

# Temas de debate

## Comisión de Normalización de Métodos Microbiológicos

**José Martínez Peinado**

Vicepresidente de la SEM

Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología,

Universidad Complutense 28040 Madrid

E-mail: peinado@eucmax.sim.ucm.es

La SEM, desde su fundación hace más de 50 años, nunca ha separado el avance en el conocimiento microbiológico de su aplicación, fomentando ambos. Así lo plasmó en sus primeros estatutos al afirmar que sus actividades comprenderían "todas las especialidades y aspectos microbiológicos, tanto desde el punto de vista científico puro, como desde el de la aplicación". Por ello, la SEM ha colaborado y ha estado representada en organismos de la administración relacionados con la profesión de microbiólogo, participando en las Comisiones Nacionales de la Especialidad de Microbiología, en AENOR, en comités de expertos y en tribunales para otorgar plazas de microbiólogo. Esta larga tradición se ha plasmado también en nuestros estatutos actuales aprobados en 1990. El Art. 3.c dice textualmente que será un objetivo de la SEM "la planificación, organización y eventual administración de proyectos relativos a investigación microbiológica o a aplicación de la microbiología, si hubiera lugar". Fomentar y velar por la correcta aplicación de los avances en microbiología, desarrollando o buscando la mejor técnica disponible, y facilitando su aprendizaje a los socios, es por tanto no sólo una tradición de la SEM, sino una obligación estatutaria.

El Art. 3.c. citado arriba, habla del desarrollo de proyectos relativos a la aplicación de la Microbiología "si hubiera lugar". La realidad es que cada vez hay más lugar. Y una prueba muy estimulante de la vitalidad de la SEM y de su incardinación en la sociedad, que le hace estar alerta con los problemas más actuales, es la conciencia que ha ido desarrollándose entre muchos socios de que "hay lugar" y que la SEM debe ocuparlo potenciando sus capacidades para ello, que son muchas como veremos.

El primer síntoma de la inquietud de los socios por potenciar unas actividades en las que la SEM, como hemos visto, siempre estuvo implicada, se detectó en la reunión del Grupo de Microbiología Acuática del 98. Uno de los resultados de dicha reunión fue la redacción de un informe titulado "**Presencia/ausencia de los micro-**

**biólogos españoles en las organizaciones de estandarización/normalización de métodos y en foros legislativos**", que fue entregado por el presidente del Grupo a la Junta Directiva en junio de 1998. La Junta comenzó a trabajar sobre ello y detectamos que otros grupos, como Alimentos y Biodeterioro también se habían planteado inquietudes semejantes y desarrollado iniciativas en el mismo sentido. Este estado de opinión fue ampliamente debatido en nuestro congreso en Granada, tanto en las mesas redondas de los grupos como entre los socios en las reuniones informales de pasillo y, lógicamente, también en la Junta Directiva. El resultado final, que todos conocéis, es la aprobación por la Asamblea de la SEM, a propuesta del Presidente, de una Comisión formada por los presidentes de los grupos inicialmente implicados (Microbiología del Medio Acuático, de los Alimentos y Biodeterioro) y los Drs. Alberto Ramos, Juan José Borrego y Rafael Rotger, a la que se ha unido posteriormente Federico Uruburu como director de la CECT. La coordinación ha sido encomendada al vicepresidente de la SEM.

No partimos de cero y por ello la Comisión ha comenzado a trabajar estudiando la forma de potenciar las acciones que ya se vienen desarrollando y de encajar las nuevas propuestas en las estructuras de la SEM. Hemos desarrollado un esquema de las actuales y futuras actividades a desarrollar basándonos en la génesis de un nuevo método microbiológico, desde su creación en un laboratorio, su evaluación y normalización por los organismos competentes hasta su aplicación rutinaria en los laboratorios de análisis:

### **NIVEL 1: Desarrollo de nuevos métodos (más rápidos, sensibles, específicos, baratos...).**

En este campo los socios de la SEM son bastante activos y el número de comunicaciones en los últimos congresos lo muestra. Una primera sugerencia interesante recibida por la Comisión es la de realizar reuniones monográficas intergrupos (Alimentos-Aguas, por ejemplo) interesados en la misma metodología. Más sugerencias serán bienvenidas.

**NIVEL 2: Evaluación de los nuevos métodos.****Elaboración de informes con fines legislativos. Participación en organismos nacionales e internacionales de normalización.**

Es una de las tareas más complejas pero en la que bastantes socios de la SEM ya tienen experiencia, sea porque fueron nombrados por la propia SEM representantes en dichos organismos o porque han sido invitados directamente por ellos, por ser expertos reconocidos. En esta fase lo más importante es recoger toda la información y la experiencia acumuladas para formular propuestas viables y eficaces. El informe del grupo de Microbiología del Medio Acuático ya citado, las ponencias sobre este tema en Granada o un trabajo enviado por el director de la CECT que vamos a difundir, son buenos ejemplos de la rapidez y generosidad con que los socios están compartiendo sus experiencias. A partir de este acervo la Comisión ira elaborando propuestas de acción. Esperamos muchas colaboraciones.

**NIVEL 3: Implementación de los métodos normalizados o recomendados en los laboratorios de análisis.**

Es éste uno de los temas que más nos atañe, no sólo por la necesidad sentida y expresada por

muchos socios, sino porque además es un mandato estatutario. En efecto, el Art.3.e nos señala el objetivo de "Contribuir a la educación microbiológica, a nivel formativo, interprofesional y de educación continuada". Un amplio campo en el que somos capaces, sin grandes dificultades, de hacer muchas cosas y esperamos que los socios notarán rápidamente la ayuda de la SEM. Un excelente y primer ejemplo es el resumen legislativo que han preparado en el Grupo de Microbiología de los Alimentos difundiendo a través de su Red de correo electrónico y página WEB. Sin salirnos de Internet, son obvias las posibilidades formativas que la SEM puede ofrecer a través de este medio, y contamos para ello con la experiencia de nuestro compañero Andrés Chordi. Y todos los cursos que necesitemos, vayáis proponiendo y sean factibles.

Es obvio que para implementar todo lo que vaya surgiendo hará falta conseguir financiación. Los distintos Ministerios implicados, la CICYT a través de proyectos o Acciones Especiales y las organizaciones dedicadas a la normalización pueden y deben ayudarnos. Pero lo más importante será siempre la colaboración entusiasta, generosa y sostenida de todos. Confiadamente la esperamos.

## ***La Sociedad Española de Microbiología y el aseguramiento de la calidad microbiológica***

**Federico Uruburu Fernández**

Director de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)  
Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, Universidad de Valencia  
46100 BURJASSOT (Valencia)  
E-mail: cect@uv.es

En los últimos años ha surgido en los distintos laboratorios microbiológicos un enorme interés en asegurar la calidad del trabajo que realizan. Unas veces es un imperativo legal el que obliga a ello, y otras veces es por interés del propio laboratorio. Como consecuencia, existen muchas normativas y recomendaciones, que tienden a conseguir que los resultados conseguidos en estos laboratorios sean fiables y comparables entre sí. En el último Congreso Nacional de Microbiología, celebrado en Granada durante los días 17 al 21 de Septiembre de 1999, tuvimos ocasión de comprobar la importancia de estos temas que fueron tratados en Mesas Redondas. La Junta Directiva de la SEM, ante el interés general de los microbiólogos españoles, decidió tomar iniciativas para ayudarles, encargando a tres miembros de la misma (Dr. Martínez Peinado como coordinador, Dr. Rotger y Dr. Borrego) junto con los presidentes de los tres grupos especializados de la SEM más relacionados con estos problemas (Dr. Iriberry por el Grupo de Microbiología del Medio Acuático; Dr. Laborda por el Grupo de Biodeterioro y Biodegradación y Dr. Ordóñez por el Grupo de Microbiología de los Alimentos) que estudiaran qué podía hacer la SEM para estandarizar lo más posible los métodos y ordenar la confusa normativa actual. Sobre todo interesa que los microbiólogos españoles intervengan en la elaboración de las normativas europeas.

La SEM ya desde hace tiempo interviene en la resolución de estos problemas, porque la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) está patrocinada por ella, y es bien sabido el importante papel que las colecciones de cultivo desempeñan en el aseguramiento de la calidad microbiológica. Precisamente, el hecho de que unos días antes del congreso de Granada hubiésemos impartido en los laboratorios de la CECT en Burjasot nuestro primer curso teórico-práctico sobre conservación y control de cepas microbianas, junto con todo lo que pudimos vivir en Granada, me ha llevado a escribir estas líneas como una modesta contribución a la aclaración de los aspectos más

confusos de los problemas y al mismo tiempo informar del interés de la SEM en ello.

Para la calibración de los aparatos de laboratorio, para la evaluación de un método de medida o para la asignación de valores materiales, existen los llamados materiales de referencia, que son materiales o sustancias que sirven para ello, por ser claramente homogéneos y estar claramente establecidos. A ellos hay que referirse o hay que usarlos para un trabajo correcto en los laboratorios. En las técnicas microbiológicas existen, por lo tanto, las cepas de referencia, que son los microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocidas, como es la CECT o la ATCC. Vemos ya, que un servicio muy importante de las colecciones de cultivos es proporcionar no sólo cepas microbianas, útiles para muchas cosas, pues ya sabemos que en Microbiología cada aislamiento es un cepa distinta, sino que, dentro de las cepas que suministran las colecciones, están las cepas de referencia, que sirven para demostrar la trazabilidad del laboratorio.

Los materiales de referencia deben cumplir tres requisitos. Veamos cuáles con y su trasplante al trabajo microbiológico:

- 1º.- Estabilidad.** En Microbiología quiere decir que las células microbianas puedan crecer. Por eso las colecciones suministran las cepas con las instrucciones para su recuperación.
- 2º.- Homogeneidad.** En Microbiología quiere decir que se trata de un cultivo puro.
- 3º.- Valor de la propiedad.** En Microbiología quiere decir que se trata de una cepa microbiana auténtica.

Curiosamente, estos tres requisitos coinciden con las tres finalidades que se persiguen con un buen método de conservación de cepas microbianas, es decir, se deben guardar las cepas vivas, puras y genéticamente estables. Por lo tanto, los dos primeros requisitos de un material de referencia, que son los dos primeros objetivos

de un buen método de conservación, son fáciles de cumplir si uno posee los conocimientos básicos en Microbiología. Pero el tercer requisito y tercer objetivo es muy difícil de conseguir, pues es de todos conocido la facilidad con que una cepa microbiana cambia sus características con los subcultivos que de ella se van haciendo. Por eso los métodos de conservación son tanto mejores cuanto más se evita el crecimiento de la cepa que se guarda, y en las recomendaciones para un trabajo microbiológico correcto, se habla de la diferencia entre cepas de reserva y cepas de trabajo. El laboratorio debe manejar las cepas siguiendo las recomendaciones de las normas correspondientes para asegurar la calidad de su trabajo, y sobre todo debe conservar la cepa adecuadamente (por congelación o liofilización, si es posible), controlar su pureza y que no haya perdido las características propias de las mismas.

Todo lo anteriormente expuesto lleva a una conclusión, muy importante en Microbiología: cada cepa de una colección es única, lo cual quiere decir que los resultados de trabajos de microbiología realizados en diferentes laboratorios en distintos momentos, y utilizando cepas que tienen un mismo número en una colección, sólo son comparables entre sí si los cultivos se obtuvieron de esa colección. Si una cepa de colección se consigue por cualquier vía que no sea la propia colección, no se puede mencionar utilizando el número que tienen en esa colección, sino solamente como derivada de la cepa de la colección.

Como en las metodologías oficiales de microbiología se suelen citar las cepas de referencia, con los números que tienen éstas en la *American Type Culture Collection* de los Estados Unidos (ATCC), quiere decir que, estrictamente, solamente puede ser la ATCC la que suministre las cepas de referencia. Pero en la práctica esto no es así, y todas las colecciones tienen las mismas cepas de referencia que han obtenido a través de diferentes vías, y los usuarios consiguen su cepa

de referencia a partir de muchas y variadas colecciones, aunque las piden con los números de la ATCC. Además, como una misma cepa puede ser referencia para muchas cosas, últimamente está ocurriendo que una cepa se hace inadecuada para un determinado uso, sin haber perdido las características que le hacen adecuada para otros, y muchas veces las colecciones ignoran algunos de los usos de la cepa y por lo tanto no pueden controlar su autenticidad.

Este problema de la autenticidad de una cepa de referencia se complica aun más cuando se solicita a la colección que certifique la cepa. En ese caso, la cepa de referencia sería un material de referencia certificado, es decir, el material de referencia en cuestión acompañado de un certificado en el cual, uno o más valores de sus propiedades, han sido certificadas mediante un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de dichas propiedades. Pero en nuestro caso el material de referencia es un material biológico, y surge entonces la dificultad en la certificación. Una colección de cultivos puede certificar solamente que ha suministrado una determinada cepa, después de comprobar que se trata de un cultivo puro y que al haberse conservado la cepa con todo cuidado y haberla caracterizado por las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares adecuadas, es difícil que se haya producido un cambio genético en sus propiedades, cosa que puede ocurrir con relativa frecuencia en microbiología.

Como resumen final de todo lo anteriormente expuesto presentamos un modelo de los certificados de origen o de calidad que emite la CECT, en los cuales se certifica lo más posible la autenticidad de la cepa, solamente hasta el momento en que se envía al usuario. Si este cumple con todas las recomendaciones de la metodología microbiológica, se habrá asegurado casi totalmente la calidad microbiológica de su trabajo, que es el objetivo final que se pretendía conseguir.

### **Certificado de Análisis**

#### **Cepa: *Pseudomonas aeruginosa*. CECT 111**

Para cumplimiento de las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (GMP) y la norma ISO 9000, certificamos que los tubos liofilizados que se suministran se han obtenido a partir de cultivos puros de la cepa microbiana *Pseudomonas aeruginosa* CECT 111, después de haber comprobado su autenticidad realizando las determinaciones morfológicas y bioquímicas que se recomiendan en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9ª Edición. Esta cepa procede de la cepa NCIMB 8626, la cual a su vez se corresponde con la cepa ATCC 9027. La CECT no se responsabiliza de cualquier cambio genético que se pudiera haber producido durante su almacenamiento.

# Temas de actualidad

## Metilación Dam, regulación génica y patogénesis

Josep Casadesús

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla  
E-mail: genbac@cica.es

En el DNA de las Enterobacterias y de otros grupos bacterianos, los residuos de adenina que forman parte de sitios 5'-GATC-3' están metilados en la posición N°. Un genoma como el de *Salmonella* o el de *Escherichia coli*, con un 50% de C+G, contiene unos 20.000 sitios GATC. La metilación de adenina (o metilación Dam) es postreplicativa. Durante la replicación, la DNA polimerasa introduce nucleótidos estándar, generando DNA hemimetilado (metilado en la cadena molde, desmetilado en la cadena de nueva síntesis). Este DNA hemimetilado tiene una existencia muy breve: la metiltransferasa Dam sigue a la horquilla de replicación a unas 6 kb de distancia, y metila los sitios GATC hemimetilados producidos por la replicación.

La célula bacteriana usa la metilación Dam como un mecanismo de memoria espacio-temporal, cuyas señales sirven para indicar dónde o cuándo debe actuar una determinada función celular (1). Por ejemplo, el estado de metilación de dianas GATC situadas en el origen de replicación indica cuándo debe iniciarse la replicación del DNA y, en una etapa posterior, cuándo deben repartirse los cromosomas recién replicados a las células hijas nacientes (2, 3). Tras la replicación, la hemimetilación transitoria de los sitios GATC indica cuál es la cadena vieja y cuál es la nueva, y ello sirve para reparar en la dirección adecuada los emparejamientos erróneos de nucleótidos producidos por errores de replicación. También se conocen ejemplos de genes regulados por metilación Dam (4-6). En los casos más simples, la transcripción del gen está acoplada al ciclo celular, de modo que el promotor sólo es activo en un determinado estado de metilación. Por ejemplo, el promotor del gen de la transposasa de IS10 sólo es activo en estado hemimetilado. En cambio, el promotor principal de *dnaA* sólo es activo si está metilado. En otros promotores, la regulación transcripcional por metilación es más compleja, debido a la posibilidad de bloquear la remetilación de sitios GATC mediante la unión de proteínas (7, 8). En la primera generación, el bloqueo de la metilación produce DNA hemimetilado; tras dos generaciones, se forma DNA desmetilado. En algunos casos, se ha observado que el bloqueo de

la metilación está asociado a señales fisiológicas o ambientales (7, 8). Como la metilación afecta a la estructura del DNA, el estado de metilación de sitios GATC críticos puede modificar la constante de afinidad entre determinadas proteínas y sus dianas en el DNA. Entre esas proteínas se encuentra la RNA polimerasa, además de una serie de reguladores transcripcionales como CRP, Lrp y OxyR.

Uno de los ejemplos mejor estudiados de regulación génica por metilación Dam es el operón *pap* de estirpes uropatogénicas de *E. coli* (9). El operón *pap* rige la síntesis de fimbrias implicadas en la adhesión al epitelio del tracto urinario y tiene una regulación compleja, cuyo funcionamiento ha sido descifrado con elegancia y detalle por el grupo de David A. Low, de la Universidad de California en Santa Barbara (UCSB). La transcripción de *pap* está regulada por un mecanismo de cambio de fase, en el que un elemento clave es el estado de metilación de dos sitios GATC situados corriente arriba del promotor (9). Un regulador global de la transcripción, la proteína Lrp, determina el estado de metilación de dichos sitios, y en definitiva el acceso de la RNA polimerasa al promotor (9). Como consecuencia, la metilación Dam regula la frecuencia de cambio de fase en el promotor *pap*.

Otro operón de fimbrias regulado por metilación Dam es el operón *tra* del episoma F y de otros plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad (10). En este caso, la función de la metilación Dam consiste en reprimir la transcripción de *tra*, y por tanto la transferencia del plásmido. La metilación no regula la transcripción de *tra*, sino la del gen regulador *finP* (10). Este gen, que sólo es activo en un fondo Dam<sup>+</sup>, especifica un RNA antisentido que reprime la conjugación. El significado fisiológico de la represión de la conjugación por metilación Dam se desconoce, pero los indicios apuntan hacia un mecanismo que regula la síntesis del pelo sexual como respuesta a condiciones fisiológicas o a señales externas (10).

Dos artículos recientes han mostrado que la metilación Dam es esencial para la virulencia en *Salmonella typhimurium*, abriendo un nuevo campo de investigación cuyo alcance aún

desconocemos (11, 12). Experimentos de infección de ratones han mostrado que los mutantes Dam<sup>-</sup> de *S. typhimurium* son avirulentos, tanto si se administran por vía oral como por vía intraperitoneal. La disminución de la virulencia debida a la carencia de metilación es espectacular: la DL<sub>50</sub> de un mutante Dam<sup>-</sup> es 1.000-10.000 veces mayor que la de la estirpe silvestre (11, 12). Un rasgo inesperado de los mutantes Dam<sup>-</sup> de *S. typhimurium* es su capacidad para persistir, aunque en número bajo de células, en el hígado y el bazo de los animales infectados. Ello los convierte en una vacuna ideal (11, 12). La asociación entre metilación Dam y virulencia también plantea la posibilidad de diseñar fármacos dirigidos contra la metilasa. Un fármaco que inactivara la enzima eliminaría la virulencia, y en principio debería ser inocuo para el hospedador, ya que el DNA de los vertebrados no contiene cantidades detectables de adenina metilada.

Como las mutaciones *dam* son pleiotrópicas, la relación entre metilación Dam y virulencia no es obvia ni fácil de desentrañar. Experimentos realizados por Francisco García del Portillo y Graciela Pucciarelli en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM, Cantoblanco), en colaboración con mi laboratorio, han mostrado que los mutantes Dam<sup>-</sup> de *S. typhimurium* tienen disminuida la capacidad para invadir células epiteliales (12). Como dicha capacidad está relacionada con la secreción de proteínas, el paso siguiente consistió en investigar si los mutantes Dam<sup>-</sup> de *S. typhimurium* presentaban defectos de secreción. Los resultados superaron todas las previsiones: los patrones de proteínas secretadas son diferentes en fondos genéticos Dam<sup>+</sup> y Dam<sup>-</sup>, y los mutantes deficientes

en metilación secretan cantidades menores de algunas proteínas relacionadas con la invasión. También secretan una serie de proteínas desconocidas que no aparecen en el extracto de la estirpe silvestre (12). Además, ensayos en asas de ileon han indicado que los mutantes Dam<sup>-</sup> no son citotóxicos sobre las células M de las placas de Peyer (12).

El grupo de Michael J. Mahan, de la UCSB, ha obtenido otro tipo de indicios que pueden ayudar a definir la relación entre metilación Dam y patogénesis. Según Mahan, al menos veinte genes de *Salmonella* que se activan durante la infección están corregulados por metilación Dam y por PhoP, una proteína de unión al DNA que regula la transcripción de numerosos genes de virulencia en *Salmonella* (11). Es posible que algunos de los genes reprimidos por Dam descritos por Mahan codifiquen las proteínas secretadas que García del Portillo y colaboradores han detectado en mutantes Dam<sup>-</sup> (12). El aumento en la secreción de determinadas proteínas puede ser un factor clave en la pérdida de virulencia, ya que la presentación incontrolada de múltiples antígenos al sistema inmune puede facilitar la respuesta del hospedador.

Además de *Escherichia* y *Salmonella*, muchos otros géneros del grupo alfa de las Proteobacterias tienen metilación del DNA (13). En *Caulobacter*, la metilasa CcrM, que metila la adenina en las dianas 5'-GANTC-3', regula el ciclo celular y es esencial para la viabilidad de la célula (14). Mahan ha sugerido la posibilidad de que, además de *Salmonella*, otras bacterias patógenas tengan genes de virulencia regulados por metilación del DNA. Algunos candidatos son los géneros *Shigella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Vibrio* y *Treponema*, todos los cuales poseen metilasa Dam (11). Es posible que la metilación del DNA bacteriano nos depare grandes sorpresas en los próximos años.

#### Josep Casadesús Pursals

obtuvo el Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada. Ha realizado investigación postdoctoral en las universidades de Sussex (Reino Unido) y Utah (Estados Unidos). Ha sido profesor visitante en el Biozentrum de Basilea (Suiza) y en la Universidad de Sassari (Italia).



Actualmente es catedrático de Genética en la Universidad de Sevilla, y presidente del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM.

Sus intereses investigadores se centran en la genética de *Salmonella*, e incluyen aspectos como el estudio de elementos transponibles (IS2000), del fago P22, del comportamiento de mutantes His(c), o de la regulación por la metilasa Dam.

#### Referencias

1. Messer W, Noyer-Weidner M (1988) Timing and targeting: the biological functions of Dam methylation in *E. coli*. Cell 54: 735-737.
2. Boye E, Løbner-Olesen A (1990) The role of Dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. Cell 62: 981-989.
3. Ogden GB, Pratt MJ, Schaechter M (1988) The replication origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. Cell 54: 127-135.

4. Noyer-Weidner M, Trautner TA (1993) Methylation of DNA in prokaryotes, En: Jost JP, Saluz HP (eds) DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. Basilea: Birkhäuser Verlag, pp 39-108.
  5. Marinus MG (1996) Methylation of DNA. En: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Washington DC: ASM Press. pp 782-791.
  6. Casadesús J, Torreblanca J (1996) Methylation-related epigenetic signals in bacterial DNA. En: Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (eds) Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 141-153.
  7. Hale WB, van der Woude MW, Low DA (1994) Analysis of nonmethylated GATC sites in the *Escherichia coli* chromosome and identification of sites that are differentially methylated in response to environmental stimuli. J. Bacteriol. 176: 3438-3441.
  8. van der Woude M, Hale WB, Low DA (1998) Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in gut and *pap* operons. J. Bacteriol. 180: 5913-5920.
  9. van der Woude M, Braaten B, Low DA (1996) Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. Trends Microbiol. 4: 5-9.
  10. Torreblanca J, Marqués S, Casadesús J (1999) Synthesis of FinP RNA by plasmids F and pSLT is regulated by DNA adenine methylation. Genetics 152: 31-45, 1999.
  11. Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., Mahan, M. J. 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. Science 284: 967-970.
  12. García del Portillo F, Pucciarelli MG, Casadesús J (1999) DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* are deficient in protein secretion, cell invasion and M cell cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11584-11588.
  13. Barbeyron T, Kean K, Forterre P (1984) DNA adenine methylation of GATC sequences appeared recently in the *Escherichia coli* lineage. J. Bacteriol. 160: 586-590.
  14. Reisenauer A, Kahng LS, McCollum S, Shapiro L (1999) Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? J. Bacteriol. 181: 5135-5139.
-

## Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos

Juan María García Lobo

Departamento de de Biología Molecular, Universidad de Cantabria.

Unidad asociada al Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

E-mail: jmglobo@medi.unican.es

A lo largo del último cuarto de siglo, la atención de los que nos hemos dedicado al estudio de las bases genéticas de la resistencia a antibióticos en bacterias ha estado fijada en una serie de elementos, que al final han encajado unos dentro de otros como un juego de muñecas rusas. En los años 70 nuestro objeto de deseo eran los plásmidos, a finales de esa década y durante toda la siguiente tuvimos un nuevo sujeto de estudio, los trasposones, y en estos momentos el interés de algunos de nosotros se centra en una nueva clase de elementos genéticos, los integrones.

### Definición.

Las primeras pistas sobre la existencia de esta clase de elementos se obtienen estudiando el trasposón Tn21. Analizando las funciones de recombinación de este elemento se observaron una clase de recombinantes sitio-específicos, diferentes de los producidos por la trasposasa e independientes de ésta y de los extremos invertidos del trasposón. El estudio detallado de estos recombinantes y de las secuencias requeridas para su obtención, revelaron la presencia de un elemento independiente, más tarde denominado integrón, dentro del trasposón Tn21.

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, pero no exclusivamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en el integrón para escindirse en forma de círculos autónomos (no replicativos) y a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente.

Cada día se acumulan nuevos datos que nos indican que los integrones son ubicuos, sobre todo en plásmidos o cromosomas de bacterias Gram negativas, pero también se han descrito en Gram positivos, y quizás el hallazgo más sorprendente fue el encontrar un integrón en el cromosoma de una cepa de *Mycobacterium fortuitum*.

### Estructura genética

Para la actividad de los integrones se requiere un gen que codifica una recombinasa sitio específica, la integrasa. Esta enzima cataliza la recombinación sitio-específica entre dos secuencias cortas de DNA que pueden ser de dos clases: *attI* o *attC*, que son los sitios primarios de reconocimiento de la integrasa.

En la actualidad se habla de hasta cuatro clases de integrones, que se distinguen por la integrasa que codifican. Sin embargo puesto que los más comunes son con mucho los integrones de tipo I, la mayor parte de este texto se referirá a ellos salvo referencia expresa a alguno de los otros grupos.

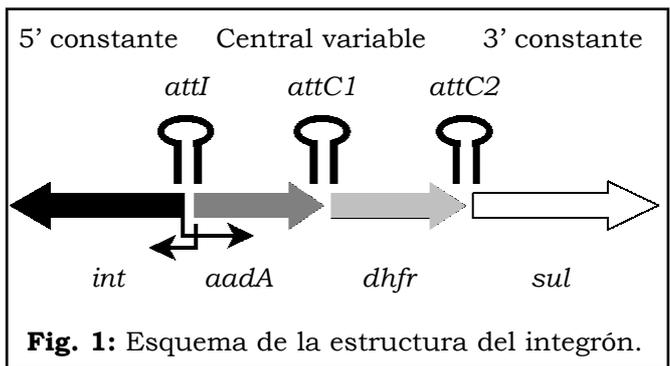


Fig. 1: Esquema de la estructura del integrón.

Estructuralmente se suele hablar de tres regiones en un integrón (Figura 1): Una **región constante 5'** que contiene básicamente el gen de la integrasa que se transcribe de derecha a izquierda. En el extremo 5' del gen de la integrasa se encuentra una región con dos promotores divergentes que controlan respectivamente la transcripción del gen de la integrasa y la de los genes estructurales situados a la derecha. A continuación nos encontramos una **region central variable** en la que se localizan los genes estructurales del integrón (casi siempre genes de resistencia a antibióticos) en número variable que suele oscilar de uno a cuatro, aunque conocemos integrones descargados (In0) que no contienen ningún gen en la región central. Las regiones constante 5' y central variable están separadas por la secuencia *attI*, uno de los sitios de reconocimiento de la integrasa. Los genes constitutivos

en la región central están separados unos de otros por secuencias *attC*. Una característica de esta región central es su compacidad genética. Las regiones no codificantes suelen ser siempre muy cortas, generalmente menos de 10 pb. De este modo es posible la organización de todos los genes en una sola unidad transcripcional controlada por el promotor presente en la región constante 5', aunque las secuencias *attC* intergénicas pueden actuar como terminadores parciales de la transcripción. Dependiendo de los genes presentes en la región central se ha propuesto una nomenclatura para los integrones In0, In1, In2... No obstante, la enorme diversidad que se está encontrando en la región central de los integrones hace este sistema poco práctico, y resulta más sencillo hacer una descripción de los integrones por los genes presentes en la región variable.

A continuación de la región central encontramos otra **región constante 3'** en la que encuentra un gen de resistencia a sulfamidas y otros dos marcos abiertos de lectura.

### El integrón como elemento trasponible.

Al estudiar en los trasposones de la familia del Tn21, las secuencias colindantes con las regiones constantes del integrón que acabamos de definir se encuentran genes para una trasposasa y dos repeticiones invertidas flanqueando el conjunto que constituyen un trasposón dentro del Tn21. En algunas ocasiones este hallazgo ha llevado a definir el integrón como la región comprendida entre estas dos repeticiones invertidas. Sin embargo, es más correcto considerar esta región como un trasposón, dentro del cual se encuentra un integrón. Este trasposón es activo y de hecho, junto con el Tn21 que lo alberga, puede ser responsable de la gran diseminación de los integrones en enterobacterias.

### La integrasa.

En los integrones de clase I la integrasa es una proteína de 337 aminoácidos con un tamaño calculado de 38 kDal. La comparación de secuencias ha permitido determinar que la integrasa del integrón pertenece a una amplia familia cuyo prototipo es la integrasa del fago  $\lambda$ . A esta familia pertenecen la mayoría de las integrasas de bacteriófagos y proteínas de resolución de genomas circulares, tanto en bacterias como en plásmidos (XerC y XerD de *Escherichia coli*, Cre del plásmido P1) y proteínas como FLP codificadas por plásmidos de levaduras. Las señas de identidad de esta familia de integrasas se localizan en el extremo carboxilo terminal de la proteína, donde encontramos cua-

tro residuos totalmente conservados: la tríada H-R-H, más una tirosina directamente implicada en la reacción de trans-esterificación. Las similitudes entre integrasas de la familia en la mitad amino-terminal son casi inexistentes. La cristalografía de rayos X ha permitido determinar la estructura tridimensional de cuatro proteínas de esta familia: las integrasas de I y del fago HP1, la proteína Cre y XerD. De estas La similitud en el extremo carboxilo permite aventurar que la estructura de la integrasa del integrón es similar en esta región a las otras de la familia, pero no sabemos nada de la estructura en la región amino terminal. La proteína se ha sobreexpresado y purificado, y es probable que se encuentre formando dímeros.

### Los sitios primarios de actuación de la integrasa.

Ya he mencionado antes que la integrasa actúa sobre dos clases de sitios primarios llamados *attI* y *attC*. En trabajos anteriores los sitios de reconocimiento de la integrasa se han denominado también RHS (*Recombination Hot Spots*) y los sitios *attC* también se han llamado elementos de 59 pares de bases (59 pb-e).

Los sitios *attC* se localizan entre los genes estructurales del integrón. Se conocen muchos sitios *attC*, generalmente asociados a genes diferentes. Aunque los primeros caracterizados tenían un tamaño de alrededor de 60 pb, en la actualidad se han descrito sitios *attC* de hasta 120 pb. La descripción exacta de un sitio *attC* concreto exige cuando menos indicar el gen al que se encuentra asociado, y en caso de que esto no fuese suficiente, habría que indicar también el integrón en el que se encuentra: por ejemplo, *attCaadA1In2* sería el sitio *attC* que se halla al lado 3' del gen *aadA1* en el integrón In2. Además de ser de tamaño variable, los sitios *attC* también son muy variables en su secuencia y solamente muestran alguna constancia en los extremos. Lo que siempre sucede en todos los sitios *attC* es que su secuencia es un palíndromo imperfecto, lo que les confiere la capacidad de formar estructuras tipo horquilla cuando están en forma de DNA de cadena sencilla o de formar cruciformes cuando se localizan en DNA superenrollado. La secuencia más frecuente en los extremos de los sitios *attC* es CTAAC .....(50-110 pb).....GTTAG

El sitio *attI* se localiza al lado 5' del gen de la integrasa, y marca la separación entre la región conservada 5' y la región central variable. Al contrario de lo que ocurre con los sitios *attC*, el sitio *attI* es prácticamente igual en todos los integrones. A pesar de esta constancia no hay un con-

sensu sobre los límites precisos del sitio *attI*. Una de las propuestas considera al sitio *attI*, por analogía con *attC*, también como un palíndrome imperfecto de 45 pb: GCAAC...(35 pb)...GTTAA.

### El sistema de ensayo de la actividad de la integrasa *in vivo*.

La manera más sencilla de probar la actividad recombinativa sitio-específica de la integrasa *in vivo* es un ensayo de conducción. Se requiere una cepa donadora *recA* que contenga simultáneamente tres plásmidos compatibles: un plásmido (A) que sobreexpresa la integrasa, un plásmido (B) conjugativo, pero sin trasposones, que contenga algún sitio *attI* o *attC*, y un tercer plásmido (C) no movilizable, también con sitios *attI* o *attC*. El ensayo consiste en estudiar la frecuencia de movilización del marcador del plásmido (C) no movilizable, lo que exige su unión física al plásmido (B). En los recombinantes se encuentra un único plásmido de tamaño igual a la suma de los tamaños de los plásmidos B y C. La naturaleza sitio-específica del proceso debe comprobarse por secuenciación de las uniones, o al menos por restricción de los recombinantes. Habitualmente se usa como fuente de la integrasa el plásmido pSU2056, que es un pUC con el gen *int* bajo el control del promotor *lac*. Estas condiciones de transcripción y número de copias son las apropiadas, ya que un mayor nivel de expresión de la integrasa hace a la bacteria inviable. El plásmido conjugativo empleado suele ser el plásmido IncW R388.

**Juan María García Lobo** es Licenciado y Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Bilbao (1981). Desde el comienzo de su tesis doctoral está dedicado al estudio de los mecanismos de diseminación de genes de resistencia a antibióticos en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, laboratorio que ha contribuido a la formación de muchos investigadores del área. Ha realizado estancias postdoctorales en La Universidad de California en Los Angeles, dedicada al estudio de la patogenicidad de *Yersinia*, y en la Universidad de Medicina y Estomatología de New Jersey (UMDNJ), dedicado al estudio del papel de la transcriptasa inversa bacteriana en el flujo genético. En la actualidad continúa en la Universidad de Cantabria, donde compagina la investigación en resistencia antibióticos con el estudio de los mecanismos de patogenicidad y epidemiología del género *Brucella*.



Utilizando este ensayo se encuentra que la frecuencia de recombinación entre dos sitios *attC* o entre un sitio *attI* y un sitio *attC* puede ser hasta de  $10^{-2}$ .

### Posición del sitio de entrecruzamiento.

La existencia de sitios *attC* muy diferentes ha permitido localizar con precisión el sitio de entrecruzamiento de la reacción de la integrasa en la G conservada en el extremo derecho de los sitios *attI* y *attC*:

```
attI:  GCAAC.....(35 pb).....GTTAA
attC:  CTAAC....(50-110 pb)....GTTAG
```

Esta localización muestra diferencias importantes con las otras integrasas de la familia. Éstas generalmente poseen un sitio principal (*core*) que consiste en un palíndrome con unas bases centrales. El sitio de entrecruzamiento se encuentra en la región central. La integrasa, generalmente un dímero, se une a cada brazo del palíndrome de forma simétrica y produce la transferencia de cadenas en la región central del palíndrome. Además, las dos moléculas que participan en la reacción son idénticas en esta región, lo que permite cierta migración de las ramas del intermediario de Holiday antes de la resolución. En el caso de la integrasa del integrón puede no haber ninguna homología entre los dos sitios participantes, y el sitio de entrecruzamiento no se encuentra en el centro, sino en un extremo del sitio *attC* (o *attI*).

### Integración o excisión. Cassettes de resistencia.

Dependiendo de que los sitios que intervienen en la reacción estén en replicones distintos o en el mismo replicón, se producen dos reacciones diferentes. En el primer caso tenemos una reacción de integración o de fusión de replicones, como ocurre en el ensayo de conducción descrito. Si la reacción ocurre entre dos sitios en el mismo replicón se produce una delección. La reacción de delección ocurre en los integrones naturales y da lugar a la producción de círculos covalentemente cerrados, independientes pero no replicativos, que consisten en un gen de resistencia y un sitio *attC*. Estos círculos se denominan cassettes de resistencia. Los cassettes de resistencia son sustrato para la reacción de la integrasa, ya que contienen un sitio *attC*. Un cassette puede integrarse generalmente en el sitio *attI* de otro integrón. Por este procedimiento se pueden generar integrones nuevos con cualquier combinación imaginable de cassettes preexistentes.

**Sitios secundarios de actuación de la integrasa.**

Utilizando el ensayo de conducción descrito anteriormente, observamos la formación de recombinantes dependientes de la integrasa a frecuencias bajas ( $10^{-7}$ ) cuando el plásmido no movilizable C no contenía un sitio *attI* ni *attC*. El análisis de estos recombinantes nos indicó que se trataba de fusiones simples entre el plásmido conjugativo B y el plásmido C. El estudio de los sitios implicados nos mostró que la recombinación usaba los sitios *attI* o *attC* del plásmido B. En el plásmido C se usaban sitios diferentes, pero en todos ellos se observó la secuencia GTWMW. Además de los ensayos *in vitro* que demostraban el uso de estos sitios sencillos se ha descrito la integración *in vivo* de cassetes en estas secuencias. El hecho de que la integrasa sea capaz de actuar sobre sitios sencillos (pueden aparecer cada 128 pb en el DNA) abre la posibilidad de que prácticamente cualquier gen cromosómico pueda escindirse como un cassette y llegar a formar parte de un integrón.

Además de estos pentanucleótidos sencillos, el análisis de diferentes sistemas nos ha permitido detectar sitios sobre los que la integrasa actúa con frecuencias intermedias entre las de los sitios primarios y las de los pentanucleótidos. El estudio de las secuencias de estos sitios ha mostrado que generalmente poseen combinaciones variables de pentanucleótidos consenso y cierta extensión de simetría de secuencia.

**Estructura modular de los sitios primarios *attC* y *attI*.**

La propuesta de una estructura modular para los sitios primarios de la integrasa deriva de dos observaciones: una, la comparación de las secuencias de los diferentes sitios *attC* conocidos, y dos, el hallazgo de sitios secundarios con actividad intermedia. La mayoría de los sitios primarios presenta una estructura palindrómica que consiste en dos pares de pentanucleótidos invertidos en cada extremo del sitio y una región central rica en G+C.

*attI*: GCAAC (3 pb) GTTAC... (19 pb) ...AAAAC (3 pb) GTTAA  
*attC*: CTAAC (5 pb) GTTCA... (28 pb) ...TTAAC (6 bp) GTTAG  
           pnt1                   pnt2   pnt3                   pnt4

De este modo se puede formar una horquilla en la que el pentanucleótido 1 se aparea con el 4 y el 2 con el 3. Sitios incompletos en los que falta alguno de los pentanucleótidos (generalmente el 1) o

con escasa simetría son los que se utilizan con frecuencias intermedias.

**Resultados obtenidos con la integrasa purificada.**

Al menos tres laboratorios diferentes han llevado a cabo la purificación de la integrasa y la han utilizado para experimentos *in vitro*. Con estas preparaciones se ha demostrado que la integrasa se une de forma específica a sus sitios primarios. Sin embargo, hay un matiz: mientras que la integrasa se une al sitio *attI* en forma de cadena doble, el sitio *attC* lo reconoce sólo en forma de cadena sencilla y se une sólo a una de las cadenas. La integrasa también se une al sitio *attI* en forma de cadena sencilla y también a una de las dos cadenas. Experimentos de protección con DNasaI han detectado zonas protegidas por la integrasa dentro de los sitios primarios, y aunque los datos no son determinantes, se pueden interpretar como que un pentanucleótido es el sitio mínimo de unión de la integrasa, lo que explicaría su uso *in vivo* como sitios de recombinación. En cuanto a la unión a DNA de cadena sencilla, se piensa que puede reflejar la forma en que los sitios se usan *in vivo*. Sería posible que en el DNA superenrollado los sitios primarios palindrómicos formen cruciformes, y que este paso sea necesario para la acción de la integrasa. No se ha conseguido reproducir *in vitro* ninguna actividad bioquímica relacionada con la capacidad recombinante de la integrasa. Esta carencia puede ser debida, entre otras causas, a la necesidad de proteínas accesorias para alcanzar una estructura recombinativa correcta.

**Otros integrones. El integrón como sistema generador de operones.**

Se ha descrito en *Vibrio cholerae* la presencia de una región genómica con estructura similar a la del integrón, en la cual los genes variables son genes relacionados con la patogenicidad en lugar de genes de resistencia a antibióticos. Como he pretendido reflejar hasta ahora, no existe ninguna razón para que la actividad de los integrones se circunscriba a la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Además de éstos y de los genes de patogenicidad descritos en *V. cholerae*, cualquier gen es susceptible de incorporarse en un integrón y es posible que si no se observan integrones con otro tipo de genes lo sea por que no existe la presión selectiva necesaria para ponerlos de manifiesto.

La organización de los genes en la región variable de los integrones sugiere un mecanismo gene-

ral para la formación de operones. La acción del integrón coloca genes sucesivos bajo el control de un mismo promotor separados por sitios *attC*. La maduración del nuevo operón consistirá en la pérdida o modificación de la actividad de la integrasa que podría convertirse en un gen regulador, y en la pérdida de los sitios *attC* intergénicos que pueden actuar como terminadores prematuros de la transcripción. Las secuencias repetitivas palindrómicas que son habituales en posición intergénica en muchos operones bacterianos pueden ser vestigios de integrones primitivos. Una peculiaridad adicional de los integrones es la falta de secuencias intergénicas no codificantes. A pesar de que los mecanismos de recombinación general y sitio-específicos usando sitios secundarios pueden ser suficientes para explicar el origen de nuevos genes en integrones, no se ha descartado (ni demostrado) una hipótesis que sugiere que los cassettes se puedan generar por retrotranscripción de mensajeros bacterianos. La presencia en bacterias de transcriptasas inversas, muchas veces asociada a bacteriofagos que cuentan además con una integrasa, hace plausible esta hipótesis, pero nos queda por encontrar las especies bacterianas en que este proceso pueda tener lugar.

#### **Cuestiones abiertas para el futuro.**

Es evidente que se requiere un esfuerzo en la reproducción de la reacción de la integrasa *in vitro* y en mejorar nuestro conocimiento bioquímico de la misma. La determinación de la estructura tridimensional de la integrasa será fundamental para alcanzar estos objetivos. Estos detalles nos deben clarificar los mecanismos de formación de integro-

nes y los de incorporación de nuevos genes. Los nuevos datos de secuencias genómicas nos pueden revelar estructuras tipo integrón en cromosomas bacterianos ayudándonos a entender el origen de estos elementos. En otro orden de cosas, cada día son más abundantes los datos sobre la implicación real de los integrones en la resistencia a antibióticos, especialmente en gérmenes Gram negativos, y asimismo crece el número de genes de resistencia que se encuentran asociados con estos elementos. La carencia de nuevos antibióticos y los problemas cada día más acuciantes de resistencias, pueden hacer necesario pensar en inhibidores de la integrasa como medida de control.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- Martínez E, de la Cruz F (1990) Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J.* 9:1275-1281.
- Hall RM, Brookes DE, Stokes HW (1991) Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* 5:1941-1959.
- Francia MV, de la Cruz F, García Lobo J (1993) Secondary-sites for integration mediated by the Tn21 integrase. *Mol. Microbiol.* 10:823-828.
- Gravel A, Fournier B, Roy PH (1998) DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res.* 26:4347-4355.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280:605-608.