una cepa receptora.
- Sugirió que la capacidad de actuar como donante era una propiedad hereditaria conferida por el **factor de fertilidad (F)**.
- Las cepas portadoras de F son capaces de donar genes y se designan F^+
- Las cepas receptoras carecen de F y no pueden donar genes, se designan F^-

Factor F (fertilidad)

- El factor F es un plásmido
- Replicación independiente del cromosoma hospedador:
Autónomo
- Contiene un operón de genes *tra* que codifican moléculas involucradas en la conjugación
- Dirige la síntesis del pili

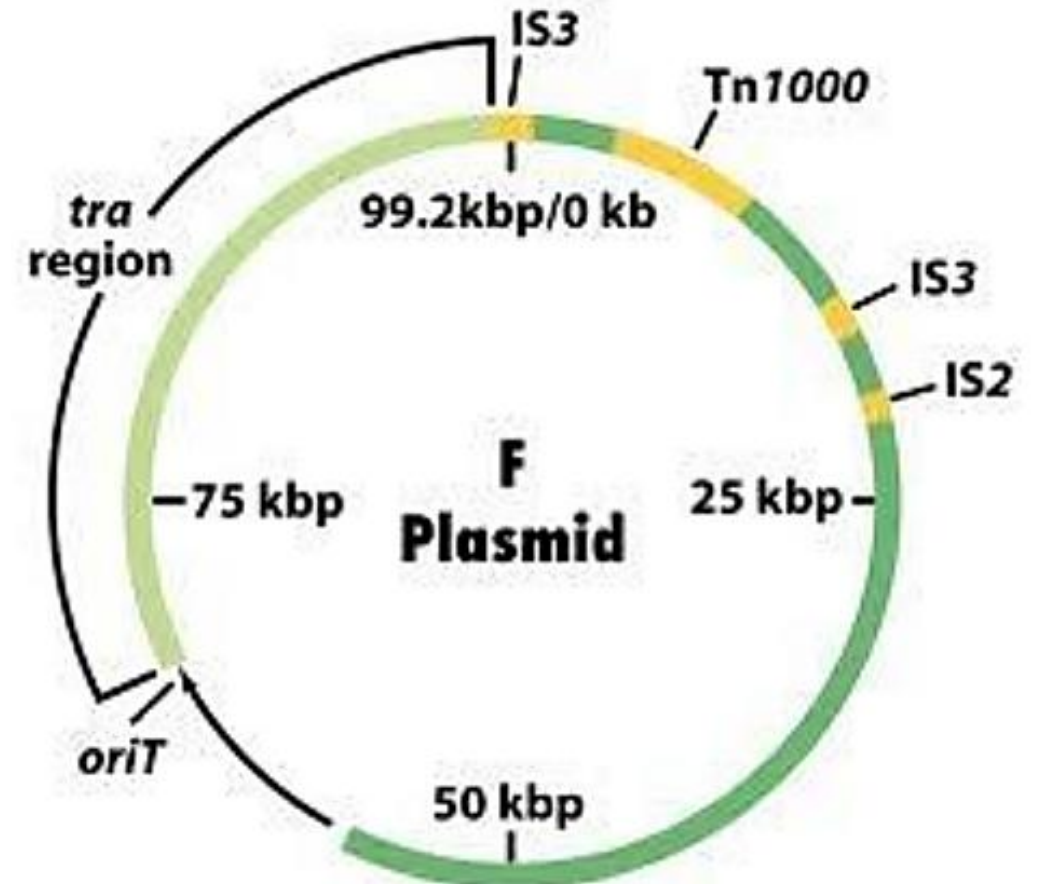
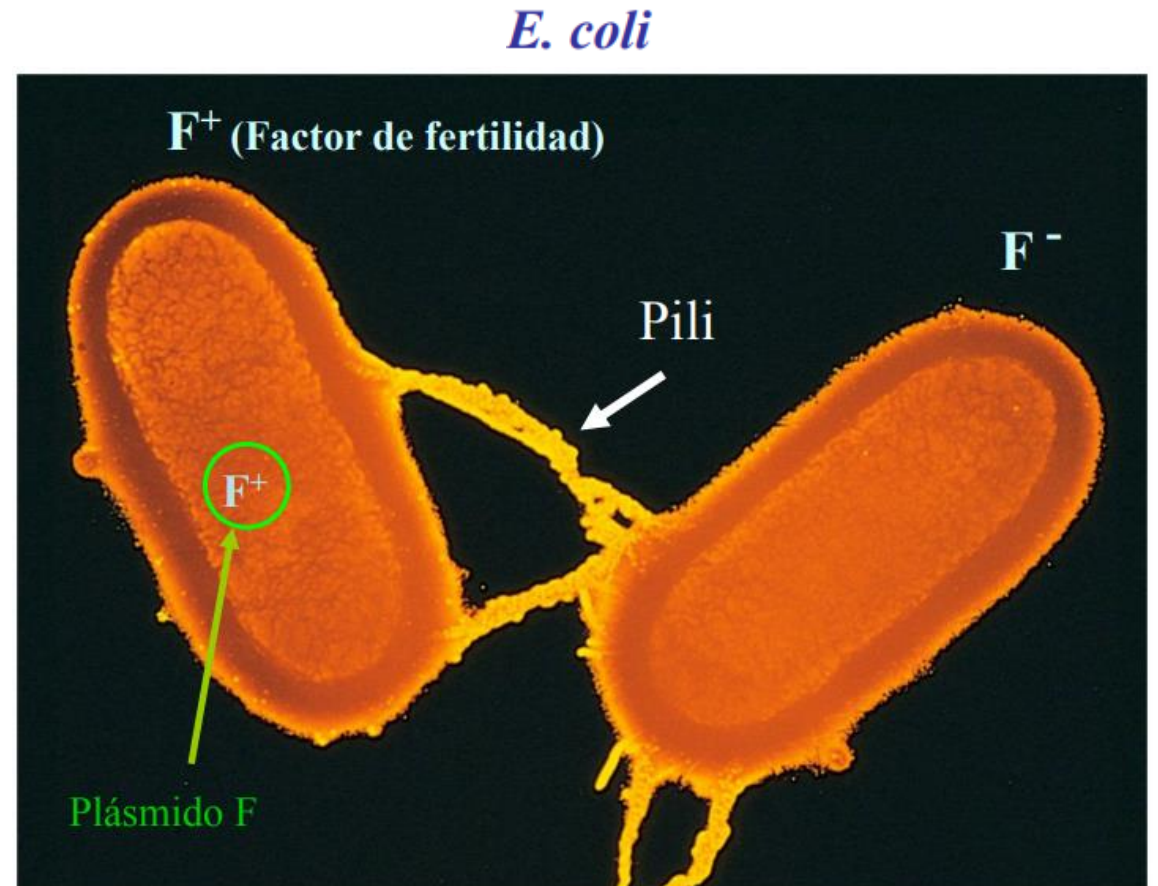


Figure 10-18 Beck Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Pili sexual (pili conjugativo)

- Formado por una subunidad proteica denominada pilina, codificada por el gen *traA*
- Cilindro hueco de aproximadamente 20 μ m de largo, 8nm de diámetro externo y 2nm de diámetro interno.
- Funciona como un vehículo para establecer contacto entre células
- Actúa como un conducto a través del cual pasa el DNA durante la conjugación

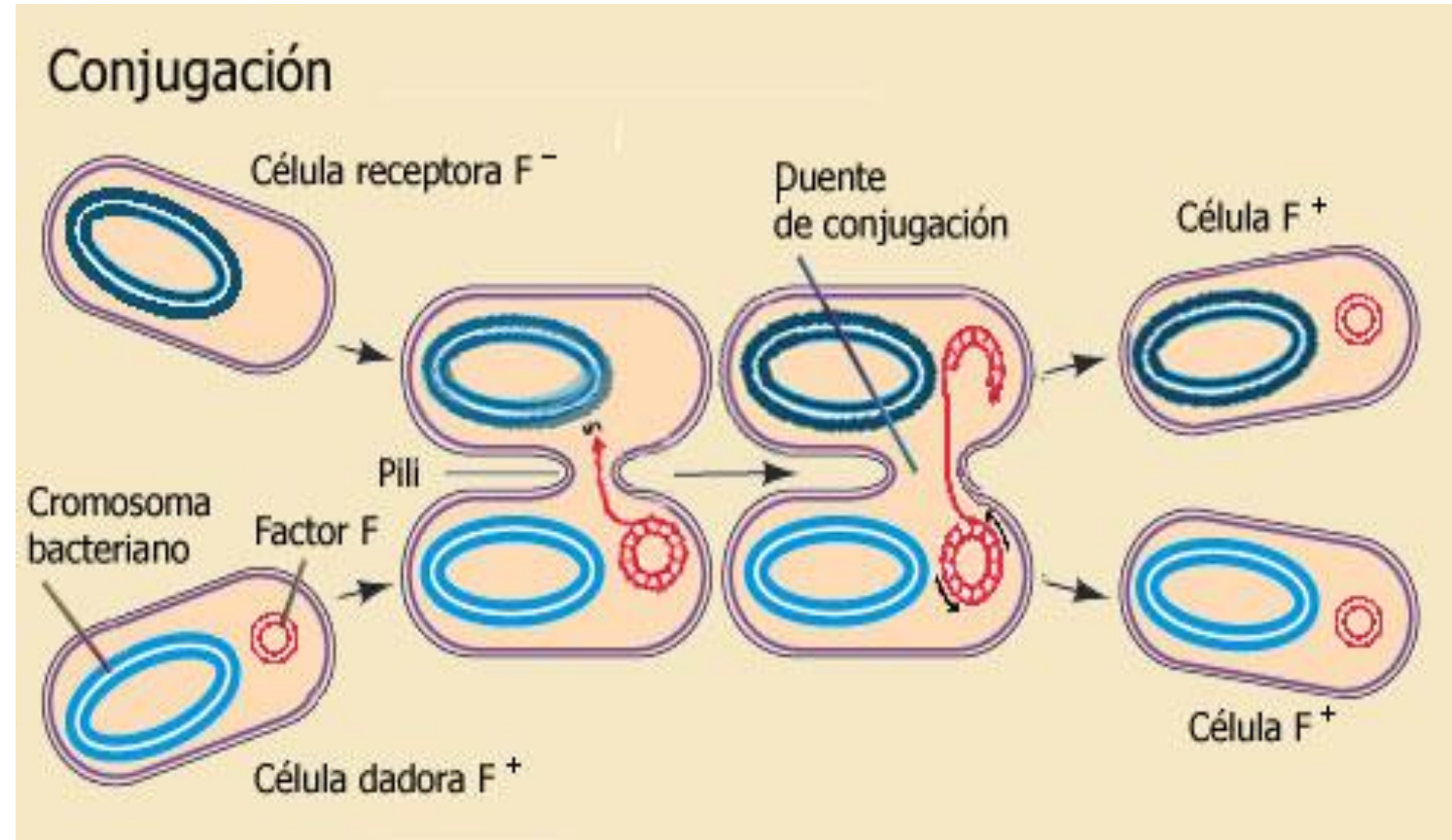


El proceso de conjugación de *E. coli* (gramnegativa)

Transferencia del factor F

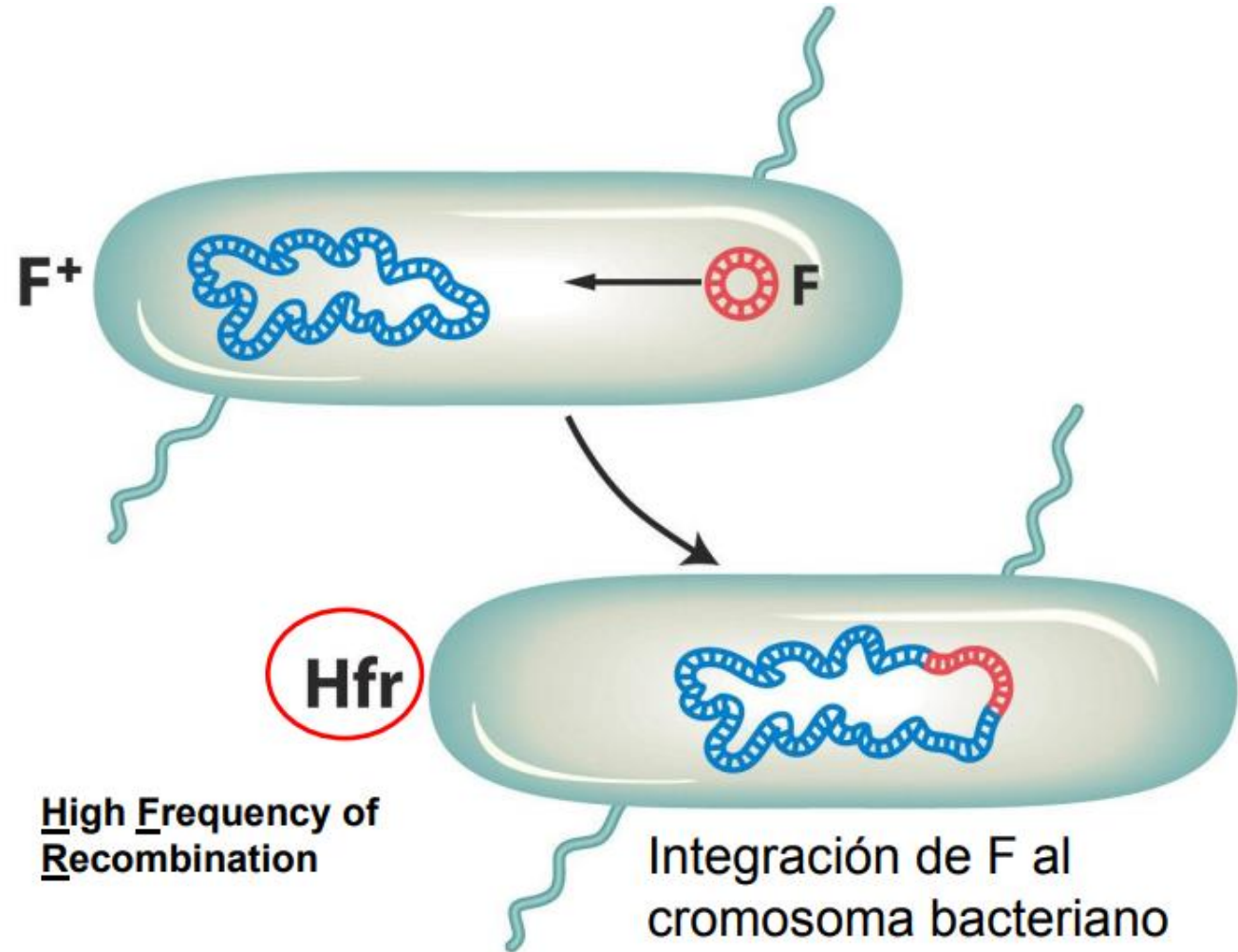
Pasos:

- Contacto entre células a través del pili
- Retracción del pili.
- Muesca en el plásmido F en una cadena
- Transferencia de una cadena de la célula F^+ a la F^-
- Replicación simultánea del plásmido en F^+
- Síntesis de cadena complementaria en la F^-
- Terminación de transferencia y replicación. Separación de células



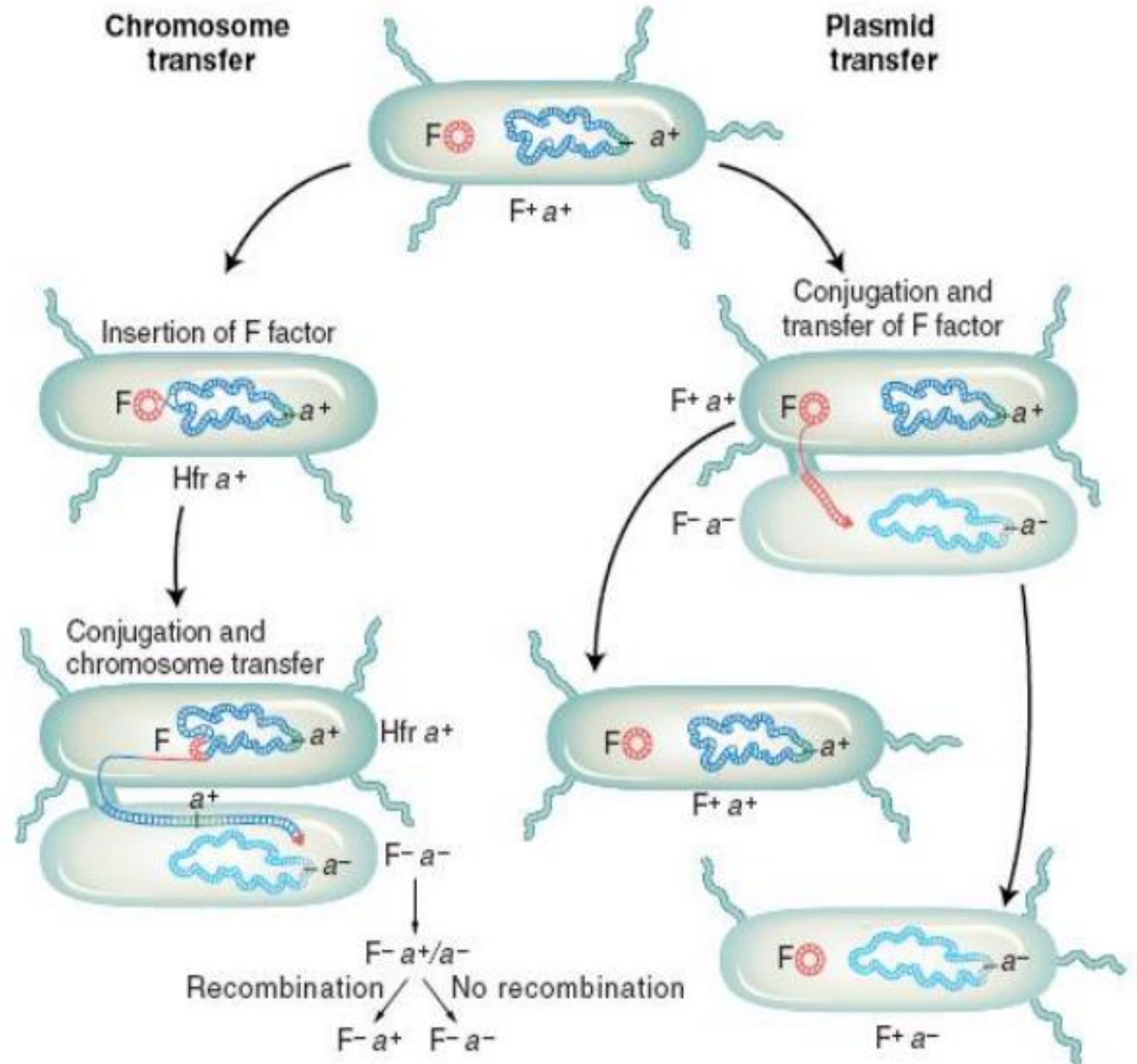
Hfr (alta frecuencia de recombinación)

- Luca Cavalli obtuvo una nueva cepa a partir de una F^+ . Al cruzarla con una F^- observo que prácticamente ninguno de los parentales se convertían en F^+ .
- Concluyó que este resultado era debido a la integración del factor F en el cromosoma.
- Denominó Hfr (high frequency of recombination) a esta cepa.



Resumen...

- **Las células F^-** carecen del factor F y no pueden transferir DNA por conjugación. Actúan como receptoras del DNA transferido por las células F^+ o Hfr.
- **Las células F^+** contienen al factor F en su citoplasma. Actúan como donadoras al transferir DNA a una célula F^- durante la conjugación.
- **Las células Hfr** contienen al factor F integrado en el cromosoma bacteriano. También actúan como donadoras.



Conjugación

¿Para qué?

- **Resistencia:** antibióticos, metales pesados
- **Factores de virulencia:** toxinas
- **Actividades metabólicas:** síntesis o degradación de compuestos carbonados

¿Cómo seleccionamos?

- **Genes marcadores,** dentro del plásmido y permite seleccionar colonias conjugantes por fenotipos: auxotrofía, fuente de carbono, resistencia/susceptibilidad a antibióticos.

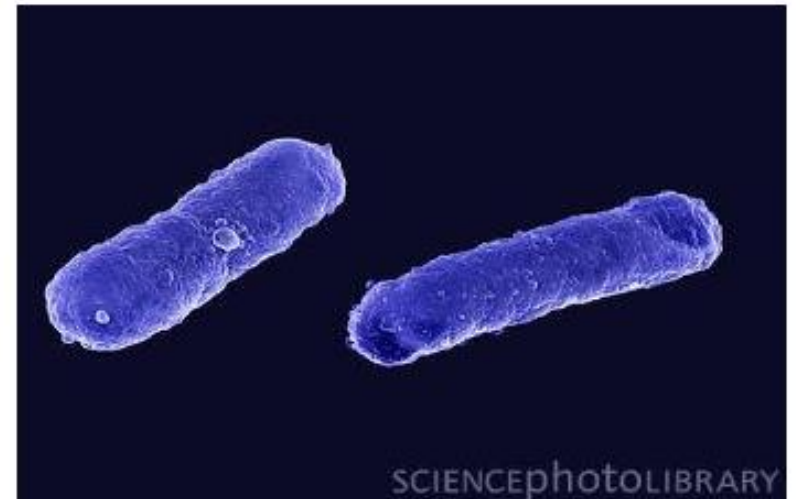
En la práctica...

- *E. coli* JM1452Str

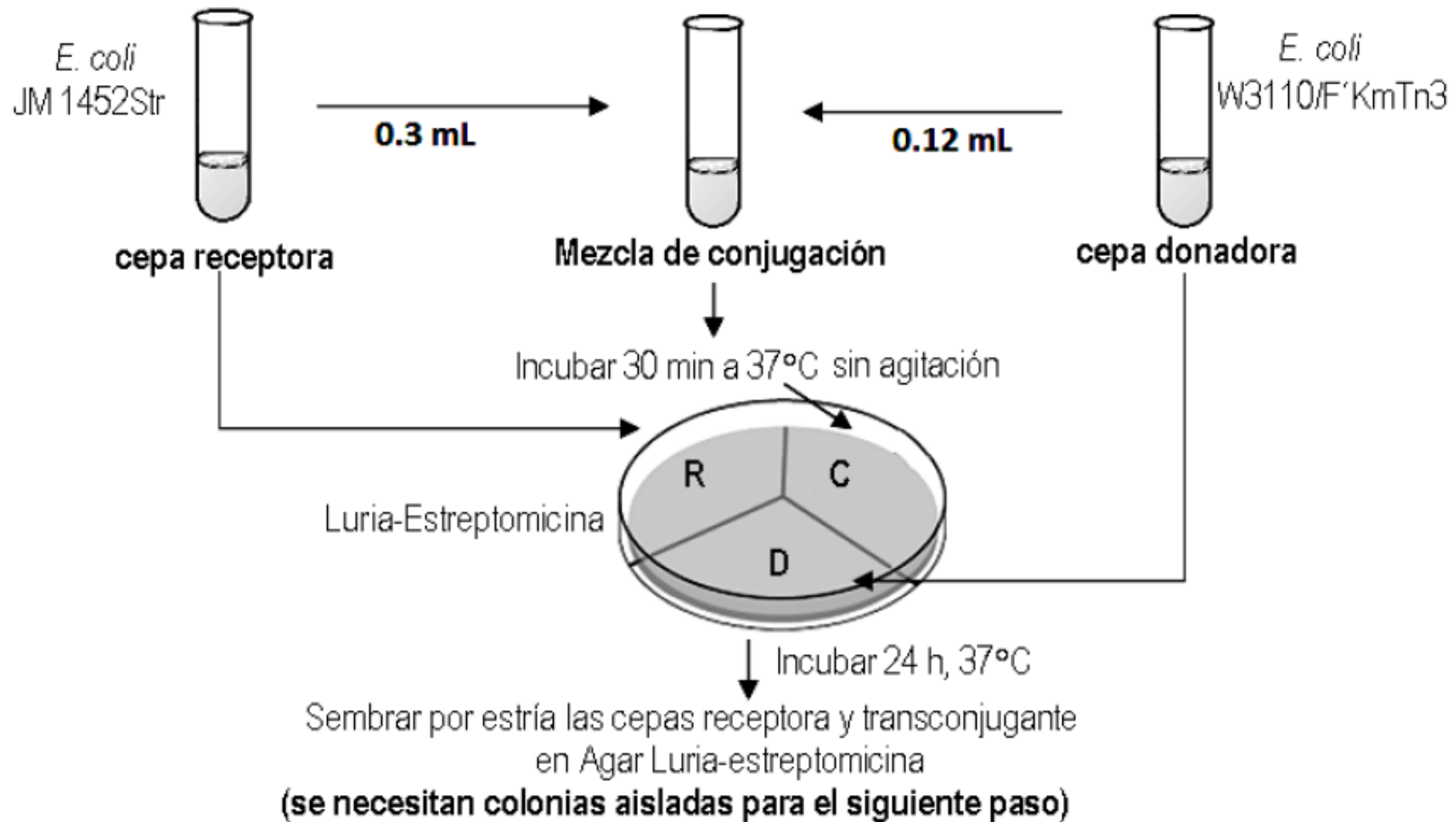
Cepa resistente a estreptomycin, no codifica para el pili

- *E. coli* W 3110 /F'KmTn3

Cepa resistente a kanamicina. Cepa F'

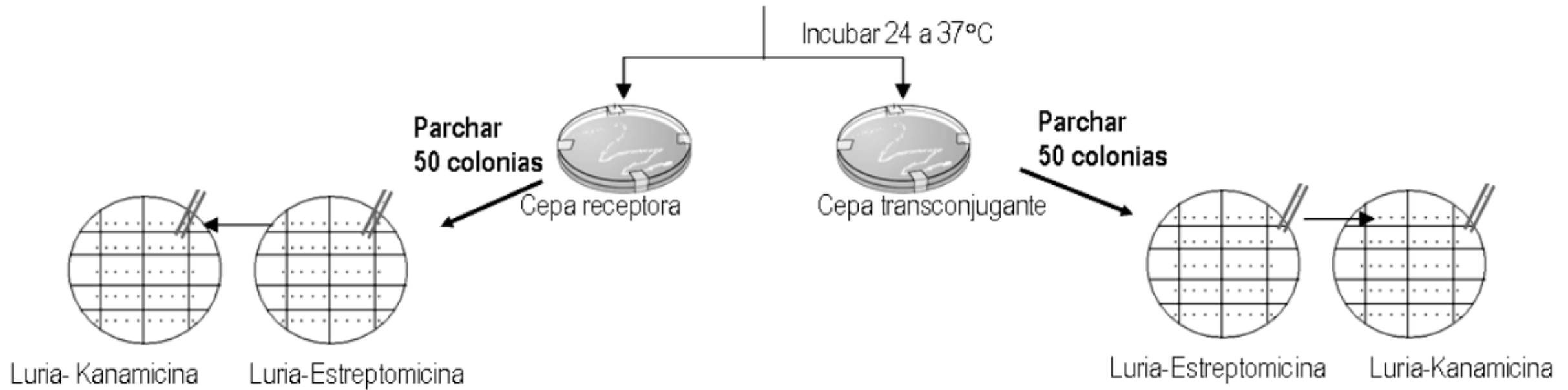


En la práctica...



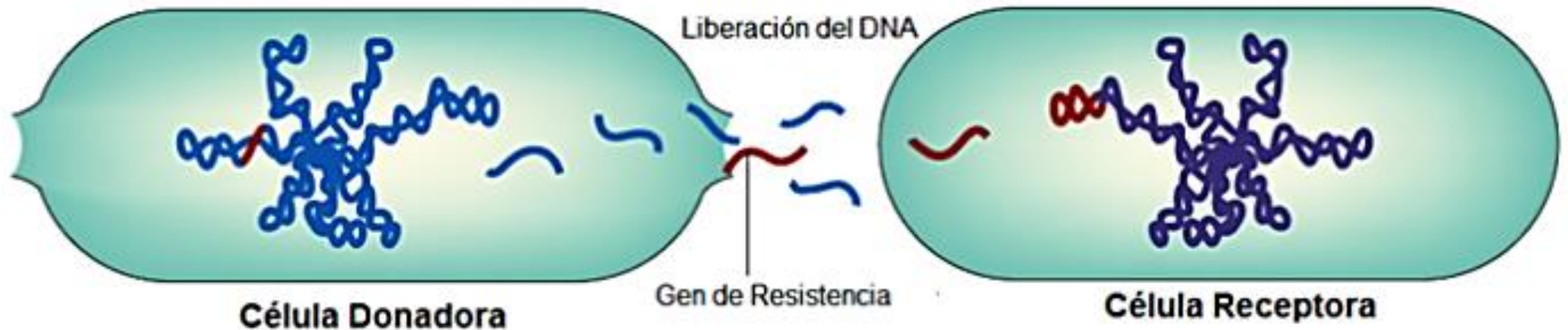
En la práctica...

(se necesitan colonias aisladas para el siguiente paso)



Transformación

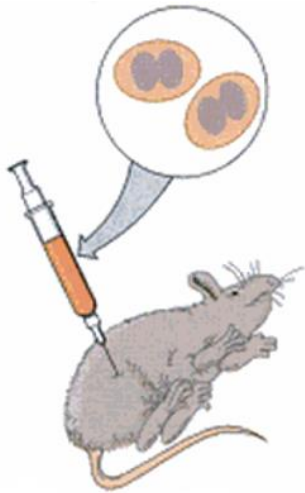
Proceso de transferencia por el cual **DNA libre** procedente de una célula es incorporado por otra célula (receptora).



Descubrimiento

En 1928, Frederick Griffith realizó experimentos con *Streptococcus pneumoniae*, agente causal de la neumonía en humanos, pero letal en ratones.

A) Cepa lisa S

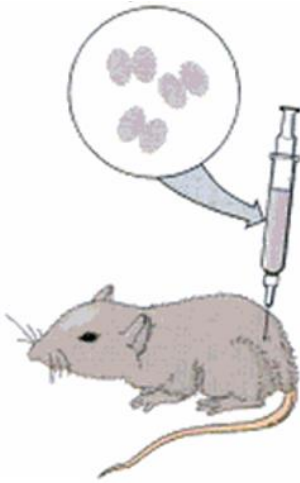


Ratón muere



Cepa lisa S

B) Cepa rugosa (R)

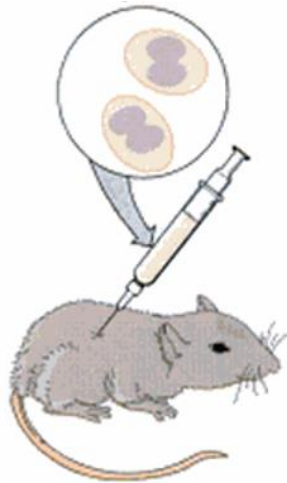


Ratón vive



Cepa rugosa R

C) Cepa lisa S
muerta por calor



Ratón vive

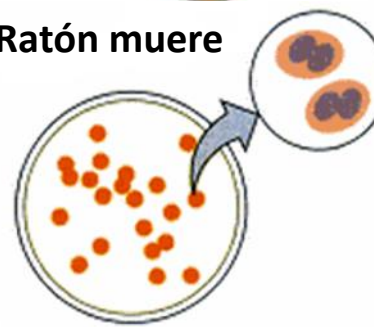


No hay crecimiento

D) Cepa rugosa (R) + cepa
lisa S muerta por calor



Ratón muere



Cepa lisa S

Una cepa **no patógena R** puede ser transformada en **patógena S** cuando se expone a cepas patógenas S que han sido matadas por calor.

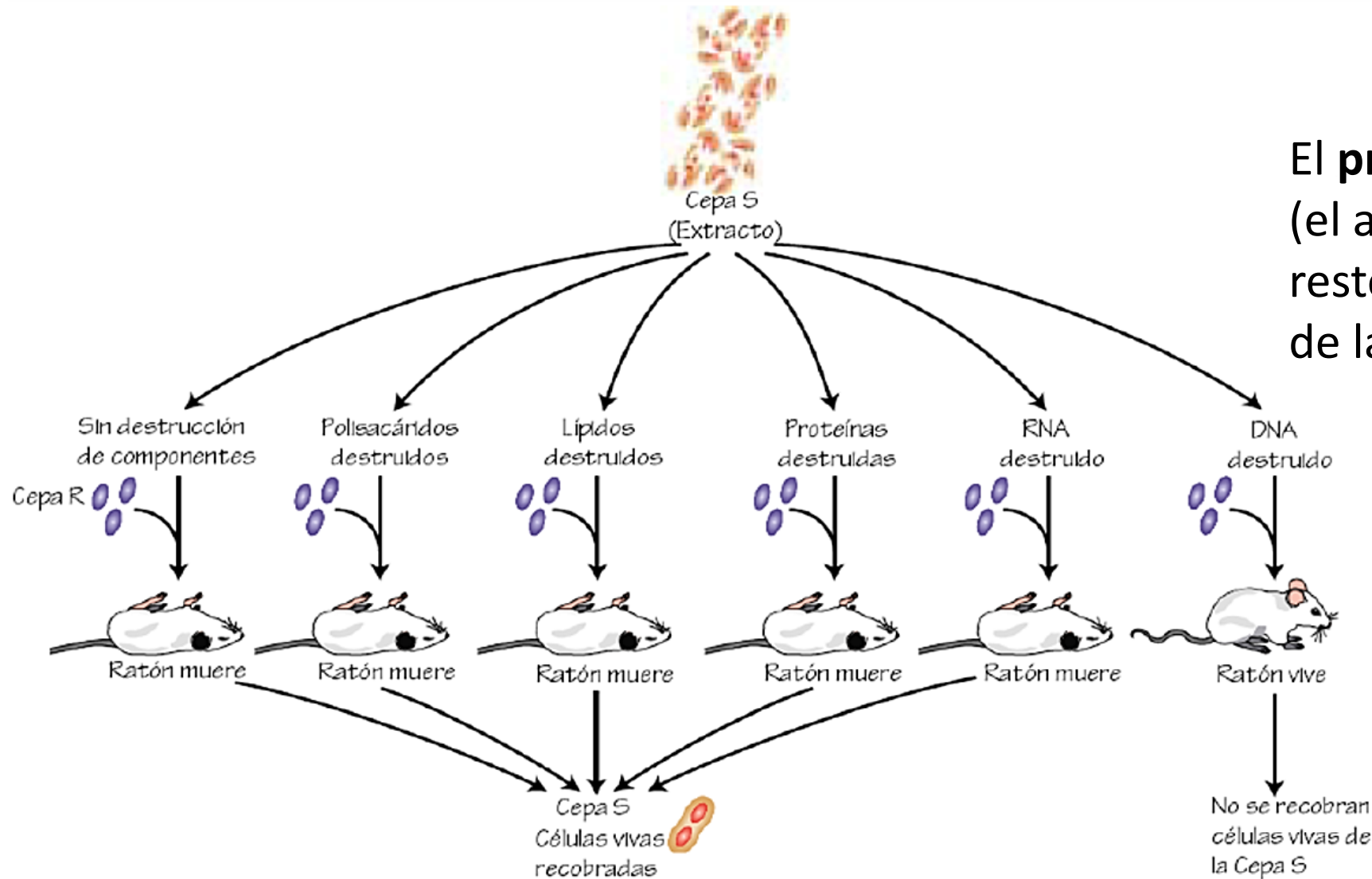
Como las células aisladas siempre tenían cápsulas, concluyó que los polisacáridos eran el agente causal de que las células R se hayan transformado en una clase nueva de células.

Inoculación

Aislamiento

Descubrimiento

En 1944, Oswald Avery y colegas dieron la explicación molecular de la transformación.



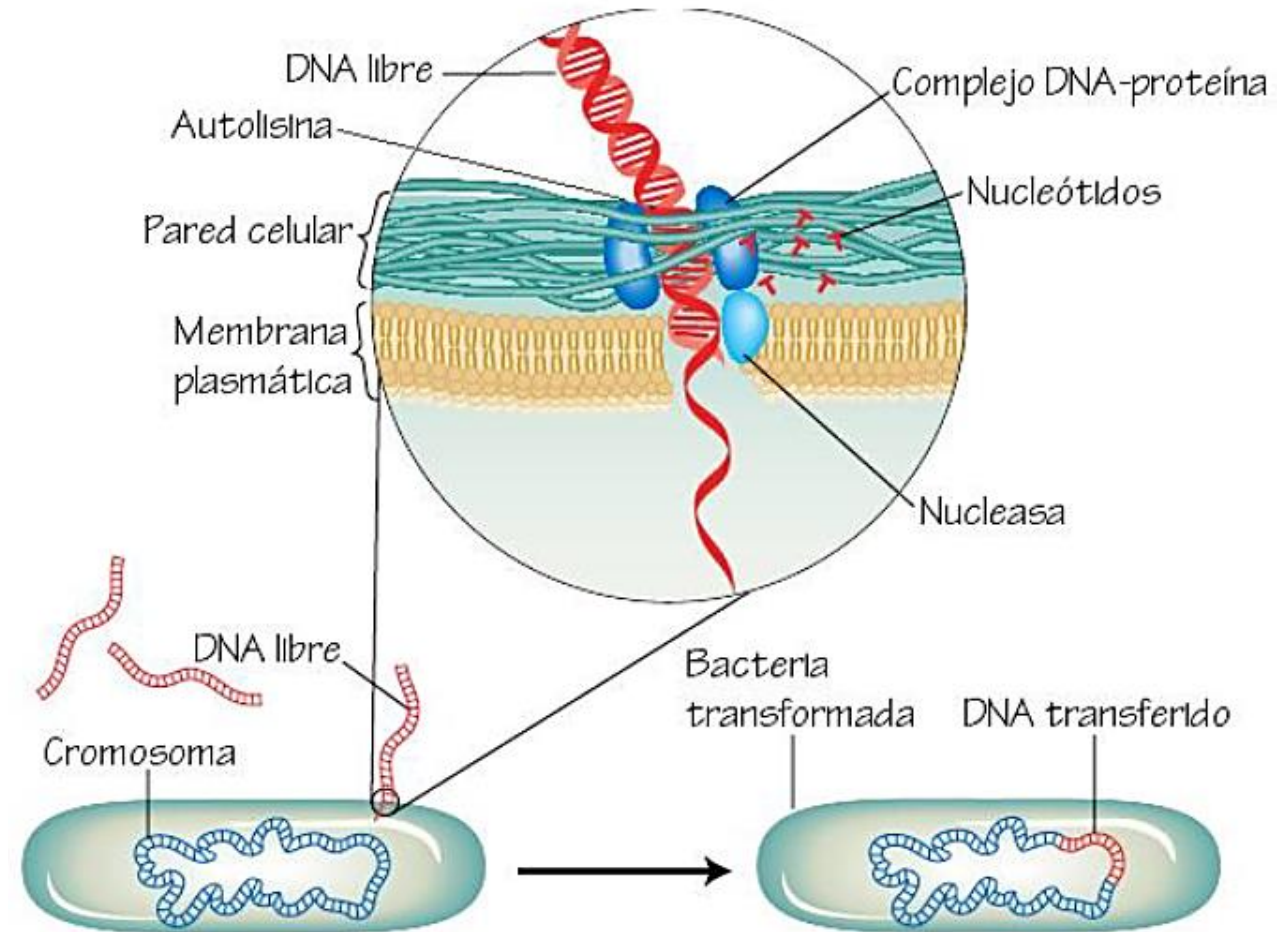
El **principio transformante** (el agente presente en los restos celulares, responsable de la transformación).

El DNA induce la transformación de las células R

Competencia en transformación

Solo determinadas cepas o especies son capaces de transformarse

- Una célula que es capaz de aceptar DNA y ser transformada se dice que es **competente natural**
- Esta capacidad está determinada genéticamente
- Se requieren proteínas especiales para la toma y procesamiento del DNA: **autolisina, proteínas de unión al DNA y nucleasas (factores de competencia)**

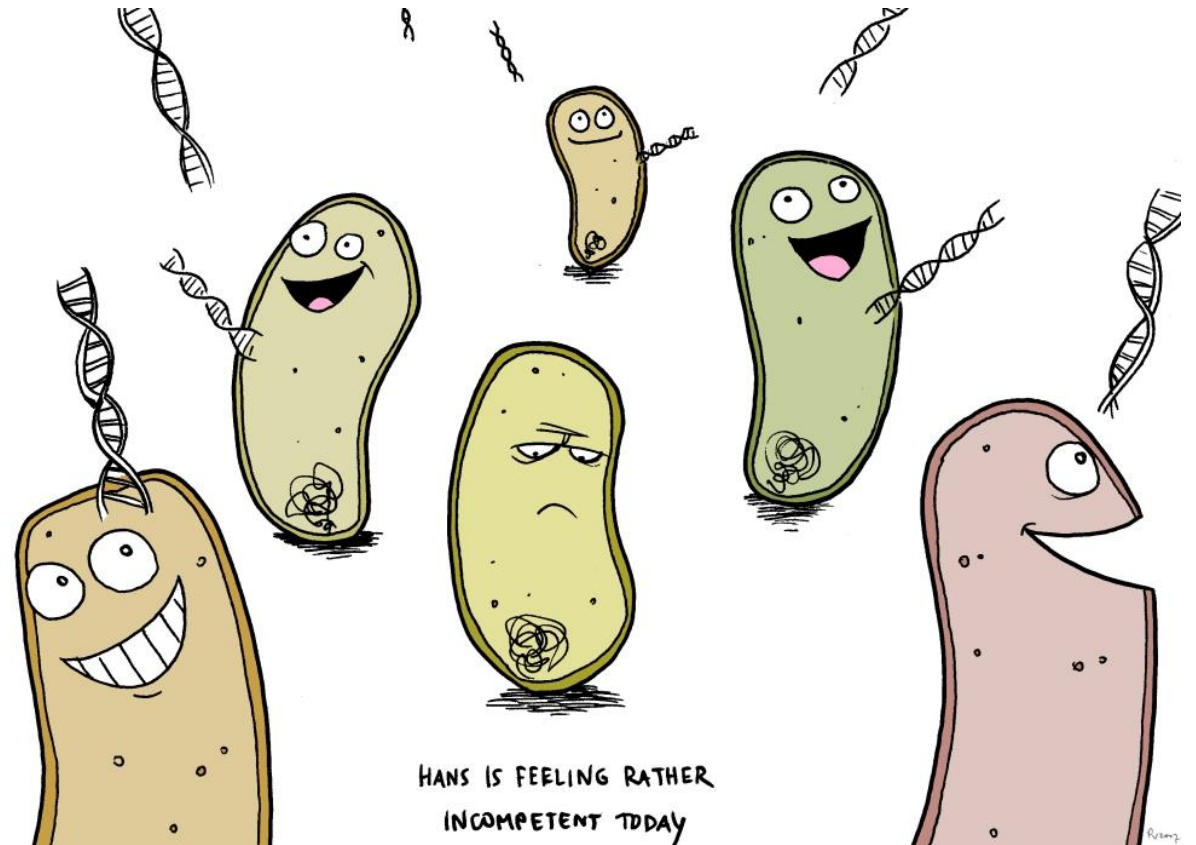


Competencia en transformación

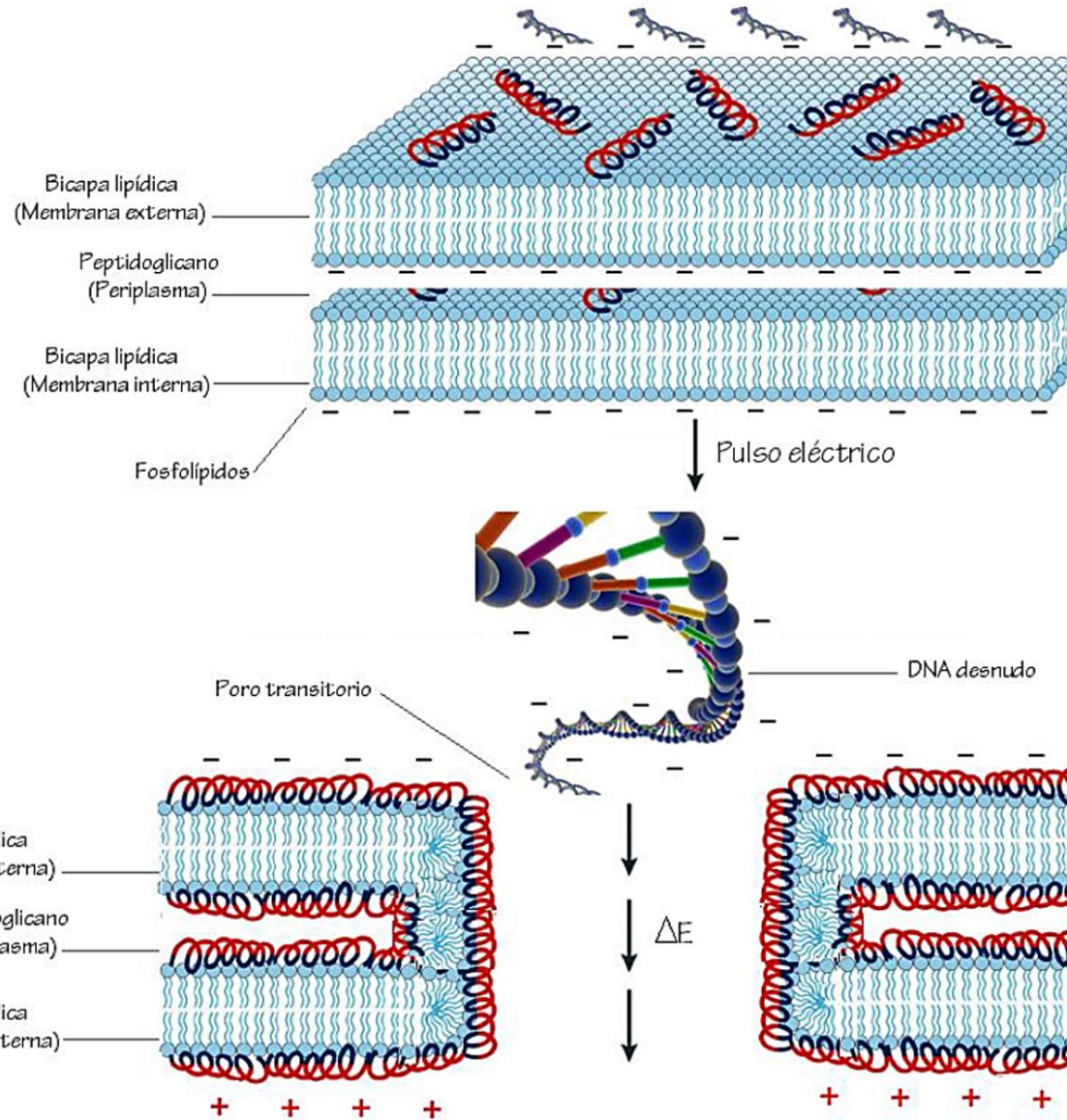
- **Competentes naturales:** Bacterias del género *Acetivobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Thermus*
- **No competentes naturales:** *Salmonella* spp., *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, entre otras bacterias gramnegativas

¿Cómo las volvemos competentes?

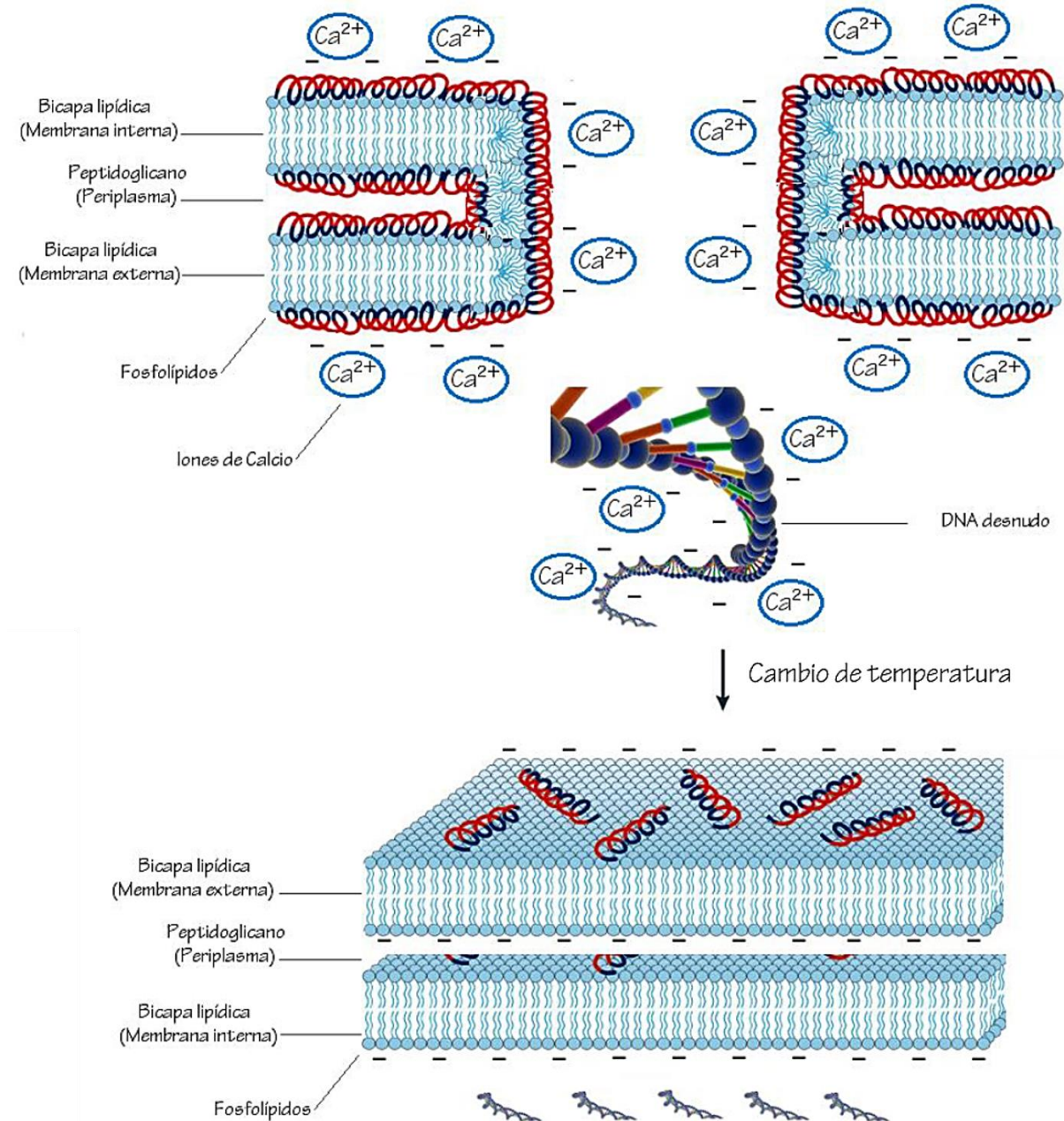
Métodos físicos y químicos



Electroporación



Cationes (iones calcio)



¿Por qué ocurre la transformación?

Naturalmente

- **Nutrición**: como fuente de C, N y energía en condiciones de inanición.
- **Reparación**: tomar el DNA externo para reparar daños cromosomales y asegurar la supervivencia de la especie.
- **Recombinación**: intercambiar material genético entre miembros de diferentes (o misma especie), incrementando la variabilidad genética, acelerando el proceso de evolución.

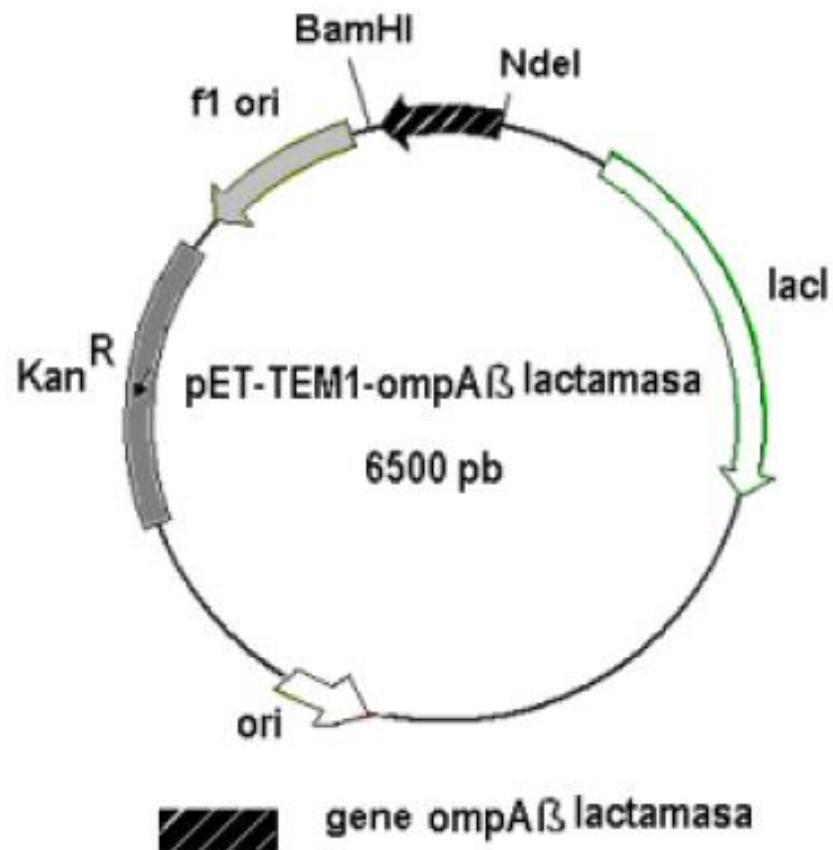
Artificialmente

- **Ingeniería genética**: expresión de genes heterólogos de interés biotecnológico. **Organismos transgénicos.**

¿Cómo seleccionar?

¿Qué vamos a hacer en la práctica?

DNA transferido

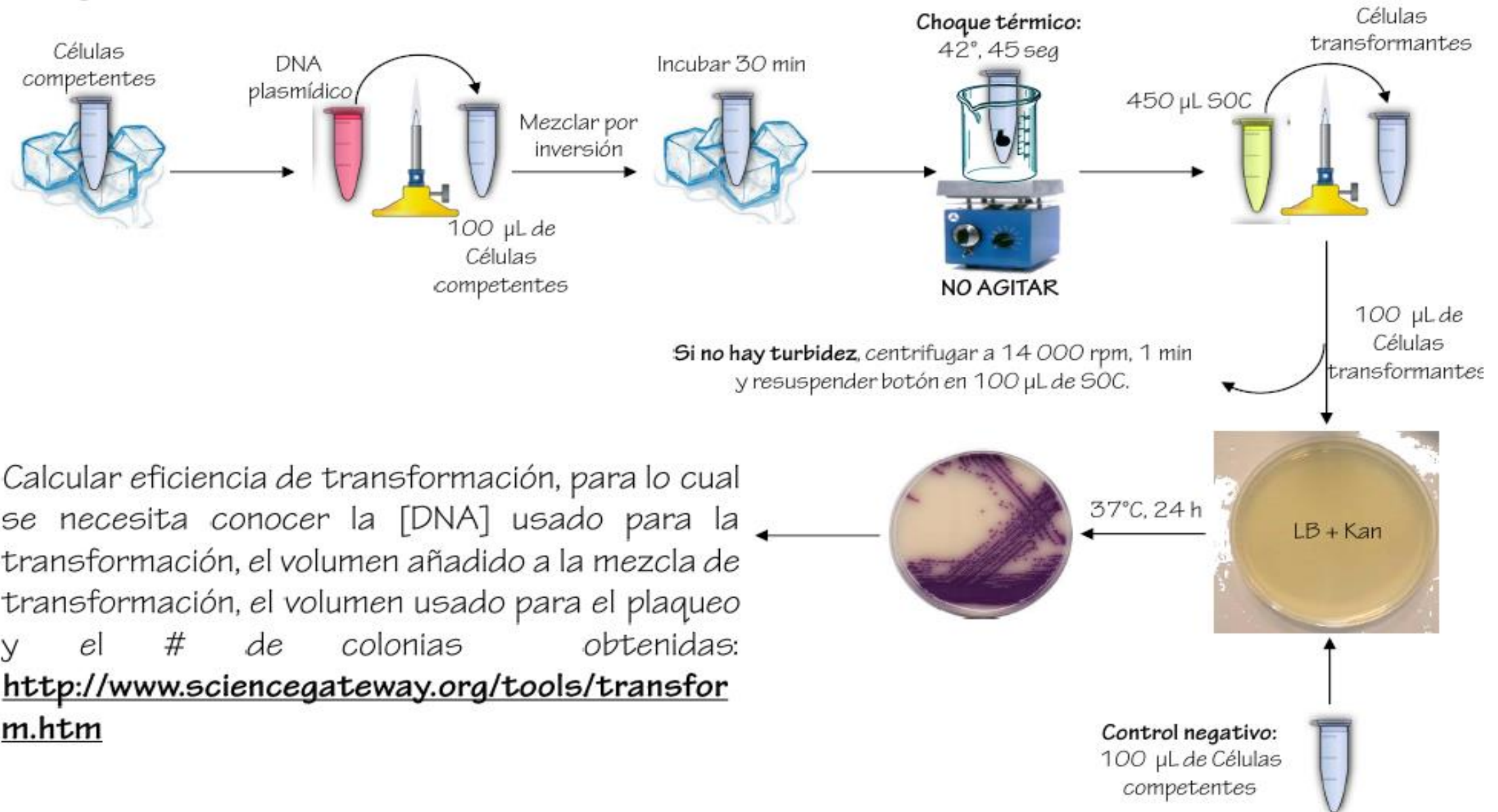


Célula receptora



- *E. coli* DH5 α : Para mantenimiento y replicación del DNA plasmídico.

¿Qué vamos a hacer en la práctica?



Calcular eficiencia de transformación, para lo cual se necesita conocer la [DNA] usado para la transformación, el volumen añadido a la mezcla de transformación, el volumen usado para el plaqueo y el # de colonias obtenidas:

<http://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm>

Eficiencia de transformación:

(# de colonias observadas)(Volumen original de transformación) (Factor dilución)

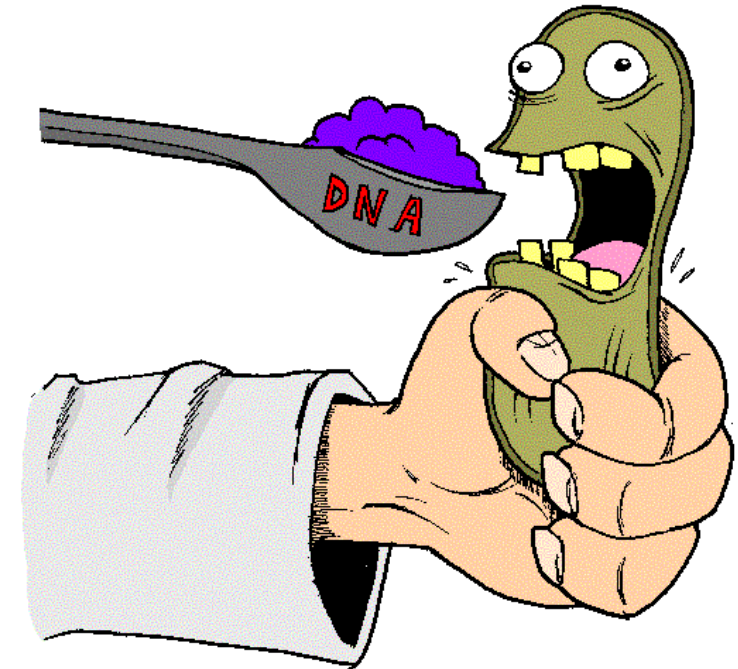
$$\text{UFC transformadas} = \frac{\text{---}}{\text{Volumen empleado en la placa}}$$

$$\text{Eficiencias transformación} = \frac{\text{UFC transformadas}}{\text{DNA plasmidico empleado (\mu g)}}$$

Una buena eficiencia de transformación 10^9 ufc/ μ g de DNA

Pasos críticos

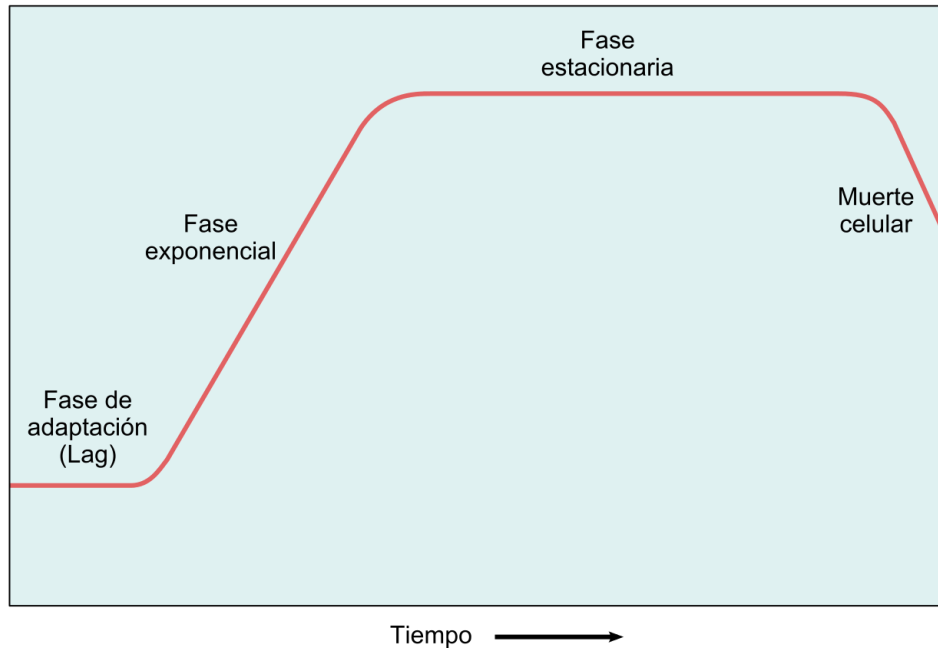
- Mantener siempre a las células en hielo
- Trabajar en condiciones asépticas
- Choqué térmico a la temperatura y tiempo indicado
- Primera incubación en medio rico sin antibiótico
- Plaquear en medio selectivo



Obtención de células competentes por CaCl₂

El método consiste en ir concentrando un cultivo en fase logarítmica mediante lavados sucesivos en una solución fría de CaCl₂

Curva de crecimiento bacteriano



Técnica para preparar 200 μ L de las células competentes (protocolo de la M. en C. Luz del Carmen Castellanos)

- Inocular 3 mL de medio Luria con *E. coli* BL21 y se deja crecer en agitación toda la noche a 37°C.
- Tomar 0.2 mL del precultivo y agregárselo a 10 mL de medio Luria. Las bacterias se dejan crecer hasta llegar a una absorbencia de 0.6 a 0.8 (lectura a 600 nm).
- Centrifugar la suspensión de células a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el paquete celular muy bien en 3 mL en solución 10 mM NaCl frío.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 mL de 30 mM CaCl₂ frío.
- Dejar incubando en hielo por 20 min con agitación ocasional suave y centrifugar a 2500 rpm por 7 min. El precipitado debe ser de forma anular.
- Resuspender el precipitado en 0.5 mL de 30 mM CaCl₂ frío. Tomar 0.2 mL y pasarlo a un tubo microfuga.
- Almacenar a -80°C hasta su uso.