Lección 8.1. Introducción al Módulo 8



Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la biología molecular

Sergi Maicas Prieto
Departamento de Microbiología y Ecología
Universitat de València

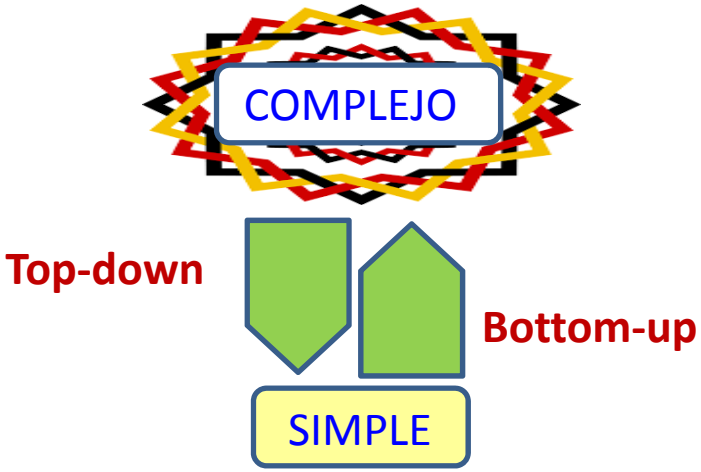


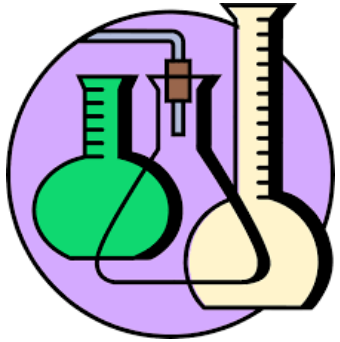


Fabricación de células sintéticas

- Diseño de nuevos “sistemas biológicos” de forma racional y sistemática, que puedan incorporar funciones que no existen en la naturaleza

- Creación de vida artificial
  - Componente a componente
  - Simplificando





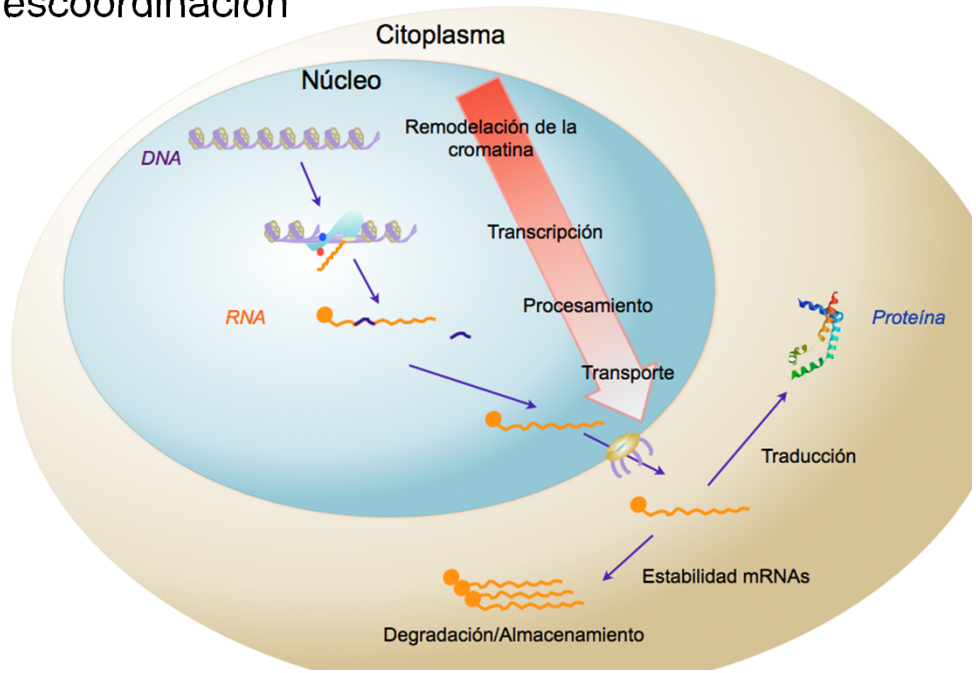
Síntesis *in vitro*



Expresión génica → programación

- Diferentes etapas de la expresión génica y cómo se coordinan
  - Epigenética
  - Transcripción y procesamiento de mRNA
  - Transporte de RNA
  - Traducción de RNA, degradación o almacenaje

- Enfermedades cuando hay descoordinación

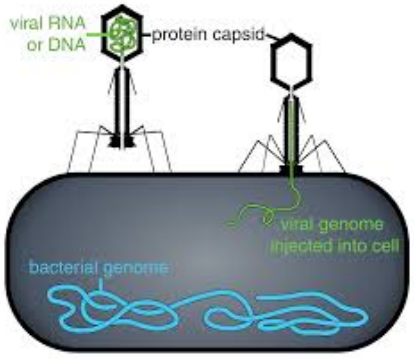




Elementos genéticos móviles

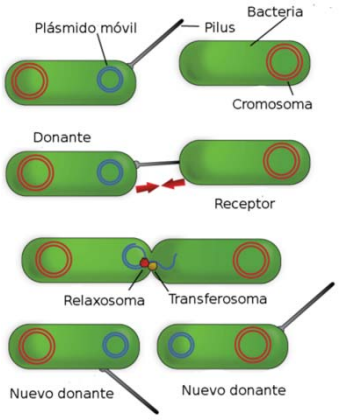
- Fragmentos de DNA que codifican para gran variedad de factores de virulencia y proteínas que permiten la movilidad del DNA
- Definición del genoma bacteriano, tanto el común como otros complementarios





  - Transposones
  - Integrones y casetes cromosómicos
  - Plásmidos y elementos conjugativos integrativos
  - Bacteriófagos e islas de patogenicidad

  - Mecanismos de transferencia horizontal
    - Transformación
    - Conjugación
    - Transducción

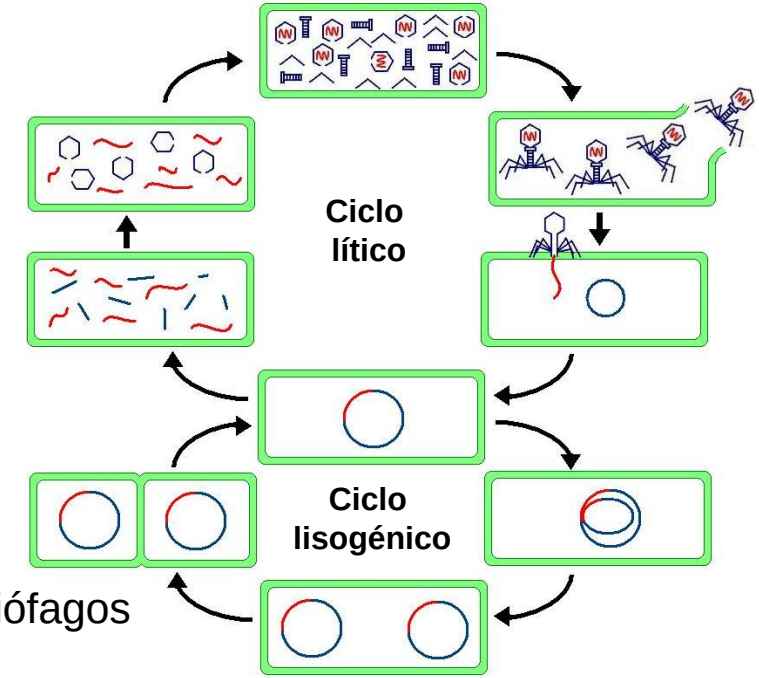


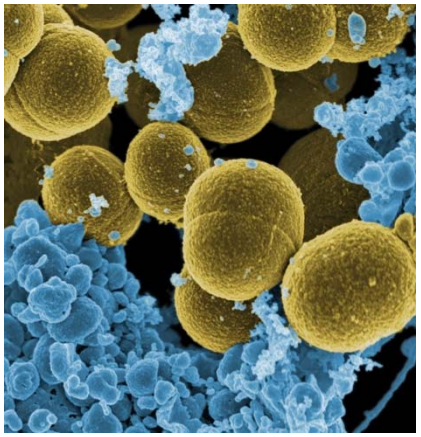


Bacteriófagos e islas de patogenicidad



- ¿Qué son los bacteriófagos?
- Ciclos de los fagos
  - Ciclo lítico
  - Ciclo lisogénico
- Organización genética de los bacteriófagos
- Islas de patogenicidad
  - PICIs (*Phage-inducible chromosomal islands*)
    - SaPI (*S. aureus* pathogenicity island)





Seguridad de los alimentos transgénicos

- ¿Qué es un alimento transgénico?



- ¿Qué es un alimento modificado genéticamente?
- ¿Qué NO es un alimento/organismo modificado genéticamente?



- Evaluación de los alimentos modificados genéticamente





MOOC

Biología molecular. Bases y aplicaciones

- 8.2. Fabricación de células sintéticas
- 8.3. Etapas de la expresión génica en eucariotas
- 8.4. Elementos genéticos móviles
- 8.5. Seguridad de los alimentos transgénicos
- 8.6. Bacteriófagos e islas de patogenicidad

Imágenes tomadas de www.wikipedia.org y www.google.es

Lección 8.2. Fabricación de células sintéticas



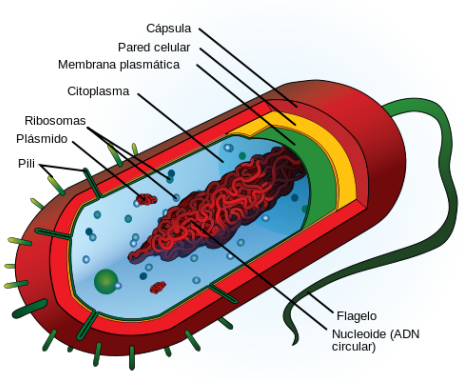
Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la biología molecular

Rosario Gil
Departamento de Genética/
Instituto de Biología Integrativa de Sistemas
Universitat de València





Biología sintética



- Área emergente dentro de la Biología
  que combina ciencia, tecnología e ingeniería
  para el diseño y construcción de nuevas funciones y sistemas biológicos.

- La Biología Sintética aspira a diseñar nuevos “sistemas biológicos” de forma racional y sistemática, que puedan incorporar funciones que no existen en la naturaleza.

Aplicación de conceptos propios de la ingeniería en biotecnología:

- Estandarización
- Ortogonalidad
- Modularidad

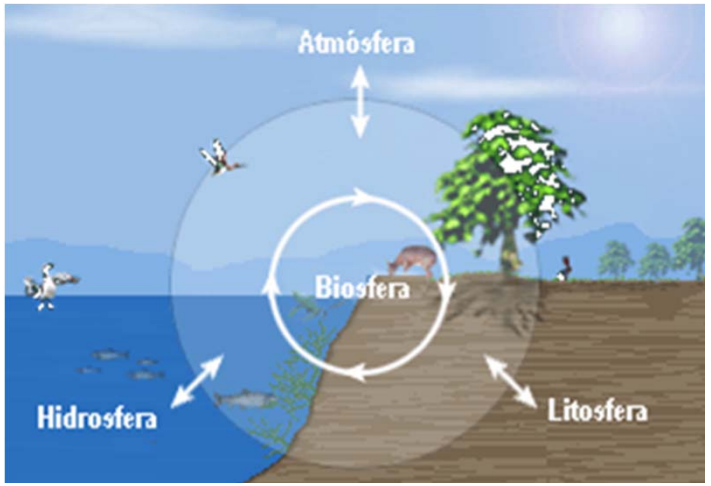




¿Qué es la vida?

Propiedad emergente de un sistema con dos capacidades fundamentales:

- Autopoiesis (automantenimiento): capacidad de reproducirse y mantenerse por sí mismo.
- Evolución





Existe una gran diversidad de formas de vida y muchos grados de complejidad

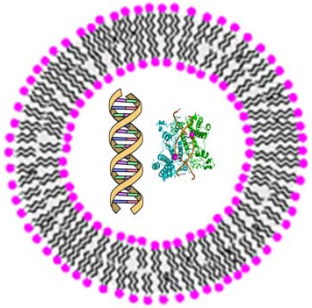
pero…

Todas las formas de vida que conocemos tienen organización celular:

Genoma y **metabolismo**

delimitados por una **membrana**

que permite la interacción con el ambiente



Aproximaciones para crear vida “artificial”

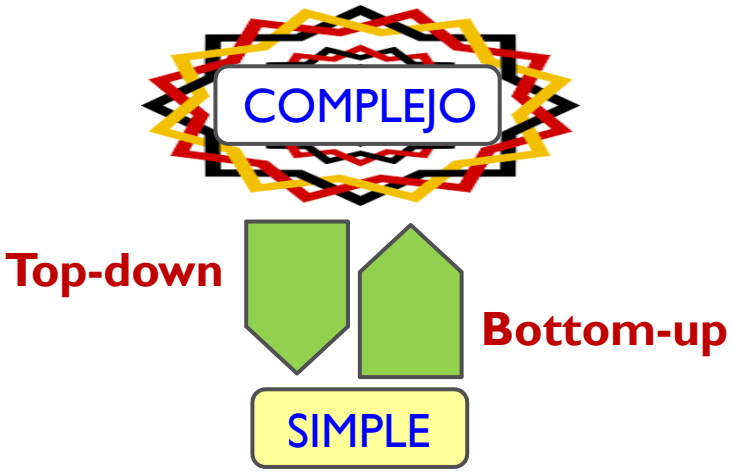
Si somos capaces de crear formas de vida simples

a) Será más fácil entender los distintos procesos vitales

b) Podremos utilizarlas con fines aplicados

Podemos intentarlo de dos formas:

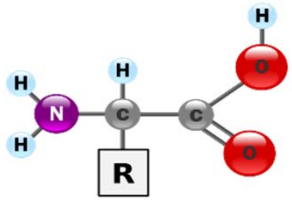
a) Simplificando formas de vida sencillas (de arriba abajo, *top-down*)



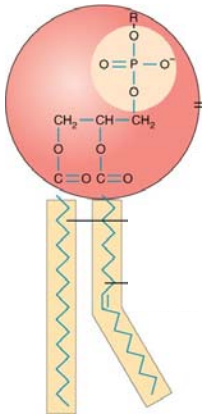
b) Combinando los componentes esenciales (de abajo a arriba, *bottom-up*)

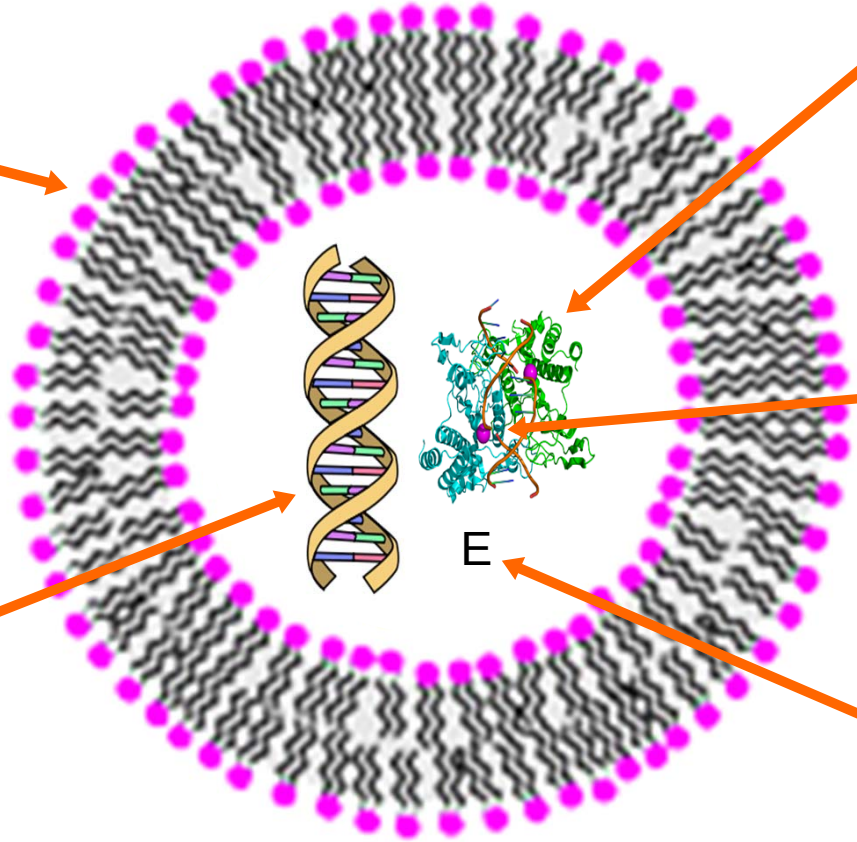
Vida artificial “*Bottom-up*” desde los componentes básicos

aminoácidos



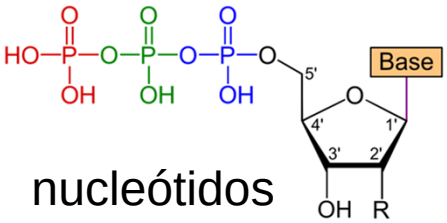
lípidos



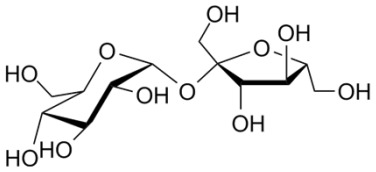


sales minerales





nucleótidos



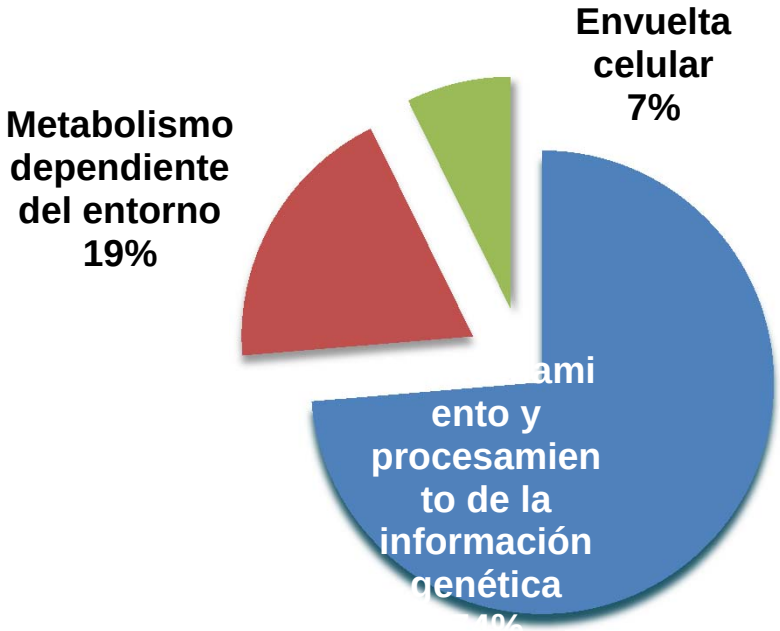
glúcidos

Fabricación de **protocélulas**

Vida artificial "*top-down*" simplificando la vida conocida

CÉLULA MÍNIMA:
Sistema biológico que posee los atributos mínimos para ser considerado vivo.

GENOMA MÍNIMO:
Genoma que contiene el menor número de elementos genéticos suficiente para dar lugar a un organismo vivo.



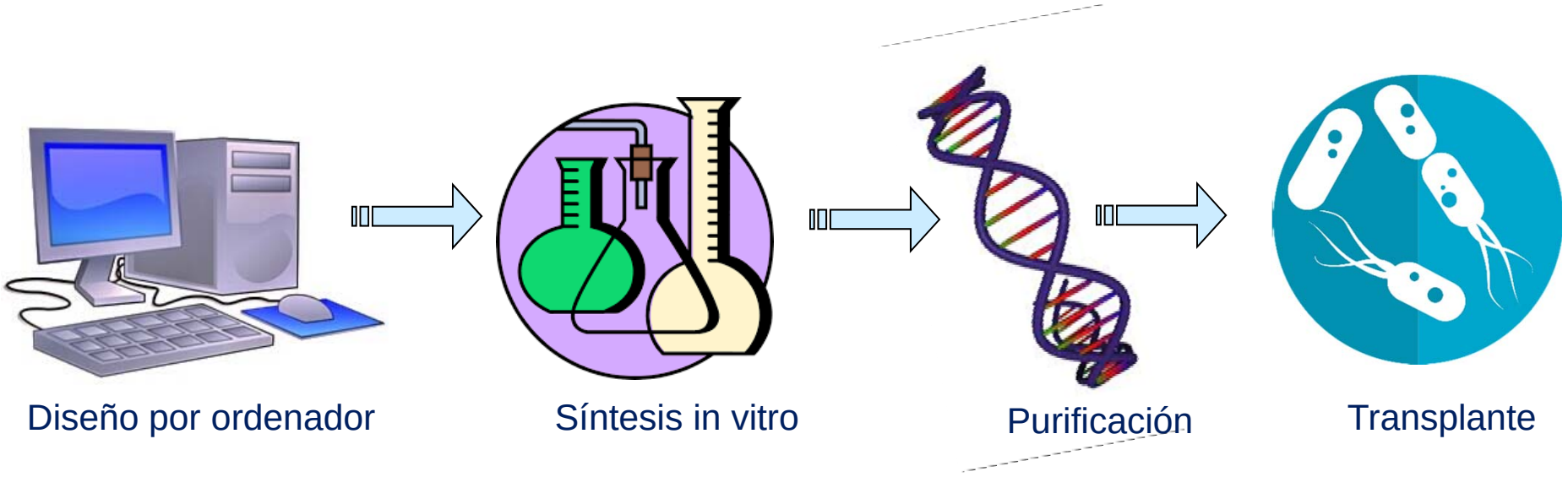
Podemos

- Eliminar los elementos no esenciales de genomas de bacterias de vida libre
- Sintetizar genomas compuestos únicamente por módulos esenciales

Vida artificial “*top-down*” simplificando la vida conocida

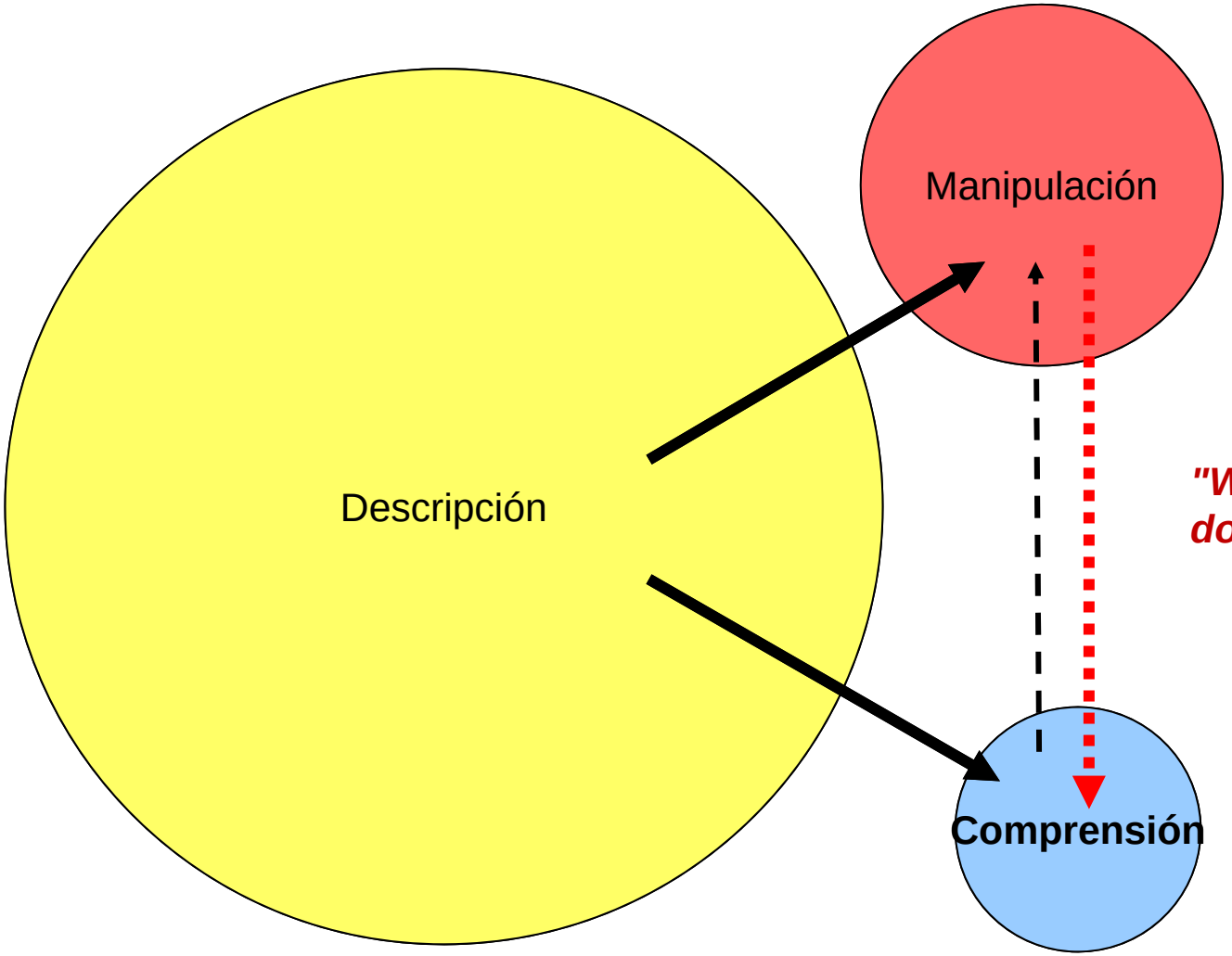
La tecnología moderna permite

- El diseño por ordenador y la síntesis de genomas completos de organismos sencillos.
- La introducción de genomas completos en células vivas, de forma que el nuevo genoma “toma el control” (Transplante de genomas).
- La simplificación de genomas para aproximarnos al genoma mínimo.



¿Y esto para qué nos sirve?

Los esfuerzos dedicados a crear vida artificial son el motor de nuevos descubrimientos y teorías.



"What I cannot create, I do not understand"

Richard Feynman

Referencias bibliográficas y enlaces

- Videos Youtube:

  Synthetic Biology
  https://www.youtube.com/watch?v=Ywy5b_Om0Q8

- Páginas web:

  Microbichitos por Miguel Vicente
  - Deja de ser ficción: el transplante de genoma convierte una especie en otra
    http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2007/12/11/80697

  - Los científicos ya han sintetizado un genoma, y ahora ¿qué pasa?
    http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2008/01/26/83331

  Creada vida artificial más sencilla que la vida misma
  https://elpais.com/elpais/2016/03/23/ciencia/1458759034_274399.html

- Otros enlaces:

  En busca del genoma mínimo (articulo en la revista Apuntes de CyT)
  http://www.aacte.eu/wp/wp-content/uploads/2012/08/Apuntes_23.pdf

Lección 8.3 Etapas de la Expresión Génica en eucariotas



Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la Biología Molecular

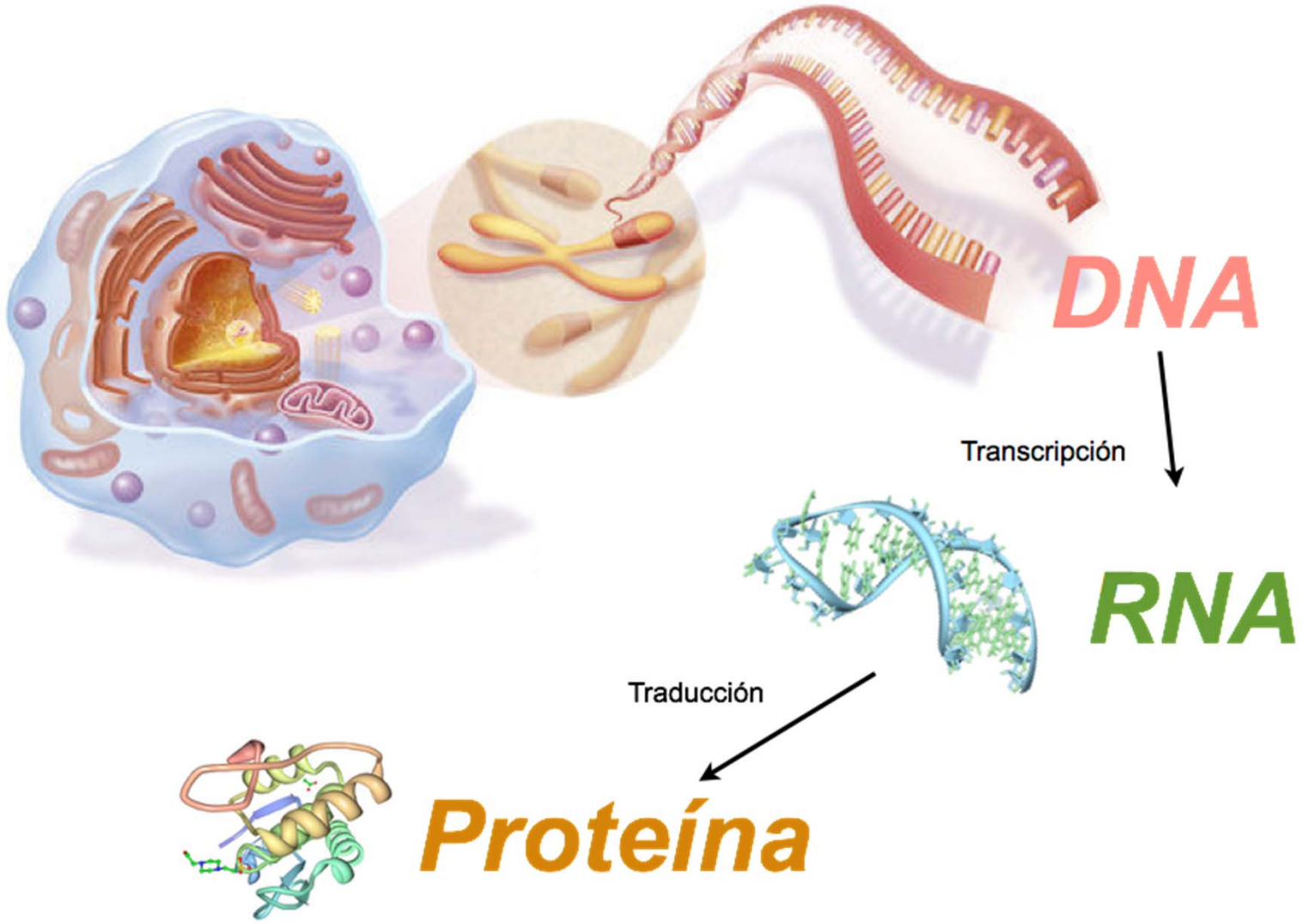
Susana Rodríguez-Navarro
Laboratorio de expresión génica y metabolismo de RNA
Centro de Investigación Príncipe Felipe
Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)

PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

ibv
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA CSIC

CSIC

La Expresión Génica

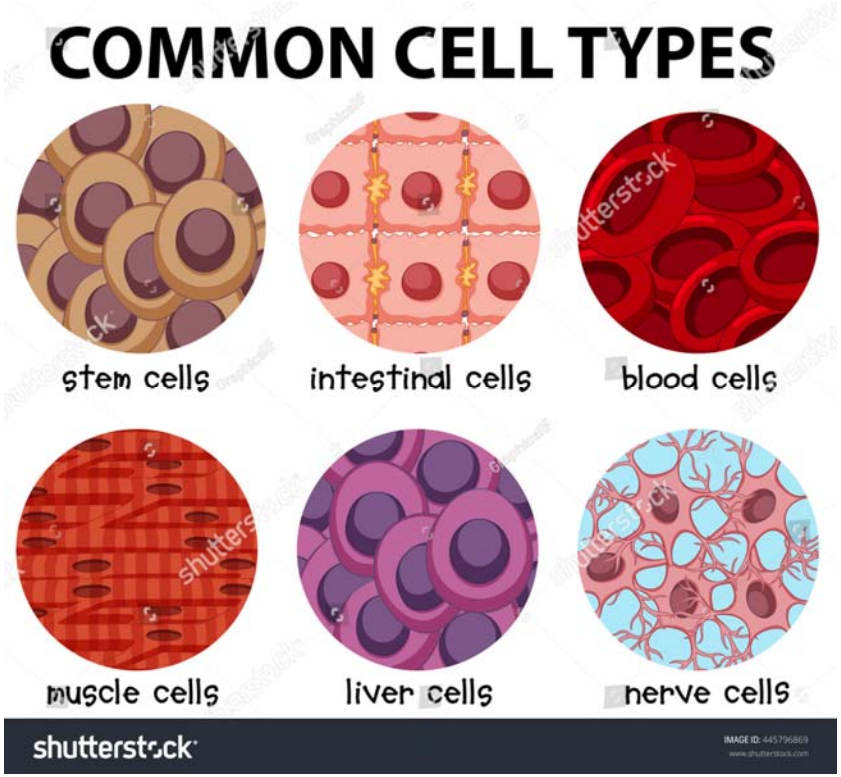


La Expresión Génica

Todas las células de un organismo poseen el mismo material genético.

Sin embargo, todas ellas no expresan los mismos genes.

¿cómo lo consiguen?



La Expresión Génica

Todas las células de un organismo poseen el mismo material genético.

Sin embargo, todas ellas no expresan los mismos genes.

¿cómo lo consiguen?

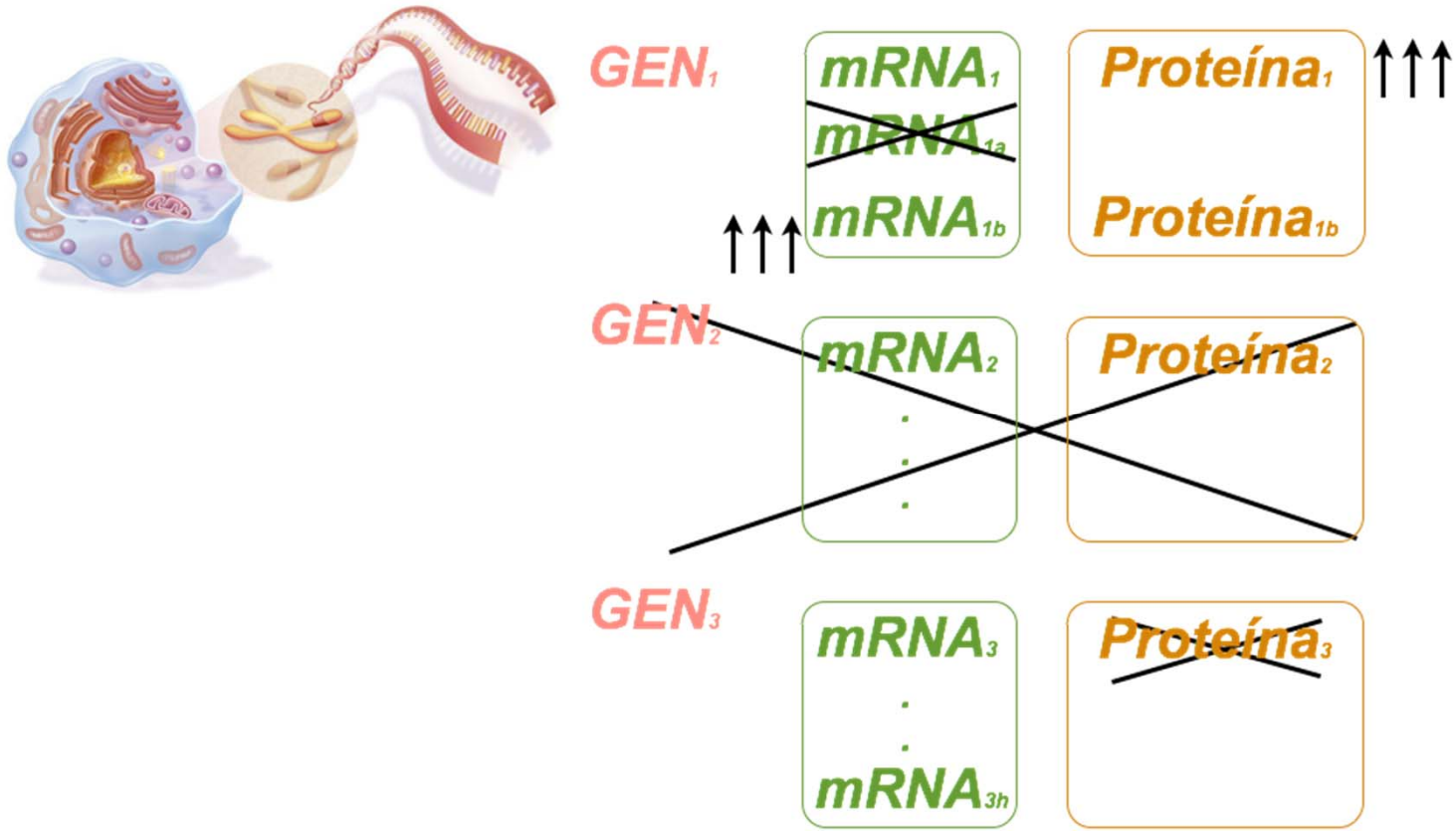
A través de una "**programación específica"** de la expresión génica, de modo que únicamente se produce aquello que necesitan.

Esta "**programación**" se da a muchos niveles y los "**productos**" obtenidos son muy variados. Por ejemplo, con un mismo genoma podemos obtener productos típicos de una neurona o de un adipocito, dependiendo del tipo celular.

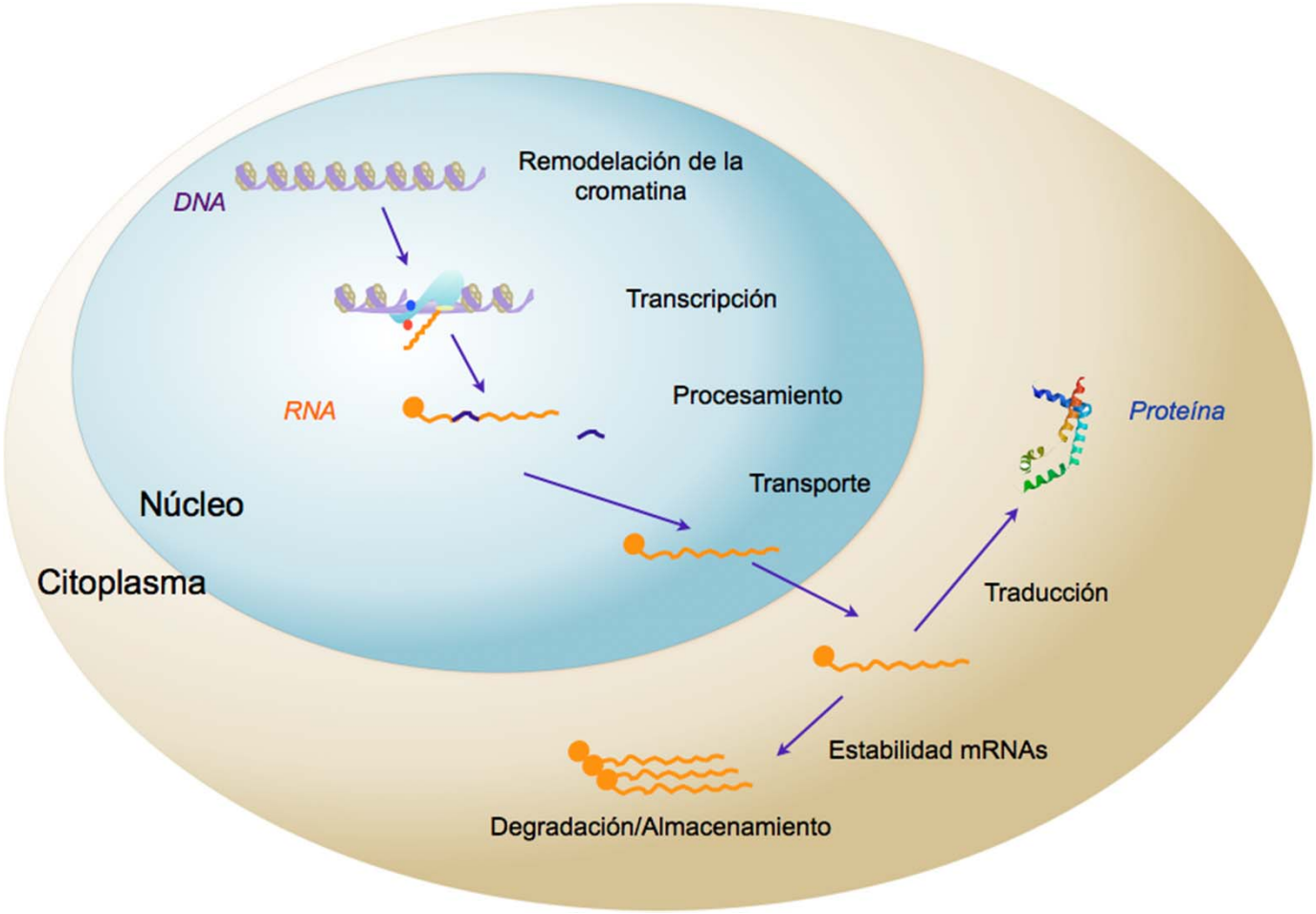
En organismos más sencillos, como los unicelulares eucariotas, estas "programaciones específicas" permiten la adaptación a diferentes ambientes o resistencia a estrés.

La Expresión Génica

A pesar de poseer una misma dotación génica, las células pueden implementar **perfiles transcripcionales** específicos con fines de adaptación, desarrollo y diferenciación.



Etapas de la Expresión Génica (etapas de la “PROGRAMACIÓN”)



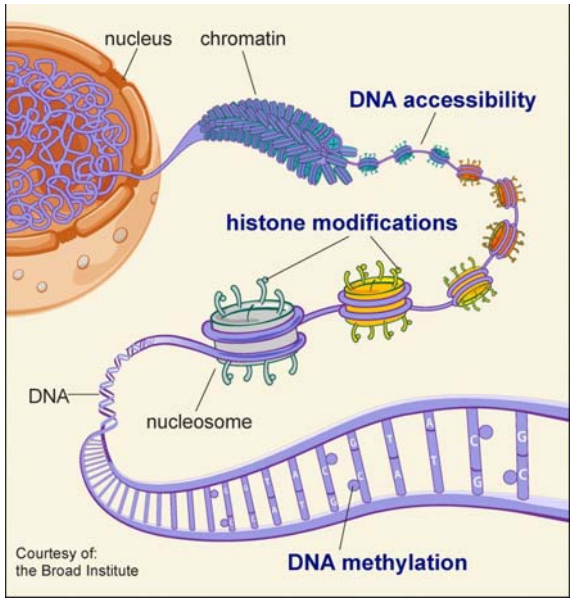
El proceso de expresión génica consta de diferentes etapas tanto nucleares como citoplasmáticas.

Etapas de la Expresión Génica: 1. Epigenética

La epigenética consiste en un conjunto de modificaciones del genoma que no altera su secuencia permitiendo su interpretación.

Existen marcas epigenéticas de distinto tipo que *marcan* el DNA y sus proteínas asociadas (las Histonas) con el fin de dar instrucciones sobre su utilización.

Las marcas más conocidas son la metilación del DNA y las modificaciones de las histonas.



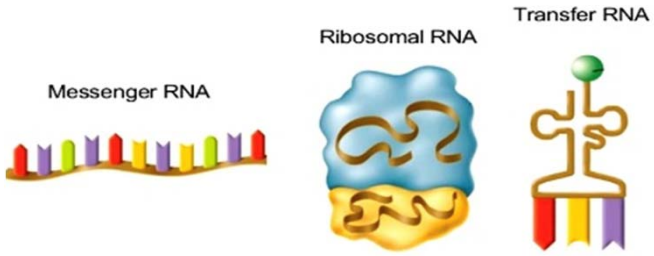
Fuente imagen: Google pictures CC



Etapas de la Expresión Génica:
2. Transcripción y procesamiento de RNA

La transcripción es el primer paso en la decodificación del mensaje genético. Consiste en transcribir la información del DNA en una nueva molécula ("*producto*") llamado RNA. La decisión de producir un RNA determinado se "programa" a través de la epigenómica, obteniéndose distintos perfiles transcripcionales (conjunto de RNAs).

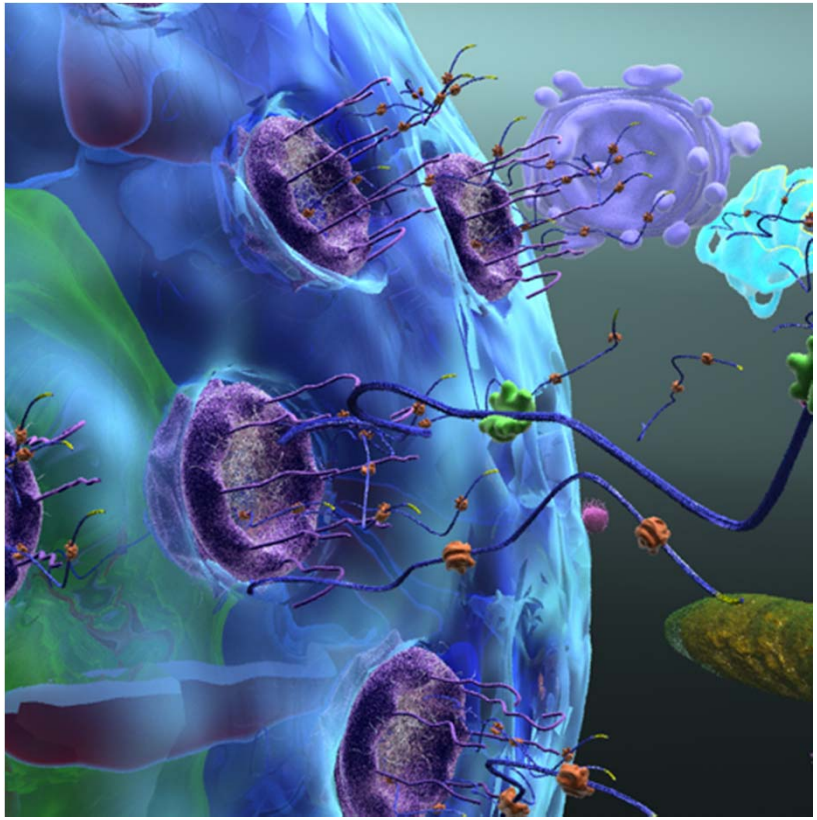
Existen distintos tipos de RNA con funciones celulares variadas. Estos RNAs son sintetizados por diferentes maquinarias cuya principal protagonista es la RNA polimerasa. La biogénesis de los RNAs maduros consta de distintas etapas de procesamiento que añade otra capa de "programación" al proceso de expresión génica .



Fuente imagen: Google pictures CC

Etapas de la Expresión Génica:
3. Transporte de RNA

En las células eucariotas, una vez madurado el RNA es exportado del núcleo al citoplasma atravesando los llamados poros nucleares. Los RNAs no viajan solos, sino que existen gran variedad de “transportistas” que participan en este viaje.



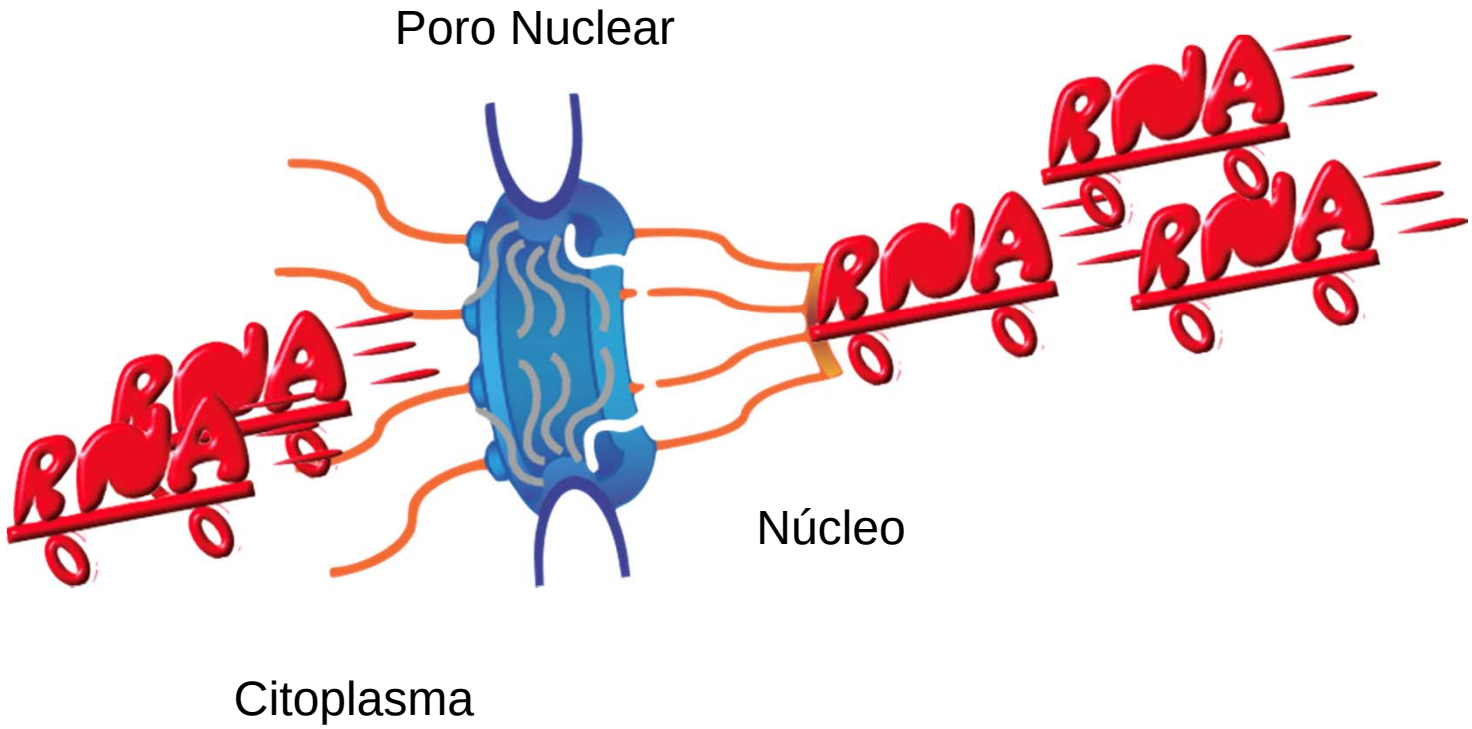
Genes **2014**, *5*(4), 1032-1049; doi:10.3390/genes5041032 Open Access Review

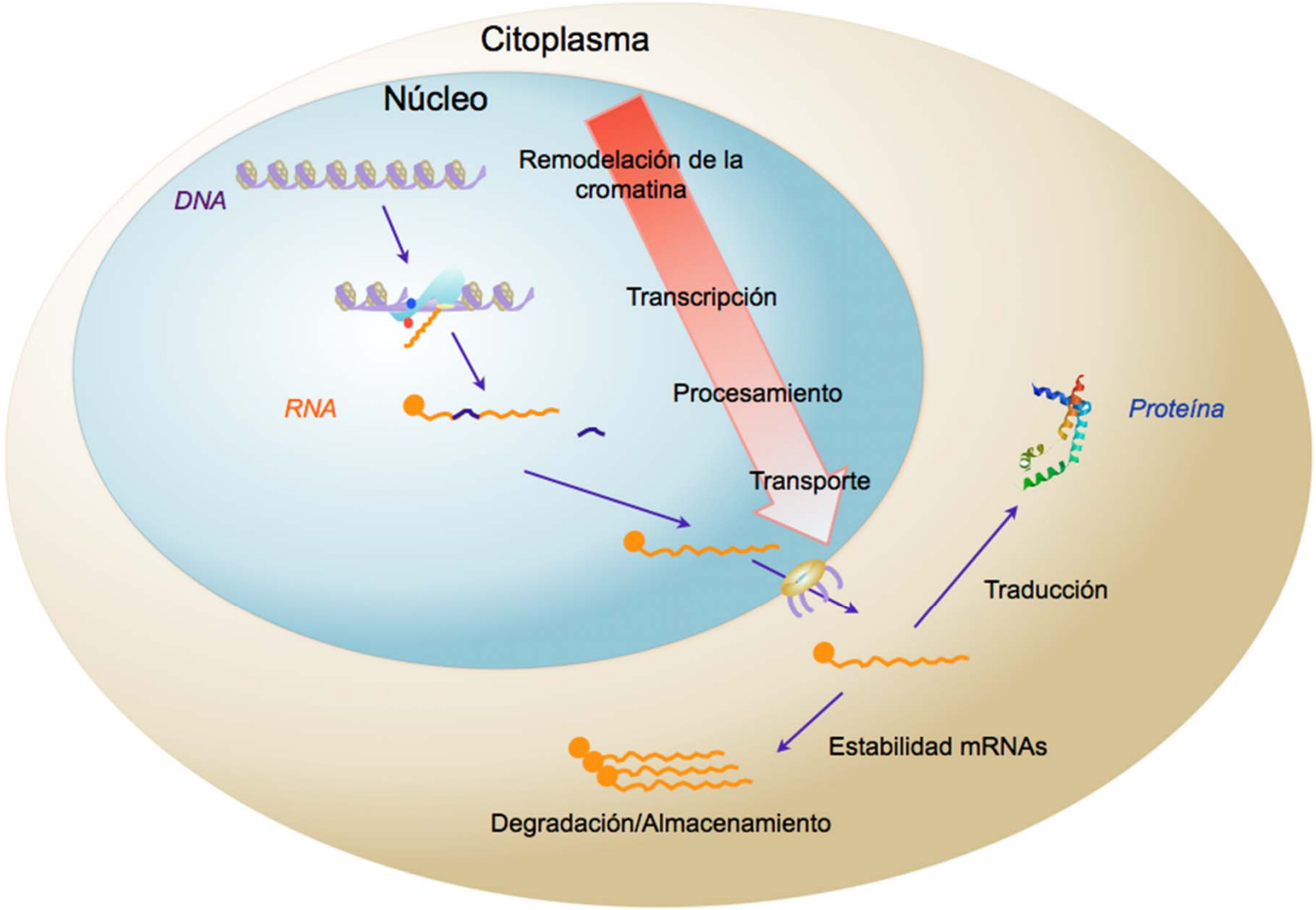
Three-Dimensional Mapping of mRNA Export through the Nuclear Pore Complex

Steven J. Schnell, Jiong Ma and Weidong Yang *

Etapas de la Expresión Génica:
3. Transporte de RNA

En las células eucariotas, una vez madurado el RNA es exportado del núcleo al citoplasma atravesando los llamados poros nucleares. Los RNAs no viajan solos, sino que existen gran variedad de “transportistas” que participan en este viaje.



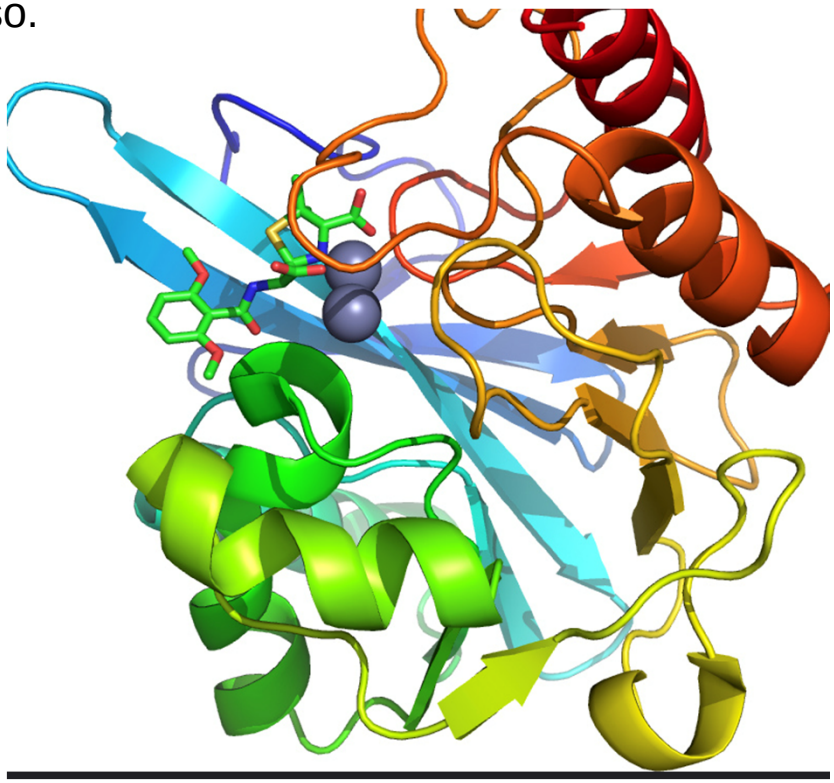

Citoplasma
Núcleo
DNA
Remodelación de la cromatina
Transcripción
RNA
Procesamiento
Transporte
Proteína
Traducción
Estabilidad mRNAs
Degradación/Almacenamiento

Etapas de la Expresión Génica:
4. Traducción del mRNA, degradación o almacenaje



La mayoría de los mRNAs, una vez alcanzado el citoplasma, son traducidos a proteínas que generalmente son consideradas “producto” final de la expresión génica.

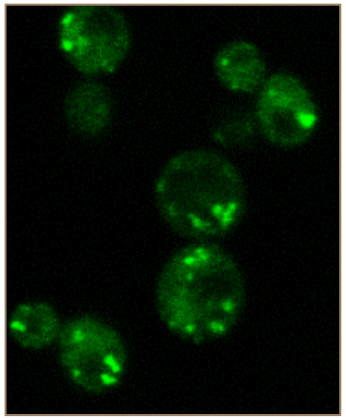
Nuevamente, existe una compleja regulación de la traducción que permite a la célula añadir una nueva etapa en la “programación” del proceso.



Etapas de la Expresión Génica:
4. Traducción del mRNA, degradación o almacenaje



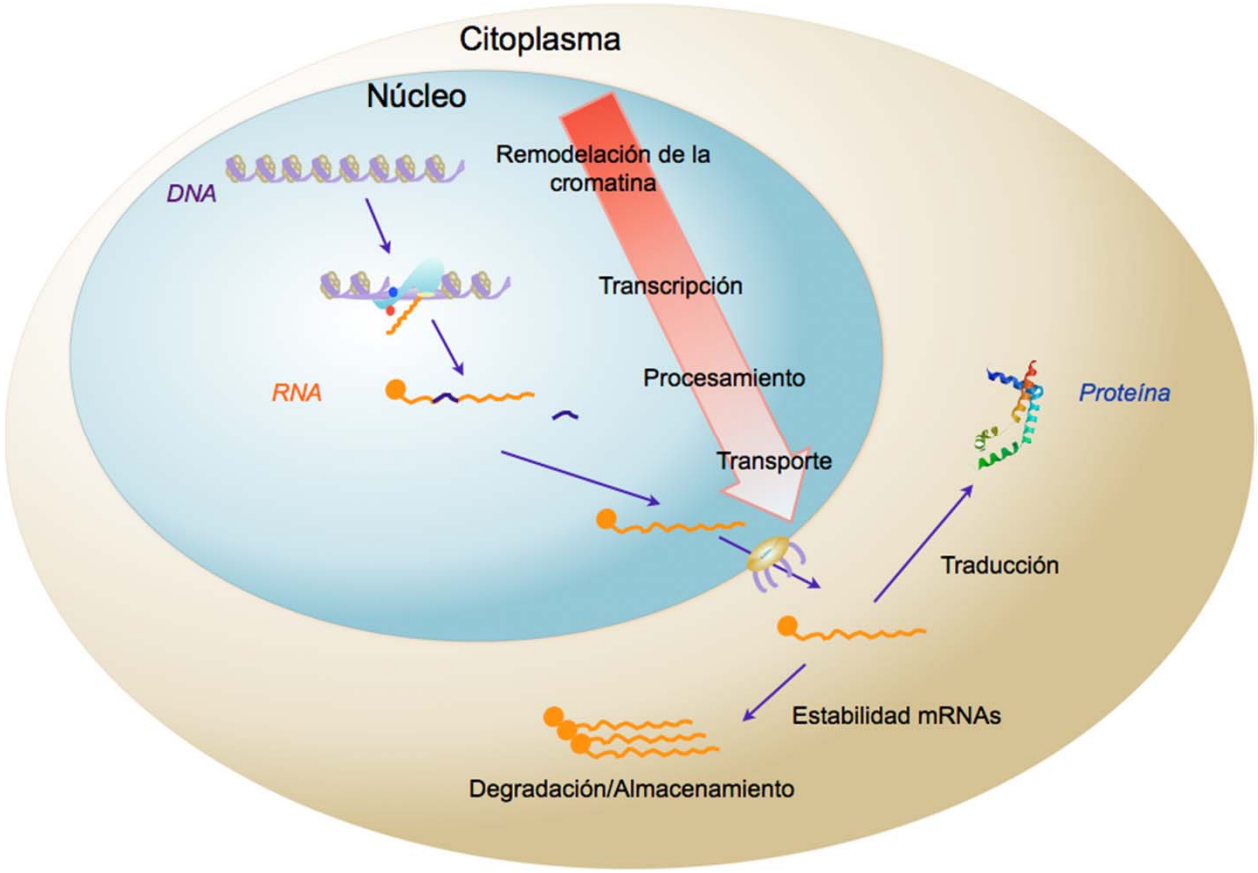
La mayoría de mRNAs que no van a ser traducidos a proteínas son frecuentemente degradados en el citoplasma. Sin embargo, no todos los mRNAs que no se traducen se degradan. La célula puede decidir almacenarlos en reservorios protegidos de la degradación para su uso posterior. Estamos pues ante nuevos ejemplos de modulación de la "programación" de la expresión génica.



Células de levadura mostrando acumulación de proteínas y RNAs en gránulos de estrés (Laboratorio Dr. Rodríguez-Navarro)

Coordinación de las etapas de la Expresión Génica

Además del control de la ”programación” específica de cada etapa, existen mecanismos encargados de coordinar las diferentes etapas del proceso: **coordinación de la programación**



Coordinación de las etapas de la Expresión Génica

Des**coordinación de la programación: ENFERMEDADES**



Lección 8.4. Elementos genéticos móviles

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la biología molecular

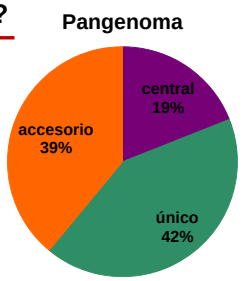
Mª Ángeles Tormo Mas
Grupo Acreditado de Infección Grave
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

¿Qué son los Elementos Géneticos Móviles (EGM)?

El genoma bacteriano (**pangenoma**) está formado por el genoma central, el genoma accesorio, y los genes únicos. El **genoma central** contiene todos los genes necesarios para la biología celular básica, presente en todas las cepas de la especie. El **genoma único**, genes presentes en determinadas cepas de la especie. El **genoma accesorio** codifica para para proteínas necesarias para la adaptación de la bacteria a diferentes nichos.

Los **elementos genéticos móviles EGM** forman parte del genoma accesorio**,** son fragmentos de ADN que codifican para gran variedad de factores de virulencia así como para enzimas y proteínas que permiten la movilidad del ADN dentro del genoma (**movilidad intracelular**) y entre células bacterianas (**movilidad intercelular**).

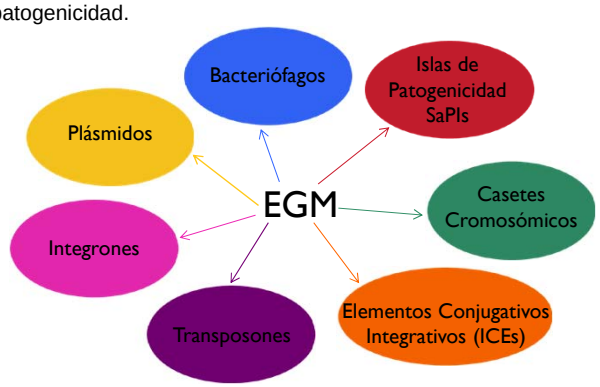




Clases de Elemento Géneticos Móviles (EGM)

Los EGM contienen diferente contenido G+C que el genoma central, ya que con frecuencia son adquiridos de otras especies bacterianas.

Entre los EGM más caracterizados encontramos, los plásmidos, los bacteriófagos, los transposones, los casetes cromosómicos, los elementos conjugativos integrativos, los integrones y las islas de patogenicidad.



Transposones

Los elementos transponibles están flanqueados por repeticiones invertidas y tienen la capacidad de transponerse de un lugar a otro dentro del cromosoma. Se pueden clasificar según su composición en:

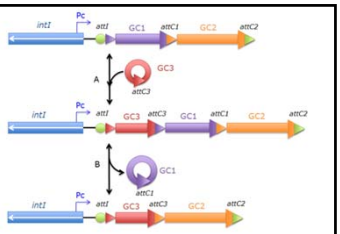
- **Secuencias de inserción** (IS), contienen una transposasa (enzima que cataliza el mecanismo de transposición) y en los extremos dos secuencias repetidas invertidas (ITR)
- **Transposones compuestos**, presentan a ambos extremos IS y genes que codifican para proteínas que confieren resistencia antibiótica.
- **Transposones tipo Tn3**, poseen en los extremos ITR y codifican para una transposasa y una resolvasa (resuelve el cointegrado en la integración replicativa).

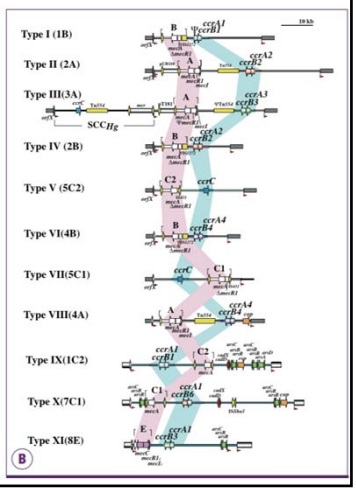


Integrones y casetes cromosómicos

Los **integrones** son capaces de capturar material genético exógeno (casetes de genes), integrarlo mediante recombinación sitio-específica y expresarlo de forma eficiente. Contienen el gen *int*I que codifica para una integrasa, el sitio de recombinación *att*C y una región variable de genes adquiridos (principalmente genes de resistencia antibiótica).

Los **SSCs** (***Staphylococcal cassette chromosomes***) se insertan en la orfX y codifican para genes de resistencia antibiótica y/o genes de virulencia. SSC*mec* está formado por el gen *mec*A que confiere resistencia a meticilina.

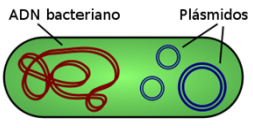




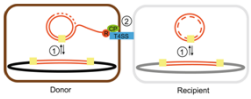
Plásmidos y elementos conjugativos integrativos (ICEs)

Los **plásmidos** son moléculas de ADN extracromosómicos con capacidad de autoreplicarse, en la mayoría de los casos son circulares y bicatenarios, presentando gran variabilidad en tamaño y número de copias. Están organizados de manera modular, dado que los genes con funciones semejantes suelen aparecer físicamente agrupados. Presentan módulos indispensables para la viabilidad de los plásmidos y accesorios (resistencia antibiótica...).





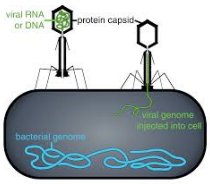
Los **ICEs**, también conocidos como transposones de conjugación, se transmiten por conjugación, se integran y se replican junto con el cromosoma. Después de la integración, las ICE pueden escindirse del cromosoma y formar moléculas circulares que son transferidas a otras bacterias. Estos elementos codifican para proteínas que intervienen en la integración, escisión y conjugación, además de proteínas accesorias (resistencia antibiótica...).





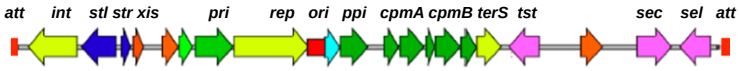
Bacteriófagos e islas de patogenicidad





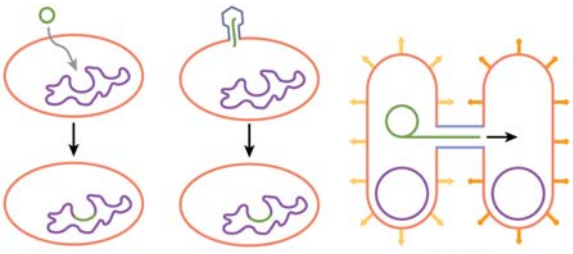
Los bacteriófagos o fagos, son **agentes infecciosos** que se replican como agentes intracelulares obligados dentro de las **bacterias**. Los bacteriófagos están **ampliamente distribuidos** en todo tipo de hábitats y son considerados como los **organismos más abundantes** de la biosfera. Numerosos **factores de virulencia** están codificados por fagos. Además de transferir su propio genoma, los fagos son capaces de transferir otros EGM.

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (**SaPIs**) son el modelo de una gran familia de EGM denominada **PICIs** *Phage-inducible chromosomal islands*. Codifican para factores de virulencia y dependen de los fagos para su inducción y encapsidación.



Mecanismos de transferencia horizontal

Los elementos genéticos móviles pueden ser transferidos horizontalmente, principalmente por tres mecanismos, como son, la **transformación**, la **conjugación** y la **transducción**. Estos mecanismos permiten por tanto la diseminación de los EGM entre distintas bacterias y consecuentemente la propagación de los diferentes factores de virulencia que codifican, destacando los **genes de resistencia antibiótica**, que actualmente suponen un grave problema en el tratamiento de las infecciones, principalmente a nivel hospitalario donde la presencia **de bacterias multirresistentes** provoca en ocasiones el fracaso terapéutico.



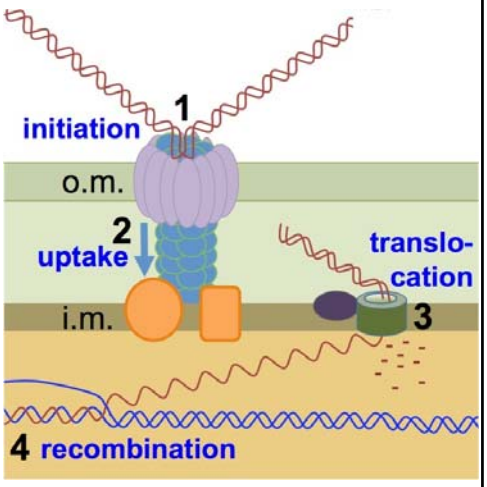
Transformación **Transducción** **Conjugación**



Transformación

La transformación bacteriana natural implica la internalización y la integración del ADN exógeno en el genoma de la bacteria receptora mediante recombinación homóloga, lo cual permite a las bacterias adquirir nuevos genes.

La transformación está totalmente **dirigida por la célula receptora** y todas las proteínas requeridas están codificadas en su genoma. La mayoría de las bacterias transformables no expresan permanentemente las proteínas que están involucradas, sino que requieren condiciones específicas para desarrollar la competencia para la transformación genética. La competitividad es, por lo tanto, una "ventana de oportunidad" transitoria para la internalización del ADN.



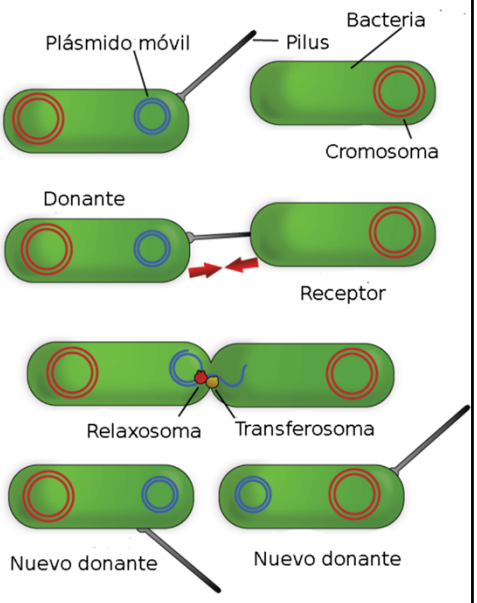
Conjugación

Transferencia de material genético (plásmidos, ICEs) desde una célula donadora a otra receptora.

A diferencia de la transformación y la transducción, se requiere contacto físico entre las bacterias, a través del pilus generado por la bacteria donante.

El ADN transferido posee su propio origen de replicación.

La relaxasa es una proteína clave en la conjugación que cataliza las etapas inicial y final en la conjugación, es decir, la escisión inicial en el donante y la ligación final del ADN transportado en la célula receptora.

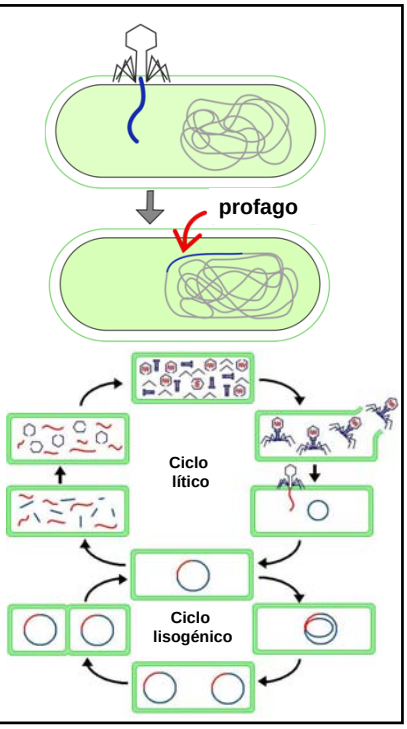


Transducción

Proceso de transferencia de ADN de una bacteria a otra a través de un virus bacteriano (bacteriófago). Tras la absorción del bacteriófago a la superficie bacteriana y la inyección del ADN en el interior celular, continúa el ciclo de reproducción vírico, que puede ser lítico o lisogénico:

Ciclo lítico: el ADN vírico replica y genera nuevas partículas virales que finalmente lisan la bacteria y continúan la infección.

Ciclo lisogénico: el ADN vírico se integra en el genoma bacteriano (profago), y replica de acuerdo con la división celular hasta que entra nuevamente en fase lítica en respuesta a estímulos ambientales (respuesta SOS).



Referencias bibliográficas y enlaces

- Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. Nat Rev Microbiol. 2015 Dec;13(12):777-86.
- Penadés JR, Christie GE. The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):181-201.
- Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat Rev Microbiol. 2010 Aug;8(8):552-63.
- Pinto UM, Pappas KM, Winans SC. The ABCs of plasmid replication and segregation. Nat Rev Microbiol. 2012 Nov;10(11):755-65
- Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. Int J Med Microbiol. 2013 Aug;303(6-7):350-9.
- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Front Microbiol. 2012 Apr 9;3:119.
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M.Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Jun;67(2):277-301.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. Nat Rev Microbiol. 2014 Mar;12(3):181-96.

Lección 8.5. Seguridad de los alimentos transgénicos

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la biología molecular

Emilia Matallana Redondo
Instituto de Biología Integrativa de Sistemas
Universitat de València

¿Qué es un alimento transgénico?

- Los alimentos transgénicos son aquellos que han sido producidos a partir de un organismo modificado mediante ingeniería genética y al que se le han incorporado genes de otro organismo para producir las características deseadas.

https://es.wikipedia.org/wiki/Alimento_transg%C3%A9nico

- Los alimentos transgénicos son aquellos que incluyen en su composición algún ingrediente procedente de un organismo al que se le ha incorporado, mediante técnicas genéticas, un gen de otra especie.

https://www.muyinteresante.es/innovacion/articulo/ique-son-los-alimentos-transgenicos



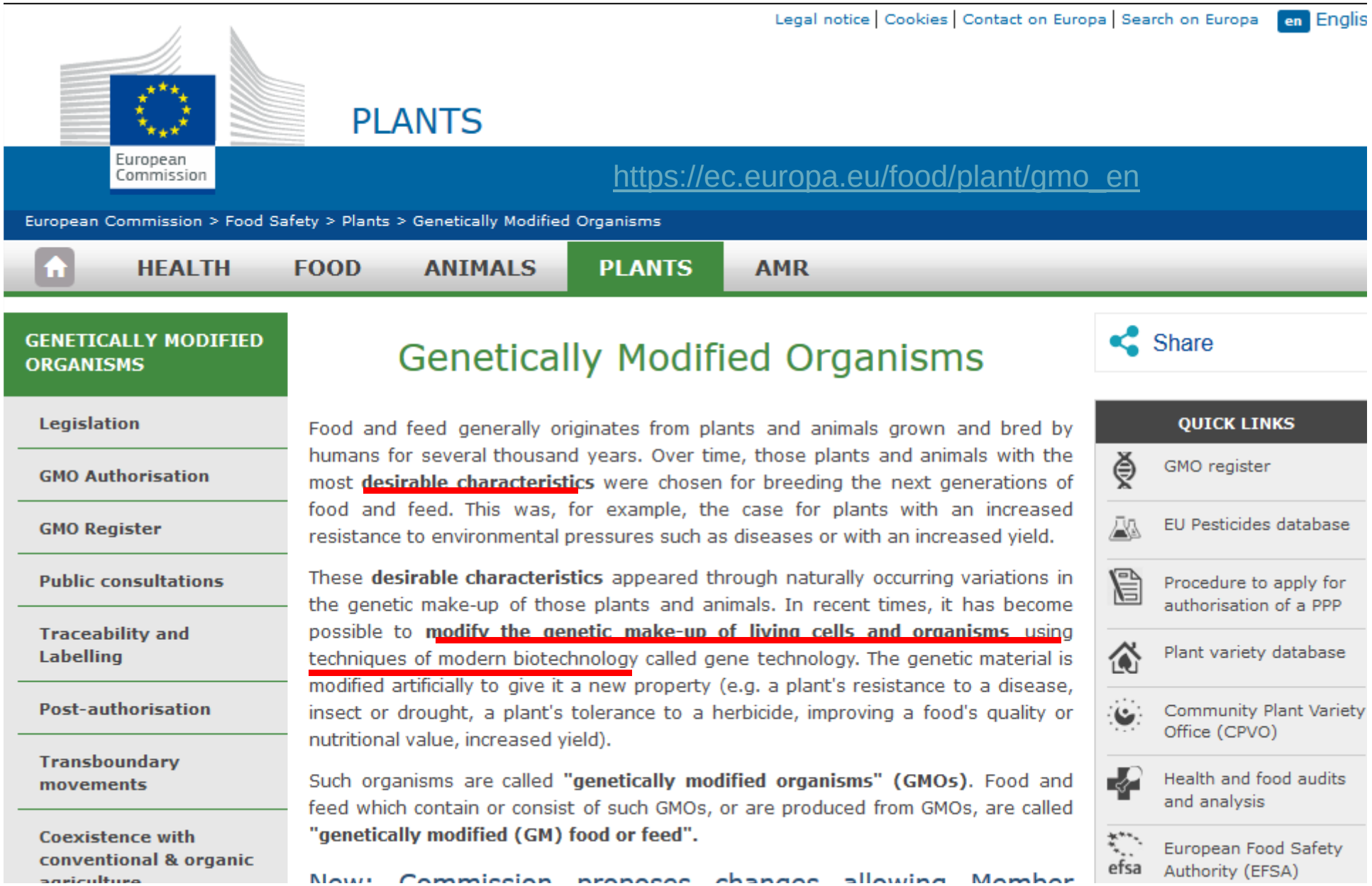
Vacas belgas azules

No son transgénicos

Tomates negros



¿Qué es un alimento modificado genéticamente?



Legal notice | Cookies | Contact on Europa | Search on Europa en Englis

European Commission

PLANTS

https://ec.europa.eu/food/plant/gmo_en

European Commission > Food Safety > Plants > Genetically Modified Organisms

HEALTH FOOD ANIMALS PLANTS AMR

GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

- Legislation
- GMO Authorisation
- GMO Register
- Public consultations
- Traceability and Labelling
- Post-authorisation
- Transboundary movements
- Coexistence with conventional & organic agriculture

Genetically Modified Organisms

Food and feed generally originates from plants and animals grown and bred by humans for several thousand years. Over time, those plants and animals with the most **desirable characteristics** were chosen for breeding the next generations of food and feed. This was, for example, the case for plants with an increased resistance to environmental pressures such as diseases or with an increased yield.

These **desirable characteristics** appeared through naturally occurring variations in the genetic make-up of those plants and animals. In recent times, it has become possible to **modify the genetic make-up of living cells and organisms** using techniques of modern biotechnology called gene technology. The genetic material is modified artificially to give it a new property (e.g. a plant's resistance to a disease, insect or drought, a plant's tolerance to a herbicide, improving a food's quality or nutritional value, increased yield).

Such organisms are called **"genetically modified organisms" (GMOs)**. Food and feed which contain or consist of such GMOs, or are produced from GMOs, are called **"genetically modified (GM) food or feed"**.

Now: Commission proposes changes allowing Member

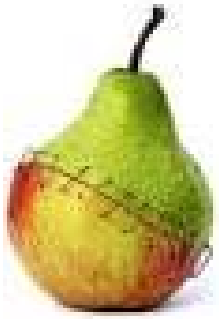
Share

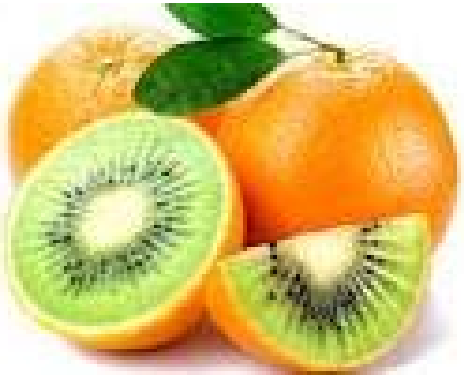
QUICK LINKS

- GMO register
- EU Pesticides database
- Procedure to apply for authorisation of a PPP
- Plant variety database
- Community Plant Variety Office (CPVO)
- Health and food audits and analysis
- European Food Safety Authority (EFSA)

¿Qué NO es un alimento/organismo modificado genéticamente?



















Evaluación de los alimentos modificados genéticamente

European Food Safety Authority

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION

European Food Safety Authority EFSA Journal 2011; 9(5):2150

Evaluación sanitaria

SCIENTIFIC OPINION

Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants[1]

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)[2,3]

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

European Food Safety Authority EFSA Journal 2015;13(6):4128

Evaluación ambiental

SCIENTIFIC OPINION

Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants[1]

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)[2,3]

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

Evaluación sanitaria

3. Information required for risk assessment of GM plants and derived food and feed 8
3.1. Hazard identification and characterisation 8
3.1.1. Information relating to the recipient and the parental plants 8
3.1.2. Molecular Characterisation 9
3.1.2.1. Information relating to the genetic modification 9
3.1.2.2. Information relating to the GM plant 9
3.1.2.3. Conclusions 12
3.1.3. Comparative assessment 12
3.1.3.1. Criteria for the selection of comparator(s) 13
3.1.3.2. Field trials: experimental design and statistical analysis 13
3.1.3.3. Compositional analysis 19
3.1.3.4. Agronomic and phenotypic characteristics 20
3.1.3.5. Effects of processing 20
3.1.3.6. Conclusions 20
3.1.4. Toxicological assessment 21
3.1.4.1. Standardised Guidelines for Toxicity Tests 22
3.1.4.2. Assessment of newly expressed proteins 22
3.1.4.3. Assessment of new constituents other than proteins 23
3.1.4.4. Assessment of altered levels of food and feed constituents 24
3.1.4.5. Assessment of the whole food and/or feed derived from GM plants 24
3.1.4.6. Conclusions 25
3.1.5. Allergenicity assessment 25
3.1.5.1. Assessment of allergenicity of the newly expressed protein 26
3.1.5.2. Assessment of the allergenicity of the whole GM plant 28
3.1.5.3. Adjuvanticity 28
3.1.5.4. Conclusions 28
3.1.6. Nutritional assessment 28
3.1.6.1. Nutritional assessment of food derived from GM plants 29
3.1.6.2. Nutritional assessment of feed derived from GM plants 29
3.1.6.3. Conclusions 30

Evaluación ambiental

Assessment 8
1. Introduction 8
1.1. Relevance of agronomic and phenotypic data for the risk assessment of GM plants 9
1.1.1. Detecting intended and unintended differences 9
1.1.2. Assess to what extent differences depend on receiving environments 10
1.1.3. Confirm that field trials were conducted following good agricultural practices 10
1.1.4. Support to the risk characterisation of GM plants 11
1.2. Objectives of the guidelines 11
1.3. Scope of the guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of GM plants 12
1.4. Transitional period of the guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of GM plants 12
2. Selection of sites and test materials 14
2.1. Representativeness of the sites and suitability of test materials 14
2.2. The need for diversity of sites 15
2.3. A strategy to select sites and varieties 15
3. Quality and design of field trials 18
3.1. Seed quality 18
3.1.1. Production conditions of the sown seeds 18
3.1.2. Identity of starting materials 18
3.1.3. Seed health and viability 19
3.2. Description of the receiving environments of field trials 19
3.2.1. Location of field trials 19
3.2.2. Agrometeorological data 19
3.2.3. Soil characteristics 20
3.2.4. Cropping history 21
3.3. Crop management system 21
3.3.1. Crop management 21
3.3.2. Field trial design 23

Legislación e información adicional



Lección 8.6. Bacteriófagos e islas de patogenicidad

Biología molecular. Bases y aplicaciones
Módulo 8. Otras aplicaciones de la biología molecular

Mª Ángeles Tormo Mas
Grupo Acreditado de Infección Grave
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

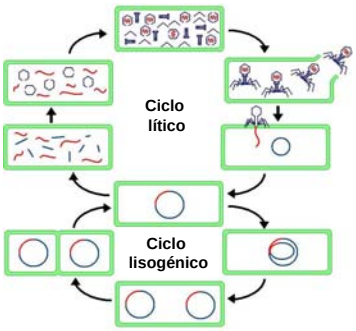
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

¿Qué son los bacteriófagos?



- Son **agentes infecciosos** que se replican como agentes intracelulares obligados dentro de las **bacterias**, y que para hacerlo utilizan la maquinaria biosintética de su hospedador.
- Están **ampliamente distribuidos** en todo tipo de hábitats y son considerados como los **organismos más abundantes** de la biosfera.
- No son solo cuantitativamente importantes como **elementos genéticos móviles**, sino también como vectores de **transferencia horizontal** entre bacterias, jugando un papel crítico en la biología, diversidad y evolución bacteriana. Numerosos **factores de virulencia** están codificados por fagos.
- Además de su papel en la **patogénesis bacteriana**, los fagos atemperados contribuyen a la **reorganización genómica**, ayudan a la **adaptación** de cepas bacterianas a su nicho ecológico, confieren **protección frente** a la posible infección lítica de **otros fagos** o intervienen en **mecanismos de competencia ecológica** entre diferentes especies bacterianas.

Ciclos de los fagos



Los bacteriófagos se clasifican según su ciclo de vida en fagos líticos o virulentos y fagos atemperados.

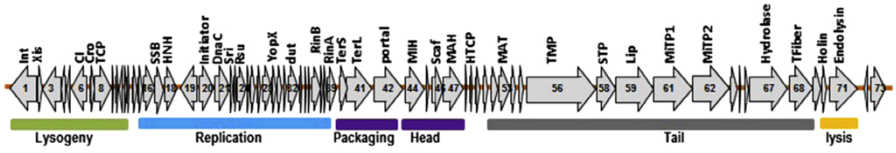
Los **fagos líticos** son aquellos que tras la infección de la célula bacteriana y después de su multiplicación, provocan la lisis de la bacteria liberando una nueva progenie fágica en un proceso denominado **ciclo lítico**.

Durante el **ciclo lisogénico**, los **fagos atemperados**, se integran en el genoma de la bacteria, transmitiéndose de una generación a otra sin que se produzca la lisis celular. A las bacterias huéspedes infectadas se las llama **lisogénicas** y al ADN viral integrado se le llama **profago**. Ante situaciones de estrés, como la exposición a la luz ultravioleta o a agentes que dañan el ADN como determinados antibióticos, se desencadena la denominada **respuesta SOS** bacteriana, iniciando el ciclo lítico que conducirá a la lisis celular. Durante la inducción, los fagos se escinden del cromosoma bacteriano y comienzan a replicarse, se encapsidan y se **transfieren horizontalmente** a otras bacterias.

Organización genética de los bacteriófagos

El fago lambda (λ) es uno de los fagos mejor estudiados, siendo el prototipo del grupo de bacteriófagos lambdoides. Los fagos miembros de este grupo tienen una organización genética muy similar. Los genes que se localizan juntos en el genoma se agrupan en **módulos según su función biológica** (**lisogenia, replicación, empaquetamiento** y **lisis**), el conjunto de módulos se combina para constituir el genoma viral.

La organización modular de los fagos y la conservación de cierta homología en los extremos de los distintos módulos, posibilitan el **intercambio de módulos con una misma función,** entre fagos diferentes por recombinación homóloga. Por lo tanto, los bacteriófagos pueden ser considerados como mosaicos modulares, siendo cada virus una combinación favorable de módulos, uno para cada función, que le permite al fago adaptarse de manera óptima a un nicho concreto.



La historia de las islas de patogenicidad

La historia de las islas de patogenicidad, comienza en el importante brote del **síndrome del shock tóxico** ocurrido a principios de la década de los 80, relacionado con el uso de tampones. El síndrome se atribuyó a una nueva **toxina** de *Staphylococcus aureus* (TSST-1). El estudió de esta toxina cobró importancia debido a que fue la causa de muerte en mujeres jóvenes sanas y porque fue uno de los primeros superantígenos bacterianos conocidos.

Las investigaciones demostraron, que el gen que codificaba para TSST-1 se encontraba en una región de 15 kb que no se observaba en las cepas que no contenían esta toxina, lo que sugería, que correspondía con un elemento genético insertado, el cual fue bautizado como **SaPI** (***S. aureus* pathogenicity island**).







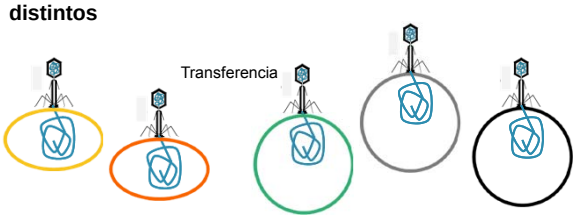


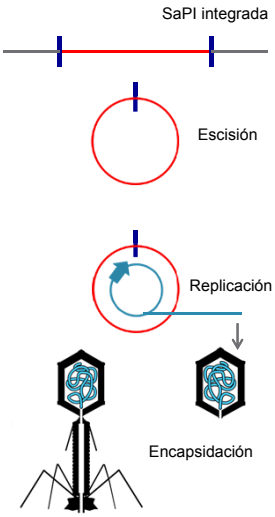


Las PICIs (*Phage-inducible chromosomal islands*)

Las SaPIs son el modelo de una gran familia de elementos genéticos móviles (EGM) denominada PICIs que tienen una serie características en común:

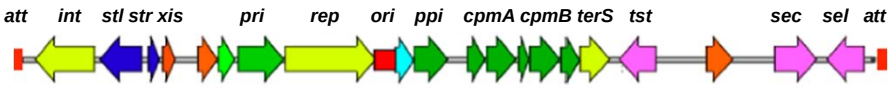
- **Organización genética muy conservada**
- **Genes accesorios específicos de PICIs**
- **Ciclo de vida común de escisión, replicación y encapsidación.**
- **Interferencia con los fagos**
- **Trasferencia entre especies y géneros bacterianos distintos**





Organización genética muy conservada de las SaPIs

Están flanqueadas por repeticiones directas. Cada SaPI se inserta en un sitio específico de integración (*attC*), gracias a su **integrasa** (*int*). Poseen dos genes con orientación divergente encargados de la regulación *stl* y *str*. Stl es el **represor** de la isla y permite que la isla permanezca insertada en el cromosoma de manera latente. A continuación se encuentra la **escisionasa** *xis*, encargada de que la isla puede escindir del genoma. Posteriormente está la **primasa** (*pri*), el iniciador de la replicación (*rep*) y el origen de replicación, cuya función es la replicación autónoma de la isla. Seguidamente vienen las genes relacionados con la encapsidación de las SaPIs, *ter*S, *cpm*A y *cpm*B. También poseen genes que codifican para proteínas de interferencia con el fago *ppi*, así como genes accesorios, entre los que encontramos importantes **factores de virulencia.**

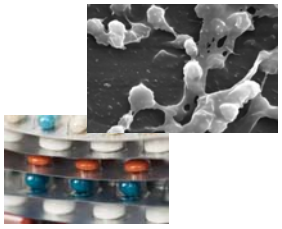


Genes accesorios específicos de las SaPIs

Los genes accesorios están localizados a ambos extremos de las PICIs. Algunos de ellos no tienen función asignada, pero también encontramos numerosos factores de virulencia como:

- Superantígenos o **toxinas** bacterianas (*tst, sec, sel sak*…)
- Genes relacionados con la capacidad de formar **biofilm** (*bap*), lo que permite a las bacterias adherirse a las superficies, agregarse y ser más resistentes tanto a los antibióticos como a sistema inmune del hospedador.
- Genes relacionados con la **resistencia a los antibióticos** como el ácido fusídico (fusB).
- Genes relacionados con la **adaptación al hospedador**.







Ciclo de vida común de las SaPIs:

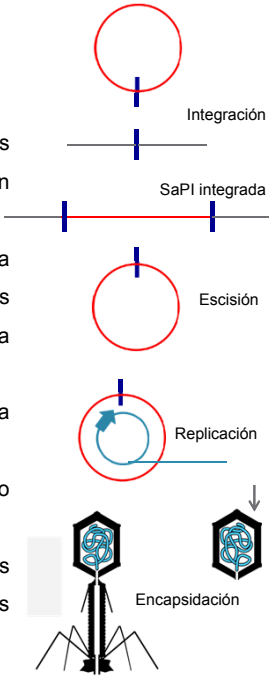
Integración. Las SaPIs se pueden clasificar en función de sus integrasas, principalmente en seis familias, las cuales se integran específicamente en un sitio distinto del cromosoma (*att*C).

Inducción. Las SaPIs permanecen latentes en el cromosoma hasta que son inducidas por proteínas específicas del fago, estas proteínas se unen al represor de la isla, activando así el ciclo de la isla de escisión, replicación y encapsidación.

Escisión. Las SaPIs escinden del cromosoma gracias a la escisionasa, formando un intermediario circular**.**

Replicación. Las SaPIs replican de manera autónoma, generando múltiples copias de la misma.

Encapsidación. Las SaPIs se empaquetan utilizando las proteínas de la cápside de los fagos, muchas de ellas poseen proteínas específicas para adaptar la cápside a su tamaño más pequeño.



Interferencia con los fagos de las SaPIs:

- Las SaPIs son unos "**parásitos de los fagos"**, ya que los utilizan para su **inducción y empaquetamiento**.
- No contentas con eso, las SaPIs contienen proteínas que producen **interferencia con el fago**. Los fagos para encapsidarse, necesitan de una terminasa pequeña y una grande, las SaPIs, codifican para una terminasa pequeña, específica de ellas, que sustituye a la del fago.
- Además poseen una proteína denominada Ppi (***phage packaging interference***) que se une a la terminasa pequeña del fago, impidiendo su función.
- Muchas SaPIs codifican para proteínas que hacen las **capsides del fago más pequeñas**, de manera que solo caben ellas.
- También poseen proteínas denominadas PtiA (***phage transcription interference***) que interfieren con la transcripción del módulo de empaquetamiento y lisis del fago.

Título de fago en una cepa sin SaPI
1 x 10^{10} ufc/ml

La presencia de SaPI inducida disminuye el titulo de fago unas 100 veces

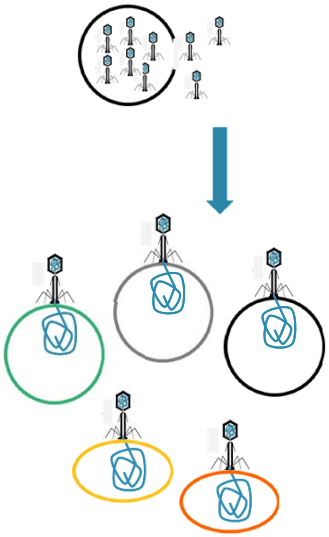
Título de fago en una cepa con SaPI inducida
1 x 10^{8} ufc/ml

Trasferencia de las SaPIs:

Las SaPIs se pueden transducir a **diferentes especies** de *Staphylococcus* spp como, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes, Staphylococcus xylosus e intermedius.* Además también se ha demostrado la transducción a **otros géneros**, como a *Listeria monocytogenes*.

Las islas una vez inducidas y empaquetadas son capaces de transducirse con una extraordinaria eficacia llegando a generar 1 x 10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por ml).

os genes relacionados con virulencia que poseen serán diseminados a numerosas bacterias de manera horizontal, lo que permitirá a estas nuevas bacterias adaptarse mejor al medio y persistir en el hospedador.



Referencias bibliográficas y enlaces

Bacteriófagos:

- Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. Nat Rev Microbiol. 2015 Dec;13(12):777-86.
- Día G, Wolf C. Phages of Staphylococcus aureus and their impact on host evolution. Infecta Gente Evo. 2014 Jan;21:593-601.

SaPIs:

- Tormo-Más MA, Mir I, Christa A, Tallen SM, Campoy S, Lasa I, Barbé J, Nick RP, Christie GE, Penadés JR. Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299):779-82.
- Tormo-Más MÁ, Dunderas J, García-Caballero M, Alta A, Mir-Sanchas I, Marina A, Penadés JR.Phage dUTPases control transfer of virulence genes by a proto-oncogenic G protein-like mechanism. *Mol Cell*. 2013 Mar 7;49(5):947-58.
- Penadés JR, Christie GE. The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):181-201.
- Nick RP, Ram G. The Floating (Pathogenicity) Island: A Genomic Dessert. Trends Gente. 2016 Feb;32(2):114-26.
- Martínez-Rubio R, Quiles-Puchalt N, Martí M, Humphrey S, Ram G, Smyth D, Chen J, Nick RP, Penadés JR. Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. *ISME J*. 2017 Apr;11(4):1029-1042.