



114
2ej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

"PRESENCIA DE CITOSINA METILADA EN LAS
SECUENCIAS CC(A/T)GG DEL DNA
DE EUBACTERIAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ALICIA LEVY MUSTRI



CD. UNIVERSITARIA, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODO.....	50
RESULTADOS.....	100
DISCUSION.....	113

CONCLUSION.....118

FIGURAS.....120

TABLAS.....133

BIBLIOGRAFIA.....145

RESUMEN

La metilación es un fenómeno biológico presente en la mayoría de los organismos; es un evento postreplicativo inmediato e involucra la transferencia enzimática del grupo metilo de la S-adenosilmetionina a bases nitrogenadas de secuencias específicas de nucleótidos. La metilación en procariontes está presente en algunas adeninas y/o citosinas, mientras que en la mayoría de las células eucarióticas solo se detecta en citosinas.

En las bacterias, se conocen algunas funciones biológicas del patrón de metilación en la adenina de GATC (patrón Dam) mientras que se sabe muy poco de la función biológica de las citosinas metiladas.

En la bacteria Escherichia coli, el gen dcm codifica para la metilasa (Dcm) que metila la segunda citosina de la secuencia CC(A/T)GG. La endonucleasa de restricción EcoRII corta a esta secuencia si no está metilada.

Debido a la incertidumbre acerca de la función de este patrón de metilación, nos hemos abocado a realizar un estudio comenzando con la distribución de esta metilasa dentro del grupo de las subbacterias. Para poder comprender mejor las posibles funciones biológicas de este patrón de metilación,

se correlacionó la presencia o ausencia del patrón Dcm en diferentes generos bacterianos, con la posición de estos generos en un arbol filogenético de eubacterias. La elección del arbol filogenético se realizo mediante un seguimiento de la clasificación bacteriana.

Se sabe que la búsqueda de la filogenia bacteriana fue inicialmente un fracaso. Los animales y plantas presentan muchos detalles morfológicos que han permitido clasificarlos, mientras que la morfología de las bacterias es muy sencilla. Las características bioquímicas y fisiológicas de las bacterias han sido utiles para clasificarlas; sin embargo, existen especies emparentadas difíciles de clasificar en base a estas características.

Actualmente, la determinación y comparación de las secuencias de bases de un gran número de genes de diferentes bacterias ha permitido un avance importante en las clasificaciones filogenéticas de estos organismos.

Woese (1980) utilizó el rRNA 16S (1600 nucleotidos) para proponer un arbol genealogico de bacterias. Debido a las características de esta molécula se ha visto que es un buen cronómetro evolutivo: esta universalmente distribuida, presenta la misma función en todas las células, los cambios en su secuencia han sido muy lentos debido a su importante

función, etc.

El árbol filogenético que se seleccionó fue el propuesto por Woese y recientemente modificado por Ochman y Wilson. A este árbol fue necesario adicionarle dos géneros de bacterias. Para ello, tomamos como base un trabajo de hibridación DNA-DNA de diferentes bacterias.

Para poder determinar la presencia del patrón de metilación tipo Dcm en diferentes bacterias, se purificó el DNA por el método descrito por Maniatis en 1982, con ciertas modificaciones; se digirió con la enzima EcoRII para determinar la presencia o no de citosina metilada en CC(A/T)GG y se realizó una correlación entre la presencia del patrón Dcm y el árbol filogenético de eubacterias elegido.

Los resultados nos muestran que el patrón de metilación Dcm se encuentra distribuido en la familia Enterobacteriaceae y sólo esta presente en los géneros estrechamente relacionados con Escherichia, Shigella, Citrobacter, Salmonella y Klebsiella. Estos experimentos sugieren que el patrón de metilación tipo Dcm se adquirió recientemente; además, es probable que haya surgido en una bacteria ancestro común cercano a Escherichia y Klebsiella. La presencia de la metilación Dcm en cepas clínicas de E. coli, al igual que en E. blattae y en E. freusonii sugieren que E. coliB que

naturalmente es Dcm-, podría tener el gene dcm mutado.

Se ha sugerido que la posible función de la metilación Dcm es la de proteger el DNA de las bacterias de la digestión por la enzima EcoRII que se encuentra codificada por algunos plásmidos tipo N. Sin embargo, esos plásmidos han sido detectados en algunas cepas de Proteus. Así, para probar si realmente la metilación Dcm ejerce una función de protección, es importante determinar esta metilación en otras cepas de Proteus; también sería necesario transferir por conjugación estos plásmidos a bacterias Dcm+ y Dcm- y poder así determinar la actividad endonucleasa/metilasa del sistema EcoRII. Otro experimento interesante que ayudaría a comprender un poco más sobre este patrón de metilación sería hibridar el DNA del gene dcm con el DNA de las eubacterias, con lo cual podríamos ver si el gene está mutado o en realidad no está presente en las bacterias Dcm- y que tanta similitud tienen los genes dcm de las bacterias Dcm+.

I N T R O D U C C I O N

El objetivo de este trabajo fue el determinar la presencia del patron de metilacion tipo Dcm. en el cual se metila la citosina interna de la secuencia CC(A/T)GG. en diferentes bacterias: con esto ver si es un patron comun en las eubacterias y si la informacion genetica que lo determina originalmente estaba localizada en plasmidos.

Para cubrir este objetivo fue necesario elegir un arbol filogenetico de bacterias que permitiera, ya determinada la distribucion del patron de metilacion en diferentes bacterias, correlacionar esta distribucion con la filocenia de las bacterias analizadas.

En la primera parte de la introduccion se presenta un recuento de la historia de las clasificaciones de los seres vivos en general y de las bacterias en particular, donde se confrontan las metodologias implicadas en la conformacion de las clasificaciones bacterianas, para seleccionar asi la mas adecuada para nuestros objetivos. En la segunda parte se presenta un resumen de lo que hasta ahora se conoce sobre la metilacion del DNA en las bacterias.

HISTORIA DE LAS CLASIFICACIONES DE LOS SERES VIVOS

Desde hace tiempo se ha pretendido idear un sistema de clasificación que abarque la totalidad de los organismos, no solo los actuales, sino también los fósiles.

A pesar de esa continua y tesonera labor, aun no se ha logrado un sistema que clasifique de manera satisfactoria a todos los organismos.

Este afán, ya con cierta forma, se remonta históricamente a la época de Aristóteles y sus discípulos. Así, Teofrasto, considerado el padre de la botánica, clasificaba a las plantas de acuerdo con su morfología y domesticidad, usando caracteres seleccionados a-priori y dando un fin utilitario a su sistema.

En la elaboración de un sistema impera una finalidad y se parte de categorías que se definen por los caracteres de los seres que abarcan, cuyo criterio de valoración y selección ha cambiado en el curso de la historia.

Desde Teofrasto hasta Linneo se trata, en general, de "sistemas artificiales", o sea, basados en atributos seleccionados arbitrariamente, que sirven para diferenciar los seres de los grupos establecidos.

Esta etapa histórica culmina con Linneo. En lo que se refiere a las categorías, a partir de este famoso naturalista escandinavo, la fundamental o punto de arranque es la "especie", y como tal, ésta adquiere una dimensión universal.

Linneo y sus contemporáneos consideraron a la especie inmutable y creada por Dios. Aunque no negaban la variabilidad de los individuos, y por ende, de sus caracteres, la misma se atribuyó a diferencias inducidas por el ambiente.

Algunos de los méritos de Linneo fueron: el reconocimiento de la especie como unidad base, la nomenclatura binomial, el establecimiento de una escala jerárquica de categorías, y la introducción de una terminología científica uniforme.

Linneo siempre reconoció el grado de arbitrariedad de su sistema y nunca pretendió que fuera perfecto. El momento así lo exigía; la exploración y ecopio de material en riquísimas regiones extraeuropeas necesitaban una rápida clasificación y

la ordenación de lo descubierto según un sistema sencillo, sin mayor ambición

Más adelante, aunque el concepto de especie se mantuvo sin variantes, muchos biólogos llegaron a la conclusión que a partir de un solo carácter o de pocos para clasificar a los organismos, no se podía lograr un sistema que reflejara su "afinidad". El empleo de un mayor número de elementos de juicio y el no incurrir en una selección arbitraria de los mismos, fueron las bases de los denominados "sistemas naturales".

Una de las preguntas planteadas era: si las especies fueron creadas y existieron siempre como tales, ¿de qué manera se explica entonces la idea de relación o afinidad natural?. Esta sólo podría ser interpretada como una cualidad sobre-natural, inherente a la especie desde el momento de su origen.

El uso de todos los caracteres posibles de los seres vivos en su clasificación planteó a su vez el problema de su jerarquización. ¿Son todos iguales, o algunos son más importantes que otros?. Y así surge la posición, conocida como "doctrina adansoniana". De acuerdo con su autor, Michael Adanson, botánico del siglo XVIII, en su sistema clasificó con todos los caracteres empleados con el mismo peso y valor. Adanson se adelantó a su época, ya que su

método de clasificación pretendía eliminar la apreciación subjetiva.

Es decir, antes del advenimiento de la teoría de la evolución, los sistemas se elaboraron partiendo de la premisa de que su unidad, la especie, era un ente inmutable creado por Dios. Al final de este periodo se comienza a abordar la selección arbitraria de los caracteres y se busca ya la "afinidad natural", entre especies, géneros, familias, etc.

TAXONOMÍA Y EVOLUCIÓN

Sin duda alguna, el factor que cambia radicalmente los fines, métodos y naturaleza de los sistemas de clasificación es la teoría de la evolución.

Esta teoría propone que los animales y plantas pueden cambiar en el proceso de su reproducción y dar origen a otros con ciertos caracteres distintos. Hay una materia prima dinámica que hace factible la variación y sobre ella actúan complejos factores de calificación, fijación y mantenimiento de las nuevas formas que se logran.

La especie no es una entidad inmutable ni tampoco puede estar tipificada por un ejemplar, sino por "poblaciones"; es decir, un conjunto de individuos que ocupan una extensión

definida (en tiempo y espacio), bajo determinadas condiciones ambientales y que, por cruzamiento (siempre que se traten de poblaciones con reproducción sexual), intercambian su material genético. Como se puede apreciar, son complejos dinámicos, no estáticos ni fortuitos, como si se tratase de un espécimen de planta o animal conservado en una colección.

La idea de la evolución ya se insinúa en la época precedente o creacionista. El mismo Linneo, en 1761, un siglo antes de Darwin, anticipa una teoría evolucionista, según la cual en la creación de la especie intervienen la Divinidad y la Naturaleza. Hasta llega a admitir que ciertas especies pueden haberse originado por cruzamiento.

Para pensadores como San Agustín y otros filósofos naturalistas, la evolución era el cumplimiento de planes preestablecidos por la Divinidad. Aun paleontólogos de la talla de Cuvier, que tenían a su alcance el testimonio de una sucesión histórica de fauna, se mantenían aferrados al Creacionismo e inmutabilidad de los seres vivos.

La aceptación general de la evolución ha llegado a sobesar y juzgar los caracteres que definen los peldaños de la Taxonomía, a partir de otros patrones. Este proceso implica la adquisición de nuevos atributos en un grupo, que se denomina "avanzado o especial", en oposición a los

" primitivos o generales ", presentes en sus ancestros (antecesores). Se introduce un vector más, el tiempo, y se distinguen "niveles de especialización" alcanzados por una característica, estructura u organismo.

Al margen de estos hechos, se plantea el interrogante de como acontece el fascinante proceso de la evolución, es decir, cuales son sus causas y como actúa. La taxonomía pasa de su etapa estática a una dinámica.

Hemos pasado a vuelo de pájaro desde Teofrasto hasta los principios del siglo XX, desde los sistemas artificiales hasta los filogenéticos, desde los utilitarios y arbitrarios hasta los más recientes, donde la finalidad esencial es precisar las relaciones de parentesco de los grupos y los hechos que expliquen la evolución del mundo viviente.

Como ya se mencionó, Linneo había basado su clasificación en las estructuras visibles de los organismos. Posteriormente aparecen en escena los organismos extintos. En el siglo XIX se sabe que los descubrimientos paleontológicos y la publicación de la Teoría Evolutiva de Darwin animó a los sistemáticos a pensar que las clasificaciones podrían reflejar la historia de la vida. Las clasificaciones se convirtieron en filogenia, árboles genealógicos de especies o de Taxones mayores.

En resumen, se pueden distinguir tres tipos de clasificaciones, que corresponden a otras tantas épocas en el desarrollo histórico de la Taxonomía y la sistemática: artificial, natural y filogenética. En 1963, Alston y Turner, proponen la siguiente división de los periodos de la historia de la taxonomía:

a) Megamorficos (desde 400 años a.C hasta 1700).- la clasificaciones se hacen a base de caracteres de la morfología externa.

b) Micromorfico (desde 1700 hasta 1860).- el estudio de los seres vivos y su clasificación se profundiza gracias a la invención del microscopio.

c) Evolucionista (desde 1860 hasta la fecha).- los sistemas se fundan en relaciones de parentesco y se abandona el fijismo y creacionismo de la especie.

d) Citogenético (desde 1900 a la fecha).- A partir del redescubrimiento de las leyes de la herencia, la taxonomía comienza a transformarse en una disciplina experimental, y se presta especial atención a las causas genéticas de la evolución.

e) Etiológico (desde 1950 a la fecha).- El parentesco de los organismos se establece de acuerdo con patrones

bioquímicos.

Es decir, en la actualidad la Taxonomía está atravesando dos periodos simultáneos: el citogenético y el bioquímico.

En el siglo XX, los avances en Embriología y en Bioquímica han proporcionado nuevos instrumentos a la Taxonomía. Últimamente se han perfeccionado en gran manera las técnicas de microscopía óptica y electrónica, lo que permite estudiar la estructura interna de las formas más pequeñas de vida y de las células constituyentes de las formas de mayor tamaño. (16, 43)

Hasta 1903, año en que Alston y Turner proponen esta división, las clasificaciones de los microorganismos no implicaban relaciones filogenéticas. A diferencia de los animales y plantas, en los cuales, los detalles morfológicos sirvieron de base para su clasificación taxonómica, la morfología de las bacterias es tan sencilla que no sirve para clasificarlas. Lo anterior aunado a la escasez de fosilización bacteriana hicieron que la búsqueda de la filogenia bacteriana fuera inicialmente un fracaso. (16, 43)

CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS

La ciencia encargada del estudio de los microorganismos es la denominada "Microbiología".

La Microbiología moderna se ha convertido en una extensa disciplina, que se divide en bacteriología, Virología, Micología, y Protozoología. (55)

Se puede decir que la Microbiología se ha desarrollado en 4 periodos: (1) periodo anterior a 1855, durante el cual se tenía pocos datos acerca de las bacterias y otros microbios, y mucha especulación, mas o menos correcta, acerca de los mismos, (2) periodo entre 1855 y 1882, cuando se asentaron con seguridad las bases de una ciencia nueva; (3) periodo de 1882 a 1940, aproximadamente, durante el cual hubo una producción rapida de nueva información acerca de los microbios, especialmente de los organismos patógenos, y finalmente, (4) el periodo de 1940 a la fecha, en la que la Microbiología llega a una completa madurez como disciplina básica de la Biología moderna.

Los microorganismos son los representantes mas antiguos de los seres vivientes sobre la tierra. Su aparición data de hace 4 mil millones de años. Después de formarse la tierra, el agua oceánica lleno las hondonadas entre las montañas y las depresiones en las rocas. La atmósfera incluía vapor de agua, metano, amoníaco e hidrogeno, pero carecía de oxígeno o bixido de carbono. Los fósiles mas

antiguos encontrados hasta ahora son unos filamentos formados por unas estructuras parecidas a bacterias, descubiertos en las rocas de los campos auríferos de Filbera, cerca de North Pole (Australia Occidental), y tienen unos 3500 millones de años. En el sistema rocoso de Swaziland, al sur de Africa, se han encontrado unas formas parecidas a bacterias esteroides en rocas de la misma edad. (13)

Los fósiles más abundantes anteriores al Fanerozoico son unas formaciones rocosas llamadas estromatolitos. Un estromatolito típico es una columna o cúpula de roca de algunos centímetros de anchura formada por varias capas horizontales que parecen ser los restos de un sedimento precipitado y consolidado por comunidades de microorganismos (bacterias y cianobacterias). Comunidades como estas existen hoy en día, pero se hallan restringidas a ambientes muy aislados y de condiciones extremas como, por ejemplo, las salinas. En el Arqueozoico y proterozoico eran las formas dominantes de vida. Así pues, durante 2500 millones de años como mínimo, el planeta fue territorio indiscutible del grupo de las bacterias. Las comunidades de los estromatolitos sólo empezaron a declinar con el desarrollo de los protistas y de los animales, quienes debieron pastar vorazmente en las apetitosas praderas bacterianas.

Los microorganismos, en su mayor parte, no se distinguen a simple vista y pueden ser acelulares (virus), organismos

unicelulares (bacterias, actinomicetos, espiroquetas y protozoos) y multicelulares (algas, verde-azules, algunos hongos etc.) (55)

La existencia de este mundo microbiano se desconocía hasta la invención de los microscopios. Los microscopios, inventados al comienzo del siglo XVII, abrieron el dominio biológico de lo muy pequeño a las observaciones científicas sistemáticas.

Descubrimiento de los microorganismos

Antony van Leewenhoek (1632 - 1723), el hombre que descubrió el mundo microbiano, llamó "animalículos" a los microorganismos que encontraba en grandes cantidades por doquier. Mas de un siglo después aun se pensaba que estos pequeños organismos surgían espontáneamente de la materia inanimada. Louis Pasteur (1824-1895) y John Tyndall (1820-1893) demostraron, de forma concluyente, que los organismos microscópicos solo eran producidos por otros organismos microscópicos, al igual que ocurre con los organismos macroscópicos. (43)

Dificultades taxonomicas para clasificar a los microorganismos

Desde los tiempos de Aristoteles, a Galileo, pasando por la Edad Media, la invencion de Saunin del sistema binomial, las floras y faunas de Linneo, Ray, Buffon y Reaumur, hasta llegar a los tiempos modernos, los biologos han descrito y nombrado muchos cientos de miles de especies de organismos vivos del planeta, con intencion de presentar algun orden de esta diversidad.

Las primeras clasificaciones, basadas mas en semejanzas superficiales que en relaciones evolutivas fueron como ya se menciona, artificiales. El objetivo actual es realizar una clasificacion natural que refleje las relaciones verdaderas, tanto como podamos indagarlas a partir de características bioquimica, citologicas, morfologicas, embriologicas y etologicas.

Los primeros reinos incorporados dentro de las clasificaciones formales de Linneo (1735) y de otros, fueron aquellos dos grupos de organismos que a los primeros naturalistas les parecieron obviamente distintos: Las plantas y los animales.

Sin embargo, desde mediados del siglo XIX, muchos sistematicos observaron que ciertos organismos, como las

bacterias y los hongos diferían de las plantas y los animales más de lo que diferían entre sí las plantas y los animales.

Por tanto, debido a que ciertos organismos no se pueden clasificar en el reino vegetal, o el animal, se han establecido nuevos reinos para clasificarlos.

Una de las primeras proposiciones la hizo, en 1828, el zoólogo alemán E.H.Haeckel, quien sugirió un tercer reino que comprendiera los microorganismos unicelulares que no son típicamente vegetales, ni animales y los catalogó en el reino de los Protistas (Fig 1.).

A medida que se profundiza en el conocimiento de la ultraestructura celular, los microorganismos a su vez se dividen en 2 categorías, los procariontes y los eucariontes. Esta división se basa en diferencias de los detalles de la organización de la estructura celular (Tabla 1.).

La opinión científica empezó a cambiar en los años sesentas principalmente a causa del conocimiento adquirido con las nuevas técnicas bioquímicas y microscópicas. Estas técnicas revelaron afinidades fundamentales y diferencias a nivel subcelular que originaron gran cantidad de nuevas propuestas de un sistema de "Múltiples Reinos" (uno de ellos incluía trece reinos). Entre ellos, el Sistema de los Cinco Reinos propuesto por R. H. Whittaker en 1967 se

ha distinguido por haber alcanzado amplio crédito durante las últimas décadas.

Brevemente los Cinco Reinos son:

- Monera.
- Protista,
- Fungi,
- Animales, y
- Plantas.

El sistema de los 5 reinos se basa en 3 niveles de organización celular, así como en los tipos de organización en relación con los tres modos principales de nutrición: fotosíntesis, absorción e ingestión. Los procariontes pertenecen al reino Monera, porque carecen del modo ingestivo de nutrición; los microorganismos eucariontes unicelulares se clasifican dentro del reino Protista; Plantae para los eucariontes multicelulares fotosintéticos, productores; Fungi para los eucariontes multicelulares reductores, Animalia para los eucariontes multicelulares consumidores. (43).

Ventajas y Desventajas

La separación de los organismos vivos en Plantas y Animales, no permite reconocer la discontinuidad evolutiva entre Procariontes y Eucariontes. Adicionalmente, los hongos y otros organismos unicelulares, no encuadran en dicho esquema de clasificación; sin embargo, el sistema de los

Cinco Reinos es ampliamente aceptado por considerar las relaciones evolutivas y es compatible con estudios bioquímicos, genéticos y de ultraestructura que hacen suponer que la endosimbiosis herecitaria lleva a la célula eucariotica tal como la conocemos, a partir de una variedad de procariontes que derivan de un ancestro procariontico comun.

CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS

A pesar de su pequeño tamaño, las bacterias tienen un papel clave en aspectos tan fundamentales como la salud, la agricultura, los bosques, y la misma existencia del aire que respiramos. Con la industria alimentaria moderna se dio un gran empuje al conocimiento de la naturaleza de las bacterias (envasado, conservación, deshidratacion y pasteurizacion). Las bacterias cubren la piel, los conductos nasales y bucales, viven en las encias y entre los dientes y se aglomeran en el tubo digestivo, especialmente en el colon.

En la bibliografia bacteriana se reconocen mas de 5000 descripciones de especies y queda una cantidad mayor por identificar.

Las bacterias pueden efectuar un gran número de transformaciones químicas diferentes y son metabólicamente mucho más diversas que los eucariontes.

Las bacterias tienen una historia antigua. Fueron probablemente, los primeros organismos vivos y, a pesar de su tamaño, han dominado la vida en la tierra a través de los tiempos. La más antigua evidencia fósil de bacterias se remonta a cerca de 3400 millones de años, mientras que la evidencia más antigua de los animales es de hace unos 700 millones de años, y de las plantas y hongos, de hace 470 millones de años. La prueba más antigua de los protoctistas es más insegura pero probablemente, no sobrepasan los 1000 millones de años.

Las bacterias como grupo son los seres vivos más resistentes. Pueden sobrevivir a temperaturas bellísimas o incluso superar la congelación total.

Por su gran ubicuidad, no hay comunidades de organismos vivos en todo el globo que carezcan de bacterias pero, por otro lado, pocos son los lugares donde estas sean dominantes. (8)

Principales criterios de clasificación bacteriana

Un punto importante a discutir es si las bacterias tienen o no una filogenia, es decir, una historia única. Esta duda surge desde el momento en que este bien documentada la transferencia horizontal de información genética entre las bacterias, ya sea mediada por plasmidos, fagos o transformación genética. Alguna función pudo haber evolucionado en un organismo en particular y luego ser transferida horizontalmente a otro organismo distinto. El análisis de estas secuencias daría árboles filogenéticos distorsionados ya que reflejaría la historia de la secuencia en particular y no la del conjunto del genoma de individuos. Esto podría llegar al grado de que el intercambio de genes entre especies fuera tan grande que las bacterias no tuvieran una historia propia sino que fueran, en palabras de Woese, "una quimera evolutiva, una colección de genes, cada uno con su historia" (Woese, 1987).

La integración estece de genes de una especie en el genoma de otra es raro en la naturaleza. Si fuese frecuente, el genoma de cada especie sería un mosaico constituido, sobre todo, por características transferidas horizontalmente entre diversas especies. En este caso un árbol basado en un gen particular discreparía probablemente de otro árbol de un gen distinto. En la práctica sin embargo, los árboles construidos con genes diferentes generalmente coinciden entre sí.

Comparando las filogenias del grupo de las bacterias púrpura obtenidas con secuencias de rRNA 16S y de citocromo C, se encontro que las filogenias obtenidas con cada secuencia no eran marcadamente diferentes entre si, lo cual indica que estas secuencias al menos, no han estado involucradas en eventos de transferencia horizontal. Por tanto, se puede proponer con cierta seguridad que las bacterias tienen en principio una historia genetica propia, y que esta registrada por algunos de los cronometros evolutivos de la célula.

Tanto en el mundo microbiano como en el de los eucariotes superiores el modo de evolucion predominante ha sido vertical: de padres a hijos.

Otro punto por discutir es si la taxonomia de las bacterias es comparable a la de los metazoarios en el sentido de que si los arboles filogeneticos pueden dividirse en taxa naturalmente y que los grupos encontrados se coloquen a su vez en estructuras jerarquicas sencillas. Por el momento no parece ser siempre este el caso ya que pocos son los conjuntos de bacterias que pueden ser agrupados por propiedades fenotipicas particulares comunes a todos los miembros. Por ejemplo, aunque las bacterias gram-positivas, definidas por la estructura de su pared celular, forman un clado, este tambien incluye bacterias

que no tienen pared celular gram-positivas. Una explicación a estas aparentes inconsistencias es que aun no se han buscado las características fenotípicas que realmente son comunes a las bacterias pertenecientes a un mismo grupo filogenético.

Los análisis moleculares han permitido ver la extensión del árbol filogenético de todos los seres vivos. No se conoce cual es el punto en la estructura que corresponde realmente al ancestro universal, aunque debe encontrarse entre el dominio Bacteria y los otros. Este árbol presenta una separación bastante clara de los dominios primarios. Todos los miembros de un dominio se parecen más entre sí que a cualquier miembro de otro dominio (árbol propuesto por Woese, se discute más adelante). (63)

La mayoría de las clasificaciones son de orden médico, pocas tienen relación con filogenia bacteriana.

A. Primeros criterios de clasificación:

1) Morfológica. El primer intento notable para clasificar las bacterias fue el de Ehrenberg, en 1838. Ehrenberg distinguió entre bacterias esféricas, en forma de bastoncitos y de espiral, y fue el primero en utilizar los términos Bacterium, Spirillum y Spirocheta, en relación con las bacterias. (Fig.2.).

ii) Tinción diferencial de las bacterias. El método más utilizado es el de la tinción Gram. Un test universalmente aplicado es el desarrollado por el médico danés Hans Christian Gram (1853-1935) que diferencia dos clases de bacterias mediante el empleo de las soluciones fenólica de violeta de genciana y una solución de yodo (1000-100000) destiñendo con alcohol etílico de 75 grados.

FUNDAMENTOS DE LA COLORACION DE GRAM

1.- El colorante inicial tiñe prácticamente todas las bacterias.

2.- El yodo es un mordiente que fija el colorante en los organismos gram positivos.

3.- Las bacterias que se decoloran por acción del alcohol al 95% son gram negativas.

4.- Las bacterias gram negativas toman la coloración de contraste en tanto que las bacterias gram positivas retienen el violeta.

Esto se basa en las diferencias en la estructura molecular de la envoltura celular. Presentando las gram negativas 2 membranas, a diferencia de las gram positivas que solo presenta una. Es posible que las gram negativas sean las

precursores de las mitocondrias y cloroplastos de organismos superiores.

Esta clasificación es muy útil ya que se correlaciona con otras propiedades de los organismos:

-Hay diferencias dentro de la permeabilidad de las células bacterianas para los aminoácidos, ácido glutámico y lisina en particular, que guardan relación con la reacción de Gram. Las bacterias gram positivas se distinguen por su capacidad de concentrar tales aminoácidos existentes en el medio ambiente, mientras que en las bacterias gram negativas, estos aminoácidos se sintetizan intracelularmente.

-La presencia del complejo de ribonucleo de magnesio, proteína de las bacterias gram positivas, este ausente en las gram negativas.

-La pared celular de las gram positivas es químicamente más compleja que la pared celular de las gram negativas. La pared celular de las gram positivas contiene más aminoácidos que las gram negativas. Los ácidos teicoicos son propios de la pared celular de las gram positivas. El contenido lipídico es considerablemente mayor en las gram negativas. Uno de los constituyentes de la pared celular de las gram negativas, el lipopolisacárido, determina la antigenicidad, toxicidad y sensibilidad a la infección por fagos. Hay

diferencias entre la composición de la pared celular de especies diferentes. De hecho, se ha sugerido que una especie podría ser identificada por los constituyentes de su pared celular.

Las diferencias entre las bacterias gram positivas y negativas (Table. II.) son muchas, lo que sugiere que la reacción al colorante de Gram refleja diferencias fundamentales entre los 2 tipos de bacterias; aunque tales diferencias son reales para la mayoría de las bacterias, ha. excepciones. Por ejemplo el gonococo, aunque es Gram negativo, presenta algunas propiedades de Gram positivo. (10, 21, 51).

(ii) Bioquímica. Para realizar este tipo de clasificaciones se toman en cuenta diferentes propiedades o funciones bioquímicas:

-Respiración. En relación a la utilización o no de oxígeno, las bacterias se clasifican en:

- a) Aerobias,
- b) Anaerobias y
- c) Aerobias facultativas.

- Fuente de energía. En función con la fuente de

energía que requieren se pueden dividir en:

a) bacterias fototróficas.- la energía es provista por las reacciones fotoquímicas. Pueden tratarse de:

fotolitotróficas.-dador de hidrogeno mineral.

fotorganotróficas.-dador de hidrogeno organico.

b) bacterias quimiotróficas.-su energía es proporcionada por una reacción química. Son:

quimiolitotróficas.-oxidación de sustancias minerales.

quimioorganotróficas.-oxidación de sustancias organicas.

c) Autotróficas. aprovechan el ácido carbonico en calidad de fuente de carbono.

Algunas de estas tienen la propiedad de aprovechar el polietileno, ácido bórico, fenol y otras sustancias inorganicas.

d) Heterotróficas.- precisan el carbono organico para su nutrición. (Tabla.III.).

Las bacterias tambien se clasifican tomando en cuenta

otro tipo de estudios bioquímicos como son: fermentación de azúcares, reducción de nitratos o nitritos, producción de sulfuro de hidrógeno, etc. Existen además clasificaciones más complejas, que toman en cuenta tanto propiedades morfológicas, como fisiológicas y bioquímicas. (Fig.3.)

B. Criterios actuales de clasificación. Clasificación en base a estudios con macromoléculas.

A partir de la Segunda Guerra Mundial, comenzó a desarrollarse una nueva disciplina en Biología: la *Etología Molecular*.

La *Biología Molecular* nació cuando un grupo de investigadores comenzó a buscar un modelo biológico sencillo que les permitiera responder a la pregunta: ¿En qué molécula de la célula se localiza la información genética?. En 1944 los experimentos de Avery, MacLeod, y McCarty demostraron que el *DNA* del neumococo, una bacteria, tenía la información genética. La siguiente pregunta a responder fue: ¿Cuál es la estructura química del *DNA*?. Watson y Crick en 1953, la contestaron al presentar un modelo de la estructura química del *DNA*.

A partir de ese año los biólogos moleculares trabajan intensivamente en la formulación de preguntas claras, en el

planteamiento de hipótesis y en la búsqueda de metodologías y estrategias experimentales adecuadas para resolverlas. La Biología Molecular utiliza todos los métodos y herramientas necesarios: bioquímicos, físico-químicos, difracción de rayos X, microscopía electrónica, así como los desarrollados por ella misma.

La Biología Molecular en general pretende:

1. Explicar los mecanismos por los cuales cambia la información genética y se hace posible la evolución de los seres vivos.

2. Explicar los mecanismos de regulación de la expresión genética.

3. Decodificar toda la información escrita en el ADN.

4. Determinar la organización y dinámica molecular de los genomas.

Es claro, que estos estudios permiten profundizar en el conocimiento de los mecanismos que generan diversidad en los seres vivos en un primer nivel jerárquico de complejidad: el de los genomas; es decir, del ADN que contiene la información genética que define a un organismo dado. La variabilidad en

los genotipos se expresa a su vez en un nuevo nivel de mayor complejidad: el del Fenotipo. Por ser los cambios en las secuencias del ADN de los genomas (mutaciones) el primer nivel de generación de diversidad biológica, a partir del cual se construyen niveles jerárquicos cada vez mas complejos de diversidad en la biosfera, su conocimiento es esencial para la Biología Evolutiva.

La Biología Molecular ha permitido un gran avance en el conocimiento de la filogenia de los microorganismos, gracias principalmente a la biotecnología llamada Ingeniería Genética. Se conoce como Ingeniería Genética al diseño y construcción in vitro de moléculas de DNA formadas por la unión de diferentes fragmentos naturales o sintéticos de DNA capaces de replicarse y expresarse en una célula. Esto permite la obtención de grandes cantidades de DNA para su secuenciación o uso como sonda y de grandes cantidades de proteínas codificadas por ese DNA.

La obtención de la secuencia de bases de un gran número de genes, de muchos organismos diferentes, permite avanzar en el conocimiento de la información genética, así como comparar secuencias homólogas de organismos diferente y hacer inferencias filogenéticas. Sin embargo, los criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, siguen siendo importantes ya que una buena clasificación debe de integrar, sin contradicciones, el conocimiento aportado

por cada uno de estos estudios: es decir, debe existir la concordancia con otros criterios de clasificación. (25)

Las clasificaciones en base al estudio de macromoléculas se basan en el análisis de las proteínas, de los ácidos nucleicos (RNA y DNA).

1) Proteínas:

- Propiedades antigénicas de las proteínas. Se han realizado clasificaciones con ayuda de métodos de inmunología. La caracterización antigénica de proteínas supone la inyección de microorganismos, o moléculas aisladas de los mismos, en un animal con el fin de estudiar el suero sanguíneo de ese animal en busca de anticuerpos. Las reacciones antígeno-anticuerpo son muy específicas. Los microorganismos poseen clases muy diferentes de antígenos que por lo común se pueden detectar con gran precisión.

Los antígenos bacterianos pueden encontrarse en el flagelo (antígeno flagelar), en la envoltura celular (antígeno somático) o en la periferia (antígeno de superficie).

La divergencia evolutiva con respecto a secuencias de bases conduce a una divergencia respecto de la secuencia de

aminoácidos de la correspondiente proteína.

Una proteína es portadora de un número de determinantes antígenicos diferentes, cada uno de los cuales representa un aspecto específico de su arquitectura molecular. Un antisuero obtenido frente a una proteína pura contiene anticuerpos específicos para cada uno de dichos determinantes. Un antisuero se ensaya permitiendo su difusión deagar hacia un extracto crudo de la bacteria que contiene al antígeno; en la zona de interacción antígeno-anticuerpo se forma una banda fina y clara definida de precipitados. Se forma una sola línea de precipitado porque cada molécula de enzima es portadora de todos los determinantes antígenicos, y todos ellos difunden con la misma velocidad a través del gel.

Cuando el antígeno frente al cual se produjo el antisuero, el antígeno homólogo (H), se compara en un experimento de doble difusión con un antígeno heterólogo (h), (por ejemplo una misma proteína pero obtenida de otro organismo), pueden aparecer dos patrones de precipitación (asumiendo que H y h tienen algunos determinantes antígenicos comunes). Cuando ambas líneas de precipitación se funden por completo indican que todos los determinantes antígenicos de H están también en h. Cuando ambas líneas se funden parcialmente, presentando un espalon hacia el bozillo de h, ello indica que H y h comparten algunos determinantes antígenicos, pero H tiene uno o más que no están presentes en

h. (67)

La propiedad antigénica de las proteínas ha permitido realizar filogenia ya que nos habla de similitud a nivel de secuencias de aminoácidos.

-Zimodemos.- Se pueden determinar semejanzas entre especies mediante la comparación de la movilidad electroforética en geles de determinadas enzimas. El patrón de movilidad electroforética obtenido de las enzimas es conocido como zimodemo. Si la movilidad electroforética de la misma enzima, pero de organismos diferentes es distinta, esto nos habla de una diferencia a nivel de aminoácidos que a su vez nos informa de un cambio de bases a nivel de DNA.

El análisis de los zimodemos realizado con 5 o más enzimas, así como el tratamiento matemático de los resultados con diferentes programas de cómputo, permiten proponer relaciones filogenéticas entre los organismos estudiados.

-Secuenciación de aminoácidos. Este método es más complicado que el anterior y que obtener la secuencia de los aminoácidos de una proteína es complejo y necesita del empleo de una gran cantidad de tiempo. Para realizar un trabajo de óptima calidad es imprescindible llevar a cabo una comparación entre varias secuencias proteicas.

Tal vez la característica más notable del código genético es la de que sea un código degenerado; es decir que un aminoácido puede tener más de un codón específico.

En la mayoría de los casos en los que los aminoácidos presentan múltiples codones, la diferencia entre ellos reside en la tercera base, es decir, la que se encuentra en el extremo 3'. Por tanto las dos primeras letras de cada codón son las determinantes de su especificidad, por lo que en ocasiones un análisis de la secuencia de bases muestra un grado de similitud menor que el que se obtiene del análisis de la proteína codificada por esa secuencia.

Actualmente, el análisis comparativo de proteínas se enfoca también al análisis de la estructura secundaria.

ii) DNA

-Propiedades fisicoquímicas. Composición de bases nitrogenadas.- Aunque la composición de bases de DNA puede determinarse químicamente, previa hidrólisis de la muestra de DNA y separación de las bases libres (contenido en % de bases), su determinación por métodos físicos resulta más sencilla y esta es la forma principal de hacerlo. La temperatura a la cual se desnaturaliza el DNA por puentes de hidrógeno rotos que mantienen unidas las cadenas, está relacionada con el contenido en G-C, ya que los puentes de

hidrogeno entre los pares CG son mas fuertes que entre los pares AT. La separacion de cadenas va acompañada de un marcado incremento de la absorcion a 260nm, al maximo de absorcion del DNA, y esto puede medirse con facilidad en el espectrofotometro.

Cuando una muestra de DNA se calienta gradualmente, la absorcion a 260 nm se incrementa a medida que se van rompiendo los puentes de hidrogeno, alcanzandose un maximo a aquella temperatura a la cual todo el DNA pasa a ser unicatenario. El punto medio de esta curva, la temperatura a la cual el 50% de las secuencias del DNA se desnaturalizan se denomina T_m y es una medida del contenido de G+C. El porcentaje relativo de G+C de un DNA puede tambien calcularse a partir de su coeficiente de flotacion en gradientes de CsCl, y por la determinacion optica de la posicion de la banda de DNA en el gradiente, lo cual proporciona una medida precisa de su densidad. Este metodo puede usarse porque la densidad del DNA esta tambien en funcion del cociente $(G+C) / (A+T)$.

El analisis por metodos fisicos tambien aporta informacion sobre la heterogeneidad molecular de una determinada muestra de DNA. Si cada molecula de DNA tuviera el mismo contenido de G+C, tanto la transicion termica, como la posicion de la banda de DNA en un gradiente de CsCl apareceria bien definidas. La pendiente de las curvas en

la transición térmica y lo estrecho de la banda de DNA en el gradiente están, por lo tanto, directamente relacionados con el grado de homogeneidad.

¿Por que los distintos organismos difieren tan ampliamente en los promedios de composición de bases de su DNA? Esto no puede atribuirse razonablemente a diferencias de codificación, ya que existe gran cantidad de pruebas que indican que la clave genética es universal. Podría reflejar diferencias en la composición de aminoácidos que integran las proteínas celulares de los organismos, de forma que en unos existiera una preponderancia de aminoácidos codificados por tripletes ricos en C+G, mientras que en otros predominarían los que codifican los tripletes ricos en A+T. Ciertos números de datos sugieren que este factor sí que es importante. Noemias debido a que la clave genética es degenerada, podrían existir diferencias importantes en el contenido en C+G, incluso entre organismos con idéntica composición de aminoácidos, siempre que se diera una preferencia para la selección de ciertos tripletes. Así un organismo podría utilizar perfectamente tripletes ricos en G+C para codificar aminoácidos representados por más de un triplete, mientras que otros pueden preferir los tripletes ricos en A+T. Existe la posibilidad de que ambos factores hayan desempeñado un papel en la aparición de las diferencias que se dan en los seres vivos, en lo que respecta a su contenido medio en G+C.

Las diferencias sustanciales en la composición de bases del DNA de dos organismos son reflejo de un número alto de diferencias individuales en las respectivas secuencias de bases de sus DNAs. Ello es una evidencia clara de importantes divergencias genéticas y, por tanto, de una amplia separación evolutiva.

El margen tan amplio de valores característicos de los ΔT viene a indicar la enorme diversidad evolutiva de este grupo de seres vivos, sugiriendo, así mismo, su antigüedad en la escala de la evolución.

-Hibridación de DNA-DNA.- Cuando se enfría rápidamente una solución de DNA desnaturalizado térmicamente, las cadenas permanecen separadas. Pero si la solución se mantiene a una temperatura de 10-30 grados C. por debajo del valor de la temperatura en que se desnaturaliza (T_m), tiene lugar una reasociación específica de cadenas complementarias, formándose moléculas de doble cadena. Aunque siempre hay algo de apareamiento al azar, como las dobles cadenas estables siempre se forman entre regiones complementarias, su reasociación resulta favorecida.

Poco después de que se descubrieran estos fenómenos se

puso de manifiesto que al mezclar preparaciones de DNA procedentes de 2 cepas bacterianas relacionadas se formaban moléculas híbridas de DNA. Una de las cepas se cultivó en medio con D₂O (agua deuterada), para que formara un DNA "pesado" por incorporación de deuterio. Después de que las dos muestras de DNA s diferentes se mezclaron, desnaturalizaron y reasociaron, las moléculas híbridas se detectaron por centrifugación en un gradiente de CsCl en donde aparecieron en posición intermedia entre las dobles cadenas "ligeras" y "pesadas". La realización de experimentos similares con bacterias no relacionadas, no conducía a híbridos, ya que por reasociación solo se formaban moléculas bicatenarias mediante apareamiento de cadenas procedentes de la misma cepa.

Estos experimentos permiten evaluar el grado de homología genética entre las bacterias.

El método de los gradientes de densidad es complicado y solo detecta homologías con un grado elevado.

Otro método sería por la formación de heterodúplex* entre 2 muestras de DNA desnaturalizado una de las cuales se ha marcado con un isótopo radioactivo; separación de los heterodúplex de los ácidos nucleicos unicatenarios residuales; y determinación posterior de la radioactividad. Siempre se requiere de un control, que lo

suministra la reasociación de DNA marcado y no marcado, de una misma cepa de referencia. Se determina la reasociación entre estos 2 DNA homólogos, asignándole arbitrariamente el valor de 100. Se puede medir ya la reasociación entre el DNA de referencia y otros DNA heterólogos y expresarla como porcentaje del valor correspondiente a la reasociación del DNA homólogo.

Dependiendo de la técnica que se use se marca bien el DNA de referencia.

Otro método es el de separación de moléculas de DNA con Hidroxiapatita, un gel de fosfato de calcio que, en determinadas condiciones absorbe moléculas bicatenarias de DNA pero no las unicatenarias. Se realiza la reasociación entre DNA marcado y no marcado, en solución, después de lo cual se absorben en hidroxiapatita las moléculas bicatenarias, lavándose el gel para eliminar las unicatenarias.

*Un heteroduplex es el DNA de doble cadena, en el que una cadena pertenece a un organismo y la otra a otro organismo similar.

Las moléculas bicatenarias absorbidas son finalmente eluidas, bien por incremento de la fuerza iónica de la solución, o bien, por elevación de la temperatura, procediéndose a valorar la radioactividad eluida. Es necesario que el DNA no marcado este en exceso con respecto al radioactivo, para evitar la reasociación de moléculas unicatenarias complementarias.

En el método de la hidroxapatita el grado de homología de la secuencia de bases de los DNA híbridos puede valorarse mediante el estudio de la elución de estos a partir del gel en función de la temperatura, mediante un perfil de elución térmica. La T_m desciende aproximadamente 1 grado C. para cada 1% de bases despareadas en el híbrido.

En el caso en que la divergencia evolutiva ha provocado numerosas diferencias en las secuencias de bases de 2 genomas, la reasociación específica entre los DNAs se hace indetectables. (67)

-Patrones de restricción del DNA:

Los fragmentos de DNA obtenidos por la digestión de una enzima de restricción son separados conforme a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa, son desnaturalizados, transferidos a filtro de nitrocelulosa e inmovilizados.

La posición relativa de los fragmentos de DNA en el gel es preservado durante su transferencia al filtro. El DNA del filtro es entonces hibridizado con DNA marcado con P³² y la autoradiografía es usada en la localización de la posición de todas las bandas complementarias con la prueba de radioactividad.

Para ver relaciones filogenéticas se realiza una comparación entre las bandas de DNA de un organismo cortadas con enzima de restricción y las bandas de DNA de otro organismo cortado con la misma enzima.

-Reacción en cadena de polimerasa (PCR = Polymerase Chain Reaction).-Esta técnica se utiliza para amplificar un segmento de DNA del cual se conoce la secuencia.

Esto es muy útil en la clasificación ya que permite incrementar la cantidad de ácido nucleico que se va a secuenciar.

Dos oligonucleótidos son usados como blanco para una

serie de reacciones de síntesis que son catalizadas por una DNA polimerasa. Estos oligonucleótidos típicamente tienen diferente secuencia y son complementarios a las secuencias que están sobre las hebras opuestas al DNA template y el segmento lateral de DNA que se amplifica.

El DNA template es primero desnaturalizado por calentamiento en presencia de un exceso de cada oligonucleótido y el 4 dNTPs. La mezcla de la reacción es entonces enfriada a una temperatura que permite a los oligonucleótidos templar, después de que se templo son amplificados con DNA polimerasa.

El ciclo de desnaturalizar, templar y sintetizar DNA es entonces repetido muchas veces. Los productos de una ronda de amplificación sirven como templates para la próxima, cada ciclo sucesivo esencialmente dobla la cantidad del deseado producto DNA.

El mayor producto de esta reacción exponencial es un segmento de DNA de doble hebra cuyas terminaciones son definidas por la terminación 5' de los oligonucleótidos y cuyas longitudes se definen por la distancia entre los oligonucleótidos. En adición, son generadas moléculas de DNA más largas durante la reacción. (20)

iii) RNA:

-Patrón de oligonucleótidos. Consiste en el corte del RNA con enzimas específicas, separar en gel los segmentos analizarlos y compararlos. Este método fue utilizado en un principio por Woese para hacer relaciones filogenéticas con la molécula de rRNA, pero el trabajo fue facilitado con la metodología de secuenciación de bases.

-Secuenciación de bases. Debido a la dificultad de trabajar con RNA, por situaciones como su inestabilidad y fácil degradación, se ha cambiado por estudios directos con secuencias de DNA.

-Estudio de moléculas de rRNA

Se ha caracterizado el rRNA de más de 500 especies de bacterias, encontrándose que las bacterias se separan en grupos totalmente definidos. Algunos taxa definidos por las secuencias de rRNA pueden también ser identificados por características fenotípicas comunes, que en la mayoría de los casos sólo son comunes en alguno de los miembros del taxón pero no de su totalidad.

Recientemente Woese y colaboradores (1990), mediante análisis comparativos de secuenciación del rRNA 16S propusieron la separación de todos los seres vivos en

tres dominios: Bacterias, Archaea y Eukarya (antes conocidos como Eubacterias, Archeobacterias, y Eukariota). Esto es diferente a los arreglos observados con características fenotípicas (por ejemplo el arreglo de los 5 reinos de Whittaker: Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera, o la dicotomía de la separación eucariote-procariote de Chatton (1935)). Dentro de la propuesta de Woese se plantea una división formal entre los miembros del dominio Archaea en 2 reinos: Euryarchaeota compuesto por las metanógenas y bacterias relacionadas, formando un grupo fenotípicamente heterogéneo y Crenarchaeota compuesto por las termoacidófilas o eocitas, formando un grupo fenotípicamente homogéneo que ocupa nichos enteramente termófilos. Esta característica es común en los 2 grupos por lo que se puede suponer que es un fenotipo ancestral del dominio Archaea. De la misma manera se propone la elevación a nivel de reinos de las diferentes chyla del dominio Bacteria, ya que representan divisiones filogenéticas muy profundas, y en el dominio Eukarya la conservación de los reinos Plantae, Animalia y Fungi pero la división del reino Protista en varios reinos correspondientes a los diferentes linajes protistas.

El dominio Bacteria está actualmente dividido en los siguientes grupos: Termotogales, Flavobacterias y parientes, Cianobacterias, Bacterias Púrpuras, Bacterias Gram-positivas y Bacterias verdes no-sulfurosas. (fig.4.). (63, 74).

ARBOLES FILOGENETICOS DE LAS BACTERIAS

Los evolucionistas generalmente están interesados en obtener un árbol filogenético de especies o poblaciones. Sin embargo, es posible obtener un árbol filogenético para un grupo determinado de organismos con la información de una sola proteína o un solo gen. Lo que en realidad se obtiene es un árbol de genes, el cual puede o no ser igual a un árbol de especies. Hay muchos árboles de genes dentro de cualquier árbol de poblaciones o de especies y, más aun, el árbol de poblaciones puede en cierto sentido representar una compilación de genealogías para varios genes. Sin embargo, la topología para un determinado árbol de genes puede diferir de la del árbol de poblaciones o especies debido a:

a) Errores de muestreo atribuibles a un número pequeño de nucleótidos o aminoácidos examinados (Saitou y Nei, 1986).

b) Selección inadecuada del gen a estudiar. Por ejemplo, los genes que pertenecen a una familia multigénica. En estos casos no es fácil identificar los genes homólogos para todas las especies estudiadas. Cuando el número de genes duplicados es pequeño la identificación es relativamente

sencilla; pero cuando el número es mayor, como en el caso de las regiones variables de las inmunoglobulinas, resulta virtualmente imposible (Nai, 1967).

c) heterogeneidad en las tasas de evolución entre linajes. Vamos a suponer, en el caso más simple, que los genes de cada especie se separaron al mismo tiempo que las especies. Supongamos además que los patrones de dispersión en la historia evolutiva de los genes concuerda con los patrones de separación de las especies bajo consideraciones. aun así, puede darse el caso de que los patrones de ramificación o topologías de los árboles filogenéticos, uno el de las especies, que en el caso ideal se deriva de todo el genoma, y otro, el de un gen particular, no coincidan. Esto se debe a que las sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos ocurren al azar (proceso estocástico) por lo que el número de sustituciones en el linaje (organismo) Z puede ser menor que en los X y Y. Para evitar este tipo de errores de gran importancia analizar un gran número de nucleótidos o aminoácidos.

d) Si existió polimorfismo en el momento de la separación de los genes, los tiempos de divergencia de los genes muestreados para diferentes especies serán mayores que los tiempos de divergencia de las especies. Mas aun, la topología del árbol construido para un gen en particular puede ser diferente de la topología para el árbol de las especies si

causa del polimorfismo ancestral.

e) Flujo genético. Si hay intercambio genético y recombinación entre distintos linajes (especies o poblaciones), los patrones filogenéticos derivados de genes homólogos, no van a representar la historia "real" de los linajes.

Las últimas tres posibilidades no son simples generadores de "ruido" en la estimación filogenética. Al contrario, son fenómenos reales y una parte importante de la historia evolutiva de un grupo de linajes (Avise, 1987).

El análisis de la información genotípica permite proponer clasificaciones filogenéticas de las bacterias más precisas que las propuestas en base únicamente a la información fenotípica. La información genotípica de las bacterias tiene más ventajas que la información fenotípica, la base clásica de la clasificación taxonómica. La información de secuencias puede ser interpretada más sencilla, rápida y precisamente y es por ser más informativa en cuanto a las relaciones evolutivas que la información fenotípica. Los elementos de una secuencia, nucleótidos o aminoácidos están restringidos en número y bien definidos. La subjetividad de determinar la igualdad o similitud a nivel fenotípico es reemplazada por juicios más sencillos, por ende más objetivos, y por relaciones matemáticas

definidas.

Gran cantidad de pruebas abonan la idea de que las sustituciones de aminoácidos se acumulan a un ritmo casi constante en el transcurso de largos periodos de tiempo evolutivo.

El reloj molecular no anda a la misma velocidad en todas las regiones de la molecula de DNA. El ritmo de la evolucion en una zona de DNA que afecte directamente al funcionamiento de una proteina es lento; es mayor en una posicion que no incida en ese funcionamiento.

La revolucionaria idea de que el cambio genetico esta dominado por mutaciones neutras ha ayudado a explicar el descubrimiento de que la evolucion molecular decurre mas de los años que de las generaciones.

Con los arboles filogeneticos basados exclusivamente en diferencias de rasgos anatomicos, los biólogos no tenían forma de saber el numero de mutaciones necesarias para generar una diferencia observable en un rasgo. Tampoco podian saber si una mutacion que origina la mutacion de un rasgo anatómico contribuye tambien a provocar modificaciones de otros rasgos anatomicos. Los arboles moleculares erigidos con datos de secuencias no requieren decisiones subjetivas acerca de los rasgos. Ademas, es posible

calcular el número mínimo de sustituciones de bases que se precisen para dar cuenta de las diferencias entre las secuencias. El número de rasgos genéticos numerables, obtenidos mediante comparación de secuencias de DNA y de proteína, ha empezado a sobrepasar el número de rasgos anatómicos disponibles para el análisis genealógico.

Los árboles moleculares no sólo revelan el orden de las bifurcaciones en los linajes, sino que también contienen información sobre el momento en que ocurren las divergencias.

Por otro lado los análisis genealógicos han contribuido al conocimiento del papel evolutivo de la transferencia genética entre especies que no se cruzan.

Se puede considerar a una molécula cuya secuencia cambia al azar en el tiempo como a un cronómetro. El número de cambios en una secuencia es el producto de la velocidad de fijación de mutaciones por el tiempo transcurrido. Sin embargo, no se puede medir el cambio de un estado original a un estado final ya, que el estado original ya no existe, por lo tanto se utiliza el hecho de que 2 o más versiones de una secuencia encontradas en 2 o más organismos existentes provienen de un ancestro común. Las diferencias encontradas entre estas secuencias serían aproximadamente el doble (asumiendo una velocidad de

mutacion comparable en las dos) de las diferencias adquiridas por cada organismo desde que tuvieron un ancestro comun. Para ser usadas como cronometro evolutivo es necesario una secuencia que cumpla con las siguientes condiciones: Comportamiento de reloj en el sentido que los cambios deben ser proporcionales al tiempo (los cambios deben ser lo mas azarosos posibles), las velocidades de cambio deben corresponder al espectro de las distancias evolutivas que se quieren determinar (debe haber zonas de relativa constancia y zonas mas variables, algo asi como las manecillas del reloj de horas, minutos y segundos) y por ultimo la molécula debe ser lo bastante grande como para proveer la informacion necesaria y contribuir a un funcionamiento regular del reloj evolutivo (la zona debe ser lo bastante grande para garantizar que no haya limitaciones en lo azaroso de la aparicion de mutaciones).

Las moléculas mas utilizadas en la actualidad para determinar filigenias son RNA ribosomiales. Son moléculas que muestran un alto grado de constancia funcional, lo cual garantiza un buen funcionamiento como reloj evolutivo, por lo mismo sus cambios de secuencias son muy lentos, ya que tienen una gran restriccion por su importante funcion. Se encuentran en todos los organismos, y diferentes zonas de la molécula cambian a velocidades muy diferentes lo cual permite determinar hasta las relaciones filogeneticas mas distantes.

Su tamaño varía entre 1.5 y 3 kb aproximadamente y contienen un gran número de dominios (existen alrededor de 50 bases en la estructura secundaria del rRNA 16S) involucrados en la funcionalidad de la molécula.

La comparación de secuencias de bases del rRNA permite encontrar la relación existente hacia el ancestro común.

Lo que es bien sabido, es que, por un solo proceso no es posible llegar a un árbol filogenético concieto de las bacterias. Para esto, además del análisis de diferentes secuencias de DNA se requieren de datos ecológicos que ocurren a tiempos conocidos en el pasado geológico, así como del conocimiento bioquímico, fisiológico, etc. sobre estos organismos.

Aunque en 1974 se reportó, que tanto Styrimyrium como S. typhi presentaban un patrón de metilación en citosina igual al de E. coli 1-12, no se ha avanzado en el estudio de este patrón en otras bacterias. Consideramos importante determinar en que géneros bacterianos esta presente y en cuales no, ya que esta información nos puede permitir entender las posibles funciones de este patrón de metilación. Para esto, es necesario realizar una correlación de la presencia de la metilación Dcm de las diferentes eubacterias con un árbol filogenético.

De acuerdo a todo lo presentado se decidió elegir la clasificación filogenética propuesta por Woese, enriquecida y modificada por Ochman y Wilson. (Fig. 5.7, además fue necesario acomodar a las cepas Citrobacter y Enterobacter para lo cual decidimos apoyarnos en los datos de un trabajo realizado por medio de hibridación DNA-DNA (Tabla. IV.).

METILACION DEL DNA

La metilación del DNA es un fenómeno de modificación estructural de la molécula, que ocurre a un nivel polinucleotídico, como un evento postreplicativo inmediato. La metilación del DNA involucra la transferencia enzimática del grupo metilo de la S-adenosilmetilina a bases nitrogenadas de secuencias específicas de nucleótidos (24, 47, 60).

La metilación específica de algunas bases en el DNA está presente en prácticamente todos los organismos (48, 59, 67). El DNA de las células procarionticas está metilado en algunas adeninas y/o citosinas, mientras que en la mayoría de las células eucarionticas únicamente se ha detectado metilación en las citosinas (48, 60).

El conocimiento que se tiene acerca de la existencia de

este fenómeno en la escala filogenética así como las funciones biológicas atribuibles a esta modificación del DNA aun no es completo. En el caso de los procariontes, la mayoría de los estudios sobre metilación se han realizado en Escherichia coli.

El DNA del cromosoma de la Enterobacteria Escherichia coli K-12 contiene aproximadamente 0.5 moles % de adeninas metiladas en posición N6 (6-MeA), 0.15 moles % de citosinas metiladas en posición 5C (5-MeC, 1P), las cuales son el producto de la actividad de tres enzimas: las metilasas Hsd, Dam, y Dcm. (14, 21, 22) (Tabla 1).

La metilasa Hsd metila la segunda adenina de las secuencias AAC(=N)GTGC, Dam metila la adenina de la secuencia GATC y Dcm metila la segunda citosina de la secuencia CC(A/T)GG (Fig. 6 y 7). Las adeninas metiladas por la primera metilasa representan menos del 1-2 % del total de bases metilada (47, 48).

Los genes que codifican la secuencia de aminoácidos de las metilasas de E. coli K-12 se han mapeado y secuenciado. El gene hsd se localiza en el minuto 49; el gene dam en el 74 y el gene dcm esta ubicado en el 43 del mapa genético de esta bacteria. Esta localización de los genes, indica que no están unidos entre si. El gene dam ha sido identificado como una secuencia de 834 pares de nucleótidos que codifican para

una enzima de aproximadamente 31.000 de peso molecular. Esto concuerda con el valor observado para la proteína purificada y con la composición total de aminoácidos codificada teóricamente por la secuencia (46). Las propiedades de la metilasa Dam son similares a otras metilasas de modificación tipo 2. (5) tales como EcoRI y HpaII. Recientemente se secuenció el gene dcm el cual tiene 1416 pares de bases (29).

De la misma manera como existen enzimas capaces de metilar la adenina de la secuencia GATC existen enzimas de restricción que cortan solamente en secuencias GATC metiladas o no metiladas, estas enzimas son DpnI y MboI respectivamente. La endonucleasa de restricción EcoRII corta la secuencia CC(A/T)GG cuando la segunda citosina no está metilada (48).

Recientemente en Escherichia coli K-12 se determinó la frecuencia de 6-MeA y de 5-MeC en las secuencias GATC y CC(A/T)GG, respectivamente. Para esto se analizaron 49 secuencias de E. coli del Gen Bank (210.501 bases, aproximadamente el 4.54% del total del cromosoma). Los sitios GATC están presentes en promedio uno cada 213 pares de bases y CC(A/T)GG uno cada 331 pares de bases. Tomando en cuenta que en el genoma de E. coli el 25% son C, 25% G, 25% A y 25% T, 53 bases de las 213 son A por lo que eso equivale a 1.87% de adeninas metiladas y así, de 315 bases, 66 son C por lo que hay aproximadamente 1.13% de citosinas metiladas en el

genoma de E. coli (47).

Una manera para determinar alguna función biológica de la metilación del DNA es la comparación de células silvestres y células mutantes.

FUNCIONES DE LA METILACIÓN DEL DNA EN Escherichia coli-K12

Las adeninas metiladas por la metilasa Hsd están involucradas en el sistema de reconocimiento del propio DNA de las bacterias (sistema de modificación-restricción) (41).

Las cepas de E.coli que no tienen metiladas las adeninas en las secuencias GATC (dam -) presentan, entre otras características fenotípicas, una frecuencia elevada de mutaciones espontáneas. El DNA de estas cepas presenta un número mayor de cortes de cadena sencilla si se compara con el número de cortes de una cepa silvestre. La presencia de estos cortes podría explicar las características fenotípicas de las cepas dam - : hipermutabilidad, hiper-recombinación, inviabilidad en presencia de mutaciones en los genes recA, recB, recC, polA y lexA, así como sensibilidad incrementada a la luz ultravioleta. En estas cepas también se observa un incremento de la transposición y rearrreglos de algunos transposones; desrepresión moderada de algunos genes del sistema SOS; incremento de la expresión de trpR y la

supresion de algunos fenotipos dam por una segunda mutacion en mutH y mutL. Estos fenotipos sugieren que las cepas Dam son deficientes en la reparacion del DNA (44). La excision inducida por luz ultravioleta fue encontrada normal en estos mutantes, lo que sugiere que el responsable de este fenotipo es otro de los procesos de reparacion del DNA. (43, 46, 54, 59).

Otras de las funciones propuestas de las adeninas metiladas en GATC son: señal para la sintesis de los fragmentos de Okazaki (25), proteccion del DNA (44), puntuacion en la transcripcion (71) y discriminacion de cadenas de DNA durante la reparacion de pares de bases no apareados correctamente (23, 57). Tambien se le ha involucrado en la recombinacion del DNA (38, 44), en favorecer la desnaturalizacion y/o la union de la secuencia ori a membrana externa (52, 76) y en la regulacion de la transcripcion de los genes que contienen a GATC dentro del promotor (4).

La funcion de la metilacion Dcm se desconoce. Las cepas Dcm no muestran un fenotipo determinado, como E. coli B no presenta la metilacion tipo Dcm (45, 47, 59).

Se han construido cepas dam-dcm-hsd- viables que no contienen bases metiladas detectables en el DNA. Esto indica que la metilacion del DNA en E. coli K-12 no es esencial

para la viabilidad (59).

A continuación se describen en detalle las principales funciones de la metilación Dam.

6-MeA EN GATC Y REPARACION POSTREPLICATIVA DE APAREAMIENTOS ERRÓNEOS

Una de las funciones biológicas de la metilación, probablemente la más estudiada y mejor entendida, es su participación en la reparación del material genético recién sintetizado. (4) En las células silvestre, el DNA en la mayoría de los sitios -GATC- tiene la adenina metilada en sus dos cadenas, con excepción de los que se encuentran justo unidos a la horquilla de replicación y que son el producto de la síntesis reciente; estos segmentos hemimetilados existen tan solo transitoriamente y es durante este corto periodo que los errores de la replicación se pueden corregir, principalmente los apareamientos erróneos A-C y G-T, por el sistema de reparación de apareamientos erróneos (en inglés mismatch). La reparación es alcanzada por acción conjunta de los productos de los genes dam, mutH, mutS y mutL. Un complejo de los productos de estos genes se une al DNA hemimetilado en el sitio -GATC- más cercano, reconoce el "mismatch", lo corrige y finalmente metila las adeninas de los sitios -GATC- para concluir el proceso de reparación.

Brevemente la proteína MutS reconoce el "mismatch", lo cual es facilitado por la proteína MutL. La endonucleasa MutH corta el DNA en la G en GATC dentro de la cadena no metilada del heteroduplex hemimetilado, tanto a la derecha como a la izquierda del error. La helicasa y una exonucleasa forman un hueco. La holoenzima DNA polimerasa III se encarga de llenar el hueco, y entonces la DNA ligasa sella la muesca (esto se realiza en presencia de ATP) (Fig.8) (2, 4, 23, 49, 50, 57, 77).

Uno puede imaginarse que un grupo metilo sobre una cadena esta asistiendo a la proteína MutS al reconocimiento de DNA, mientras la falta del grupo metilo sobre la segunda cadena permite la actividad de corte. En las células dam al no existir la presencia de 6MeA en los sitios GATC, la corrección de los apareamientos erróneos se efectúa indistintamente en la cadena templado o en la nueva, lo que induce un incremento en la frecuencia de mutación.

6-MeA EN GATC : EXPRESION GENETICA

- Funcion en la expresion genetica:

Otra funcion propuesta para la metilacion Dam, es en expresion genica (4). En E.coli algunos genes cuya expresion

se modifica en mutantes dam, tienen sitios GATC en las regiones -10 o -35 de sus promotores.

- Mecanismo por el que se modifica la expresión genética:

No es conocido como es que la metilasa Dam y otras proteínas diferencian entre DNA no metilado, metilado y hemimetilado. Esto puede estar asociado con el decremento de estabilidad de los pares de bases metiladenina-timina. Otra posibilidad incluye la pérdida de puentes de hidrógeno entre el DNA y la proteína cuando el grupo metilo está presente o la formación de regiones hidrofóbicas por grupos metilo de la metiladenina y la timina adyacente, lo cual puede impedir el acercamiento de la proteína al DNA.

Como se mencionó, la interacción DNA-proteína puede ser influenciada por el estado de metilación de las secuencias GATC. Si una secuencia se encuentra presente en una región -35 o -10 del promotor, la metilación puede afectar la expresión del gen por incremento o reducción de la iniciación de la transcripción. Generalmente, la presencia de un grupo metilo disminuye la expresión de un gen por un factor de 2-5 veces.

Una simple explicación a la inhibición de la expresión del gen por metilación del DNA es la presencia del grupo

metilo en el surco mayor de la helice del DNA lo que impide el acceso de la RNA polimerasa al promotor. Alternativamente, las proteinas Dam o MthH pueden actuar como represores en los promotores que contienen GATC e interferir con la union de la RNA polimerasa.

La proteina MthH y la metilasa Dam pueden ser un ejemplo de clase de proteinas que se une diferencialmente a GATC dependiendo del estado de metilacion.

Los genes trpA y trpB, importantes para el control de la expresion del operon trp, tienen GATCs en su region promotora y se localizan a la misma distancia de oriC, y sobre el lado opuesto del origen de replicacion oriC: es decir uno hacia la derecha y el otro hacia la izquierda de este sitio. Esto sugiere que ambos genes pueden estar en un estado hemimetilado al mismo tiempo, y asi maximizar su expresion, de manera coordinada. Un mecanismo similar ocurre en los genes malE y malFQ, los cuales tienen GATCs en sus regiones reguladoras.

La expresion de los genes dnaA y micC se incrementa cuando los GATC s estan metilados en las 2 cadenas y disminuye si estan hemimetilados. ambos genes son regulados por la proteina DnaA. La transcripcion de los genes micC y dnaA es necesaria para la iniciacion de la replicacion cromosomica en oriC. El gene micC esta adyacente al oriC y

el gene gnaA esta localizado a un minuto del mapa genético. Ambos genes pueden estar en un estado hemimetilado durante la fase de inicio de la replicación. La reducción resultante de la transcripción de estos genes puede estar relacionada a la propia inhibición de la iniciación de la replicación en oriC.

El gene mom del bacteriofago Mu y el gene gra del bacteriofago F1, así como la actividad de ciertos transposones (Tn10 y Tn5, ambos flanqueados por dos secuencias de inserción IS10 e IS50, respectivamente), también se modifica por la presencia de adeninas metiladas en sus promotores. (L. 4. p. 77).

El transposon, Tn10 se replica y transcribe simultáneamente usando la maquinaria de replicación de la célula huésped. La transposición de Tn10 es elevada en mutantes Dam-, un efecto mediado por dos sitios GMAC presentes en IS10. Uno de esos sitios se asocia a la región -10 de P_{in}, el promotor del gene de la transposasa; el otro esta localizado en la terminación interna de IS10 en la región donde se une la transposasa. El DNA hemimetilado es mejor sustrato que el metilado para la transcripción del gene transposasa, y por ende, también es mejor para la acción de transposición. Eso significa que la transposición esta reprimida en la mayor parte del ciclo celular pero que se induce cada vez que el elemento se replica. Se ha sugerido que la transposición de IS10 y de Tn10 en células Dam+ esta

acoplada con la replicación cromosómica. Este acoplamiento con la replicación ayuda a prevenir los efectos potencialmente negativos de una excesiva transposición. Acorde a este modelo, después de la horquilla de replicación, solo los elementos hemimetilados activos pueden transponer, mientras los otros elementos completamente metilados en el resto del genoma, permanecen en su posición original. Tal mecanismo puede ser ventajoso para elementos semejantes a IS10, los cuales transponen por excisión no replicativa.

Los aspectos acerca de la transposición:

La asimetría impuesta en la horquilla de replicación significa que sólo una de las 2 copias de In10 puede transponerse. Por tanto una copia permanece en su lugar, mientras la otra encuentra una localización alternativa. Además se obtiene un mayor efecto aditivo al tener la expresión de las dos transposasas y su acción dependiente de la hemimetilación.

Aunque no hay estudios explícitos con respecto a la transposición de In2, ésta parece ser también afectada por la metilación Dam. Entre los sitios GATC presentes en In2, dos están en el promotor del gen de la transposasa. Hay otros dos sitios GATC en una región del par de bases 1^a en la IS10 en la región terminal donde se une la transposasa. Varias evidencias prueban que, como en el caso de In10, los

promotores de la transposasa y la terminacion interna son más activos en cepas dam-.

Tn703, el cual contiene un sitio GATC en el promotor del gene de la transposasa, tambien transpone a alta frecuencia en dam-; por el contrario, otras transposones, como los de la familia Tn2, no tienen secuencias GATC en los promotores y por lo tanto transponen con igual frecuencia en células Dam+ y Dam-; es decir, no son afectados por la metilacion en GATC (45).

6-HEA EN GATC Y REPLICACION

La densidad alta de sitios GATC (11 sitios) en el origen de replicacion oriC, permite especular acerca de la participacion de estos en la iniciacion eficiente de la replicacion (2, 31, 38, 44).

Los plásmidos construidos in vitro que contienen oriC como el único origen de replicacion (minicromosomas) son inestables en células mutantes dam -, mientras que en células que reproducen a la metilasa Dam, la iniciacion de la replicacion ocurre con mas frecuencia. Se sabe ademas, que el DNA no metilado no es buen sustrato para la iniciacion in vitro.

Abel y Austin han demostrado que miniplásmidos F1 (es un ejemplo de minicromosoma que solo tiene el ori de F1 como región de origen) no puede estar estable en células dam-.

La evidencia de que la metilación puede jugar un papel importante en la iniciación de la replicación proviene de estudios usando plásmidos metilados en células dam-.

Recientemente, Russel y Zinder observaron que la transformación de células bacterianas dam- fue más eficiente con DNA de pBR322 no metilado que con un DNA de un plásmido metilado, ya que el DNA metilado de pBR322 puede producir en células dam- moléculas hemimetiladas después de la primera ronda de replicación y completamente desmetiladas en la subsecuente ronda. Los autores recobran solo moléculas hemimetiladas de tales células y concluyen que DNA de plásmidos hemimetilados no pueden replicarse ulteriormente.

Estos resultados y otros muestran que los plásmidos no metilados pueden replicarse en células dam- y los plásmidos completamente metilados en silvestres. La inhibición de la replicación se debe al estado de hemimetilación del DNA de los plásmidos. La replicación in vivo no puede iniciarse en la forma hemimetilada del oriC (Russel y Zinder 1987). Por tanto, plásmidos oriC completamente metilados (minicromosomas) transforman cepas dam- ineficientemente debido a que hay una sola ronda de replicación y se acumulan

formas hemimetiladas. Experimentos adicionales muestran que los GATCs en DNA hemimetilado que inhiben replicación fueron localizados en o muy cerca del origen de replicación del plásmido. Russel y Zinder sugieren que estos GATCs cruciales están en secuencias que pueden adoptar una estructura cruciforme y que tales estructuras son importantes para la iniciación de replicación. El papel de la estructura cruciforme no es conocido pero se cree que la hemimetilación destruye la simetría de la estructura cuando esta totalmente metilado o no metilado, y probablemente, así la FliA polimerasa no tiene acceso a la hélice de DNA.

Otra posibilidad, sin embargo, es que algunas proteínas inhibitoras pueden unirse específicamente al origen de replicación solo cuando el DNA está hemimetilado (31).

Algunas observaciones sugieren que la metilación es importante para la regulación de la función del origen de replicación a intervalos variables (2) y células con una deficiencia o un exceso de la enzima Dam exhiben numerosas aberraciones en el origen de replicación (Boye y Looser-Olesen 1990).

Puede ser de interés probar también la transformabilidad de las bacterias muth- y dam-, muth- con DNA metilado. En estas células no están presentes las proteínas Muth o Dam y Muth que se unen eficientemente a DNA hemimetilado. Estos

experimentos permitirían saber si la proteína Muth también está implicada en la replicación.

-Explicación actual de la importancia de la hemimetilación en la regulación de la replicación:

En un artículo publicado por Nancy Kleckner en 1990 se presenta la siguiente información:

Examinando sitios GATC individuales localizados en diferentes sitios del genoma de *E. coli*-K12 para estudios de su cinética de remetilación por la metiltransferasa Dam siguiendo el pasaje de la horquilla de replicación se llegó a evidenciar 3 puntos:

-oriC es una unidad funcional simple que es secuestrada específicamente de la metilasa Dam por un periodo significativo de tiempo y entonces es liberada.

-la región del promotor gnaA está sujeta a secuestraciones análogas, lo que sugiere que la secuestración hemimetilado-dependiente es posiblemente un fenómeno general.

-en cada ronda de iniciación de replicación hay un bloqueo temporal en la reiniciación de oriC y la expresión del gen gnaA (11).

Bajo condiciones especiales donde las células han acumulado un exceso de funciones de la iniciación de replicación la sobreproducción de la metiltransferasa reduce el periodo entre las rondas de iniciación de la replicación, sugiriendo así que la velocidad de remetilación de un origen replicado puede ser un factor limitante en la reiniciación (49).

Estas y otras observaciones son consistentes con la idea de que la hemimetilación en esas 2 regiones actúa asegurando que el inicio de la replicación del origen sobrevenga una y sólo una vez por ciclo celular.

Los orígenes hemimetilados están específicamente unidos a una fracción de membrana de E. coli tanto in vivo como in vitro, mientras que los completamente metilados o desmetilados no lo están. Este estudio también sugirió que los sitios GATC en y/o cerca del origen persisten en forma hemimetilada después de la iniciación de replicación con la unión del origen a membrana (52).

En sitios GATCs encontrados en otra parte del genoma, se vio que la remetilación empieza inmediatamente después de que el sitio es replicado y es muy rápida. En contraste a los 2 sitios examinados en el DNA de oriC donde permanecen completamente hemimetilados por cerca de 10 minutos, después

de los cuales la remetilación ocurre a una velocidad rápida similar a la observada en otros sitios. Se sugiere que el origen es secuestrado de la metiltransferasa y posteriormente es liberado.

El secuestro de oriC y dnaA posiblemente involucra proteínas específicas que reconocen sitios GATCs hemimetilados en el contexto apropiado de otras secuencias adicionales de DNA. Las proteínas candidatas han sido identificadas por análisis de la membrana que une a orígenes replicados nuevamente. (Hendrickson et al; 1982).

La liberación del oriC del secuestro es también un interesante proceso. Puede involucrar un evento celular que destaque el origen de los aparatos de secuestro siguiendo la remetilación. La acción de la metiltransferasa puede ser suficiente. Si la secuestro involucra interacciones cooperativas de la mayoría de los sitios GATC, la metilación ocasional de uno o pocos sitios puede reducir drásticamente la afinidad del origen para con el aparato de secuestro conduciendo así a una concertada liberación de la región entera seguido por una rápida remetilación de los sitios que quedan. La sobreproducción de Dam reduce los niveles de lugares de DNA hemimetilado en sitios GATC en oriC y dnaA. La sobreproducción puede ser causa de que esas regiones se remiten antes de poderse reorganizar por el aparato de secuestro; los altos niveles Dam pueden competir con el

aparato de secuestro y liberar prematuramente el efecto.

Paapel del "secuestro" de los GATC en oriC:

Como se menciona, la iniciacion ocurre en el origen de replicacion una vez por ciclo celular, las iniciaciones secundarias son raras. Ademas ese control es mantenido aun cuando la celula contiene multiples origenes de la replicacion.

La iniciacion ocurre asi eficientemente y sincronicamente en todos los origenes de la celula.

Observaciones han demostrado que la falta de replicacion de origenes en estado hemimetilado debido a la secuestro sirve para prevenir una reiniciacion prematura de replicacion, que es prevencion de rondas secundarias de iniciacion de replicacion, ocurriendo durante los tiempos de ciclo celular cuando el potencial de iniciacion es alto.

Es importante que oriC este hemimetilado para asegurar la segregacion propia de los cromosomas de las celulas hijas. Encontrando que la secuestro dura tanto como el 30% del ciclo celular hace aun mas plausible que ese periodo de secuestro provea el tiempo necesario de anclaje a sitios de membrana para la separacion celular por incorporacion de materia nueva de la pared celular.

Las bacterias como E. coli tienen dos membranas celulares: una bajo la pared celular y la otra externa a esta. Sorprendentemente, oriC se conecta a la membrana externa.

Si la metilación Dam es importante para la unión de DNA a membrana, entonces en células gam- se esperaría que tuvieran una morfología aberrante. Esto no ha sido observado. La morfología alterada puede también sin embargo, ser causada por incremento en la expresión del gen sulA, el cual codifica para una de las proteínas reguladoras de la división celular.

La iniciación en oriC, así como en ori de F1, depende de la unión de la proteína DnaA, la cual actúa sobre las hebras de DNA. Tamaki demostró que la temperatura de fusión del oriC disminuye por la metilación en GATC (4). La metilación podría además facilitar la formación de un complejo soletto catalizado por DnaA.

Bramhill y Kornberg han identificado secuencias repetidas en las cuales la proteína DnaA se une facilitando abrir el duplex para la iniciación de replicación. La secuencia consenso 13-mer empieza con el reconocimiento de la Dam al sitio 5'-GATC-3'. Hay 3 de estas secuencias en oriC y una en micC / dnaA. La delección de un 13-mer en oriC inhibe

la iniciación. Sería interesante conocer si la interacción entre DnaA y el 13-mer es modulada por metilación. Si es así puesto que la transcripción de gnaA es incrementada por metilación, un efecto sinérgico podría resultar de la estimulación coordinada de la producción y acción de la proteína DnaA (4).

La evidencia mencionada sugiere que la metilación puede ser esencial para la iniciación de la replicación del cromosoma. Pero, paradójicamente, mutantes sin el gene gam son viables, e inician y replican sus cromosomas. Sin embargo, en estas mutantes, la regulación de la replicación está alterada, sería interesante ver como los requerimientos de metilación pueden ser reconciliados en la existencia de mutantes Dam.

En conclusión:

1.- La región oriC del cromosoma de E. coli puede unirse a la membrana celular, esta unión específica es máxima cuando el DNA está hemimetilado.

2.- En una célula silvestre, la región oriC se replica, y permanece hemimetilada ("secuestrada"), unida a membrana por un tiempo determinado. La unión a membrana inhibe la aparición de eventos de iniciación extra y provee un mecanismo, de partición de cromosomas a las células hijas. La

región oriC posiblemente se libera de la membrana cerca del final del ciclo celular, y se metila para iniciar un nuevo ciclo de replicación.

Así, la región oriC hemimetilada puede ser vista como un centrómero y la membrana como el huso mitótico.

DISTRIBUCION DE LA METILACION Dam EN DIFERENTES EUBACTERIAS

Actualmente, la presencia de adenina metilada en GATC se ha detectado en varios géneros de bacterias Gram-negativas: Salmonella typhimurium, Salmonella typhi (26), Haemophilus influenzae (37), Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Erwinia carotovora, Haemophilus gallinarum, Haemophilus paraneolyticus, Proteus zuberis, Providencia stuartii y Serratia marcescens (7); en Gram-positivas se le encuentra presente en Diplococcus pneumoniae y Clostridium perfringens y ausente en Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus (3, 17, 18, 26, 30, 37, 68).

DISTRIBUCION DE SITIOS GATC EN EL CROMOSOMA DE E. coli

Morris y Marinus, determinaron la distribución de

secuencias GATC en 9 secuencias de E. coli de mas de 7,000 pares de bases reportadas en el GENE-BANK. Sus resultados principales fueron: la distancia entre 2 GATC nunca es mayor a 2,000 pares de bases, la frecuencia de esta secuencia es mayor en las regiones codificadoras que en las no codificadoras, su patron de distribucion tiende a seguir un esquema alternado de agrupamientos de secuencia GATC, regiones "vacias" (4). Estos resultados muestran una distribucion de GATC de acuerdo a lo esperado para su funcion en el sistema de recuperacion de "mismatch", mientras que su mayor frecuencia en las regiones codificadoras parece coadecir a una presion informacional.

Especialmente significativa fue la baja frecuencia de GATC en genes que codifican para rRNA y tRNA. Un analisis detallado de la localizacion de sitios GATC en el gene para el rRNA 16S mostro que 2 de 5 GATC se estan conservados en todas las eubacterias, archaebacterias, eucariotes, mientras un tercero se encuentra en la misma posicion en la mayoria de las eubacterias. Eso sugiere que los GATC se han sido cuidadosamente seleccionados o retirados, dependiendo de la region del RNA. Esto parece deberse a la naturaleza palindromica de GATC, y a su efecto sobre la estructura secundaria de RNAs no traducidos.

Morris y Marinus identificaron varias regiones con una alta densidad de GATCs. Una de estas regiones, como ya se

mencionó, es oriC. Sería importante investigar, si estas regiones representan un origen en replicación secundario o sitios de unión a membrana.

FUNCION DE 5-MeC EN CC(A,T)GG EN E. coli

Si bien no se ha encontrado una función clara para la metilación de citosina en CC(A,T)GG, se sabe que una citosina metilada puede inducir mutaciones por transición C:G a T:A, que el DNA hemi-metilado para esta C (en regiones del DNA diferentes al de la horquilla de replicación) induce daños en el DNA y un incremento en recombinación y que la presencia de 5MeC en promotores o en regiones importantes de interacción DNA-proteína afecta de manera secundaria la expresión del gene.

La citosina y la citosina metilada pueden desaminarse de manera espontánea en las células. Al desaminarse la citosina se genera uracilo. Los uracilos generados por este mecanismo o por su incorporación al DNA por la DNA polimerasa, son eficientemente removidos y sustituidos por citosina por un sistema de reparación que involucra a la enzima uracil-DNA-glicosidasa (40). La citosina metilada y desaminada da timina, lo que genera un apareamiento incorrecto T/G que puede ser corregido o puede generar una mutación por

transición de C:G a T:A si la región con el apareamiento incorrecto se replica antes de ser reparada. En el caso de que se fije la mutación: los pentanucleótidos CCTGG y CCAAG pasarían a CTAGG y CCATGG por desaminación de la 5-MeC de esas secuencias o de las complementarias (15). El triplete TAG (TAG en el DNA, UAG como amar en el mRNA) puede generar una mutación sin sentido si este queda en fase en el marco de lectura de un mRNA.

Esta posibilidad fue explorada experimentalmente en 1975 por el grupo de Coulondre et al (15). Este grupo analizó las mutaciones amar en el gen legI del operon lac y encontró que, efectivamente, la segunda citosina del pentanucleótido CCAAG mutaba a T con una frecuencia alta. Estos sitios preferenciales para mutaciones amar no se detectaban en cepas dam - (4). Sin embargo, es posible que las cesas vecinas influyan en determinar la frecuencia de mutación a nivel CCAAG, ya que una de estas secuencias presente en legI no fue sitio preferencial de mutaciones amar. Otra prueba de la influencia de otros factores, es la ausencia de estos sitios de alta frecuencia mutagenica en MB9 de E. coli.

En E. coli K-12 las mutaciones en el gen ari (accumulation of recombinogenic lesions) induce la hipometilación tipo Dcm tanto de fagos lambda propagados en células con esta mutación, como en plásmidos y en el propio cromosoma de la bacteria. Este DNA nido-metilado se

encuentra mas roto e hiper-recombina si se le compara con el DNA metilado. La explicacion que se propone es que el gene arl codifica para una proteina que interacciona directa o indirectamente con la metilasa de citosina asegurando asi una eficiencia optima de esta ; en su ausencia, la metilasa seria menos eficiente y el DNA se encontraria hipometilado (35). Esto induciria la hemimetilacion de los sitios CC(A/T)GG. Se sugiere que los sitios hemimetilados serian reconocidos por un sistema de reparacion que cortaria el DNA a ese nivel induciendo la presencia de lesiones recombinogenicas.

Se ha visto que fagos Arl- presentan un duodociesimo de resistencia a EcoRII en comparacion con fagos Arl+. pero es 40 veces mas resistente que fagos Dcm-. Los analisis cromatograficos muestran que el DNA de Arl- contiene un tercio de 5MeC que la Arl+. La hipometilacion de la C en las Arl- induce: un incremento en la recombinacion genetica ; una sensibilidad inusual del DNA a endonucleasa S1, las cuales estan ausentes en fagos crecidos sobre gca+ o gcm-arl+. El DNA heteroduplex (metilado/no metilado) preparado in vitro es altamente recombinogenico pero no es sensible a S1. Se ha propuesto que los sitios CC(A/T)GG hemimetilados en DNA Arl- son necesarios y suficientes para incrementar la recombinacion y son necesarios, pero no suficientes, para la sensibilidad a S1 (35, 41).

En células con la metilasa Dcm, la presencia de 5-MeC

reduce la formación de fotoproductos inducidos por UV entre los dos CC en los sitios CC(A,T)GG en relación con la formación de esos fotoproductos en células Dam- en esos sitios.

En 1990 Senall A. et al (60) publicaron un artículo en el cual hablan sobre el descubrimiento de un gen requerido para la reparación VEF (Very Short Patch) en E. coli. El proceso de reparación (VEF) en E. coli disminuye la frecuencia de mutaciones de transición producidas por la desaminación de la 5-HmC la cual resulta en la producción de apareamientos erróneos (mismatches) T G. La reparación VEF se realiza en la hebra que contiene a la G. Se ha demostrado que un plásmido que contiene un fragmento de 11 kb del cromosoma de E. coli puede complementar a mutaciones cromosómicas dam- vr-. Se mapeó la región esencial para ambos fenotipos. Se construyó un plásmido que completará la mutación cromosómica de la metilación (dam-) pero no de la reparación (vr-) viceversa. Identificaron los genes responsables de cada fenotipo por análisis de secuenciación de DNA. Descubrieron que el gen esencial para la metilasa de citosina, Dam, codifica para 473 aa y no se requiere para la reparación VEF. La proteína Dam es similar a la metilasa EccRii en aproximadamente un 68.2%. El segmento de DNA esencial para la reparación VEF contiene un gen que puede codificar para una proteína de 150 aa. La proteína Var no es esencial para la función de la metilasa. El final 3' del gen var se

translada con el inicio 5' de yar. Los 2 genes parecen ser transcritos por un promotor comun, pero tienen fase de lectura diferente. Esto permite que los dos genes se expresen simultaneamente y asi minimizar el efecto mutagenico de la citosina metilada (66).

Algunos estudios han sugerido cierta influencia de este patron de metilacion en la regulacion de la actividad genica.

Por ejemplo, la proteina LexA es un represor que controla a los genes del sistema SOS. Este sistema se induce cuando hay dafio en el DNA. El gene lexA contiene dos secuencias que unen a la proteina LexA en su region promotora y que se denominan cajas SOS. La union del represor LexA a estas cajas induce que las dos cajas se junten formando una asa del DNA. La segunda caja SOS contiene un sitio dcm y la metilacion en ese sitio disminuye la afinidad del represor. La significancia biologica de esa observacion no esta clara, pero probablemente es muy importante en la regulacion de niveles de represor LexA. Realizando medidas del represor activo LexA en cepas dcm- y dcm+ podria aclarar este punto.

Se ha observado que la 5-Azacitidina es bacteriostatica para E.coli. Esto no puede deberse solamente a la inhibicion de la enzima Dcm, ya que es conocido que la enzima no es indispensable para el crecimiento. Ademas las cepas dcm- y dcm+ muestran una sensibilidad similar al agente (Friedman,

1979). No obstante 5-Azacitidina es interesante, ya que carece ser un inhibidor irreversible de Dcm (Friedman 1979, 1981, 1982); así esto ofrece una oportunidad al estudio de la acción del mecanismo enzimático (Santi et al 1983). El DNA que contiene 5-Azacitidina inactiva a las metilasas Dcm₁, HpaII y EcoRII. Este daño puede ser prevenido por cortes del DNA con nucleasa micrococcal o con la enzima de restricción correspondiente, o por adición de sustrato normal de DNA. La digestión con nucleasa HpaII no destruye la actividad inhibitoria para la metilasa EcoRII. En experimentos recientes *in vivo* las células con el sistema de modificación-restricción EcoRII presente en un plásmido fueron encuestadas brevemente a 5-Azacitidina. Esas células no recuperaron el crecimiento después de suspender la droga, mientras que muchos plásmidos se hicieron en las células. Mutantes deficientes en la función de restricción fueron sensibles, pero en mutantes deficientes en la función de modificación disminuyó la sensibilidad a este agente. Eso significa que el efecto recae sobre la enzima de metilación y no en la enzima de restricción. Puede ser que la inactivación irreversible de la enzima lleve el mecanismo de replicación a un mal funcionamiento y a la muerte celular (5).

Otra de las situaciones es la sunderencia de que *gcm* es esencial para la replicación del fago ϕ 174 (Fazio et al. 1975). Un estudio subsiguiente, sin embargo, no ha confirmado esta idea (Hattman et al. 1979).

Contrariamente a la información creciente acerca de las funciones biológicas para la metilación de adenina, los datos sobre el papel que desempeñan las citosinas metiladas son muy escasos. A través del uso de enzimas se ha mostrado que el DNA de células Dcm- es sustrato de EcoRII, lo cual sugiere que una función puede ser la protección del DNA del grupo de plasmidos que producen esta enzima de restricción.

DISTRIBUCION DE LA METILACION Dcm EN LAS BACTERIAS:

Las mutantes Dcm- no muestran cambios fenotípicos. Por ejemplo se sabe que esta metilación, presente en cepas de E. coli K-12 y E. coli C, está ausente en cepas de E. coli B, Staphylococcus aureus, así como en 10 diferentes especies de Bacillus estudiadas. (15, 18, 46, 68). La presencia de citosinas metiladas en CC(A/T)GG se ha reportado en Salmonella typhimurium y en Salmonella typhi. (20).

DISTRIBUCION DE SITIOS CC(A/T)GG EN EL CROMOSOMA DE E. coli:

Recientemente M. C. Gomez E. determino la distribución de los sitios Dcm en 49 secuencias de E. coli reportadas en el GENBANK. En total se analizaron 207,530 bases las que representan aproximadamente el 5.3% del genoma. Las principales observaciones de este análisis fueron: a. La

distancia máxima entre dos sitios Dcm nunca fue mayor a 2.000 bases. b) la secuencia CCTGG es más frecuente que la CCAGG. c) la frecuencia de CCTGG es mayor en regiones codificadoras que no codificadoras; mientras que para CCAGG es al revés d) los sitios Dcm a diferencia de los Dam, no mostraron un patrón regular de distribución e) En oriC hay 2 sitios Dcm; sin embargo, a diferencia de los sitios GATC que se encuentran conservados en 5 géneros diferentes de Eubacterias, estos no están conservados. También se analizó el uso de 5-MeC de las secuencias Dcm para formar codones. Este análisis mostró que 5-MeC se encuentra con más frecuencia en los codones CUG (leucina) y CAG (glutamina), en segundo lugar en CCU (prolina) y CCA (prolina) y finalmente en ACC. En el primer caso la 5-MeC está en la posición 1 del codón, en el segundo caso en la posición 2, y finalmente en el tercer caso en la posición 3. Este resultado es sorprendente ya que la 5-MeC tiene una probabilidad mayor de inducir mutaciones que la citosina no metilada. La mutación por transición C a T (U en el codón) de CUG genera UUG que también codifica para leucina y en cuyo caso la mutación es neutral; sin embargo, el codón CAG mutaría a UAG que es codón de terminación. Posiblemente este hecho explique la frecuencia menor de CCAGG en relación a CCTGG. Las mutaciones por transición C a T en CCU (prolina) generan CUU (leucina) y en CCA (prolina) generan CUA (leucina). Otro dato interesante de este análisis es que si bien los genes en general contienen un número similar de codones CUG y CAG, los genes

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

que contienen un número alto de sitios Dcm utilizan con frecuencia a los sitios Dcm para formar estos cocones, mientras que los genes con pocos sitios los usan poco. Esto sugiere que no existe una precisión estricta sobre las secuencias Dcm para formar a cocones CUG y CAG, que son de los cocones más abundantes. (55)

Desde que se demostró que la metilasa Dcm no se requiere para la viabilidad y que la EcoRII metilasa es muy similar a la metilasa Dcm se ha sugerido la posibilidad de que la adquisición de esta enzima pudo resultar de la integración de un plásmido N (o parte de este) en el cromosoma de un ancestro de E. coli K-12. Ese evento tal vez ocurrió después de la separación de E. coli K-12 y E. coli λ o también pudo ocurrir que el gen de la metilasa Dcm se perdiera en E. coli λ . (59)

Debido a que no se conoce la función de la metilación Dcm el determinar su distribución entre las subespecies nos permite saber si su localización es similar o no a Dcm. Así como poder evaluar la hipótesis de que si su función es la de proteger al DNA de la enzima EcoRII.

M A T E R I A L

Y

M E T O D O

A) MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES:

Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a una temperatura de 110 grados Centígrados y a una presión de 15 libras por 25 minutos.

Las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtrado a través de filtros Millipore HA 0.45 um. Los medios de cultivo con agar se vaciaron calientes en las cajas de Petri (20 ml/caja) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

MEDIO LURIA (LB)

Sacto triptona	10.0	g
Extracto de levadura	5.0	g
NaCl	10.0	g

Timina	0.02	g
NaOH (2.5 M aproximadamente)	1.0	ml
Agua desionizada	1	Lt
pH	7.0	

FLACAS DE AGAR (L1)

Bacto agar	20	g
Medio LB	1	Lt

FLACAS CON ANTIBIOTICOS

Cuando se uso algun antibiotico en las placas de agar, este se agrega despues de esterilizar el medio. a las siguientes concentraciones:

Ampicilina (Ap)	(200 uqs/ml)
Cloramfenicol (Cm)	(25 uqs/ml)
Espectinomicina (So)	(25 uqs/ml)
Estreptomocina (Sm)	(50 o 200 uqs/ml)

Kanamicina (Km)	(25 o 50 uqs/ml)
Acido Nalidixico (Nal)	(20 uqs/ml)
Tetraciclina (Tc)	(10, 12.5 o 25 uqs/ml)

MEDIO MCCONKEY

50 g de Medio McConkey (Difco) , Lt de agua.

PLACAS DE MEDIO MINIMO (M1)

NH4Cl	1.0	g
K2PO4	3.0	g
NaPO4	6.0	g
NaCl	0.5	g
Bacto-agar	20.0	g
Dextrosa 20%	10.0	ml
MgSO4 25%	1.0	ml
Vitamina B1 0.1%	0.1a	ml
Água desionizada	1	Lt

PLACAS DE MEDIO M5 Y M7

M5 se preparo igual a M1 excepto que lleva Leucina y Treonina (20 ugs/ml).

M7 se preparo igual a M1 excepto que lleva Leucina, Treonina e Histidina (20 ugs/ml).

MEDIO PARA ALMACENAR CEFAS EN CONDICIONES DE MICRO-AEROFILIA (STAB)

Bacto caldo nutritivo	1.0	g
NaCl	0.6	g
Bactoagar	0.6	g
Triptofano	0.1	ml
Agua desionizada	100	ml

MEDIO DE DILUCION (MD)

MgSO4 . 7 H2O	2.5	g
Agua desionizada	1	Lt

AMORTIGUADOR TE

Tris-HCl (pH 8.0)	10	mM
EDTA (pH 8.0)	1	mM

AMORTIGUADOR TBE (Buffer de Socrates 5X)

Trizma base	54.495	g
Acido bórico	27.823	g
EDTA (disodio)	4.2025	g
Aqua desionizada	1	Lt
pH final	8.2	

SOLUCIONES PARA LA PURIFICACION DEL DNA:

SOLUCION 1

Sacarosa 50%	50	ml
Tris 1M (pH 8.0)	5	ml
EDTA 0.25M (pH 8.0)	0.4	ml
Aqua desionizada	44.0	ml

SOLUCION 2

Tris-HCl 1M (pH 8.0)	1.25	ml
Agua desionizada	48.75	ml

SOLUCION 3 (Mezcla Litica):

Triton (10%)	1.5	ml
EDTA 0.25M (pH 8.0)	37.5	ml
Tris-HCl 1M (pH 8.0)	3.5	ml
Agua desionizada	7.5	ml

SOLUCIONES PARA GELES DE ACRILAMIDA:

Sol. A. Acrilamida 29.2%, Bis-acrilamida 0.8% (en agua).
Se filtró y guardó en frasco oscuro a 4 grados centigrados.

Sol. B. TBE 5%.

SOLUCIONES PARA PURIFICAR PLASMIDOS POR EL METODO DE
LISIS ALCALINA:

SOLUCION I

Glucosa	50	mm
EDTA	10	mm
Tris/HCl (pH 8.0)	25	mm
Lisozima	4	mg/ml

SOLUCION II (2ml)

Aqua desionizada	1.4	ml
SDS 10%	0.2	ml
NaOH 1M	0.4	ml

SOLUCION III (ACETATO DE POTASIO pH 4.8):

Acetato de potasio 5M	0.0	ml
Acido acetico	11.5	ml

Agua desionizada

26.5 ml

B) CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS:

Las cepas de Escherichia coli K-12 utilizadas en este trabajo fueron:

-W3110 prototrofa gcm+, Sm sensible; GMSO Gal-, Ara-, Lac-, Xyl-, Thr-, Leu-, Trp-, His-, Met-, Sm resistente, gcm+; Gm31 igual que la GMSO pero gcm-, se usaron como cepas control. Además se utilizaron las cepas G600 Leu-, la J53 Met- Fro-.

Las otras cepas bacterianas se muestran en la Tabla I.

Los plasmidos utilizados en este trabajo fueron:

-PBF322 (2,600,000 daltones). Confiere resistencia a Ab y Tc.

-R1-19 (60,000,000 daltones). Ina+, confiere resistencia a Ab, Cm, Km, Sm, Sp y sulfonamidas (Su).

-RP4 (36,000,000 daltones). confiere resistencia a Km, Tc y Ap.

-N3 (33,000,000 daltones). Tra+. confiere resistencia a Tc, Sm, Sp, Su y Mercurio (Hg). Contiene los genes del sistema modificacion restriccion EcoRII.

C) METODOS DE MICROBIOLOGIA GENERAL:

-CONSERVACION DE LAS CEFAS BACTERIANAS

La conservacion de las bacterias con periodos largos, se llevo a cabo en condiciones de micro-aerofilia. A partir de un cultivo en medio solido, se sembró por picuete una muestra del cepado bacteriano en un tubo (STAB) el cual se tubo y sello con parafina. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar oscuro.

-CULTIVOS BACTERIANOS

Para obtener cultivos puros de bacterias en medio solido se llevo a cabo la siembra por estria, que es en general el metodo mas util de sembrar en placa. El asa bacteriologica esteril se introdujo en una suspension de cultivo fresco para obtener un inoculo; en seguida se estrio este inoculo formando estrias paralelas, no superpuestas, sobre una caja de agar solido. El inoculo se va diluyendo progresivamente

con cada estria sucesiva, de tal manera que si las estrias iniciales proporcionan un crecimiento confluyente, a lo largo de las ultimas estrias crecen colonias aisladas.

-IDENTIFICACION FENOTIPICA DE LAS BACTERIAS:

La verificación de las características de auxotrofia de las cepas se realizó sembrándolas en medios de cultivo específicos.

Determinación del patrón de resistencia a antibióticos:

Las bacterias se espatularon en placas con Li y se incubaron a 37 grados centígrados para obtener colonias aisladas. De cada cepa, se traspasaron de 20-100 colonias aisladas a una caja de Li, utilizando palillos de madera estériles y se incubaron a 37 grados centígrados de 14-16 hrs.

Se duplicaron los parches por el método de replica de placas (Miller, 1972), en los medios con los antibióticos adecuados para verificar la presencia de los marcadores de resistencia del plasmido y de la cepa correspondiente. Se incubaron las cajas a 37 grados centígrados de 14-16 hrs.

-IDENTIFICACION DEL TAMAÑO DEL PLASMIDO N3:

De la cepa J53/N3 se aisló el plasmido de interés por el método de lisis alcalina.

Se tomaron como patrones los plásmidos A1-17 y FF4 de las cepas C600 y de la J53 respectivamente. La N3110 sirvió para determinar la banda cromosómica

-OBTENCION DE CUENTAS VIABLES:

Para determinar el número de células viables por ml de cultivo bacteriano se utilizó la metodología propuesta por Miller (1972), descrita a continuación.

El cultivo se diluyó de manera seriada en MD. Las soluciones adecuadas para un cultivo con una μ (550 nm) de 0.4 fueron 1/10,000 y 1/100,000. Se sembraron por espatulado 100 μ l de cada dilución en placas de L1. Las placas se incubaron a 37 grados centígrados de 14-18 hrs. con el fin de obtener colonias aisladas y cuantificar el número de células viables en el cultivo, ya que cada célula forma una colonia bacteriana.

-CONJUGACION BACTERIANA:

En este trabajo se utilizaron dos métodos de

conjugación.

a) Conjugación cuantitativa (en líquido):

Se cultivo cada cepa bacteriana hasta una densidad celular aproximada de 100,000,000 células por ml, una alícuota de cada cultivo se incubó a 4 grados centígrados para hacer cuentas viables. A partir de esta alícuota se hicieron cuentas viables con el fin de calcular el número de bacterias por ml utilizadas para la conjugación. Como control se sembraron 100 ul del cultivo sin diluir y de una dilución 1/10, en medio con el antibiótico usado para seleccionar a las exconjugantes. Esto es con el fin de cuantificar las posibles mutantes espontáneas resistentes a los antibióticos utilizados en los medios selectivos.

En un matraz de 125 ml se mezclaron la cepa donadora y la receptora en una relación 1:5-10.

La mezcla de conjugación se incubó a 37 grados centígrados sin agitación por una hora. Al finalizar este tiempo se interrumpió la conjugación mediante agitación con vortex e incubación en hielo.

La mezcla de conjugación se diluyó 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10,000 en MD. Las diluciones se sembraron en el medio selectivo (100 ul x muestra). Las placas se incubaron a 37 grados centígrados por 2 días.

Para evitar cepas no conjugantes que pudieran encontrarse bajo las colonias, se tomo una muestra de las que crecieron en el medio selectivo, se resuspendio en un mililitro de Luria agitando fuertemente y se sembro en un medio selectivo fresco junto con los controles.

Se realizo la determinacion fenotipica de las colonias resultantes.

b) Conjugacion no cuantitativa en solido:

Se coloco en cada tubo 1ml de Luria con un inoculo de las diferentes cepas. Posteriormente se mezclaron 200 ul de la receptora y 50 ul de la cepa donadora.

La mezcla se sembro en placas de Li. Las placas se incubaron a 37 grados centigrados por 2 dias. Una muestra de ese cultivo mixto se resuspendio en 1 ml de Luria, se agito fuertemente y se sembro en los medios selectivos. Posteriormente se verifico el fenotipo de las colonias ex-conjugantes.

-OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS A RIFAMPICINA:

Para obtener cepas mutantes espontaneas resistentes a

Rifampicina se sembraron 50 y 100 μ l de un cultivo de una noche de la cepa original sensible a Rifampicina en cajas de Luria con 50 μ g/ml de Rifampicina. Las cajas se incubaron a 37 grados centigrados por 24-48 hrs. Las colonias resultantes se purificaron estirandolas por separado en cajas de L1 con Rifampicina.

D) METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

-PURIFICACION DE DNA:

1. Tomar una asada de la cepa e inocular 2-3 ml de caldo Luria. Incubar a 37 grados centigrados por 16 hrs. Este cultivo se denomina cultivo de una noche.
2. Inocular 0.3 ml del cultivo de una noche en 10 ml de caldo Luria. Incubar en un matraz nefelometrico de 250 ml a 37 grados centigrados con agitacion moderada (aproximadamente 150-150 rev/min.).
3. Procesar las células cuando estas presenten una densidad optica (60) a 550nm de 0.8-1.0 unidades. Centrifugar el cultivo a 5.000 rpm por 10 min.

4. Incubar la pastilla a -20 grados centigrados.
(Este paso se puede omitir y proceder directamente a la lisis)

5. Descongelar la pastilla a temperatura ambiente.
Resuspendirla en 1 ml de la solución 1.

a. Añadir:

250 ul de EDTA 0.25 M en 2.0

50 ul de lisozima (10mg/ml en Tris-HCl) 0.025M
en 2.0)

7. Incubar a temperatura ambiente por 10-15 min.

B. Añadir:

500 ul de la mezcla lítica (Sol III).

9. Incubar a temperatura ambiente por 15 min. y si la solución no está viscosa, incubar otros 15 min a 37 grados centigrados.

10. Calcular el volumen del sobrenadante y añadir 1 vol de TE (Maniatis).

Dejarlo en frio por 12 hrs.

11. Iniciar la extracción en tubos de eoca ancha con Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.

La extracción se hace de la siguiente manera:

Añadir 1.5 ml de fenol, mezclar, añadir 1.5 ml de cloroformo/isoamílico (25:1 v/v) mezclar.

Posteriormente centrifugar a 10,000 rpm por 15-20 min. Tomar con cuidado la fase acuosa superior, pasarla a un tubo limpio y repetir la extracción hasta que no se observe la capa blanca de proteínas precipitadas en la interfase.

Todos los casos se hacen agitando suavemente

12. Añadir 2/25 del volumen de NaCl 2.5 M.

13. Añadir 2.5 vol de etanol absoluto.

14. Con una varilla de vidrio delgada y limpia mezclar suave y lentamente la fase superior (etanol) y la inferior. Recoger las fibras de DNA. Llevar estas fibras en etanol al 70% fríg. Para esto introducir la varilla varias veces en el etanol, escurrir y dejar

secar a temperatura ambiente.

15. Resuspender el DNA en 500 ul de TE estéril y filtrado a través de filtros Millipore HA. 0.45 u.

16. Incubar el tubo con NaCl y etanol a -20 grados centígrados para que al día siguiente o 4 hrs después se centrifugue a 10,000 rpm por 10-20 min. obtener el DNA que no se recogio por varilla. Se desecha el sobrenadante, se lava la pastilla con etanol al 70% y se deja secar posteriormente. se resuspende en 500 ul de TE.

17. El DNA se cuantifica con la siguiente formula:

$$\text{DNA (ugs/ml)} = \text{Unidades de Densidad optica} \times 250 \text{ ng} \\ (\text{LO } 250) \times 50. \text{ El DNA se puede también cuantificar de manera aproximada por su visualización en gel de agarosa (ver mas adelante).}$$

-DIGESTION DEL DNA CON LA ENZIMA DE RESTRICION EcoRII-

Se digirieron de 1-3 ugs de los DNAs de las cepas estudiadas con la enzima de restriccion EcoRII. Las condiciones de restriccion fueron las establecidas por el proveedor (BRL. Bethesda Research Laboratories, USA.). Estas condiciones de reaccion fueron: 1-3 ugs de DNA; 1-3 unidades

de enzima y de 15-25 ul del siguiente amortiguador:

Tris-HCl (pH 7.4)	50 mM
KCl	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	1 mM.

La mezcla de reacción se incubó a 37 grados centígrados por 3-24 hrs. Al final de la reacción se añadieron 2 ul de una solución de etanol alileno al 0.25%, azul de bromotoleno al 0.25% y glicerol en agua al 30% (manetas).

- SEPARACION DE MOLECULAS DE DNA POR ELECTROFRESIS EN GELES DE AGAROSA O ACRILAMIDA:

Las muestras de DNA en la solución Glicerol-colorantes se aplicaron directamente a los pozos de los geles de agarosa o acrilamida para su separación por electroforesis. Los geles utilizados en este proceso fueron los siguientes:

-Geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 1% en amortiguador TBE 1X.

Con agarosa se prepararon 2 tipos de geles:

MINIGELS.- gel horizontal con un tamaño aproximado de 7x10. La electroforesis se corrió con amortiguador TBE 1X a 60-70 Volts por aproximadamente 2 hrs.

GEL ESTÁNDAR.- gel horizontal con un tamaño de 10x14 cm y 1.5 mm de espesor. Este gel se corrió con TBE 1X a 20 volts por un tiempo aproximado de 3 hrs.

-Geles de acrilamida. Los geles de acrilamida se prepararon al 7.5% de la siguiente manera:

Sol A	7.5 ml
Agua	16.4 ml
Sol.B.	6.0 ml
Persulfato de sodio 10%	250.0 ul

La solución se preparó en un matraz pitasato y se conectó al vacío por 15 min.

Se añadió TEMED 20 ul y se vació.

Se dejó gelificar por aproximadamente 30-45 min.

El gel se corrió en amortiguador TBE 1X a 80-120 V, por 2-3 hrs.

- VISUALIZACION DEL DNA:

Al termino de la electroforesis, los geles se incubaron con bromuro de etidio [0.5 microgramos/ml] por 2-3 hrs; el DNA se visualizo con un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografio con una camara Polaroid, utilizando un filtro rojo.

RESULTADOS

PURIFICACION Y CUANTIFICACION DEL DNA DE DIFERENTES BACTERIAS

Para purificar el DNA de las diferentes cepas bacterianas seleccionadas para este estudio, se utilizo el método descrito en Material y Metodos. Sin embargo, este método no fue efectivo en el caso de varias cepas. Los principales problemas y su solución fueron:

- Lisis celular incompleta.- este factor depende de la cepa que se trabaje ya que algunas cepas fueron mas difíciles de romper debido a su composición; en estos casos, se incremento el tiempo de incubación a temperatura ambiente con la lisozima y finalmente se incubo por 30 min. a 37 grados centígrados.

- Presencia de un precipitado importante de proteínas desnaturalizadas en la interfase fenol-cloroformo-isoamilico/lisado celular. En este caso, el lisado se extrajo repetidamente, hasta obtener una interfase limpia. Las cepas que presentaron este problema, dieron un rendimiento bajo de DNA final y muchas veces este se encontro muy fragmentado.

- Obtencion de fragmentos pequeños de DNA. La obtencion de

DNA con una varilla de vidrio, que generalmente asegura la limpieza del DNA, unicamente es posible si se obtiene un lisado claro con fragmentos grandes de DNA. En los casos en que no se obtuvo DNA por medio de varilla, este se precipit6 con 2/25 de volumen de NaCl a 2.5M y 2 volúmenes de etanol. La pastilla de DNA se lavo con etanol al 70% para disminuir la cantidad de sal y permitir la actividad de la endonucleasa EcoRII.

- DNA no limpio. En la mayoría de los casos casto con una nueva precipitación con 2 volúmenes de etanol y 1/25 de volumen de NaCl a 2.5M. (Material y Metodos).

Para poder realizar una cuantificación de la concentración de DNA en las muestras, en un principio se procedió a una lectura en un espectrofotómetro (DU 260nm), con esto se pudo calcular la cantidad de ácidos nucleicos; sin embargo, este método puede no cuantificar con precisión la concentración de DNA. En el precipitado final de etanol, además del DNA precipita el RNA y las proteínas. Estas moléculas absorben también a DU 260nm. Para una cuantificación más adecuada a nuestros objetivos, se eligió el de su visualización en geles de agarosa teñidos con BrEt utilizando un patrón de referencia y pudiendo así extrapolarlo a nuestra muestra.

El rendimiento fue muy variado ya que dependió tanto de

la cepa como de los problemas que se presentan en los diferentes pasos de purificación. La obtención del DNA de las cepas Gram+ (Clostridium) fue más complicado ya que presentaron un gran precipitado en la interfase al realizarse la extracción fenol/cloroformo/isoamílico en comparación con las Gram-.

Hubo casos en que no se logró obtener DNA, por el contrario otros en que se obtuvo hasta un total de 500 ugs de DNA por 10 ml de cultivo inicial.

RESTRICCIÓN DEL DNA DE DIFERENTES BACTERIAS CON LA ENDONUCLEASA EcoRII

La presencia o ausencia del patrón de metilación Dcm (metilación en la segunda citosina de la secuencia CC(A/T)GG), fue determinada mediante la digestión del DNA problema con la enzima de restricción EcoRII. Esta enzima presenta la característica de cortar el DNA si no está metilado en los sitios CC(A/T)GG. En general el DNA colectado por varilla de vidrio, presentó un grado de pureza adecuado; sin embargo, a varias muestras de DNA precipitadas con etanol fue necesario re-purificarlas (como se describe en Material y Métodos). La digestión del pBR322 purificado de una cepa dcm- y mezclado con la muestra de DNA cromosómico se tomó como

prueba de pureza del DNA.

La separación de las moléculas de DNA, posterior a la digestión con la endonucleasa EcoRII, se realizó por electroforesis en geles de acrilamida al 7.5%, ya que permiten una buena separación de los fragmentos del DNA control (pBR322).

El DNA de las bacterias Dcm⁺ no se digiere con EcoRII por lo que aparece en estos geles como una banda en la parte superior del gel (Fig 9 (7,10); Fig 10 (7,10); Fig 11 (5,6)). Por otra parte, la digestión del DNA total de una bacteria Dcm⁻ genera un gran número de fragmentos de tamaño diferente, lo que en el gel se visualiza como un barrido continuo.

En algunas cepas, se llegó a observar bandas sobre el barrido de fondo. Estas bandas pueden generarse por la presencia en estas cepas de uno o más plásmidos o por la existencia de secuencias cromosómicas repetidas.

Cuando a las muestras de DNA de bacterias Dcm⁺ se les añade DNA de pBR322 también se observa un barrido de fondo con bandas (Fig 9 (4) y Fig 10 (4)). En estos casos los fragmentos EcoRII del plásmido se visualizan claramente sobre el barrido de los fragmentos de DNA cromosómico.

Los resultados de la digestión de los DNA's extraídos de diferentes bacterias con EcoRII, se muestran en la Tabla VII. En esta Tabla, al igual que en la Tabla VI, los géneros bacterianos están ordenados de acuerdo a sus relaciones filogenéticas.

Como se menciona en la introducción, esta distribución filogenética fue tomada del árbol de Woese modificado por Ochman y Wilson, y los géneros Citrobacter y Enterobacter no presentes en este árbol, se intercalaron de acuerdo al porcentaje de hibridación de su DNA con el DNA de E. coli (ver Introducción)

En los resultados de este trabajo (Tabla VII) se muestra que el patrón de metilación en citosina Dcm presenta una localización filogenética muy definida:

Géneros Dcm+: Escherichia, Shigella, Citrobacter, Salmonella y Klebsiella.

Como se observa, la metilación Dcm está presente únicamente en los géneros de la familia Enterobacteriaceae más relacionados a Escherichia. Estos resultados contrastan con los reportes sobre la distribución del patrón de metilación en adenina Dam, el cual se encuentra en un gran número de géneros bacterianos incluyendo incluso algunos

generos Gram positivos.

TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DEL PLASMIDO N3 A CELAS DE
E. coli Dcm- Y Dcm+

Teniendo como hipotesis que la funcion de la metilasa Dcm es el de proteger el DNA de las bacterias contra la degradacion de los plasmidos tipo N se realizo el siguiente experimento:

Se introdujo un plasmido tipo N3 que presenta los genes para la metilasa tipo Dcm y para la endonucleasa EcoRII (Sistema de Modificacion-Restriccion EcoRII o HaeII) en ceas Dcm+ y Dcm-.

Si la hipotesis es cierta; es decir, si el patron Dcm protege de la degradacion in vivo por EcoRII, se esperaria la obtencion de exconjugantes con N3 unicamente en ceas Dcm+. Las ex-conjugantes Dcm-/N3 no serian viables, ya que, el DNA cromosomal seria degradado por EcoRII.

Sin embargo, existen reportes en la literatura de que existen Sistemas de Modificación- Restriccion que pueden ser introducidos a células que no tienen protegido el DNA por

metilacion, sin causar la muerte celular. En estos casos la enzima de modificacion (metilasa) se expresa primero o es más activa que la de restriccion, de tal forma que el DNA cromosomico se metila y protege de la accion de la enzima de restriccion.

Para comenzar este experimento fue necesario verificar que el plásmido N3 fuera el correcto:

a) VISUALIZACION DEL TAMAÑO DEL PLASMIDO N3:

Para determinar el tamaño del plásmido se llevo a cabo la purificacion de los siguientes plásmidos:

PLASMIDO CEPA HUESPED

-RP4	(J53)	control
-R1-19	(C600)	control
-N3	(J53)	

Esta se realizo por el metodo de lisis alcalina ya mencionado. Los plásmidos RP4 y R1-19 se usaron como controles ya que su tamaño nos permite calcular el del plásmido N3.

Los tamaños reportados en la bibliografía son:

R1-1963,000,000 daltons.

RF436,000,000 daltons.

N333,000,000 daltons

Se utilizó a la cepa W3110 como control para determinar la banda cromosomal.

Se efectuó una electroforesis en geles verticales de agarosa al 1%, a 120 Volts por 3 horas.

Los resultados mostraron que el plásmido N3 tiene un tamaño menor al R1-17 pero mayor al RF4. Esto sugiere que posiblemente el plásmido N3 que se recibió en el laboratorio no es igual al N3 descrito en la literatura.

F + R1-17

a . N3

s . RF4

o - Banda cromosomal

b) VERIFICACION DEL FENOTIPO DE LA CEPA J53/N3:

El fenotipo reportado para la cepa J53 es Nat⁻, Fro⁻, Lac⁻, Hal resistente, mientras que el plásmido N3 (tray) confiere resistencia a Sm, Sp, Su, Tc, mg, contiene el Sistema HBB1 (ESCR11).

Los resultados fueron:

J53/N3 .-Cm, Sp, Sm, Tc, Nal resistente, Mi-, Lac-.

El fenotipo que se obtuvo concuerda con el esperado excepto que el plasmido confiere además resistencia a Cm, la cual, no está reportada para el N3 original. Sin embargo, existen varios plasmidos tipo N3 que contienen el gen de resistencia a Cm.

c) TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DEL PLASMIDO N3 A E. coli

Dcm-, Dcm-.

Para realizar la conjugación fueron elegidas como cepas receptoras las cepas E. coli K-12 la GM30 dcm+ y la GM31 dcm-.

Como cepa donadora se utilizó la J53/N3.

Tomando en cuenta la hipótesis mencionada, las ideas iniciales fueron:

No se esperaban conjugantes de la cepa GM31 a diferencia de la GM30, ya que en ésta el DNA está metilado en la segunda

citosina de la secuencia CC(A/T)GG, lo cual le sirve de protección contra la degradación por el plásmido N3 que codifica para una endonucleasa EcoRII.

Para la conjugación en líquido se utilizó un medio Luria con Sm 400 ug/ml y Tc 10 ug/ml.

La conjugación en líquido no dio resultados positivos debido a que los pili de la cepa J53/N3 son rígidos y estos conjugan con mayor eficiencia en sólido, además que el medio selectivo no fue el adecuado, por lo que posteriormente se realizó una conjugación en sólido.

Para la conjugación en sólido se prepararon 3 medios selectivos diferentes:

-ST = Sm 400 y Tc 10

-RT = Rif 50 y Tc 10

-SRT = Sm 400 , Tc 10 y Rif 50

La conjugación en sólido nos permite llevar a cabo una cuantificación de la eficacia de transferencia del plásmido. Para la conjugación en sólido se aislaron mutantes espontáneos a Rifamicina que permitieran la preparación de un medio selectivo más potente, ya que la presencia de

resistencia a Sm no fue suficiente para una buena seleccion de ex-conjugantes GM30 y GM31 con N3.

Las mutantes espontaneas Rifampicina resistentes dieron buen resultado, ya que en la caja selectiva (con Rifampicina) solo crecieron las cepas receptoras y no la donadora , lo que permitio utilizar estas cepas resistentes a Rifampicina para poder preparar un medio selectivo mas adecuado.

d) ANALISIS DE LAS CEPAS EX-CONJUGANTES (FENOTIPO):

1.- La conjugacion realizada en medio luria no fue util ya que los controles asi como las supuestas conjugantes crecieron en el medio selectivo en gran proporcion ademas las que aparentemente eran conjugantes (GM31/N3 y GM30/N3) resultaron ser de la cepa J53/N3 que habian adquirido la resistencia tanto a Tc como a Sm.

2.- La conjugacion realizada en solido con las cepas resistentes a Rifampicina fue exitosa. Se obtuvieron conjugantes tanto de la GM31 Rifampicina resistente (Dcm-) como de la GM30 Rifampicina resistente (Dcm+), lo cual hace sospechar que la hipotesis de que la función de la metilasa tipo Dcm es proteger a la bacteria de la degradacion de su DNA por el plasmido N3 no es correcta. Sin embargo, el Plasmido N3 no presento el peso molecular ni el fenotipo

descrito para este plásmido, por tanto se procedió directamente al paso siguiente.

DETERMINACION DEL PATRON DE METILACION Dcm EN LAS CEPAS EX-CONJUGANTES Dcm-7N3

Se llevo a cabo el método de purificación del DNA tanto de las cepas conjugantes (GMS1 Rifampicina resistente/N3 y GMS0 Rifampicina resistente/ND) como de las cepas controles (GMS1 y GMS0 resistentes a Rifampicina y de la 253.43). Posteriormente se determino la existencia o ausencia de la metilacion tipo Dcm. Los resultados se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. DETERMINACION DEL PATRON DCM EN LAS CEPAS E1-
 CONJUGANTES GMSO Dcm+/NS ; GMS1 DCM-/NS *

CEFA	METILACION Dcm**
GMS1 Rifampicina resistente	-
GMSO Rifampicina resistente	+
J53/NS	-
GMS1 Rifampicina resistente/NS	-
GMSO Rifampicina resistente/NS	+

* El patrón de metilación Dcm se determinó como se describe en Material y Métodos.

** +, Presencia de la metilación Dcm; -, ausencia de la metilación Dcm.

Con estos resultados solo se pudo concluir que el plásmido no era el adecuado, ya que al parecer carece del Sistema Modificación-Restricción EcoRII.

D I S C U S I O N

El objetivo de este trabajo fue determinar la distribución del patrón de metilación Dcm, ya que esta es un primer paso para entender su función, la cual ha sido difícil de deducir ya a que las mutantes dcm- no muestran modificaciones fenotípicas.

A diferencia de la metilación Dcm, de la metilación Dam se conoce más de su distribución, además de que las mutantes dam- si presentan un claro cambio fenotípico, gracias a lo cual se entiende más acerca de su función. Se conoce que tiene un papel importante en la reparación post-replicativa de apareamientos de bases erróneas, coordina la expresión de algunos genes con la replicación del DNA, asegura la movilización de algunos transposones únicamente durante la replicación, etc.

Como ya se menciona, para realizar este trabajo nos basamos en un árbol de relaciones filogenéticas propuestas por Ochman y Wilson. Las bacterias que se utilizaron están enlistadas de acuerdo a este árbol (Tablas VI y VII). En este árbol no se encuentran los géneros Citrobacter y Enterobacter. Como se observa Citrobacter está enlistado entre Shigella y Salmonella y Enterobacter entre Yersinia y Serratia, esto fue determinado de acuerdo a los porcentajes

obtenidos en un trabajo de hibridación DNA-DNA, en donde el DNA de E. coli presenta un porcentaje de hibridación de 50-59% y del 37% con el DNA de Citrobacter y de Enterobacter respectivamente. El porcentaje reportado para el DNA de Shigella, Salmonella, Klebsiella y Serratia es de 84-100%, 45%, 38% y 24%, respectivamente.

Como se puede apreciar los porcentajes concuerdan con la distribución en el árbol filogenético.

Al correlacionar la distribución de la metilación Dcm con el árbol filogenético escogido, se observa que esta metilación está presente en géneros de la familia Enterobacteriaceae y de estos únicamente en los más relacionados a Escherichia, lo que contrasta con la metilación Dam la cual se encuentra presente en un gran número de géneros bacterianos, incluyendo a algunos Gram+.

La distribución filogenética de esta metilación sugiere que la metilación Dcm apareció cuando divergieron Escherichia de Klebsiella, es decir, poco antes de la fecha en que se separaron Escherichia de Salmonella, esto es hace aproximadamente 120-160 millones de años. Esta fecha fue calculada mediante comparaciones de secuencias del rRNA y concuerda con el origen de los mamíferos, ya que se sabe que E. coli no habita en el colon de los mamíferos, ni fermentos de la lactosa de la leche, mientras S. typhimurium es un

patógeno que típicamente parasita mamíferos. Por tanto, se podría decir que es un gene que apareció recientemente.

Los resultados también nos hacen pensar que la metilación Dcm tiene una función biológica muy específica. Además sugieren que el gene dcm no es un gene que se transmite horizontalmente sino que posiblemente su transmisión es vertical. Este gene tal vez se adquirió a nivel de un ancestro común de Escherichia y Klebsiella. (como ya se mencionó). También es posible que fuera común a las Enterobacterias y que una rama lo perdió. Una forma de probar esta hipótesis sería mediante la hibridación de una sonda del gene dcm con el DNA de células dcm- y observar si la no funcionalidad se debe a una mutación o realmente no está presente.

En el caso de E. coli, llama la atención que E. coliB sea Dcm -, debido a que otras cepas de Escherichia como E. plattae y E. fergusonii tienen a la metilasa Dcm. En E. coliB sería interesante determinar la presencia de secuencias similares al gene dcm ya que probablemente el que esta bacteria no tenga esta metilación puede deberse a la existencia de un gene mutado.

Recientemente (1990) se descubrió en E. coliK-12 la presencia de un gene var adyacente al gene dcm, el cual, como ya se mencionó codifica para una enzima capaz de reparar los

apareamientos erróneos generados por la deaminación de 5MeC. Como se sabe, la citosina metilada presenta una frecuencia alta de mutaciones espontáneas por transición. Sería importante verificar si el arreglo genético dcm vsr se encuentra presente en todas las bacterias Dcm.

Se compararon los genes dcm-vsr con el Sistema de Modificación-R restricción EcoRII, y se observó que los genes de las metilasas en los dos sistemas presentan gran semejanza. Mediante un alineamiento de las secuencias de 444 aminoácidos de las dos proteínas, el 66.2% de residuos fueron idénticos. La secuencia consenso fue vista también a nivel de DNA. En un segmento de 1,427 pares de bases que parten de cerca de 40 pares de bases antes del codón inicial AUG del gene dcm y de 40 pares de bases antes del codón terminal de este, se encontró un 66.1% de similitud entre las dos secuencias. Claramente Dcm y EcoRII están relacionadas evolutivamente, sin embargo, el gene de la endonucleasa EcoRII no se relaciona con el gene vsr. La proximidad del gene de la endonucleasa y el de la metilasa en el Sistema EcoRII aseguran la transferencia coordinada de ambos, lo cual es útil para un Sistema de Modificación-R restricción. Así, el arreglo del gene dcm-vsr parece permitir una regulación coordinada de los genes. (fig 12).

Se ha propuesto como posible función de la metilación Dcm la protección del DNA de las bacterias contra la

degradacion por parte de la endonucleasa EcoRII codificada por algunos plasmidos del grupo H. Los resultados muestran una distribucion muy limitada. Si la hipotesis acerca de su funcion es correcta, habria que suponer que los plasmidos tipo H3 que codifican para el sistema Modificacion-Restriccion EcoRII presentan un rango de hospedeces restringido a aquellas bacterias que son Dcm⁻, es decir, tendrian que ser muy especificos. Sin embargo, existen reportes de aislamiento de plasmidos tipo H3 en Proteus. Esto podria explicarse solo si esas cepas de Proteus fueran Dcm⁺ o bien, si los plasmidos tipo H3 tienen la capacidad de establecerse en celulas Dcm⁻ y Dcm⁺. Para esto seria necesario que la metilasa EcoRII se expresara o fuera mas activa que la endonucleasa EcoRII. En este trabajo se intento probar experimentalmente esta hipotesis mediante la conjugacion de la cepa J55/H3 con celulas Dcm⁻ (GM31) y Dcm⁺ (GM30) y de esta manera ver la actividad del Sistema EcoRII. sin embargo, no fue posible realizar este estudio, ya que al parecer el plasmido que se uso no contenia el gene de la metilasa.

Una de las mayores aportaciones de los resultados presentados en este trabajo es el permitir plantear preguntas que posiblemente lleven a una mejor comprension de la funcion de la metilacion Dcm en eubacterias, hasta ahora desconocida.

CONCLUSIONES

A diferencia de la metilación Dam, la cual esta presente en todos los generos de la familia Enterobacteriaceae, asi como en otros generos; la metilacion Dcm solo se encuentra en los generos de la familia Enterobacteriaceae mas relacionados con Escherichia: Shigella, Citrobacter, Salmonella, Klebsiella. Todas las cepas de Escherichia analizadas, E. coli, E. blattae, E. fergusonii, fueron Dcm+. Este resultado sugiere que E. coli B, que es Dcm-, posiblemente tiene un gene dcm mutado.

La distribucion del patrón de metilacion Dcm reportado en esta tesis sugiere que este tipo de metilacion aparecio más recientemente y tiene una funcion biologica mas especifica que la metilacion Dam. Una posible funcion de la metilacion Dcm es la proteccion del DNA celular de la digestion por la endonucleasa EccRII codificada por genes presentes en algunos plásmidos; sin embargo, esos plásmidos han sido reportados en cepas de Proteus que de nuestros resultados sabemos que son Dcm-. Es importante demostrar el patrón Dcm en mas cepas de Proteus para ver que tan general es que sean Dcm-. Si la metilacion Dcm sirve para proteger al DNA se vuelve de gran importancia demostrarlo y para esto habria que hacer un estudio relativo a las actividades de la

endonucleasa y metilasa EcoRII después de transferir un plasmido que codifique para estas dos enzimas a cepas Dcm+ y Dcm-.

FIGURAS

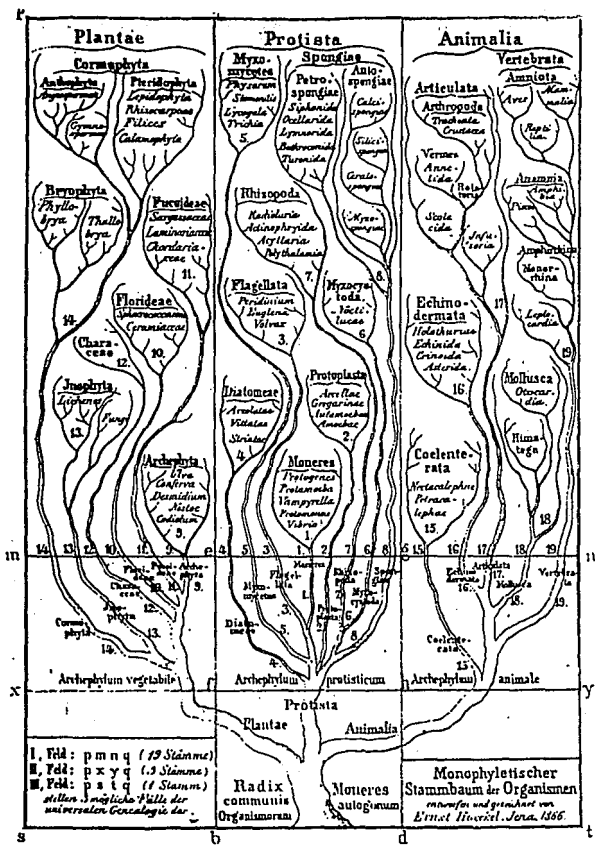


FIG. 1. Arbol filogenético de Haeckel de 1866. Tomada de: Woese R. C. (1987). Bacterial Evolution. *MoI. Reviews*. 51(2):221-271. Illinois.

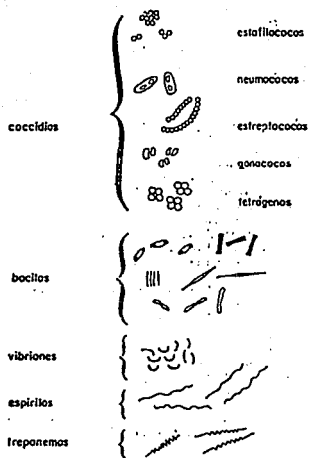


Fig.2. Formas y agrupaciones de las bacterias. Tomado de: Budin Jean-Claude y De Lavigne E. (1987). Las bacterias. Fondo de Cultura Económica, Mexico.

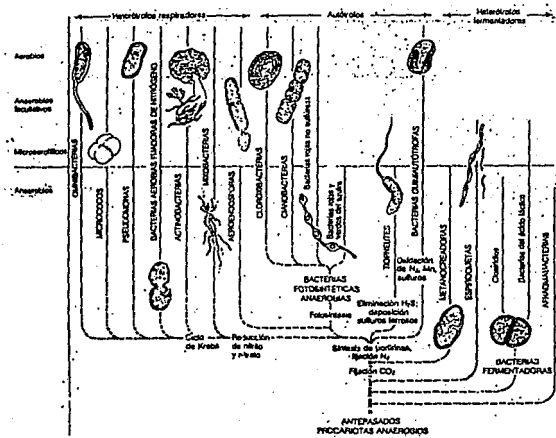


Fig.3. Arbol Filogenético compuesto. Tomada del: Marquis L. y Schwartz V. (1987). Cinco Reinos. Ciencias. (por una educación popular).

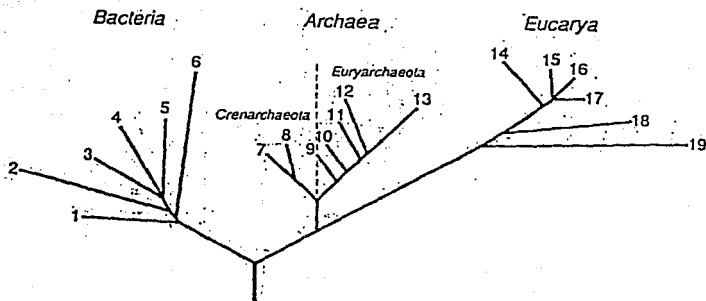


Fig.4. Arbol filogenético universal mostrando los tres dominios y algunos de los reinos propuestos por Woese y col. (1990). La posición relativa de las ramas fue definida por el análisis de rRNA 16S. La posición de la raíz fue inferida de un análisis de genes parálogos (genes que divergieron el uno del otro antes de la separación de los dominios). Tomada de Segovia F. P. L. (1991). Taxonomía y filogenia de *Coccoloba Rizobium leguminosarum*. Cuernavaca Morelos. UNAM.

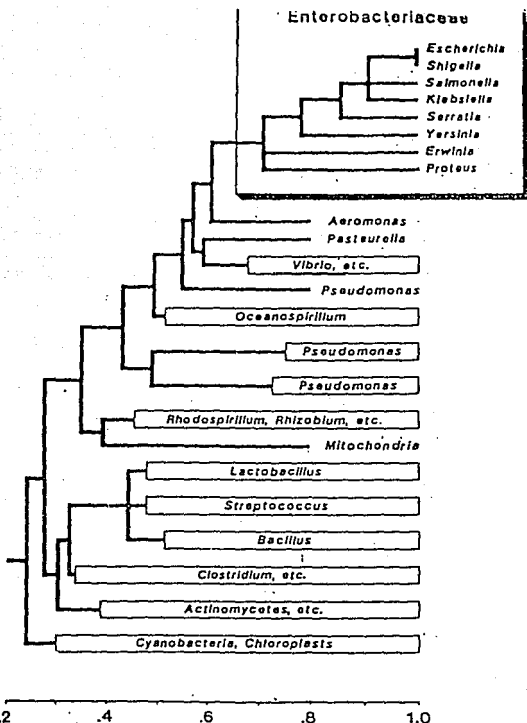
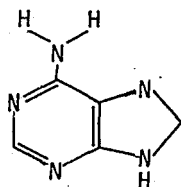
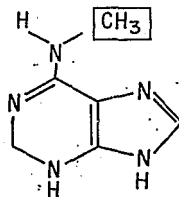


Fig. 5. Relaciones filogenéticas entre eubacterias. Este árbol está basado en secuencias nucleotídicas parciales del rRNA 16S de eubacteria, cloroplastos y mitocondria. La relación entre los miembros de las Enterobacteriaceae se determinó además por comparaciones inmunológicas de las enzimas fosfatasa alcalina y las de la biosíntesis de triptófano. El coeficiente Sab es una medida indirecta del grado de homología de las secuencias donde Sab=1 denota completa homología. Las barras reflejan el nivel de relación entre 2 ó más especies en un grupo taxonómico. Tomada de: Ochman H. y Wilson A. Evolutionary History of Enteric Bacteria. Dept. of Biochemistry, University of California, Berkeley.

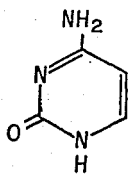


ADENINA

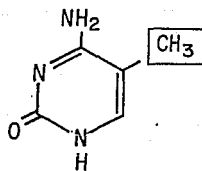


6-METILADENINA

Fig. 6. Adenina y metil.



CITOSINA



5-METIL CITOSINA

Fig.7. Citosina y 5MeC.

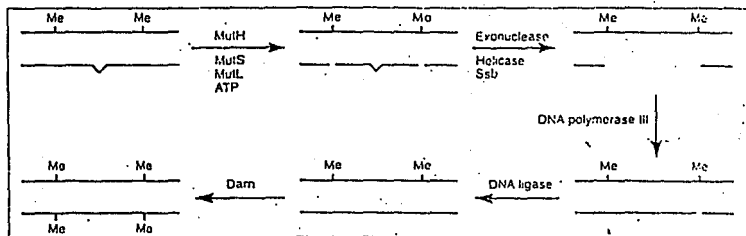


Fig. 8. Reparación de bases mismatch en DNA no metilado. Tomada de: Barras, F. y Narisus H. (1987). The Great GATC: DNA methylation in E. coli, 5:139-143.

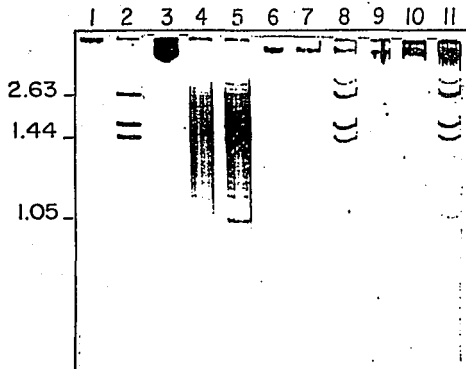


Fig. 7. Separación de electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% de DNA digerido con *EcoRII*. El DNA del plasmido pBR322 (10 μ g) aislado de la ceca GM31 ~~como~~ se adiciona a las muestras del DNA bacteriano (5), (8) y (11). Las cebras bacterianas fueron: (3) *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), sin enzima; (4) *P. aeruginosa*, *EcoRII*; (5) *Klebsiella pneumoniae*, sin enzima; (7) *K. pneumoniae*, *EcoRII*; (8) *K. pneumoniae*, (DNA de pBR322), *EcoRII*; (9) *K. oxytoca*, sin enzima; (10) *K. oxytoca*, *EcoRII*; (11) *K. oxytoca*, (DNA de pBR322), *EcoRII*. Se utilizó DNA de pBR322 como control, sin enzima (1) y con enzima (2). Los tamaños de los fragmentos, están enlistados del lado izquierdo en kilobases.

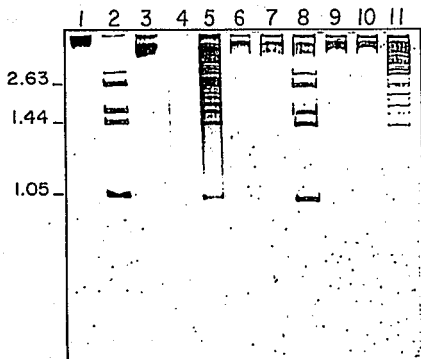


Fig.10. Separación de electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% de DNA digerido con *EcoRII*. El DNA del Plasmido pBR322 (1ug) aislado de la cepa GM31 como se adiciono a las muestras del DNA bacteriano (5), (6) y (11). Las cepas bacterianas fueron: (3) *Escherichia praeseeli* (504), sin enzima; (4) *E. praeseeli* (504), *EcoRII*; (5) *E. praeseeli* (504), (DNA de pBR322, *EcoRII*); (6) *Salmonella parva* (60), sin enzima; (7) *S. parva* (60), *EcoRII*; (8) *E. parva* (60), (DNA de pBR322), *EcoRII*; (9) *S. parva* (44), sin enzima; (10) *S. parva* (44), *EcoRII*; (11) *S. parva* (44), (DNA de pBR322), *EcoRII*. Se utilizo DNA de pBR322 como control, sin enzima (1) y con enzima (2). Los tamaños de los fragmentos, estan enlistados del lado izquierdo en kilobases.

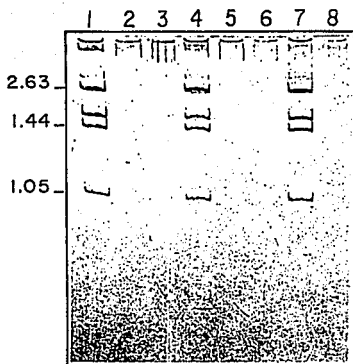


Fig.11. Separación de electroforesis en gel de acrilamida al 7.5% de DNA digerido con *EcoRII*. El DNA del plásmido pBR322 (1uq) aislado de la cepa GM31 como se adicionó a las muestras del DNA bacteriano (3), (8) y (11). Las cepas bacterianas fueron: (3) *Shigella* (19), sin enzima; (4) *Shigella* (19), *EcoRII*; (5) *Shigella* (19), (DNA de pBR322), *EcoRII*; (6) *Shigella sonnei*, sin enzima; (7) *S. sonnei*, *EcoRII*; (8) *S. sonnei*, (DNA de pBR322), *EcoRII*. Se utilizó DNA de pBR322 como control, sin enzima (1) y con enzima (2), los tamaños de los fragmentos, están enlistados del lado izquierdo en kilobases.

		10	20	30	40	50
Dcm		MGENISVTSVSTGNAQAAMLEKLLQTYDKVTLVAQLAGVGENHSAATLK				
EcoRII	K.....I...I...I...I...				
		10	20	30	40	50
		EcoRII MSEPELLAOLLEKAFARZQDQDQKLLGQVLEIYDQKVAELLLKAVKGDHSHRETLN				
Dcm		60	70	80	90	100
		BALANDSAMWRRLSEKELFALQTLLEKPPAHHPHYAFRFDLFAIGGGIRAGFESIGGQCV				
EcoRII		60	70	80	90	100
		EcoRII RMINGKCSFRTLTLAEELLRNGLFAPARHPDYAFRFDLFAIGGGIRAGFESIGGQCV				
Dcm		120	130	140	150	160
		FTSEMWKAIVTKFAWHYCPATRUHEDIRDTLSHKEGVSDFAAAENIRQHIPERDVL				
EcoRII		120	130	140	150	160
		EcoRII FTSEMWKAIVTKFAWHYCPATRUHEDIRDTLSHKEGVSDFAAAENIRQHIPERDVL				
Dcm		180	190	200	210	220
		LAGYFCOFFSLAGVYKNSLGRANGTACDTGTLFDVVRKIIDARRPAPVLEWVWNLKS				
EcoRII		180	190	200	210	220
		EcoRII LAGYFCOFFSLAGVYKNSLGRANGTACDTGTLFDVVRKIIDARRPAPVLEWVWNLKS				
Dcm		240	250	260	270	280
		HDGKTRFIDHQTLELGYVADAADKCPDQPKIIDGKDFLQDREKIVLVGFRDLNLEK				
EcoRII		240	250	260	270	280
		EcoRII HDGKTRFIDHQTLELGYVADAADKCPDQPKIIDGKDFLQDREKIVLVGFRDLNLEK				
Dcm		300	310	320	330	340
		ADFTLRDISECTFACRVTLAQLDPPVAKYKILYVLMKTLRYAAGHQAAGKCFYGMV				
EcoRII		300	310	320	330	340
		EcoRII ADFTLRDISECTFACRVTLAQLDPPVAKYKILYVLMKTLRYAAGHQAAGKCFYGMV				
Dcm		360	370	380	390	400
		YFNRDQVTRTLSAVYDGAELIDKQHWATGSDYDDELNQQGDFRLLTPRECARLM				
EcoRII		360	370	380	390	400
		EcoRII YFNRDQVTRTLSAVYDGAELIDKQHWATGSDYDDELNQQGDFRLLTPRECARLM				
Dcm		420	430	440	450	460
		GTEAFCEAKTRFVDTQATQFGNSVVPVFAAVAKLEPKIKQAVLRQCEAQHGRSRL				
EcoRII		420	430	440	450	460
		EcoRII GTEAFCEAKTRFVDTQATQFGNSVVPVFAAVAKLEPKIKQAVLRQCEAQHGRSRL				

Fig.12. Alineamiento de las secuencias Dcm y EcoRII.

TABLAS

Tabla. I. Diferencias entre Eucariontes y Procariotes.
Tomada de: Margulis L. y Schwartz. V. (1967). Cinco Reinos.
Ciencias (por una educación popular).

Procariotas	Eucariotas
Por lo general, células pequeñas (1-10 μ m). Todos son microbios.	Por lo general, células grandes (10-100 μ m). Algunos son microbios; la mayoría son organismos grandes.
ADN en un nucleóide, no rodeado por una membrana. No hay cromosomas.	Núcleo rodeado por una membrana. Contiene cromosomas compuestos de ADN, ARN, y proteínas.
División celular directa. Previamente por tación binaria. No hay centriolos, huso mitótico ni microtúbulos. Delimita señales exactas: cuando hay algún intercambio sexual, el material genético es transferido de un donador a un receptor.	División celular según varias formas de mitosis. Hay un huso mitótico (a. como mínimo, algún tipo de ordenación de microtúbulos). Bases de señales imprecisas: igual participación de ambos sexos (masculino y femenino) en la fertilización. Abstracción de formas haploides y diploides mediante la mitosis y la fecundación.
Formas multicelulares escasas. Sin desarrollo de tejidos.	Los organismos multicelulares muestran un desarrollo extensivo de tejidos.
Muchas formas anaeróbicas estrictas (el oxígeno causa su muerte); aeróbicas facultativas, microaerófilas y aeróbicas.	Casi todos son aeróbicos (necesitan oxígeno para vivir); las excepciones son claramente modificaciones secundarias.
Grandes variaciones en las vías metabólicas del grupo.	Vías metabólicas de oxidación similares en el grupo (metabolismo de la glucosa) según la vía Embden-Meyerhof, oxidaciones según el ciclo de Krebs, cadenas de transporte de electrones por citocromos.
Ausencia de mitocondrias; los enzimas para la oxidación de moléculas orgánicas están ligados a membranas celulares (no empaquetados separadamente).	Los enzimas para la oxidación de los ácidos orgánicos de sus carbonos están empaquetados en las mitocondrias.
Flagelos bacterianos simples, compuestos de la proteína flagelina.	Unidulcoides compuestos 9+2 compuestos de tubulina y otras proteínas.
En las especies filotéticas los enzimas para la fotosíntesis no están empaquetados separadamente, sino ligados a la membrana celular. Distintas vías de fotosíntesis aeróbica y anaeróbica, incluyendo la formación de productos finales como el azufre, el sulfato y el oxígeno.	En las especies filotéticas, los enzimas para la fotosíntesis están dentro de gránulos rodeados por una membrana. Todas las especies fotosintéticas siempre exhiben fotosíntesis.

1)

TABLA.II. DIFERENCIAS ENTRE BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y
GRAM-NEGATIVAS.

BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS
Contienen Ribonucleato de magnesio.	No contienen Ribonucleato de magnesio.
Muy Sensibles a los colorantes de trietilmetano (v. orviolenta cristal).	Son menos sensibles a los colorantes de trietilmetano.
Sensibles a la penicilina.	Sensibles a la estrepto-micina.
No son disueltas por KOH al 1%.	Son disueltas por KOH al 1%.
Su punto isoelectrico esta entre pH de 2 y 3.	Punto isoelectrico entre pH de 4 a 5.
Cilindros que forman esporas. - muchos cocos.	La mayor parte son bacilos espirilos y cocos que no forman esporas.
Toxinas; exotoxinas.	Toxinas; endotoxinas.

1) Tomada de: Carpenter F. (1967). Microbiolog. SANDER, USA.

1)
 TABLA. III. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS DE ACUERDO A
 SU METABOLISMO

TIPO	SUBSTRATO OXIDABLE (DONADOR DE HIDROGENO).	FUENTES DE		MICROORGANISMOS
		ENERGIA	CARBONO	
1. Autotrofos fotosinteticos	Inorganico.	Luz	CO ₂	Chlorobacteriaceae (verdes - sulfuro - sas) Thioredoxose (viola - ceas, sulfuro - sas).
2. Autotrofos quimiosinteticos	Inorganico.	Reacciones de oxidación - reducción	CO ₂	Hydrogenomonas, Thiobacillus, Beggiatox Nitrosomonas, Nitrospirillum.
3. Heterotrofos fotosinteticos	Organico.	Luz	CO ₂ y orgánicas.	Athiorhodaceae (viola - ceas no sulfuro - sas).
4. Heterótrofos quimiosinteticos	Organico.	Reacciones de oxidación - reducción	Orgánicas	Muchos microorganismos excepto algas.

a) Se les conoce tambien con los siguientes nombres:

1. Fotolitotrofo
2. Quimiolitotrofo
3. Fotoorganotrofo
4. Quimioorganotrofo

Tabla IV. Porcentajes de reelección evolutiva mediante hibridación DNA-DNA. Tomada de: Sansonson, K. E. (1976). Genetic relatedness in the family Enterococcaceae. Ann. Rev. Microbiology, 30:327-349, Canada

	Source of unlabeled DNA				Source of labeled DNA									
	<i>E. coli</i> K12	<i>S. faecalis</i> 2a	<i>S. typhimurium</i> LT2	<i>C. freundii</i> 460-61	<i>E. tarda</i> 3592-64	<i>Y. enterocolitica</i> 301-70	<i>Y. pseudotuberculosis</i> p501	<i>E. amylophilus</i> ZA 178	<i>P. carotinarum</i> 495	<i>S. pneumoniae</i> 11 (211)	<i>E. aerogenes</i> 1627-66			
<i>E. coli</i> K12	88-100		46	59	25	24	21	17	28	27-29	31-38			
<i>S. faecalis</i>	84-85	83-100	38-39	57			18	14	28	30				
<i>S. typhimurium</i>	45	44	93-100	60	25	26	15		30					
<i>S. typhi</i>			88-100											
<i>S. cholerae</i> subsp. <i>discreta</i>			91-94											
<i>C. freundii</i>	30		69-80	33-61	35				30					
<i>S. marcescens</i>	34	17	25	34	26		22	17	30	28-32				
<i>A. parvum</i>	36		40	52				19	25	26	27-29			
<i>E. aerogenes</i>	31		36	47	24			14	19	28	83-100			
<i>K. agglutrans</i>			19	30	26			17	22-25					
<i>E. tarda</i>	23	16	10-19	25	84-100		15	17	18					
<i>Y. enterocolitica</i>						90-100	42-53							
<i>Y. pseudotuberculosis</i>						43-64	81-100							
<i>P. mirabilis</i>						6-12	7-32							
<i>E. amylophilus</i>			22	18	22		11	83-100	24-36					
<i>P. carotinarum</i>	8		20	30	20			16	80-100					
<i>P. mirabilis</i>	6		7	11	8	19	31	7	18					
<i>P. vulgaris</i>						13								
<i>P. maripalms</i>						16								

* Percent relatedness = (heterologous DNA bound to HA x 100) ÷ homologous DNA bound to HA.

References, classified by "source of labeled DNA": *E. coli* K12 with *E. aerogenes*, *P. mirabilis* (14); with *E. coli*, *S. faecalis*, *S. typhimurium* (18); with others (17); *S. faecalis* 2a (13); *S. typhimurium* LT2 (41); *C. freundii* 460-61 (17); *E. tarda* 3592-64 (17); *Yersinia* spp. (11); *Yersinia enterocolitica* EA 178 (18); *P. carotinarum* 495 (21); *A. parvum* (1) 31 and *E. aerogenes* 1627-66 (18); *E. aerogenes* 1627-66 with *E. coli*, *S. marcescens* (38), with *A. parvum* and *E. aerogenes* (20).

1)
 TABLA.V. METILASAS DEL DNA DE Escherichia coli b-12

GENES	BASE ^{a)} METILADA	SECUENCIAS ^{b)} RECONOCIDAS	FRECUENCIA ^{c)} TEORICA
<u>hsd M</u>	A	* -AA C(N6)GTCG-	1/45,000
<u>dam</u>	A	* -GATC-	1/250
<u>dcm</u>	C	* -CC(A/T)GG-	1/512

a) La A se metila en N6: 6-MeAde

La C se metila en C5: 5-Mecyt

b) *, base metilada.

c) Frecuencia teórica de las secuencias reconocidas por las metilasas si su distribución fuera al azar.

1) Tomada de: Razin A., Cedar H., y Riggs A. D. (1984). DNA methylation Biochemistry and Biological significance. 81-109. USA.

TABLA VI. CEPAS BACTERIANAS

Especies bacterianas		Origen de las cepas
A) Escherichia	coli (71).	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
	coli (110).	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
	coli lac-	J. Torres. Fac. de Medicina U.N.A.M.
	blattae.	J. Torres. Fac. de Medicina U.N.A.M.
	fergusonii	J. Torres. Fac. de Medicina U.N.A.M.
B) Shigella	sonnei	J. Kupersztoch. CINVESTAV, IFN.
	flexneri	J. Kupersztoch. CINVESTAV, IFN.
	19	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
	41	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
C) Citrobacter	freundii	C. Bazualdo Inst. Inv. Biomédicas.
D) Salmonella	poona (44)	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
	poona (60)	J. Olarte. Hospital Infantil de México.
	B	J. Olarte. Hospital Infantil de México.

E) <i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	C. Lopez. Hospital 20 de Noviembre.
	<i>oxytoca</i>	C. Lopez. Hospital 20 de Noviembre.
F) <i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	C. Bazualdo. Inst. Inv. Biomédicas.
G) <i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	C. Bazualdo. Inst. Inv. Biomédicas.
H) <i>Yersinia</i>	<i>enterocolica</i> (11995)	A. Cravioto. Inst. Nac. de Salud. Cuernavaca. Mor.
	<i>enterocolica</i> (11999)	A. Cravioto. Inst. Nac. de Salud. Cuernavaca. Mor.
I) <i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> . (Fm15)	A. Easton. USA.
	<i>morganii</i>	C. Bazualdo. Inst. Inv. Biomédicas. U.N.A.M.
J) <i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	J. Torres. Fac. de Medicina. U.N.A.M.
	<i>caviae</i>	J. Torres. Fac. de Medicina. U.N.A.M.
	<i>spp</i>	J. Torres. Fac. de Medicina. U.N.A.M.
K) <i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i> (FA01)	L. Mindich. USA.

L) <i>Rhizobium</i>	phaseoli (G17R)	E. Martinez, Centro de investigación en Fijación del Nitroge- no, UNAM.
	phaseoli (504)	E. Martinez, Centro de investigación en Fijación del Nitroge- no, UNAM
M) <i>Lactobacillus</i>	casei	C. Castillo, Inst. Inv. Biomedicas, U.N.A.M.
N) <i>Clostridium</i>	difficile (104a3).	J. Torres, Fac. de Medicina, U.N.A.M.
	difficile (20309).	J. Torres, Fac de Medicina, U.N.A.M.
O) <i>Streptomyces</i>	phaeochrom- ogenes.	L. Servin, Inst. Inv. Biomedicas, U.N.A.M.

TABLA VII. PRESENCIA DE CITOSINA METILADA EN LA SECUENCIA

CC(A/T)GG (METILACION Dcm) EN DIFERENTES BACTERIAS:

Cepas	a) Digestion con <u>EcoRI</u>	b) Patrón Dcm
<i>Escherichia</i>		
a) coli (71)	-	+
b) coli (110)	-	+
c) coli (lac-)	-	-
d) blattae	-	+
e) fergusonii	-	+
<i>Shigella</i>		
a) sonnei	-	+
b) flexneri	-	+
c) 19	-	+
d) 41	-	+
<i>Citrobacter</i>		
a) freundii	-	+
<i>Salmonella</i>		
a) parva (44)	-	+
b) parva (66)	-	+
c) B	-	+

Klebsiella

- a) pneumoniae -
- b) oxytoca -

Enterobacter

- a) cloacae + -

Serratia

- a) marsences + -

Yersinia

- a) enterocolica (11993) + -
- b) enterocolica (11997) + -

Proteus

- a) mirabilis (Fm15) + -
- b) morganii + -

Aeromonas

- a) hydrophila + -
- b) caviae + -
- c) spp + -

Pseudomonas

- a) aeruginosa (PA01) + -

Rhizobium

a) phaseoli (G17R)	+	-
b) phaseoli (504)	+	-

Lactobacillus

a) casei	+	-
----------	---	---

Clostridium

a) difficile (10463)	+	-
b) difficile (20309)	+	-

Streptomyces

a) phaeochromogenes.	+	-
----------------------	---	---

a) +, el DNA se corto con EcoRII; -, el DNA no se corto con esta enzima. En todos los casos negativos, se verifico la pureza del DNA digiriendo DNA de PB5322 (DCM-), en presencia del DNA negativo (Ver Material y Metodo).

b) +, presencia de 5-MeC en las secuencias CC(A/T)GG; -, ausencia de 5-MeC en esas secuencias.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anand S. y Jensen R. (1988). Mol. Biol. Evol. 5(3):261-257.
- 2.- Bakker A. y Smith D. (1969). J. Bacteriol. 171:573a-574c.
- 3.- Bardeyron T., Kean K. y Forterre. (1984). J. Bacteriol. 160:586-590.
- 4.- Barras F. y Marinus M. (1989). Trends in Genet. 5:139-143.
- 5.- Bickle, A. T. (1980). DNA Restriction and Modification Systems. 072-096.
- 6.- Braun W. (1966). Bacterial Genetics. SAUCEF. USA.
- 7.- Brooks J. E., Elumenthal R. M. y Gingeras T. R. (1983). Nucleic Acid Res. 11:837-851.
- 8.- Budin Jean-Claude y De Lavigne E. (1967). Las bacterias. Fondo De Cultura Economica. Mexico.
- 9.- Bukhari A. I., Shapiro J. A. y Adnys S. L. (1977). DNA

insertion Elements, Plasmids, and Episomes. CSH. cCopp. USA.

10.- Burrows W. (1966). Microbiología. SAUDER. USA.

11.- Campbell L. J y Niekner N. (1990). Cell. 62:967-979.

12.- Carraway M., Youderian F. and Marinus, M. G. (1967).
Genetics. 116:343-347.

13.- Carpenter F. (1967). Microbiología. SANDERS. 47ed. USA.

14.- Chen K., Lautenberger, J. A., Edgell M. H., Hutchinson,
C. A. (1977). J. Mol. Biol. 100:191-209.

15.- Coulondre C, Miller J. H., Farabaugh F. J., Gilbert W.
(1978). Nature. 274:775-780.

16.- De la Sota R. La Tandonia y la revolución en las
ciencias biológicas. Programa regional de desarrollo
científico y tecnológico.

17.- Dingman D. W. (1990). J. Bacteriol. 172:150-159.

18.- Dreiseikelmann B. y Wackernagel W. (1981). J. Bacteriol.
147:259-261.

19.- Dunn D. B. y Smith J. D. (1956). Biochem. J. 66:627-636.

20.- Erlich A. H. , Gibbs R., Kazazian H. H. (1967).
Polymerase Chain Reaction. Current Communications in Molec.
Biology. New York. 243pp.

21.- Fox, Woese, et al. (1980). Science. 207:457-463.

22.- Geier G. E. y Moorich F. J. (1979). J. Biol. Chem.
254:1408-1413.

23.- Glickmann B. W., Van Den Elsen F., y Radman, M. (1973).
Molec. Gen. Genetics. 163: 307-312.

24.- Gold M., y Hurwitz J. (1964). J. Biol. Chem. 239:3856-
3865.

25.- Gomez-Eichelmann M. C. y Lark K. G. (1977). J. Mol.
Biol. 117:621-635.

26.- Gomez-Eichelmann M. C. (1979). J. Bacteriol. 140:574-
579.

27.- Gomez-Eichelmann M. C. y Alvarez G. (1985). Biochim.
Biophys Acta. 825:335-338.

28.- Gomez-Eichelmann M. C. (1990). ICyT. 12:39-43.

- 29.- Hanck T., Gerwin N. y Fritz H. (1989). *Nucleic Acids. Res.* 17:5844-5850.
- 30.- Hattman S., Keister T. y Gottenher A. (1976). *J. Mol. Biol.* 124:701-711.
- 31.- Hughes F., Landoulsi. A, Kern R y Kohiyama. M. (1985). *Mol. Gen. Genet.* 217:276-280.
- 32.- Jacob E., Shapiro J. A., Yamamoto I., Smith D. I., Cohen S. N. y Berg D. (1977). Plasmids studied in *Escherichia coli* and other enteric bacteria. p 607-670. In A. I. Bukhari, J. A. Shapiro, and S. L. Adhya (ed). *DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- 33.- Jawetz Ernest et al. (1974). Review of Medical Microbiology. Lange Medical Publications, California.
- 34.- Kimura Motoo. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(1):454-458. USA.
- 35.- Korba B. y Hays J. (1982). *Cell.* 28:531-541.
- 36.- Krieg. N. R. (1988). *J. Microbiol.* 34:536-540.
- 37.- Lacks S. y Greenberg B. J. (1977). *J. Mol. Biol.* 114:153-168.

- 38.- Lark C. J. (1968). J. Mol. Biol. 31:389-399.
- 39.- Lieb. M. Mol. Gen. Genet. 184:364-371.
- 40.- Lindahl T., Ljungquist S. T., Siebert W., Nyberg B. y Sperens B. J. (1977). Journal Biol. Chem. 252:3266-3264.
- 41.- Mamelak L., y Boyer H. W. (1979). J. Bacteriol. 104:57-62.
- 42.- Maniatis T., Fritsch E. F. y Sambrook J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 43.- Margulis L. y Schwartz V. (1987). Cinco Reinos. Ciencias (por una educacion popular).
- 44.- Marinus M. G. y Morris N. R. (1974). J. Mol. Biol. 85:309-322.
- 45.- Marinus M. G. y Morris N. R. (1973). J. Bacteriol. 114:1143-1150.
- 46.- Marinus M. G. y Morris N. R. (1975). Mut. Research. 26:15-26.

- 47.- Marinus M. G. (1987). Annu Rev. Genet. 21:113-131.
- 48.- Marinus M. G. (1987). Methylation of DNA. p. 677-702. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 49.- Messer W. y noyer-weaner M. (1986). Cell. 54:735-737.
- 50.- Nodrich Paul. (1987). The Journal of Biological Chemistry. 264(12):2577-2600. USA.
- 51.- Ochman H. Wilson A. C. (1987) Evolutionary history of Enteric Bacteria. p 1040-1054. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 52.- Ogden G. B., Fratt M. J. y Schaechter M. (1988). Cell. 54:127-135.
- 53.- Pelczar J. Michael. (1984) Microbiology. Mc Graw-Hill, Mexico.
- 54.- Peterson K. R. Wertman K. F., Mount D. W. y Marinus M.

64. (1985). Mol. Gen. Genet. 201:14-19.
- 55.- Piatkin K. D. y Krivoshein Yu. S. (1966). Microbiologia. Mir. URSS.
- 56.- Piñero D., Martínez E. y Selander K. (1968). Applied and Environmental Microbiol. 34:2515-2532.
- 57.- Fukkila F. J., Feterson J., Herman G., Madritch F. y Meselson M. (1983). Genetics. 104:571-582.
- 58.- Ramirez, S. J. y Gomez E. M. C. Manuscrito en preparación.
- 59.- Raiz A., Cedar H. y Riggs A. (1984). DNA Methylation Biochemistry and Biological significance. 61-109. USA.
- 60.- Razin A. y Riggs A. D. (1980). Science. 110:604-610.
- 61.- Roberts D., Hoppes B. C., McClure W. R. y Iclecnen. (1985). Cell. 43:117-130.
- 62.- Sanderson K. E. (1976). Ann. Rev. Microbiol. 30:327-349.
- 63.- Segovia Forcella Patrick Lorenzo. (1991). Tesis de Doctorado en Investigación Biomedica Basica. Taxonomia y Filogenia de cepas de *Rhodobium leguminosarum*. Centro de Investigación sobre fijación de Nitrogeno. UNAM. Cuernavaca.

Morelos.

64.- Siström (1973). Vida Microbiana. CECSA. Mexico.

65.- Solagman S., Hattman S., May M. S. y Berger L. (1970).
J. Bacteriol. 120:990-996.

66.- Sonail A., Lieb M., Der M. y Bhattach A. (1970). J.
Bacteriol. 172:4214-4221.

67.- Stanier, A. I. (1964). Microbiología. REPLA. USA.

68.- Uriel-Snoval S., Groenbaum I. y Razin A. (1960). J.
Bacteriol. 153:274-280.

69.- Valdez F. A. M. (1970). Tesis de Licenciatura en
Investigación Biológica Básica. Estimación filogenética de
transferencia horizontal de genes en bacterias. Instituto de
Investigaciones Biológicas. UNAM.

70.- Vanyushin B. F., Balozersky A. N., Kokorina N. A. y
Kadirova D. X. (1968). Nature (London). 215:1066-1067.

71.- Vanyushin B. F., Buryanov Y. I. y Belosarsky A. N.
(1971). Nature. 230:25-27.

72.- Wilson, A. C. (1985). Investigación y Ciencias. 111:100-

146.

73.- Woese C. R., Kandler y Wheelis (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:4570-4579.

74.- Woese R. C. (1967). Microbiol. Rev. 57:221-257.

75.- Woese R. C. (1967). Microbiol. Rev. 51(2):221-227.

76.- Yamaki H., Ohsuog E., Nagai K. y Maeda T. (1968). Nucleic Acids Res. 1:5067-5073.

77.- Yin J. C. P., Krebs M. F. y Reznikoff W. S. (1966). J. Mol. Biol. 19:35-45.