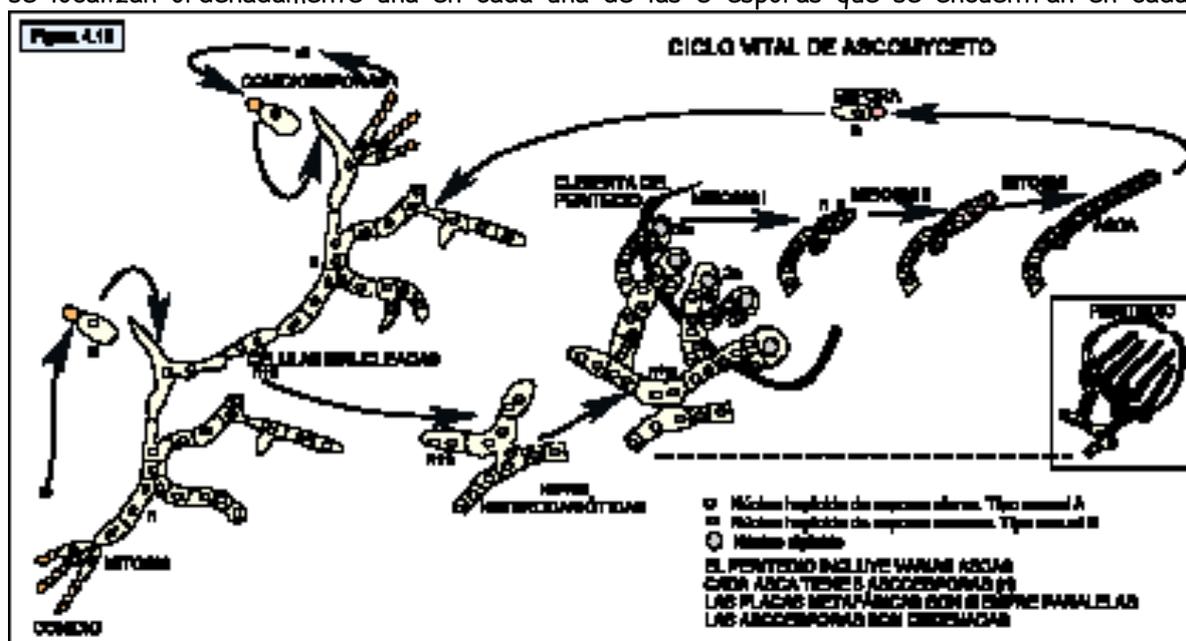


MECANISMO MOLECULAR DE LA RECOMBINACIÓN:

El mecanismo molecular de la recombinación no preocupaba en los años 30 del siglo XX pero en 1961 la utilización de microorganismos con ADNs sencillos y la posibilidad de marcarlos con isótopos pesados permitió comprobar que las dobles hélices de ADN se rompían en el sobrecruzamiento y se soldaban de manera cruzada dando lugar a dobles hélices mixtas (semipesadas) que coincidían en ser recombinantes para marcadores moleculares (Meselson y Weigle en fago I). Interesa entonces determinar el mecanismo molecular del proceso y su universalidad tratando de ver si es igual en procariotas y en eucariotas.

Sin embargo los primeros modelos del mecanismo molecular de la recombinación surgen del análisis genético de ascomycetos (Fig. 4.16).

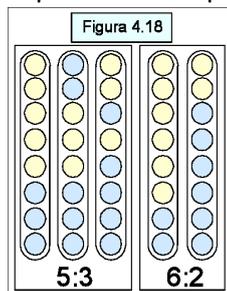
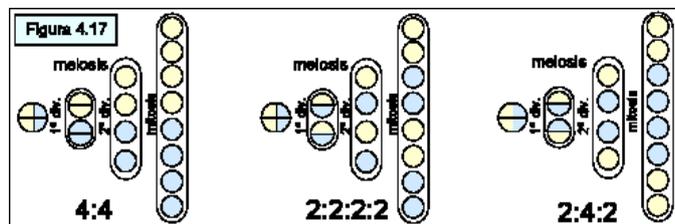
Los ascomycetos tienen, entre otras características la de mantener juntos los productos de cada una de las meiosis y además de forma ordenada ya que los planos de división son siempre paralelos. Si a esto añadimos la existencia de una mitosis post-meiótica en la que se mantiene el orden, sin duda los ascomycetos son un buen material para iniciar el análisis de la recombinación a nivel molecular ya que las 8 hebras de DNA que comienzan la meiosis (4 dobles hélices por bivalente) se localizan ordenadamente una en cada una de las 8 esporas que se encuentran en cada asca.



Partiendo de una célula diploide heterocigota \oplus que entra en meiosis, se espera una segregación 4:4 o 2:2:2:2 o 2:4:2, dependiendo de los sobrecruzamientos entre el locus y el centrómero (Fig. 4.17).

En todos los casos hay en total 4 productos de un tipo y 4 del otro tipo.

Sin embargo con una frecuencia de hasta el 1% se encuentran ordenaciones que difieren de las esperadas y que tienen en total 5 esporas de un tipo y 3 del otro o incluso casos en los que hay 6 esporas de un tipo y 2 de otro (Fig. 4.18).



Estos resultados no pueden deberse a mutaciones pues su frecuencia de aparición es muy alta y además siempre cambia por el otro alelo (no aparecen variantes nuevas ni otras existentes en otros individuos, siempre la otra variante del heterocigoto).

Puesto que el punto de partida es una célula diploide heterocigota parece que a lo largo del proceso meiótico-mitótico de la formación del asca una o más cadenas sencillas de ADN se hubieran CONVERTIDO en la secuencia del otro alelo.

Una segregación 5:3 implica que uno de los 4 productos meióticos tiene en la doble hélice del cromosoma portador de la información que se analiza, información para los dos alelos (directa de un alelo en una hebra y complementaria del otro alelo en la otra).

Desechada la mutación, la recombinación pasa a ser la candidata más fuerte para asumir la responsabilidad de la conversión.

En determinados genes se puede establecer, igual que hizo Benzer en fagos, un mapa alélico preciso que incluye el punto exacto en el que cada alelo difiere de otro (Fig. 4.19).

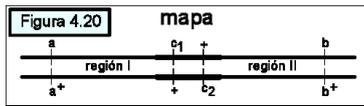


Al hacer el análisis genético de los distintos alelos se encuentra que por regla general los alelos más próximos a los extremos presentan mayor frecuencia de conversión que los alelos más alejados (centrales).

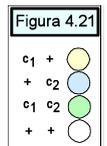
A este fenómeno se le denominó POLARIDAD en la conversión.

Aceptando que la conversión tiene algo que ver con el proceso de intercambio y que no existe prioridad de participación de unas u otras cadenas de las dobles hélices, la polaridad parece indicar que el punto de iniciación del proceso no es aleatorio a lo largo del gen, y mientras más cerca está la zona diferencial de un alelo del punto de iniciación del sobrecruzamiento, más frecuencia tendrá de conversión.

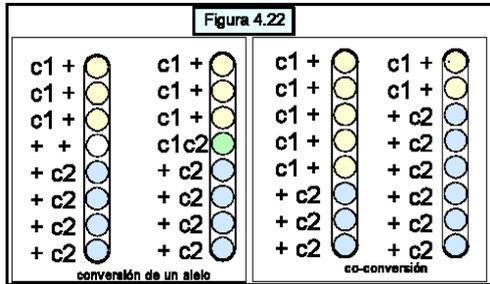
Para el análisis de la relación entre el fenómeno de la conversión y el sobrecruzamiento se construyen cepas heterocigotas para tres loci próximos entre sí, de los cuales el central tiene un mapa alélico bien conocido (Fig. 4.20).



(Para hacerlo más sencillo, suponemos que las combinaciones alélicas del locus central se diferencian tal como se presenta en el esquema en el color de las esporas) (Fig. 4.21). Al estudiar las ascas con alguna espora convertida en el locus central, aparecen casos con conversión de un alelo y otros casos con conversión simultánea de los dos alelos del locus central, fenómeno que se denomina co-conversión (Fig. 4.22).



central, aparecen casos con conversión de un alelo y otros casos con conversión simultánea de los dos alelos del locus central, fenómeno que se denomina co-conversión (Fig. 4.22).



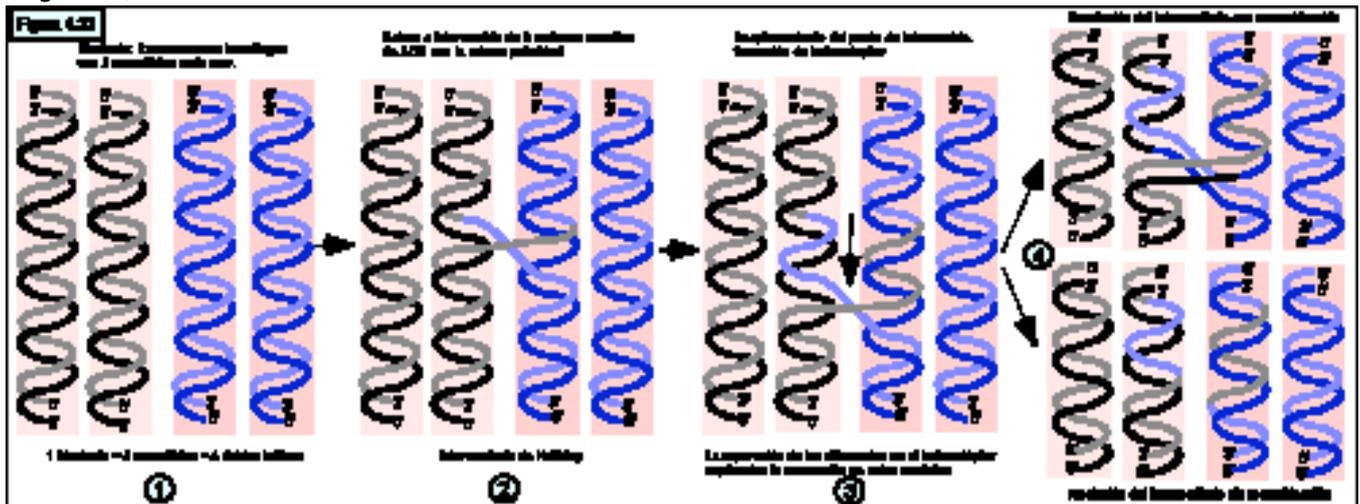
La co-conversión aumenta cuanto menor es la distancia entre c1 y c2 (puntos exactos de diferencia entre los alelos).

Una vez detectadas las esporas convertidas y co-convertidas se analiza en ellas la recombinación con los genes de los lados (a,a+; b,b+). La conversión va acompañada en el 50% de los casos de recombinación entre los marcadores laterales; además se puede determinar si el sobrecruzamiento se produjo en la región I o en la región II (ver mapa) y en la casi totalidad de los casos ocurre en la región más próxima al alelo del locus c que se ha convertido.

en la región I o en la región II (ver mapa) y en la casi totalidad de los casos ocurre en la región más próxima al alelo del locus c que se ha convertido.

- En resumen:
- la conversión está ligada al sobrecruzamiento
 - la conversión es un proceso que como mínimo afecta a una media cromátida
 - se producen heteroduplex no muy extensos (la co-conversión es poco frecuente)
 - hay polaridad en la conversión (el sobrecruzamiento no empieza en cualquier lugar).

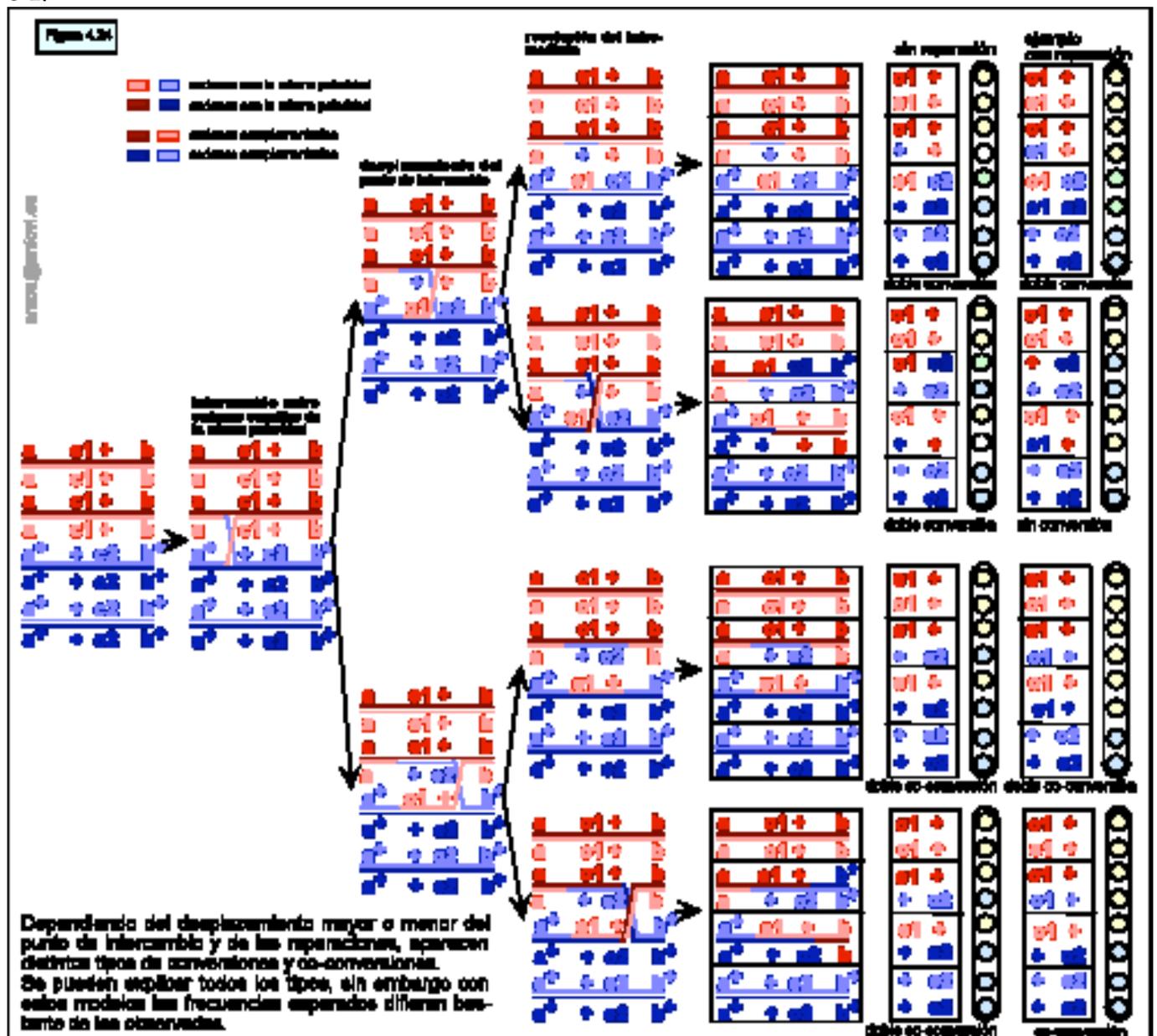
Fundamentalmente con estos datos y en el primer modelo propuesto por Holliday el mecanismo para explicar cómo se produce el sobrecruzamiento entre cromátidas sería muy parecido al que se presenta (Fig. 4.23):



Partiendo de un bivalente, es decir, dos cromosomas homólogos con dos cromátidas hermanas cada uno (en total 4 dobles hélices (1)), se produce una rotura en una cadena de una doble hélice y otra aproximadamente a la misma altura de otra cadena de la misma polaridad (tiene que ser de otra cromátida). Por uno de los extremos se intercambian (2) y se produce un desplazamiento del punto de intercambio (3). El desplazamiento asegura el reconocimiento por complementariedad de las cadenas pues la otra alternativa para explicar que el sobrecruzamiento sea exactamente entre las mismas secuencias es que la rotura se produzca exactamente en el mismo punto y eso es más complicado sobre todo si se recuerda cómo se produce el apareamiento entre homólogos. Además el desplazamiento podría ser el mecanismo que explicara la conversión génica.

Admitido el desplazamiento se establece una figura llamada intermediario de Holliday que se resuelve (4) con un nuevo corte de dos cadenas con la misma polaridad. Si son las cadenas complementarias de las que se cortaron anteriormente, se produce un segundo intercambio y se completa el sobrecruzamiento entre cromátidas. Si son las mismas cadenas que se cortaron con anterioridad se resuelve el intermediario sin sobrecruzamiento, quedando tan sólo un segmento heteroduplex en cada una de las cromátidas que intervinieron en el proceso.

Como se indica en el esquema siguiente (Fig. 4.24), las zonas heteroduplex pueden permanecer como tales o corregirse por un sistema de reparación explicando ordenaciones 4:4 anómalas y conversiones 5:3 o 6:2.



A partir de estos modelos el avance en el análisis del sobrecruzamiento y sus consecuencias

citológicas y genéticas se realiza mediante la combinación de análisis genético y técnicas citogenéticas y bioquímicas, de modo similar al explicado en el capítulo del ciclo celular.

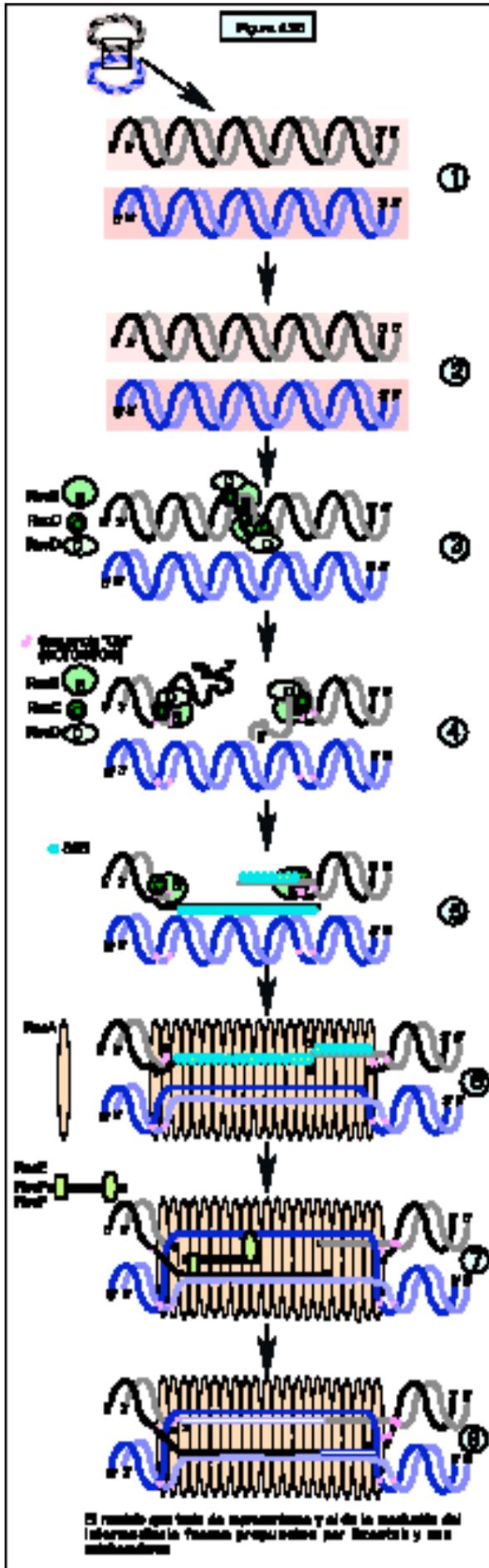
Colecciones de mutantes deficientes para recombinación y reparación posibilitaron el establecimiento de la secuencia de pasos del proceso y el aislamiento de las moléculas intervinientes.

Por otra parte el sobrecruzamiento se ha detectado como un fenómeno universal que se produce de forma similar tanto en procariotas como en eucariotas asexuales y por supuesto en eucariotas con reproducción sexual tanto en meiosis como en mitosis.

La sencillez de los procariotas favoreció que los primeros avances y las primeras pruebas visuales se hiciesen en estos organismos y aunque para los eucariotas al principio se propusieron modelos distintos y más complejos, conforme se iban describiendo los funcionamientos en determinados pasos de unos y otros, pudo comprobarse que las diferencias no eran sustanciales y cada uno de los intervinientes en el sobrecruzamiento en procariotas tenía sus homólogos en eucariotas, en algunos casos bastante conservados evolutivamente.

Siendo bastante profundo el conocimiento que en la actualidad se tiene del proceso, conviene la descripción pormenorizada del mecanismo molecular, pues aunque resulta eminentemente bioquímico tiene interés desde el punto de vista genético. Así, si bien en el principio de los estudios del sobrecruzamiento fenómenos puramente genéticos como la conversión llevaron a la elaboración de hipótesis congruentes que a la larga se revelaron como fundamentalmente acertadas, ahora se puede obtener un mejor conocimiento de estos procesos y del comportamiento de los cromosomas durante el sobrecruzamiento por la descripción de los pasos que realizan sus componentes moleculares.

Tomando como modelo *Escherichia coli* se comienza describiendo el proceso en procariotas (Fig. 4.25).



En *E. coli* se han detectado gran número de mutantes para determinadas funciones de la recombinación y a partir de éstos se han podido determinar las proteínas que actúan en cada momento y cómo es su modo de acción con el apoyo del análisis bioquímico.

El fenómeno se produce cuando se encuentran en proximidad dos dobles hélices de ADN (1).

Una exonucleasa 5'-3' (o tal vez el complejo RecBCD del que se hablará a continuación) produce una rotura en las dos cadenas de una doble hélice (2).

La doble rotura se produce en cualquier punto de la doble hélice.

El complejo RecBCD (trímero formado por los productos de los genes *RecB*, *RecC*, *RecD*), se une a la doble hélice en el punto de la rotura (3) y actuando como una helicasa corre por la secuencia nucleotídica hasta encontrar una región χ (GCTGGTGG). En bacterias estos octámeros se encuentran ampliamente distribuidos en intervalos de entre 20 y 40 kb.

Por la interacción con χ la recBCD pierde la proteína *RecD* y pierde la capacidad de desplazarse más allá del octámero. En ese momento y quizás desde antes de separarse de *RecD*, el complejo *RecBC* tiene la capacidad de digerir desde 5' una de las hebras dejando un DNA monocatenario con el extremo 3' libre (4).

Esta hebra en el momento tiende a plegarse sobre sí misma formando incluso si hay secuencias complementarias autoapareamientos (fold-back).

A la cadena sencilla se unen proteínas SSB que son desestabilizadoras de la doble hélice y cuando interaccionan con monohebras impiden que se plieguen sobre sí mismas formando fold-back (5).

Estas proteínas presentadoras SSB facilitan la intervención de la proteína *RecA*

La *RecA* es una proteína abundante en las células (entre 1000 y 10000 monómeros por célula) que actúa de forma cooperativa asociándose cada monómero a un grupo de tres nucleótidos (6). Tiene capacidad para desplazar los complejos *RecBC* y de formar filamentos multímeros (de tres hebras, doble hélice + cadena sencilla). Además desestabiliza la doble hélice quedando las tres cadenas independientes.

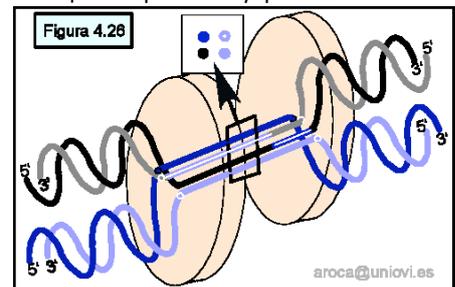
Es importante la acción de *RecA* estirando la fibra de ADN hasta 1.5 veces su tamaño (en doble hélice tipo B) facilitando el apareamiento de bases complementarias.

La *RecA* tiene más intervención en el proceso pero en el momento que se describe tiene importancia la intervención de otra serie de proteínas (*RecE*, *RecF*, *RecP*) (7) que desplazan las SSB permitiendo que *RecA* busque complementariedad entre las hebras y éstas puedan establecer apareamientos entre hebras complementarias de distinto cromosoma (la monohebra con una muesca aparea con la complementaria de la doble hélice desplazando a la otra cadena).

RecA es responsable de la nueva síntesis a partir de la cadena digerida al principio y tomando como molde la cadena desplazada de la doble hélice (8). Al final de la síntesis los extremos de las cadenas probablemente se unen como ocurre en la reparación de ADN.

Así se forma la estructura denominada intermediario de Holliday en el que las 4 hebras quedan paralelas y próximas entre sí (Fig. 4.26).

Para entender bien el proceso debe tenerse presente que cada molécula de *RecA* tiene un tamaño de 100 Å, lo que significa 5 veces el diámetro de la doble hélice. Puede fácilmente englobar dos dobles

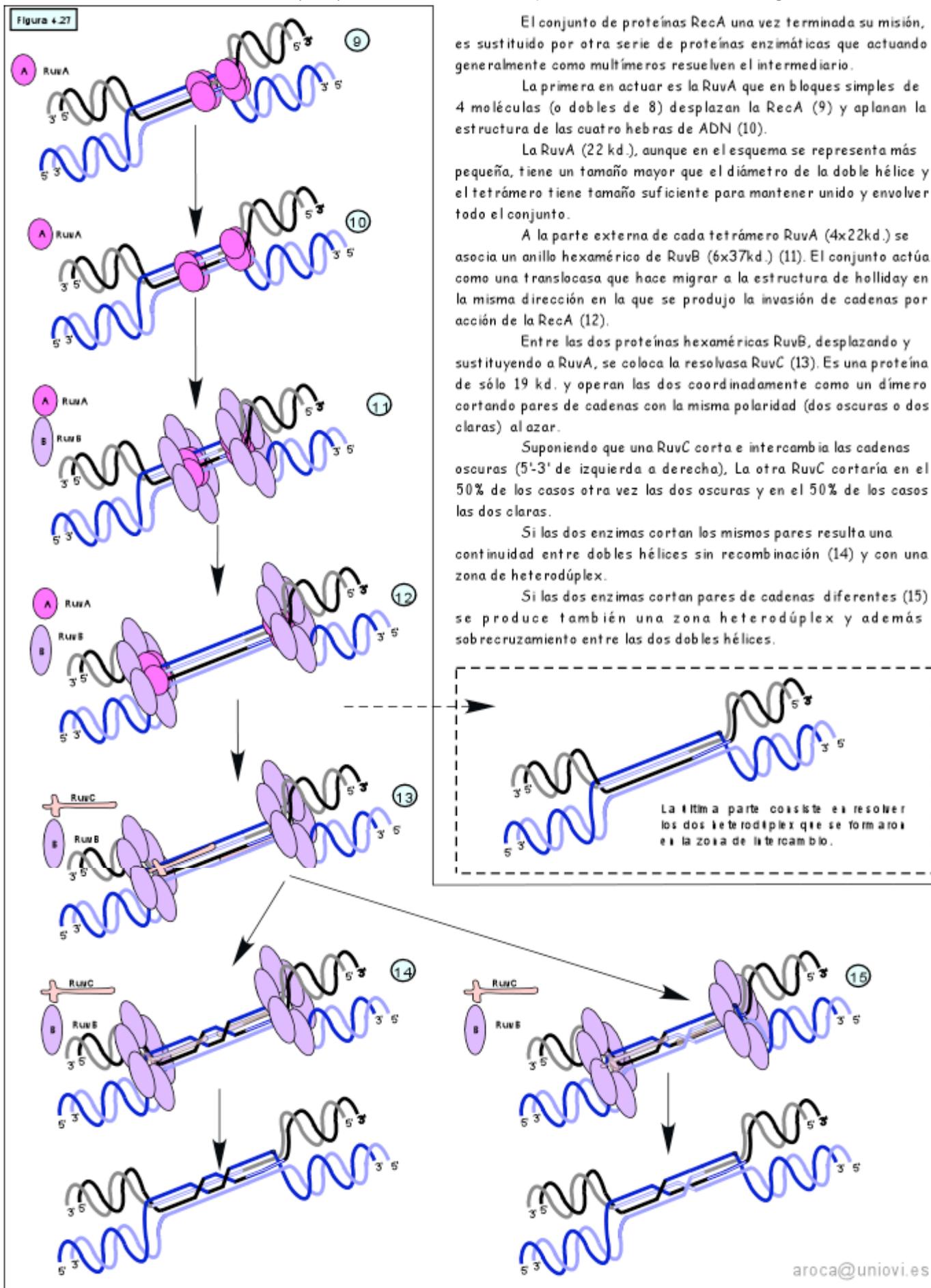


hélices y actuando varias moléculas cubrir un espacio grande de la secuencia.

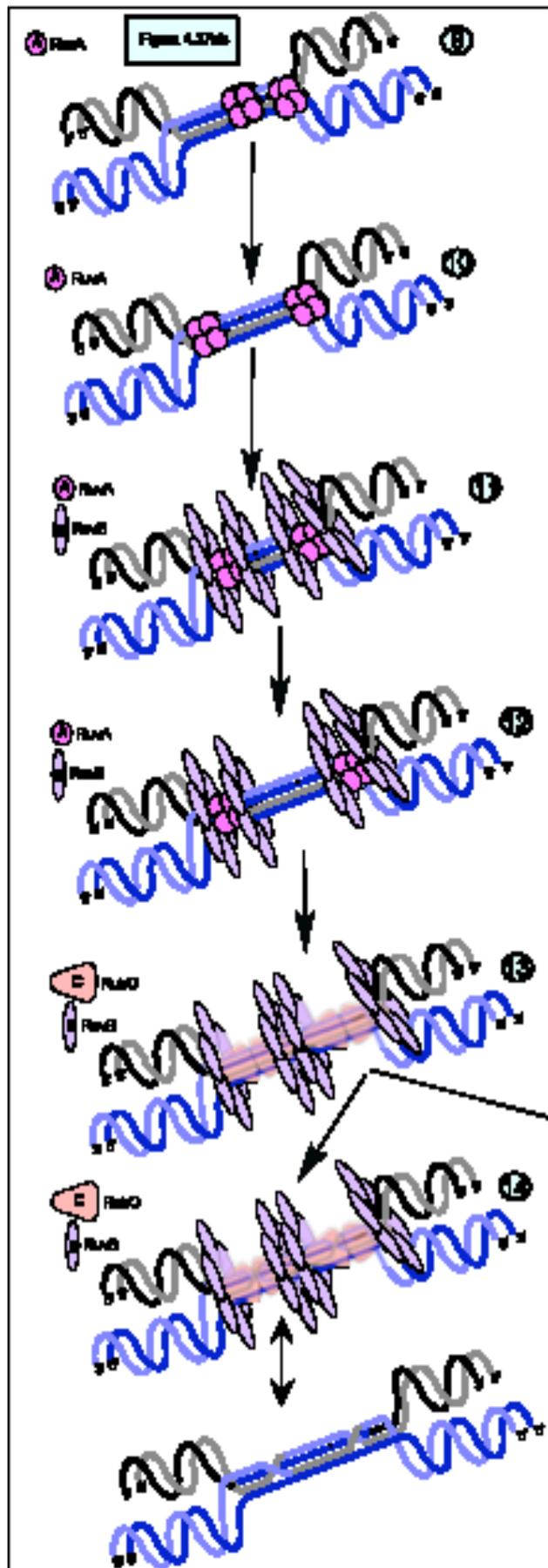
Es especialmente importante que en la formación del heteroduplex, si hay muchos errores de apareamiento el proceso se interrumpe. Así se evita la mezcla de secuencias diferentes y sobre todo híbridos entre especies diferentes. En la detención

intervienen las proteínas MutS y MutL. (Se encontró que las cepas de Salmonella deficientes para MutS y MutL conjugaban con otras especies como E.coli 1000 veces más pues no importaba la falta de homología.

El intermediario es en principio una estructura inestable que debe evolucionar, resolverse (Fig. 4.27).



Se especula con la posibilidad de que los sistemas enzimáticos que intervienen sean dobles, respecto a los representados, por ello se presenta un esquema alternativo de la resolución del intermediario.



El intermediario es en principio una estructura inestable que debe evolucionar, resolverse (Fig. 4.37b/c).

El conjunto de proteínas RecA una vez terminada su misión, es sustituido por otra serie de proteínas enzimáticas que actuando generalmente como multímeros resuelven el intermediario.

La primera en actuar es la RuvA que en bloques simples de 4 moléculas (o dobles de 8) desplazan la RecA (9) y apilan la estructura de las cuatro hebras de ADN (10).

La RuvA (22 kd.), aunque en el esquema es representada más pequeña, tiene un tamaño mayor que el diámetro de la doble hélice y el tetrámero tiene tamaño suficiente para mantener unido y envolver todo el conjunto.

A la parte externa de cada tetrámero RuvA (6x22kd.) se añade un anillo heptámero de RuvB (6x37kd.) (11). El conjunto actúa como una tijera que hace seguir a la estructura de la hélice en la misma dirección en la que se produjo la lesión de codones por acción de la RecA (12).

Entre las dos proteínas heptámeras RuvB, desplazando y sustituyendo a RuvA, se sitúan las enzimas RecC (13). Es una proteína de 21 kd. y separan las dos hebras como un cilindro cortando pares de codones con la misma polaridad (dos oscuros a dos claros) al azar.

Suponiendo que una RecC corta e intercambia las cadenas oscuras (5'-3' de izquierda a derecha). La otra RecC actuaría en el 50% de los casos otra vez las dos oscuras y en el 50% de los casos las dos claras.

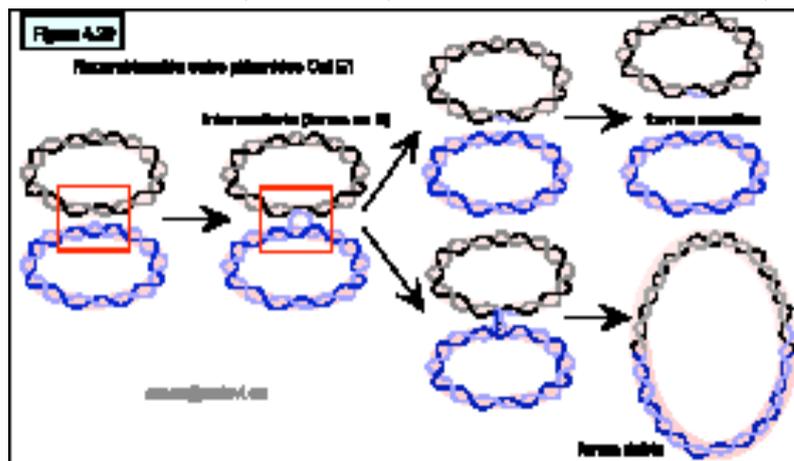
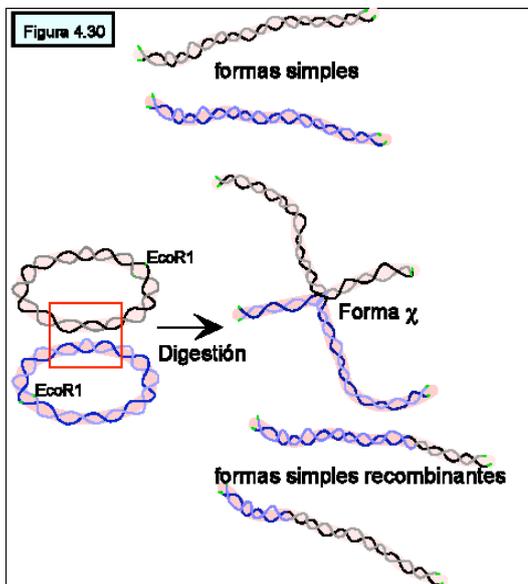
Si las dos enzimas cortan los mismos pares resulta una continuidad entre dobles hélices sin recombinación (14) y con una zona de heterodúplex.

Si las dos enzimas cortan pares de codones diferentes (15) se produce también una zona heterodúplex y además sobrecruzamiento entre las dos dobles hélices.

aroca@univox.es

La existencia de intermediarios se puso de manifiesto físicamente mediante los experimentos de Potter y Dressler con plásmidos Col E1 (Fig. 4.29). Observaron al microscopio electrónico de transmisión (MET) que además de las formas sencillas de plásmidos aparecían otras formas dobles y en ocho todas ellas interpretables según el esquema.

Para determinar si la recombinación era específica de lugar y por complementariedad de bases, digirieron los plásmidos con un enzima de restricción que tuviese una sola diana en el plásmido, Concretamente Eco RI (Fig. 4.30).



Se observaron además de gran número de plásmidos linealizados, todos del mismo tamaño, algunos de longitud doble con forma de c (chi) es decir, con 4 brazos iguales dos a dos en longitud. Estas formas son indicativas de emparejamiento complementario pues deja iguales distancias entre el punto de sobrecruzamiento y las dianas de restricción.

Además Potter y Dressler encontraron que:

Las formas en 8 sólo eran estables a 0°C, y cuando se ponían a 37°C se escindían en cuestión de minutos. Dicho de otra manera eran unas formas de transición que duraban poco tiempo en condiciones metabólicas normales, eran intermediarios de otras formas.

Se podía apreciar en el centro de las formas c que el apareamiento no era tan perfecto como en el resto.

Las bacterias *recA*- (deficientes para el enzima *RecA*) no formaban en ningún caso formas 8 ni c.

La combinación de estas observaciones citológicas junto con los análisis genéticos y moleculares del proceso hacen suponer que los modelos que se proponen y explican en la actualidad deben ser bastante similares a la realidad, pero no se debe olvidar que lo mismo se decía con los primeros modelos y hoy todavía se postulan nuevos enzimas necesarios para completar el proceso como son entre otros las topoisomerasas que deben facilitar la resolución de los cruces espaciales de las hebras de ADN.

Por el análisis de los mutantes para las proteínas descritas en la recombinación se ha podido determinar que el proceso no está llamado solamente a la obtención de variabilidad secundaria en la información genética ya que los mutantes bloquean los procesos de reparación de daño.

Cuando las roturas dobles ocurren en el periodo G1 la muesca se repara sin más, pero cuando la doble rotura se produce después de S entra en funcionamiento inmediatamente el proceso de reparación por invasión. Cuando el problema viene dado por el bloqueo de una de las hebras durante el periodo de replicación (S), la hebra que avanza puede invadir la otra y obviarse así el problema.

En resumen, el proceso del sobrecruzamiento se ve que tienen al menos 3 finalidades: 1- Detener la actividad celular cuando entre las dos dobles hélices que intervienen existen demasiadas diferencias de secuencia como se ha visto en casos de conjugación entre especies bacterianas diferentes (es muy posible que para detener el proceso en eucariotas las diferencias deban ser muchísimo mayores). 2-Reparar los daños que se produzcan en G2 y los bloqueos durante la replicación. 3-Conseguir mediante el intercambio de cromátidas mayor variabilidad en los gametos.