

03466



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DISTRIBUCION DE ADENINAS Y
CISTOSINAS METILADAS EN EL DNA
DE Escherichia coli K12 Y SU METILACION
DURANTE ESTRES CALORICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
EL BIOLOGO JESUS RAMIREZ SANTOS

MEXICO, D. F.

1993

**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

INTRODUCCION	1
Metilación del DNA	2
Sistemas de metilación en bacterias	3
Sistemas de metilación en <i>Escherichia coli</i> K12	5
Sistema EcoK	5
La metilasa Dam	6
Reparación de apareamientos erróneos (mismatch)	6
Regulación de la expresión genética	9
Control de la replicación cromosómica	12
La metilasa Dcm	14
La metilación Dcm y mutación	16
La metilación Dcm y otros procesos celulares	17
 MATERIALES Y METODOS	 21
Cepas de <i>E. coli</i> , plásmidos y bacteriófagos	21
Medios de cultivo	21
Soluciones y buffers empleados	23
Secuencias de DNA de <i>E. coli</i> K12	24
Métodos de Genética bacteriana	25
Métodos de Biología Molecular	28
 RESULTADOS	 31
I. Distribución de los sitios de metilación en DNA en adenina (Dam) y citosina (Dcm)	31
1. Frecuencia de los sitios Dam y Dcm en el cromosoma de <i>E. coli</i>	31
2. Frecuencia de los sitios CC(A/T)GG, CTAGG, CCAAG, CTGG y CCTAG en regiones codificadoras y no codificadoras	34

3.	Distribución de los sitios Dcm en el cromosoma de <i>E. coli</i>	37
4.	Identificación de genes con frecuencia alta y baja de sitios Dcm	40
5.	Identificación de genes con frecuencia alta en sitios Dcm y baja en sitios Dam y viceversa, y de genes con frecuencia baja en sitios Dcm y alta en sitios Dam	43
6.	Frecuencia de los sitios P en genes con frecuencia alta y baja en sitios Dcm	44
7.	Sitios Dcm en <i>oriC</i> y promotores de genes	45
8.	Los sitios Dcm y la codificación de aminoácidos	47
II.	La metilación Dam y Dcm durante estrés calórico	50
1.	Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dam y Dcm ..	56
2.	Efecto del tiempo de estrés de 47°C sobre la metilación Dam y Dcm	56
3.	Influencia de las proteínas GroEL y GroES sobre la metilación Dcm durante estrés calórico	61
4.	Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dcm en cepas diferentes de <i>E. coli</i> K12	63
5.	Efecto del estrés calórico en la metilación Dcm en una cepa transductante para el gen <i>dcm</i> procedente de la cepa C600 ..	65
	DISCUSION	68
	CONCLUSIONES	76
	REFERENCIAS	78

INTRODUCCION

El DNA de la mayoría de los organismos (procariontes y eucariontes), contiene una pequeña proporción de bases metiladas. La metilación de estas bases es una modificación base-secuencia específica y postsintética del DNA, que involucra la unión covalente de grupos metilo a ciertas bases nitrogenadas (Gold y Hurwitz, 1964). Este fenómeno constituye un medio para alterar la secuencia de bases en regiones específicas del DNA de una manera regulada y permanente, y añade un nivel de información a la doble hélice.

Esta alteración epigenética no es particular del DNA, otras macromoléculas biológicas también presentan la metilación post-sintética inmediata. En muchos organismos superiores los RNAs son metilados en sus bases. Los estudios con células eucariontes han mostrado que los grupos metilo se adicionan a bases nitrogenadas de pre-mRNA, antes que ocurra el procesamiento (Nevins, 1980). Lo anterior parece ocurrir con poca frecuencia o estar ausente en organismos inferiores (Nevins, 1983). El pre-RNA ribosómico (pre-rRNA) de células humanas y de *Xenopus laevis* se modifica con la adición de más de 100 grupos metilo en sus bases nitrogenadas y en la ribosa de nucleótidos específicos (Maden, 1988). El RNA de transferencia también presenta metilación en bases específicas (Rich y RajBahandary, 1976). Otras moléculas biológicas capaces de metilarse son las proteínas (Hayashi y col. 1976; van Holde, 1989). Aunque se conoce la existencia de este fenómeno en carbohidratos y lípidos, se ha prestado poca atención a ello (Hirata y Axerold, 1980).

Como puede notarse, la adición de metilos a las macromoléculas es un fenómeno de amplia distribución entre los organismos y ya en muchas publicaciones se ha intentado explicar la importancia biológica y los mecanismos que la originan

METILACION DEL DNA

El análisis del DNA de un gran número de especies biológicas muestra que la metilación es un fenómeno ampliamente distribuido a través de la escala filogenética. Así, este evento se observa desde las bacterias hasta los vertebrados y plantas; sin embargo, es posible que existan algunas especies donde esté ausente (Adams y Burdon, 1985; Marinus, 1987; Razin y Riggs, 1980).

La adición de grupos metilo se efectúa después del paso de la horquilla de replicación sobre la hebra nueva de DNA y en el surco mayor, y no interfiere con el apareamiento de las bases (Gold y Hurwitz, 1964). La metilación se efectúa mediante la actividad enzimática de metilasas (metil transferasas), sobre bases específicas de secuencias particulares (Gold y Hurwitz, 1964). La molécula proveedora universal del grupo metilo es la S-adenosil-L-metionina (AdoMet), que se origina por la transferencia enzimática de la adenosina del ATP a la metionina (Cantoni, 1975). Se conoce muy poco acerca del mecanismo de reacción de transferencia del grupo metilo a las bases, aunque por lo menos se han descrito dos fases: la de reconocimiento del sitio y la fase de catálisis. Actualmente se sabe que la metilación de procariontes y eucariontes difiere en las bases metiladas de cada

uno de ellos. En procariontes se presenta la metilación de la adenina y la citosina, mientras en eucariontes ocurre solo se metila la citosina (Marinus 1987; Razin y Riggs, 1980). Las posiciones de adición del metilo en ambos casos son los mismos dentro de la base: en adenina es el nitrógeno 6 (N6-meA), y en citosina es en el carbono 5 (5-meC) y excepcionalmente en el nitrógeno 4 (N4-meC) (Wilson y Murray, 1991).

SISTEMAS DE METILACION DEL DNA EN BACTERIAS

El estudio de cerca de 10,000 cepas bacterianas muestra que, la metilación es común entre las bacterias de todos los nichos ecológicos y grupos taxonómicos (Wilson y Murray, 1991). Esta metilación se da principalmente por la codificación cromosómica o plasmídica de sistemas genéticos conocidos como sistemas de Restricción-Modificación (R-M) (Wilson y Murray, 1991). En la mayoría de los casos, estos sistemas se integran por dos proteínas de actividad enzimática diferente: es una endodesoxirribonucleasa (R), y la otra es una metiltransferasa de DNA (M). En estos sistemas las endonucleasas catalizan la ruptura de la doble cadena del DNA, ya sea en el sitio de reconocimiento o a distancia de este; por el contrario, las M catalizan la adición de grupos metilo a una misma base de cada banda del sitio de reconocimiento, y de esta manera evitan el rompimiento por las R (Wilson y Murray, 1991). Los productos de metilación están restringidos a tres productos: N6 metiladenina, 5 metilcitosina y N4 metilcitosina.

Los R-M se clasifican en tres tipos, de acuerdo a la composición de enzimas, requerimiento de cofactores, simetría del

sitio de reconocimiento y la posición del rompimiento del DNA. Los sistemas tipo I se componen de tres polipeptidos: R (proteína para corte del DNA), M (proteína para metilación del DNA), y S (proteína que confiere especificidad de especie). En este sistema la unión de R a su secuencia de reconocimiento requiere AdoMet y ATP, y el rompimiento del DNA ocurre en una posición remota al sitio de reconocimiento. La M tiene preferencia por DNA hemimetilado y el producto siempre es N⁶-metiladenina; las secuencias que son reconocidas son asimétricas (Bickle, 1987; Wilson y Murray, 1991). Los sistemas tipo II, son los más simples y más numerosos. Las R y M actúan de manera independiente con requerimientos mínimos. Las R requieren magnesio (Mg), actúan como dímeros y cortan en el sitio de reconocimiento; las M requieren AdoMet, son activas como monómeros, la metilación ocurre en el sitio de reconocimiento y se pueden generar los tres productos diferentes de metilación; sus sitios de reconocimiento son básicamente simétricos (Bickle, 1987; Wilson y Murray, 1991). Los sistemas tipo III (codificados en P1 y p15B), son los menos abundantes y en ellos la subunidad M confiere especificidad de secuencia para la restricción y la metilación. La subunidad M por se actúa como metilasa, mientras que como heterodímero con la subunidad R actúa como metilasa y nucleasa. La metilación requiere AdoMet y la restricción, ATP. En presencia de ambos cofactores se genera una competencia del propio heterodímero por la modificación y restricción en la misma reacción. Los sitios de reconocimiento son asimétricos, no están interrumpidos y de 5 a 6 nt de longitud. El corte ocurre aproximadamente a 25 nucleóti-

dos del sitio de reconocimiento (Bickle, 1987; Wilson y Murray, 1991)

Por lo general, se acepta que los sistemas R-M son activos en la protección de las células de la adquisición de DNA extraño (particularmente de virus). Otras funciones alternativas incluyen: a la reparación, la recombinación del DNA, y la regulación de la expresión genética.

SISTEMAS DE METILACION EN ESCHERICHIA COLI K12

E. coli K12 es una especie con 3 sistemas diferentes de metilación de DNA que modifican aproximadamente el 2% de sus adeninas y 1% de citosinas. Los sistemas EcoK (pertenece al tipo I de R-M) y Dam metilan a adenina, mientras que la metilasa Dcm metila a la citosina.

I. Sistema EcoK

El sistema EcoK se encuentra codificado en el minuto 99 del mapa genético y se integra de los genes *hadR*, *hadM* y *hadS*. El gen *hadM* codifica para la metilasa HsdM. Esta enzima tiene un peso molecular de 62 kDa y su actividad de metilación la efectúa sobre la segunda adenina de la secuencia AAN(6N)GTGC (donde N puede ser cualquiera de las cuatro bases) (Sain y Murray, 1980). La proporción de adeninas modificadas por esta enzima en relación al total de las adeninas metiladas existentes, es de cerca del 1% (Mamelak y Boyer, 1970). La función de este sistema de metilación es la descrita previamente para los sistemas tipo I R-M: es decir, para el autorreconocimiento de DNA durante la restricción de DNA

extraño que penetra a las células. Sin embargo, este sistema no es esencial para la viabilidad celular, ya que mutantes en este sistema no se ven alterados en su ciclo de división celular.

II. La metilasa Dam

La metilasa Dam (metilasa de adenina de DNA), está codificada por el gen *dam* en el minuto 74 del mapa genético (Lobner-Olesen y col. 1992). Su composición peptídica de 278 aminoácidos se organiza en una cadena sencilla con un peso molecular de 32 kDa (Herman y Modrich, 1982). Funciona como un monómero y metila la adenina de la secuencia simétrica 5'GATC 3', entre 1.5 y 10 minutos después del paso de la horquilla de replicación (Campbell y Kleckner, 1990). La metilación Dam está asociada a varios cambios fenotípicos y a algunos procesos importantes del ciclo celular.

Por la existencia de un desfase temporal entre la replicación y la metilación, el DNA recién sintetizado está hemimetilado, y por lo tanto es distinto al resto del genoma. Este estado hemimetilado del DNA provee un lapso de tiempo durante el cual algunos procesos celulares son activados o suprimidos. A continuación se exponen los usos celulares potenciales de esta información superimpuesta por este estado de transición de la metilación.

1. Reparación de apareamientos erróneos (mismatch).

La especificidad de la reparación dependiente de metilación está determinada por el estado de metilación de las secuencias GATC. Un heteroduplex que lleva modificadas las dos cadenas en

GATC no es un sustrato adecuado para la reparación dependiente de esta metilación. Las moléculas no metiladas se corrigen indistintamente en cualquiera de las dos hebras, mientras que el DNA hemimetilado se repara sobre la hebra no metilada (Messer y Nover-Weidner, 1988). La hebra modificada sirve como molde y los sitios GATC hemimetilados actúan como señal para discriminar la hebra hija de la hebra parental (Modrich, 1991). Este sistema puede operar en cualquier dirección y sobre una distancia sustancial, ya que los sitios GATC pueden controlar la corrección de mismatch localizados a kilobases de este (Bruni y col. 1988). Sin embargo, sitios GATC localizados a más de 2 kpb del mismatch parecen ser relativamente débiles para promover la reparación. Sin embargo, Barras y Marinus (1988), mostraron en su análisis teórico de secuencias de DNA, que no existen zonas carentes de GATCs mayores de 2 kpb. Además de su capacidad para responder a patrones de metilación del DNA, este sistema es capaz de reconocer apareamientos erróneos diferentes; los estudios *in vitro* sugieren que de los ocho apareamientos no complementarios posibles, solamente C-C puede ser refractario a la reparación. G-T, A-C, A-A y G-G son buenos sustratos y T-T, T-C y A-G, se corrigen de alta a baja eficiencia en función de las secuencias que los flanquean (Modrich, 1989; Modrich, 1991).

La reparación dirigida por metilación requiere de los productos de cuatro genes mutadores: *mutH*, *L*, *S* y *U*; de la proteína SSB (proteína de unión a hebra sencilla), DNA polimerasa III, exonucleasa I, exonucleasa VII, RecJ exonucleasa y ligasa. Además se requiere de cofactores tales como ATP, los cuatro dNTPs y

NAD⁺. La información sobre el mecanismo de la reacción no es completa, pero los estudios *in vitro* con los productos de los genes *mut*, acoplados con un análisis de los intermediarios de la reparación revelan varias características importantes de la reacción (Modrich, 1989; Modrich, 1991; Lahuae y col. 1989).

La corrección de un mismatch se inicia con la interacción específica de MutS (97 kDa) con el mismatch; esta interacción promueve la formación de una asa en forma de alfa en presencia de ATP. Muth (25 kDa), es responsable del reconocimiento del sitio GATC mas cercano y cataliza el evento primario que confiere especificidad de hebra sobre la reacción dependiente de metilación. Esto es, actua como endonucleasa débil, dependiente del Mg²⁺, para cortar la hebra no metilada del DNA hemimetilado; con esto se marca el extremo y la orientación para iniciar la reparación. Esta reacción es dependiente de un mismatch y requiere MutS, MutL e hidrólisis de ATP. MutL (70 kDa) funciona como homodimero y como interfase proteína-proteína entre MutS y Muth, mas que interaccionar con el DNA; sin embargo no se ha atribuido alguna función simple a esta proteína. Estudios de huella de proteína en DNA (footprinting), muestran que MutL se une al complejo heteroduplex-MutS en presuncia de ATP. Una vez que se genera el corte en GATC, las reacciones de escisión y resíntesis las catalizan las proteínas DNA helicasa II, exonucleasa I, exonucleasa VII, exonucleasa RecJ, DNA polimerasa III y ligasa. La información concerniente a estas etapas es muy limitada. Sin embargo, el mapeo de fragmentos de escisión ha revelado que la escision es bidireccional, esto es, se puede iniciar en cual-

quier extremo, ya sea 3' o 5' del mismatch pero en el sitios de la hebra donde se efectuó el corte por MthH (Modrich, 1991; Lahuae y col. 1989).

La naturaleza discriminatoria de hebra especifica funciona en la reparación postreplicativa de errores sintéticos del DNA. Actualmente existen evidencias claras para afirmar que la corrección de errores dirigida por metilación, contribuye en gran medida al mantenimiento de la fidelidad informacional del cromosoma bacteriano. Las células mutantes *dam* (deficientes en metilasa Dam), muestran cambios fenotipicos en relación a las cepas silvestres. Como resultado de la deficiencia en metilasa Dam y en condiciones normales, la tasa de mutación espontánea se incrementa, un efecto que se atribuye a la pérdida de capacidad de discriminación de hebras durante la reparación dirigida por la metilación Dam (Carraway y col. 1987; Marinus y Morris, 1975). Además de este fenotipo mutador, las células *dam*-son hipersensibles a luz ultravioleta y a mutágenos químicos que inducen sustitución de bases (bromouracilo y 2-aminopurina) y mutaciones de corrimiento de mensaja (9-aminoacridina y oxazolopiridocarbazol) (Marinus y Morris, 1974; Marinus y Morris, 1975). Estos análogos de bases ejercen sus efectos a nivel de síntesis de DNA, lo cual indica que las lesiones ocurren durante la replicación (Marinus y Morris, 1974; Marinus y Morris, 1975).

2. Regulación de la expresión genética.

La metilación del DNA puede regular procesos celulares a través de su capacidad para alterar las interacciones entre

proteínas y el DNA. Esta interacción está involucrada en la regulación genética a nivel de transcripción, ya que la presencia o ausencia de metilos puede ser una condición para que esta interacción sea la adecuada. La expresión de varios genes de *E. coli* se modifica por la presencia de GATCs en las regiones -35 y -10 de sus promotores (Barras y Marinus, 1989; Marinus, 1987). Algunos genes tienen una actividad transcripcional mayor en un estado hemimetilado (después de la replicación o en mutantes *dam*-), mientras otros tienen una respuesta contraria, es decir, se expresan mejor cuando están metilados en sus dos hebras.

La transposición de *Ins* se incrementa de 5 a 20 veces en cepas *dam*-, deficientes en metilación de adenina en GATC; ello se debe a que el gen *tnp* (que codifica a la transposonasa), tiene un GATC en la región -10 de su promotor y su expresión es mayor que en células silvestres (Barras y Marinus, 1989; Messer y Neyer-Weidner, 1988). Los transposones *IS10* y *Tn10* están regulados por una forma más compleja en relación a la metilación *Dam*. *Tn10* exhibe una tasa de transposición alta en mutantes *dam*. Este efecto es una consecuencia directa de la ausencia de metilación en dos sitios GATC en la *IS10* de su extremo derecho. Un sitio se encuentra en la región -10 del gen de la transposonasa y en ausencia del grupo metilo en este sitio, la transcripción del gen se incrementa. El segundo sitio está en el extremo opuesto de la *IS10*, justo en el sitio de unión de la transposonasa y la ausencia de metilación en este sitio activa este extremo como un sustrato para la transposonasa. La combinación de los efectos en estos dos sitios GATC incrementa a más de 100 veces la transposi-

ción de IS10 (Barras y Marinus, 1989; Marinus, 1987; Messer y Noyer-Wedner, 1988).

Los genes *trpR* y *trpS*, involucrados en el control de la expresión del operón de triptofano, tienen GATCs en su región promotora; su actividad promotora se incrementa de 2 a 3 veces en células *dam-* (Barras y Marinus, 1989; Marinus, 1985). Un efecto similar se observa para los genes *malE*, *malP*, *glnS* y *sulA*, los cuales tienen GATCs en sus regiones regulatorias (Barras y Marinus, 1989; Messer y Noyer-Weidner, 1988).

La expresión de los genes *recA*, *lexA*, *sulA*, *uvrA*, *uvrB* y *dinF* (regulón SOS) también se incrementa de 2 a 6 veces en cepas *dam-*, aunque de ellos solamente *sulA* tiene una secuencia GATC en su promotor (Peterson, 1985). Lo anterior parece indicar que en ausencia de metilación Dam ocurre un ajuste en el nivel basal de la expresión del sistema SOS, para mantener la viabilidad celular; de esta forma, también se explica la letalidad de las mutantes dobles *dam-recA-*, *dam-recB-*, *dam-recC-*, *dam-recJ-*, *dau-lexA-* y *dam-polA-* (Marinus y Morris, 1975; Peterson, 1985).

Un efecto contrario, de inactivación, se observa en la expresión de los genes *dnaA* y *micC*. Los promotores *dna2P* y *micP* contienen cada uno un sólo GATC en su región -35. Su expresión se ve disminuida de 0.5 a 0.25 veces en cepas *dam-* (Barras y Marinus, 1989; Messer y Noyer-Weidner, 1988). Las proteínas DnaA y MicC se requieren para el inicio de la replicación y son reguladas negativamente por DnaA; esto sugiere que la expresión de estos genes se reduce después del paso de la horquilla de replicación como un evento clave en el control del ciclo de replicación y por lo tanto del ciclo celular.

La expresión de genes codificados en bacteriofagos también se modifica por su estado de metilación en sitios GATC. El gen *mom* (modificador de Mu) perteneciente al fago Mu, y que modifica adeninas del mismo fago, tiene tres sitios de reconocimiento de Dam. La metilación de estos tres sitios estimula la transcripción de *mom* por lo menos 20 veces, y en cepas *dam-* el gen no se expresa (Marinus, 1984; Marinus, 1987). El gen *cre* codificado en el bacteriófago P1, contiene tres promotores; el promotor P1, el más alejado tiene dos sitios Dam en su región -35. La expresión de este promotor se incrementa de tres a cuatro veces en cepas *dam-*; en cambio el promotor P2, aunque tiene un sitio GATC en su región -35, no muestra diferencia en su expresión en células silvestres y *dam-* (Marinus, 1987).

3. Control de la replicación cromosómica

La metilación en adenina de GATC esta asociada con el control de la replicación del genoma de *E. coli* (Marinus, 1987). El origen mínimo de replicación, *oriC* con 245 pb, contiene 11 sitios Dam, lo cual significa que tiene 10 veces más de lo esperado por ocurrencia aleatoria. Sin embargo, la metilación de estos sitios no parece ser esencial para la replicación cromosómica, ya que las células *dam-* son viables. Por otra parte, existen evidencias experimentales suficientes que indican que la metilación se requiere para la iniciación eficiente de la replicación. Observaciones realizadas por Messer y col. (1985) sobre la transformación ineficiente de mutantes *dam-* con minicromosomas metilados y que llevan *oriC* como único origen de replicación, hizo pensar que la

metilación Dam podría ser importante para el inicio de la replicación. Posteriormente Russel y Zinder (1988), mostraron que las moléculas de DNA hemimetiladas son sustratos de afinidad baja para la replicación. Louarn y col. (1990), mostraron que la velocidad de las fases de progresión de la horquilla de replicación y la terminación, no se afecta por el estado de metilación Dam en *oriC*. También la enzima Dam está involucrada en el control de la iniciación de la replicación, y aunque el mecanismo de este control se desconoce. Boye y Lobner-Olesen (1989), demostraron que la coordinación de la iniciación en *E. coli* puede ocurrir solamente cuando el nivel de Dam intracelular está cuidadosamente regulada. Las concentraciones altas o bajas de Dam son compatibles con una ocurrencia de iniciación aleatoria en el tiempo, mientras que la iniciación sincrónica se observa en niveles intermedios de Dam. Las observaciones recientes realizadas por Campbell y Kleckner (1990), permiten plantear un modelo más completo acerca de la participación de la metilación Dam en el origen de replicación para el inicio de este proceso. La observación acerca de que la metilación de *oriC* y los promotores de *dnaA* requieren una mayor tiempo, 10 a 13 min (20 a 30% del ciclo celular), después del paso de la horquilla de replicación, hace suponer que ocurre un secuestro de estas regiones durante su estado hemimetilado. Posiblemente esto ocurra a nivel de la membrana externa, donde podría quedar bloqueada la interacción del DNA con la proteína Dam y la RNA polimerasa. Lo anterior correlaciona con una baja en el nivel de transcripción del gen *dnaA* (hasta un 10%) (Campbell y Kleckner, 1990), y por lo tanto también una baja en la síntesis de DnaA, una proteína indis-

pensable en las etapas tempranas del inicio de la replicación. Esto implica que después de cada inicio de replicación continua un intervalo de tiempo de coordinación entre la reiniciación de *oriC* y la expresión de *dnaA*.

En resumen, todo parece indicar que el secuestro de *oriC* y *dnaA*, de la maquinaria de replicación y la RNA polimerasa respectivamente, no permite las reiniciaciones prematuras y provee de un lapso de tiempo para avanzar hacia etapas de progresión de la replicación y fases tardías del ciclo de división celular. Sin embargo, esté de acuerdo con la propuesta de que la hemimetilación de *oriC* permite su adhesión a la membrana externa, y por lo tanto se asegura la segregación cromosómica adecuada hacia las células hijas (Campbell y Kleckner, 1990).

III. La metilasa Dcm

La proteína Dcm (metilasa de citosina de DNA), es una metiltransferasa considerada variante de los sistemas R-M tipo II. Consta de cerca de 473 aminoácidos para un peso molecular aproximado de 53 kDa. Esta proteína modifica la citosina interna de la secuencia 5'CC(A/T)GG3'. El gen *dcm*, codificador de esta proteína, se localiza en el minuto 43 del mapa cromosómico y se integra de 1600pb (Bhagwat y col. 1986; Sohail y col. 1990)

En el extremo 3' de *dcm* se encuentra sobrelapado el gen *vsr* y se transcribe a partir del mismo promotor de *dcm* (Sohail y col. 1990). El producto codificado en *vsr* es la proteína Vsr que participa en el proceso de reparación de fragmentos pequeños (10 bases), conocido como "very short patch". La manera de

organización de estos dos genes predice ciertas ventajas para sus funciones celulares, ya que Vsr constituye parte del sistema de reparación que puede corregir apareamientos erróneos surgidos por la desaminación de 5-meC (Sohail y col. 1990).

Una metilasa de citosina similar a la de *E. coli* K12 esta codificada en *E. coli* C y en plásmidos del grupo de incompatibilidad N (Som y col. 1987; Urieli-Shoval, 1983); estas proteínas reconocen la misma secuencia y la misma posición de metilación de citosina que Dcm. La metilasa M.EcoRII codificada en plásmidos forma parte de un sistema de modificación-restricción tipo II conocido como EcoRII. El alineamiento de las secuencias de DNA y aminoácidos de la metilasa codificada en plásmido y la Dcm muestra una similitud de 68.2% y 66.1% respectivamente, lo que sugiere un origen común (Sohail y col. 1990).

A pesar de su distribución amplia en las enterobacterias, las funciones biológicas de la metilación de citosina en la secuencia CC(A/T)GG no ha sido todavía entendida, ya que mutantes dcm y *E. coli* B no manifiestan cambios fenotípicos apreciables en relación a las cepas silvestres. Sin embargo, estudios genéticos muestran que 5-meC esta asociada a algunos procesos metabólicos del DNA. La presencia de citosina metilada incrementa la tasa de mutación espontánea por generación de apareamientos no complementarios y reduce la tasa de mutación inducida por luz ultravioleta (Coulondre y col. 1978; Glickman y col. 1986). También está asociada a cambios en los niveles de recombinación homóloga de plásmidos, bacteriofagos y cromosoma bacteriano (Korba y Hays, 1982A; Korba y Hays, 1982B).

1. La metilación Dcm y mutación espontánea

El surgimiento de apareamientos erróneos puede ocurrir por razones diferentes: sin embargo, las razones principales son tres: 1) debida a errores de la replicación; 2) a causa de la acción de factores celulares externos (mutágenos); y 3) por la inestabilidad inherente de la citosina y la 5-meC. En condiciones fisiológicas normales, la citosina tiende a desaminarse espontáneamente, y al convertirse en uracilo resulta en la generación de apareamientos erróneos U/G. Este daño al DNA se corrige por la N-glicosidasa que libera la base nitrogenada del residuo de U. Los sitios pirimidínicos son entonces reconocidos por endonucleasas específicas de estos sitios para completar la reparación del daño causado (Lieb, 1991).

La 5-meC es más inestable que la citosina en condiciones fisiológicas, su desaminación espontánea genera timina y consecuentemente apareamientos equivocados T/G. Coulondre y col. (1978), mostraron que sitios CCAGG en lacI son sitios de alta mutabilidad por generación de codones ambar (TAG) en la secuencia CCAGG debida a desaminación de 5-meC. Este efecto se observó en cepas de *E. coli* B, donde no existe la metilación en citosina.

Para contrarrestar el efecto premutagénico causado por la desaminación espontánea de 5-meC o por errores de replicación, *E. coli* K12 contiene el sistema de reparación conocido como VSP (very short patch), que repara fragmentos pequeños de DNA marcados por la presencia de apareamientos T/G (Sohail, 1990; Lieb, 1991). Este sistema consta de la endonucleasa Vsr de cerca de 18 kDa, ya mencionada antes, de MutH, MutL y DNA Polimerasa I

(Modrich, 1991). Aunque la manera precisa de como se realiza la reparación por este sistema no está bien entendida, se conoce la actividad endonucleasa de Vsr (Hennecke y col. 1991). Esta proteína puede cortar en hebras dobles de DNA en las secuencias específicas CTWGN/GGWCN o NTWGG/NGWCC (W puede ser A o T y N puede ser A, T, C o G). El corte endonucleolítico se realiza en las secuencias del T/G, específicamente en la cadena donde se encuentra T; también se sabe que no es necesaria la presencia de grupos metilo en la citosina de la hebra no cortada de la secuencia sustrato. El corte deja libre al extremo 3' hidróxilo de la base adyacente a T, y al extremo 5' correspondiente al fosfato de T (Hennecke y col. 1991).

2. La metilación Dcm y otros procesos celulares

Un incremento en la tasa de recombinación de más de 4 veces (comportamiento hiper-recombinante), fue observado en el bacteriófago lambda y plásmidos replicados en cepas arl- (Korba y Hays, 1982A; Korba y Hays, 1982B). El análisis cuantitativo del 5-meC total de plásmido y fago lambda replicados en cepas arl- muestra que ocurre una disminución del 50 y 70%, respectivamente, de 5-meC. La interpretación actual a este fenómeno es que, probablemente, el producto del gen arl sea un factor necesario para la actividad eficiente de la metilasa Dcm. En ausencia de este factor, la actividad de Dcm puede no ser óptima y las secuencias CC(A/T)GG se pueden metilar parcialmente; los sitios hemimetilados y/o no metilados podrían ser blanco preferencial de lesiones al DNA, y a su vez podrían ser reconocidas como sustratos recombinogénicos (Korba y Hays, 1982A; Korba y Hays, 1982B).

Por otra parte, los estudios *in vitro* e *in vivo* en el gen *lacI* de *E. coli* muestran que la formación de fotoproductos (6-4) pirimidina-pirimidona con luz UV se observa en los sitios CC(A/T)GG cuando existe la metilación Dcm, mientras un efecto contrario ocurre en mutantes *dcm* (Brash y Hazeltine, 1982; Glickman y col. 1986)

En resumen: el papel biológico de la adenina metilada en *E. coli* se conoce solo en parte, pero el papel de la citosina metilada en los sitios Dcm se desconoce. Por ello, se consideró importante continuar con los estudios sobre la citosina metilada en *E. coli*. Para esto, en este trabajo se plantearon tres estrategias principales:

1. Determinar en que géneros de Eubacterias se encuentra presente este patrón de metilación. Responder a esta pregunta permite conocer si se trata de un patrón común a las Eubacterias o se encuentra presente únicamente en algunos géneros.
2. Realizar un análisis de su distribución en un número representativo de secuencias de DNA de *E. coli* presentes en el GENBANK. Estos análisis representan una alternativa interesante y complementaria a los enfoques experimentales. Por ejemplo, Barras y Marinus (1988), llevaron a cabo un análisis de este tipo para adenina metilada. Este análisis reforzó en buena medida los datos experimentales sobre su participación en el proceso de reparación efectuado por el sistema MthLSU, dependiente de metilación Dam. Recientemente se publicó un análisis de la metilación Dcm que

permite proponer que esta metilación es importante para determinar la frecuencia de ciertos oligonucleótidos en el cromosoma de *E. coli* (Merkl y col. 1992).

3. Estudiar si los patrones de metilación Dam y Dcm se mantienen durante la respuesta celular a un estrés de calor. *E. coli* K12 ofrece una respuesta al estrés calórico que se caracteriza por la inducción de la expresión del regulón de estrés calórico. La inducción se manifiesta como la síntesis incrementada y transitoria de cerca de 20 proteínas (las proteínas de estrés calórico) y una disminución de la expresión de las proteínas en general (Lindquist, 1986; Neidhardt y van Bogelen, 1987). En esta estrategia se planteó probar la hipótesis de que durante la respuesta celular a estrés calórico, el DNA que se sintetiza puede no metilarse. Es posible que durante el estrés calórico la síntesis baja de proteínas en general podría afectar de alguna forma el estado de metilación Dam o Dcm del DNA bacteriano, ya sea por una síntesis disminuida de ambas metilasas, o por la pérdida de su actividad enzimática a causa de su desnaturalización por calor. Esto implicaría, para el caso de la metilación Dam, que el sistema de corrección que depende de esta metilación dejaría de funcionar en forma correcta. En el caso de Dcm, la generación transitoria de sitios Dcm hemimetilados podría inducir, como ya se mencionó, daño al DNA e hiperrecombinación. Por lo tanto, la inhibición transitoria de la metilación podría inducir un incremento en eventos mutagénicos, que a su vez incrementarían la variabilidad poblacional.

La primera estrategia, llevada a cabo en otro trabajo, muestra que la metilación Dcm solamente se encuentra en géneros de la familia Enterobacteriaceae que están relacionados estrechamente a *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Klebsiella* (Gómez-Eichelmann y col. 1991). Los resultados de la segunda y tercera estrategia se presentan en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Cepas de E. coli, plásmidos y bacteriofago utilizados en este trabajo.

CEPA	Características y referencia de su origen
C600	thr- leu- thi- F- lac- (Bachman, 1972).
C600 NaI	como C600 mas NaI ^r (Hanahan, 1983)
GM30	thr- leu- thi- his- lac- str- (Marinus y Morris, 1975).
GM31	como GM30 mas dca- (Marinus y Morris, 1975)
GM33	F- dam- (Marinus y Morris, 1975).
AB1157	F- thr- leu- thi- lac- arg- (Kenyon y col. 1986).
W3110	Prototrofa F-

PLASMIDOS

pBR322	Ap ^r Tc ^r (Balbas y col. 1986).
PLN44	Ap ^r Tc ^r groEL groES derivado de pBR325 (Favet y col. 1985).

BACTERIOFAGO

Pivir	litico (Miller, 1972).
-------	------------------------

2. Medios de cultivo utilizados.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 110°C, a 15 libras de presión y durante 25 minutos.

MEDIO LURIA (LB)		
Bacto triptona	10	g
Extracto de levadura	5	g
NaCl	10	g
Timina	0.002	g
NaOH 2.5 M	1	ml
Agua desionizada	1000	ml

MEDIO EN PLACA CON AGAR SEMISOLIDO (L1).

Medio LB	1000 ml
Bacto agar	20 g

MEDIOS EN PLACA CON ANTIBIOTICOS

Después de la esterilización del medio de cultivo L1 se adicionó el antibiótico requerido en sus concentraciones respectivas.

Ampicilina	200 mg/ml
Cloramfenicol	25
Espectinomicina	25
Estreptomicina	50
Kanamicina	25
Acido Nalidixico	20
Tetraciclina	25

MEDIO MINIMO (M1).

NH ₄ Cl	1	g
KPO ₄	3	
NaPO ₄	6	
NaCl	0.5	
Bactoagar	20	
Dextrosa 20%	10	ml
MgSO ₄ 25%	1	ml
Vitamina B1 0.1%	0.16	ml
Agua desionizada	1000	ml

MEDIO MINIMO (M5).

Preparado como M1 con la adición de:

Treonina	20	ug/ml
Leucina	20	ug/ml

MEDIO MINIMO (M7).

Preparado como M1 con la adición de 20 ug/ml de los aminoácidos histidina, leucina y treonina.

MEDIO EN PLACA McCONKEY.

Medio McConkey	50	g
Agua desionizada	1000	ml

MEDIO LURIA EN PLACA CON CALCIO.

LB	500	ml
CaCl ₂ 0.25 M	5	ml
Dextrosa 20%	5	ml

MEDIO TSS 2X (pH 6.5).	
Polietilenglicol 8000	20%
Dimetil sulfoxido	10%
Cloruro de Magnesio	50 mM
Medio LB	

MEDIO AGAR BLANDO DE LURIA CON CALCIO (LCAB).	
Medio Luria	15 ml
NaCl	4 g
Agar	3.5 g
CaCl ₂ 0.25 M	5 ml
Dextrosa 20%	5 ml
Agua desionizada	500 ml

MEDIO DE DILUCION PARA BACTERIAS (MD).	
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5 g
Agua desionizada	1000 ml

3. Soluciones y buffers empleados.

SOLUCION DE PRONASA (5mg/ml).	
Pronasa (Merck)	50 mg
Trizma-HCl 10 mn, NaCl 10mmn	10 ml

Incubar por 60 minutos a 37°C v almacenar a -20°C.

BUFFER TE 10X	
Trizma-base	3.027 g
EDTA	0.570 g
Agua desionizada	500 ml

BUFFER TBE 5X	
Trizma base	0.45 M
Acido bórico	0.45 M
EDTA	0.05 M

SOLUCION DE RNasa (10 mg/ml).	
RNasa	100 mg
Acetato de sodio 0.1 M	
EDTA 3.3 x 10 ⁻⁵ pH 5.5	10 ml

Hervir la solución de enzima por 5 minutos a 80°C

SOLUCION I	
glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Trizma HCl pH 8	25 mM
Lisozima	4 mg/ml

SOLUCION II

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

SOLUCION III

Acetato de Potasio	3 M
ácido acético glacial	5 M

SOLUCION PARA ADSORCION DE BACTERIOFAGO Pivir.

CaCl ₂	1.66485 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7.395 g
Agua desionizada	100 ml

TRIPTONA 1%.

Triptona	1 g
Agua desionizada	100 ml

SOLUCION DE ACRILAMIDA 30% Y BIS-ACRILAMIDA 0.8%.

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua desionizada	100 ml

PERSULFATO DE AMONIO 10%

Persulfato de amonio	100 mg
Agua desionizada	1 ml

SECUENCIAS DE DNA DE E. coli 12.

Una muestra representativa de 49 secuencias de DNA de E. coli del GENBANK release 55.0. fueron usadas para este estudio. Las secuencias seleccionadas están distribuidas aleatoriamente en el mapa genético y representan cerca del 4.5% del total de nucleótidos del cromosoma bacteriano. Las secuencias son: ECOACE (7.740b), ECOAMPCR (5.482b), ECOARABAD (4.478b), ECOARACK (1.172b), ECOBIRA (2.491b), ECOBTUCED (2.600b), ECOCARAB (5.227b), ECODLD (2.340b), ECODNAZX (2.218b), ECOFHUACD (4.607b), ECOGALLYS (4.295b), ECOGLTA (13.063b), ECOGLTX (1.514b), ECOGUABA (3.531b), ECOHSDK (2.528b), ECOILVIH (2.323b), ECOLAC (7.477b), ECOLIVJK2 (1.107b), ECOLP28 (1.688b), ECOMALB (6.545b), ECOMUTH

SOLUCION II

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

SOLUCION III

Acetato de Potasio	3 M
ácido acético glacial	5 M

SOLUCION PARA ADSORCION DE BACTERIOFAGO Pivir.

CaCl ₂	1.66485 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.395 g
Agua desionizada	100 ml

TRIPTONA 1%.

Triptona	1 g
Agua desionizada	100 ml

SOLUCION DE ACRILAMIDA 30% Y BIS-ACRILAMIDA 0.8%.

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua desionizada	100 ml

PERSULFATO DE AMONIO 10%

Persulfato de amonio	100 mg
Agua desionizada	1 ml

SECUENCIAS DE DNA DE E. coli 12.

Una muestra representativa de 49 secuencias de DNA de *E. coli* del GENBANK release 55.0. fueron usadas para este estudio. Las secuencias seleccionadas están distribuidas aleatoriamente en el mapa genético y representan cerca del 4.5% del total de nucleótidos del cromosoma bacteriano. Las secuencias son: ECOACE (7,740b), ECOAMPCFR (5,482b), ECOARABAD (4,478b), ECOARACK (1,172b), ECOBIRA (2,491b), ECOBTUCED (2,600b), ECOCARAB (5,227b), ECODLD (2,340b), ECODNAZX (2,218b), ECOFHUACD (4,607b), ECOGALLYS (4,295b), ECOGLTA (13,063b), ECOGLTX (1,514b), ECOGUABA (3,531b), ECOHSDK (2,528b), ECOILVIH (2,323b), ECOLAC (7,477b), ECOLIVJK2 (1,107b), ECOLP28 (1,688b), ECOMALB (6,545b), ECOMUTH

pos distintos.

CALCULO DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Para determinar la viabilidad celular de los cultivos, se tomaron alícuotas de 100 μ l de cultivo en la fase de crecimiento deseada y se diluyeron en MD hasta 10^{-5} o 10^{-6} . Se sembraron en placas de L1 volúmenes de 100 μ l de las diluciones, y se incubaron a 37°C de 12 a 18 horas. El número de células viables se obtuvo de la suma de las colonias por placa multiplicado por 10 y por el factor de dilución.

TRANSFORMACION BACTERIANA.

Se empleó el Método descrito por Chung y col. (1989). Se inocularon 10 μ l de cultivo fresco de la cepa deseada en 10 ml de medio LB. El cultivo se hizo a 30°C con agitación constante hasta una DO de 0.4 a 550 nm. Se tomó 0.5 ml de cultivo y se mezcló con 0.5 ml de medio TSS 2X; se homogeneizó perfectamente y la mezcla se transfirió en volúmenes de 100 μ l a tubos eppendorf. Se adicionaron cantidades variables de DNA (de 100 ng a 1 μ g), se mezcló y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se dio un estrés de 43°C durante 5 minutos, y se regresaron los tubos a 30°C por 5 minutos más. A continuación se añadieron 900 μ l de LB dextrosa y se incubó a 37°C con agitación 3 a 14 horas. La selección de células transformantes se hizo por sembrado directo de 100 μ l del cultivo en placas de selección adecuado y se incubaron de 12 a 14 horas a 37°C.

PROPAGACION DEL BACTERIOFAGO P1vir

Para la propagación de P1vir se inocularon 10 μ l de cultivo

fresco de la cepa 0800 Nal en 10 ml de LB y se dejó crecer a 30°C hasta una DO de 0.4 (2×10^8) células /ml). Se añadió CaCl_2 a una concentración final de 5 mM. Un ml de cultivo se mezcló con 5 μl de Pivir (10^9 ufp/ml). La mezcla se incubó a 37°C durante 20 minutos, sin agitación y se sembró por vaciado, empleando medio LCAB, en placas de LC. Las placas se incubaron a 37°C por 8 horas y se añadió 1 ml de LB y se incubó a 4°C durante 12 horas. Con una espátula se recuperó la capa de agar blando de la placa con el lisado; se añadieron 5 gotas de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 8000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (donde está Pivir) y se adicionaron 200 μl de cloroformo (Miller, 1972).

TITULACION DE Pivir.

Para titular el fago se utilizó la cepa sensible AB1157. Se inocularon 100 μl de cultivo fresco de AB1157 en 10 ml de LB y se dejó crecer hasta una DO de 0.4 a 37°C. El cultivo se concentró 10 veces por centrifugación y volúmenes de 100 μl se mezclaron con: 100 μl de una solución de CaCl_2 15 mM, 100 μl de lisado fágico en concentración de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . A la mezcla se le añadió 2.5 ml de LCAB a 37°C, se homogeneizó por agitación y se sembró en cajas de medio LC. La incubación fue de 12 a 14 horas a 37°C (Miller, 1972).

TRANSDUCCION CON Pivir.

Se hizo un cultivo de fase logarítmica de crecimiento (DO 0.4) de la cepa GM31 y se concentró 10 veces por centrifugación. Para realizar la adsorción de P1 se adicionaron los siguientes compuestos: 500 μl del cultivo concentrado, 500 μl de CaCl_2 15 mM

- $MgSO_4$ 30 mM y 500 μ l de lisado fágico en una concentración de 5×10^7 ufp/ml, para tener una proporción de infección de un fago por cada 20 bacterias. En los controles de infección se sustituyó Pivir por medio LB. Los ingredientes se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C 20 minutos sin agitación. La mezcla se centrifugó, se deshechó el sobrenadante, y la pastilla se lavó dos veces con MD. Finalmente, la pastilla se resuspendió en MD y se sembró en placas de medio de selección (M7 + 200 mg/ml de estreptomicina) (Miller, 1972)

METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

PURIFICACION DE PLASMIDOS POR LISADOS CLAROS

Para la purificación de plásmidos se siguieron dos métodos similares:

1. LISADOS CLAROS SEMIPURIFICADOS.

Los cultivos en diferentes fases de crecimiento y bajo diferentes condiciones se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó la pastilla y se mezcló suavemente con 2 ml de pronasa (5mg/ml), 2 ml de SDS 10% y se incubó a 37°C una hora sin agitación hasta que la solución quedó clara. A continuación se agregó 0.5 ml de NaOH 3 M y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 5.4 ml de NaCl 5 M, y se mantuvo en hielo 3 a 14 horas. Para eliminar el complejo SDS-NaCl-DNA cromosómico, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, y para precipitar el DNA se agregó polietilenglicol 9000 o 6000 a una concentración final de 10%. La solución se incubó de 4 a 14 horas a 4°C. El DNA

se obtuvo por centrifugación a 7.000 rpm por 15 minutos a 4°C y la pastilla se resuspendió en 500 µl de TE. Para eliminar la contaminación con RNA, se agregaron 40 µl de una solución de RNasa 10mg/ml y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para desproteínizar la solución se extrajo con un volumen de fenol equilibrado con amortiguador TE y varios volúmenes de cloroformo, la fase acuosa se recuperó siempre. Para precipitar el DNA se añadieron 1:25 de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. La precipitación se realizó toda la noche a 4°C y al día siguiente se centrifugó a 10.000 rpm de 10 a 15 min a 4°C. Después de secar la pastilla se resuspendió en TE 1X o en agua desionizada y esteril.

2. LISADOS CLAROS.

Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 minutos. Las pastillas se resuspendieron en 1 ml de solución I con RNasa y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. Para lisar a las bacterias se agregaron 2 ml de solución II, y se mantuvieron en hielo por 10 minutos. Para precipitar el DNA cromosómico se adicionaron 1.5 ml de solución III, se dejó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó y se mezcló con un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó 3 min a 10.000 rpm. La fase acuosa superior se mezcló con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20°C de 12 a 14 horas. El precipitado se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos, la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 40 o 50 µl de agua desionizada y esteril (Maniatis y col, 1982).

DIGESTION DEL DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCION.

El DNA fue digerido con diferentes enzimas de restricción en una relación constante de una unidad de enzima por cada microgramo de DNA; de acuerdo al protocolo recomendado por los proveedores (Bethesda Research Laboratories y New England Biolabs). Las enzimas que se utilizaron fueron: MboI, DpnI, EcoRII, y BstNI.

VISUALIZACION DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROFORESIS.

Se prepararon geles de acrilamida al 7% y se montaron en cámaras de electroforesis verticales (Maniatis y col. 1982). Las muestras de DNA digerido se mezclaron en una relación 1:5 con colorante de ficoll. se depositaron en el gel y se corrió la electroforesis a 120 volts durante 2 horas. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se fotografió

ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA.

El sistema Pustell para el análisis de secuencias fue usado para analizar las secuencias de DNA y su traducción en aminoácidos.

R E S U L T A D O S

I. DISTRIBUCION DE LOS SITIOS DE METILACION EN DNA EN ADENINA (DAM) Y CITOSINA (DCM).

1. Frecuencia de los sitios Dam y Dcm en el cromosoma de E. coli.

La frecuencia de los sitios GATC (sitios Dam) y CC(A/T)GG (sitios Dcm) en las 49 (207,530b) secuencias de DNA cromosómico de E. coli K12 se determinó mediante la división del número de bases totales entre el número total de sitios. Los valores que se obtuvieron fueron: un sitio Dam cada 214b, un sitio CC(A/T)GG cada 351b, un sitio CCAGG cada 804b, y un sitio CCTGG cada 623b. Los valores de frecuencia para los sitios Dam fluctuaron entre 82b y 660b por cada sitio, mientras para Dcm no fueron menores a 250b ni mayores a 1.179b por sitio. La distancia entre dos sitios Dcm o dos sitios Dam no fue mayor a 2000b. Los intervalos en los valores de frecuencia de los sitios Dcm por secuencia, revela que estos sitios no están distribuidos uniformemente en el cromosoma de E. coli.

La frecuencia esperada para estos sitios si su distribución es al azar es: un sitio CC(A/T)GG cada 512b, un sitio CCAGG o CCTGG cada 1.024b y un sitio Dam cada 256b. La frecuencia de estos mismos sitios calculada por la aplicación del análisis serial de Markov es: 1 sitio CCAGG cada 707b, un sitio CCTGG cada 497b y un sitio GATC cada 173b. Los resultados de este trabajo muestran una frecuencia de sitios Dcm mayor que la esperada por

ocurrencia aleatoria, pero menor que la esperada por el análisis de Markov (Phillips y col. 1987). La frecuencia de los sitios Dcm calculada en este trabajo (un sitio cada 351b), es parecida al tamaño promedio de los fragmentos obtenidos por gradiente de centrifugación después de la digestión de DNA de E. coli C con BstNI (380b). Los sitios CCTGG fueron mas frecuentes que los sitios CCAGG, como se esperaba de la frecuencia de los tetranucleotidos CCAG, CAGG, CCTG, CTGG, y de los trinucleotidos CAG y CTG.

En consideración de la sugerencia de que el contenido de sitios CC(A/T)GG podria ser proporcional al contenido de C+G, se realizó el análisis de la frecuencia de sitios Dcm contra el porcentaje de C+G (Bayen y Dalmon, 1976); en la Figura 1 se muestra una correlación baja entre estos dos parámetros. Con respecto a los sitios Dam, Barras y Marinus (1988), en un análisis de 79,333b encontraron una frecuencia promedio de un sitio por cada 222b, el análisis presente muestra un frecuencia mayor de ocurrencia, un sitio Dam cada 214b.

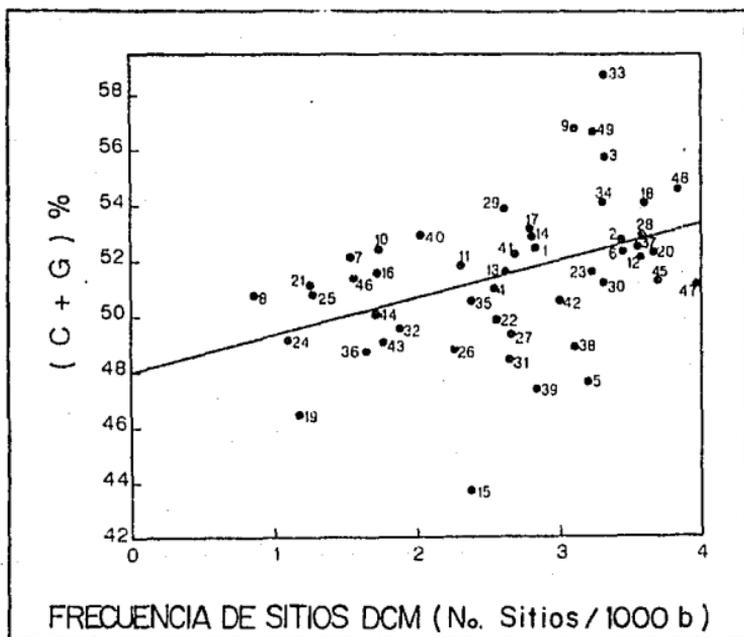


Figura 1. Correlación entre la frecuencia de sitios Dcm y el porcentaje de (C+G) de las secuencias de *E. coli* K12. Los números en la curva corresponden a las 49 secuencias de DNA enlistadas en Materiales y Métodos.

2. Frecuencia de los sitios CC(A/T)GG, CTAGG, CCAAG, CTTGG y CCTAG en regiones codificadoras y no codificadoras.

Debido al requerimiento de regiones no codificadas para este análisis. 25 secuencias de DNA de mayor número de bases fueron seleccionadas para calcular la frecuencia de los sitios Dcm y los sitios CTAGG, CCAAG, CTTGG y CCTAG (sitios P: secuencias que podrían surgir por la desaminación espontánea de 5-meC en los sitios Dcm). Los resultados en la Figura 2 muestran que la frecuencia de los sitios Dcm y CCTGG es mayor en región codificadora que en la región no codificadora. La frecuencia de CCTGG en regiones no codificadoras fue similar a la frecuencia azarosa esperada. Por el contrario, los sitios CCAGG fueron más frecuentes en región no codificadora que en región codificadora. Estos resultados sugieren una selección positiva para CCTGG, y negativa para CCAGG en la región codificadora.

La frecuencia de los sitios P se determinó debido a que estos sitios pueden ser generados por desaminación espontánea de 5-meC en las secuencias CCAGG/GGTCC y CCTGG/GGACC (Coulondre y col. 1978; Lieb, 1991). La frecuencia de los sitios P fue mucho más baja que la frecuencia aleatoria predicha o por el método de Markov (Phillips y col. 1987) Como se muestra en la Figura 3, lo anterior es especialmente cierto para CTAGG y CCTAG; la baja frecuencia de estos dos sitios puede deberse a una fuerza selectiva negativa que opera sobre estas secuencias, ya que ambos sitios contienen el tetranucleótido CTAG y el trinucleótido TAG. Estas secuencias son de las menos abundantes en E. coli, ya que contienen al codon TAG de terminación de la traducción (Phillips

v col. 1987). A pesar de la baja frecuencia de los sitios P, estos se encontraron con frecuencia mayor en regiones codificadoras que en regiones no codificadoras

La frecuencia de los sitios Dam se determinó también en las 25 secuencias. La frecuencia general fue de un sitio cada 213b, en la región codificadora de un sitio cada 199b, y en la no codificadora de un sitio cada 302b. Estos valores son similares a los reportados por Barras y Marinus (1989), para estos sitios.

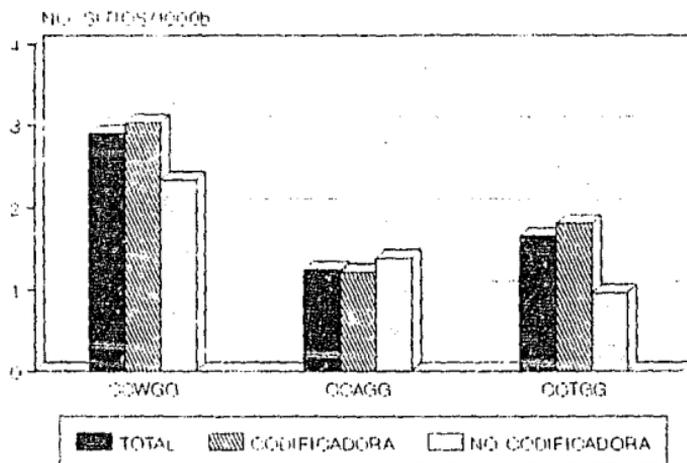


Figura 2. Frecuencia de los sitios de metilación Dcm en el DNA de E. coli K12. Las alturas de las barras representan los valores promedio de la frecuencia de los sitios Dcm, correspondientes a 25 de las 49 secuencias de DNA utilizadas en este estudio. La frecuencia esta dada como el numero de sitios Dcm por cada 1.000 bases. W puede ser A o T.

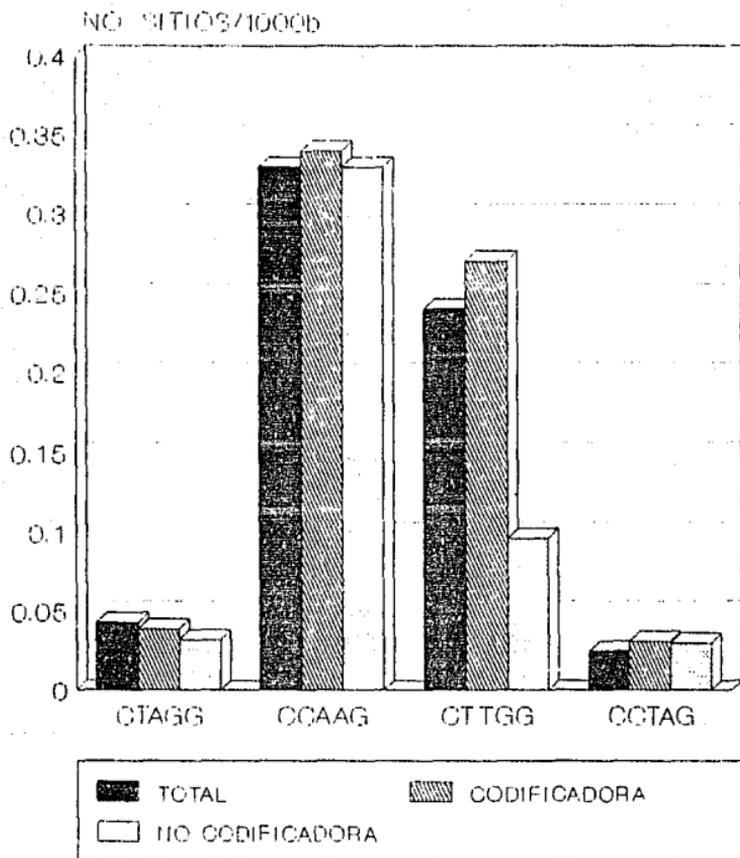


Figura 3. Frecuencia de sitios P en el DNA de *E. coli* K12. Las alturas de las barras corresponden a los valores promedio de las frecuencias de los sitios P, obtenidos en 25 de las 49 secuencias usadas en este estudio. La frecuencia se muestra como el número de sitios por cada 1.000 bases.

3. Distribución de los sitios Dcm en el cromosoma de E. coli.

Para determinar el patrón de distribución de los sitios Dcm, se analizaron las trece secuencias de mayor número de bases. Estas secuencias constituyeron un total de 109,495b (87,111b secuencias codificadoras y 22,384b no codificadoras). El procedimiento fue similar al seguido por Barras y Marinus (1988). Un vacío se definió como una región de por lo menos 1,024b sin sitios Dcm y un grupo como una región de 200b con 3 o más sitios Dcm; esto corresponde a tres veces menos o a 5 veces más del valor promedio para un sitio Dcm (un sitio cada 351b).

Los resultados indican que estos sitios no exhiben un patrón de alternancia vacío-grupo-vacío-etc., u otro patrón regular de distribución, como el reportado por Barras y Marinus (1988) para los sitios Dam. La sobreposición de la distribución de los sitios Dam y Dcm no muestra alguna relación entre ambos patrones.

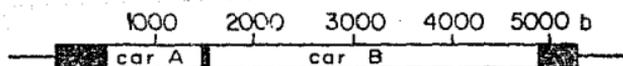
En las 13 secuencias se identificó un total de 24 grupos y 11 vacíos. De los grupos, 22 de ellos se localizaron en regiones codificadoras, y 2 en regiones no codificadoras; 8 vacíos estuvieron presentes en región codificadora, uno en no codificadora y dos que incluyeron región codificadora y no codificadora. La Tabla I muestra los principales grupos y vacíos de este análisis.

Las secuencias ECOCARAB y ECOUNOC mostraron una distribución de los sitios Dam y Dcm diferente a la del resto de las secuencias analizadas. La secuencia ECOCARAB que contiene a los genes *CARA* y *carB* contiene dos regiones vacías de sitios Dcm, y tres para Dam. De manera general, un vacío de Dcm o Dam contiene

sitios Dam y Dcm respectivamente. sin embargo, esta secuencia contiene un vacio para Dcm y otro Dam traslapados en el gen carB (Figura 4). Por otro lado, la secuencia ECOUNCC, la mas grande de todas las secuencias analizadas, contiene el operon unc, que codifica para las 8 subunidades de la ATP sintetasa, el origen de replicación oriC y 7 genes mas. Esta secuencia contiene solamente un vacio para sitios Dcm, y 6 grupos de Dcm localizados principalmente en el operon unc.

Aunque la función de esta distribución no se conoce, es probable que participe en la interacción DNA-proteína y/o DNA-membrana, y que sea importante para la replicación del DNA o la regulación de la expresión genética.

Ecocarab



Vacios de sitio Dcm [1297 b] [1491 b]

Vacios de sitio Dam [1913 b]

Figura 4. Localización de regiones vacías de sitios Dcm en la secuencia ECOCARAB. En claro y obscuro, regiones codificadoras y no codificadoras, respectivamente.

TABLE I. IDENTIFICACION DE LOS PRINCIPALES VACIOS
Y GRUPOS DE SITIOS DCM.

SECUENCIA	VACIO(b)	LIMITES	GRUPO*	UBICACION
ECOACE			3/56	1,516-1,571
ECOCARAB	1,491	3,027-4,517		
	1,297	1,547-2,843		
ECOGLTA	1,869	254-2,122	3/33	11,464-11,496
			3/67	12,120-12,202
ECOLAC	1,264	4,280-5,543	4/82	7,083-7,164
ECONRDA			3/110	4,815-4,924
ECOTHR			3/93	279-371
ECOTHRINF	1,489	5,051-6,539		
ECOUNCC			4/68	3,728-3,815
			4/147	182-309

* NUMERO DE SITOS DCM / NUMERO DE BASES.

4. Identificación de genes con frecuencia alta y baja de sitios Dcm.

En las 49 secuencias que se analizaron en este trabajo, se identificaron los genes que presentaron una frecuencia de sitios Dcm mayor de dos veces y menor de 0.5 veces con respecto a la frecuencia promedio de estos sitios en la región codificadora (un sitio Dcm cada 330b). Los genes con alta o baja frecuencia en sitios Dcm se muestran en la Tabla II. Cinco de los nueve genes con frecuencia alta en Dcm pertenecen al operón unc, lo cual coincide con la presencia de grupos de sitios Dcm en la secuencia ECOUNCC. La integración de grupos por esta característica no permitió identificar otras características comunes entre estos genes. Del total de genes analizados solo el 9% y 7% mostraron una reducción o un incremento del doble o más respectivamente, en la frecuencia de sitios Dcm. Un análisis similar se efectuó para secuencias completas y para regiones codificadoras; sin embargo, los datos no indicaron la existencia de grupos. Ello significa que el intervalo de variación de la frecuencia de los sitios Dcm es estrecho en el cromosoma bacteriano.

TABLA II. GENES CON FRECUENCIA ALTA Y BAJA DE SITIOS DCM*.

GEN	TAMANO (b) SECUENCIA	F**	PRODUCTO
FRECUENCIA ALTA:			
<i>uncC</i>	420 ECOUNCC	70	ATP sintetasa, subunidad epsilon
<i>rpsP</i>	249 ECOTRMD	63	Proteina ribosomal S16
<i>uncI</i>	393 ECOUNCC	98	ATP sintetasa, polipeptido UncI
<i>uncF</i>	471 ECOUNCC	118	ATP sintetasa, subunidad beta
<i>g15</i>	398 ECOUNCC	144	Proteina G15
<i>uncG</i>	864 ECOUNCC	144	ATP sintetasa, subunidad gamma
<i>sucD</i>	870 ECOGLTA	145	Succinil-CoA sintetasa subunidad alfa
<i>gidB</i>	624 ECOUNCC	150	Proteina GidB
<i>rnH</i>	468 ECORNHQ	156	Ribonucleasa H
FRECUENCIA BAJA:			
<i>dld</i>	1,716 ECODLD	1,716	D-lactato deshidrogenasa
<i>ecoK</i>	1,395 ECOHSDSK	1,395	Enzima EcoK subunit
<i>laci</i>	1,254 ECOLAC	1,254	Lactato permeasa
<i>pheA</i>	1,161 ECOPHEAE	1,161	Corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa
<i>birA</i>	966 ECOBIRA	966	Proteina bifuncional BirA
<i>trpA</i>	807 ECOTGP	807	Triptofano sintetasa subunidad alfa
<i>carB</i>	3,222 ECOCARAB	805	Carbamoil fosfatato subunidad alfa

<i>phuC</i>	798	ECOFHUAC	798	Proteína PhuC
<i>nlpA</i>	747	ECOLP28	747	Lipoproteína 28
<i>frdB</i>	735	ECOAMPCF	735	Fumarato reductasa, subunidad Fierro-Azufre
<i>phoM</i>	1,425	ECOPHOM	713	Proteína PhoM
<i>muth</i>	690	ECOMUTH	690	Proteína Muth
<i>trpC</i>	1,359	ECOTGF	680	Antranilato isomerasa

-
- CON UNA FRECUENCIA DE SITIOS DCM MAYOR DE DOS O MENOR A 0.5 VECES, EN RELACION A LA FRECUENCIA PROMEDIO DE ESTOS SITIOS EN REGION CODIFICADORA DE 25 SECUENCIAS: 1 SITIO DCM/ 330b. SE ANALIZARON 318 GENES EN TOTAL.
 - LA FRECUENCIA (F) ES IGUAL AL NUMERO DE SITIOS DCM DIVIDIDO ENTRE EL NUMERO DE BASES DE CADA GEN.

5. Identificación de genes con frecuencia alta en sitios Dcm y baja en sitios Dam y viceversa, genes con frecuencia baja en sitios Dcm y alta en sitios Dam.

Es posible que los patrones de metilación jueguen un papel importante en la determinación de la frecuencia de mutación espontánea del genoma de *E. coli*. Los sitios Dam y Dcm podrían definir dos clases de genes: una de genes con una frecuencia de mutación más elevada que la de los genes promedio, y otra de clase de genes con una frecuencia de mutación baja. Los genes con tasa baja de mutación podrían representar preferentemente a genes de mantenimiento, mientras que los genes con una tasa de mutación alta podrían representar compartimentos del genoma con capacidad mayor para conferir adaptación.

Si se considera el efecto de los patrones de metilación Dam y Dcm sobre la tasa de mutación, es posible que genes con baja frecuencia en sitios Dam y frecuencia alta en sitios Dcm y viceversa, muestren una alta y baja tasa de mutación respectivamente, comparados con genes con una frecuencia promedio de sitios Dam y Dcm. La tasa alta de mutación puede deberse a una actividad deficiente del sistema de reparación dirigida por metilación Dam, y la probabilidad alta de transiciones C a T debido a la desaminación de 5-meC en las secuencias CC(A/T)GG. Una tasa baja de mutación podría ser a causa de una actividad eficiente del sistema dirigido por metilación Dam para reparar apareamientos erróneos y una probabilidad baja por desaminación de 5-meC. Con esta perspectiva se trató de identificar genes con una frecuencia alta de sitios Dcm (dos veces o más que la promedio) y una frecuencia

baja (0.5 veces o menos) de sitios Dam y viceversa. Solamente un gen de 138 genes analizados mostró estas características: uncf con un sitio Dam cada 471b y un sitio Dcm cada 118b. No se identificó ningún gen con frecuencia alta de sitios Dam y frecuencia baja en sitios Dcm, o frecuencia alta en ambos sitios.

Este análisis sugiere que existen pocos genes con una tasa de mutación alta o baja determinada principalmente por los patrones de metilación Dam y Dcm. La tasa de mutación está determinada por varios eventos enzimáticos complejos; en este análisis solamente se consideraron los eventos concernientes a la desaminación de 5-meC y los sitios de metilación Dam.

6. Frecuencia de los sitios P en genes con frecuencia alta y baja en sitios Dcm.

Debido a que la desaminación espontánea de 5-meC puede dar origen a los sitios P (Coulondre y col. 1978; Lieb. 1991), y estos a su vez, por el sistema VSP, pueden originar sitios Dcm (Bhagwat y McClelland. 1992; Merki y col. 1992), una posible correlación entre los sitios Dcm y los sitios P se determinó. Para este estudio se seleccionaron un total de 28 genes con mas de 1000b; 14 de estos genes presentaron una frecuencia alta en sitios Dcm (promedio de un sitio Dcm por cada 229b) y los otros 14 genes presentaron una frecuencia baja de sitios Dcm (promedio de un sitio Dcm por cada 732b). La frecuencia promedio de los sitios P para los genes con alta y baja frecuencia en sitios Dcm fue de un sitio cada 2.573b y un sitio cada 1.705b respectivamente. El análisis de 28 genes con un tamaño menor a 1.000b

mostró resultados similares. Estos resultados sugieren una correlación inversa entre la frecuencia de sitios Dcm y la frecuencia de sitios P. La correlación puede deberse a la conversión de sitios Dcm en sitios P por la desaminación espontánea de 5-meC o por la conversión de sitios P a sitios Dcm debido a la actividad reparadora del sistema VSP o por la combinación de ambos eventos.

7. Sitios Dcm en oriC y promotores de genes.

La región oriC (sitio de origen de replicación cromosómica), contiene una frecuencia alta de sitios Dam, 11 sitios en 250b (Barras v Marinus, 1989). Estos 11 sitios están presentes en *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* (Cleary y col. 1982). Como se muestra en la Figura 5, el oriC de *Erwinia caratovor*a contiene 9 de los 11 de los sitios Dam (Takeda y col. 1982). El oriC de *E. coli* contiene dos sitios Dcm, uno de los cuales se localiza entre los sitios Dam 6 y 7, mientras el otro está en el extremo 3' del sitio Dam 9, GATCCTGG. Entre el sitio Dam 6 y el segundo sitio Dcm hay 50b, los cuales contienen 4 sitios Dam y 2 sitios Dcm. Los cuatro sitios Dam están presentes en las cinco especies bacterianas. Sin embargo, con excepción del segundo sitio el cual está únicamente presente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, los sitios Dcm no se conservan (Figura 5). Estos resultados sugieren que la metilación Dam, pero no la Dcm, es importante para la regulación del inicio de la replicación del cromosoma de las eubacterias.

También se determinó la distribución de los sitios Dcm en los promotores. Los promotores de los genes presentes en las 49 secuencias, así como de los enlistados por Harley y Reynolds

(1987). fueron analizados. Como se esperaba, ningún sitio Dcm se encontró en la región -10, y solamente un sitio Dcm está presente en la región -35 del promotor en el gen *gltA*. Es probable que la ausencia de sitios Dcm en los promotores esté directamente relacionada a la secuencia particular de estas regiones.

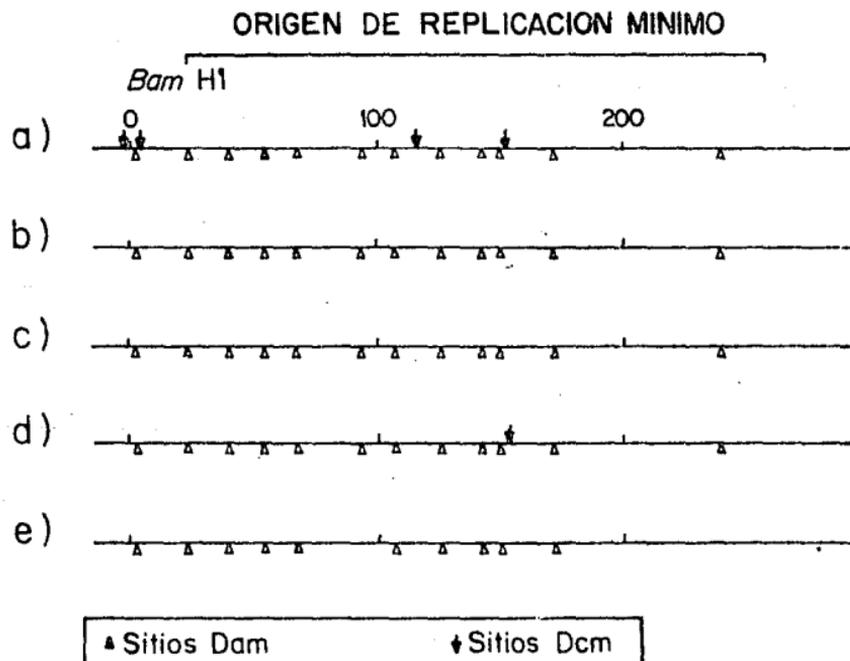


Figura 5. Distribución de sitios de metilación Dam y Dcm en el origen de replicación mínimo en especies de la familia Enterobacteriaceae. a) *E. coli*, b) *Salmonella typhimurium*, c) *Enterobacter aerogenes*, d) *Klebsiella pneumoniae*, e) *Erwinia caratovora*.

8. Los sitios Dcm y la codificación de aminoácidos.

La relación entre los sitios Dcm y la codificación de aminoácidos se determinó en 55 genes (19,863 codones). Para esto se calculó la frecuencia de los codones ACC (Thr), UCC (Ser), CCC (Pro), GCC (Ala), CCA (Pro), CCU (Pro), CAG (Gln) y CUG (Leu), así como los mismos codones en los sitios Dcm. Estos codones se eligieron porque en ellos se puede encontrar la 5-meC en las tres posiciones: primera, segunda y tercera. Del total de codones analizados el 16% (3.187 codones) potencialmente podrían contener 5-meC, pero solo 178 (0.9%) contienen a la citosina metilada. De los 178 codones que contienen 5-meC, los más frecuentes fueron los que contenían a la citosina metilada en primera posición, CAG y CUG (64%); en la segunda (CCA, CCU) y tercera (ACC, UCC, CCC, GCC) posición, se encontraron en un 17% y 19% respectivamente de dichos codones. El número alto de codones CAG fue sorprendente, ya que la desaminación de 5-meC en este codón podría inducir la transición de C a T, y como consecuencia la generación de un codón de término de lectura de RNAm (Coulondre y col. 1978; Lieb, 1991).

La frecuencia de sitios Dcm varió entre los genes, desde un sitio por cada 70b hasta un sitio cada 1.176b, por lo que se determinó la composición de aminoácidos y el uso de codones en genes con diferentes frecuencias de sitios Dcm. Para este análisis los 55 genes se organizaron en tres clases: Clase I (0,727 codones), 15 genes con la frecuencia de Dcm más baja (promedio de un sitio cada 917b); Clase II (2,953b codones), 15 genes con la frecuencia de sitios Dcm más alta (promedio de un sitio

cada 143b) y Clase III (10.183 codones). 25 genes con una frecuencia de sitios Dcm en el intervalo de 222b a 590b por cada sitio.

La Tabla III muestra los resultados de este análisis. La composición de aminoácidos en las tres clases de genes es similar, aunque se encontraron diferencias menores en el uso de codones. Por ejemplo, CUG se usa con menor frecuencia en genes de la Clase I. Sin embargo, no se pudo establecer ninguna correlación clara en estos datos.

TABLA III. USO DE SITIOS DCM PARA CODIFICAR
AMINOACIDOS*.

AMINOACIDO CODON**	GENES***		
	CLASE I	CLASE II	CLASE III
Leu	10.5	8.5	8.9
CUC	47.9	57.0	65.0
Gln	4.0	4.6	4.3
CAG	68.5	72.2	72.4
Pro	4.5	4.2	4.7
CCU	15.5	22.4	12.2
CCA	19.1	24.0	16.8
CCC	11.5	12.8	5.2
Thr	4.9	5.2	5.2
ACC	47.2	51.6	53.2
Ser	5.6	4.6	5.0
UCC	15.3	17.6	23.5
Ala	9.6	11.0	9.4
GCC	26.	20.2	18.6

- * SOLAMENTE LOS CODONES QUE PUEDEN CONTENER 5-MEC FUERON CONSIDERADOS EN EL ANALISIS. PORCENTAJE DE AMINOACIDOS EN PROTEINAS CODIFICADAS.
- ** AMINOACIDO: PORCENTAJE DE AMINOACIDOS EN LAS PROTEINAS CODIFICADAS POR LOS GENES DE CADA CLASE.
- *** CLASE I: 15 GENES; CLASE II: 15 GENES; CLASE III: 25 GENES.

II. LA METILACION DAM Y DCM DURANTE ESTRES CALORICO

1. Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dam y Dcm.

La información presente en la introducción de este trabajo muestra que no se conoce una función de la metilación Dcm en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, se consideró como una alternativa el estudio de la metilación del DNA en condiciones de estrés celular (condiciones a las cuales *E. coli* puede estar expuesta en un ambiente natural). El estrés calórico es una condición importante para explorar en la búsqueda de una función celular posible de la metilación Dcm. Como se mencionó anteriormente, durante un estrés de calor ocurren cambios bioquímicos que permiten adecuar a las células a las nuevas condiciones de su ambiente. Una respuesta bien conocida en *E. coli* es el incremento en la síntesis de proteínas de estrés calórico y una disminución de la síntesis de las proteínas en general (Neidhardt y van Bogelen, 1987). Es posible que bajo las condiciones de estrés calórico el DNA no se metile correctamente. La falta de metilación puede deberse a una expresión baja de los genes *dam* y *dcm*, o bien a la pérdida de la conformación activa de las metilasas Dam y Dcm. La disminución en la metilación Dam puede incrementar la tasa de mutación espontánea a causa de una actividad reparadora ineficiente por el sistema MutHLSU dependiente de la metilación Dam. También puede modificarse la regulación del inicio de la replicación, así como la expresión de los genes cuya regulación está influenciada por la metilación Dam.

La inhibición de la metilación Dcm puede originar un estado hemimetilado del DNA. Los sitios Dcm hemimetilados pueden sufrir

rupturas, y como consecuencia transformarse en un sustrato para las enzimas de recombinación. Esto puede aumentar significativamente la frecuencia de recombinación. Korba y Hays (1982), mostraron un incremento en la tasa de recombinación dependiente del estado de metilación Dcm.

Para observar la metilación Dam y Dcm durante choque térmico se recurrió al uso de la cepa C600 Nal^r (resistente al ácido nalidíxico), transformada con el plásmido pBR322. Cultivos de la cepa C600/pBR322 en crecimiento a 30°C se cambiaron subitamente a temperaturas de 44 a 47°C. La temperatura del estrés se eligió de tal manera que fuera lo suficiente alta como para disminuir el crecimiento celular (que no fuera letal), y que al mismo tiempo permitiera la replicación del DNA. La fase de crecimiento logarítmico de DO 0.4 a 550 nm (2×10^8 células/ml) se escogió debido a que en esta fase las células presentan un crecimiento balanceado que disminuye la influencia de otros factores en los resultados de los experimentos.

El empleo del plásmido pBR322, para observar el efecto del calor sobre la metilación, permitió identificar con mayor precisión los fragmentos de restricción del DNA que se obtienen por corte enzimático. Si se usa el DNA cromosómico para observar el efecto del estrés, es probable que se generen fragmentos de restricción muy grandes que no pueden separarse del DNA no fragmentado o cortado por causas diferentes al calor. Además, se conoce el patrón de restricción de pBR322 con diferentes enzimas tales como MboI, EcoRII y BstNI, y su número de sitios de metilación Dam (22) y Dcm (6) (Balbas y col. 1986). Lo anterior permite

identificar la localización precisa de los sitios Dcm no metilados. Después de aplicar el estrés, se purificó el plásmido, y para observar su estado de metilación se trató con enzimas que cortan DNA no metilado en adenina y en citosina. Se esperaba que el DNA no metilado en adenina se cortara con MboI (corta DNA no metilado en la adenina de GATC), y que el DNA no metilado en citosina se fragmentara en presencia de EcoRII (corta en sitios C(A/T)GG no metilados en la citosina interna). El DNA hemimetilado no se fragmenta con estas dos enzimas, por lo que no fue posible detectarlo en este trabajo. Sin embargo, la falta de corte en DNA con MboI y EcoRII, puede ser debida a la inhibición de la actividad enzimática por exceso de sales, o a residuos de fenol en la solución de pBR322. Para descartar esta posibilidad, en los experimentos de restricción del DNA se incluyeron controles para constatar la pureza del plásmido. En una mezcla de reacción de cada experimento se adicionó un microgramo del plásmido pBR322 no metilado en adenina de GATC o en citosina de C(A/T)GG. Otra opción fue cortar al plásmido con la enzima DpnI (corta DNA metilado en adenina de GATC) y con BstNI (corta DNA en sitios Dcm y no es sensible a metilación en citosina).

Después de la digestión enzimática de pBR322, los fragmentos se separaron en geles de acrilamida y se tñieron con bromuro de etidio.

La Figura 6 muestra que la metilación Dam no se afecta cuando se aplica un estrés de 44-45°C (carriles 2) o un estrés de 46-47°C (carriles 3). Los carriles 1 representan controles de pBR322 no metilado en adenina de GATC sin cortar (C) y cortado

con MboI (H). Si existieran fragmentos de plásmido en los carriles 2M y 3M similares a los presentes en el patrón de restricción de pBR322 en el carril 1M, ello significaría que hubo corte en los sitios GATC/CTAG y por lo tanto que existen sitios GATC no metilados en las dos hebras. El carril 3D muestra la digestión con DpnI; como se advierte, el patrón de fragmentos de pBR322 generado con DpnI es muy parecido al resultante con la enzima MboI. Los controles C se introdujeron para verificar la integridad del plásmido, es decir, que no tuviera cortes por razones diferentes al tratamiento enzimático.

La metilación de citosina en los sitios CC(A/T)GG muestra cambios cuando se exponen las células a cambios súbitos de temperatura. En el carril 3E de la Figura 7, correspondiente a un estrés calórico de 46-47°C, pueden observarse fragmentos de plásmido cuando se le digiere con la enzima EcoRII; esta proteína corta DNA en la secuencia CC(A/T)GG cuando la citosina interna no está metilada. También puede notarse que el patrón de restricción no es similar al que se ve en el carril 1E. Sin embargo, este cambio en el patrón de metilación no se observó (carril 2E), cuando se dio un estrés de 44-45 °C. Los controles (C) del DNA no cortado con EcoRII se incluyeron para asegurar que los fragmentos observados fueran únicamente producto del corte enzimático. Los controles 1C y 1E corresponden a pBR322, no metilado en los sitios Dcm, tratado sin y con enzima EcoRII respectivamente; el objetivo de este control es comparar los patrones de restricción resultantes de plásmidos obtenidos de células en estrés y el patrón de un plásmido replicado en una cepa sin metilación Dcm. En un intento por obtener un rendimiento óptimo

de plásmido que pudiera ser cortado con EcoRII, el estrés calórico se dió en fases de crecimiento de DO 0.25 y 0.3, para dar oportunidad a que el plásmido se replicará mayor número de veces; los datos no se muestran, pero los resultados fueron similares a los obtenidos con una DO 0.4.

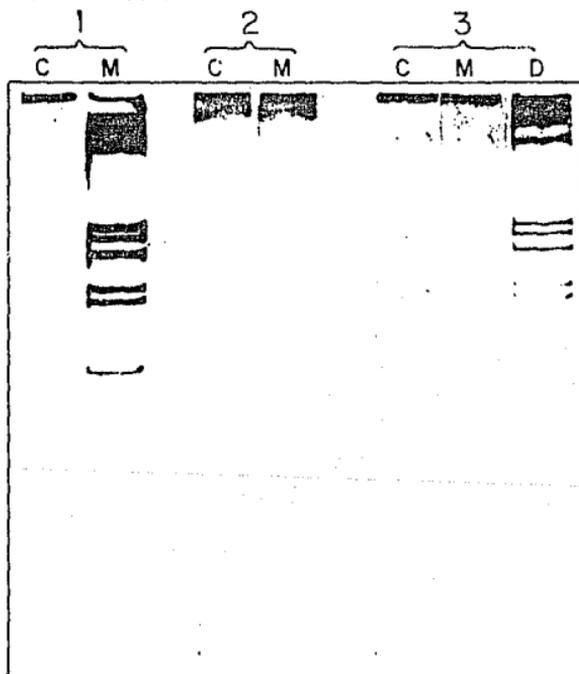


Figura 6. Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dam. Patrón de restricción del plásmido pBR322 purificado de la cepa Q600 Nal^r 1 es un control de pBR322 no metilado en la adenina de GATC 2 y 3 corresponden a plásmidos de cultivos incubados a 44-45 y 46-47 °C respectivamente. C: pBR322, M: plásmido tratado con MboI y D: plásmido digerido con DpnI.

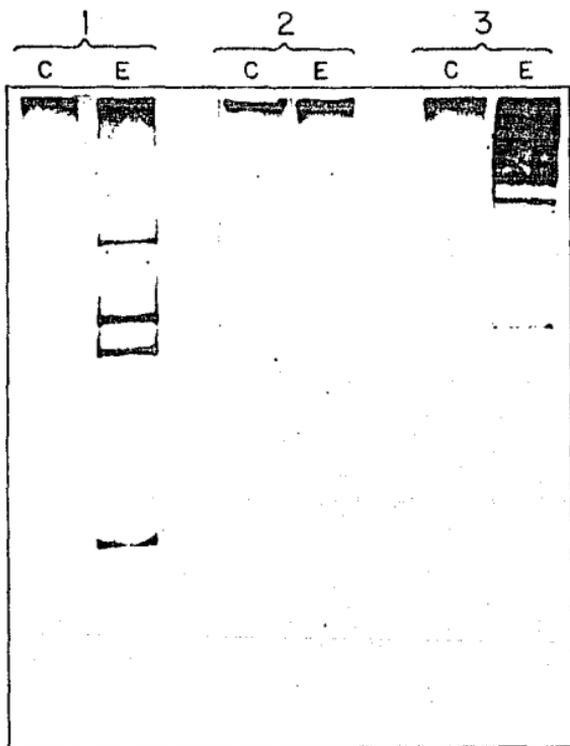


Figura 7. Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dcm. Patrón de restricción de pBR322 (cepa C600 Nal^r). 1 es un coltro de un plásmido no metilado en citosina. 2 y 3 corresponden a plásmidos obtenidos de cultivos incubados a 44-45 °C y 46-47 °C, respectivamente. C) pBR322 sin tratamiento con enzima, E) plásmido cortado con EcoRII

2. Efecto del tiempo de estrés de 47°C sobre la metilación Dam y Dcm.

Para estudiar si el patrón de metilación Dam se mantiene durante un estrés prolongado a 47°C y si la disminución de la metilación Dcm es un evento transitorio o permanente, las células se incubaron por tiempos prolongados de estrés. En estos experimentos se eligieron tiempos de 4 y 6 horas de estrés. En la Figura 8 se muestran los resultados para la metilación Dam. Los carriles 1M y 1P corresponden al estado de metilación Dam del plásmido obtenido de la cepa C600 Hal^r después de 4 horas de estrés calórico; 1M corresponde al plásmido tratado con la enzima MboI que corta en la secuencia GATC cuando no está metilada la adenina. Puede notarse que no hay fragmentos de plásmido, lo cual se interpreta como una ausencia de secuencias GATC/CTAG no metiladas (secuencias metiladas en una sola cadena o metiladas completamente no son sustrato adecuado para MboI). Resultados similares se observaron cuando el tiempo de estrés se incrementó a seis horas: 2M (plásmido tratado con MboI) es similar a 1M, no hay aparición de fragmentos de restricción. En los carriles 1P y 2P se muestra el patrón de restricción de pBR322 no metilado en GATC/CTAG, que se adicionó a la mezcla de reacción con enzima MboI como un control de la pureza del plásmido purificado después del estrés calórico. La estabilidad del patrón de metilación de adenina en GATC es notoria a pesar de los tiempos prolongados de estrés.

En el caso de la metilación Dcm, los resultados de un estrés prolongado fueron diferentes a los de un estrés de 2 horas. En la

Figura 9 muestra los resultados. Los carriles 1E y 2E, que corresponden a plásmido tratado con EcoRII después de 4 y 6 horas de estrés respectivamente, no muestran fragmentos de DNA generados por corte con la enzima. Los carriles 1P y 2P con pBR322 no metilado en sitios Dcm se incluyeron como control de la pureza del plásmido y la actividad adecuada de EcoRII en la mezcla de reacción. Los resultados se corroboraron en experimentos posteriores, donde se observó un comportamiento similar de los patrones de metilación Dam y Dcm al aplicar un estrés constante desde el principio de crecimiento del cultivo bacteriano. En estos experimentos se dió un estrés constante de 47°C hasta que el cultivo alcanzó una DO 0.4 (región media de la fase de crecimiento exponencial). La Figura 10 muestra los resultados: el carril DamM muestra que no hay generación de fragmentos de DNA después de incubar a pBR322 con la enzima MboI, el carril DamD es un control de pureza del plásmido, que esta vez se incubó con DpnI. Como puede notarse, se obtuvo el patrón de restricción esperado para este plásmido. El patrón de metilación Dcm tampoco se vio alterado, como se muestra en el carril DcmE, cuando se incubó al plásmido con EcoRII; su control (carril DcmP) de pureza del plásmido con la adición de pBR322 no metilado en citosina también muestra los fragmentos del plásmido esperados. Los resultados muestran una dependencia de tiempo para la recuperación del patrón de metilación en citosina. Es difícil de saber lo que sucede en relación a la expresión del gen dcm o su regulación a nivel de transcripción bajo las condiciones de estos experimentos. Se conoce la existencia de proteínas que se sobreproducen durante el estrés calórico y que tienen una actividad de chapero-

nina sobre otras proteínas (Kumamoto, 1991); es probable que la recuperación del patrón de metilación Dcm sea el resultado de una actividad óptima de la metilasa Dcm por el contacto con chaperoninas, durante estos tiempos prolongados de estrés.

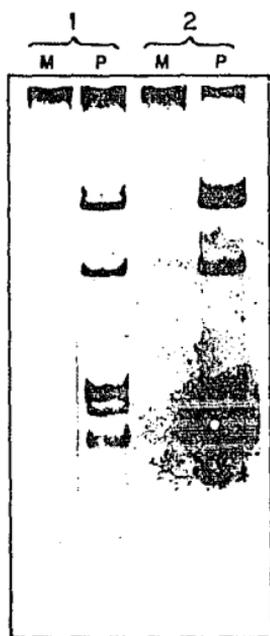


Figura 8. Efecto del tiempo de estrés a 47 °C sobre la metilación Dam. 1 y 2 muestran los patrones de restricción de pBR322 obtenidos después de una incubación de 4 y 6 horas respectivamente. M: plásmido tratado con MboI, P) control de pureza del plásmido por adición de pBR322 no metilado en citosina y tratado con MboI.

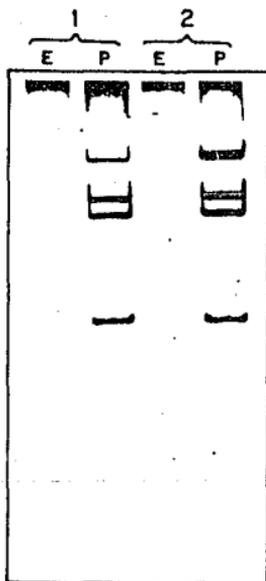


Figura 9. Efecto del tiempo de estrés a 47 °C sobre la metilación Dcm. 1 y 2 corresponden a plásmidos obtenidos de la cepa C600 Nal^r después de 4 y 6 horas de estrés. E: pBR322 tratado con $EcoRII$. P) control de pureza del plásmido; se añadió a la mezcla de reacción plásmido no metilado en citosina y se cortó con $EcoRII$.

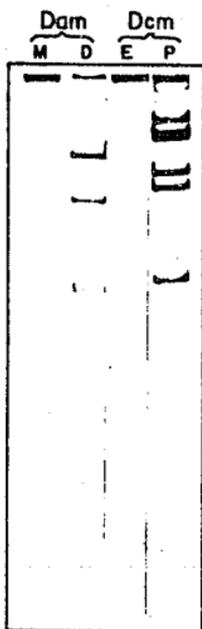


Figura 10. La metilación Dam y Dcm durante estrés calórico constante a 47 °C. pBR322 se purificó de la cepa C600 Nal^r después de una incubación constante a 47 °C y se cortó con enzimas. Dam y Dcm, son los patrones de restricción para los sitios de metilación Dam y Dcm, respectivamente. M) pBR322 tratado con MboI, D) plásmido tratado con DpnI, E) plásmido cortado con EcoRII, P) control de pureza del plásmido.

3. Influencia de las proteínas GroEL y GroES sobre la metilación Dcm durante estrés calórico.

Los resultados anteriores nos sugieren que podría haber factores que se sintetizan o se acumulan durante periodos largos de estrés, y que pueden colaborar en la recuperación del patrón de metilación Dcm. La actividad conocida de chaperonina que poseen las proteínas GroEL y GroES condujo a emplearlas para probar esta hipótesis. Para esto se recurrió al uso del plásmido multicopia pLN44, donde se encuentran clonados los genes groEL y groES. El número de copias elevado de este plásmido permite una sobreproducción de las proteínas GroEL y GroES. Sin embargo, los plásmidos pBR322 y pLN44 pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, y no se pueden mantener juntos en una misma célula por varias generaciones; esto nos llevo a realizar los experimentos de patrón de metilación Dcm en el mismo plásmido pLN44. La Figura 11 muestra que la sobreproducción de las proteínas GroEL y GroES esta involucrada de alguna manera en el mantenimiento del patrón de metilación Dcm durante estrés calórico. El carril E corresponde al plásmido tratado con enzima EcoRII y puede notarse la ausencia de fragmentos de restricción de pLN44, lo que indica que el patrón de restricción de Dcm se encuentra en condiciones normales o que por lo menos el DNA está hemimetilado. Los carriles C y B son controles del plásmido: C corresponde a plásmido no tratado con enzima de restricción, y B al plásmido tratado con la enzima BstNI que fragmenta DNA independientemente de la presencia o no de 5-meC en los sitios Dcm. Es difícil saber a que nivel del proceso de metilación actúan GroEL y GroES. Lo que si

es claro es que hay una influencia importante en el mantenimiento del patrón de metilación Dcm después de 2 horas de estrés a 47°C.

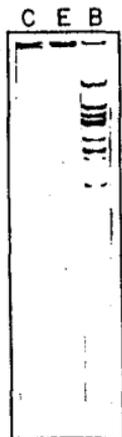


Figura 11. Influencia de las proteínas GroES y GroEL sobre la metilación Dcm durante estrés calórico. El plásmido pLN44 (groES, groEL) se purificó de la cepa C600 Nal^r después una incubación a 47 °C durante 2 horas. C) control de integridad del plásmido, sin tratamiento enzimático. E) pLN44 incubado con EcoRII. B) pLN44 cortado con BstNI

4. Efecto del estrés calórico sobre la metilación Dcm en cepas diferentes de E. coli K12.

Una vez descrito en la cepa C600 Nal^r el fenómeno de la disminución de la metilación Dcm durante estrés de calor, el siguiente paso fue investigar si este fenómeno se presenta en otras cepas de E. coli K12 o únicamente en la cepa C600. Para esto se seleccionaron 4 cepas diferentes: C600, W3110, GM30 y la AB1157. La cepa C600 mostró resultados similares a su cepa isogénica C600 Nal^r . Cuando la cepa C600 se incubó a 47°C durante dos horas, la restricción del plásmido pBR322 con EcoRII mostró la generación de fragmentos de restricción típicos de este plásmido, similares a los generados en la cepa C600 Nal^r después del estrés. El fenómeno contrario ocurrió con las cepas W3110, GM30 y AB1157; es decir, no hubo generación de fragmentos del plásmido cuando este se dirigió con EcoRII. La Figura 12 muestra estos resultados: los carriles 1, 2 y 3 corresponden a DNA de plásmidos obtenidos de las cepas W3110, GM30 y AB1157 tratados con EcoRII. El carril P representa un control del patrón de restricción típico de pBR322 tratado con EcoRII, después de añadir a la mezcla de reacción enzimática de la cepa W3110 1 μg de plásmido sin metilación en los sitios Dcm. En resumen, se observó que la disminución de la metilación Dcm a 47°C durante dos horas es un evento que únicamente ocurrió en la cepa C600.

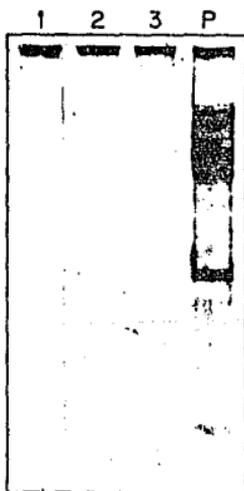


Figura 12. La metilación Dcm en cepas diferentes de *E. coli* durante estrés calórico. pBR322 purificado de cepas de *E. coli* y tratado con EcoRII, después de 2 horas de estrés a 47 °C. 1: W3110. 2: GM30. 3: AB1157 y P: control de pureza de pBR322.

5. Efecto del estrés calórico en la metilación Dcm de una cepa transductante para el gen dcm procedente de la cepa C600.

En estos experimentos se probó la hipótesis de que el fenómeno de disminución de la metilación en citosina podría ser a causa de la presencia de un gen dcm mutante en esta cepa, y por lo tanto su producto la metilasa Dcm podría ser una proteína sensible a la temperatura. Se efectuó la transducción del gen dcm de la cepa C600 a la cepa GM31 dcm- isogénica a la cepa GM30, previamente utilizada. La transducción se realizó por medio del bacteriófago P1vir, y se eligió como marcador al operón de histidina que está a menos de un minuto de dcm en el mapa genético de E. coli. La cepa receptora GM31 es his- y dcm-. Primero se seleccionaron las transductantes His+, posteriormente se purificó el DNA de estas cepas y se cortó con EcoRII. Las posibles transductantes His+ Dcm+ metilan la citosina, y por lo tanto su DNA no debe ser digerido por esta enzima.

La probabilidad de obtener una cepa cotransductante His+ Dcm+ era de 4 a 25%, por lo que se probaron un total de 20 transductantes de histidina y así se identificó la cepa JR15 His+ Dcm+.

A continuación se realizó la transformación de la cepa resultante JR15 con el plásmido pBR322 para realizar los experimentos bajo las mismas condiciones que con la C600. Después de crecer a 30°C a la cepa JR15/pBR322 hasta una DO 0.4 (2×10^8 células/ml), se aplicó un estrés de 47°C durante dos horas, se purificó el plásmido, se incubó con EcoRII y se observó su patrón

de restricción en geles de acrilamida. La Figura 13 muestra que no existe un patrón de restricción cuando el plásmido es tratado con EcoRII (carril E). Esto indica la presencia de grupos metilo en por lo menos una de las cadenas de nucleótidos del plásmido que no permiten su corte con esta enzima. Los carriles C y P corresponden a controles de la integridad del plásmido y de su pureza, respectivamente. En el carril C se trata de plásmido incubado con la mezcla de reacción para EcoRII con excepción de la enzima y en el carril P se adicionó un microgramo de pBR322 no metilado en los sitios Dcm y se muestra el patrón de restricción esperado para este plásmido. El fenómeno no parece ser dependiente del producto del gen dcm proveniente de la cepa C600, sino dependiente del fondo genético y del contexto celular donde se encuentre.

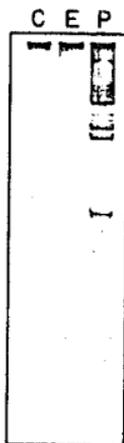


Figura 13. Patrón de metilación Dcm de una cepa transductante del gene dcm de la cepa CG00. pBR322 se purificó de la cepa JR15 (dcm his) después de una incubación a 47 °C durante 2 horas y se trató con EcoKII. C: plásmido sin tratamiento enzimático, E: pBR322 tratado con la enzima. P: control de pureza del plásmido.

D I S C U S I O N

El codón CAG se encontró con mayor frecuencia en los sitios CCAGG. Este codon puede cambiar por desaminación espontánea de 5-meC a UAG, que es una señal para término de traducción. Esta observación junto con una menor frecuencia observada de estos sitios en region codificadora que en no codificadora, sugiere la existencia de una fuerza de selección negativa sobre los sitios CCAGG en la región codificadora. Por otra parte, la frecuencia de CCTGG fue mayor en regiones codificadoras que en no codificadoras, y CUG fue el codon de mayor frecuencia encontrado en estos sitios. La desaminación de 5-meC en CUG puede generar UUG, el cual codifica para el mismo aminoácido como CUG. Sin embargo, CUG es un codón preferencial fuerte en *E. coli*. Este hecho puede ser importante para determinar una frecuencia mas alta en región codificadora que en no codificadora.

La comparación de las frecuencias de los sitios P en las regiones codificadoras sugiere que algunos sitios Dcm podrian originarse de sitios P o viceversa. La hipótesis de la conversión de los sitios P a sitios Dcm se ve apoyada en la abundancia de pentanucleótidos y tetranucleótidos relacionados a sitios Dcm (Bhagwat y McClelland 1992; Merkl y col. 1992). Estos estudios sugieren que el sistema de reparación VSP depleta al genoma de secuencias que contienen T tales como CTAG, TAGG, CTIG y TTGG, mientras lo enriquece de las secuencias correspondientes con C, CCAG, CAGG, CCTG y CTGG. Esta disminución en el número de secuencias P no se observa en *Bacillus subtilis* (Merkl y col. 1992)

y o en *Saccharomyces cerevisiae* (Bhagwat y McClelland 1992). Estos dos organismos no contienen genes homologos a *dcm* y *vsr*. Sin embargo, para apoyar la hipótesis de que la metilación *Dcm* y el sistema de reparación VSP determinan la disminución de los sitios P en *E. coli* K12, es importante determinar las frecuencias de estas secuencias en cepas más próximas evolutivamente a *E. coli* K12. Por ejemplo, *E. coli* B (una cepa *dcm*- natural) o enterobacterias que no presentan metilación *Dcm* como: *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia* y *Proteus*.

La distribución de los sitios *Dcm* mostró que el vacío más grande para estos sitios (1,869b) fue más corto que el vacío más grande para los sitios *Dam* (1,913b). Sin embargo, debido a los valores de las frecuencias de los sitios *Dcm* y *Dam*, se esperaba un tamaño mayor para los vacíos de los sitios *Dcm*. Barras y Marinus (1980), propusieron que la ausencia de vacíos de *Dam* superiores a 2.000b significa que todo el genoma de *E. coli* es susceptible de reparación posreplicativa de apareamientos erróneos por el sistema MthLSD dependiente de metilación *Dam*. La presencia de vacíos de sitios *Dcm* es probable que dependa principalmente de las fuerzas selectivas que actúan a nivel de los pentanucleótidos. Sin embargo 5-meC, la presencia de los sitios *Dcm* también podría dirigir un sistema de reparación posreplicativo para apareamientos erróneos diferente al sistema dirigido por metilación *Dam*. Este sistema podría ser diferente a VSP, ya que 5-meC no es esencial para la actividad de *Vsr* (Modrich 1991). En este contexto, sería importante verificar la tasa de mutación espontánea en cepas *dcm* y *dcm*-, así como determinar si la metilación *Dcm* ocurre poco tiempo después del paso de la horquilla de

replicación, como ocurre con la metilación Dam. Varios grupos de sitios GATC están localizados en regiones en las cuales la interacción proteína-DNA depende del estado de metilación de los sitios GATC. Los grupos de GATC que juegan un papel en procesos regulatorios están localizados en *oriC*, y en las regiones promotoras de los genes *dnaA* y *micC* (Marinus 1987). Sin embargo, ya que ningún grupo de sitios Dcm se encuentre en regiones promotoras o en *oriC* es probable que la metilación Dcm carezca de una función regulatoria.

El análisis realizado en este trabajo no apoya la hipótesis de que los patrones de metilación Dam y Dcm podrían generar dos clases de genes con tasa de mutación diferente.

Los experimentos realizados sobre la metilación durante estrés calórico aportan algunos datos importantes de esta modificación del DNA. Los resultados sobre la metilación de citosina en la secuencia CC(A/T)GG en las cepas C600 y C600 Nal muestran que ocurre una disminución de la metilación Dcm cuando se expone a las células a un estrés de 47 °C durante dos horas. Sin embargo, pBR322 no muestra un patrón de restricción típico de un plásmido desmetilado cortado con EcoRII. Es probable que los fragmentos de DNA que generan se deban a que existen sitios Dcm del plásmido que están preferencialmente desmetilados o que la metilación es parcial y quedan solo dos o tres sitios sin metilarse. La generación de fragmentos de peso molecular alto significa que existen sitios preferencialmente no metilados y que la generación de un estado no metilado del plásmido ocurre solo parcialmente. La posibilidad de que la disminución de la metila-

ción Dcm sea un efecto de la falta de la síntesis del donador del grupo metilo (S-adenosilmetionina) se puede descartar, ya que la metilación Dam se mantiene a 47 C. La ausencia de fragmentos de restricción después del tratamiento con MboI así lo muestra. Tampoco puede descartarse tampoco la posibilidad de que algunos sitios Dam o Dcm estén hemimetilados y debido al método utilizado en este trabajo para identificar DNA no metilado, no sea posible determinar su existencia. La carencia de metilación Dcm durante estrés calórico podría ser interpretada como un efecto directo de la temperatura sobre la expresión del gen dcm o sobre la actividad enzimática de la proteína Dcm. La recuperación de la metilación de los sitios Dcm podría ser consecuencia de la expresión de niveles normales del gen dcm y/o por el restablecimiento de una conformación activa de la metilasa. La termosensibilidad de la enzima Dcm podría ser determinada en ensayos de metilación realizados *in vitro* a 47 C. Los resultados muestran que el estado desmetilado de algunos sitios Dcm de pBR322 es una situación transitoria, ya que se observó la metilación normal de los sitios Dcm en tiempos prolongados de estrés, aunque es posible que el plásmido se encuentre todavía en un estado hemimetilado. Durante el estrés calórico ocurre la síntesis incrementada de proteínas conocidas como chaperoninas. La función de chaperona molecular de la proteína DnaK, GroEL y GroES es bien conocida (Ellis, 1991; LaRosa y van Dyk, 1991; Neidhardt y McClelland, 1987). Es posible que las proteínas GroE funcionen como chaperoninas para la metilasa Dcm, o para el producto peptídico del gen *arl* (que es necesario para la actividad óptima de la metilasa Dcm) (Korba y Hays, 1983A), ya que después de tiempos prolongados

de estrés ocurre la regeneración del patrón de metilación Dcm. Lo anterior se afianzó con la observación de que el patrón de metilación Dcm se mantiene durante el estrés calórico en una cepa que sobrepone las proteínas GroE (Figura 11). Es probable que ante una sobrecarga celular de las proteínas GroE el periodo de tiempo en el cual la disminución de la metilación Dcm ocurre sea menor o no exista, y por lo tanto no es posible observarlo con el uso de enzimas de restricción. Se pensó en la posibilidad de que este fenómeno de disminución de la metilación Dcm podría ser de distribución generalizada entre las cepas de *E. coli* K12. En el análisis de la metilación Dcm durante estrés calórico en 4 cepas (W3110, GM30, AB1157 y C600), se pudo observar que la inhibición es un fenómeno exclusivo de la cepa C600; tal vez debido a la presencia de un gen *dcm* mutante en esta cepa que produce una proteína sensible a temperatura (Ts) alta. También es posible que la cepa C600 codifique un gen *arl* mutante y una proteína Ts y que no permite una metilación eficiente de los sitios Dcm como observaron Korba y Hayes (1982B). La primera posibilidad se ensayo después de transferir por transducción con el fago P1 al gen *dcm* de la cepa C600 a la cepa GM31 *dcm*-. La cepa GM30 es una cepa isogénica a la GM31 que no muestra cambio en la metilación Dcm después del estrés calórico. La transducción permitió la recuperación del patrón de metilación Dcm. Sin embargo, la metilación Dcm no se inhibió durante un choque térmico bajo las mismas condiciones que con la cepa C600. Lo anterior sugiere que el fondo genético y el contexto celular son factores determinantes para la expresión del gen *dcm* en estrés calórico. La

inhibición de la metilación durante estrés calórico permite continuar la exploración para intentar encontrar alguna posible función biológica del patrón de metilación Dcm justamente bajo estas condiciones. La opción a explorar en investigaciones futuras se encaminará hacia los fenómenos de recombinación genética durante estrés calórico. Korba y Hayes (1982), mostraron una influencia clara del estado de metilación Dcm en este evento metabólico del DNA.

Del presente trabajo y de otros datos publicados en la literatura, no es posible deducir la función biológica para la presencia de metilación en citosina (5-meC). En este trabajo, se podría proponer que las metilasas de DNA en bacterias podrían tener una función común, la protección del DNA en contra de la restricción enzimática. La frecuencia y distribución de bases metiladas, así como la función de ciertos sitios metilados, podría ser interpretado como una consecuencia de la adquisición previa de los patrones de metilación. La adquisición de la metilación Dcm probablemente tuvo lugar después de la separación de la línea evolutiva que dio origen a la familia *Enterobacteriaceae* y a *Aeromonas*, pero antes de la división que dio origen a *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella* por un lado y a *Serratia* por el otro (Gómez-Eichelmann y col. 1991). La función original de la metilación Dcm podría ser la protección del DNA celular de la enzima EcoRII que está codificada en el sistema de modificación-restricción llevado por varios plásmidos del grupo de incompatibilidad N. La metilasa Dcm y la metilasa del sistema EcoRII (M.EcoRII) están emparentadas evolutivamente de forma

estrecha: M.EcoRII complementa cepas dcm para metilación y las secuencias de los genes dcm y M.EcoRII muestran un 66% de similitud (Sohail y col. 1990). La presencia de la metilación Dam en géneros y especies eubacterianas diferentes, que incluye bacterias gram positivas (Dingman 1990, Gómez-Eichelmann 1979; Hattman y col. 1978), sugiere que este tipo de metilación apareció más tempranamente que la metilación Dcm. Una explicación alternativa podría ser que este patrón de metilación está relacionado con enzimas de restricción que reconocen sitios Dam, las cuales están distribuidas ampliamente entre las eubacterias. La primera propuesta parece más probable ya que los sitios Dam tienen funciones específicas diferentes (Barras y Marinus, 1989); este hecho sugiere un tiempo largo de acción de fuerzas selectivas sobre este patrón de metilación y posteriormente la adquisición y fijación de estas funciones.

En un contexto evolutivo es probable que los plásmidos que llevaban codificada a EcoRII ejercieron una selección negativa sobre las poblaciones de sus cepas hospederas de enterobacterias. Las células sobrevivientes fueron principalmente las que adquirieron el gen de la proteína M EcoRII. La organización de los genes del sistema EcoRII es M.EcoRII-R EcoRII, los genes están orientados en dirección opuesta y entonces tienen diferentes promotores (Sohail y col. 1990). El contexto genético de dcm es distinto. Este gen está adyacente a var, y al parecer ambos son transcritos a partir del mismo promotor. Una posible explicación para la organización dcm-var es que el resultado de esta fusión dio ventajas selectivas a esta célula. La metilasa Dcm y la proteína Vsr reconocen la misma secuencia (CC(A/T)GG); Dcm metila

la citosina interna y Vsr repara los apareamientos equivocados T/G en la secuencia reconocida por Dcm. Sin embargo, Vsr también repara estos apareamientos en las secuencias NTAGG y CTAGN sin requerimiento de 5-meC (Modrich 1991). Es posible que *vsr* existiera antes de la fusión de estos dos genes. Debido a la desaminación de 5-meC en los sitios Dcm, existió un incremento en la proporción de errores de apareamiento, por lo que es probable que se saturara la actividad correctora de la proteína Vsr antigua. La fusión nueva *dcm-vsr* aseguró una expresión coordinada de ambos genes. Esta fusión aunada a la presencia del gen *arl*, el cual optimiza la actividad de la metilasa Dcm (Korba y Hayes 1982), contribuye a asegurar el mantenimiento del patrón de metilación de citosina para la protección del DNA cromosómico de la proteína R.EcoRII y una reparación eficiente de los apareamientos erróneos T/G generados por la desaminación de 5-meC.

Si se toma como base la hipótesis de que la función original de la metilasa Dcm fue la de proteger al DNA cromosómico de enzimas de restricción codificadas por plásmidos, se vierten algunas predicciones: 1) En cepas de enterobacterias que carecen de metilación Dcm, deben estar presentes genes homólogos a *vsr* involucrados en la reparación de apareamientos T/G. 2) La presencia de genes homólogos a *arl* en eubacterias que llevan *dcm* y 3) Los hospederos de los plásmidos que codifican a R.EcoRII se restringen a especies con metilación Dcm.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados del presente trabajo sobre la distribución de los sitios Dam y Dcm, y su metilación durante estrés calórico permite obtener las conclusiones siguientes:

1. La frecuencia de los sitios Dcm es superior a la esperada aleatoriamente, pero menor a la esperada por el método de Markov.
2. Los sitios CCTGG presentan una frecuencia mayor en las regiones codificadoras que en las no codificadoras; lo contrario ocurre para los sitios CCAGG. Sin embargo, ambos sitios no muestran un patrón regular de distribución.
3. Es probable que los sitios Dcm no sean importantes para la iniciación correcta de la replicación en *oriC*.
4. Es probable que existan pocos genes para los cuales la tasa de mutación está determinada principalmente por la metilación del DNA.
5. Los patrones de distribución de los sitios Dam y Dcm no muestran alguna relación entre sí.
6. La metilación Dcm se inhibe cuando se aplican periodos cortos de estrés calórico a 47 °C. Por el contrario la metilación Dam no se afecta bajo estas mismas condiciones.

7. La sobreproducción de las proteínas GroEL y GroES está involucrada en el mantenimiento del patrón de metilación Dcm durante estrés calórico de 47 °C.

8. La inhibición de la metilación Dcm durante estrés calórico ocurre solamente en la cepa C600, y no en otras cepas de E. coli K12.

9. La termosensibilidad de la metilasa Dcm codificada por el gen dcm de la cepa C600, depende del fondo genético y del contexto celular en que se encuentre.

R E F E R E N C I A S

1. Adams, R. L. P. v R. H. Burdon. 1985. Molecular Biology of DNA methylation. Springer-Verlag. New York.
2. Bachman, B. J. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* 36, 525-557.
3. Balbás, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores y F. Bolívar. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - A review. *Gene*, 50, 3-40.
4. Barras, F. y Marinus M. G. 1988. Arragment of Dam methylation sites (GATC) in the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Res.* 16, 9821-9832.
5. Barras, F. y M. G. Marinus. 1989. The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. *TIG.* 5(5), 139-143.
6. Bayer, M. v J. Dalmon. 1976. 5-methylcytosine in *Chlorella pyrenoidosa* DNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 432, 273-280.
7. Bhagwat, A., A. Sohail v J. Roberts. 1986. Clonning and characterization of dcm locus of *Escherichia coli* F12. *J. Bacteriol.* 166(1), 751-755.
8. Bhagwat, A. v M. McClelland. 1992. DNA mismatch correction by very short patch repair may have altered the abundance of oligonucleotides in the *E. coli* genome. *Nucleic Acids Res.* 20(7), 1663-1668.
9. Bickle, T. A. 1987. DNA restriction and modification system. en: Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington D.C.
10. Boye, E. y A. Lobner-Olesen. 1990. The role of dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell.* 62, 981-989.
11. Bragh, D. E. v W. A. Haseltine. 1982. UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature.* 298, 189-190.
12. Bruni, R., D. Martin v J. Jiricny. 1988. d(GATC) sequences influence *escherichia coli* mismatch repair in a distance-dependent manner from position both upstream on the mismatch. *Nucleic Acids Res.* 16, 4875-4890.
13. Campbell J. L. v N. Kleckner. 1990. *E. coli* *oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork.

14. Cantoni, G. L. 1975. Biological methylation: selected aspects. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 435-451
15. Carraway, M., P. Yourderian y M. G. Marinus. 1987. Spontaneous mutations occur near Dam recognition sites in *dam*- *Escherichia coli* host. *Genetics.* 116, 343-347.
16. Chung, C. T., S. L. Niemela y R. H. Miller. 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.
17. Cleary, J. M., D. W. Smith y N. E. Harding. 1982. Primary structure of the Chromosomal origins *oriC* of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* comparisons and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 150, 1467-1471.
18. Coulondre, C., J. H. Miller, P. J. Farabaugh y W. Gilbert. 1978. Molecular basis of base substitution hotspot in *Escherichia coli*. *Nature.* 274, 775-780.
19. Dingman, D. W. 1990. Presence of N6-methyladenine in GATC sequences of *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus* KLN2. *J. Bacteriol.* 172, 6156-6159.
20. Ellis, R. J. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-347.
21. Favet, O., D. M. Louarn y C. Georgopoulos. 1986. Suppression of the *Escherichia coli dnaA46* mutation by amplification of *groES* and *groEL* genes. *Mol. Gen. Genet.* 202, 435-445.
22. Glickman, B. W., R. M. Schaaper, W. A. Haseltine, R. L. Dunn y D. E. Brash. 1986. The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 6945-6949.
23. Gold, M. y J. Hurwitz. 1964. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. V: Purification and properties of the deoxyribonucleic acid-methylation activity of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 3858-3865.
24. Gómez-Eichelmann, M. C. 1979. Deoxyribonucleic acid adenine and cytosine methylation in *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* 140, 574-579.
25. Gómez-Eichelmann, M. C., A. Levy y J. Ramirez-Santos. 1991. Presence of 5-methylcytosine in CC(A/T)GG sequences (Dam methylation) in DNAs from different bacteria. *J. Bacteriol.* 173, 7692-7694.
26. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

27. Harley, C. B. v R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15, 2342-2361.
28. Hattman, S., T. Keister y A. Gottelher. 1978. Sequence specificity of DNA methylases from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus brevis*. *J. Mol. Biol.* 124, 701-711.
29. Hennecke, F., H. Kolmar, K. Brundl v H. J. Fritz. 1991. The *vbr* gene product of *E. coli* K12 is a strand and sequence specific DNA mismatch endonuclease. *Nature.* 253, 776-778.
30. Herman, G. E. v P. Modrich. 1982. *Escherichia coli* *dam* methylase. *J. Biol. Chem.* 257, 2605-2612
31. Hirata, F. v J. Axerold. 1960 Phospholipid methylation and biological transmission. *Science.* 202, 1002-1006.
32. Kenyon, C. J., R. Brent, M. Patzshne v G. C. Walker. 1982. Regulation of damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 160, 445-457.
33. Korba, B.E y J. P. Hays. 1982A. Partially deficient methylation of cytosine in DNA at CC(A/T)GG sites stimulates genetic recombination of bacteriophage lambda. *Cell.* 28, 531-541.
34. Korba, B. E v J. B. Hays. 1982B. Novel mutations of *Escherichia coli* that produce recombinogenic lesions in DNA. *J. Mol Biol.* 157, 213-235
35. Kumamoto, C. A. 1991. Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol. Microbiol.* 5(1), 19-22.
36. Lahuae, R. S., K. G. Au y P. Modrich. 1989. DNA mismatch correction in a defined system. *Science.* 245, 160-164.
37. LaKosa, R. A. y T. K. Dyk. 1991. Physiological roles of DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding of macromolecular sponges? *Mol. Microbiol.* 5(3), 529-534.
38. Lieb, M. 1991. Spontaneous Mutation at a 5-methylcytosine hotspot is prevented by very short patch (VSP) mismatch repair. *Genetics.* 128, 23-27.
39. Lindahl, T. 1974. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 71(9), 3649-3653.
40. Lindquist, S. 1986. The Heat-Shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
41. Lobner-Olsen, A., E. Boye y M. G. Marinus. 1992. Expression of the *Escherichia coli* *dam* gene. *Mol. Microbiol.* 6(13), 1841-1851

42. Louarn, J., V. Francois y J. M. Louarn. 1990. Chromosome replication pattern in *dam* mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 221, 291-294.
43. Maden, B. E. H. 1988. Locations of methyl groups in 28S rRNA of *Xenopus laevis* and man, clustering in the conserved core molecule. *J. Mol. Biol.* 201, 289-314.
44. Mamelak, L. y H. W. Boyer. 1970. Genetic control of the secondary modification of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104, 57-62.
45. Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor (Ed.). New York.
46. Marinus, M. G. y N. R. Morris. 1974. Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 85, 309-322.
47. Marinus, M. G. y N. P. Morris. 1975. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (*dam-3*) in *Escherichia coli* K12. *Mutation Res.* 28, 15-26.
48. Marinus, M. G. 1984. Methylation of prokaryotic DNA. en: DNA methylation: Biochemistry and Biological significance. Razin, A., H. Cedar y A. D. Riggs. Ed. Springer series in Molecular Biology. New York. 82-109 pag.
49. Marinus, M. G. 1985. DNA methylation influences *trpR* promoter activity in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 200, 135-186.
50. Marinus, M. G. 1987. DNA methylation in *Escherichia coli* *Ann. Rev. Genet.* 21, 113-131.
51. Marinus, M. G. 1987. Methylation of DNA. en: Neidhardt, F.C., J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. Washington D. C.
52. Merkl, R., M. Kroger, P. Rice y H-J Fritz. 1992. Statistical evaluation and biological interpretation of non-random abundance in the *E. coli* K12 genome of tetra and pentanucleotide sequences related to VSP DNA mismatch repair. *Nucleic acids. Res.* 20(7), 1657-1662.
53. Messer, W., V. Bellekes y H. Lother. 1985. Effect of *dam* methylation on the activity of the *E. coli* replication *ori* *Fin*, *oriC*. *EMBO J.* 4, 1327-1332.
54. Messer, W. y M. Nover-Weidner. 1988. Timing and targeting: the biological functions of *Dam* methylation in *E. coli*. *Cell*

55. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor (Ed). New York.
56. Modrich, P. 1989. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J. Biol. Chem.* 262(12). 6597-6600.
57. Modrich, P. 1991. Mechanisms and Biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 25. 229-253.
58. Neidhardt, F. C. y R. A. van Bogelen. 1987. Heat shock response. en: Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger. (Eds). *Escherichia coli y Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology. Washington
59. Nevins, J. R. 1983. The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* 52. 441-446
60. Peterson, K. R., K. F. Wertman, D. W. Mount y M. G. Marinus. 1985. Viability of *Escherichia coli* K12 DNA adenine methylase (*dam*) mutants requires increased expression of specific genes in SOS regulon. *Mol. Gen. Genet.* 201. 14-19.
61. Phillips, G. L., J. Arnold y R. Ivarie. 1987. Mono-through hexanucleotide composition of the *Escherichia coli* genome: a Markov chain analysis. *Nucleic Acids Res.* 15. 2611-2626.
62. Razin, A. y A. D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. *Science.* 210. 604-610
63. Rich, A. y U. L. Rajbhandary. 1976. Transfer RNA: Molecular structure, sequence and properties. *Ann. Rev. Biochem.* 45. 805-860
64. Russel, D. W. y N. D. Zinder. 1987. Homimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell.* 50. 1071-1079.
65. Sain y Murray. 1980. The *hsd* (host specificity) genes of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 35-46.
66. Sohail, A., M. Lieb, M. Dar y A. S. Bhagwat. 1990. A gene required for very short patch repair in *Escherichia coli* is adjacent to the DNA cytosine methylase gene. *J. Bact.* 172(3), 4214-4221.
67. Som, S., A. Bhagwat y S. Friedman. 1987. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the EcoRII modification enzyme. *Nucleic Acids Res.* 15. 311-331.
68. Takeda, Y., N. E. Harding, D. W. Smith y J. W. Zyskind. 1982. The Chromosomal origin of replication (*oriC*) of *Erwinia carotovora*. *Nucleic Acids Res.* 10. 2639-2650.

69. Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum y A. Razin. 1983. Sequence and substrate specificity of isolated DNA methylases from *Escherichia coli* C. J. Bact. 152(1), 274-280.
70. van Holde, K. E. 1989. Chromatin. Springer-Verlag, New York. 67-180 pag.
71. Wilson, G. G y Murray. 1991. Restriction and modification systems Annu Rev Genet 35, 585-627