

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⁺, 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⁻ 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 DL₅₀ de un mutante Dam⁻ es 1.000-10.000 veces mayor que la de la estirpe silvestre (11, 12). Un rasgo inesperado de los mutantes Dam⁻ 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⁻ 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⁻ de *S. typhimurium* presentaban defectos de secreción. Los resultados superaron todas las previsiones: los patrones de proteínas secretadas son diferentes en fondos genéticos Dam⁺ y Dam⁻, 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⁻ 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⁻ (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.
-