

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



sobre las desoxirribonucleasas
producidas por
Myxococcus coralloides D

María Magdalena Martínez Cañamero

Tesis Doctoral

1989



Biblioteca Universitaria de Granada



01533696

T
12
45

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIOS SOBRE LAS
DESOXIRIBONUCLEASAS PRODUCIDAS POR
Myxococcus coralloides D

Ma Magdalena Martínez Cañamero

| | |
|--------------------------|-----------|
| BIBLIOTECA UNIVERSITARIA | |
| GRANADA | |
| Nº Documento | 519654686 |
| Nº Copia | 21200658 |

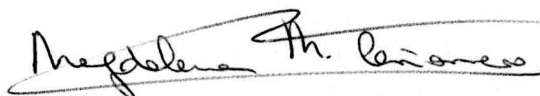
UNIVERSIDAD DE GRANADA

1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 12 JUL. 1989
ENTRADA NUM. 1174

"ESTUDIOS SOBRE LAS DESOXIRRIBONUCLEASAS PRODUCIDAS POR
Myxococcus coralloides D"

Memoria presentada para aspirar al grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Fdo: M^a Magdalena Martínez Cañamero

Los Directores



Antonio Luis Extremera León
Profesor Titular de Microbio-
logía. Facultad de Ciencias.



José Muñoz Dorado
Becario Postdoctoral del
Ministerio de Educación y
Ciencia.

Granada, Junio de 1989

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en el 1^{er} European Symposium on the Biology of the Myxobacteria, celebrado en Braunschweig, RFA (1987), en la 15th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, celebrada en Pensilvania, USA (1988), así como en el 14th International Congress of Biochemistry, celebrado en Praga, Checoslovaquia (1988).

Warrant
D. A. D.

INDICE

| | <u>Pág</u> |
|--|------------|
| INTRODUCCION..... | 17 |
| Las mixobacterias..... | 19 |
| Las desoxirribonucleasas..... | 41 |
| OBJETO DEL TRABAJO..... | 67 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 71 |
| 1. Microorganismos..... | 73 |
| 2. Medios de cultivo..... | 74 |
| Agar levadura..... | 74 |
| Medio CTA..... | 74 |
| Medio CTT..... | 75 |
| Medio CT 0.5%..... | 75 |
| Medio Triptona..... | 76 |
| 3. Técnicas de cultivo..... | 77 |
| 3.1. Mantenimiento y conservación de las mixobacterias..... | 77 |
| 3.2. Condiciones de cultivo..... | 78 |
| 4. Medidas de densidad óptica y pH..... | 79 |
| 4.1. Medidas turbidométricas..... | 79 |
| 4.2. Medidas espectrofotométricas..... | 79 |
| 4.3. Medidas de pH..... | 79 |
| 5. Determinación de proteínas..... | 80 |
| 5.1. Método de Bradford..... | 80 |
| 5.2. Absorción en el U.V. a 280 nm..... | 81 |
| 6. Medida de la actividad desoxirribonucleasa..... | 82 |
| 6.1. Ensayo de actividad DNasa..... | 82 |
| 6.2. Método de la difenilamina..... | 82 |
| 6.3. Definición de unidad y actividad específica.... | 83 |
| 7. Extracción de la actividad DNasa..... | 84 |
| 7.1. Obtención de extractos sonicados..... | 84 |

| | <u>Pág</u> |
|---|------------|
| 8. Fraccionamiento de los extractos..... | 85 |
| 8.1. Preparación de los geles..... | 85 |
| 8.2. Montaje y preparación de la columna..... | 85 |
| 8.3. Aplicación y elución de la muestra..... | 87 |
| 8.4. Medida del contenido proteico de las fracciones..... | 88 |
| 9. Purificación de los enzimas..... | 89 |
| 9.1. Precipitación con sulfato amónico..... | 89 |
| 9.2. Elección de los tampones utilizados para cromatografía de intercambio iónico..... | 89 |
| 9.3. Estimación del punto isoeléctrico de las muestras | 90 |
| 9.4. Estimación de la fuerza iónica óptima para cromatografía de intercambio iónico..... | 91 |
| 9.5. Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH..... | 91 |
| 9.6. Cromatografía de intercambio iónico con elución isocrática..... | 92 |
| 9.7. Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica..... | 92 |
| 10. Técnicas de electroforesis..... | 93 |
| 10.1. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida con SDS..... | 93 |
| 10.2. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida para la detección de nucleasas... | 94 |
| 10.3. Electroforesis en gel de agarosa para ADN..... | 95 |
| 11. Estudios de caracterización..... | 97 |
| 11.1. Determinación del tamaño molecular mediante Sephacryl S-200..... | 97 |
| 11.2. Determinación del tamaño molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. | 97 |
| 11.3. Estudio del efecto de inhibidores..... | 98 |

| | <u>Pág</u> |
|---|------------|
| 12. Estudios de cinética enzimática..... | 99 |
| 12.1. Respecto a la concentración de sustrato..... | 99 |
| 12.2. Respecto al tiempo..... | 100 |
| 13. Estudios de localización de las nucleasas..... | 101 |
| 13.1. Aislamiento de las fracciones celulares..... | 101 |
| 13.2. Caracterización bioquímica de las membranas..... | 103 |
| 13.3. Microscopia electrónica..... | 104 |
| 14. Estudios de la actividad desoxirribonucleasa durante el crecimiento..... | 107 |
| 14.1. Inducción de mixósporas mediante glicerol..... | 107 |
| 14.2. Formación de cuerpos fructificantes..... | 107 |
| 14.3. Rotura y permeabilización de las células..... | 107 |
| RESULTADOS..... | 109 |
| Estudio comparativo en diferentes mixobacterias..... | 111 |
| Purificación de las desoxirribonucleasas..... | 120 |
| Cromatografía en columna..... | 120 |
| Purificación de la DNasa P..... | 123 |
| Purificación de la DNasa M..... | 128 |
| Purificación de la DNasa G..... | 132 |
| Tabla resumen de los niveles de purificación obtenidos..... | 133 |
| Estudios de caracterización..... | 138 |
| Determinación del tamaño molecular..... | 138 |
| Electroforesis en condiciones nativas..... | 142 |
| Efecto del PMSF sobre la actividad desoxirribonucleasa..... | 144 |
| Efecto de diferentes inhibidores enzimáticos..... | 147 |
| Especificidad de sustrato..... | 158 |
| Estudios de cinética enzimática..... | 162 |
| Cinética enzimática con respecto a la concentración de sustrato..... | 162 |

| | <u>Pág</u> |
|---|------------|
| Cinética enzimática con respecto al tiempo | |
| de incubación..... | 163 |
| Estudios de localización de las nucleasas..... | 170 |
| Aislamiento de las fracciones celulares..... | 170 |
| Caracterización bioquímica de las membranas..... | 170 |
| Actividad DNasa de las diferentes fracciones..... | 172 |
| Estudios de la actividad desoxirribonucleasa | |
| durante el crecimiento..... | 180 |
| DISCUSION..... | 187 |
| CONCLUSIONES..... | 213 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 217 |

INTRODUCCION

Las mixobacterias

Las mixobacterias, descubiertas por Thaxter en 1892, constituyen hoy día uno de los grupos bacterianos que centran la atención de los investigadores dedicados al estudio de la Biología del Desarrollo. Su complejo ciclo de vida, uno de los más llamativos entre los microorganismos, hizo que en un principio fueran incluidas entre los hongos.

Hasta mediados de los años sesenta, la mayoría de los trabajos publicados sobre estas bacterias eran de tipo descriptivo, junto con diversos intentos para conseguir crecimiento disperso en medio líquido, uno de los hándicaps más importantes a la hora de abordar el estudio de cualquier raza mixobacteriana. Pero durante los últimos quince años el tipo de investigación ha ido evolucionando -mediante la aplicación de técnicas en genética bacteriana y biología molecular cada vez más sofisticadas- hacia un mejor conocimiento de su ciclo de vida, lo que ha dado lugar a que *Myxococcus xanthus*, el principal representante de este grupo, se haya convertido en la *E. coli* de la Biología del Desarrollo, uno de los objetivos más importantes en la biología actual.

Las mixobacterias son bacterias típicas Gram negativas. Las células vegetativas pueden ser bacilos largos y delgados con extremos afilados o bacilos cortos y gruesos con extremos romos. En posición bipolar poseen fimbrias, probablemente implicadas en la

INTRODUCCION

adhesión célula-célula en la comunidad mixobacteriana. Las células están rodeadas por una capa mucosa o glicocálix que forma una matriz común para la población celular cuando crecen como enjambres ("swarms") en superficies sólidas. Esta capa mucosa fue analizada por Sutherland y Thompson (1975) encontrando un polisacárido neutro cuyos azúcares mayoritarios eran manosa, D-glucosa y D-galactosa.

Como el resto de las bacterias Gram negativas, las mixobacterias presentan una membrana externa al peptidoglicano, rodeando la pared celular, consistente en fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos. Los azúcares que constituyen estos últimos varían de cepa a cepa, e incluyen ribosa, manosa, galactosa, ramnosa, glucosa, glucosamina y galactosamina. Pero, notablemente, no se ha encontrado heptosa, azúcar común a muchos lipopolisacáridos bacterianos.

El peptidoglicano presenta otra característica peculiar. Debido a la flexibilidad que presentan las mixobacterias al deslizarse, en un principio se pensó que no poseían una pared celular conteniendo peptidoglicano como ocurre en las bacterias más rígidas. Sin embargo pronto se descubrió la presencia de componentes peptidoglicanos en *M. xanthus*, tales como ácido diaminopimélico (Mason y Powelson, 1958) y ácido murámico (Abye y Powelson, 1961). Posteriormente, White *et al* (1968) informaron del aislamiento y composición química del peptidoglicano tanto de células vegetativas como de mixósporas de *M. xanthus*. Sin embargo, el tratamiento de las paredes celulares con tripsina tuvo un resultado sorprendente. Al contrario de lo que ocurría en *E. coli*, el tratamiento de las paredes de *Nyxococcus* las fragmentaba en piezas más pequeñas que podían ser sedimentadas por centrifugación. Esto sugiere que el peptidoglicano podría estar formando parches que se mantienen unidos por un

INTRODUCCION

material sensible a la tripsina, y explicaría la mayor flexibilidad de la pared mixobacteriana.

Otra de las características más llamativas de las mixobacterias es su extraordinario comportamiento social que se exterioriza en un movimiento conjunto y coordinado de deslizamiento y un espectacular potencial morfogenético

Precisamente este deslizamiento característico hizo relacionar en un principio a este grupo bacteriano con las cianobacterias (Jahn, 1924) y posteriormente con los actinomicetos, por una composición química similar (Reichenbach, 1981). Sin embargo, ambas especulaciones resultaron falsas, a raíz del estudio del ácido ribonucleico 16S (Ludwig *et al*, 1983), basado en el método taxonómico desarrollado por Stakebrant y Woese (1981). Así, los parientes más cercanos de las mixobacterias serían las bacterias purpúreas del azufre y no sulfurosas, las enterobacterias y las pseudomonas. Además, este mismo método parece desmentir la relación que se había propuesto entre mixobacterias y bacterias del grupo *Cytophaga*, que habían sido agrupadas en el orden *Flexibacteriae*, no sólo por presentar un movimiento deslizante similar, sino por características bioquímicas comunes como ácidos grasos semejantes y el hecho de tener exclusivamente megaquinonas en sus cadenas respiratorias.

Los datos del ARN 16S apoyan la idea de que todas las bacterias deslizantes que forman cuerpos fructificantes pueden ser consideradas como un grupo a nivel de orden, *Myxobacterales*. De acuerdo con esto está el estrecho rango de G+C en la composición de bases del ADN mixobacteriano, entre 66 y 72 % (Mandel y Leadbetter, 1965; McCurdy y Wolf, 1967; Behreus *et al*, 1976).

INTRODUCCION

Dentro del orden se ha propuesto la existencia de dos subgrupos basándose en diferencias morfológicas y bioquímicas (Reichenbach, 1974a). Esta idea, apoyada también por estudios del ARN 16S que muestran una profunda división entre *Myxococcus*, *Cystobacter* y *Stigmatella* por un lado y *Sorangium* y *Nannocystis* por otro (Ludwig et al, 1983), sugiere incluir los últimos géneros en dos familias: *Polyangiaceae* y *Nannocystaceae*, mientras que los tres primeros formarían una sola: *Cystobacteraceae*.

Mientras que el asunto parece estar claro a niveles superiores, no lo está tanto a nivel de especie e incluso de género. A estos niveles, la taxonomía se basa casi exclusivamente en características morfológicas. En algunos casos se ha usado la pigmentación como único factor que diferencia dos especies (p. ej. *M. xanthus* y *M. virescens*). Sin embargo, en general éste no es un carácter muy fiable ya que depende fuertemente de las condiciones de crecimiento (p. ej. iluminación) y puede haber variaciones dentro de las mismas razas.

La situación filogenética de este orden ya nos puede adelantar algo de lo que es su ecología. En general, las mixobacterias son organismos del suelo, aunque desde allí son capaces de colonizar otros hábitats, especialmente aquellos que son ricos en comunidades microbianas como es el caso de la rizosfera de plantas, deposiciones de animales herbívoros, madera muerta y material orgánico en descomposición. Algunas especies se han especializado en nichos muy concretos. Así *Polyangium parasiticum* fue descrito incluso como un parásito del alga verde *Cladophora* (Geitler, 1925). No se han descrito en hábitats marinos.

En cuanto a la distribución de estos microorganismos en diferentes zonas climáticas, se han observado poblaciones muy ricas de mixobacterias en climas cálidos áridos y semiáridos. Esto es

INTRODUCCION

lógico ya que la resistencia a la desecación de las mixósporas obviamente les da una fuerte ventaja selectiva en estas zonas (Singh y Singh, 1971). También se han encontrado en climas templados y tropicales, e incluso en climas fríos, subárticos, árticos y de alta montaña, especialmente con *Myxococcus* y *Corallococcus*. Por otra parte, aunque la mayoría de las mixobacterias son sensibles a la concentración de cloruro sódico, algunas de ellas pueden crecer razonablemente bien en presencia de sales al 0.8%.

Dentro de todos estos hábitats, las mixobacterias presentan un papel ecológico muy característico e importante. Han sido definidas como los basureros del reino microbiano. Avanzan reptando sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua de forma totalmente coordinada, formando lo que se conocen como enjambres. Cuando encuentran una fuente de alimento actúan conjuntamente como una "manada de lobos bacterianos" (Dworkin, 1973). De esta forma degradan y se alimentan de macromoléculas insolubles presentes en el medio ambiente y pueden lisar a otros microorganismos como eubacterias, actinomicetos, cianobacterias, levaduras y otros hongos, e incluso nematodos. Esta actividad lítica es debida a la producción de una amplia variedad de antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticos de la pared celular, proteasas polisacáridos, nucleasas y lipasas (Rosenberg y Varon, 1984).

Cuando por el contrario las condiciones ambientales son adversas o existe un agotamiento de la fuente alimenticia, los enjambres se organizan y son capaces de constituir formas de reposo y resistencia hasta que las condiciones vuelven a ser favorables.

De este retrato podemos entresacar las tres características más importantes del grupo, en relación con su notable comportamiento social: el movimiento coordinado, su actuación como depredadores del reino microbiano, y el ciclo de

INTRODUCCION

desarrollo y fructificación. Cada uno de estos apartados ha merecido estudios en profundidad.

En cuanto al primer punto, aunque las mixobacterias tienen la capacidad de desplazarse como células individuales, su comportamiento deslizante es típicamente comunal. Tienden a deslizarse en densos enjambres de células estrechamente asociadas. Incluso cuando alguna célula se separa del grupo más de unas cuantas veces la longitud celular, su movimiento se detiene y vuelve activamente al enjambre, o bien espera a que éste la alcance. Parece ser que hay una sustancia quimiotáctica distribuida uniformemente alrededor del enjambre que permite a las células moverse libremente dentro de estos límites, pero que forma un gradiente en disminución que inhibe progresivamente el movimiento unicelular cuando estas se alejan del grupo. El aislamiento de una feromona de *Stigmatella aurantiaca* (Stephens et al, 1982) apoya la hipótesis de una comunicación química intercelular.

Este movimiento deslizante es lento comparado con la velocidad de las bacterias flageladas ($1 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ frente a los $60 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ de éstas) y necesita de una considerable flexibilidad celular, atribuida a la elasticidad de la pared celular (Thaxter, 1892).

Un tipo notable y complejo de movimiento coordinado característico de varios géneros de mixobacterias ha sido descrito como olas pulsantes y rítmicas ("ripples"). Aparecían espontáneamente durante la fructificación y la predación por enjambres de mixobacterias. El fenómeno ha sido parcialmente caracterizado por Shimkets y Kaiser (1982b), que definieron las ondas como acumulaciones con forma rígida de células orientadas moviéndose en

INTRODUCCION

una forma sincrónica y pulsante. Estos dos fenómenos (fructificación y predación) están caracterizados por el lanzamiento de componentes de peptidoglicano desde las paredes celulares bien mediante la autólisis en la fructificación (Wireman y Dworkin, 1972) o mediante la producción de enzimas líticos de la pared en la predación (Sudo y Dworkin, 1972). Shimkets y Kaiser (1982b) han demostrado claramente que el peptidoglicano exógeno o una combinación de sus subunidades induce ondulamiento en cualquier población quiescente.

Para encontrar una teoría que explique el movimiento deslizante, se han estudiado tanto condiciones físicas y químicas como diferentes mutantes que le afecten. De esta forma se ha observado (Burchard, 1974b) que se requieren proteínas de membrana y del espacio periplásmico, ya que la motilidad se inhibía mediante tratamiento con enzimas proteolíticos o con shock osmótico. Es más, los anticuerpos frente a las proteínas periplásmicas de *Myxococcus* bloqueaban el deslizamiento de células intactas. La retirada de Ca^{2+} mediante tratamiento con EGTA también inhibía el deslizamiento (Heulmann y Külmeim, 1979).

Por otra parte, el estudio de diferentes mutantes del deslizamiento ha evidenciado la existencia de dos sistemas de movilidad, cada uno con múltiples loci genéticos (Hodkin y Kaiser, 1979a, 1979b). El llamado "sistema de genes aventureros" (A) controla el deslizamiento de la célula individual; el "sistema génico social" (S) controla los movimientos de grupos de células o enjambres. Mutantes A^- son capaces de deslizarse mediante el sistema S si dos o tres células se encuentran en aposición a ellos o cerca. Los mutantes S^- muestran predominantemente deslizamiento individual de la célula; tales mutantes fructifican pobremente y no forman enjambres. La velocidad de deslizamiento de las células A^+S^+ , A^-S^+ y A^+S^- son similares (Kaiser y Crosby, 1983). Los mutantes A^-S^- son

INTRODUCCION

inmóviles al igual que los mutantes en otro *locus* de movilidad, *mgl*, que se requiere para el funcionamiento de ambos sistemas génicos.

También parece ser que se requieren fimbrias que median en las asociaciones célula-célula para el deslizamiento mediante el sistema S.

En cuanto a los mecanismos de deslizamiento, han surgido tres teorías principales que se basan en el moco excretado por la célula, la tensión superficial y en mecanismos contráctiles.

El moco de *Myxococcus virescens* fue analizado por Gnospelius (1978a), quien informó que consistía en un complejo lipídico-polisacarídico-proteico. El componente polisacarídico del moco de varias especies de *Myxococcus* ha sido caracterizado por Sutherland y Thompson (1975). La teoría que intenta explicar el movimiento desde este punto de vista afirma que el lanzamiento dirigido del moco produce una fuerza propulsiva que impulsa a la célula en sentido opuesto (Jahn, 1924; Kühlmeier, 1953). Sin embargo, no existe hasta el momento ninguna evidencia a este respecto.

El hecho innegable de que un requisito para el deslizamiento es la asociación de una célula con una superficie, hizo pensar que el responsable del deslizamiento podría ser un gradiente de surfactante producido por la célula. Es la teoría basada en la tensión superficial (Keller *et al*, 1983). Sin embargo aunque esta teoría presenta coherencia, debe hacer frente al hecho de que ha sido observado deslizamiento en superficies de plástico y cristal bajo una fina capa de agua, donde la tensión superficial no puede tener efectos. La teoría de los surfactantes tampoco explica otros movimientos menores de las mixobacterias.

INTRODUCCION

Queda, por último, la teoría de una base contráctil para el deslizamiento. El origen de esta idea data de algunos años atrás (Meyer-Pietschmann, 1951; Reichenbach, 1965b), y revivió hace poco (Burchard, 1981) con la descripción de un orgánulo asociado a la membrana en el citoplasma de *M. xanthus*, compuesto de filamentos de 4-5 nm de diámetro dispuestos longitudinalmente. Estas estructuras fueron sólo observadas en células deslizantes mientras que las mixobacterias cultivadas en suspensión carecían de ellas.

Burchard et al. (1977a) propusieron que el manojito de filamentos podría ser un orgánulo contráctil del deslizamiento, ya que presenta un parecido morfológico con el músculo estriado. Si los filamentos estuvieran de hecho anclados a la envuelta en o cerca de los polos de una célula deslizante y si estuvieran unidos a todo lo largo de la cara interna de la envuelta celular, podría realizarse un movimiento contráctil. Por otra parte, Hughes y Burchard propusieron que el moco tendría las propiedades de un plástico que se comporta como un fluido viscoso no-adhesivo, desempeñando, pues, un papel importante en el movimiento contráctil. Además, la expresión de las contracciones en la superficie celular podría estar facilitada por una naturaleza inusual en forma de parches de la capa del peptidoglicano (White et al, 1968) que conferiría una flexibilidad adecuada para hacer esta capa compresible.

La segunda característica importante de las mixobacterias apuntada anteriormente es su alto potencial morfogenético, el cual tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis cooperativa, que conduce a la formación de cuerpos fructificantes por la acción de cientos de miles de células, y una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la

INTRODUCCION

aparición de células de reposo, denominadas mixosporas, que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes. Debido a este potencial morfogénico, las mixobacterias pueden presentar dos ciclos de vida muy diferentes entre sí: un ciclo de desarrollo o fructificación, que conduce a la aparición de los cuerpos fructificantes y las mixosporas, y un ciclo de vida vegetativo, en el cual sólo tienen lugar divisiones binarias.

El proceso de fructificación parece estar íntimamente relacionado con los factores nutricionales del medio, disparándose cuando se agotan o están en cantidad limitante algunos de los aminoácidos u otros componentes del medio de cultivo (Manoil y Kaiser, 1980). Por el contrario, en medios ricos no ocurre fructificación, sino que se sigue el ciclo de vida vegetativo. Este ciclo puede tener lugar tanto en medio sólido como en medio líquido, si bien en este último caso sólo se produce en aquellas bacterias capaces de crecer dispersas. El ciclo de desarrollo, por el contrario, requiere una superficie sólida para llevarse a cabo.

Durante la fructificación ocurren dos procesos que, si bien normalmente se producen uno a continuación de otro, también pueden tener lugar por separado, lo que demuestra que, aunque presenten algunos puntos de conexión, son bastante independientes entre sí. Se trata de la agregación y la esporulación.

La agregación se inicia cuando se encuentra en concentración limitante algún factor nutritivo del medio de cultivo. El factor limitante puede ser algún aminoácido (esencial o no) o incluso la fuente de carbono y energía, o el fosfato inorgánico. Durante un tiempo se creyó que el disparador de la iniciación de la fructificación era la acumulación de guanosina tetra y pentafofato, ya que los niveles de ambos compuestos aumentan cuando las células se encuentran en estado de inanición (Manoil y Kaiser, 1980). Estos

INTRODUCCION

compuestos se detectan en otras bacterias como mediadores de la respuesta estricta, uno de los mecanismos reguladores mediante el cual estos microorganismos responden a la carencia de nutrientes (Cashel y Gallant, 1969). Sin embargo, recientemente (Zusman, 1984) se ha comprobado que mutantes deficientes en la síntesis de estos dos compuestos pueden fructificar, lo que hace que no esté claro el mecanismo por el que se inicia la fructificación y el papel que juegan en dicho proceso los nucleótidos hiperfosforilados.

Para la agregación, además de la inanición, son requeridos dos factores: la presencia de una superficie sólida y una densidad celular alta. El hecho de que no aparezcan cuerpos fructificantes en medio líquido se debe a que las mixobacterias no pueden moverse en dichos medios, lo que impide que se concentren en puntos concretos. En cuanto a la densidad celular, la explicación parece estar en la necesidad de una distancia crítica entre célula y célula. Cuando se supera dicha distancia se dificulta la comunicación intercelular y no se produce agregación.

Por otra parte se ha descrito una hemoaglutinina que puede jugar un papel importante en el proceso de agregación. Quizá intervenga también en la esporulación, ya que algunos mutantes defectivos en este proceso no producen hemoaglutinina (La Rossa et al, 1983). Esto podría representar un punto de unión entre agregación y esporulación.

Una vez cumplidos estos requisitos, las células empiezan a deslizarse hacia puntos concretos, normalmente formando oleadas. Y en esos puntos de atracción se originan unos agregados que van creciendo de tamaño hasta constituir el cuerpo fructificante maduro.

La morfología de los cuerpos fructificantes varía según los distintos géneros. Los más simples son los de la familia

INTRODUCCION

Myxococcaceae, cuyo aspecto es el de montículos esféricos o algo alargados, a veces con un tallo corto, de consistencia blanda y mucosa. En otros géneros, como *Stigmatella*, son más complejos; constan de un pedúnculo del que salen varios esporangiolos, recubierto todo por una pared dura. En el caso de *Chondromyces* el pedúnculo es ramificado y cada rama termina en un racimo de esporangiolos.

Una vez agregadas, las células sufren una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que conducen a la formación de mixósporas. Las mixósporas se diferencian de las endosporas clásicas en que éstas son formadas *de novo*, mientras que en las mixobacterias la célula vegetativa completa se transforma en mixóspora. Además, aunque son algo más resistentes que las células vegetativas a las condiciones ambientales adversas, lo son mucho menos que las endosporas. Estas dos razones han hecho pensar que las mixósporas son formas de reposo, más que de resistencia.

Durante la esporulación, las células vegetativas se van recubriendo de una cubierta gruesa, constituida por tres capas, a la vez que van cambiando de forma. En *Cystobacterinae* dicho cambio es muy acusado, apareciendo mixósporas esféricas; por el contrario en *Soranginae* las mixósporas mantienen prácticamente la forma bacilar de las células vegetativas.

El proceso de esporulación puede tener lugar sin que se haya producido agregación anteriormente. Así, Dworkin y Gibson (1964) observaron que la adición de glicerol 0.5 M a cultivos de *M. xanthus* en fase exponencial inducía la formación de mixósporas. Idéntico efecto ejercen otras sustancias orgánicas (Bacon y Rosenberg, 1967). Estas mixósporas artificialmente inducidas presentan algunas diferencias con respecto a las producidas en los procesos naturales de agregación. Así, mientras que estas últimas

INTRODUCCION

tienen una tasa respiratoria nula, las inducidas muestran un cierto consumo de oxígeno, aunque inferior al de las células vegetativas. Además, las mixósporas que se encuentran en los cuerpos fructificantes poseen, como ya se ha mencionado, una gruesa cubierta de tres capas, constituida mayoritariamente por las proteínas U y S, mientras que en las obtenidas por adición de glicerol, ésta última proteína está ausente, y, por lo tanto, la envoltura es mucho más delgada.

Por su mayor refringencia al microscopio de contraste de fases, y por su mayor resistencia a la desecación, calor y sonicación, ambos tipos de mixósporas son claramente diferentes de las células vegetativas.

Un hecho muy significativo que tiene lugar durante el proceso de esporulación es la autólisis del 80% aproximadamente de las células que se han agregado, de forma que sólo el 20% llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1971, 1977). Una teoría sostiene que la muerte de la mayor parte de la población haría que las células supervivientes dispusieran de suficientes nutrientes para esporular, ya que se encuentran en estado de inanición (Wireman y Dworkin, 1977). Otra teoría indica que algunos de los productos liberados en la lisis podrían actuar como señales químicas que inducirían la esporulación (Shimkets y Kaiser, 1982). Ambas teorías presentan el fenómeno de la autólisis con un significado de cooperación celular. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que estas células, que están sufriendo morfogénesis, son bastante sensibles al choque osmótico y, por tanto, están expuestas a la lisis; se trataría de una autólisis no cooperativa (Zusman, 1984). Recientemente, O'Connor y Zusman (1987) han informado que las células en diferenciación atraviesan un estado frágil en el que son fácilmente lisadas por la manipulación experimental. Esta fragilidad puede llevar a una sobreestimación de la tasa de lisis durante el

INTRODUCCION

desarrollo. Por tanto, aunque se tiende a considerar la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población, esta autólisis sería no activa.

Por otra parte, la autólisis en mixobacterias no sólo se produce durante el ciclo de desarrollo, sino también, con bastante frecuencia, durante el ciclo vegetativo, en cultivos creciendo de manera dispersa en medio líquido. En estos casos, los cultivos presentan una corta fase estacionaria, después de la cual entran en una fase de declive más o menos rápida, que termina cuando todas las células se han lisado. En *M. coralloides* D, la mixobacteria en la que este proceso está más estudiado, se ha encontrado que los factores nutricionales del medio, especialmente el fosfato inorgánico, ejercen un papel importante en el control de la autólisis. Así, un aumento en la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno acelera la autólisis, mientras que el fosfato ejerce un efecto contrario, llegando a prevenir el proceso a una concentración de 40 mM (Fernández et al, 1983).

La germinación de las mixósporas, provenientes de los cuerpos fructificantes o inducidas artificialmente, ocurre cuando son colocadas en un medio rico, por lo que se cree que algunos nutrientes del medio deben actuar como señal que desencadene el proceso.

Parece ser que para la germinación se requiere una densidad celular alta, en relación inversa con la riqueza del medio (Dworkin, 1973). De cualquier forma, la germinación es un proceso a nivel de comunidad, no de células aisladas. La población celular resultante de la germinación de un cuerpo fructificante se mantiene unida y se comporta como un nuevo enjambre. En éstos, las células siguen el ciclo de vida vegetativo hasta que se agotan los nutrientes. En este momento se originarán varios puntos de atracción

INTRODUCCION

dentro del enjambre, a los que migrarán las células, se agregarán, se diferenciarán y aparecerán varios cuerpos fructificantes nuevos.

Durante mucho tiempo se ha especulado sobre el significado biológico de este peculiar ciclo de vida. La hipótesis más aceptada actualmente es que la función de dicho proceso sería la de originar una nueva población vegetativa a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían colonias en reposo. Cabe preguntarse por qué se requiere o es necesario que el ciclo se inicie con una comunidad. La explicación puede hallarse en el modo de vida de estos microorganismos en la naturaleza. Las mixobacterias viven en ambientes de macromoléculas en degradación, muchas de ellas provenientes de bacterias y levaduras. Para que una mixobacteria aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Allí difundirán y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado que será digerido. Los nutrientes liberados difundirán desde el punto en el que se han producido de manera radial, por lo que no todos llegarán a la mixobacteria en cuestión, sino sólo una pequeña parte, que sería insuficiente para mantener el crecimiento de la misma. Por el contrario, si en puntos cercanos existen otras mixobacterias, o sea, si se parte de una comunidad, la producción de enzimas será mucho más elevada, con lo que la degradación de moléculas será más rápida y el aprovechamiento más efectivo, ya que cada mixobacteria tendrá acceso a los nutrientes obtenidos por toda la comunidad, lo que haría que las pérdidas por difusión fueran mínimas.

La tercera característica con que definimos previamente a las mixobacterias presenta a estos microorganismos como

INTRODUCCION

depredadores del reino microbiano. Este hecho era conocido desde antaño pero sólo recientemente los factores responsables del comportamiento lítico han sido aislados y estudiados

En el suelo, su hábitat natural mayoritario, las mixobacterias van a encontrar materia orgánica insoluble como son proteínas desnaturalizadas, fragmentos de células y otros microorganismos vivos o muertos. El grupo de organismos susceptible a la lisis es amplio e incluye, como se ha mencionado anteriormente, muchas eubacterias, actinomicetos, cianobacterias, levaduras y otros hongos. Incluso se ha informado de la lisis de nematodos por algunas especies de *Sorangium* (Katznelson et al, 1964). Para asimilar estos sustratos insolubles las mixobacterias deben producir materiales extracelulares y difusibles que solubilicen dichos sustratos. Aunque las células individuales no producen suficientes enzimas extracelulares para solubilizar los sustratos, el producto acumulado de muchas células cercanas podría alcanzar una concentración suficientemente alta como para solubilizar y/o hidrolizar el sustrato y así proveer de nutrientes a toda la comunidad. Además, el material que difunde al azar en cualquier dirección es mucho mejor aprovechado por todo un enjambre que si se tratara de una sola célula.

En la mayoría de los casos, estos productos extracelulares son suficientes para realizar la lisis del microorganismo. Este es el caso de las bacterias Gram positivas que son mucho más sensibles a los enzimas bacteriolíticos. En el caso de las Gram negativas es necesario muchas veces el contacto directo entre la mixobacteria y su presa. Generalmente se asume que la membrana externa, con lipoproteínas y lipopolisacáridos, protege al peptidoglicano. El daño en la capa externa mediante tratamiento con disolventes orgánicos, EDTA, detergentes, calor o congelación y descongelación, sensibiliza a las eubacterias Gram negativas a los enzimas bacteriolíticos. De

INTRODUCCION

hecho, esto ha sido demostrado en el laboratorio (Haská *et al*, 1972) y curiosamente, las mixobacterias generan mecanismos auxiliares naturales para sus mecanismos hidrolíticos. Haská *et al* (1972) encontraron que ácidos grasos ramificados y no ramificados aislados de *M. xanthus* y añadidos a las eubacterias normalmente resistentes a la lisis, las sensibilizaban a los enzimas mixobacterianos. Los autores sugirieron que los ácidos grasos podrían cambiar las propiedades de permeabilidad de la pared celular. La localización de los ácidos grasos en la superficie de la mixobacteria podría ayudar a explicar la necesidad del contacto directo con la presa para una lisis efectiva.

El complejo lipídico-polisacárido-proteico aislado por Gnospelius (1978a) del moco de *M. virescens* se une a las proteínas y afecta a sus propiedades. Este autor sugiere que dicho complejo desnaturaliza las proteínas nativas haciéndolas más asequibles a la proteólisis. Además, el complejo mostraba actividad proteolítica que podría aumentar la capacidad desnaturalizante del complejo *in situ*.

Este tipo de nutrición se realiza gracias a la producción de un amplio rango de antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticos de la pared celular, lipasas, nucleasas, polisacaridasas y proteasas.

Respecto a la producción de antibióticos, el primero que se caracterizó fue la mixina, producida por *Sorangium* (Peterson, *et al*, 1966). Con posterioridad se han encontrado sustancias antibióticas en una gran variedad de mixobacterias, tales como *M. xanthus* (Rosenberg *et al*, 1973), *M. virescens* (Gerth *et al*, 1982), *M. coralloides* (Arias *et al*, 1979), y *M. fulvus* (Gerth *et al*, 1980, 1982; Irschik *et al*, 1983), entre otras. En general son sustancias de bajo peso molecular, estructura química compleja, mecanismo de acción variado y un amplio espectro antimicrobiano.

INTRODUCCION

En contraste con el abundante número de antibióticos descrito, pocas bacteriocinas han sido encontradas en mixobacterias. La primera actividad de este tipo fue detectada en *M. xanthus* (McCurdy y MacRae, 1974). Más recientemente otras bacteriocinas han sido caracterizadas en *M. virescens* (Brown et al, 1976), *M. fulvus* (Hirsch, 1977) y *M. coralloides* D (Muñoz et al, 1984).

Los enzimas líticos de la pared celular producidos por mixobacterias pueden dividirse en cuatro grupos: (1) muramidasa, que rompen el enlace 1,4 entre el ácido murámico y la glucosamina (Harcke et al, 1972); (2) glucosaminidasas, que cortan el enlace 1,4 entre la glucosamina y el ácido murámico (Haská, 1974); (3) amidasa, que cortan el enlace entre el ácido murámico y la alanina de la cadena peptídica (Sudo y Dworkin, 1972), y (4) peptidasas, que hidrolizan enlaces de la cadena peptídica (Haská, 1974). De estos cuatro grupos, los tres primeros son altamente específicos de la pared celular, mientras que las peptidasas pueden actuar también sobre otros polipeptidos diferentes de los que forman la pared.

Los enzimas proteolíticos juegan un papel muy importante en la nutrición, ya que la mayoría de mixobacterias utilizan las proteínas como fuente de carbono y energía. Varios enzimas proteolíticos extracelulares han sido purificados y estudiados en detalle en *M. virescens* (Gnospelius, 1978a), *M. xanthus*, (Rodríguez y Montoya, 1980) y *M. coralloides* (Harcke et al, 1971). Destaca el hecho de que la actividad bacteriolítica y proteolítica es afectada por la composición del medio de crecimiento.

Se han descrito también enzimas con actividad lipásica, tanto extracelular como unidos a estructuras celulares (Sørhan, 1974; Rodríguez et al, 1979).

INTRODUCCION

Por último, como parte del equipo enzimático que poseen las mixobacterias, deben incluirse distintos tipos de nucleasas.

Este tipo de enzimas han sido estudiados en este grupo desde dos puntos de vista diferentes. Por una parte, tienen interés como enzimas capaces de degradar macromoléculas (en este caso ADN) dentro de un equipo lítico que les permite aprovechar al máximo la materia orgánica. Por otra, su papel en procesos genéticos, especialmente en procesos de restricción, está adquiriendo gran relevancia en los últimos años.

La capacidad de las mixobacterias para degradar ADN fue descrita por Fink en 1950. Posteriormente, Norén (1955) detectó actividad DNasa y RNasa en varias mixobacterias e incluso observó algún crecimiento de estos organismos en medios suplementados con ADN o ARN como única fuente de carbono y nitrógeno. No obstante, Loebeck y Klein (1956) afirmaron que estos microorganismos no utilizan fracciones de ácido nucléico para su crecimiento. Realmente, debido a la peculiar localización de las DNasas en mixobacterias -principalmente en el espacio periplásmico- es difícil atribuirles algún papel en condiciones naturales en la digestión y aprovechamiento de nutrientes de otros microorganismos (levaduras y bacterias) del suelo. Sin embargo, esta localización le puede ser útil a la bacteria productora para defenderse de la entrada de ADN extraño. Así, por ejemplo, Morris y Parish (1976) encontraron que la raza V2 de *M. virescens* producía dos enzimas de restricción, *Mvi* V2I y *Mvi* V2II. La primera cortaba el ADN del fago λ en un único sitio, mientras que el ADN del fago Mx-1, específico de mixobacterias, era hidrolizado en diez puntos. La segunda, por el contrario, generaba un gran número de fragmentos sobre el ADN de este último fago, con un patrón de corte similar al de *Eco* RII sobre dicho ADN. Posteriormente, Mayer y Reichenbach (1978) aislaron enzimas de restricción del espacio periplásmico de varias mixobacterias (varias

INTRODUCCION

razas de *M. fulvus*, *M. virescens*, *M. xanthus*, *M. stipitatus*, *Archangium serpens* y *Podangium erectum*); sin embargo, los estudios realizados por estos autores estaban principalmente dirigidos a la detección de nuevas endonucleasas de restricción.

Sin embargo, las mixobacterias no son depredadores obligados. Ya que crecen bien sobre proteínas, péptidos o mezclas de aminoácidos como única fuente de carbono y energía, no les es económico sintetizar enzimas bacteriolíticos de forma constitutiva. No ha habido, no obstante, un intento sistemático de estudiar la regulación de la síntesis de estos enzimas. En un estudio realizado por Haská y Stahl (1971) se encontró que la aparición de enzimas hidrolíticos precedía a la de los enzimas proteolíticos, como se esperaría si los primeros se requirieran para hacer el citoplasma de la presa accesible a los últimos. Es tentador asumir que los enzimas proteolíticos son inducidos o activados después de la liberación del sustrato potencial por los enzimas bacteriolíticos.

De todas estas características expuestas se deduce el enorme atractivo de las mixobacterias en muy diversos campos. Ya se ha hablado anteriormente del papel de *Myxococcus xanthus* en la Biología del Desarrollo. Existe otro campo en el que las mixobacterias son un modelo idóneo: el estudio del comportamiento social. Debido a las inmensas dificultades en realizar estudios experimentales sobre evolución, la mayor parte de la teoría evolutiva en macroorganismos está basada en estudios comparativos. Por otra parte, la evolución bacteriana se sigue experimentalmente de forma relativamente fácil debido de una parte a su corto ciclo de vida y grandes densidades de población que incrementan la oportunidad de encontrar mutaciones apropiadas, y de otra a la posibilidad de

INTRODUCCION

controlar su entorno. El uso de modelos microbianos ha demostrado ser muy útil en muchos campos genéticos y fisiológicos y de la misma forma puede contribuir al conocimiento social.

Desde este punto de vista, la selección de grupo es especialmente atractiva para interpretar la evolución de las adaptaciones sociales en mixobacterias. Este tipo de selección da una respuesta fácil a por qué las mixobacterias, de forma individual, segregan enzimas cuyos productos son usados por otras bacterias y participan en una esporulación en masa en la que lo más probable es perecer. Las poblaciones de mixobacterias que poseen estas adaptaciones compiten con ventaja frente a aquellas que no las poseen.

En el primer caso -comportamiento social durante el crecimiento- las mixobacterias producen enzimas proteolíticos en cantidades suficientemente amplias como para que la población en su conjunto pueda beneficiarse de la degradación del sustrato. Aunque este fenómeno puede ser explicado como selección individual o de grupo, el hecho de que mutantes con capacidad proteásica disminuida sean menos competitivos que los salvajes, hace pensar en la primera teoría. Parece ser que la ventaja directa que la célula individual obtiene de la superproducción de proteasas extracelulares es la atracción de sus compañeros; es decir, se asegura la presencia de colaboradores que de otra forma la dejarían fuera de la masa de células.

En cuanto al segundo comportamiento social -durante el desarrollo- siguiendo la teoría de la selección de grupo, es fácil sugerir una hipótesis para explicar la esporulación durante la lisis. Es mejor para el grupo como un todo el que se lisen algunas células y alimentar al resto durante condiciones de falta de nutrientes, que mantener a toda la población en condiciones extremas. Por supuesto,

INTRODUCCION

una explicación puede ser que el proceso lítico es simplemente una consecuencia lógica del intento de esporular. Las células que no lo consiguen mueren y su lisis es una consecuencia de reacciones bioquímicas específicas de mixobacterias. Sin embargo el proceso lítico de forma específica puede ser también explicado como una adaptación individual que sirve para atraer otras células hacia la bacteria esporulante.

Todas estas características hacen que las mixobacterias sean únicas entre los procariotas al poseer un rango tan amplio de adaptaciones sociales y es difícil encontrar un candidato mejor entre las bacterias para el estudio de la evolución de las adaptaciones sociales, la biología del desarrollo e incluso el origen de los organismos multicelulares.

Las desoxirribonucleasas

Enzimas capaces de degradar ácidos nucleicos son muy abundantes en la naturaleza y se conocen desde principios de siglo. En una visión retrospectiva, Laskowski (1985) ha dividido la historia de las nucleasas en seis periodos:

1.- Periodo de descubrimiento, que comenzó con Araki (1903) y que actualmente está prácticamente cerrado; no obstante aún hay excepciones en sustratos más complicados como cromatina y cromosomas, o el caso de las nucleasas de restricción, cuya búsqueda continúa.

2.- Periodo de cristalización, que pretendía la obtención de mayor pureza. Se buscaba la cristalización de los enzimas como sintoma de su total purificación. Así, en 1940 Kunitz cristaliza la RNasa pancreática que fue durante un tiempo empleada para distinguir entre ADN y ARN.

3.- Periodo de clasificación, iniciado por Kunitz, que realizó además una división previa atendiendo al sustrato del enzima, dando lugar a la separación en DNasas y RNasas. Pero el descubrimiento de enzimas que podían actuar tanto sobre ADN como sobre ARN, exigiendo una clasificación más compleja, hizo que Laskowski (1959) propusiera cuatro criterios para clasificar las

INTRODUCCION

nucleasas: sustratos susceptibles (ADN, ARN), tipo de ataque (exonucleasa, endonucleasa), productos de degradación (terminados en 3' o en 5') y unión preferencial (Pu↓Py, Py↓Pu). Numerosos intentos de clasificación posteriormente publicados nunca han llegado a ser significativos ni universalmente aceptados.

4.- Periodo de estudios estructurales y comprensión del mecanismo de acción enzimática, que comenzó con la secuenciación de la RNasa pancreática debido a su bajo peso molecular, siendo además esta la primera enzima y la segunda proteína (tras la hemoglobina) en ser secuenciada.

5.- Periodo de especificidad, para determinar la posición del grupo monofosforil, expresado en términos de formadores de fosfato 3' ó formadores de fosfato 5'. Con el tiempo y el descubrimiento de los enzimas de restricción, el concepto de especificidad cobró una dimensión nueva.

6.- Periodo del encuadramiento de cada nucleasa en una función fisiológica general. Al principio, al ser detectadas en el páncreas se asociaron a una función digestiva. Posteriormente, al ser encontradas en otros tejidos, se pensó en una función metabólica. Hoy día se sabe que es más difícil encontrar una función biológica en la que las nucleasas no participen que una en que lo hagan, como se puede observar por todo lo expuesto a continuación.

En efecto, las nucleasas están asociadas a una amplia variedad de procesos fundamentalmente de tipo genético. Ejercen un importante papel en la recombinación genética. Funcionan como topoisomerasas de ADN e intervienen en procesos de reparación y replicación de este ácido nucleico. Finalmente su acción como endonucleasas de restricción les permite desempeñar un papel clave en la ingeniería genética.

INTRODUCCION

La recombinación genética suele dividirse en recombinación general que tiene lugar entre moléculas de ADN homólogo con una probabilidad de recombinación comparable en todas las regiones de los ADNs (genes *recA* y *recBC* de *E. coli*) y la recombinación específica de sitio que tiene lugar entre moléculas de ADN que guardan poca homología entre sí o aparentemente ninguna. Se subdivide en conservativa, cuando los cromosomas recombinantes no sufren replicación durante la recombinación (p. ej. integración y escisión de λ) y replicativa, que sí conlleva replicación (p. ej. transposones, fago μ).

Entre los enzimas que intervienen en la recombinación general pueden citarse endonucleasas como la endonucleasa I del fago T7 (producto del gen 3), implicada en destrucción de ADN extraño, maduración del ADN y recombinación genética (Kerr y Sadowski, 1975). También participan exonucleasas independientes de ATP, como la exonucleasa λ (Little, 1975) y la exonucleasa VII (Gillen *et al*, 1981) que actúan liberando mononucleótidos del ADN dúplex en sentido 5' y de forma procesiva o la exonucleasa T7 (producto del gen 6 del fago T7) que también libera mononucleótidos a partir del extremo 5' en cadena doble pero que actúa distributivamente (Kerr y Sadowski, 1972). Este último enzima tiene también actividad RNasa y ha sido implicado en la eliminación de los cebadores ("primers") de RNA durante la replicación del ADN; es esencial para el desarrollo del T7 y para la destrucción del ADN del hospedador al proveer de nucleótidos al virásico. Por último se encuentran también nucleasas dependientes de ATP como la nucleasa RecBC de *E. coli* (o exonucleasa V), que actúa tanto sobre ADN de cadena doble como simple y que también presenta actividad endonucleasa de cadena simple independiente de ATP (Goldmark y Linn, 1972). Es el prototipo de las nucleasas de este grupo, tanto en *E. coli* como en otras bacterias.

INTRODUCCION

Dentro de la recombinación específica de sitio destaca el proceso de integración del fago λ en el que interviene el sistema *int* del fago, constituido por dos proteínas, la formación del bucle G del fago μ por el producto del gen *in*, la variación de fase en *Salmonella* por la proteína Hin, o la unión de los genes *V* y *J* durante la inmunodiferenciación.

Otro grupo de nucleasas son las topoisomerasas de ADN. En los últimos años se ha producido una nueva ola de descubrimientos en este campo. Se trata de unos enzimas enormemente atractivos y complejos que catalizan una reacción complicada en la que numerosas consideraciones topológicas y mecanísticas deben tenerse en cuenta. En principio, su acción implica la ruptura transitoria de enlaces fosfodiéster del ADN y la reformación de estos mismos enlaces. Existe una diferencia básica entre los dos tipos de topoisomerasas conocidas: mientras que las del tipo I rompen y reúnen una hebra de ADN cada vez, las del tipo II rompen y reúnen dos hebras concertadamente. Las diferentes subclases de enzimas varían en su dependencia del sentido del superenrollamiento de ADN.

La relajación del ADN superenrollado ha sido observada para todas las topoisomerasas de ADN. Sin embargo, la reacción opuesta, el superenrollamiento, solo se sabe que sea catalizado por una girasa bacteriana. Este enzima de tipo II cataliza un superenrollamiento negativo del ADN acoplado a la hidrólisis de ATP. En ausencia de ATP puede relajar el ADN superenrollado.

La unión de anillos de ADN de cadena simple y complementarios está catalizada por enzimas de tipo I, mientras que la rotura de un ADN dúplex enlazado y la concatenación-decatenación de anillos dúplex de ADN ha sido observada para todas las

INTRODUCCION

topoisomerasas de tipo II y de hecho se utiliza como ensayo para detectar la actividad tipo II.

Hasta ahora la información acerca de las topoisomerasas está siendo enfocada hacia los procariotas. Los genes *nalA* o *cou* que eran los determinantes de la resistencia al ácido nalidíxico y la coumermicina, han sido identificados como los genes responsables de las subunidades A y B, respectivamente, de la girasa de ADN y rebautizados como *gyrA* y *gyrB*. Los inhibidores y las mutaciones han demostrado la importancia de la girasa como un enzima esencial para la viabilidad de la bacteria ya que afecta a procesos celulares de importancia como replicación y transcripción (Gellert, 1981).

Sin embargo no ocurre así, por ejemplo, con la topoisomerasa I de ADN de *E. coli* en donde se ha visto que la existencia de mutantes con el gen *topA* (que codifica para este enzima) delecionado, indica que la topoisomerasa I es dispensable. Parece ser que las funciones son realizadas por otro enzima, probablemente girasa o la cercana topoisomerasa II. Algunos grupos que perdieron la topoisomerasa I han mostrado mutaciones compensatorias en otros genes e incluso una nueva topoisomerasa de tipo I (llamada topoisomerasa III) ha sido purificada de *E. coli*.

Las funciones de las topoisomerasas de fagos y plásmidos en la replicación y recombinación específica de sitio son bien conocidas. En cuanto a las topoisomerasas bacterianas, sin embargo, no se ha probado nada en este sentido. En eucariotas no se dispone de ninguna evidencia directa en el papel de las topoisomerasas aunque es altamente probable que estén presentes en muchos procesos celulares (Cozzarelli, 1980).

INTRODUCCION

Un tercer grupo de nucleasas son aquellas implicadas en la reparación del ADN. Debido a la aparente complejidad del ADN, los sistemas de reparación, las dificultades en diseñar experimentos y en evaluar las eficiencias en reparación de ADN de células particulares, el número de DNasas relacionadas definitivamente con la reparación del ADN es relativamente pequeño.

La célula dispone de una amplia variedad de mecanismos de reparación de ADN (fotorreactivación, escisión-resíntesis, recombinación, sistema SOS) y la elección de uno u otro suele depender del momento del ciclo celular en que aparece el daño y de las condiciones ambientales. En muchos de estos mecanismos hay DNasas implicadas. En otros aunque no existe prueba experimental deben actuar también. Solo en casos muy específicos la célula no emplea nucleasas al reparar el ADN dañado.

El mecanismo de reparación en el que se conoce que actúen mayor número de nucleasas es el de escisión-resíntesis. Dentro de él podemos dividir entre la reparación por escisión de nucleótidos, propiamente dicha, y aquella que se limita a retirar simplemente la base dañada.

Dentro del primer grupo se encuentran nucleasas con actividad de escisión como las exonucleasas asociadas a la ADN polimerasa I de *E. coli* (5'→3' y 3'→5'), así como la exonucleasa VII de *E. coli* y el enzima RecBC que actúan en las dos direcciones.

Entre las endonucleasas de incisión se encuentra el sistema de incisión *uvr* de *E. coli*, formado por los productos de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, de 114000, 84000 y 68000 daltons respectivamente. La actividad endonucleasa se observa cuando ambas actividades están juntas. Dos de ellas se unen al ADN dañado y la tercera tiene actividad ATPasa (Yoakum y Grossman, 1981).

INTRODUCCION

En el caso de escisión de bases, las primeras en actuar son las glicosilasas de ADN, que reconocen una base anormal específica, rompen el enlace N-glicosílico y generan una base libre y un sitio AP. Posteriormente, los sitios sin bases son reconocidos por las endonucleasas AP, enzimas ubicuistas en la naturaleza que rompen el ADN en el enlace fosfodiéster adyacente al azúcar sin base. Se dividen en clase I y II según dejen el azúcar sin base en el término 3' o en el término 5' del corte. En *E. coli* la endonucleasa III es un enzima de clase I, mientras que las endonucleasas IV y VI son de clase II (Warner et al, 1981).

En el caso de la reparación recombinacional se han propuesto modelos sobre cómo podrían actuar las nucleasas, aunque aún no se ha implicado ninguna en concreto. Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, existen casos de reparación en que no existe rotura de enlace fosfodiéster como son los enzimas fotorreactivantes, capaces de monomerizar dímeros de pirimidina sin romper el ADN, o las transmetilasas que convierten directamente los residuos O⁶-metilguanina en guanina. También se ha observado que residuos purínicos son insertados específicamente en sitios AP no rotos del ADN.

Otro proceso en el que las nucleasas juegan un importante papel es en la replicación del ADN. Los enzimas que intervienen se pueden dividir en tres grupos: endonucleasas específicas de sitio requeridas para la replicación de ADN, actividades nucleásicas asociadas con polimerasas de ADN, y actividades nucleásicas de la reversotranscriptasa.

El genomio de los fagos de ADN de cadena simple filamentosos e icosaédricos codifica para endonucleasas específicas

INTRODUCCION

de sitio esenciales para la replicación del ADN *in vivo*. Suelen producir una mella específica en la cadena viral de la forma replicativa superenrollada del ADN.

Entre los enzimas que intervienen en estos procesos están bien caracterizados los casos de la proteína producto del gen *A* del fago icosaédrico ØX174 y el producto del gen *II* de los fagos filamentosos M13 y fd. Ambas proteínas desempeñan un papel fundamental en la replicación del ADN virásico por el modelo del círculo rodante de Gilbert y Dressler (1968).

La proteína del gen *A* del fago ØX174 produce una rotura específica a la altura del nucleótido 474 del genómico virásico, dentro del propio gen *A*. Cerca de esa zona hay una región metilada que parece actuar como señal para el corte. La proteína permanece unida a esa zona y ejercerá también el papel de ligasa al cerrar covalentemente la cadena formando nuevos genómicos virásicos. La acción de la proteína producto del gen *II* de los fagos M13 y fd parece ser similar.

Como hemos visto, estas proteínas son enzimas altamente complejas, esenciales para múltiples etapas en la replicación del ADN del fago. Aunque han pasado varios años desde que se propuso un papel multifuncional para la proteína *A* del ØX174 (Eisenberg *et al*, 1977), queda aún mucho desconocido, particularmente con los asuntos relacionados con la terminación específica de la replicación.

Es muy probable que las proteínas de este tipo sean descubiertas y caracterizadas en otros sistemas. La rotura específica de sitio y la reunión de los extremos ha sido bien estudiada en el procesamiento y maduración de la estructura del ácido nucléico.

INTRODUCCION

Por lo que se refiere a las actividades nucleásicas asociadas con polimerasas de ADN, hay que distinguir entre actividad exonucleásica 3'→5' y actividad exonucleásica 5'→3' (Kornberg, 1980).

Las tres polimerasas del ADN procariótico (I, II y III) poseen una actividad exonucleasa 3'→5'. Se cree, como ya se ha indicado anteriormente, que esta actividad juega un papel importante en la lectura de prueba ("proof-reading") de los nucleótidos incorporados que son dictados por la cadena madre de ADN. EN esta función, los errores incorporados son descubiertos y escindidos por la exonucleasa.

La actividad exonucleasa 5'→3' se ha encontrado asociada con las polimerasas I y III. La de la polimerasa I es la mejor caracterizada. Genera mono y oligonucleótidos desde el extremo 5' de forma inespecífica (puede ser 5'-OH, 5'-P, 5'-P-P, 5'-P-P-P; tanto en ADN como en ARN). En general, esta actividad actúa en sitios que contienen alteraciones de las estructuras de ADN cerca de las horquillas de replicación o en las regiones erróneas. Bajo ciertas condiciones, la polimerasa puede hacer una escisión en ausencia del término 5'

En el caso de la DNA polimerasa III, en contraste con la anterior, su actividad 5'→3' requiere una extensión 5'; el enzima hidrolizará la extensión de cadena simple y migrará en el área dúplex (Livinston y Richardson, 1975). En ausencia de región 5' de cadena simple esta actividad no funciona. Como en la polimerasa I, la actividad 5'→3' de la polimerasa III puede formar oligonucleótidos. El significado de esta actividad aún no es conocido.

Las polimerasas de ADN de eucariotas superiores α , β y γ no contienen actividades exonucleasas 5'→3' ó 3'→5'. Dos ADN

INTRODUCCION

polimerasas se han aislado de levaduras y una de ellas, la ADN polimerasa II, parece ser que contiene una actividad 3'→5'.

También deben destacarse las actividades nucleásicas de la reversotranscriptasa. Este enzima, aislado de retrovirus, posee varias actividades: polimerasa de ADN dependiente de ARN requerida para la síntesis final de ADN de cadena doble, una exonucleasa bidireccional de ARN y una endonucleasa de ADN. Las actividades polimerasa y RNasa se encuentran en la subunidad α . La endonucleasa se encuentra en la subunidad β . Pero existe otra actividad exonucleasa que reside en las dos subunidades juntas. Esta actividad solo es activa con Mn^{2+} y no con Mg^{2+} , a diferencia de la anterior que le es indiferente y actúa sobre el ADNccc (Golomb *et al*, 1981).

Otro grupo de nucleasas lo constituyen aquellas que degradan tanto ADN como ARN, pero que son altamente específicas en el hecho de que solo actúan sobre cadena simple. Están relativamente poco estudiadas pero eso no es obstáculo para que se hayan utilizado ampliamente en ingeniería genética.

Entre las más conocidas se encuentran la nucleasa S1, aislada de *Azpergillus oryzae* (Ando, 1966), las nucleasas aisladas tanto del micelio como de los conidios de *Neurospora crassa* (Linn, 1967), la nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Kuninaka *et al*, 1961), nucleasa BAL 31 de *Alteromonas espejiana* (Laval, 1974) y la nucleasa I de judía (Sung y Laskowski, 1962), entre otras.

Todas producen mono y oligonucleótidos terminados en 5'-P y 3'-OH. Son enzimas muy termoestables, activas a 60°C o más. Suelen ser metaloproteínas de Zn^{2+} , fuertemente inhibidas por el EDTA. Presentan un pH óptimo entre 5 y 8, y con pesos moleculares

INTRODUCCION

variables aunque siempre por debajo de 100 Kd. Muchas tienen actividad endo y exonucleolítica, como es el caso de las nucleasas S1, P1 y de judía. Los patrones de ruptura del ADN superenrollado son diferentes dependiendo del enzima y del pH de la reacción.

También existen nucleasas de este tipo específicas para ADN, como las exonucleasas I y VII de *E. coli*, las endonucleasas IV, del fago T4, y I, del fago T7, ó la desoxirribonucleasa de *Bacillus subtilis*.

El papel biológico de estos enzimas no siempre está estudiado pero es evidente que intervienen en la reparación y recombinación de ADN. En el caso de la endonucleasa I del fago T7 parece ser que está implicada en la degradación de ADN extraño. Sin embargo mucha más atención se ha prestado a las posibilidades de estas nucleasas en la Biología Molecular. Sus aplicaciones son muy numerosas, tanto en ácidos nucleicos de una sola cadena (preparación de mono y dinucleótidos, estimación del contenido de doble hélice, etc...), como bicatenarios (eliminación de finales cortos de cadena simple, localización de regiones de bases no aparejadas del ADN superhelicoidal) o incluso en moléculas híbridas (cuantificación de homología, etc...) y numerosísimas más.

Un sexto grupo de nucleasas, implicadas en los procesos de restricción y modificación de los ácidos nucleicos, ha sido objeto de gran atención en los últimos años debido a su papel clave en la tecnología de ADN recombinante.

El fenómeno de restricción y modificación en bacterias fue descrito por primera vez hace más de 30 años por Luria y Human

INTRODUCCION

(1952) y por Bertani y Weigle (1953) para los fagos T-pares y P2 y λ respectivamente.

Los autores observaron una habilidad adquirida, con características lamarkianas, por parte del fago al presentar una respuesta adaptativa al hospedador, aumentando la eficiencia de placa, que se perdía cuando el virus pasaba a través de otros hospedadores.

Diez años después, en un artículo del grupo Arber (1965), apareció la explicación molecular a este fenómeno. Se trataba de la acción de dos enzimas: una nucleasa que reconocía y cortaba secuencias específicas en el ADN entrante (restricción), y una metilasa del ADN que modificaba estas mismas secuencias de forma que no fueran reconocidas por la nucleasa, para así proteger el ADN propio.

Al comienzo de los 70, varias endonucleasas de restricción habían sido ya purificadas y estaba claro que podían ser divididas en, al menos, dos clases diferentes basadas en sus requerimientos de cofactores. Una de estas clases requería Mg^{2+} , ATP y S-adenosilmetionina (AdoMet); la segunda clase requería solo Mg^{2+} . Boyer (Boyer *et al*, 1971) propuso llamar a la primera clase enzimas de tipo I, y la segunda de tipo II. Estas últimas han demostrado ser herramientas indispensables en la Biología Molecular y Genética modernas. El primer grupo es el que será tratado a continuación y a su vez puede ser dividido en dos grupos, I y III, de acuerdo con Kauc y Piekarowicz (1978).

No se ha hecho ningún estudio extensivo sobre la presencia de enzimas de restricción de tipo I. La búsqueda de enzimas de tipo II no hubiera detectado enzimas que requieran ATP.

INTRODUCCION

Exceptuando el único caso del género *Haemophilus*, todos los sistemas de restricción del tipo I se han encontrado en enterobacterias.

El resultado de los análisis genéticos y de complementación de este grupo de enzimas, conduce a la idea de que al menos tres genes estructurales son necesarios. Uno de estos genes, *hsdS* sería necesario, tanto en restricción como en modificación, para el reconocimiento de la secuencia específica para el sistema. Un segundo gen *hsdM* sería responsable, junto con el producto del gen *hsdS*, de la modificación y un tercero, *hsdR*, junto con los otros dos, catalizaría la restricción. El análisis genético más reciente corrobora por completo este modelo. Sain y Murray (1980) han clonado la región *hsd* de *E. coli* K12 en el fago λ y han mostrado por análisis de delección que el orden de los genes es *hsdR*, *hsdM* y *hsdS*. También han puesto de manifiesto que los genes están organizados en dos unidades que se transcriben en la misma dirección: *hsdM* y *hsdS* se transcriben desde un promotor, mientras que *hsdR* se transcribe desde un segundo.

Los únicos enzimas de restricción que han sido extensamente purificados son los de las cepas K12 y B de *E. coli*: *Eco* K y *Eco* B (nomenclatura de Smith y Nathans, 1973). Estos enzimas, como se espera de su naturaleza alélica, tienen estructura muy similar. Ambos contienen tres subunidades no idénticas, α , β y γ , con peso molecular de 135000, 60000 y 50000, respectivamente, aunque las proporciones relativas de las subunidades parecen ser diferentes para las dos enzimas. Para *Eco* K la estructura que se propuso era $\alpha_2\beta_2\gamma$ (Meselson et al, 1972) mientras que la situación para *Eco* B parece ser más compleja. Al menos tres estructuras oligoméricas activas han sido purificadas para este enzima y la forma mayoritaria resultó ser $\alpha_2\beta_4\gamma_2$ (Eskin y Linn 1972a). Estas diferencias entre los dos enzimas pueden reflejar las variaciones en las condiciones de cultivo de las bacterias usadas para las

INTRODUCCION

diferentes preparaciones enzimáticas o en los diferentes procesos de purificación.

Las secuencias reconocidas por *Eco* B y *Eco* K han sido determinadas mediante análisis de mutantes.

Para *Eco* B, la secuencia es la siguiente:

```
5' TGANNNNNNNTGCT 3'
3' ACTNNNNNNNACGA 5'
```

y para *Eco* K:

```
5' AACNNNNNNGTGC 3'
3' TTGNNNNNNCACG 5'
```

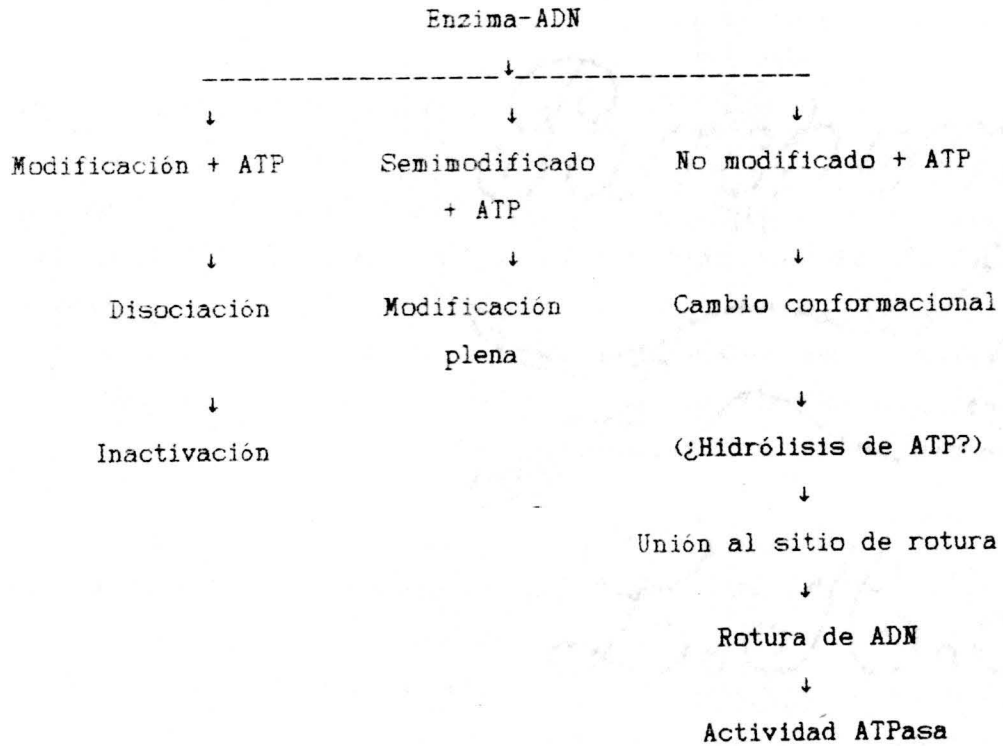
La modificación se realiza sobre los restos de adenina convirtiéndolos en 6-metiladenina. En el caso de *Eco* B, se trata de la primera adenina de la fila 3'-5'. En la otra cadena se metila la única adenina que existe. En el caso de *Eco*K, se metila la segunda adenina de la cadena 5'-3' y la única presente en la hebra contraria.

Los mecanismos de reacción son similares tanto en el sistema de restricción K como en el B, presentando ambos una amplia variedad de reacciones. Son al mismo tiempo endonucleasas de restricción, realizan modificación de ADN específica de sitio, son ATPasas dependientes de ADN, y realizan también una acción similar a la girasa.

La AdoMet es necesaria para que el enzima se una al ADN; una vez unidos enzima y sustrato, ya no se necesita. Las reacciones

INTRODUCCION

posteriores dependen del estado de metilación del ADN y del ATP presente (Yuan *et al*, 1975). Esquemáticamente:



Si no hay AdoMet, el enzima no presenta afinidad por el ADN, siendo la activación proporcional a la concentración de AdoMet hasta un determinado nivel que indica la existencia de tres sitios de unión al enzima.

El hecho de que el enzima sea inactivo con un ADN modificado en solo una cadena es importante porque este es el estado del ADN replicativo, lo que asegura la supervivencia de la célula.

INTRODUCCION

También es importante el hecho de que el enzima dependa de los niveles de AdoMet, ya que si los niveles de cofactor son bajos, habrá poca metilación pero el enzima también será poco activo. Así, se ha visto que este mismo caso con enzimas de restricción tipo II ó III, termina en la degradación del propio ADN por las mismas enzimas.

El efecto del ATP es un cambio conformacional visible al microscopio electrónico (parece ser que pierde una o más subunidades). Este cambio se acompaña de una capacidad en aumento del enzima para unir el ADN a los filtros de nitrocelulosa, que constituye la base de un ensayo muy útil para la detección del enzima (Yuan y Meselson, 1970). Este paso puede realizarse con análogos del ATP no hidrolizables, pero estos no pueden llevar a cabo el resto de la reacción.

Una característica sorprendente de estos enzimas es que la rotura del ADN tiene lugar al azar a considerables distancias (400-7000 pb) del sitio de reconocimiento. Hay dos teorías acerca de como se lleva a cabo, basadas ambas en observaciones al microscopio electrónico.

Para *Eco B*, el enzima parece que "camina" a lo largo del ADN en una sola dirección lejos de la secuencia de reconocimiento y forma un bucle gracias al cual el enzima se encuentra unida al mismo tiempo al sitio de reconocimiento y a otras secuencias del ADN (Rosemond et al, 1979). Otro mecanismo similar pasa con la *Eco K* pero en este caso el enzima rompe en ambos lados de la secuencia de reconocimiento, formando bucles de ADN superenrollado con un mecanismo comparable a las topoisomerasas (Yuan et al, 1980a).

Puede que ambos enzimas sean diferentes, pero lo más probable es que las diferencias respondan a las distintas

INTRODUCCION

condiciones de tratamiento, preparaciones al microscopio electrónico, etc... Cualquiera que sea el mecanismo, el corte de ADN es un proceso en dos pasos: el ADN primero se rompe en una cadena y luego en la otra. En caso de exceso de ADN, solo se rompe una hebra sugiriendo que dos moléculas se requieren para una doble cadena.

Parece ser además que *Eco B* libera 75 pb en la forma de nucleótidos solubles por cada corte que hace (Kimball y Linn, 1976). Por otra parte, tras la rotura las endonucleasas de tipo I se convierten irreversiblemente en potentes ATPasas, y mientras lo son, no pueden romper ADN de nuevo. Consecuentemente no hay renovación del enzima: cada enzima puede cortar solo una molécula de ADN, pero por el contrario, la actividad ATPasa es muy duradera. Además, el ATP es necesario para degradar el ADN.

Si la hidrólisis de ATP tiene cualquier función biológica es aún una cuestión abierta. Puede que solo sea un artefacto de laboratorio, sin embargo, es posible imaginar al menos dos formas en las que puede ser ventajosa:

1.- Cuando un plásmido o un virus invade una célula, su ADN debe ser no solamente troceado sino que estos trozos deben ser degradados antes de que se recombinen con el ADN nuclear. La hidrólisis masiva de ATP puede, al caer los niveles de ATP en la célula, disminuir la frecuencia de recombinación ilegítima y dar a las nucleasas una oportunidad mejor.

2.- Con respecto a la población en su conjunto, al hidrolizar todo el ATP de una sola célula, ésta no puede sobrevivir pero consigue detener la infección en el resto de la colonia; sería una especie de comportamiento altruista.

INTRODUCCION

Los enzimas de tipo III constituyen un subgrupo de la primera clase de endonucleasas de restricción. Al principio se agruparon junto con los de tipo II, pero luego se vió que los requerimientos de sustrato eran más complicados. La designación de tipo III se debe a Kauc y Piekarowicz (1978).

Solo tres miembros de esta clase han sido identificados por el momento, pero es probable que, como para los enzimas de tipo I, una búsqueda sistemática pudiera descubrir muchas más. Un miembro es codificado por el fago P1 de *E. coli* (*Eco* P1), y otro por el plásmido 15T de dicho microorganismo; la tercera es de *Haemophilus influenzae* Rf (*Hin* fIII), y es más probable que se codifique en el cromosoma (Piekarowicz *et al*, 1974). Un isoesquizómero de *Hin* fIII existe en *H. influenzae* Re (*Hin* Re), (Piekarowicz, 1982).

Se ha demostrado que solo dos genes intervienen en el proceso de restricción-modificación. El análisis de estos genes por mutagénesis de transposición puso de manifiesto dos regiones contiguas del genoma de P1. Las transposiciones en uno de estos genes dan lugar a un genotipo deficiente en restricción pero capaz de modificar, definiendo un gen llamado *res*. En la otra región el resultado es un fenotipo deficiente en restricción y modificación, que define un gen llamado *mod*, de 3 y 2 Kb respectivamente. Hay dos promotores, uno para cada gen que transcriben en la misma dirección. Ambas regiones de ADN son muy homólogas.

Por lo que respecta a la naturaleza molecular de los enzimas, recientemente se ha demostrado que tanto *Eco* P1 como *Eco* P15 contienen dos subunidades de peso molecular 106000 y 75000 dando reacciones cruzadas con sus anticuerpos. La subunidad pequeña es el producto del gen *mod* y tiene la capacidad de reconocer la secuencia de ADN y metilarla pero no la rompe. La subunidad grande debe contener la actividad endonucleolítica.

INTRODUCCION

Las secuencias de reconocimiento de las tres enzimas de restricción de tipo III han sido determinadas y son:

Eco P1: 5' AGACC 3'
3' TCTGG 5' (Báchi *et al*, 1979)

Eco P15: 5' CAGCAG 3'
3' GTCGTC 5' (Hadi *et al*, 1979)

Hin fIII: 5' CGAAT 3'
3' GCTTA 3' (Piekarowicz *et al*, 1981)

La modificación del ADN por estas tres enzimas consiste en la introducción de grupos metilos en los restos de adenina para dar 6-metiladenina. Esta adenina solo existe en una de las cadenas en la secuencia de reconocimiento de *Eco* P1 y P15; pero incluso en *Hin* fIII se ha demostrado *in vitro* que la metilación solo ocurre en una de las cadenas. Esto plantea un problema biológico: ¿Qué ocurre cuando el ADN se está replicando? Al separarse las hebras madres solo una queda protegida. Se ha postulado que el enzima es periplásmico, pero esto ha sido refutado. Puede que el ADN sea metilado inmediatamente después de que se abra la horquilla de replicación. Esto está apoyado por el hecho de que en las células que contienen estas enzimas hay una alta concentración de subunidades de modificación libres.

Todos estos enzimas rompen el ADN sobre 25-27 pb hacia la derecha de la secuencia, unos 9 nm, distancia que puede ser fácilmente cubierta por el enzima sin moverse a lo largo del ADN. Parece ser que la subunidad de modificación reconoce y se une a la

INTRODUCCION

secuencia específica y dirige la subunidad de restricción hacia el sitio de corte. Esto explica el fenotipo deficiente en restricción y modificación, que tiene intacto el gen *res*.

Los enzimas de tipo III requieren ATP para la actividad endonucleolítica pero no lo hidrolizan. La actividad nucleasa es estimulada por AdoMet sin ser un requerimiento absoluto. En presencia de ambos cofactores los enzimas actúan también como metilasas, de forma que restricción y modificación son reacciones competitivas. En presencia de AdoMet y ausencia de ATP sólo se da la modificación. Estos enzimas necesitan tamaños muy grandes de ADN para romperlo (*Hin* fIII, unas 3000 pb) pero ello no parece ser debido a la incapacidad de unión al ADN porque la metilación sí se da.

Hay muchos aspectos de los enzimas de restricción de tipo III aun no conocidos. Por ejemplo, ¿por qué *in vitro* son tan ineficientes, aún cuando se imitan las condiciones intracelulares?. Realmente *in vivo* este no es el caso, porque son incluso aún más eficientes que las del tipo I y II. Parece ser que se está perdiendo un factor importante (quizás un cofactor exótico o un componente macromolecular codificado por el hospedador). Otro problema que queda por ser resuelto para muchos sistemas de restricción (no sólo los que necesitan ATP) es el control de expresión de los genes estructurales para los enzimas.

Algo esencial es que el ADN de la célula hospedadora esté modificado antes que la restricción se exprese. Así se sabe que las células no expresan su restricción hasta una hora después de la infección, y pasan al menos tres horas hasta que la actividad de restricción alcanza sus niveles normales (Arber et al, 1974). Sin embargo, la modificación puede detectarse en unos pocos minutos después de la infección (Arber and Dussoix, 1962).

INTRODUCCION

A diferencia de los tipos I y III, los enzimas de tipo II requieren sólo Mg^{2+} como cofactor y reconocen y rompen una misma secuencia específica en la molécula de ADN. Es esto lo que ha hecho a estos enzimas tan útiles en Biología Molecular. Como los tipos I y III, estos enzimas pueden catalizar la restricción-modificación, pero no hay evidencia genética de que estén involucrados en la restricción-modificación controlada por el hospedador, y es posible que algunos de ellos tengan otros papeles, no descubiertos, en la célula. El interés que despiertan los enzimas de tipo II es meramente instrumental, ni sus propiedades biológicas ni bioquímicas han sido exploradas en detalle.

De entre 360 endonucleasas de restricción de tipo II que han sido hasta ahora caracterizadas, unas 85 especificidades diferentes han sido identificadas, y no hay razón para creer que no se encontrarán muchas más tras una búsqueda exhaustiva, si atendemos a principios de probabilidad.

Así, por ejemplo, aunque en principio había una preponderancia de las secuencias de corte ricas en G-C, ya se han empezado a encontrar secuencias sólo de T-A (Roberts, 1982).

Aunque para la mayoría de los enzimas el sitio de rotura queda dentro de la secuencia de reconocimiento, hay algunas excepciones en que está lejos. Algunos grupos de enzimas tienen secuencias de reconocimiento relajadas, y no diferencian las bases púricas o pirimidínicas en ciertas posiciones. Muchos sistemas de restricción-modificación producidos por diferentes organismos, a menudo reconocen secuencias idénticas o sustancialmente homólogas, lo que se conoce como enzimas isoesquizómeros.

Entre los pocos enzimas de tipo II que han sido aislados en forma pura o examinados con respecto al mecanismo de acción, hay

INTRODUCCION

varias diferencias en el modo de las interacciones ADN-proteína que pueden estar relacionadas con la cuestión de la secuencia de reconocimiento.

Todos los enzimas purificados, tras ser desnaturalizados y reducidos, han mostrado tener un sólo polipéptido base. La mayoría de estos enzimas existen como oligómeros de estos polipéptidos aunque hay algunos que sólo se han encontrado como monómeros. Al admitir que la relación ADN-enzima depende del estado oligomérico de éste, se ha sugerido que estas dos clases de enzima pueden diferir en el mecanismo.

El análisis estructural de los enzimas de modificación de tipo II está aún en una etapa primaria. Sólo cuatro de ellas han sido purificadas: *Eco* R1 (Rubin y Modrich, 1977), *Hpa* I y *Hpa* II (Yoo y Agarwal, 1980) y *Bsp* I (Gunther et al, 1981). Además, la metilasa Dam que es responsable de la mayoría de los residuos N-6-metiladenina de *E. coli* y, aunque no parece estar involucrada en restricción-modificación, si tiene muchas similitudes estructurales y mecanísticas con las otras cuatro.

Todos estos enzimas están constituidos por una sola cadena polipeptídica (30-40 kd), que es la forma estable en solución. Así, al menos, es para la *Eco* R1, y probablemente para las otras también: el reconocimiento de la secuencia se hace en forma de dímero pero la metilación se hace en forma de monómero. Esto puede significar que la metilasa y la endonucleasa del sistema pueden diferir significativamente con respecto a las interacciones ácido nucléico-proteína. Esta posibilidad puede parecer sorprendente si se tiene en cuenta la función complementaria de un sistema restricción-modificación. Sin embargo se ha establecido que la presencia continuada de la metilasa *Eco* R1 es necesaria para mantener la viabilidad de la célula en presencia de la endonucleasa. Esto

INTRODUCCION

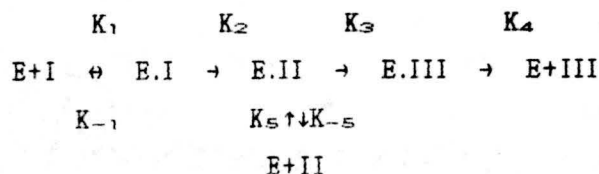
sugeriría que las dos *Eco* R1 podrían tener un origen evolutivo común; sin embargo, nuevos y más profundos estudios han demostrado que sus orígenes son diferentes (Newman *et al*, 1981).

Por otra parte, la determinación reciente de las estructuras de las enzimas *Eco* R1 han permitido comprobar las similitudes entre las dos proteínas a nivel de secuencia de aminoácidos. Los genes de estas enzimas han sido localizados en unas 2200 pb de ADN, cuya secuencia ha sido determinada en dos laboratorios (Jack *et al*, 1980; Greene *et al*, 1981; Newman *et al* 1981).

El gen de la endonucleasa codifica para un polipéptido de 277 aminoácidos, que debe ser procesado para eliminar una fMet terminal. El gen de la metilasa codifica para una proteína de 326 aminoácidos, pero en este caso el procesamiento consiste en la eliminación del fMet-Ala terminal.

De todas las endonucleasas de tipo II, la que más se ha estudiado con respecto a su mecanismo de rotura de ADN es también la *Eco* R1.

La restricción *in vitro* por endonucleasas de tipo II, que requiere sólo Mg^{2+} y ADN no modificado, conlleva la hidrólisis de dos enlaces fosfodiéster. EN el caso de la *Eco* R1, lo que ocurre es lo siguiente (Modrich y Zabel, 1976; Rubin y Modrich, 1978).



INTRODUCCION

Siendo I: secuencia para *Eco* R1 intacta
II: rotura en solo una cadena
III: rotura en las dos cadenas
 $K_a = K_{-1} / K_1$
 $K_b = K_{-5} / K_5$
 K_4 es el factor limitante

Aunque la presencia de una secuencia de reconocimiento no modificada es suficiente para que se produzca la rotura de la doble cadena, es evidente que hay factores adicionales de la estructura del ADN que influyen en la eficiencia de la rotura, así como la estructura del ADN externa al sitio de reconocimiento para *Eco* R1 (Rubin y Modrich, 1978).

Si bien los estudios mecanísticos de otras endonucleasas de tipo II están aún en un estado primario, la información disponible sugiere que la rotura del ADN puede ocurrir por un mecanismo similar al de *Eco* R1, es decir, mediante un paso intermedio en el que se rompe una sola cadena (Smith y Chirikjian, 1979).

El caso de una sola hebra metilada es muy interesante por varias razones ya mencionadas anteriormente. Estos sitios tienen importancia biológica ya que aparecen en el caso de la replicación semiconservativa del ADN. La eficacia de rotura en estos sitios proporcionaría información acerca de la interacción enzima-ADN en un sistema dado.

Con respecto a este problema hay dos clases de enzimas de tipo II: los que no rompen un ADN metilado (*Dpn* I, *Dpn* II, *Eco* R1) y las que rompen sólo la hebra no metilada del sitio de reconocimiento (*Bsp* I, *Sau* 3A, etc...)

INTRODUCCION

Entre los enzimas de tipo II, como se ha indicado con anterioridad, sólo cinco metilasas se han aislado en forma pura: *Bsu* I, *Eco* R1, *Hpa* I, *Hpa* II y *Dam*.

Presentan un comportamiento típicamente de primer orden con respecto a la concentración del enzima, y de Michaelis-Menten con respecto a los sustratos AdoMet y ADN. Esto, junto con el hecho de que la forma estable del enzima es el monómero, ha llevado a la conclusión de que cada metiltransferasa funciona como un monómero.

Parece ser también que estos enzimas transfieren un grupo metilo a un sitio de reconocimiento por unión y, en el caso de *Eco* R1, también se ha visto que los parámetros cinéticos de metilación de un sitio hemimodificado no son más favorables que aquellos de la metiltransferencia a una secuencia no modificada. En el caso de *Bsu* I y *Dam*, hay una ligera preferencia de metilos a sitios hemimetilados. Esto contrasta con lo observado en el caso de los enzimas de tipo I, en los que hay una marcada preferencia por los sitios semimodificados.

OBJETO DEL TRABAJO

OBJETO DEL TRABAJO

Myxococcus coralloides D es una mixobacteria, aislada y ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Numerosos intentos realizados con el fin de aislar bacteriófagos específicos frente a este microorganismo resultaron fallidos (Muñoz, 1985) al contrario de lo que ocurre en otras bacterias del grupo (Azuaga, 1987). Una de las causas de este comportamiento puede ser la alta actividad nucleásica detectada en esta mixobacteria.

Esta actividad nucleásica se hallaba en su totalidad en la fracción celular sin ser expulsada al sobrenadante de cultivo, y podía ser liberada a un extracto libre de células mediante homogeneización o sonicación.

Cuando el extracto libre de células se cromatografió a través de una columna preparativa, la actividad nucleasa se desdobló en tres fracciones activas. Un estudio básico de estas tres fracciones crudas constituyó la memoria de licenciatura previa a este trabajo de doctorado (Martínez-Cañamero, 1986). El estudio se orientó al conocimiento de las condiciones de acción óptimas de estas tres actividades que, por orden de elución en la columna, se las denominó G, M y P aludiendo a la relación entre sus tamaños moleculares aparentes (Grande, Mediana y Pequeña).

El resultado obtenido puso de manifiesto que *M. coralloides* D posee una amplia actividad DNasa que cubre todas las condiciones en las que esta mixobacteria es capaz de crecer: un rango de temperatura desde 20 a 45°C, un rango de pH entre 6 y 9 y

OBJETO DEL TRABAJO

una fuerza iónica, en general, baja. Dicha actividad, además, es estimulada por cationes metálicos divalentes, especialmente Mn^{2+} para las dos nucleasas de mayor tamaño y Mg^{2+} para la DNasa menor.

Conocidos estos factores básicos, surgió la necesidad de ampliar este estudio, con objeto de profundizar en su mecanismo de acción, su naturaleza molecular, su localización celular y su evolución a lo largo del desarrollo de *M. coralloides* D no sólo para poder abrir una llave en la manipulación genética de esta bacteria, sino para emitir una hipótesis acerca del papel de estas enzimas y aumentar así nuestro conocimiento acerca de la biología de este interesante microorganismo.

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

Myxococcus coralloides D, la raza productora de desoxirribonucleasas, capaz de crecer de manera dispersa en medio líquido, fue obtenida por Arias y Montoya (1978) sometiendo una raza de *M. coralloides* salvaje aislada por ellos a varios pases por medios líquidos apropiados.

Myxococcus xanthus DK101 proviene de la colección de D. Kaiser (Stanford, USA). *Coralloccoccus coralloides* Ccc410, *Myxococcus fulvus* Mxf2, *Myxococcus stipitatus* Mxs2 y *Stigmatella aurantiaca* Sgal son un regalo de Hans Reichenbach (Braunschweig, FRG). Estas razas de mixobacterias fueron utilizadas en la realización de un estudio comparativo sobre la actividad desoxirribonucleásica en este peculiar grupo de microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

2. MEDIOS DE CULTIVO

Agar levadura

Este medio ha sido utilizado para la conservación de *Myxococcus coralloides* y el resto de las mixobacterias, ya que en él se produce la fructificación. La composición química de este medio es la siguiente:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Levadura prensada de panadería | 10.0 g |
| Agar | 20.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH | 7.2 |

La levadura se añade después de filtrar el agar fundido, ajustando el pH con una solución de NaOH al 10%. Se esteriliza a 117°C durante 20 minutos.

Medio CTA

Se utilizó en todos aquellos casos en que se quiso obtener crecimiento vegetativo de las mixobacterias en medio sólido. Su composición es:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Bacto-Casitone (Difco) | 10.0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 g |
| Agar | 18.0 g |
| Tampón fosfato potásico 0.2 M pH 7.2 | 50 ml |
| Agua destilada | 950 ml |

MATERIAL Y METODOS

Medio CTT

Este medio fue utilizado para obtener el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* DK 101 en medio líquido. Su composición es la siguiente:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Bacto-Casitone (Difco) | 10.0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 g |
| Tris-HCl 1 M pH 7.5 | 10 ml |
| Tampón fosfato potásico 1M pH 7.5 | 10 ml |
| Agua destilada | 980 ml |

Medio CT 0.5%

Es el medio de cultivo en el que normalmente es mantenido *M. coralloides* D. Su composición es la siguiente:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Bacto-Casitone (Difco) | 5.0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 g |
| Tampón fosfato potásico 0.2 M pH 6.5 | 50 ml |
| Agua destilada | 950 ml |

En este medio también se ha conseguido crecimiento disperso de las razas de *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *C. coralloides* y *S. aurantiaca* mencionadas anteriormente.

MATERIAL Y METODOS

Medio Triptona

Es el medio utilizado para el cultivo de *Myxococcus coralloides* D en el fermentador. Consiste en:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Triptona | 10.0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 g |
| Tampón fosfato potásico 0.2 M pH 6.5 | 50 ml |
| Agua destilada | 1000 ml |

3. TECNICAS DE CULTIVO

3.1. Mantenimiento y conservación de las mixobacterias

El mantenimiento del crecimiento vegetativo de *M. coralloides* D se realizó por transferencias periódicas en medio líquido CT 0.5% dada la capacidad de esta mixobacteria para crecer de forma dispersa en medio líquido.

Con el resto de las mixobacterias, una vez conseguido el crecimiento disperso, se procedió de igual manera, ya que, a veces es difícil conseguir este tipo de crecimiento en estos microorganismos.

Teniendo en cuenta la rápida autólisis que muestran los cultivos dispersos de *M. coralloides* D (Arias y Montoya, 1978), y las mixobacterias en general, para asegurar su conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT 0.5% adicionado de glicerol 0.5 M, el cual, como ya se mencionó en el capítulo anterior, induce la formación de mixósporas, que pueden ser mantenidas congeladas durante años.

La inducción de mixósporas con glicerol se realizó tanto en pequeños volúmenes (tubos de 4.5 ml) como para la obtención de grandes cantidades de mixósporas (matraces de 250 y 500 ml).

MATERIAL Y METODOS

3.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo para mantener el crecimiento disperso de las células vegetativas en todas las experiencias realizadas fueron: agitación a 200 rpm, mantenida a lo largo de todo el tiempo de incubación en un agitador orbital Gallenkamp, y temperatura de 28°C. En el caso de *M. xanthus* la temperatura de incubación fue de 33°C. El crecimiento en medio sólido se realizó siempre a 28°C.

En los casos en que se deseaba obtener grandes masas celulares, se empleó un fermentador de laboratorio Braun Biostat E. Se utilizó el medio triptona en un volumen de 7 litros. El medio se inoculó con 500 ml de cultivo en fase exponencial y se incubó a 30°C, con una agitación de 150 rpm y una presión parcial de O₂ del 45 % durante 30 horas.

4. MEDIDAS DE DENSIDAD ÓPTICA Y pH

4.1. Medidas turbidométricas

Se llevaron a cabo a intervalos regulares de tiempo, determinando valores de absorción a 650 nm en un Spectronic 20.

Para efectuar las medidas se emplearon matraces que poseen un tubo lateral para ser introducidos directamente en el espectrofotómetro. Se evita así el tener que transferir con pipeta el medio a los tubos específicos del espectrofotómetro, con el consiguiente peligro de contaminación y errores en las medidas. En aquellos casos en que se necesitaron volúmenes pequeños se utilizaron tubos esterilizables, especiales para el espectrofotómetro, en los que se realizaba la incubación.

Las medidas de densidad óptica fueron relacionadas con el número de células de acuerdo con Benhamú (1978).

4.2. Medidas espectrofotométricas

Todas las medidas espectrofotométricas realizadas durante la elaboración de esta memoria se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Hitachi 100-80A.

4.3 Medidas de pH

Las medidas de pH de los caldos de cultivo y de los tampones utilizados se realizaron en un pHmetro Radiometer PHM84-Research.

MATERIAL Y METODOS

5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. Método de Bradford

La determinación cuantitativa de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Este método de determinación implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Este incremento en la absorción a 595 nm sirve para determinar la concentración de proteínas.

El reactivo se preparó como se expone a continuación: 100 mg de colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 son disueltos en 50 ml de etanol 95%; a esta solución se añaden 100 ml de ácido fosfórico 85% (p/v). La disolución resultante se lleva a un volumen final de 1 litro, se mantiene en agitación durante dos horas y se filtra antes de su uso. Este reactivo es estable durante al menos un mes a temperatura ambiente.

Para realizar el ensayo, la solución problema conteniendo entre 10 y 50 μg de proteína se completa hasta un volumen de 0.1 ml del tampón correspondiente y 5 ml del reactivo, se agita vigorosamente y se mide la absorción a 595 nm tras 2 minutos y antes de una hora frente a un blanco con 0.1 ml del tampón correspondiente y 5 ml del reactivo.

Si la muestra contiene una concentración muy baja de proteína se realiza el microensayo. En este caso, la solución problema conteniendo entre 1 y 10 μg de proteína se completa hasta

MATERIAL Y METODOS

un volumen de 0.1 ml con tampón, añadiendo 1 ml de reactivo, procediéndose posteriormente como en el ensayo anterior.

La concentración de proteína presente en las muestras ensayadas es deducida frente a una curva estandar obtenida en ensayos por triplicado con albúmina de suero bovino (Sigma). La curva estandar para el ensayo ($100-500 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) y el microensayo ($10-100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) se obtuvo para cada litro de reactivo preparado.

5.2. Absorción en el U.V. a 280 nm

Se empleó este procedimiento como criterio cuantitativo relativo determinando la absorción a 280 nm de cada una de las fracciones eluidas de las columnas utilizadas en el proceso de purificación frente a un blanco constituido por el tampón de elución.

MATERIAL Y METODOS

6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DESOXIRRIBONUCLEASA

6.1. Ensayo de actividad DNasa

La valoración de la actividad DNasa se realizó utilizando diferentes extractos de las mixobacterias mencionadas anteriormente, y siguiendo el procedimiento descrito por MacDonald (1955).

Para el ensayo se mezclaban 0.5 ml de cualquiera de las muestras a ensayar con 0.5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8 adicionado de MgCl₂ 10 mM para el caso de la nucleasa P y MnCl₂ 10 mM para las nucleasas M y G, y 0.5 ml de una solución de ADN que contenía 2 mg de ADN de testículos de salmón (Sigma) por mililitro, y se incubaban a la temperatura adecuada (25°C para la DNasa P, 33°C para la nucleasa M y 37°C para la DNasa G). Una vez transcurrido el tiempo deseado de incubación, que normalmente fue de una hora, se adicionaban 0.5 ml de ácido tricloroacético 3 M, el cual detiene la reacción y precipita el ADN no digerido. Los tubos eran mantenidos en baño de hielo durante 15 min y a continuación centrifugados. Del sobrenadante era tomado 1 ml y se le determinaba la cantidad de ADN digerido mediante el método de la difenilamina, que se describe a continuación.

6.2. Método de la difenilamina

Para la cuantificación del ADN digerido en los ensayos de DNasa se ha utilizado el método de la difenilamina de Dische modificado por Schneider (1957), que consiste en hervir 1 ml de muestra junto con 2 ml de reactivo de difenilamina durante 10 min. Este reactivo era preparado disolviendo 1 g de difenilamina (Merck) en 100 ml de ácido acético glacial y adicionándole 2.75 ml de H₂SO₄.

MATERIAL Y METODOS

Una vez enfriados se medía la intensidad de color azul de los tubos a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi 100-80 A. La correspondencia entre intensidad de color y concentración de ADN era calculada mediante una recta patrón que había sido realizada utilizando el ADN de salmón como referencia.

6.3. Definición de unidad y actividad específica

Utilizando la definición de MacDonald (1955), una unidad de actividad desoxirribonucleasa es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de desoxipentosa-fosfato soluble en ácido tras una hora de incubación. La actividad específica es expresada como unidades de DNasa por miligramo de proteína. La proteína es determinada mediante el método de Bradford (1976).

MATERIAL Y METODOS

7. EXTRACCION DE LA ACTIVIDAD DNasa

Para la extracción de las DNasas de *M. coralloides* D, así como de las otras razas estudiadas, se ha utilizado, como método de rotura celular, la sonicación.

7.1. Obtención de extractos sonicados

Para la obtención de extractos sonicados, en primer lugar se recogieron por centrifugación las células de cultivos en fase exponencial de *M. coralloides* D, se resuspendieron en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 con MgCl₂ 10 mM, concentrando 100 veces, y se rompieron en un sonicador Branson Sonic B-12 a una potencia de 50 w durante 15 min, en circuito refrigerado. A continuación se centrifugó durante 15 min a 40000xg a 2°C en una ultracentrífuga Beckman L5-50, con rotor ty50, recogiendo el sobrenadante para posteriores ensayos.

8. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Para el fraccionamiento de los extractos sonicados se ha utilizado la filtración a través de Sephadex^(R) G-200 y Sephacryl^(R) S-200 (Pharmacia Fine Chemicals), que separan sustancias por su tamaño molecular.

8.1. Preparación de los geles

El Sephadex se suministra en forma de polvo seco, y antes de empaquetarlo en la columna se debe hinchar en agua destilada. Para ello, a la cantidad adecuada de gel (1 g de Sephadex G-200 suministra un volumen de lecho de 30-40 ml) se le adicionó un exceso de agua y se mantuvo en baño a 90°C durante 5 horas. El proceso de hinchamiento puede conseguirse también manteniendo el polvo seco en el agua durante tres días.

En el caso del Sephacryl S-200 no es necesario hervir, ya que se suministra hinchado, en una suspensión de agua destilada con mertiolato al 0.01% para evitar que se contamine.

En el transcurso de la preparación pueden quedar atrapadas burbujas de aire en la matriz del gel, dando lugar a empaquetamiento y flujo desiguales. Para eliminar el aire se conectó una bomba de vacío al matraz que contiene el gel y se mantuvo así hasta que dejaron de salir burbujas de aire.

8.2. Montaje y preparación de la columna

Se han empleado columnas de vidrio de Pharmacia Fine Chemicals de 40x2.6 cm, para el caso de Sephacryl S-200, y de 100x2.6 para el Sephadex G-200, con un tubo de teflón en cada

MATERIAL Y METODOS

extremo, el cual canaliza la entrada y salida de eluyente. La preparación de las columnas, así como el proceso cromatográfico completo se llevaron a cabo en cámara fría a 4°C.

Una vez fijado el émbolo inferior de la columna se dispuso ésta verticalmente y se conectó su salida a una bomba peristáltica (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia Fine Chemicals) para mantener constante el flujo. Se adicionó por el extremo superior agua destilada previamente desgasada hasta llenar la tercera parte del volumen de la columna, procurando que no quede atrapada ninguna burbuja de aire en la placa porosa del émbolo. La columna se dejó drenar a un flujo lento (0.2 ml. min^{-1}) y se fue añadiendo entonces la suspensión de gel, continuándose la adición hasta conseguir la altura deseada. Es muy importante evitar la penetración o formación de burbujas de aire en el interior de la columna, así como procurar un empaquetamiento de la misma totalmente homogéneo. Una vez alcanzada la altura deseada, se dejó una pequeña capa de agua destilada sobre la parte superior del gel, se cerró la salida inferior y se terminó el montaje introduciendo el émbolo superior hasta que la placa porosa del mismo contactase con la superficie del gel. Conectada a este émbolo hay una válvula de tres vías. Una vez comprobada la ausencia de burbujas a lo largo de los conductos de entrada se sumergió uno de los extremos en el reservorio de tampón utilizado como eluyente, mientras que el otro extremo, que también debe carecer de burbujas de aire, se empleó para introducir la muestra.

Para estabilizar la columna se hizo pasar, estando la válvula de tres vías en la posición correspondiente, 500 ml del tampón usado como eluyente, en nuestro caso Tris-HCl 10 mM, pH 8, previamente desgasado, a un flujo de 1 ml cada 5 min. De esta forma la columna quedó estabilizada y podía recibir la muestra.

MATERIAL Y METODOS

Este proceso descrito es el seguido en el caso de Sephadex, pero en el caso de la columna de Sephacryl el montaje es mucho más cómodo debido a la rigidez del gel que permite, gracias al uso de un reservorio en el extremo superior de la columna, una compactación más mecánica y menos vigilada.

De esta manera, el gel suministrado se decantó y se lavó sucesivas veces usando el tampón de elución. Posteriormente, tras ser desgasado, se decantó de nuevo hasta formar una masa más o menos espesa que se vertió en la columna con el reservorio incorporado, previamente llena en un décimo de su volumen con tampón. Tras dejar reposar el gel cinco minutos se añadió tampón con cuidado de no remover el gel, se tapó el reservorio y se conectó a la bomba peristáltica, pasando tampón a flujo directo de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ en una cantidad doble al volumen de la columna. Transcurrido este tiempo, se colocó el émbolo superior rozando la superficie del gel y se pasaron otros dos volúmenes de tampón a flujo inverso también de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Una vez realizado esto la columna está lista para ser utilizada.

8.3. Aplicación y elución de la muestra

La muestra fue colocada en un pequeño reservorio de muestras y mediante la válvula de tres vías, la bomba peristáltica y al flujo antes indicado, se hizo pasar la cantidad deseada de muestra, que normalmente fue de 8 ml en el caso de la columna de Sephadex G-200 y de 3 ml para la columna de Sephacryl S-200. Después se giró la válvula de tres vías y se comenzó la elución de la columna con el tampón correspondiente, recogiendo fracciones de 4 ml (Sephadex G-200) o 3 ml (Sephacryl S-200).

MATERIAL Y METODOS

8.4. Medida del contenido proteico de las fracciones

El contenido proteico de las fracciones se determinó midiendo su absorción a 280 nm en un espectrofotómetro Hitachi. En algunos casos en que se quiso determinar la concentración de proteínas de alguna de las fracciones se utilizó el método de Bradford (1976).

Para conocer las fracciones en las que aparecían las distintas actividades desoxirribonucleásicas se le realizó un ensayo de actividad a cada uno de los tubos recogidos en los que se había detectado absorbancia a 280 nm.

9. PURIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

9.1. Precipitación con sulfato amónico

Se usaron alícuotas de diez mililitros de muestra y se añadió sulfato amónico en frío y lentamente hasta alcanzar saturaciones de 40, 50, 60 y 70%. Se dejó media hora en agitación y otra media hora en reposo, y posteriormente se centrifugó a 4000xg durante 20 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 5 ml y tanto sobrenadantes como sedimentos se dejaron dializando durante toda la noche frente tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 conteniendo MgCl₂ 10 mM.

9.2. Elección de los tampones utilizados para cromatografía de intercambio iónico

Si el tampón elegido para la cromatografía contiene una carga opuesta a la de los grupos funcionales del gel a utilizar, tomarán parte en el proceso de intercambio de iones y causarán alteraciones locales en el pH. Es preferible, por tanto, utilizar tampones catiónicos para los intercambiadores de aniones y aniónicos para los intercambiadores de cationes.

De acuerdo con esto, se emplearon los tampones fosfato sódico para el intercambiador de cationes Carboximetil-Sephadex

MATERIAL Y METODOS

C-25 (Pharmacia Fine Chemicals) y Tris-HCl para el intercambiador de aniones Dietilaminoetil-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals)

9.3. Estimación del punto isoelectrico de las muestras

Para poder elegir el pH inicial idóneo así como el gradiente necesario para la cromatografía de intercambio iónico, fue necesario previamente determinar el punto isoelectrico de las nucleasas.

Para ello, se colocó una serie de tubos con 0.1 g de intercambiador de iones tanto aniónico como catiónico. El gel se equilibró en cada tubo hasta alcanzar un pH diferente, lavando diez veces con diez mililitros del correspondiente tampón 0.5 M. Se utilizó un rango de pH de 5 a 9 para el intercambiador de aniones y de 4 a 8 para el intercambiador de cationes, con intervalos de media unidad de pH entre cada tubo.

El gel se equilibró posteriormente con una fuerza iónica menor (0.05 M) lavando cinco veces con 10 ml de tampón del mismo pH pero menor fuerza iónica.

Tras retirar el tampón del último lavado, se añadió una cantidad conocida y constante de muestra a cada tubo, se mezcló con el gel durante 5-10 minutos y se dejó sedimentar el gel. Tras lograr esto, se ensayó el sobrenadante. Si el sobrenadante mostraba actividad indicaba que el enzima no había quedado adherido al gel. Si, por el contrario, no había actividad indicaba que el enzima se había adherido al gel.

MATERIAL Y METODOS

Paralelamente, se midió la proteína de cada sobrenadante para llevar un control de la cantidad de proteína adherida al gel así como la actividad específica que mostraba el sobrenadante.

9.4. Estimación de la fuerza iónica óptima para cromatografía de intercambio iónico

De igual manera al caso anterior, se utilizaron tubos con 0.1 g de intercambiador de iones tanto catiónico como aniónico. Se equilibraron con el correspondiente tampón 0.5 M al pH seleccionado de forma que la sustancia quede retenida en el gel, lavando diez veces con 10 ml de tampón.

Posteriormente, el gel se equilibró en cada tubo hasta una fuerza iónica diferente usando un rango desde 0.05 hasta 0.5 de NaCl, lavando cinco veces con 10 ml de tampón y guardando intervalos de 0.05 M de NaCl.

Se añadió muestra y se ensayó el sobrenadante como se ha descrito previamente.

9.5. Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH

Se realizó utilizando DEAE-Sephadex A-25. El gel fue hinchado con exceso de tampón Tris-HCl 25 mM pH 9, conteniendo MgCl₂ 10 mM, mediante baño en agua hirviendo durante 1 hora. En estas condiciones un gramo de gel proporciona unos 5 ml de volumen de lecho.

MATERIAL Y METODOS

El gel se empaquetó en una columna de vidrio de 40x1 cm (Pharmacia Fine Chemicals) y fue lavado con el mismo tampón. Posteriormente se aplicó la muestra y se hizo pasar, mediante un mezclador de gradientes (Pharmacia Fine Chemicals) el tampón anterior con un pH variable de 9 a 7. El flujo aplicado fue de 1 ml.min⁻¹, obteniéndose fracciones de 3 ml por tubo.

9.6. Cromatografía de intercambio iónico con elución isocrática

Se utilizó tanto con DEAE-Sephadex A-25 como con CM-Sephadex C-25. Los geles se mantuvieron en agua hirviendo durante 1 hora con un exceso de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7 con MgCl₂ 10 mM para el primero y tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.3, conteniendo MgCl₂.

Tras empaquetar los geles en columnas de 40x1 cm (Pharmacia Fine Chemicals), se aplicó la muestra y se eluyó con el mismo tampón indicado a un flujo de 1 ml.min⁻¹, recogiendo fracciones de 3 ml por tubo.

9.7. Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica

Se aplicó a una columna de 40x1 cm (Pharmacia Fine Chemicals) empaquetada con gel CM-Sephadex C-25, hinchado como se ha indicado previamente con tampón fosfato sódico 10 mM pH 7, con MnCl₂ 10 mM. Tras aplicar la muestra se pasó un volumen de este tampón y posteriormente se eluyó con el mismo tampón con una concentración de sales creciente de 0.05 a 0.25 M de NaCl mediante el mezclador de gradientes.

Todas las columnas eran regeneradas mediante una solución 2 M de NaCl₂ en agua destilada.

10. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

10.1. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida con SDS

A fin de comprobar la homogeneidad de cada una de las fracciones obtenidas en cada etapa del proceso de purificación así como la determinación del peso molecular de los enzimas, se llevaron a cabo diferentes electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Se utilizaron geles con un 5.6% de acrilamida y un 0.2% de bisacrilamida en tampón NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 0.1 M pH 7. Una vez disueltos los componentes, la mezcla fue filtrada y posteriormente desgasada al vacío durante 10 minutos. Después se añadió, a partir de una solución madre, SDS hasta una concentración final del 0.1%. La gelificación se realizó utilizando como catalizadores dimetilaminopropionitrilo al 0.0025% y persulfato amónico reciente al 0.02% e inmediatamente el gel fue vertido en tubos de Pyrex de 10x0.6 cm y cubierto con unas gotas del tampón en que fue preparado para evitar la formación del menisco y el contacto del aire. El gel fue dejado en reposo durante una noche. El tampón de los electrodos consistía en el tampón base adicionado con SDS al 0.1%.

Las muestras, con una concentración aproximada de 0.3 mg.ml^{-1} de proteína, se calentaron a 100°C durante 5 minutos en la siguiente solución: SDS 1%, β -mercaptoetanol 1%, NaH_2PO_4 - NaH_2PO_4 0.01 M pH 7. Tras este tratamiento, se adicionó a cada muestra azul de bromofenol al 0.02% en glicerol 10%. El azul de bromofenol fue utilizado como indicador del frente de la electroforesis. El volumen de muestra aplicado a cada gel fue de 50 μl .

MATERIAL Y METODOS

Los geles fueron sometidos a una preelectroforesis durante 30 minutos aplicando una corriente constante de 3 mA por gel. Para el desarrollo de la electroforesis se aplicó una corriente constante 7 mA por gel durante 3-5 horas, hasta que el indicador del frente alcanzó el extremo terminal del gel. La fijación y tinción se realizaron de forma simultánea por inmersión en metanol:acético:agua (5:1:5) con azul Coomassie G-250 (0.025%) durante 5 horas. La decoloración se llevó a cabo mediante sucesivos lavados con metanol:acético:agua (5:7.5:87.5).

El análisis por densitometria de los geles fue realizado en un Procesador de Imágenes IBAS 2000 Kontron con toma de imagen por cámara de vídeo e impresión por Video HardCopy. El análisis densitométrico se basa en un barrido de 500 puntos de la imagen tomada en vídeo. Este procesado fue llevado a cabo en el Servicio de Análisis de Imágenes de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

10.2. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida para la detección de nucleasas

Esta electroforesis se basa en un método de tinción negativa (Martin *et al*, 1986) en el que se tiñe el ADN presente en los geles excepto allí donde es degradado por la nucleasa, quedando una banda sin tefir.

La electroforesis se realiza como en el caso anterior con la salvedad de que ningún componente lleva SDS, las muestras no hierven previamente y el desarrollo tiene lugar a 4°C. Tras la electroforesis, los geles son sumergidos en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8, conteniendo MgCl₂ 100 mM, CaCl₂ 100 mM con ADN a 600 µg.ml⁻¹

MATERIAL Y METODOS

durante 30 minutos a 32°C. Transcurrido este tiempo se reemplaza la solución por tampón sin sustrato durante 1.5 h a 32°C.

La tinción se realiza con una solución de acetato sódico/ácido acético 0.4 M y azul de metileno al 2% (p/v) durante 15 minutos. Los geles se destiñen con agua durante, por lo menos, una noche.

10.3. Electroforesis en gel de agarosa para ADN

Se realizó al 1% de agarosa, en tampón Tris-Borato-EDTA (89 mM:89 mM:2.5 mM). Tras fundirse durante 5 minutos en el autoclave, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar.

La muestra control consistió en 5 µl de pBR322 (500 ng/µl, Boehringer Mannheim) + 20 µl de tampón Tris-HCl 10 mM con MgCl₂ o MnCl₂ 10 mM según la muestra a ensayar. El resto de las muestras contenía 10 µl de la DNasa problema, 10 µl de tampón de ensayo y 5 µl de ADN.

Las muestras se incubaron a las temperaturas óptimas de las nucleasas. La reacción se detuvo con 5 µl de SDS al 5% y 10 µl de la solución de carga, consistente en sacarosa al 40%, azul de bromofenol al 0.25%, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8. Tras la adición, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo.

Una vez colocado el gel en la cubeta de electroforesis, el tampón debe quedar unos 3 mm por encima del gel. Se colocaron las muestras (5 µl de cada una en cada pocillo) y se sometieron a una corriente de 100 voltios (voltaje constante).

MATERIAL Y METODOS

La tinción se realizó con una solución de bromuro de etidio en agua destilada a razón de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. El gel se sumergió en la solución durante unos 15 minutos, preferiblemente en la oscuridad. Posteriormente se observó con un transiluminador Spectroline[®], modelo TS-302, Ultravioleta 302 nm y fue fotografiado utilizando una película Kodak TRI-X Pan 400 ASA.

11. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN

11.1. Determinación del tamaño molecular mediante Sephacryl S-200

Se utilizó la columna de Sephacryl S-200 en las condiciones anteriormente indicadas. La calibración de la columna fue realizada calculando el volumen vacío (V_0), el volumen total (V_t) y el volumen de elución de cada muestra (V_e). Conocidos estos datos, podemos determinar K_{av} , que representa la fracción del volumen estacionario del gel disponible para la difusión de una especie molecular dada, mediante la expresión $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$.

Los patrones de peso molecular utilizados fueron: albúmina de suero bovino (66 Kd), anhidrasa carbónica de eritrocito de carnero (29 Kd) y citrocromo c de corazón de caballo (12.4 Kd). Estos patrones (procedentes de un kit de Sigma) se aplicaron a la columna a una concentración de 0.4 mg.ml^{-1} .

11.2. Determinación del tamaño molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Se utilizaron como patrones proteínas de un kit suministrado por Boehringer Mannheim para este fin, que contiene α_2 -macroglobulina (340 Kd), fosforilasa b (97.4 Kd), glutamato deshidrogenasa (55.4 Kd), lactato deshidrogenasa (36.5 Kd) e inhibidor de tripsina (20.1 Kd). Una vez realizada la electroforesis, se determinó la movilidad relativa (R_f) de cada molécula mediante la expresión

$$R_f = (P_d/L_d) \cdot (L_a/F_a)$$

MATERIAL Y METODOS

siendo Pd la distancia de migración de la proteína, La la longitud del gel antes de la tinción, Ld la longitud del gel despues de la tinción, y Fa la distancia de migración del frente antes de la tinción.

Se representaron en abscisas las movilidades relativas y en ordenadas los logaritmos de los pesos moleculares.

11.3. Estudio del efecto de inhibidores

El efecto de los inhibidores se estudió añadiendo el producto elegido, a la concentración elegida, en el tampón de ensayo.

De esta forma se utilizaron carbodiimida (CYA, Sigma) que reacciona preferentemente con grupos carboxilos dando lugar a grupos amida, a una concentración de 100 mM; N-etilmaleimida (NEM, Fluka) que reacciona con grupos sulfidrilos a una concentración de 100 mM; y ácido aurintricarboxílico (ATA, Sigma) que impide la unión de la proteína al ácido nucleico, a una concentración de 30 mM.

12. ESTUDIOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

12.1. Respecto a la concentración de sustrato

Los estudios de la cinética enzimática con respecto a la concentración de sustrato, se estudiaron relacionando la velocidad de la reacción (considerada como μg de ADN degradados en una hora de incubación) con la concentración de sustrato.

Para ello se incubó una muestra de enzima determinada y constante, en sus condiciones óptimas de ensayo y en presencia de distintas concentraciones de ADN de salmón (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). La concentración de la muestra fue elegida de forma que la actividad del enzima fuera óptima y siempre actuara dentro de los niveles en que la A_{600} es lineal con respecto a la concentración de ADN valorado. Para asegurar una mayor exactitud, en cada ensayo se realizó paralelamente una recta patrón para la valoración del ADN mediante el método de la difenilamina.

Una vez obtenidos los valores necesarios se representó la velocidad de la reacción en ordenadas y la concentración de sustrato en abcisas. Para una velocidad inicial igual a la mitad de la velocidad máxima, a partir de la ecuación

$$V_0 = V_{\text{máx}} [S]/(K_m + [S])$$

se obtiene que $K_m = [S]$.

MATERIAL Y METODOS

12.2. Respecto al tiempo

Los estudios cinéticos con respecto al tiempo se realizaron incubando muestra óptima conocida y constante de cada nucleasa durante diferentes periodos de tiempo (0, 2, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos) con los controles necesarios.

Para evitar en lo posible un periodo de adaptación o retraso se realizó un precalentamiento del enzima y del sustrato a la temperatura óptima de ensayo.

Posteriormente, la actividad se representó en ordenadas frente a los tiempos de incubación en abscisas.

13. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN DE LAS NUCLEASAS

13.1. Aislamiento de las fracciones celulares

Para poder realizar este estudio, se puso previamente a punto la técnica para la separación de membranas descrita por para *M. xanthus* (Orndorff y Dworkin, 1980).

De esta manera, 500 ml de cultivo en fase exponencial de *M. coralloides* D se vertieron sobre tubos de centrifuga con un tercio de volumen de hielo picado, y se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió y se lavó con igual volumen de agua destilada helada.

Tras volver a centrifugar, el sedimento se resuspendió hasta alcanzar una concentración de 5×10^9 células.ml⁻¹ en Tris-acetato 10 mM pH 7.8 con sacarosa 0.75 M. Se le añadió lisozima de huevo a una concentración de 300 µg.ml⁻¹ y EDTA 100 mM a pH 7.8 hasta una concentración final de 0.5 mM, y se incubó sobre hielo durante 12-15 horas en agitación.

Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 27000xg durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió suavemente por pipeteo en igual volumen de agua destilada helada y se incubó sobre hielo 30 minutos. En esta operación se obtiene el 99% de esferoplastos.

Los esferoplastos se recogieron centrifugando a 12000xg durante 10 minutos. El sobrenadante corresponde al contenido del espacio periplásmico.

MATERIAL Y METODOS

Posteriormente, el sedimento se resuspendió en dos volúmenes de una solución fría de EDTA 5 mM pH 7.8. Se agitó sobre hielo durante 1 hora hasta que se observó al microscopio la rotura de la práctica totalidad de los esferoplastos.

Una vez conseguido esto se centrifugó a bajas revoluciones para retirar las células no rotas. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 166000xg durante dos horas. El sobrenadante de esta última centrifugación corresponde al protoplasma, mientras que el sedimento corresponde a la fracción de membrana total. Este sedimento se resuspendió suavemente en 1-2 ml de sacarosa al 25% en EDTA 5 mM (pH 7.8) utilizando una jeringa para lograr una mejor homogeneización.

Tras medir la proteína, mediante el método de Bradford (1976), la fracción se diluyó hasta 1 mg.ml^{-1} de proteína y se aplicó a un gradiente de densidad de sacarosa de densidad isopicnica. Este gradiente se realizó en un rotor Beckman SW41 a 98000xg durante 16 horas. Los tubos, de 12 ml, se llenaron con 2 ml de cada suspensión de sacarosa, utilizándose las concentraciones de 70%, 60%, 50%, 40% y 30%. Sobre ellos se aplicó 1 ml de fracción de membrana.

Una vez realizada la centrifugación, el gradiente fue fraccionado pinchando el fondo del tubo y recogiendo 10 gotas por tubo. Dichas fracciones se diluyeron hasta alcanzar 1 ml de volumen y se midió la densidad óptica a 280 nm.

13.2. Caracterización bioquímica de las membranas

Ensayo de las actividades ligadas a la membrana citoplasmática.

Las actividades valoradas fueron NADH deshidrogenasa, D-glucosa deshidrogenasa y etanol deshidrogenasa. El método de valoración fue idéntico en los tres casos, variando tan solo el sustrato de la reacción, que fue respectivamente: NADH 0.3 mM, D-glucosa 100 mM y etanol 100 mM.

En un volumen total de 3 ml, se dispuso de 0.9 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 6.5, 0.1 ml de azida sódica 240 mM; 0.1 ml de diclorofenolindofenol 3 mM, 0.1 ml de sustrato; muestra a ensayar, en un volumen que contuviera 50 ó 100 µg de proteína, y agua destilada hasta completar los 3 ml.

Toda la solución, antes de adicionar la muestra a ensayar, se preincubó a 25°C. Una vez a esta temperatura, se añadió la muestra, se agitó y se midió la disminución de la absorbancia a 600 nm en un minuto.

Medida de la cantidad de lipopolisacáridos.

A una cantidad de muestra conteniendo de 0.2 a 2 mg de proteína se le añadieron 5 ml de ácido tricloroacético frío hasta alcanzar una concentración final del 10%. Tras incubar unos minutos en hielo se centrifugó a 22000xg durante 10 minutos a 4°C.

El precipitado se resuspendió en 0.70 ml de ácido sulfúrico 0.018 N y se hirvió durante 20 minutos. En esta operación se produce la liberación del KDO. De aquí se tomaron 0.20 ml y tras

MATERIAL Y METODOS

añadir 0.25 ml de HIO_4 0.025 N en ácido sulfúrico 0.125 N, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadió 0.5 ml de arseniato sódico al 2% en HCl 0.5 N, se agitó y se dejó reposar 2 minutos tras lo cual se añadieron 2 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.3% a pH 2. Se agitó y se hirvió durante 10 minutos. Tras enfriar, se midió la absorbancia a 548 nm.

13.3. Microscopía electrónica

La preparación del material necesario así como el procesamiento de las muestras para ser examinadas al microscopio electrónico, se llevaron a cabo siguiendo técnicas generales de tinción negativa.

Para la preparación del soporte se han utilizado rejillas de cobre de 300-400 mallas, que eran guardadas en una campana de desecación.

Para la película plástica se ha utilizado el Formvar (polivinil-formol), disuelto al 0.3% en cloroformo para espectroscopía (Merck). La solución se guardó también en una campana de desecación hasta el momento de ser utilizada.

El procedimiento seguido para colocar la película plástica sobre las rejillas fue el siguiente:

Se toma un portaobjetos perfectamente limpio y seco y se sumerge en la solución de Formvar, retirándolo inmediatamente y dejándolo escurrir y secar sobre la solución, en posición vertical; de esta forma se evita que durante el secado absorba humedad y se formen agujeros en la película.

MATERIAL Y METODOS

Seguidamente se cortan los bordes de la película, raspando los bordes del portaobjetos con una cuchilla. Esta operación debe realizarse lo más cuidadosamente posible para evitar que la película se ensucie con partículas de vidrio.

A continuación se pasa a desprender la película del portaobjetos, haciéndola flotar sobre agua destilada. Para ello, se introduce el portaobjetos por su borde de menor longitud, muy lentamente, en el agua vigilando si la película se desprende uniformemente.

Una vez que se tiene la película flotando sobre el agua, se disponen las rejillas sobre ella, más o menos ordenadamente y con la superficie mate en contacto con la película. Finalmente, para extraer la película con las rejillas adheridas, se deposita un trozo de papel de filtro sobre la citada película, dejándolo estar hasta que el agua lo empapa totalmente, y en este momento se saca, depositándolo en una placa de Petri que se deja secar a temperatura ambiente.

La tinción se preparó con ácido fosfotúngstico (PTA) preparado en agua destilada al 2%, ajustando el pH con una solución de KOH al 20% entre 6.5 y 8. Las soluciones de PTK pueden enturbiarse, bien durante su preparación bien con el transcurso del tiempo por lo que es conveniente utilizarlas inmediatamente después de ser preparadas o bien filtrarlas a través de una membrana de Millipore de 0.2 micras, lo que permite su observación durante bastante tiempo.

Posteriormente se depositaron gotas de las suspensiones sobre las rejillas, dejándolas durante dos minutos y retirando a continuación el exceso de líquido con un papel de filtro. De esta

MATERIAL Y METODOS

forma queda sobre la rejilla una fina película de la suspensión que se deja secar al aire, protegida del polvo.

La tinción se realizó de la misma forma que el montaje de la muestra, es decir, se coloca una gota de la solución empleada que se retira con ayuda de un papel de filtro, colocando a continuación una nueva gota que se retira del mismo modo y, por último, se coloca una tercera gota de la que solo se retira el exceso, dejando una capa fina de líquido que se deja secar al aire.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión EM-902 Zeiss, con un voltaje de aceleración de 80 Kv, en la sección de Microscopía Electrónica de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

14. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD DESOXIRIBONUCLEASA DURANTE EL CRECIMIENTO

14.1. Inducción de mixósporas mediante glicerol

A 500 ml de células en fase exponencial se añadió glicerol estéril hasta una concentración final de 0.5 M. Las mixósporas estaban totalmente formadas al cabo de 48 horas.

14.2. Formación de cuerpos fructificantes

Cultivos a mitad de la fase exponencial se concentraron 100 veces en condiciones estériles. Las células de esta suspensión eran transferidas mediante gotas de 50 μ l a placas de agar levadura y CIA. Los cuerpos fructificantes aparecieron en el agar levadura al cabo de 8-10 días.

14.3. Rotura y permeabilización de las células

La rotura de las células se llevó a cabo utilizando una prensa francesa, forzando el paso de la muestra a través de un orificio de 1000 μ m² a una presión de 7000 Kg.cm⁻¹ y manteniendo un flujo de 20-25 ml.min⁻¹.

En el caso de la permeabilización, las células fueron resuspendidas en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7, conteniendo MgCl₂ 10 mM. La suspensión (3 ml) fue tratada con tolueno (Merck) al 10% durante 15 minutos en agitación a 28°C. Tras un lavado en el tampón de incubación del ensayo enzimático, la suspensión permeabilizada

MATERIAL Y METODOS

fue usada inmediatamente en la prueba o conservadas en el mismo tampón a 4°C (durante no más de 24 horas). El volumen se mantuvo constante en 3 ml. Se tomaron 0.5 ml para el ensayo de la actividad DNasa, que se llevó a cabo como era usual.

RESULTADOS

ESTUDIO COMPARATIVO EN DIFERENTES MIXOBACTERIAS

Como paso previo y complementario al estudio propiamente dicho de las nucleasas de *Myxococcus coralloides*, se realizó una búsqueda de actividades desoxirribonucleásicas en diferentes mixobacterias relacionadas con este microorganismo. Aunque se disponía de algunos resultados previos, en este caso se trataba de comprobar, más que la actividad existente en los extractos brutos, el número de fracciones activas que aparecían tras cromatografía en columna así como su posición en el perfil de elución. Este estudio nos permitiría tener una idea de la especificidad o generalidad de cada una de las DNasas de *M. coralloides* D.

Para ello se escogieron cinco razas mixobacterianas: *Myxococcus xanthus* DK101, *Coralloccoccus coralloides* Ccc410, *Myxococcus fulvus* Mxf2, *Myxococcus stipitatus* Mxs2 y *Stigmatella aurantiaca* Sgal.

En todos los casos, el método de extracción fue el comúnmente utilizado para *M. coralloides* D (Figura 1). Siempre se partió de 500 ml de cultivo de 48 h. Las células eran centrifugadas, resuspendidas en 5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 con MgCl₂ 10 mM y rotas en un sonicador Branson Sonic B-12 durante 10 minutos a 50 vatios. Posteriormente se centrifugaron a 40000xg durante 20 minutos para retirar restos celulares. El extracto libre de células se aplicó a una columna de Sephacryl S-200, recogiendo

RESULTADOS

fracciones de 3 ml cada una a un flujo de 1 ml.min⁻¹. A cada fracción se le midió la absorbancia a 280 nm y se valoró la actividad DNasa por el método de la difenilamina expuesto en el capítulo anterior, incubando una hora a 37°C y usando MgCl₂ 10 mM como cofactor.

Las cinco mixobacterias estudiadas mostraron una alta actividad DNasa en los extractos libres de células, mientras que la actividad era nula en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados aparecen expuestos en la Tabla 1, expresados como unidades por miligramo de proteína. Los valores más altos se encontraron en *M. xanthus* DK 101 y *C. coralloides* Ccc410, mientras que *Stigmatella aurantiaca* Sgal, muestra el nivel más bajo de actividad.

Tabla 1. Actividad DNasa en extractos sonicados libres de células de diferentes mixobacterias

| Microorganismo | Actividad |
|------------------------------|-----------|
| <i>S. aurantiaca</i> Sgal | 38.64 |
| <i>M. fulvus</i> Mxf2 | 48.72 |
| <i>C. coralloides</i> Ccc140 | 118.08 |
| <i>M. xanthus</i> DK101 | 118.95 |
| <i>M. stipitatus</i> Mxs2 | 83.02 |
| <i>M. coralloides</i> D | 264.90 |

Cuando los extractos crudos de estas cinco mixobacterias se sometieron a cromatografía a través de columnas de Sephacryl

RESULTADOS

S-200, la actividad DNasa no fue fraccionada en más de un pico (Figuras 2 a 6). Dicha actividad aparecía siempre en el frente de elución, de forma similar a lo que ocurre con la DNasa G de *Myxococcus coralloides* D según veremos más adelante (Figura 8).

RESULTADOS

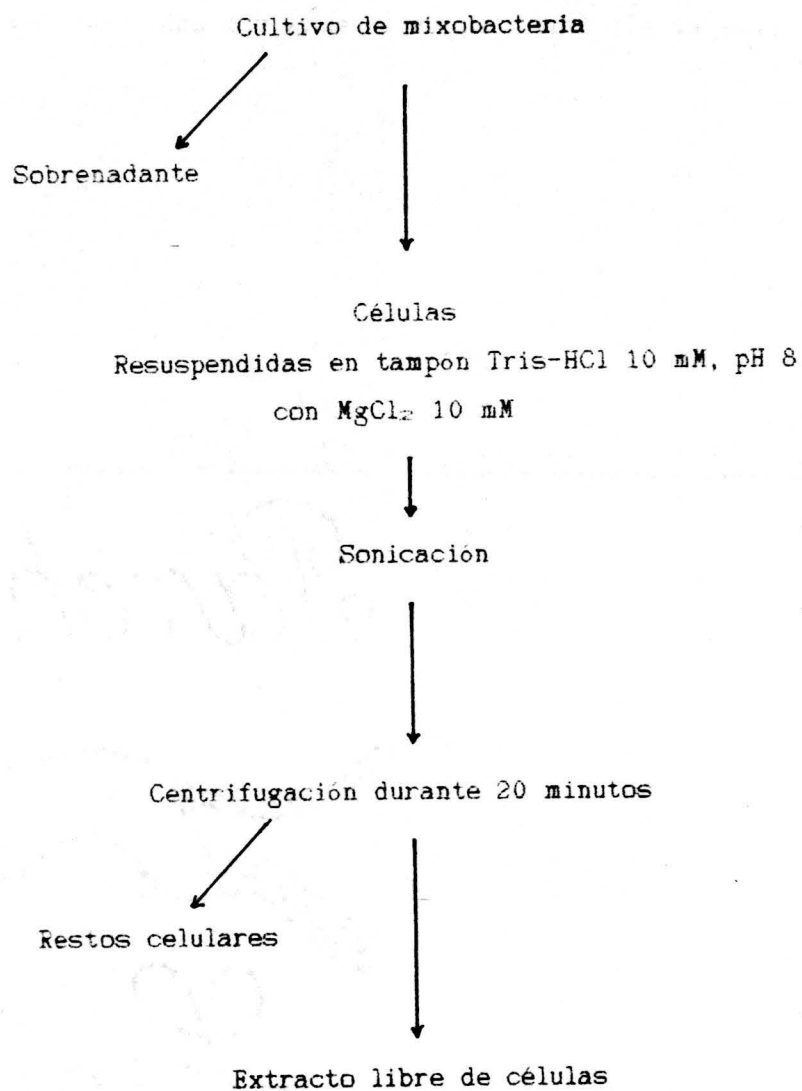


Figura 1. Esquema del proceso seguido en la extracción de DNasas de mixobacterias.

RESULTADOS

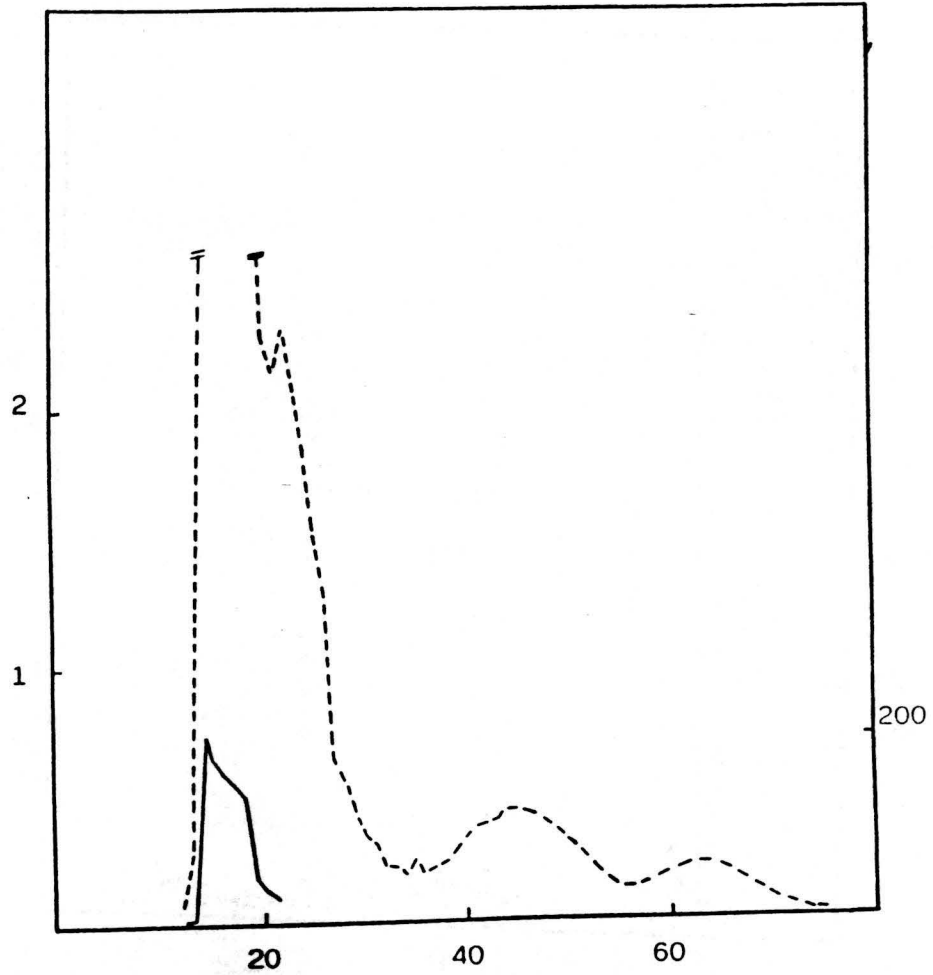


Figura 2. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Stigmatella aurantiaca* Sgal a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

RESULTADOS

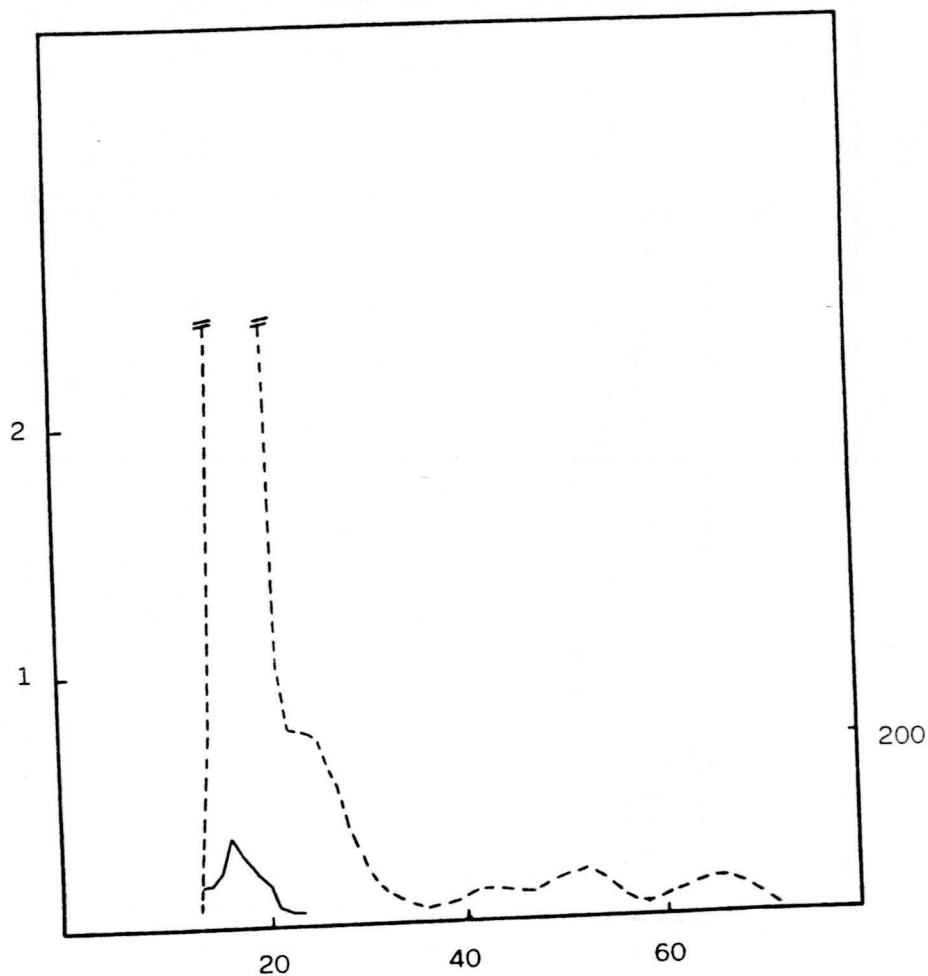


Figura 3. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Myxococcus fulvus* Mxf2 a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

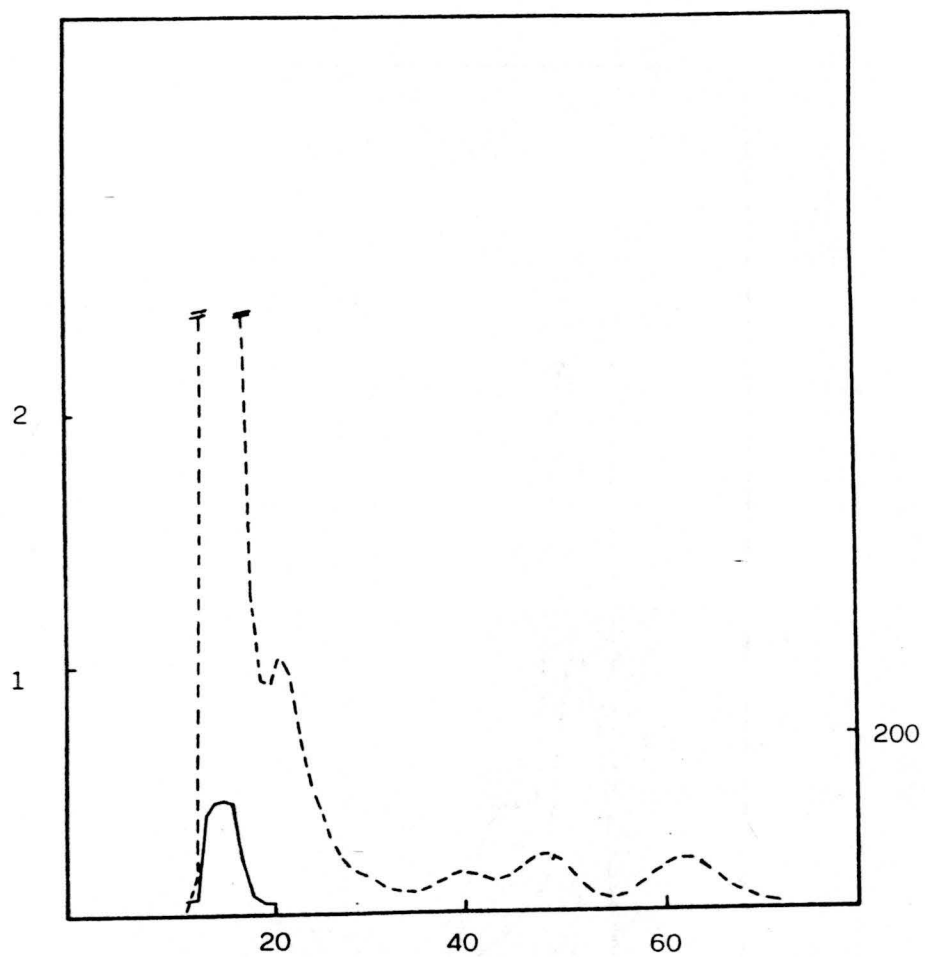


Figura 4. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Coralloccoccus coralloides* Ccc410 a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

RESULTADOS

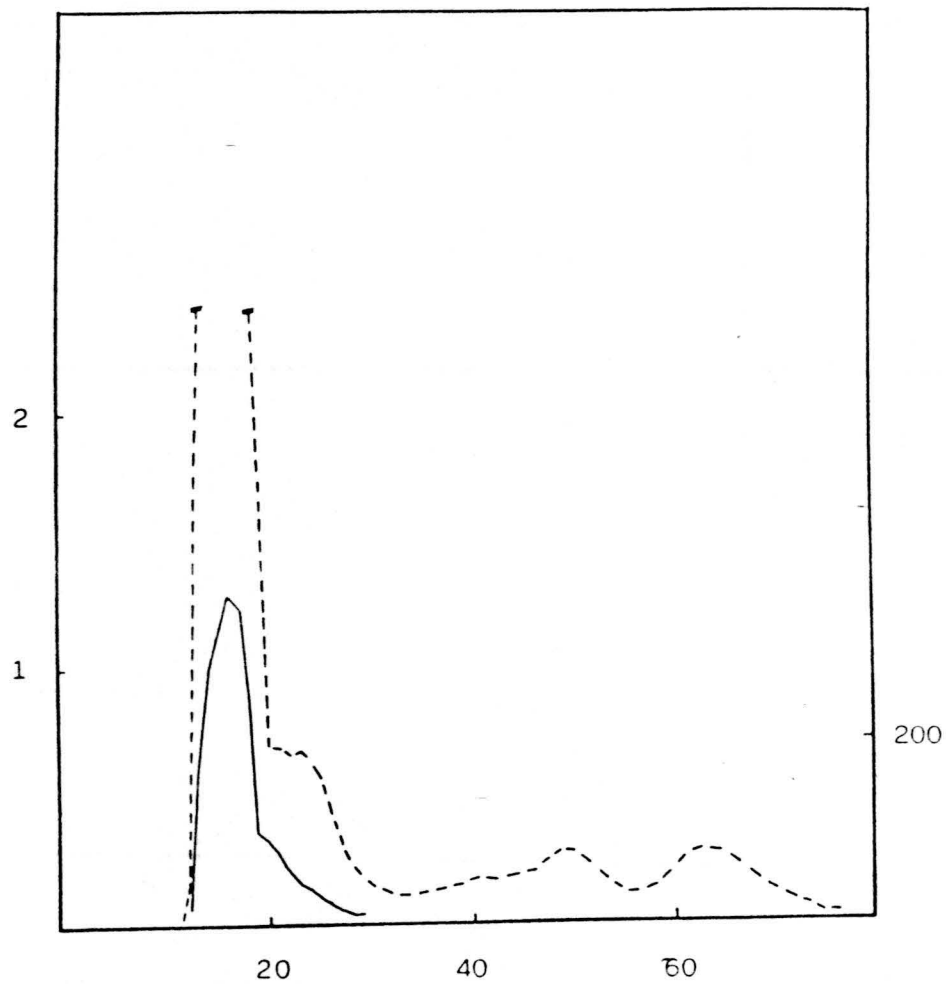


Figura 5. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Myxococcus xanthus* DK101 a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

RESULTADOS

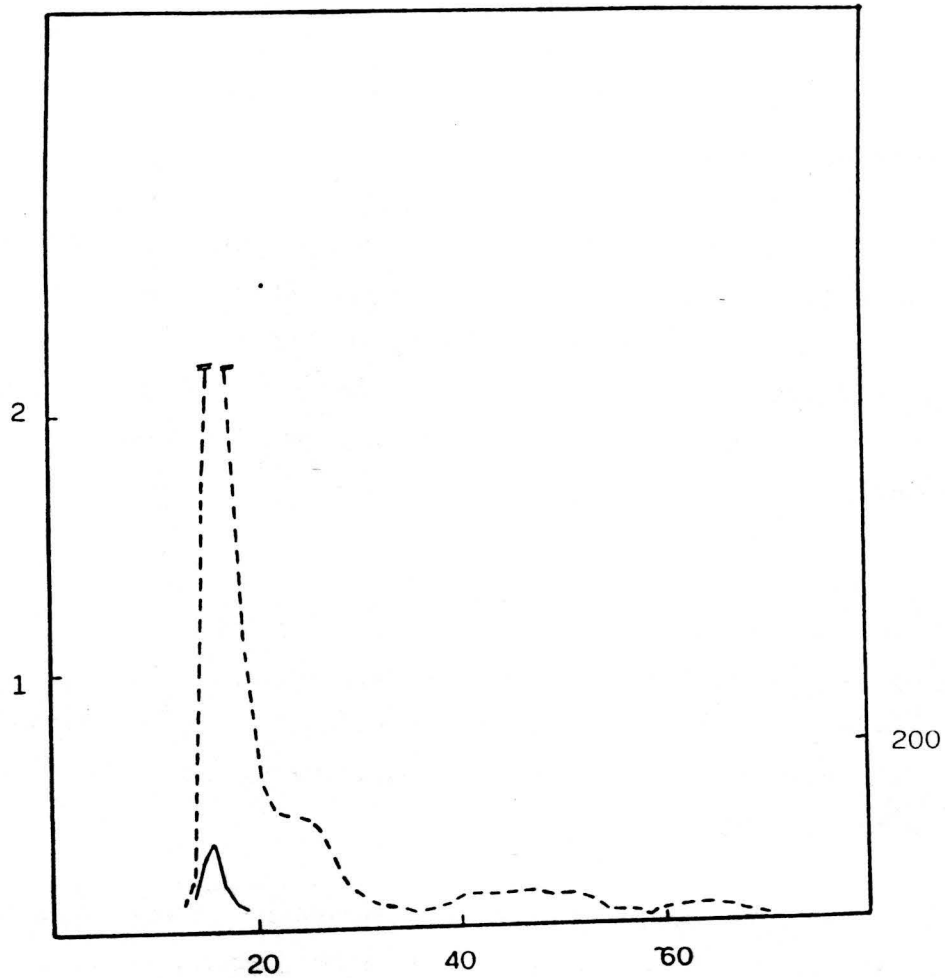


Figura 6. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Myxococcus stipitatus* Mxs2 a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LAS DESOXIRIBONUCLEASAS

Cromatografía en columna

El paso previo inicial necesario para poder separar las actividades DNasas de *M. coralloides* D presentes en el extracto libre de células es el paso por cromatografía en columna. A partir de aquí, la actividad inicial eluye en tres fracciones menores perfectamente delimitadas que permiten su estudio específico e individual.

Para ello se han utilizado dos tipos de geles, cada uno con ventajas e inconvenientes propios. El primero fue Sephadex G-200 que permite una perfecta y completa separación de los enzimas gracias a su lento flujo de elución (5 ml.h^{-1}) y amplio rango de separación. Este gel fue utilizado predominantemente en los estudios de purificación (Fig. 7).

Por otra parte, cuando era necesario obtener muestra fresca con alto nivel de actividad y de forma rápida, se ha usado Sephacryl S-200 que aporta un ventajoso flujo de elución (1 ml.min^{-1}), aunque las muestras presentaban un mayor nivel de proteínas contaminantes (Fig. 8)

Tanto en uno como en otro aparecen claramente diferenciadas tres fracciones activas que, por orden de elución recibieron los nombres de DNasa G, DNasa M y DNasa P.

RESULTADOS

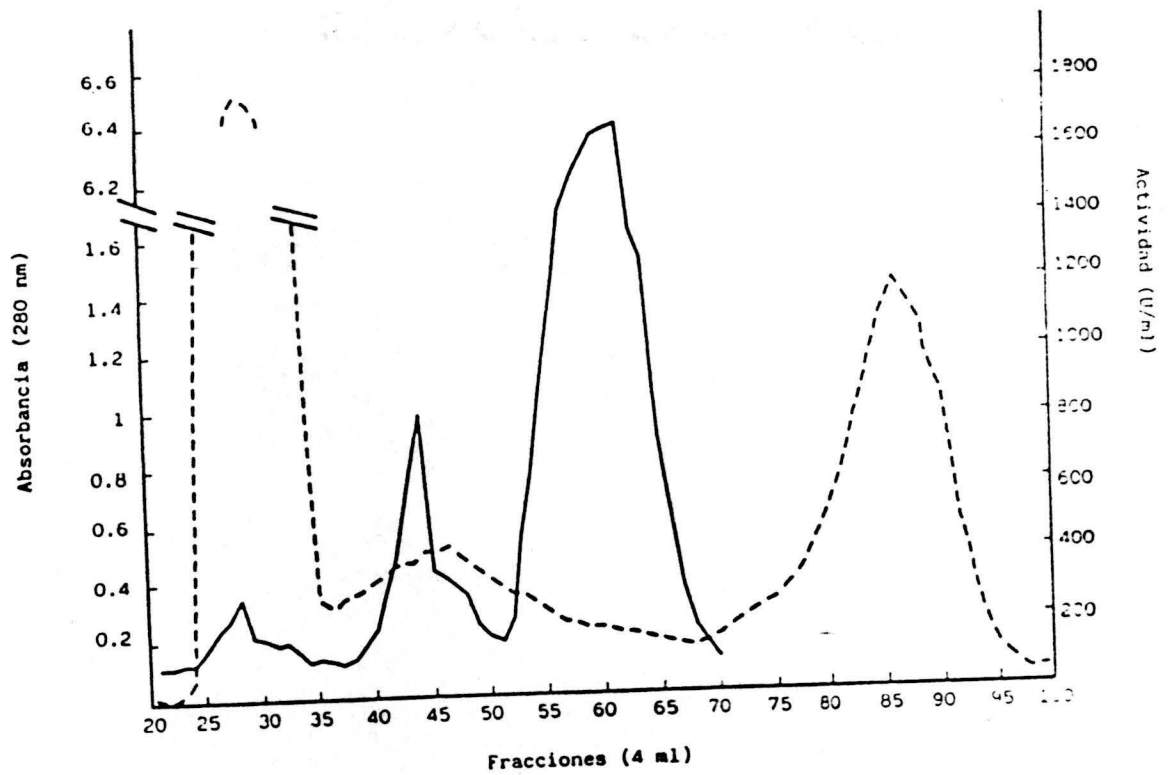
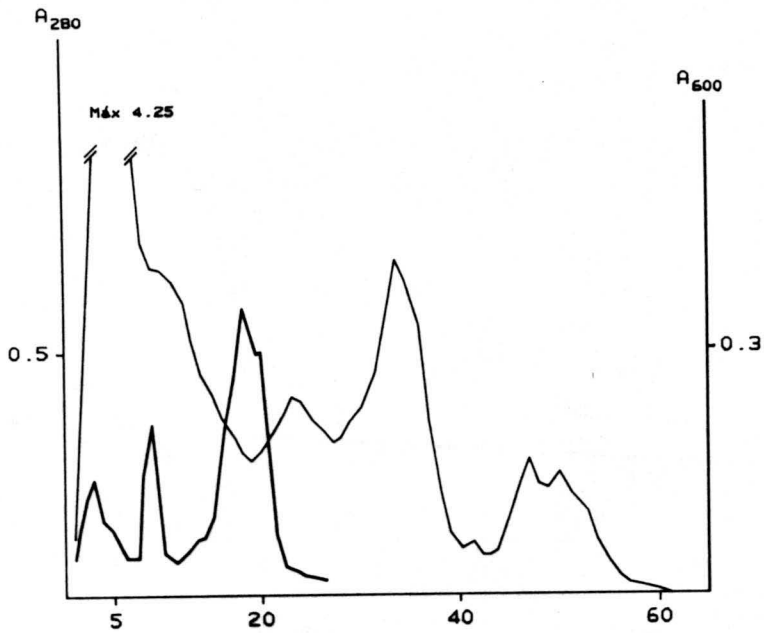


Figura 7. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Myxococcus coralloides* D a través de Sephadex G-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.

RESULTADOS

Figura 8. Fraccionamiento del extracto libre de células de *Myxococcus coralloides* D a través de Sephacryl S-200. --- Absorbancia a 280 nm. — Actividad DNasa de estas fracciones.



Purificación de la DNasa P

Debido a su mayor actividad, el proceso de purificación se comenzó con este enzima (Fig. 9). El primer paso a seguir fue la precipitación con sulfato amónico a diferentes concentraciones, mediante el procedimiento detallado en el capítulo anterior. De especial importancia era una buena diálisis, tanto en el caso de esta nucleasa como en la de mediano tamaño, dada la fuerte sensibilidad a la fuerza iónica que presentan. El mayor nivel de actividad con respecto a la menor cantidad de proteína se obtuvo en el sobrenadante tras precipitar al 70% de saturación, aumentándose la actividad específica del enzima en tres veces con respecto a la actividad obtenida tras cromatografía en columna, que a su vez aparecía 30 veces purificada con respecto al extracto bruto.

Con la muestra obtenida tras dializar el sulfato amónico se estudiaron las condiciones óptimas de desarrollo de una cromatografía en intercambio iónico.

Tras el estudio del punto isoeléctrico, que mostró estar entre 7.5 y 8, se decidió utilizar una cromatografía en DEAE-Sephadex A-25, introduciendo la muestra en la columna con un pH de 9 y eluyendo posteriormente con un gradiente de pH entre 9 y 7 mediante Tris-HCl 25 mM MgCl₂ 10 mM. La elución con un gradiente de fuerza iónica quedaba descartada debido a la razón aducida anteriormente: la poca estabilidad del enzima frente a este factor.

Consecuentemente, la muestra se cromatografió de la manera expuesta con un flujo de 1 ml.min⁻¹, recogiendo fracciones de 5 ml por tubo. La nucleasa quedaba adsorbida al gel eluyendo a un pH ligeramente superior a 7.5, tal como se esperaba. Sin embargo su actividad quedaba netamente disminuída, seguramente debido a la

RESULTADOS

necesidad de usar una fuerza iónica ligeramente más elevada de lo normal con objeto de conseguir el cambio de pH del gel.

Para evitar esto y obtener la mayor actividad posible se decidió invertir la experiencia y aplicar la muestra al gel CM-Sephadex C-25 de forma que la mayor cantidad de proteínas quedara adherida al gel mientras que nuestra proteína eluyera directamente en el frente de elución.

Para ello se volvieron a hacer pruebas con este gel para encontrar el pH óptimo en el cual quedarán adheridas el mayor número posible de proteínas contaminantes. Tras estos estudios, se decidió eluir la columna con tampón fosfato sódico 10 mM a un pH de 7.3.

El resultado de esta elución isocrática fue aún más positivo de lo que se esperaba ya que debido a su pequeño tamaño molecular, el enzima no eluía directamente en el frente sino que quedaba ligeramente retardado, separándose de la mayor parte del resto de proteínas eluyentes (Fig. 10). Se obtuvo 400 veces purificado con respecto al extracto bruto.

Como criterio de pureza, las muestras obtenidas en cada paso se aplicaron a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. En la Figura 11 se muestran los densitogramas correspondientes al extracto bruto, a la muestra obtenida tras Sephadex G-200 así como tras intercambio iónico.

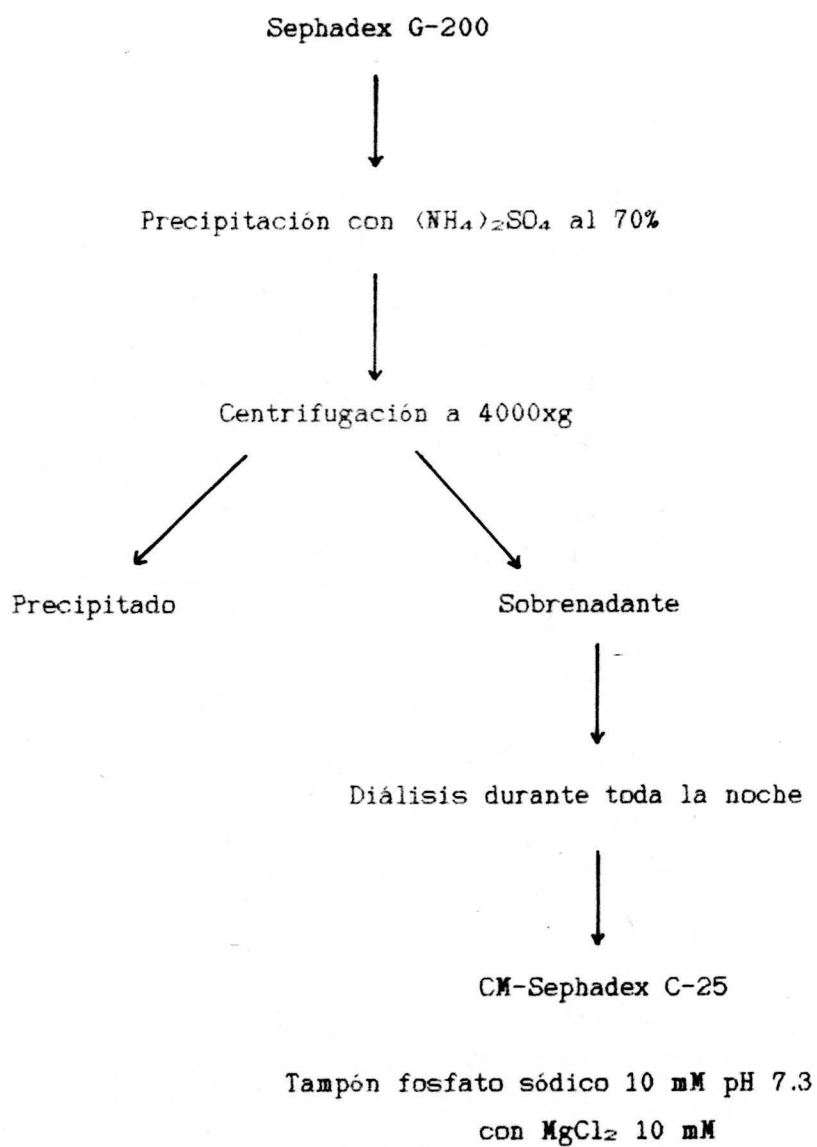


Figura 9. Proceso de purificación de la desoxirribonucleasa P

RESULTADOS

A₂₈₀

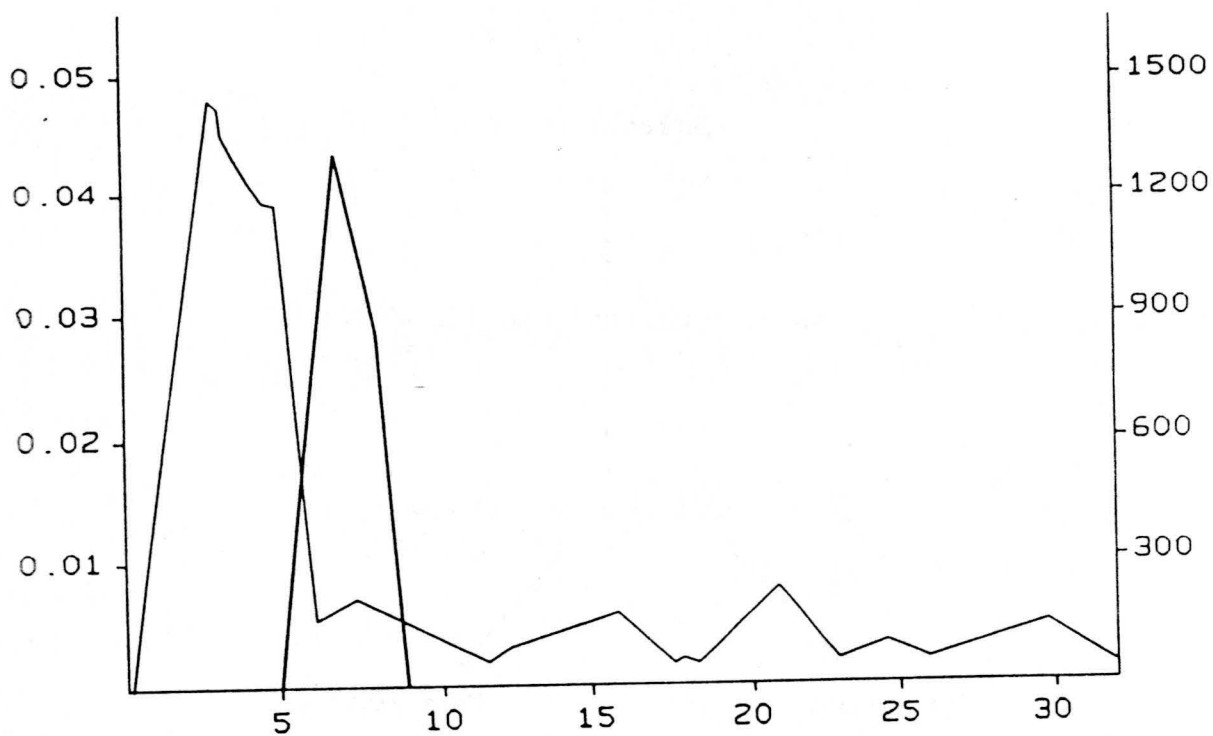


Figura 10. Cromatografía de la DNasa P a través de CM-Sephadex C-25.

RESULTADOS

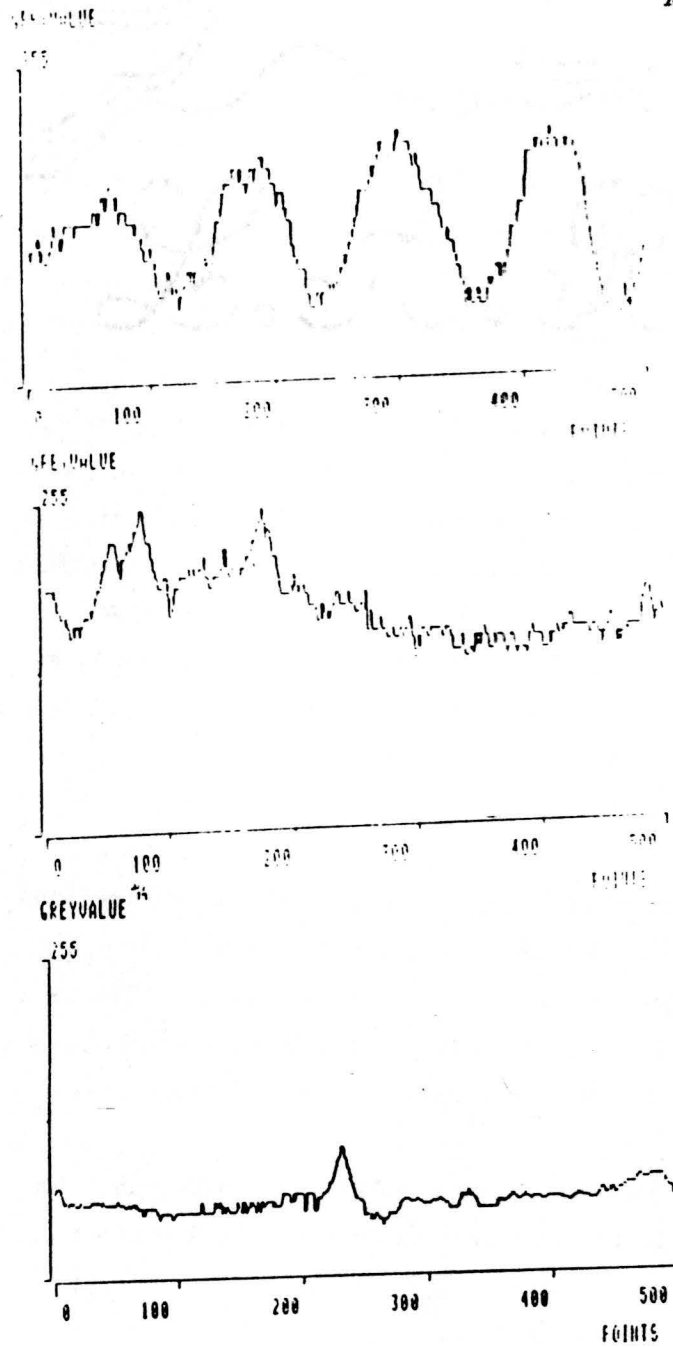


Figura 11.

Densitogramas realizados a los geles de poliacrilamida, tras electroforesis, correspondientes a: (A) Extracto libre de células, (B) Fracciones correspondientes a la actividad DNasa P tras Sephadex G-200, (C) Fracciones con actividad DNasa P tras cromatografía de intercambio iónico.

RESULTADOS

Purificación de la DNasa M

Como en el caso anterior, con esta desoxirribonucleasa se presentaba la dificultad de su inestabilidad frente a la fuerza iónica. El proceso seguido para su purificación fue similar al realizado con la nucleasa P y está representado en la Figura 12.

La precipitación con sulfato amónico resultó óptima al 60% de saturación, quedando la actividad en el sobrenadante. Tras diálisis y por la razón explicada anteriormente, se optó de nuevo por una elución isocrática. Tras las pruebas pertinentes y debido a que la carga neta de esta proteína resultó ser positiva, contrariamente a lo que ocurre con la nucleasa P, se decidió aplicar la muestra a una columna de DEAE-Sephadex A-25 y eluir con tampón Tris-HCl 25 mM pH 7 con $MnCl_2$ (Figura 13).

Esta nucleasa sólo se ha obtenido algo más de unas 50 veces purificada. Sin embargo, al ser sometidas las muestras procedentes de los diferentes pasos de purificación a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la muestra obtenida tras cromatografía en intercambio iónico mostró una sola banda, por lo que no se siguió trabajando en este sentido.

En la Figura 14 se muestran los densitogramas correspondientes al extracto bruto, tras Sephadex G-200 y tras DEAE A-25.

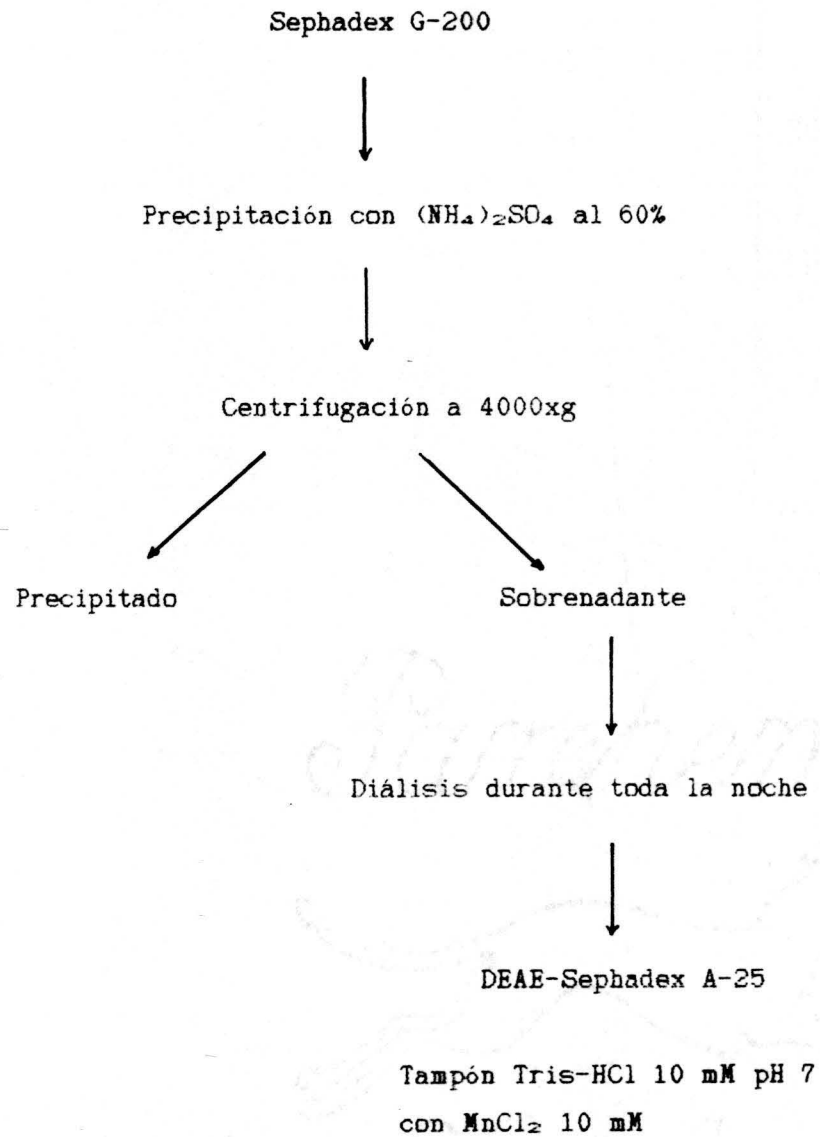


Figura 12. Proceso de purificación de la desoxirribonucleasa M

RESULTADOS

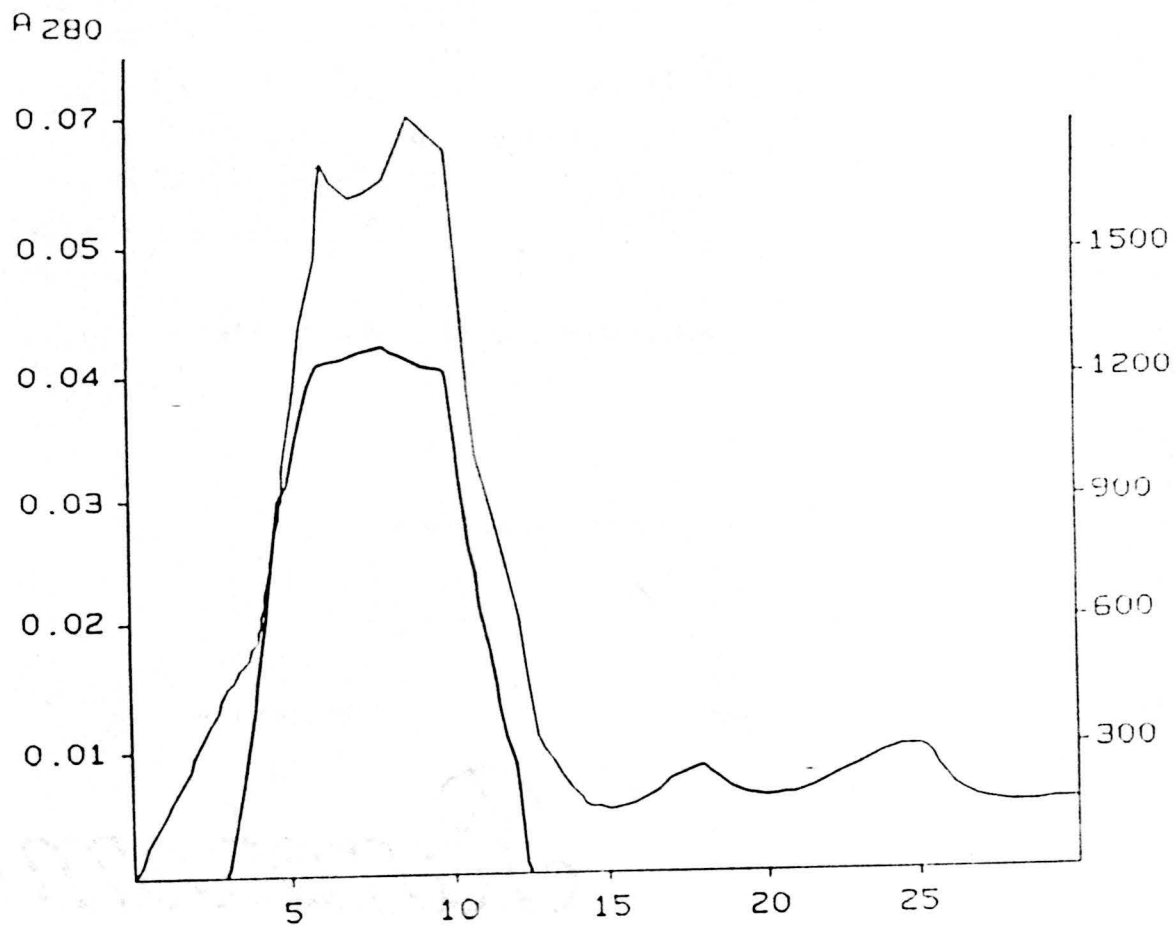


Figura 13. Cromatografía de la nucleasa M a través de DEAE-Sephadex A-25

RESULTADOS

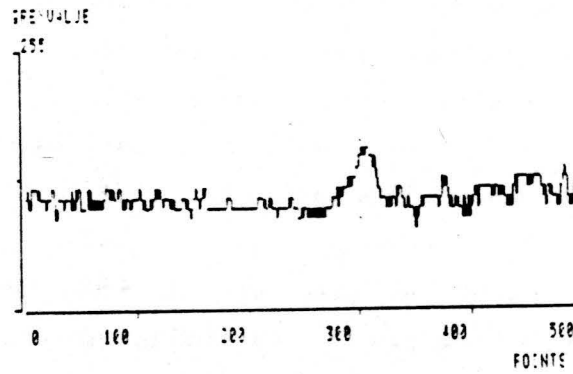
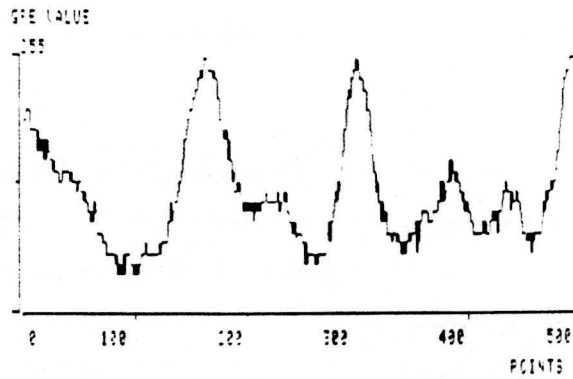
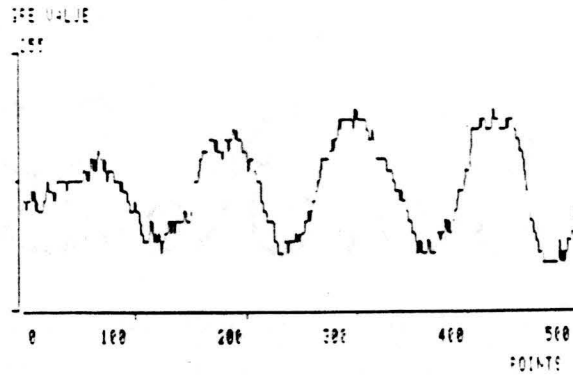


Figura 14. Densitogramas realizados a los geles de poliacrilamida, tras electroforesis, correspondientes a: (A) Extracto libre de células, (B) Fracciones correspondientes a la actividad DNasa M tras Sephadex G-200, (C) Fracciones con actividad DNasa M tras cromatografía de intercambio iónico.

RESULTADOS

Purificación de la DNasa G

Finalmente, la última nucleasa cuya purificación se abordó fue la de mayor tamaño. Los pasos seguidos están representados en la Figura 15.

Los estudios previos realizados precipitando con sulfato amónico indicaron que la saturación al 50% daba los mejores resultados.

Tras dialisis de la muestra se llevaron a cabo los análisis en gel necesarios para determinar las condiciones a elegir en la cromatografía en intercambio iónico. Estas pruebas mostraron que el enzima se mantenía unido al gel CM-Sephadex C-25 hasta un pH de 8 inclusive, mientras que a pH superiores no se adhería. Sin embargo debido a la mayor estabilidad de este enzima con respecto a la fuerza iónica, se decidió intentar la elución de la desoxirribonucleasa mediante un gradiente de NaCl, dado que este gradiente es mucho más lineal y repetitivo que el conseguido en cualquier caso mediante variación del pH. De esta manera se realizaron las pruebas correspondientes y se decidió que el rango 0.05-0.25 M era el óptimo a realizar. De esta manera, la muestra se aplicó a una columna de intercambio iónico CM-Sephadex C-25.

Al realizar el gradiente de NaCl indicado en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7 con $MnCl_2$, el enzima eluyó a una molaridad de alrededor de 0.13 M, obteniéndose unas 150 veces purificado con respecto al extracto bruto (Figura 16).

Como en los casos anteriores, se ha realizado una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. En la figura 17 se muestran los densitogramas realizados a los geles correspondientes a

RESULTADOS

extracto bruto, muestra eluida tras Sephadex G-200 y tras intercambio iónico.

Tabla resumen de los niveles de purificación obtenidos

Como resumen a este apartado de resultados dedicados a la purificación de estos tres enzimas, en la Tabla 2 se presenta un cuadro de los niveles de purificación obtenidos en cada uno de los pasos realizados y para cada una de las tres desoxirribonucleasas.

Se puede observar que la nucleasa que multiplica en mayor grado su actividad específica es la de menor tamaño, alcanzando un nivel de purificación de 400 veces con respecto al extracto bruto. La DNasa M, por el contrario, es la que multiplica su actividad un numero de veces menor (50).

Sin embargo, en los tres casos, como se ha expuesto con anterioridad, independientemente de los niveles de actividad específica alcanzados, se ha obtenido una sola banda tras electroforesis en gel de poliacrilamida, indicando un alto nivel de pureza.

RESULTADOS

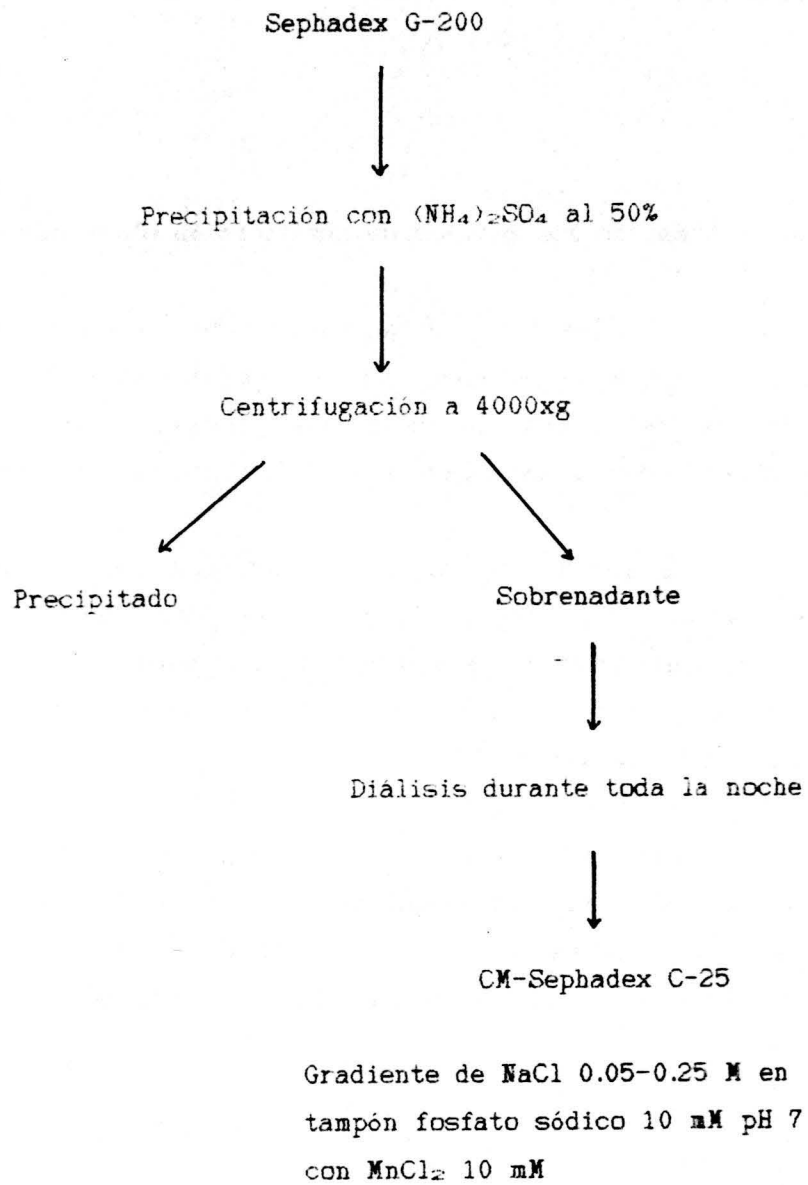


Figura 15. Proceso de purificación de la desoxirribonucleasa G

RESULTADOS

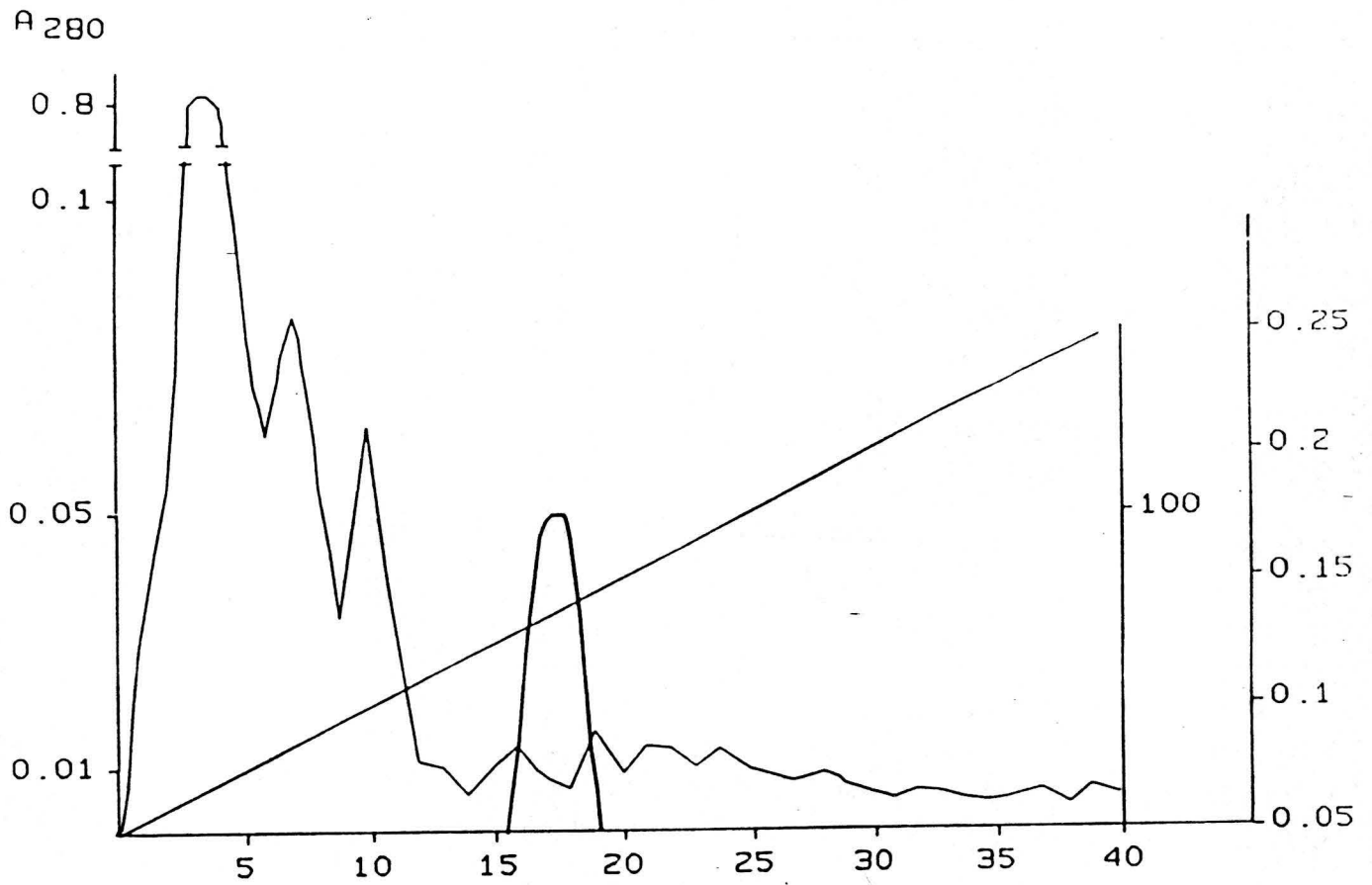


Figura 16. Cromatografía de la DNasa G a través de CM-Sephadex C-25.

RESULTADOS

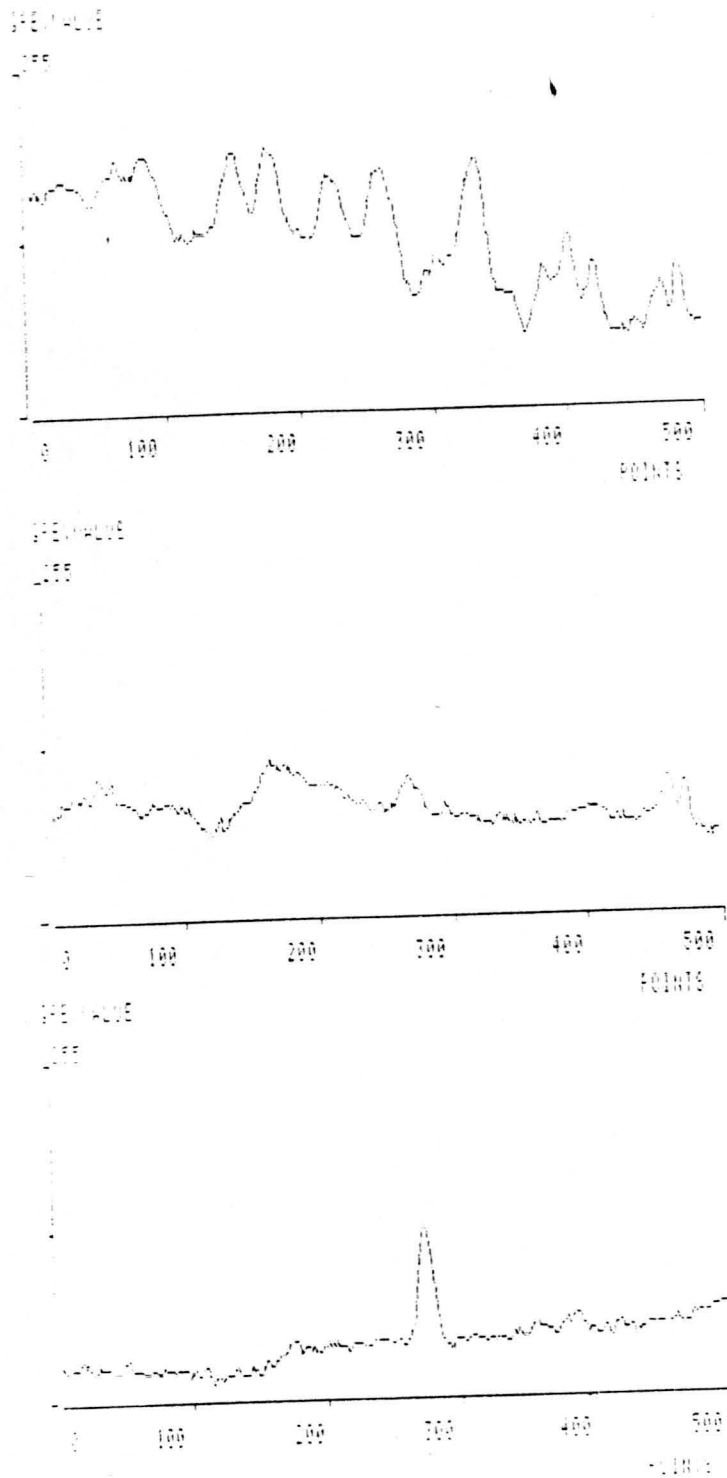


Figura 17.

Densitogramas realizados a los geles de poliacrilamida, tras electroforesis, correspondientes a: (A) Extracto libre de células, (B) Fracciones correspondientes a la actividad DNasa G tras Sephadex G-200, (C) Fracciones con actividad DNasa G tras cromatografía de intercambio iónico.

RESULTADOS

Tabla 2. Resumen de los niveles de purificación obtenidos. Los resultados están expresados como el número de veces que se multiplica la actividad específica con respecto al extracto libre de células.

| DNasa | G | M | P |
|------------------------------|-----|----|-----|
| Extracto libre de células | 1 | 1 | 1 |
| Sephadex G-200 | 3 | 10 | 30 |
| Sulfato amónico | 10 | 12 | 90 |
| Intercambio iónico | 150 | 50 | 400 |

RESULTADOS

ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN

Determinación del tamaño molecular

a) Determinación del tamaño molecular mediante cromatografía en Sephacryl S-200

Aunque la separación de las macromoléculas a través de la cromatografía de exclusión molecular se realiza en función de su tamaño en condiciones nativas, más que de su peso molecular, para un primer acercamiento a este en estos tres enzimas se utilizó la elución a través de una cromatografía en columna de Sephacryl S-200. La calibración de la columna se realizó utilizando proteínas de peso molecular diferente y conocido, de la forma indicada en el capítulo de Material y Métodos.

En la Figura 18 se representa la recta que relaciona los K_{av} de elución con un determinado peso molecular. Mediante esta recta, por extrapolación, se obtuvo un peso molecular de alrededor de 31000 daltons para la DNasa P y de 44000 para la DNasa M, indicados mediante una flecha en la figura.

En el caso de la DNasa de mayor tamaño y dado que aparece en el frente de la elución proteica, solo se pudo afirmar que su peso molecular excedía el rango de separación presentado por la columna de Sephacryl S-200 que va desde 5000 a 250000 daltons. Dado que también eluye en los primeros tubos tras cromatografía en Sephadex G-200, cuyo rango de separación es mayor (hasta 600000 daltons), se pudo afirmar que, aparentemente o al menos en condiciones nativas, el peso molecular de la DNasa G excede a los 600000 daltons.

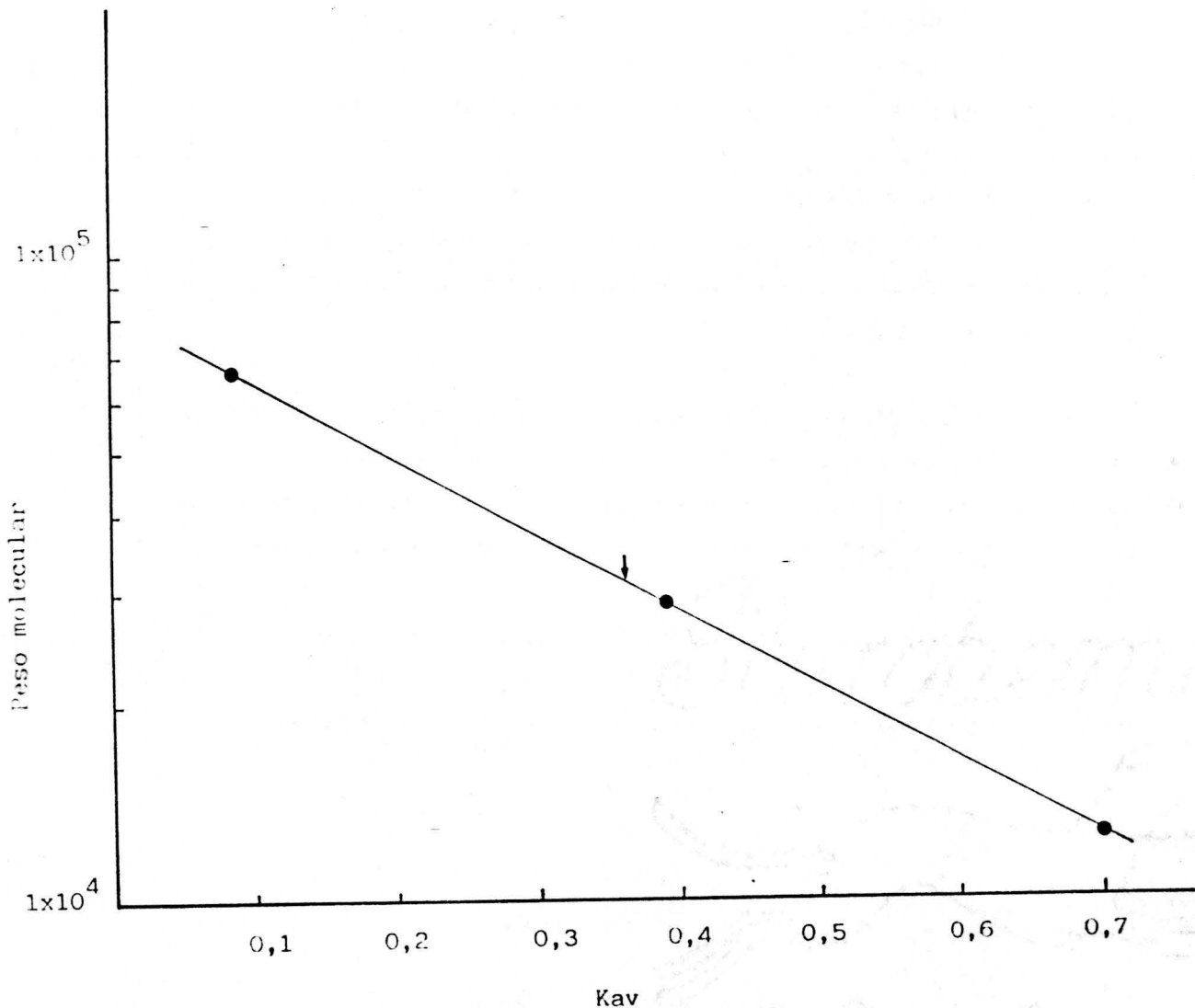


Figura 18. Determinación del tamaño molecular de las nucleasas de *Myxococcus coralloides* D mediante filtración en Sephacryl S-200. Los patrones utilizados fueron: albúmina bovina sérica (66 Kd), anhidrasa carbónica de eritrocito de carnero (29 Kd) y citocromo c de corazón de caballo (12.4 Kd). Las flechas indican la posición de la DNasa M (mayor tamaño) y la DNasa P (tamaño menor).

RESULTADOS

b) Determinación del tamaño molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Un segundo paso más definitivo en el conocimiento del peso molecular de estos tres enzimas fue mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS. Dado que se había obtenido una sola banda tras cromatografía de la muestra obtenida a través de intercambio iónico, pudo aplicarse una recta patrón obtenida como se explica en el capítulo anterior y que relaciona la movilidad relativa de cada proteína (R_f) con su peso molecular.

Para ello se utilizó el kit de proteínas que dio lugar a la recta representada en la Figura 19. Las nucleasas M y P mostraron un peso molecular similar al obtenido mediante cromatografía en Sephacryl S-200 (39000 daltons para la nucleasa P y 49000 para la nucleasa M). Sin embargo, la DNasa G, con un peso molecular de 44000, se aleja bastante del presumido al eluir en el frente proteico de la columna de Sephacryl S-200 (200000) y aún mucho más de aquél obtenido mediante la elución en Sephadex G-200 (600000).

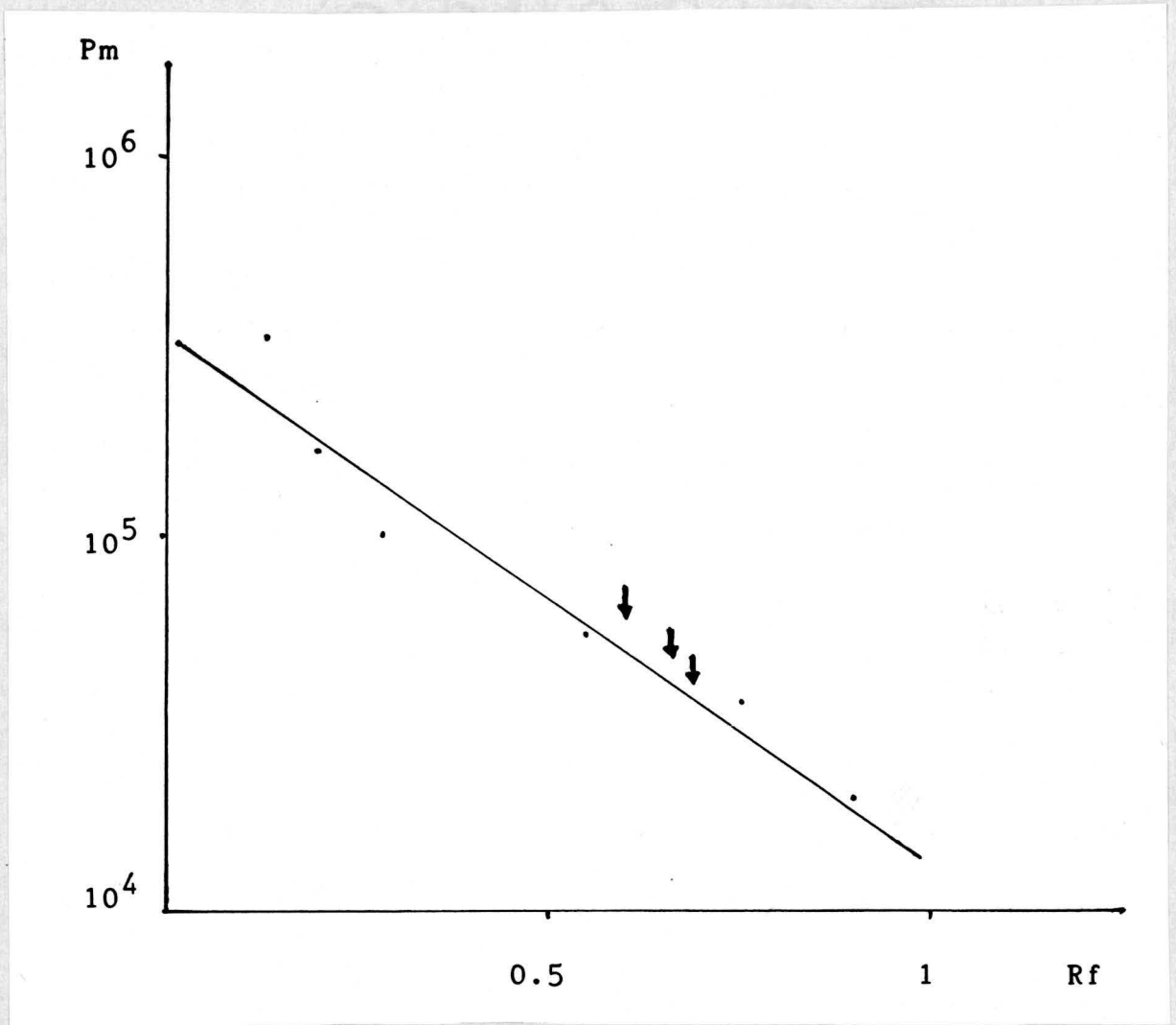


Figura 19. Determinación del tamaño molecular de las DNasas de *M. coralloides* D mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Los patrones utilizados fueron α_2 -macroglobulina (340 Kd), fosforilasa b (97.4 Kd), glutamato deshidrogenasa (55.4 Kd), lactato deshidrogenasa (36.5 Kd) e inhibidor de tripsina (20.1 Kd). Las flechas indican la posición de las DNasas G, M y P.

RESULTADOS

Electroforesis en condiciones nativas

Una vez obtenidos los pesos moleculares de las tres nucleasas, se decidió someter muestra procedente de un extracto libre de células a una electroforesis en condiciones no desnaturizantes para comprobar si aparecían una o varias bandas de degradación de ADN.

Cuando esta electroforesis se llevó a cabo, el resultado fue que el ADN presente en el gel sólo era degradado en un punto. En la Figura 20 se encuentra el gel en concreto junto a otro al que se le aplicaron los mismos patrones que fueron utilizados en la electroforesis con SDS, que en este caso no sufrieron ningún proceso desnaturizante. Como se observa, aunque las proteínas, en estas condiciones no guardan linealidad con respecto a su peso molecular, si se puede deducir que la banda de actividad nucleasa corresponde con mucha seguridad a un peso molecular bajo, mucho más acorde a los 40000 daltons obtenidos en la electroforesis con SDS, que a los 600000 daltons presumidos tras la elución en Sephadex G-200.

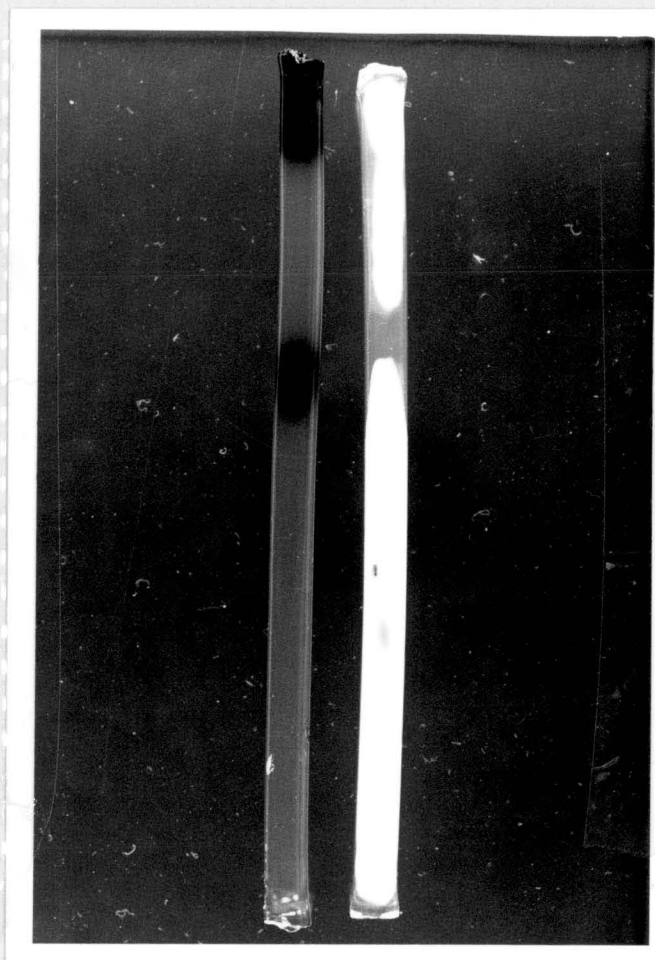


Figura 20. Degradación del ADN por las DNAsas de *M. coralloides* D en gel de poliacrilamida tras electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

RESULTADOS

Efecto del PMSF sobre la actividad desoxirribonucleásica

Antes de abordar el estudio de inhibidores enzimáticos específicos, se quiso determinar la importancia real de las proteasas normalmente presentes en mixobacterias y su efecto sobre las nucleasas de *M. coralloides* D en el proceso de extracción, es decir, conocer el grado en que la acción de las proteasas celulares disminuía dicha actividad por degradación de las proteínas responsables.

Para ello se utilizó un inhibidor de proteasas, el compuesto fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Sigma USA), que se añadió al extracto bruto a concentración final de 10 mM antes de proceder a la sonicación.

El resultado fue un aumento de la actividad nucleásica como se muestra en la Figura 21 y en la Tabla 3. En la primera se encuentra superpuesta la actividad DNasa de dos eluciones tras cromatografía en Sephadex G-200; con PMSF y sin él. En la Tabla 3, a modo de comparación a nivel de actividad específica, se expresan los resultados correspondientes a la actividad DNasa y concentración de proteínas en ambos casos.

RESULTADOS

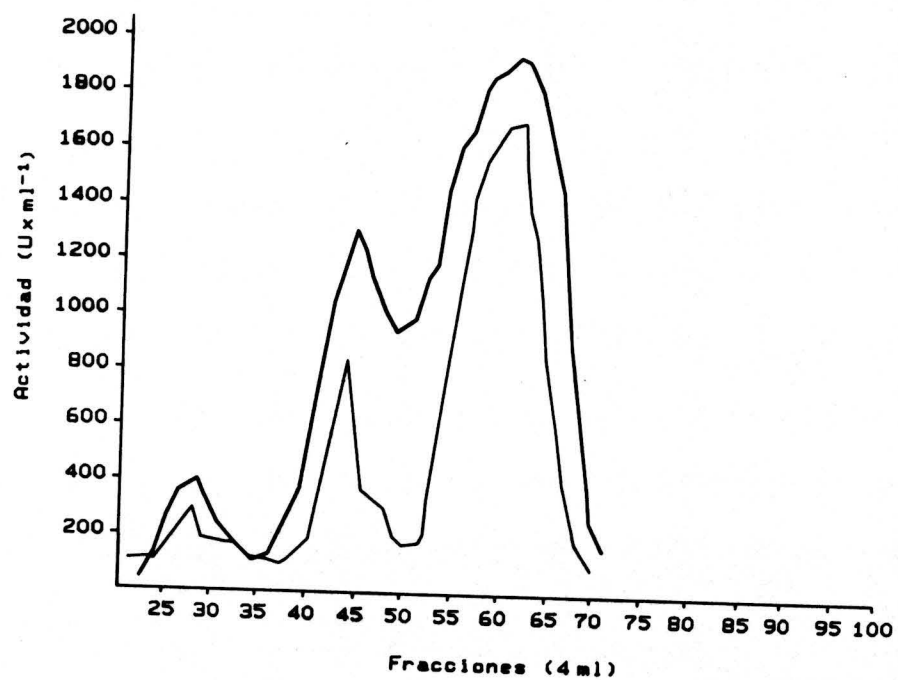


Figura 21. Actividad nucleasa en las diferentes fracciones tras cromatografía en Sephadex G-200 sin PMSF (—) y con PMSF (—).

RESULTADOS

Tabla 3. Efecto del PMSF sobre las DNasas de *M. coralloides* D.

| DNasa | G | M | P |
|---------------------------------|--------|---------|---------|
| a) Con PMSF | | | |
| Actividad (U.ml ⁻¹) | 375.25 | 1284.48 | 1934.69 |
| Proteína (µg.ml ⁻¹) | 763.79 | 261.39 | 228.08 |
| b) Sin PMSF | | | |
| Actividad (U.ml ⁻¹) | 261.60 | 796.29 | 1581.53 |
| Proteína (µg.ml ⁻¹) | 506.29 | 335.22 | 200.17 |

Efecto de diferentes inhibidores enzimáticos

Como otra parte de la caracterización de estas enzimas se abordó el estudio de diferentes sustancias conocidas como inhibidores de grupos específicos del centro activo comunes a numerosas nucleasas.

De entre los más significativos a utilizar tuvieron que suprimirse aquellos que interferían con el método de valoración utilizado usualmente. Por ejemplo, el caso más llamativo fue el del glutaraldehído, inhibidor de los residuos de lisina, que formaba un complejo lechoso con la muestra, imposible de someter a valoración.

Del resto se seleccionaron la carbodiimida (CYA) como inhibidor de los grupos carboxilos, que se utilizó a una concentración de 100 mM; la N-etilmaleimida (NEM) como inhibidor de los grupos sulfhidrilos, a una concentración de 100 mM y el ácido aurintricarboxílico (ATA), inhibidor comúnmente utilizado para nucleasas, que se añadió a una concentración de 30 mM.

El resultado obtenido fue muy similar en las tres nucleasas. La N-etilmaleimida no ejerció efecto alguno en ninguno de los tres casos (Figuras 22, 23 y 24) que mostraron la misma actividad que las muestras sin inhibidor.

Por el contrario, la carbodiimida sí actuó sobre las nucleasas y de forma ligeramente diferente. Así, la DNasa G presentó una inhibición del 10% (Figura 25), la nucleasa M, alrededor de un 30% (Figura 26) y la nucleasa P alrededor de un 20% (Figura 27).

La acción inhibitoria más drástica fue realizada por el ATA que inhibió totalmente la actividad de las tres DNasas (Figuras 28, 29 y 30).

RESULTADOS

En todos los casos se realizaron diversos controles, como se indica en las figuras correspondientes, para asegurar que el efecto obtenido era debido realmente al inhibidor y no a cualquier reacción secundaria de éste al aplicar el método de valoración; asimismo se pretendía asegurar que ninguna actividad residual de la muestra o de otra interferencia pudiera enmascarar dicho efecto.

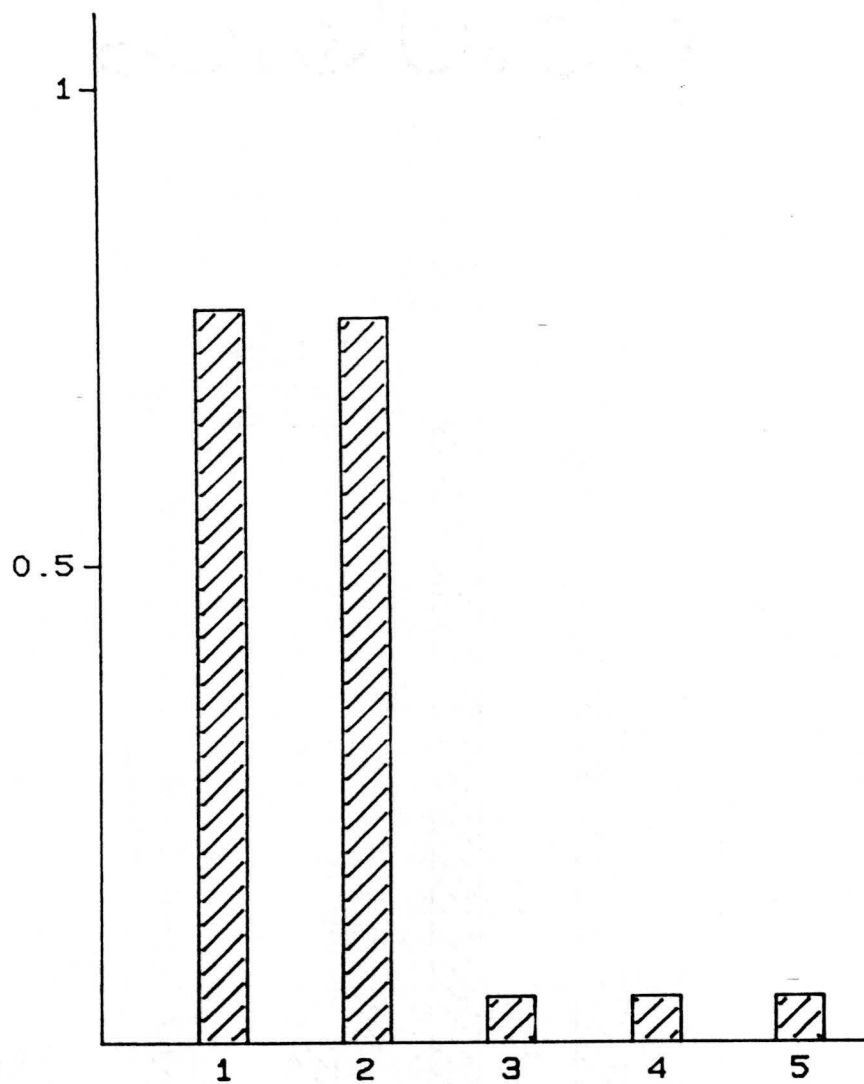


Figura 22. Efecto ejercido por la N-etilmaleimida sobre la nucleasa G, siendo: (1) G + tampón + ADN; (2) G + NEM + ADN; (3) tampón + NEM + ADN; (4) G + NEM + tampón; (5) G + tampón + tampón.

RESULTADOS

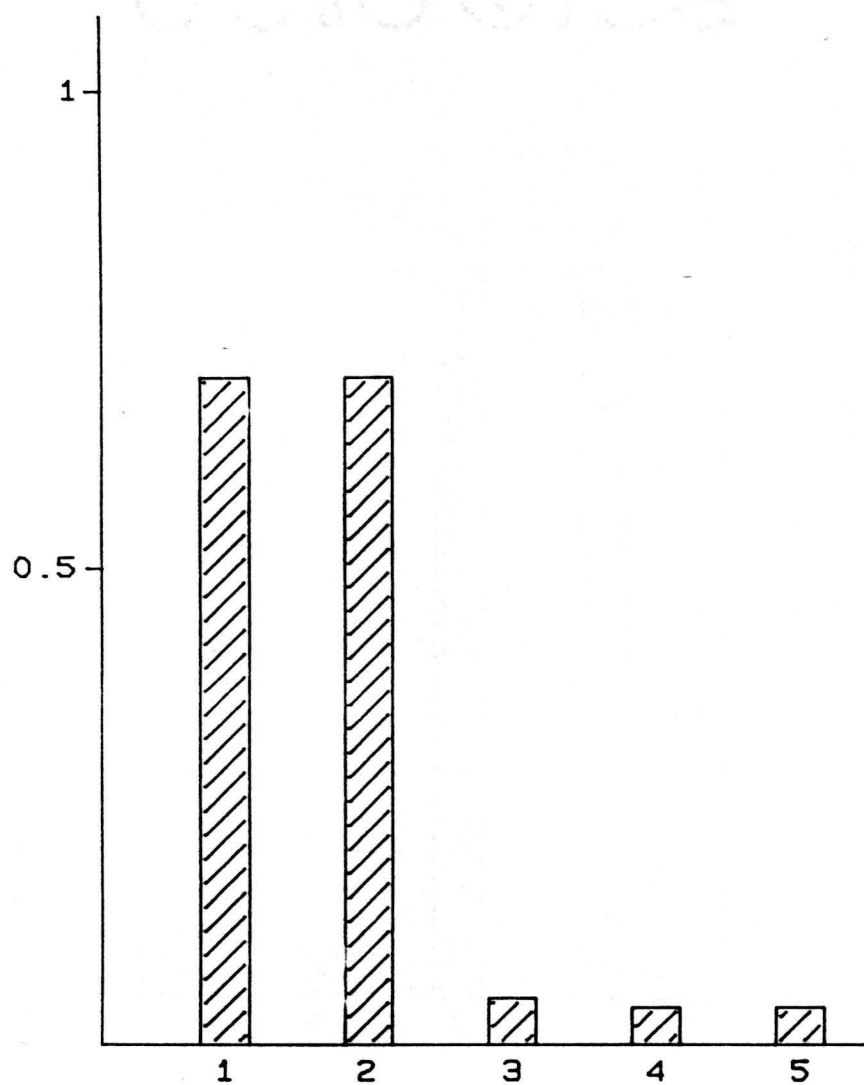


Figura 23.

Efecto ejercido por la N-etilmaleimida sobre la nucleasa M, siendo: (1) M + tampón + ADN; (2) M + NEM + ADN; (3) tampón + NEM + ADN; (4) M + NEM + tampón; (5) M + tampón + tampón.

RESULTADOS

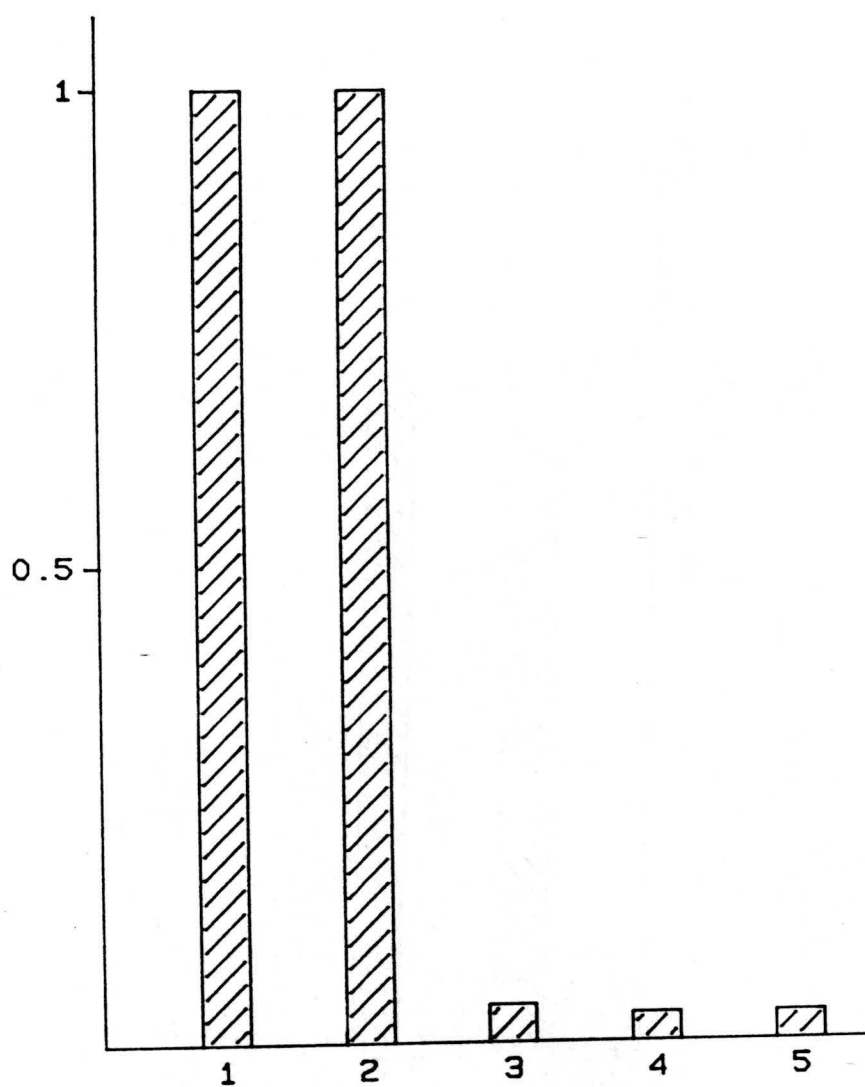


Figura 24. Efecto ejercido por la N-etilmaleimida sobre la nucleasa P, siendo: (1) P + tampón + ADN; (2) P + NEM + ADN; (3) tampón + NEM + ADN; (4) P + NEM + tampón; (5) P + tampón + tampón.

RESULTADOS

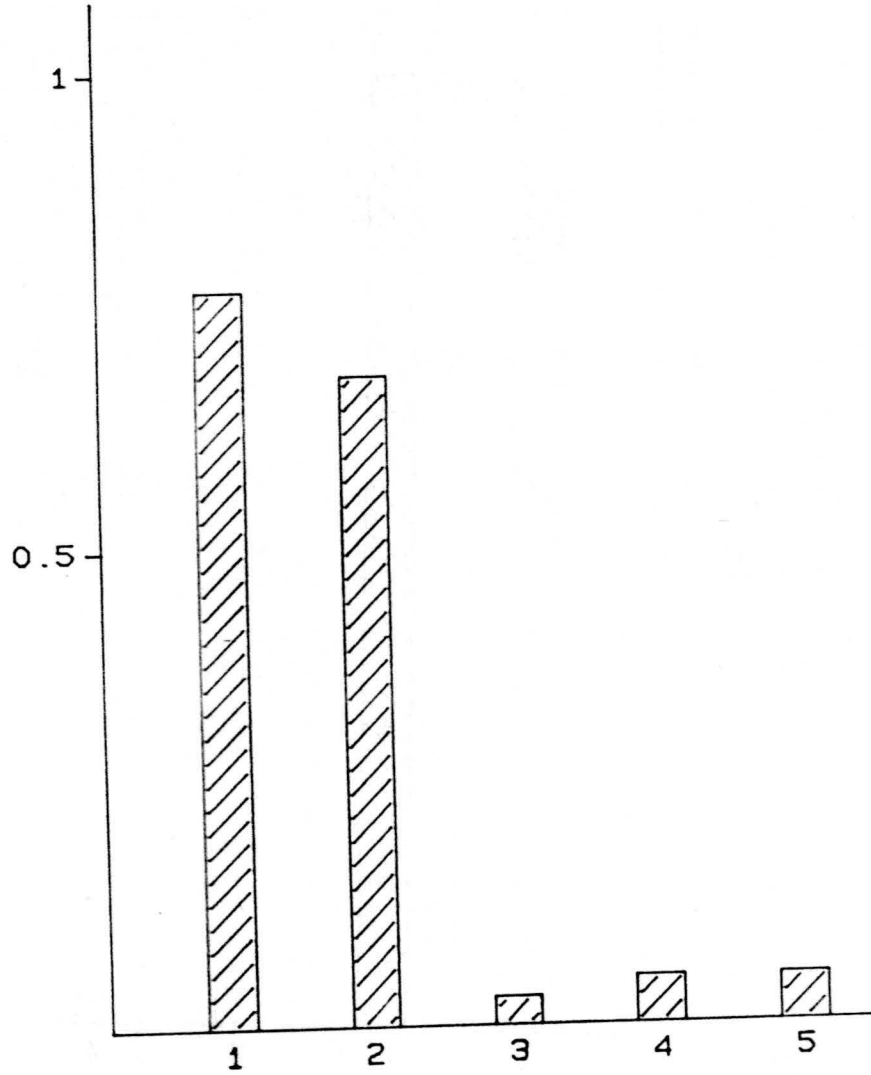


Figura 25. Efecto ejercido por la carbodiimida sobre la nucleasa G, siendo: (1) G + tampón + ADN; (2) G + CYA + ADN; (3) tampón + CYA + ADN; (4) G + CYA + tampón; (5) G + tampón + tampón.

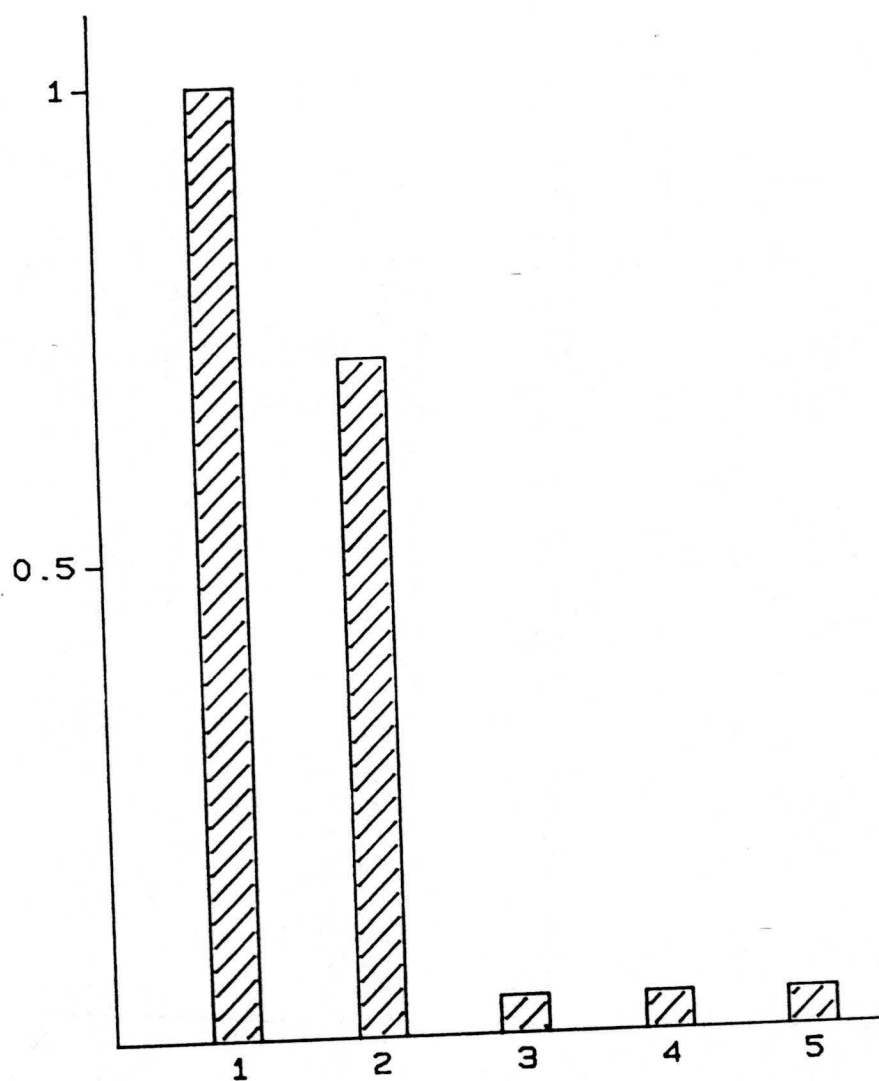


Figura 26.

Efecto ejercido por la carbodiimida sobre la nucleasa M, siendo: (1) M + tampón + ADN; (2) M + CYA + ADN; (3) tampón + tampón + ADN; (4) M + CYA + tampón; (5) M + tampón + tampón.

RESULTADOS

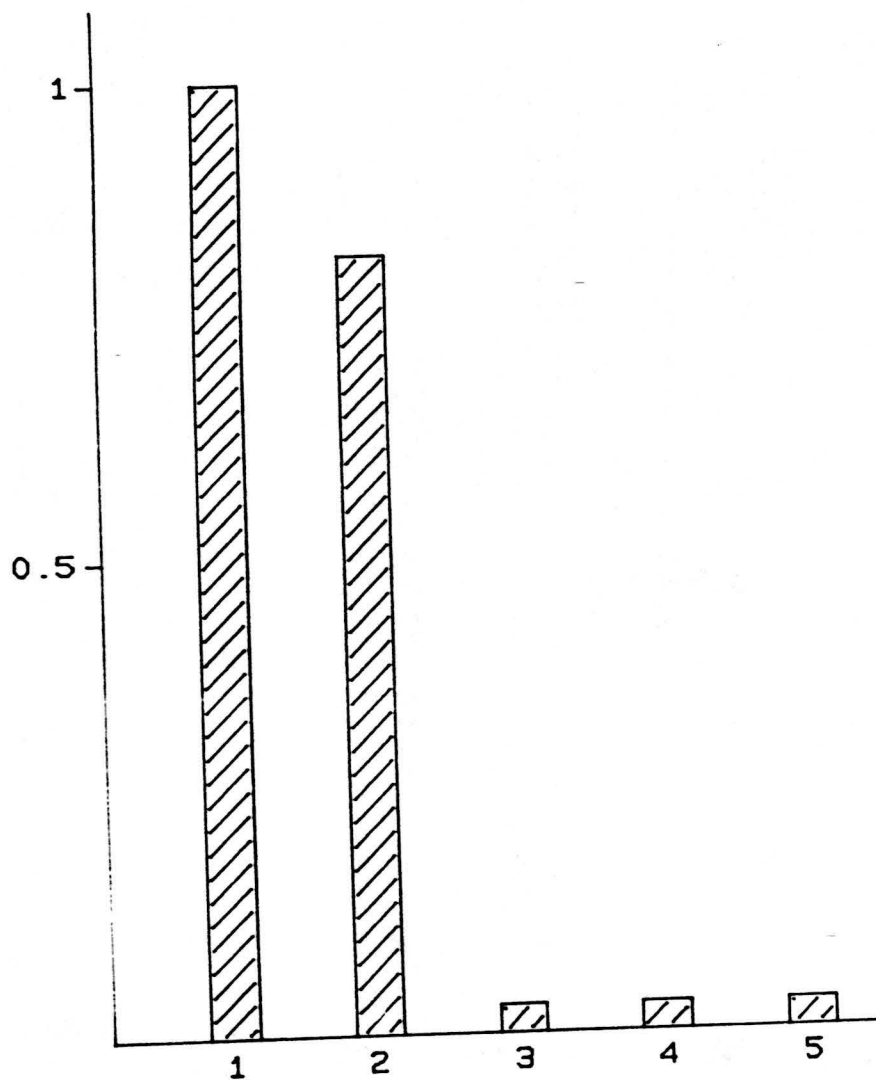


Figura 27. Efecto ejercido por la carbodiimida sobre la nucleasa P, siendo: (1) P + tampón + ADN; (2) P + CYA + ADN; (3) tampón + tampón + ADN; (4) P + CYA + tampón; (5) P + tampón + tampón.

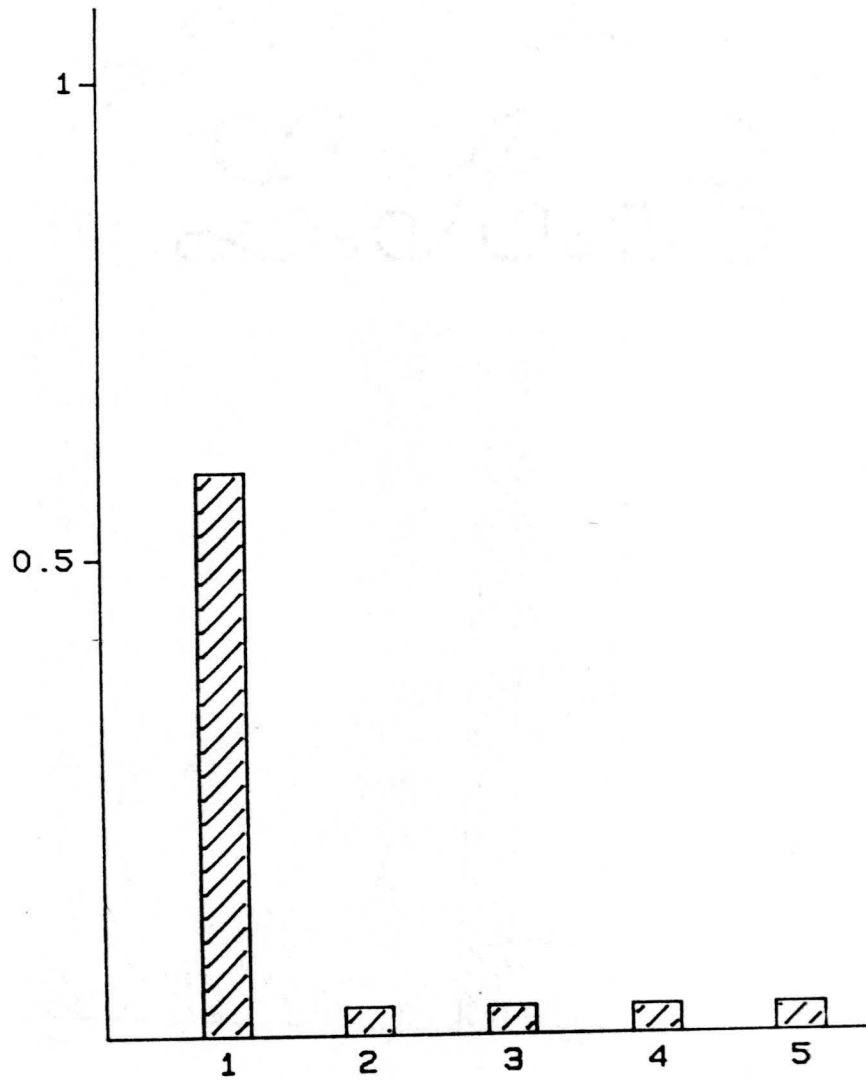


Figura 28. Efecto ejercido por el ácido aurintricarboxílico sobre la nucleasa G, siendo: (1) G + tampón + ADN; (2) G + ATA + ADN; (3) tampón + ATA + ADN; (4) G + ATA + tampón; (5) G + tampón + tampón.

RESULTADOS

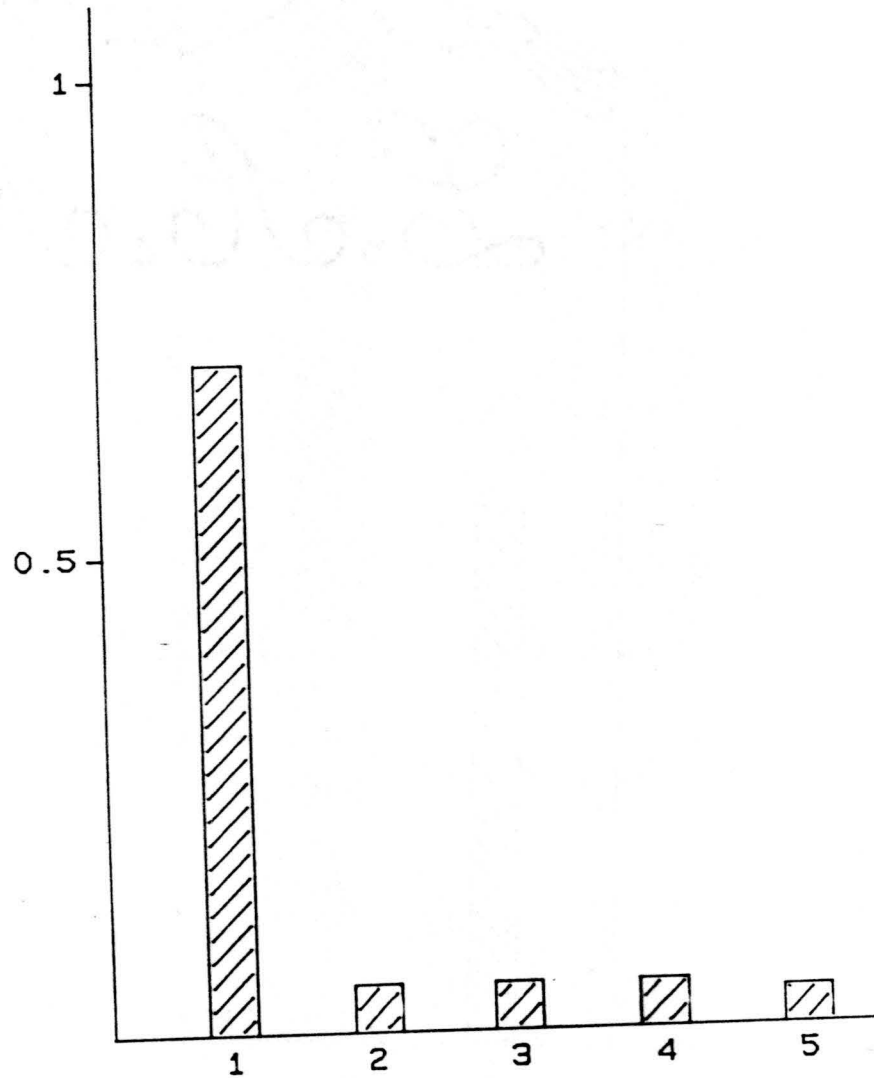


Figura 29.

Efecto ejercido por el ácido aurintricarboxílico sobre la nucleasa M, siendo: (1) M + tampón + ADN; (2) M + ATA + ADN; (3) tampón + ATA + ADN; (4) M + ATA + tampón; (5) M + tampón + tampón.

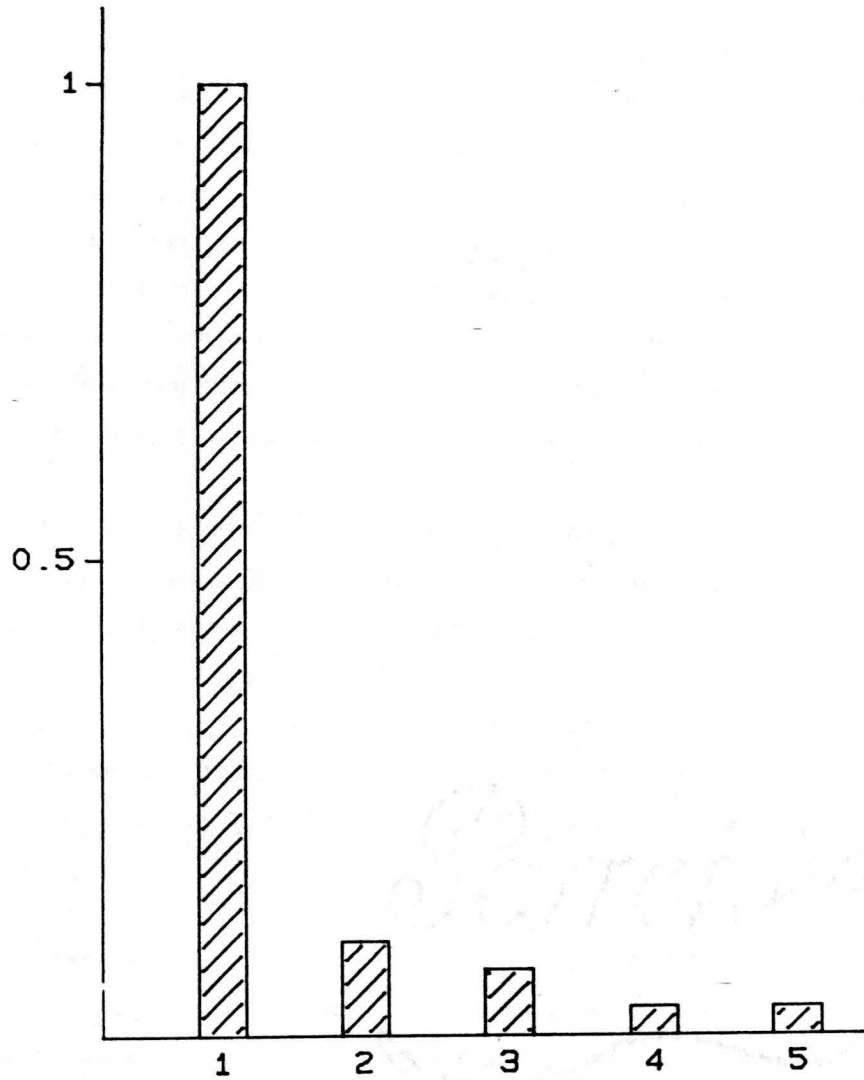


Figura 30. Efecto ejercido por el ácido aurintricarboxílico sobre la nucleasa P, siendo: (1) P + tampón + ADN; (2) P + ATA + ADN; (3) tampón + ATA + ADN; (4) P + ATA + tampón; (5) P + tampón + tampón.

RESULTADOS

Especificidad de sustrato

Para comprobar si las DNAsas eran capaces de degradar ADN circular, es decir, si podían actuar como endonucleasas, se incubaron con el plásmido pBR322 bajo sus condiciones óptimas respectivas durante diferentes tiempos. A las muestras se les aplicó posteriormente una electroforesis en gel de agarosa, se tñeron con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta según se indica en el capítulo de Material y Métodos. Paralelamente, se realizó siempre un control incubando la muestra con ADN de salmon y valorando la actividad mediante el método de la difenilamina.

En la Figura 31 se muestra la degradación del plásmido pBR322 por la nucleasa P. En la calle número 1 se aplicó un digerido de ADN de λ con *Hin* dIII como patrón de pesos moleculares. En el número 2 se puso pBR322 control, mientras que las siguientes calles muestran el sustrato tras incubación con la nucleasa durante 0.5, 2, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos. En las últimas dos calles se encuentran de nuevo las muestras correspondientes a los 0.5 y 2 minutos de incubación.

La Figura 32 muestra la electroforesis realizada tras incubación la DNasa M en presencia del pBR322. La segunda calle tiene pBR322 intacto, y las siguientes, el plásmido degradado tras 0.5, 2, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos de incubación.

Por último, la misma experiencia se realizó con la nucleasa G. En la Figura 33 aparece la electroforesis realizada. En la primera calle se encuentra el pBR322 control. En las siguientes está la muestra con el plásmido tras 0.5, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos de incubación. Como puede observarse, el plásmido quedó intacto.

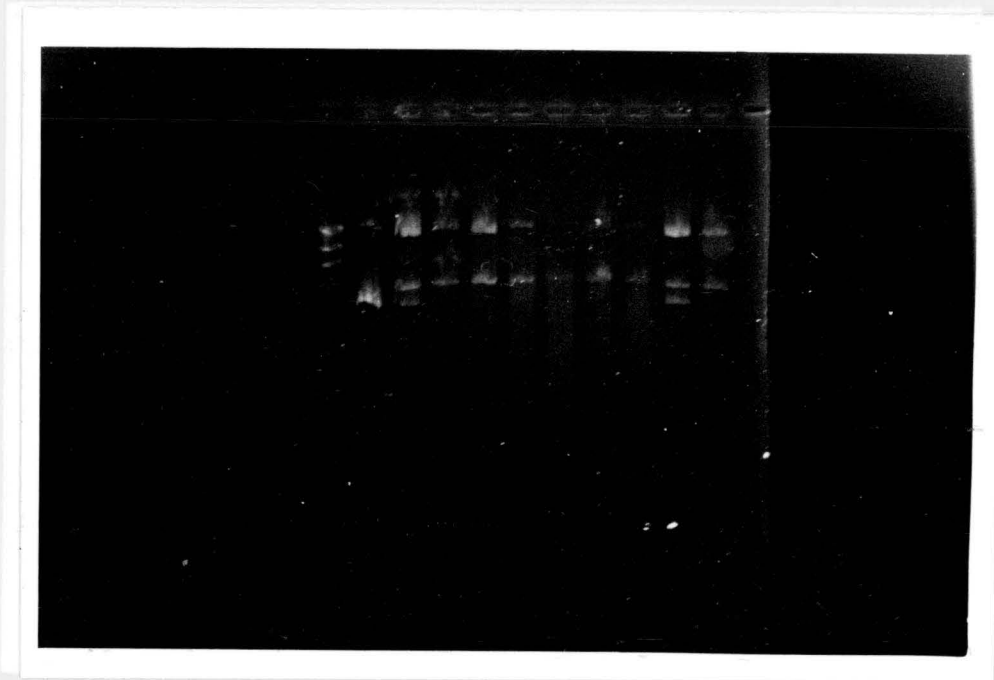


Figura 31. Degradación del plásmido pBR322 por la DNasa P. De izquierda a derecha aparece el digerido del ADN de λ por *Hin* dIII, plásmido pBR322 intacto, plásmido incubado con la nucleasa durante 0.5, 2, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos. En las últimas dos calles se repiten las muestras de 0.5 y 2 minutos de incubación.

RESULTADOS

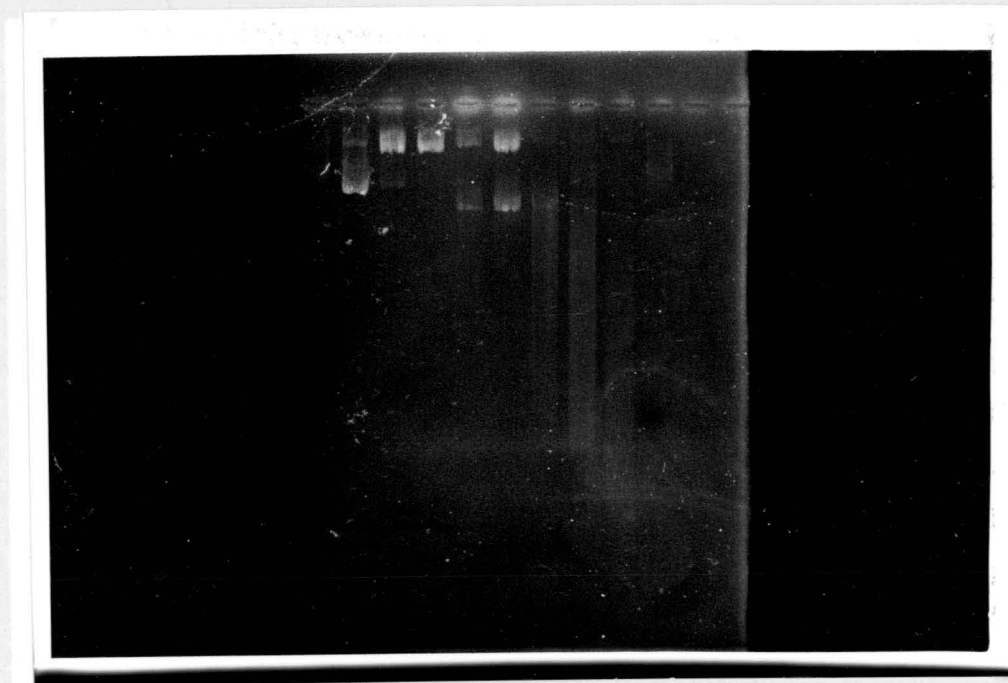


Figura 32. Degradación del plásmido pBR322 por la DNasa M. De izquierda a derecha se encuentra el plásmido intacto, e incubado durante 0.5, 2, 5, 10, 30, 45 y 60 minutos en presencia de nucleasa.

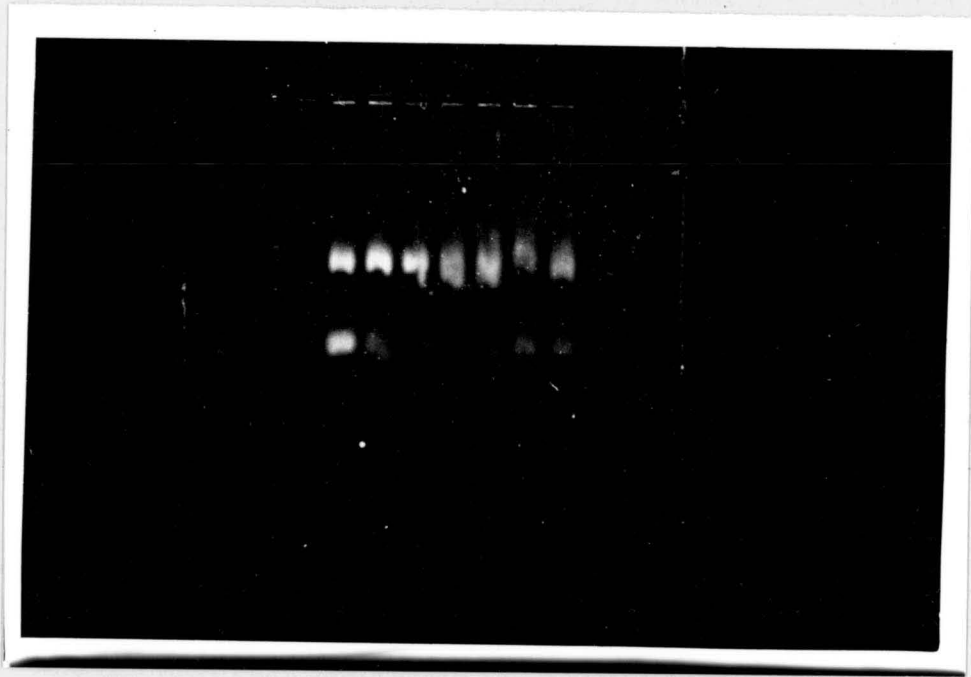


Figura 33. Plásmido pBR322 incubado en presencia de la desoxirribonucleasa G durante 0.5, 2, 5, 10, 30 y 60 minutos. En la primera calle se encuentra el plásmido control sin DNasa.

RESULTADOS

ESTUDIOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

Estos estudios se abordaron desde dos puntos de vista diferentes, como ya ha sido explicado en el capítulo de Material y Métodos. Se estudió la cinética con respecto a la concentración de sustrato hasta conseguir la saturación, así como la cinética respecto al tiempo, dada una concentración de sustrato fija.

Cinética enzimática con respecto a la concentración de sustrato

En el caso de la DNasa P se utilizó muestra de $173.6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de proteína. Se incubó a 25°C , pH 8 y con MgCl_2 como cofactor, durante una hora, con diferentes concentraciones de ADN inespecífico. El resultado fue una cinética típicamente michaeliana para un solo centro activo. En la Figura 34 se muestra la curva de Michaelis-Menten obtenida, así como la extrapolación de la constante K_m que resultó ser de $4 \times 6.10^{-4} \text{ g.ml}^{-1}$.

Con respecto a la nucleasa M se utilizó muestra de $756.69 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de proteína. Se incubó a 30°C , pH 8, con MnCl_2 como cofactor. De nuevo se obtuvo una cinética de Michaelis-Menten con un solo centro activo. La K_m obtenida fue de $4 \times 2.10^{-4} \text{ g.ml}^{-1}$, como se muestra en la Figura 35.

Por último, la DNasa G mostró también una cinética del mismo tipo. Fue incubada a 37°C , pH 8, con MnCl_2 , durante una hora, utilizando una muestra conteniendo $238 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de proteína. La constante de Michaelis-Menten obtenida fue de $4 \times 6.10^{-4} \text{ g.ml}^{-1}$, (Figura 36).

Cinética enzimática con respecto al tiempo de incubación

De nuevo se incubaron las DNAsas bajo sus condiciones óptimas de acción durante tiempos diferentes con objeto de comprobar si la degradación era lineal con respecto al tiempo o no. El resultado fue tal como se esperaba en el caso de las nucleasas P y M, mostrando una cinética totalmente lineal (Figuras 37 y 38). No ocurrió así con la nucleasa G que degrada prácticamente hasta un 80% del sustrato disponible en los diez primeros minutos de incubación y el resto, lentamente, en los cincuenta minutos restantes (Figura 39).

RESULTADOS

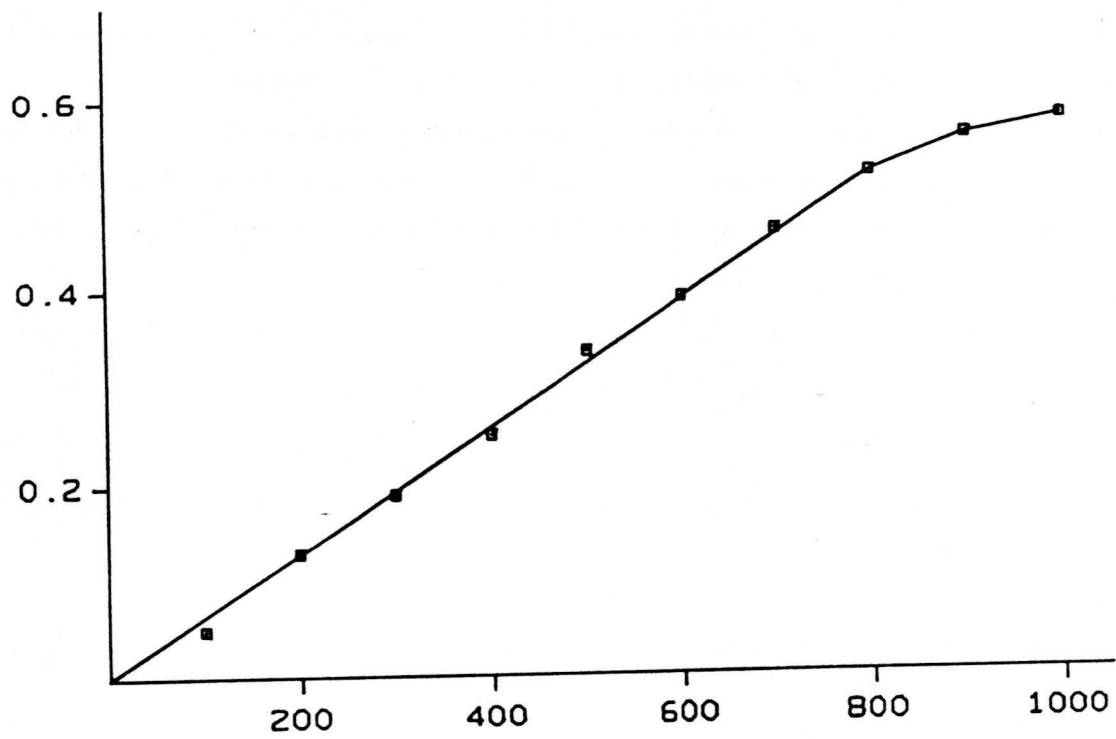


Figura 34. Cinética de la DNasa P con respecto a la concentración de sustrato.

RESULTADOS

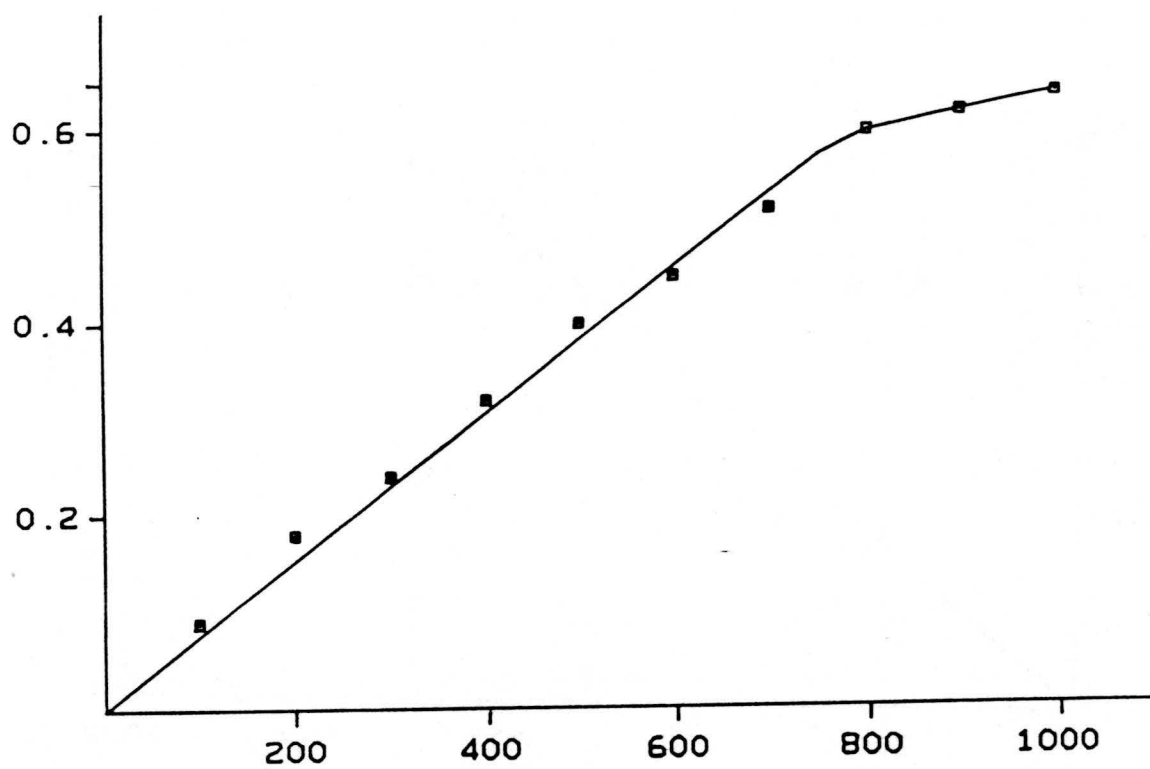


Figura 35. Cinética de la DNasa M con respecto a la concentración de sustrato.

RESULTADOS

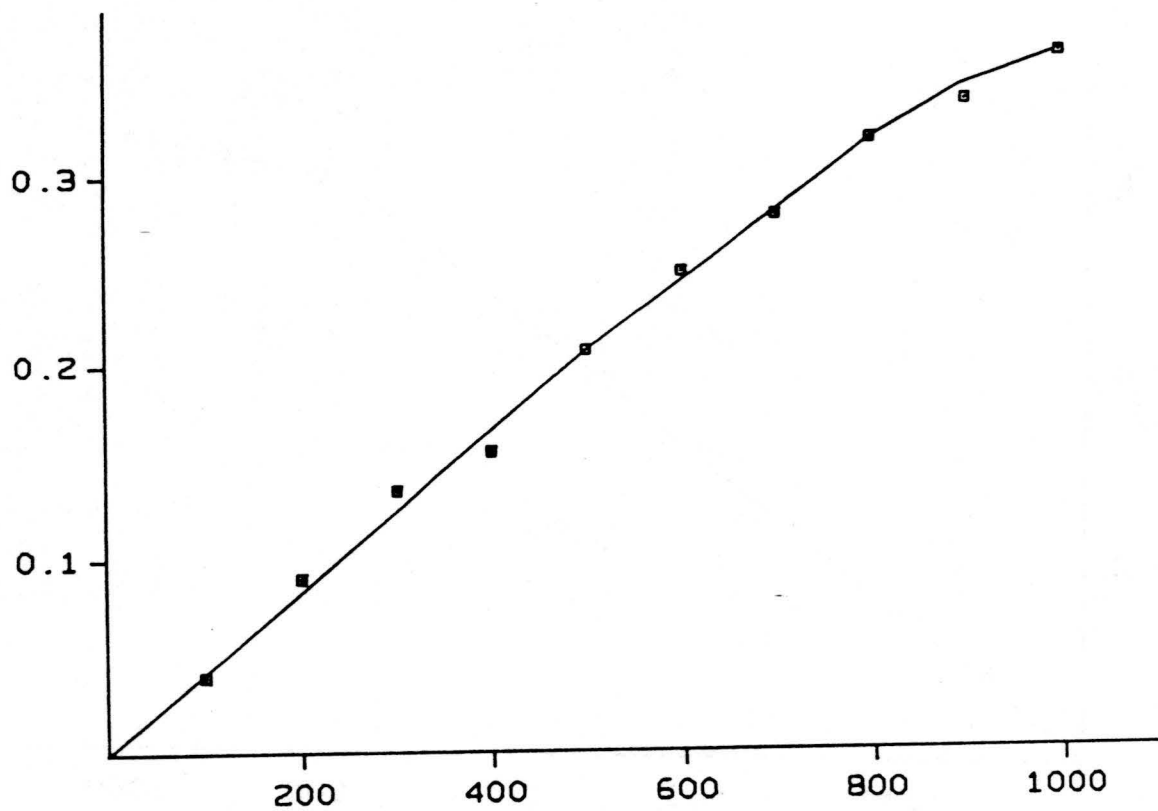


Figura 36. Cinética de la DNasa G con respecto a la concentración de sustrato.

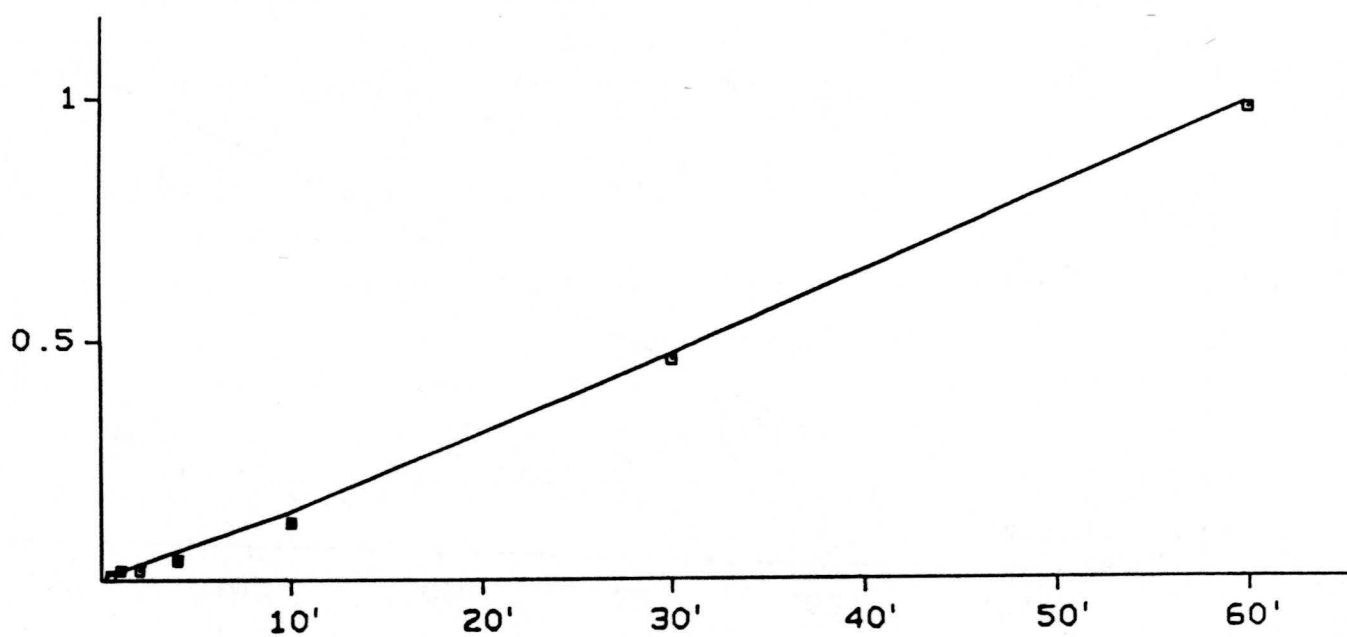


Figura 37. Cinética de la DNasa P con respecto al tiempo.

RESULTADOS

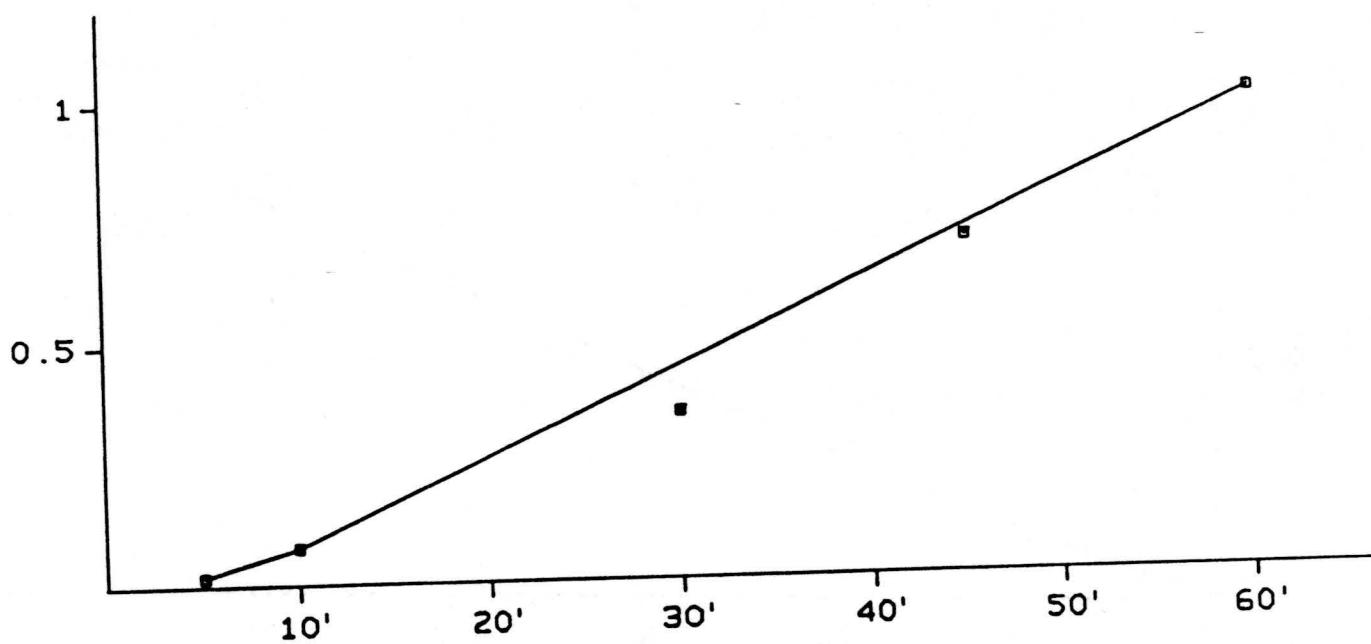


Figura 38. Cinética de la DNasa M con respecto al tiempo.

RESULTADOS

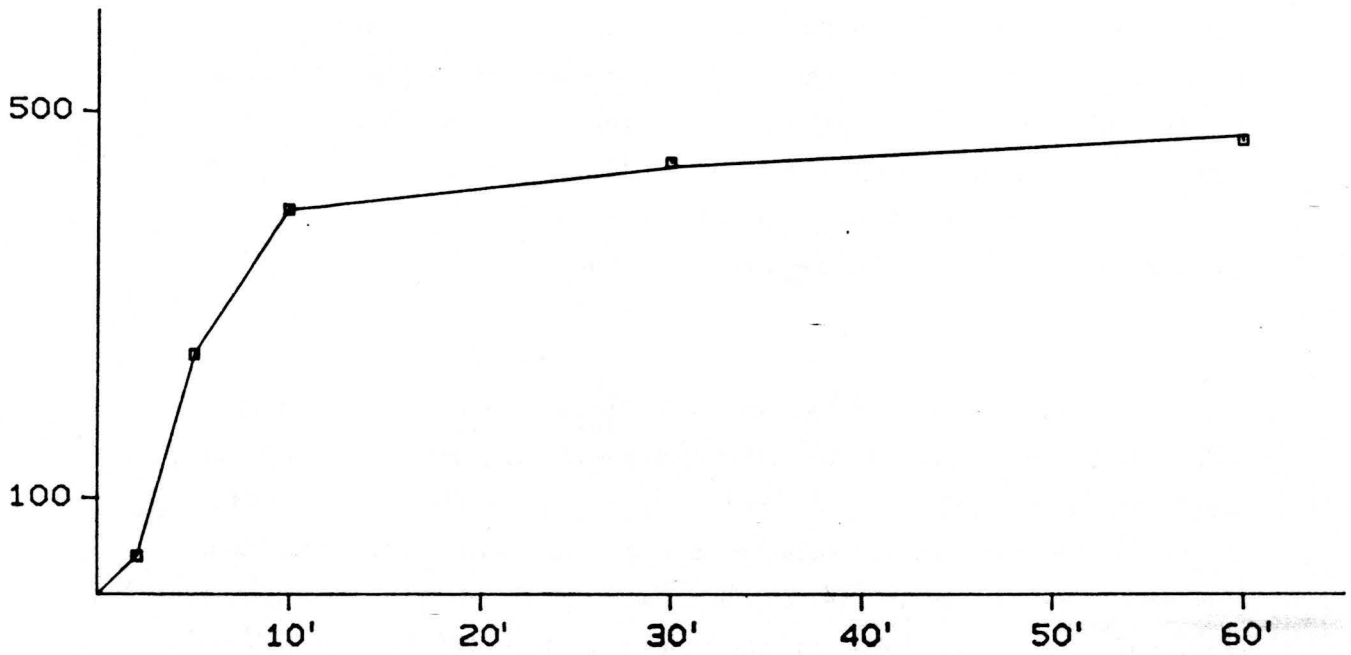


Figura 39. Cinética de la DNasa G con respecto al tiempo.

RESULTADOS

ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN DE LAS NUCLEASAS

Aislamiento de las fracciones celulares

Otro aspecto del estudio de la actividad DNasa de *Myxococcus coralloides* D fue su localización celular. Para ello se siguió el esquema representado en la Figura 40 para separar las distintas fracciones celulares. También fue necesario poner a punto la técnica de separación de membranas para dicha mixobacteria que, como se explicó en el capítulo de Material y Métodos, está basada en la centrifugación de la fracción de membrana total en un gradiente de sacarosa entre 30 y 70% de concentración.

El gradiente se recogió, mediante punzamiento de la base de los tubos, en fracciones de diez gotas cada una que fueron diluidas hasta un mililitro de volumen, midiendo posteriormente la absorbancia a 280 nm. En la Figura 41 se representa el perfil proteico tipo conseguido mediante este método. Como se observa, pudo lograrse la separación de la membrana total en dos fracciones proteicas que correspondían a las bandas de densidad al 60 y 40% de sacarosa.

Caracterización bioquímica de las membranas

El segundo paso a realizar fue la caracterización bioquímica de estas fracciones proteicas.

RESULTADOS

Para elegir una actividad enzimática que determinara la presencia de membrana citoplasmática se probaron diferentes actividades en la fracción de membrana total, con objeto de poner de manifiesto aquella que presentara mayor nivel y por lo tanto fuera más idónea para servir de marcador.

Estas fueron la NADH deshidrogenasa, la glucosa deshidrogenasa y la etanol deshidrogenasa. Las tres actividades se probaron sobre 100 μg de muestra, aunque la NADH deshidrogenasa se probó también sobre 50 μg . La actividad deshidrogenasa se midió como el descenso de la absorbancia a 600 nm en un minuto. En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos para cada una de estas actividades. Finalmente se eligió la NADH deshidrogenasa y una concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la muestra problema, aplicándose el ensayo a cada una de las fracciones obtenidas tras el gradiente.

Como marcador de la membrana externa se valoró la cantidad de lipopolisacáridos presentes en la muestra. Dicha valoración se realizó, como se indica en el capítulo anterior, midiéndose finalmente la absorbancia a una longitud de onda de 548 nm. Debido a la necesidad de mayor cantidad de proteína para este método de valoración, se reunieron las fracciones correspondientes a cada uno de los dos picos de proteína obtenidos en el gradiente y se valoraron ambas muestras. El resultado se muestra como diagrama de barras en la Figura 41.

Como se puede observar en dicha representación, la actividad NADH deshidrogenasa aparecía prácticamente en su totalidad en las fracciones correspondientes al primer pico de proteína, mientras que dichas fracciones poseían tan solo la cuarta parte de la cantidad de lipopolisacáridos mostrada por el segundo pico proteico.

RESULTADOS

A partir de estos datos se determinó que las fracciones proteicas obtenidas en la banda al 60% de concentración de sacarosa correspondían a la membrana citoplasmática, mientras que la obtenida en la banda del 40% correspondían a la membrana externa.

Con objeto de complementar el estudio, ambas membranas, junto con la fracción de membrana total, fueron sometidas a tinción negativa y observadas a microscopio electrónico. En las Figuras 42, 43 y 44 se muestran las fotografías microscópicas obtenidas tras este proceso. En este sentido, las vesículas correspondientes a la membrana externa aparecen más pequeñas y más densas a los electrones que las correspondientes a la membrana citoplasmática, mientras que éstas presentan mayor número de invaginaciones. En la membrana total aparece una mezcla de ambos tipos de vesículas.

Actividad DNasa en las diferentes fracciones

Finalmente, para determinar la localización de la actividad DNasa, se valoraron todos los pasos esquematizados en la Figura 40. Las muestras se dializaron durante toda la noche frente a tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 para eliminar todo resto de sacarosa que interfiere fuertemente en el método de valoración.

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5. La mayor parte de la actividad se encuentra en el sobrenadante obtenido tras centrifugar a 12500xg, que corresponde al espacio periplásmico aunque no se puede obviar la leve actividad obtenida en la membrana total y, concretamente, en la citoplasmática.

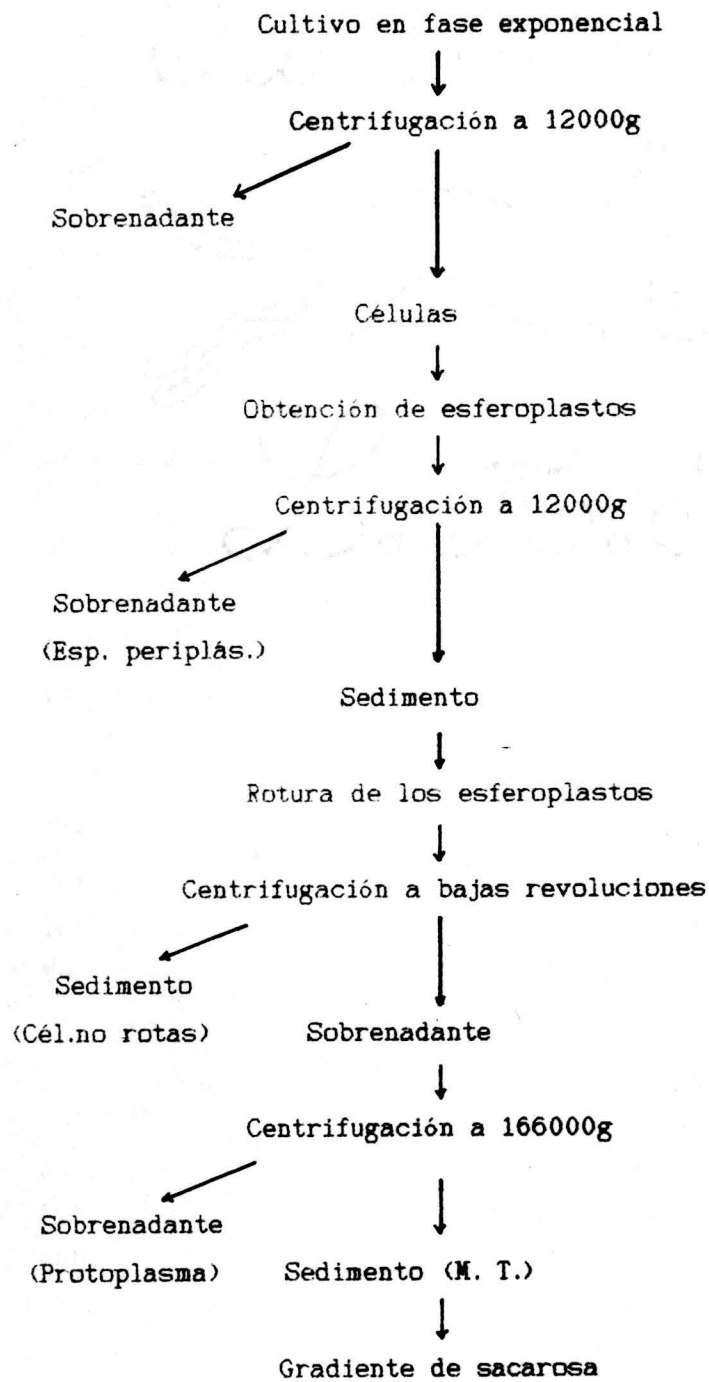


Figura 40. Esquema del proceso seguido en la separación de las fracciones celulares de cultivos de *Myxococcus coralloides* D.

RESULTADOS

Tabla 4. Valores obtenidos para las diferentes actividades deshidrogenasas en la fracción de membrana total.

| Marcador | Tiempo (min.) | A ₆₀₀ |
|-------------------------|---------------|------------------|
| NADH deshidrogenasa | | |
| 100 µg.ml ⁻¹ | 0 | 0.223 |
| | 1 | 0.203 |
| | 2 | 0.184 |
| | 3 | 0.166 |
| 50 µg.ml ⁻¹ | 0 | 0.213 |
| | 1 | 0.195 |
| | 2 | 0.181 |
| | 3 | 0.167 |
| Etanol deshidrogenasa | | |
| 100 µg.ml ⁻¹ | 0 | 0.130 |
| | 1 | 0.126 |
| | 2 | 0.124 |
| | 3 | 0.122 |
| Glucosa deshidrogenasa | | |
| 100 µg.ml ⁻¹ | 0 | 0.070 |
| | 1 | 0.068 |

RESULTADOS

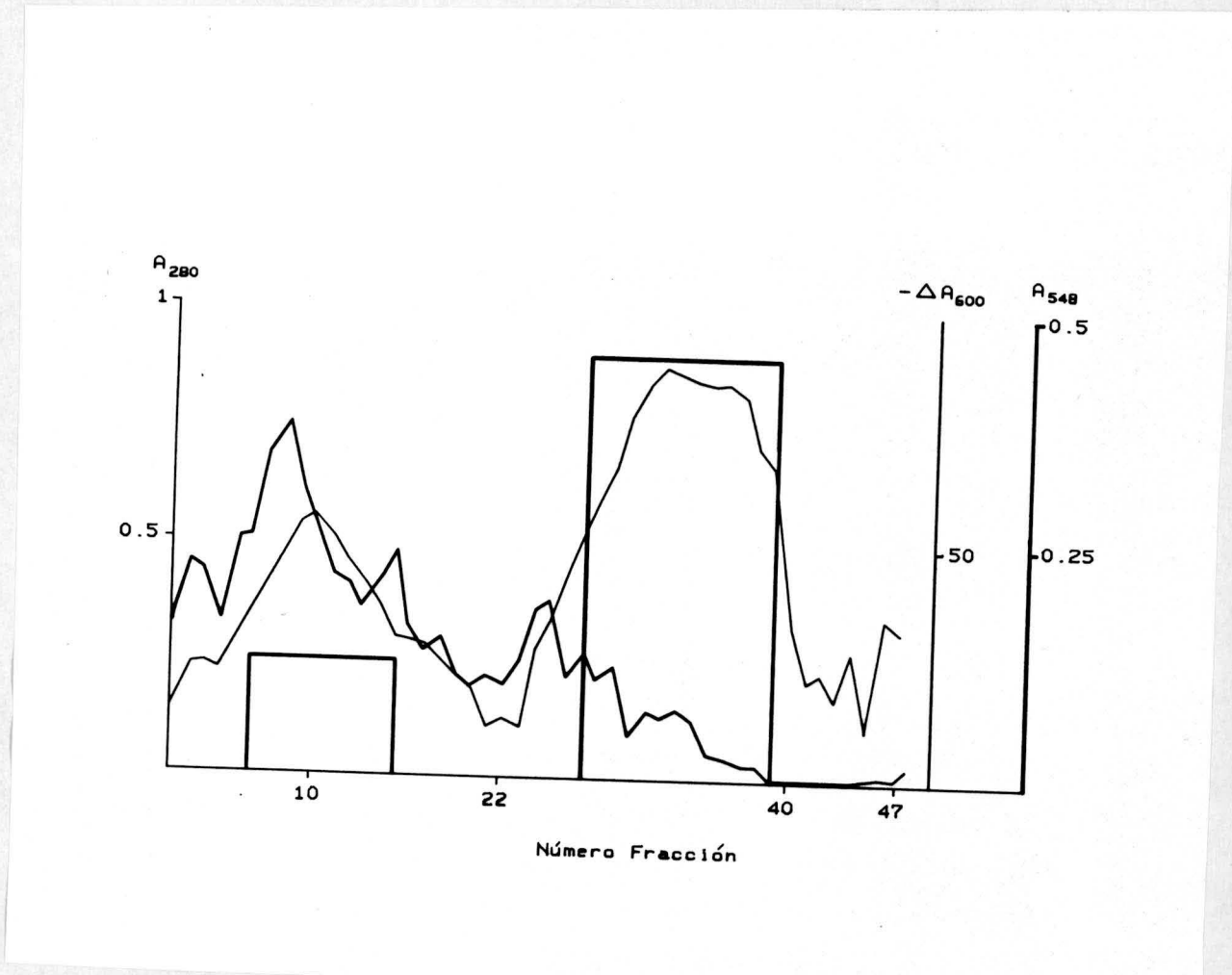


Figura 41. Perfil obtenido tras centrifugar la fracción de membrana total en gradiente de sacarosa. En trazo discontinuo la concentración de proteína (medida como absorbancia a 280 nm); en trazo continuo la actividad NADH deshidrogenasa (medida como la disminución de la absorbancia a 600 nm en un minuto), en diagrama de barras la concentración de lipopolisacáridos (medida como absorbancia a 548 nm).

RESULTADOS

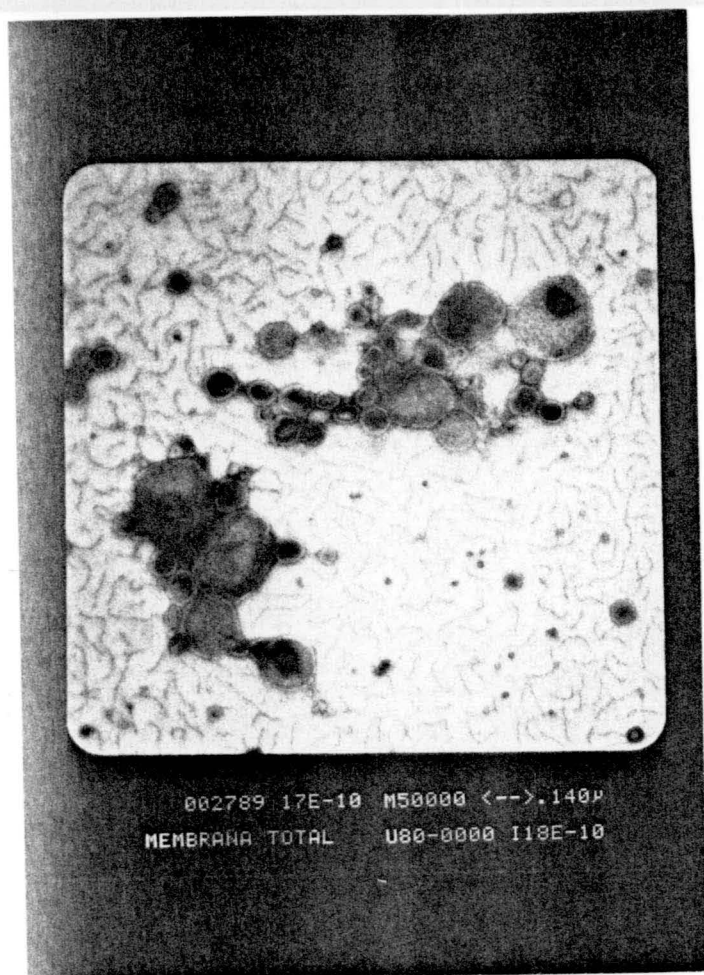


Figura 42. Fracción de membrana total, tras tinción negativa, observada al microscopio electrónico.

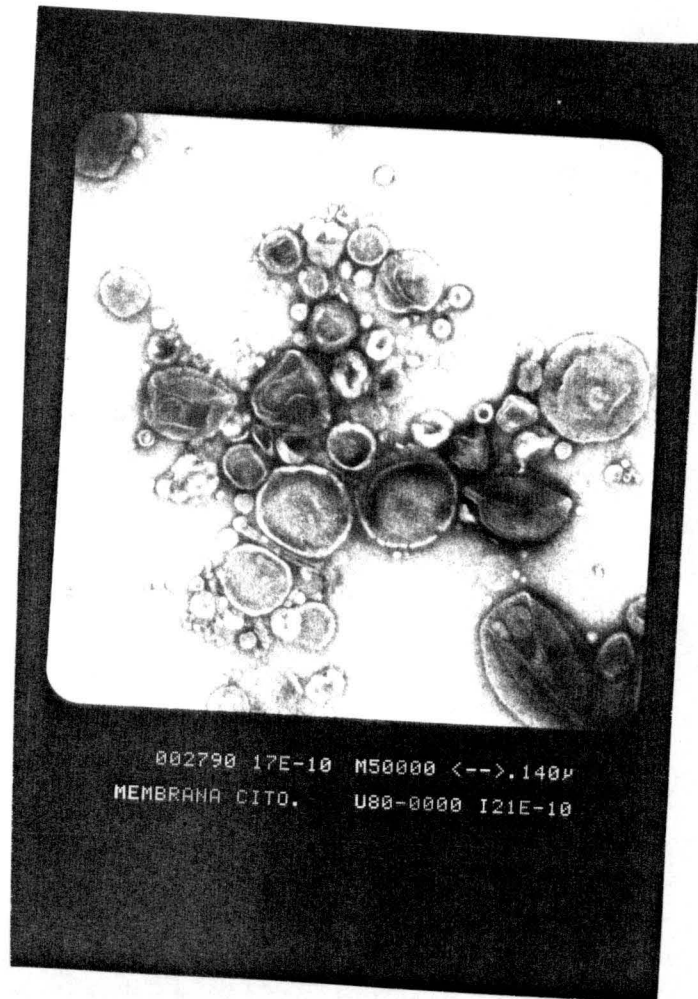


Figura 43. Fracción de membrana citoplasmática, tras tinción negativa, observada al microscopio electrónico.

RESULTADOS

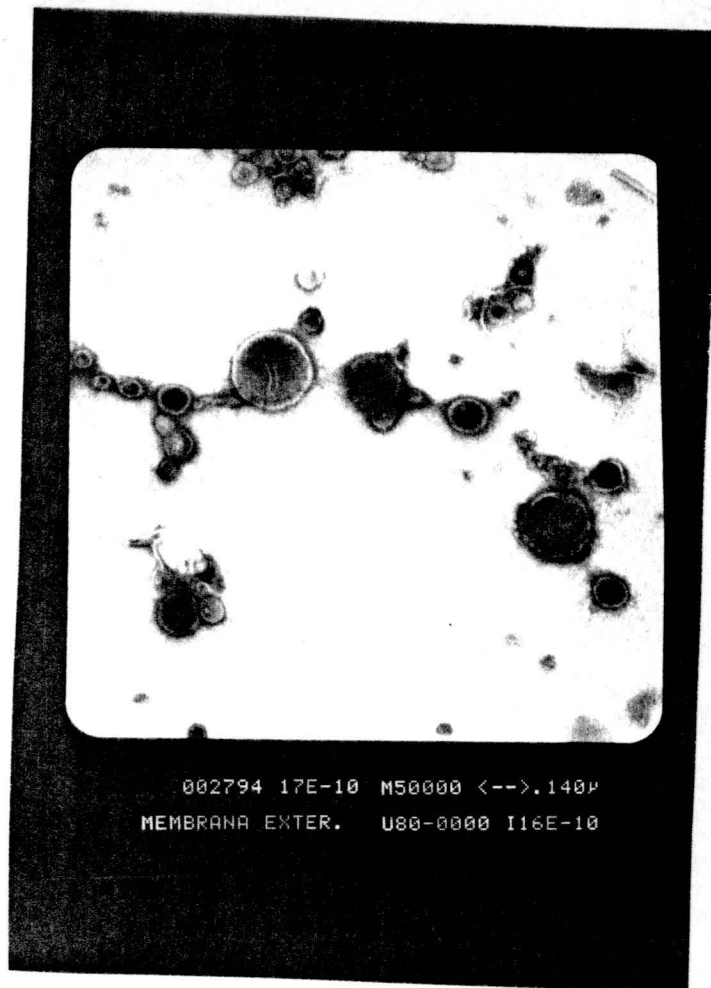


Figura 44. Fracción de membrana externa, tras tinción negativa, observada al microscopio electrónico.

RESULTADOS

Tabla 5. Actividad DNasa obtenida en cada una de las fracciones celulares aisladas.

| Muestra | Actividad DNasa (U.ml ⁻¹) | Proteína (µg.ml ⁻¹) |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Protoplasma | 8.23 | 77.98 |
| Periplasma | 1764.90 | 1038.30 |
| M. citoplásmica | 38.16 | 38.137 |
| M. externa | 8.51 | 26.43 |
| M. total | 64.43 | 866.5 |

RESULTADOS

ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD DESOXIRIBONUCLEASA DURANTE EL CRECIMIENTO

Otro apartado de este trabajo de investigación fue el estudio de la actividad DNasa a lo largo del crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en medio líquido y sólido.

Como se expuso en el capítulo de Introducción, esta bacteria puede seguir un ciclo de vida vegetativo, tanto en medio líquido (CT), como en medio sólido (CTA). Paralelamente, y como es característico de las mixobacterias, puede llevar a cabo un ciclo de desarrollo en medio sólido (AL) que finaliza con la aparición de cuerpos fructificantes y la diferenciación de sus bacilos vegetativos en formas de resistencia conocidas como mixósporas. De forma artificial, se puede inducir la aparición de dichas mixósporas mediante la adición de glicerol a un cultivo exponencial en medio líquido.

Al medir la actividad DNasa en células de *M. coralloides* D en todos estos casos, se obtuvieron los perfiles de actividad específica mostrados en las Figuras 45, 46 y 47. Como se puede observar, hay un aumento generalizado de la actividad específica al aumentar el tiempo de incubación, tanto cuando se trata de crecimiento vegetativo como en la formación de mixósporas.

Paralelamente, con objeto de poder realizar un estudio comparativo y poder perfilar mejor la producción de DNasas en *M. coralloides* D, se llevó un control midiendo actividad, igualmente, en *Myxococcus xanthus*. El resultado fue, contrariamente a lo que ocurre con la anterior mixobacteria, la disminución de la actividad DNasa a lo largo del tiempo (Figuras 48 y 49).

RESULTADOS

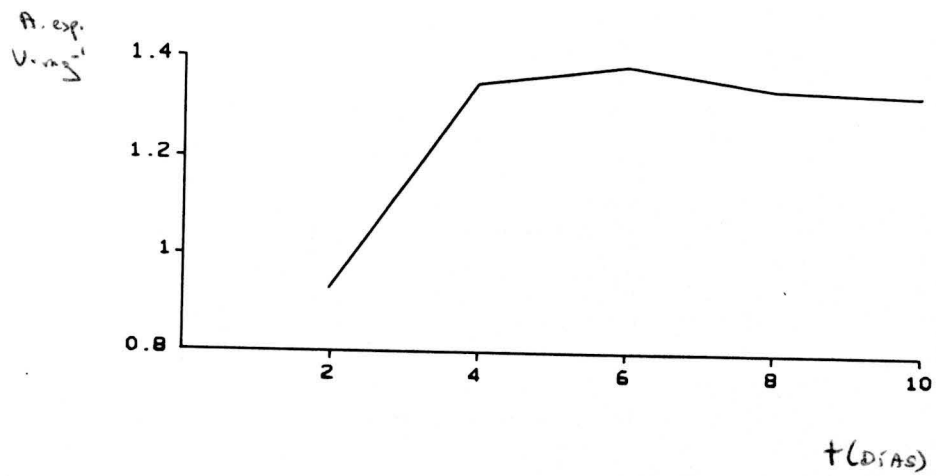


Figura 45. Actividad DNasa a lo largo del crecimiento de *N. coralloides* D en medio CTA. La actividad se expresa como unidades por miligramo de proteína.

RESULTADOS

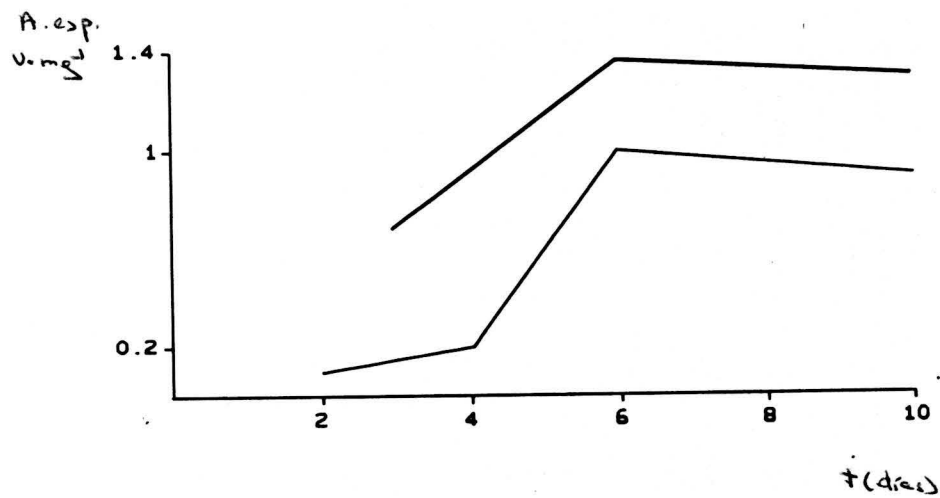


Figura 46.

Actividad DNasa a lo largo del crecimiento de *N. coralloides* D en medio AL, en células permeabilizadas con tolueno (trazo continuo) y rotas mediante prensa francesa (trazo discontinuo). La actividad se expresa como unidades por miligramo de proteína.

Stenobremia

A. esp.
Vangⁱ

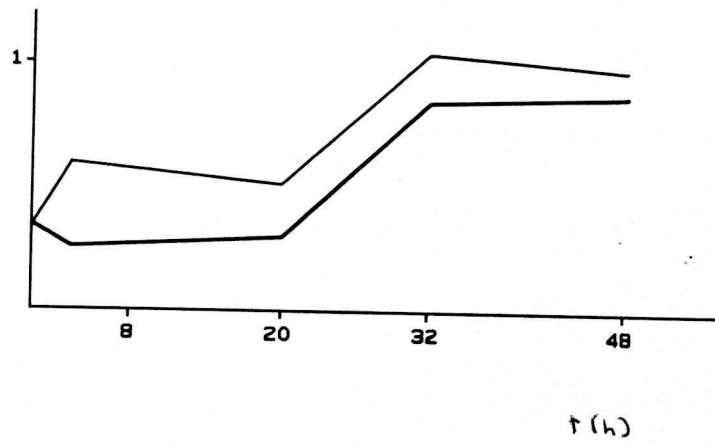


Figura 47.

Actividad DNasa durante la inducción de mixósporas en un cultivo de *M. coralloides* D en medio CT adicionado con glicerol (trazo continuo). En trazo discontinuo se muestra la actividad DNasa de un cultivo control sin glicerol. La actividad se expresa como unidades por miligramo dde proteína.

RESULTADOS

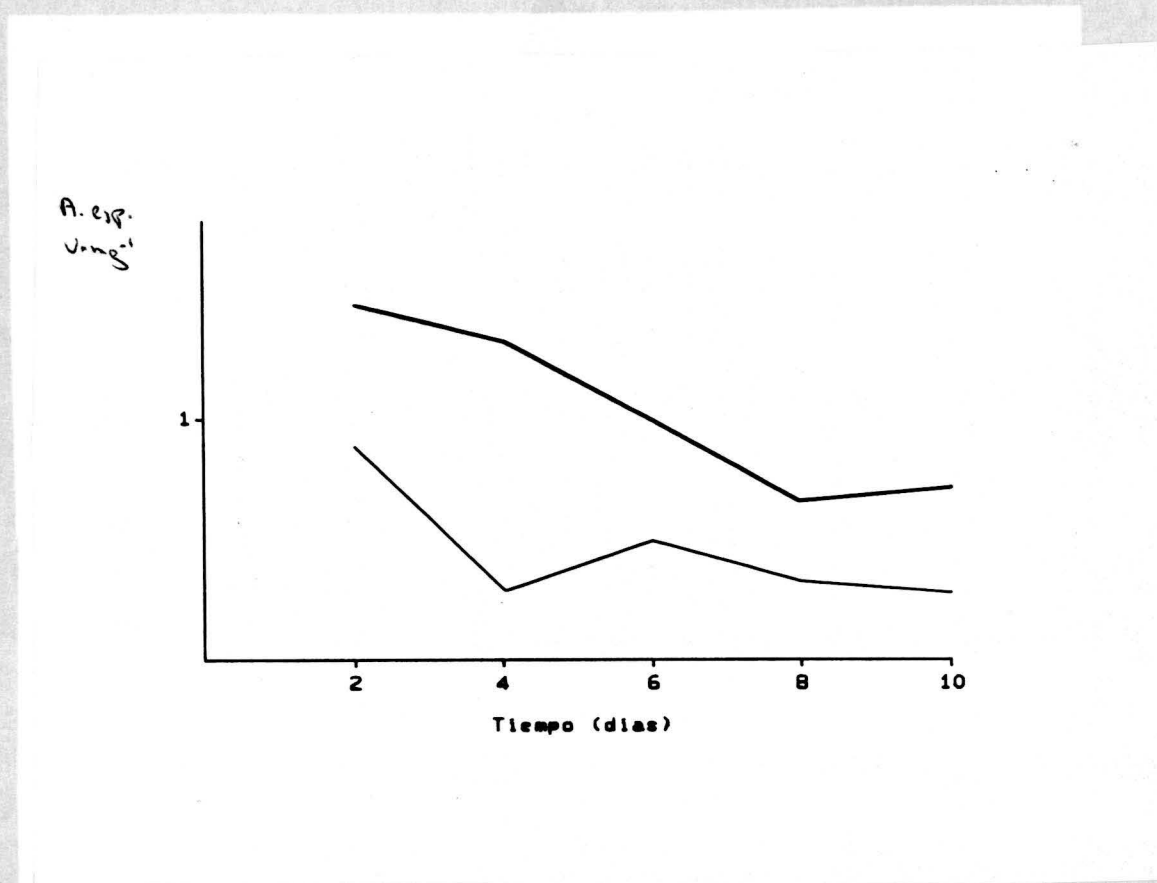


Figura 48.

Actividad DNasa a lo largo del crecimiento de *M. xanthus* en medio AL (trazo continuo) y medio CTA (trazo discontinuo). La actividad está expresada como unidades por miligramo de proteína.

RESULTADOS

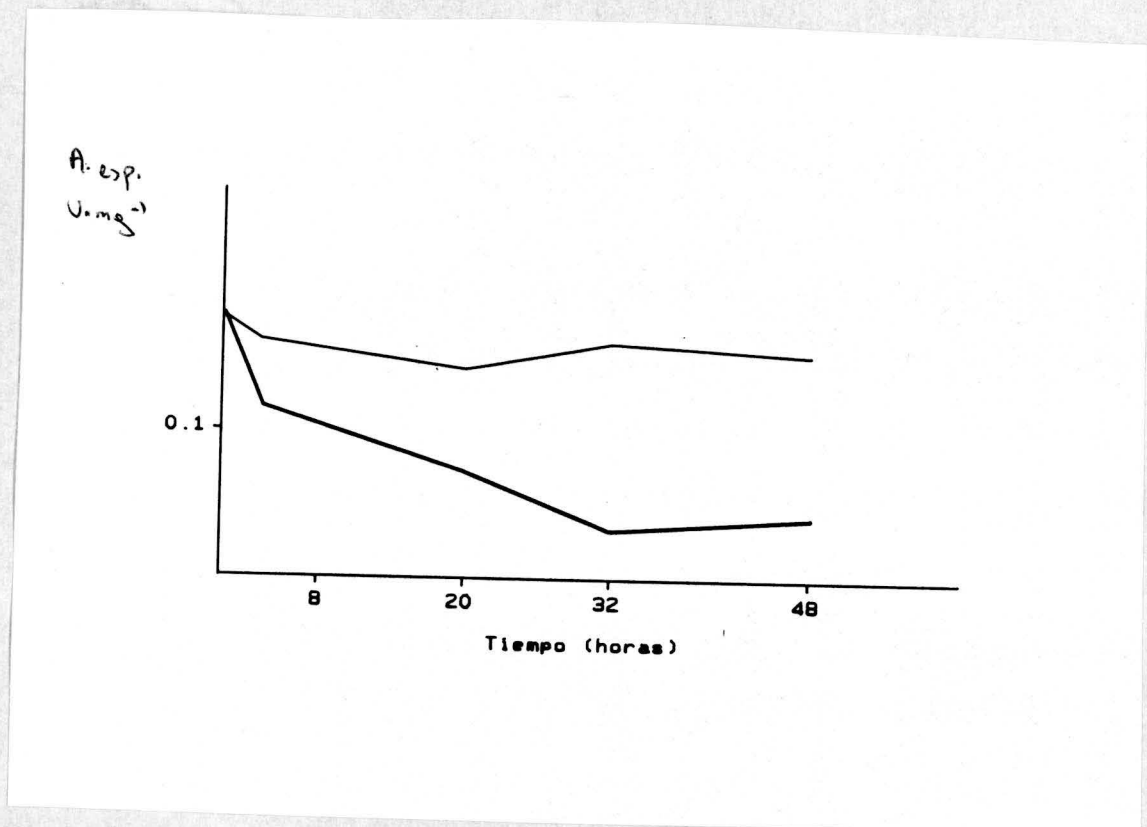


Figura 49. Actividad DNasa durante la inducción de mixósporas en un cultivo de *M. xanthus* en medio CT adicionado con glicerol (trazo continuo). En trazo discontinuo se muestra la actividad DNasa de un cultivo control sin glicerol. La actividad se expresa como unidades por miligramo de proteína.

DISCUSSION

DISCUSION

Como ya se indicó al exponer el objeto del trabajo, nuestra idea era profundizar en el conocimiento de las DNAsas caracterizadas en *Myxococcus coralloides* D así como emitir una hipótesis acerca del papel de estas actividades nucleásicas en la biología de este peculiar microorganismo.

Comenzamos nuestro trabajo realizando un estudio comparativo de las DNAsas presentes en otras mixobacterias relacionadas. Ciertamente que *M. coralloides* D había probado, ya anteriormente, tener una actividad DNasa bruta en los extractos libres de células muy superior a la de sus compañeras de grupo, pero quedaba la duda de si esta diferencia a su favor era debida a una mayor actividad proporcional en cada una de las fracciones activas, o a un mayor número de actividades diferentes. Para poder responder a esto se cromatografiaron, bajo las mismas condiciones que previamente se habían mantenido con *M. coralloides* D, extractos libres de células procedentes de las razas expuestas en el capítulo correspondiente. El resultado fue que en todas aparecía una actividad nucleásica en los primeros tubos del frente de elución, que correspondía a la fracción que en *M. coralloides* D se había denominado DNasa G. Sin embargo, ninguna otra actividad pudo ser determinada en el resto de la elución; es decir, las nucleasas M y P son específicas de esta mixobacteria y son las responsables del mayor nivel de actividad DNasa hallado en ella.

El estudio de actividades nucleásicas en mixobacterias no es nuevo aunque, salvando trabajos previos que intentaban relacionar

DISCUSION

las nucleasas con la nutrición mixobacteriana, se han llevado a cabo mayoritariamente desde el punto de vista de enzimas de restricción. Así, el hallazgo de dos endonucleasas de este tipo en *M. virescens* (Morris y Parish, 1976) indujo a una búsqueda extensiva en otras bacterias relacionadas, tanto mixobacterias como bacterias deslizantes en general (Mayer y Reichenbach, 1978). Aún cuando el estudio estaba dirigido a un grupo muy restringido de nucleasas, los autores señalan el peligro de enzimas inespecíficos contaminantes que podían enmascarar los resultados buscados.

Una vez realizado este apartado, el paso inmediato para comenzar el estudio de las tres nucleasas era su purificación. Con ello queríamos alcanzar diversos objetivos, de los cuales el principal era establecer un método repetitivo que nos permitiera obtener muestras suficientemente puras como para llevar a cabo los estudios de cinética y caracterización. Por otra parte, la purificación hasta conseguir una banda tras electroforesis en geles de poliacrilamida, como criterio de pureza, nos iba a permitir determinar el peso molecular de estos tres enzimas y, en lo posible, su naturaleza molecular.

La purificación de las tres DNAsas se consiguió tras someterlas tan solo a tres de los pasos utilizados usualmente en este tipo de enzimas (Greene *et al.*, 1978; Aiken y Gumpert, 1988) lo cual no es extraño si consideramos que se partía de muestras que habían sido cromatografiadas a través de una columna de Sephadex G-200 con un rango de separación de pesos moleculares muy amplio.

Durante el proceso de purificación se pudo comprobar que las tres DNAsas reaccionan de forma diferente a la precipitación con sulfato amónico. De acuerdo con su comportamiento en geles de

DISCUSION

intercambio iónico podemos deducir con respecto a la carga eléctrica neta de la proteína que tanto la DNasa M como la G muestran estar cargadas positivamente a pH neutro, opuestamente a lo que ocurre con la DNasa P.

Un problema común a las tres nucleasas, aunque especialmente importante para la DNasa P, fue una excesiva pérdida de actividad absoluta tras ser cromatografiadas en intercambio iónico, acompañada de una concentración mínima de proteína, lo que dificultaba enormemente la obtención de una tinción buena tras electroforesis. Sin embargo esto no es raro en la bibliografía donde es frecuente encontrar recuperaciones sólo del 3 o 5% de la actividad total (Kelly *et al*, 1985; Greene *et al*, 1988).

Por otra parte, el proceso de purificación conduce a la resolución de una serie de cuestiones laterales que no se exponen directamente en los Resultados del presente trabajo. Una de ellas es la provocada por las DNasas G y P que eluyen, tras cromatografía en columna, conjuntamente con dos fosfatasas: una de ellas actúa a pH ácido y eluye con la nucleasa G, mientras que la otra, de actividad alcalina, presenta un patrón de elución coincidente con la DNasa P. Ambas fosfatasas mostraron unas condiciones de acción muy similares a aquellas de las desoxirribonucleasas junto a las que eluían (González, 1988). Dado que se han descrito enzimas con una doble actividad fosfatasa-nucleasa (Weiss, 1981), en un principio se pensó en esta posibilidad, especialmente en el caso de la DNasa P, ya que los otros enzimas, al eluir en el frente, presentan un margen de tamaño molecular mucho más amplio y la posibilidad de eluir junto a cualquier otra actividad es mucho mayor. Además ambos enzimas presentan pHs óptimos de acción netamente diferentes.

DISCUSION

Posteriormente se comprobó que, en ambas parejas de enzimas, el punto isoelectrico resultó ser muy diferente por lo que pudieron ser fácilmente separadas mediante cromatografía en intercambio iónico. Este hecho descartó la posible existencia de un enzima de doble actividad. Sin embargo, esto no quiere decir que no haya una cooperación entre fosfatasas y nucleasas con unas condiciones de acción próximas y una localización celular coincidente, para la liberación de fosfato del ADN. Este punto ya ha sido sugerido por algunos autores (von Tigerstrom, 1984).

La presencia en una misma solución *in vitro* de actividad nucleasa y fosfatasa debida a diferentes enzimas no es rara y resulta una complicación adicional en los estudios de especificidad de sustrato de ambos tipos de enzimas, pues puede llevar a errores al calificar ambas actividades o en algunos estudios de caracterización (Schmidt y Laskowski, 1961).

Otra cuestión abierta a raíz de la purificación, radica en la naturaleza de la DNasa G. Este enzima, como se ha mencionado anteriormente, aparece en el frente de elución de la cromatografía en columna, independientemente del tipo de gel utilizado. En el frente eluye también el pigmento rojo característico de *M. coralloides* D, color que está presente de forma constante en las fracciones que contienen DNasa G hasta el último paso de la purificación, por lo que llegó casi a constituir una forma fácil, rápida y certera de reconocer en qué fracción de los diferentes experimentos realizados se encontraba la nucleasa G.

El color rojo de *M. coralloides* D es debido, como es característico en las mixobacterias en general, a pigmentos de naturaleza carotenoide (Greene y Leadbetter, 1962; Renwick y Peterson, 1969) localizados en la membrana citoplasmática de la célula (Kleining, 1972) aunque también pueden ser excretados al

DISCUSION

exterior. El hecho de que la DNasa G eluyera en el frente y estuviera siempre acompañada de los pigmentos celulares hizo pensar en la hipótesis de que estuviera unida a grandes trozos de membrana, de los que sólo se desprendería tras intercambio iónico. Esta unión debería ser fuerte aunque no de manera covalente ya que se separa tras intercambio iónico. Posteriormente, con objeto de la localización volverá a discutirse este punto.

Una vez que, mediante los pasos de purificación, se establecieron las bases para conseguir muestra idónea, se comenzaron los estudios de caracterización.

La aproximación al peso molecular se comenzó mediante cromatografía en Sephacryl S-200. Este gel presenta para polipéptidos un rango de separación de tamaños moleculares entre 5000 y 250000 daltons. Los pesos moleculares obtenidos, 31000 para la nucleasa P y 44000 para la DNasa M, son valores muy comunes entre las desoxirribonucleasas inespecíficas, así como los enzimas de restricción de tipo II. Por el contrario, la DNasa G al eluir en el frente presenta un tamaño molecular mucho mayor, superando los 250000 daltons e incluso los 600000 si atendemos a la elución en Sephadex G-200. Estas cifras tan elevadas no son inexistentes entre las DNasas, pero debemos restringirnos para encontrarlas, a las endonucleasas de restricción de tipo I preferentemente (Eskin y Linn, 1972), enzimas formadas por tres subunidades diferentes.

Sin embargo, la cromatografía mediante filtración en gel en las condiciones utilizadas presenta el problema de que se realiza con proteínas no desnaturalizadas cuya configuración molecular nativa puede interferir en la elución, presentando un peso molecular aparente distinto al real. Este problema se resuelve clásicamente

DISCUSION

mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. El peso molecular obtenido mediante este método fue ligeramente superior para las DNasas M y P (49000 y 39000 respectivamente) aunque manteniendo una relación entre ellos similar. Estos pesos moleculares, como se ha citado anteriormente, no son extraños entre las nucleasas, en las que, si bien es posible encontrar ejemplos de pesos moleculares mucho menores, como los 17000 daltons de la nucleasa estafilocócica (Alexandrescu *et al*, 1987), lo normal es encontrar ejemplos alrededor de los 39000 daltons (Kuhnlein, 1985; Lindler y Macrina, 1987) o incluso 48000, como es el caso de la nucleasa de *Neurospora crassa* (Martin *et al*, 1986b). Pesos moleculares superiores suelen corresponder normalmente a dímeros (Larson *et al*, 1987).

El caso de la DNasa G fue diferente. El peso molecular mostrado tras purificación y electroforesis en condiciones desnaturalizantes fue de 44000, muy distinto al obtenido tras cromatografía. Este hecho podía tener varios significados: o bien esta nucleasa es una macroproteína constituida por varias subunidades de un mismo peso molecular, o bien está unida a otras estructuras mayores, probablemente trozos de membrana, o bien, aun siendo un monómero, presenta una estructura terciaria excesivamente compleja que le hace eluir siempre en el volumen vacío de la columna preparativa.

Ciertamente, si la nucleasa G presenta una estructura cuaternaria, la electroforesis desnaturalizante no nos iba a aclarar si el monómero básico era original o si por el contrario se trataba de alguna de sus compañeras, ya que la diferencia entre el peso molecular de la DNasa G tanto con la nucleasa M como con la P (5000 daltons), no es suficientemente grande como para concluir determinadamente que no se trata de la misma proteína, especialmente, teniendo en cuenta la relación semilogarítmica que

DISCUSION

existe entre la movilidad relativa de los enzimas y sus pesos moleculares.

Lo que sí aclara en parte la cuestión es la electroforesis de las proteínas en condiciones no desnaturalizantes. Sólo una clara banda de ADN degradado se obtuvo en el gel cuando se aplicó la electroforesis a muestra con las tres DNasas. Si bien las proteínas y los patrones migraron con dificultad al permanecer en estado nativo, es cierto que la banda obtenida nunca podría corresponder a un peso molecular de 600000, sino más bien al peso obtenido una vez realizada la desnaturalización. Parece ser, por tanto, que el caso de una naturaleza multimérica de la DNasa G queda descartado. Las otras dos opciones se discutirán más adelante una vez conocidos nuevos datos.

El uso de inhibidores de proteasas (PMSF) durante la extracción de las desoxirribonucleasas tuvo efectos diferentes en la actividad específica de cada una de ellas. En general, la actividad neta aumentó en mayor o menor grado en las tres, destacando especialmente la DNasa M que dobló su actividad. Por otra parte, el uso de PMSF provocó un desplazamiento de la cantidad de proteína eluida tras comatografía hacia los primeros tubos de la columna. Esto hizo que el frente de elución aumentara en un 50% la concentración de proteínas, lo que conllevó que la actividad específica de la nucleasa G disminuyera ligeramente (alrededor de un 2%), aún cuando su actividad neta había aumentado. La DNasa M aumentó su actividad específica en más del doble, mientras que la nucleasa P la aumentó también aunque en menor grado.

En cualquier caso, en numerosas ocasiones era muy interesante que las nucleasas mostraran una actividad neta elevada

DISCUSION

aun cuando su actividad especifica no lo fuera tanto. Por otra parte, especialmente en el caso de la nucleasa G, era mucho más fácil retirar un exceso de proteínas contaminantes si se disponía de una actividad nucleásica fuerte, que purificar una actividad más débil a partir de un extracto menos contaminado. De hecho, este compuesto es normalmente usado en el estudio de nucleasas tanto extra como intracelulares (Greene et al, 1978; Focareta y Manning, 1986; Manachini et al, 1987; Aparicio et al, 1988).

Independientemente de esto, el uso de PMSF mostró que la DNasa M presenta una contribucion a la actividad nucleasa global de *M. coralloides* D mucho mayor de la que en un principio parecía.

El estudio de diferentes inhibidores específicos nos permite configurar un retrato robot del centro activo.

La N-etilmaleimida (NEM) no ejerció efecto alguno en las tres nucleasas. Dado que este compuesto reacciona de forma específica con los grupos sulfidrilos, se puede concluir que ningún grupo de esta naturaleza está implicado en la actividad catalitica de estas enzimas.

La carbodiimida (CYA) sí ejerció un efecto diferente en cada nucleasa, aunque siempre tratándose de una inhibición parcial. Este compuesto actúa preferentemente sobre los grupos carboxilos aunque su acción se hace extensiva también en mucho menos grado, sobre los grupos sulfidrilos. Sin embargo, si superponemos estos resultados a los del compuesto discutido anteriormente (NEM), podremos concluir que el efecto de la carbodiimida no está causado en absoluto por modificación de los grupos sulfidrilos. Por ello, se

DISCUSION

puede afirmar que los grupos carboxilos son parcialmente responsables de la funcionalidad del centro activo.

Normalmente, a niveles generales, la carbodiimida siempre suele tener un efecto claro en mayor o menor grado sobre las nucleasas, mientras que el efecto de la N-etilmaleimida es nulo o muy leve (Kaboev *et al*, 1985; Nasri y Thomas, 1987) aunque esto no es en absoluto una regla general, habiendo casos en que la sensibilidad a la NEM diferencia claramente a dos esquizómeros. Este es el caso de *Rsr I* y *Eco RI* en que la NEM elimina por completo la actividad del primero mientras que sólo la reduce en un 5% en el caso del segundo (Aiken y Gumport, 1988).

Si atendemos al modelo normalmente establecido para la catálisis del ADN por nucleasas inespecíficas, basado normalmente en el estudio de la nucleasa estafilocócica, veremos que la importancia de los grupos carboxilos es clara ya que, al menos, tres de estos grupos (dos restos de ácido aspártico y un glutámico) son importantes en el proceso (Serpesu *et al*, 1986). Estos grupos activos, utilizando un ión metálico divalente (en nuestro caso sería Mg^{2+} o Mn^{2+}) orientan el grupo fosfato del ADN que va a sufrir la rotura.

Posteriormente, dos histidinas van a dar lugar a una catálisis ácido-base concertada provocando una deslocalización de los electrones del grupo fosfato (Alexandrescu *et al*, 1987) que, a su vez, provoca la unión de éste con su propio azúcar formando un intermediario cíclico bpiramidal (Cedergren *et al*, 1987) que sufrirá finalmente un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua provocando la rotura.

Parece ser que también es muy importante en la desestabilización electrónica del grupo fosfato, la presencia de un

DISCUSION

residuo de lisina (Helene, 1977) lo cual se confirma por el hecho de la inactivación general producida por el glutaraldehído, que reacciona con dicho grupo, en todas las endonucleasas ensayadas (Nasri y Thomas, 1987). Es una lástima que este compuesto interfiriera tan fuertemente con el método de valoración utilizado, ya que nos podría confirmar esto mismo en nuestras nucleasas.

Por su parte, el ácido aurintricarboxílico (ATA) forma una sal triamónica que actúa uniéndose a la molécula de ADN, e impidiendo por tanto que este "encaje" en el centro activo de la nucleasa. El ATA es un compuesto ampliamente utilizado, tanto *in vitro* como *in vivo*, para la protección del ácido nucleico en procesos como extracción del material nuclear, transformación, transducción, etc... (Ramón et al, 1986) por lo que, bien solo o combinado con otros factores, podría abrir las puertas a procesos de manipulación genética en *M. coralloides* D.

En cuanto a la especificidad de sustrato, los resultados obtenidos con el plásmido pBR322 indican que tanto la DNasa M como la P pueden actuar como endonucleasas degradando el plásmido hasta su totalidad, sin producir en ningún caso bandas discretas. Endonucleasas de este tipo han sido previamente descritas (Aparicio et al, 1988) y se les atribuye un papel restrictivo, sin contar todos los enzimas con múltiples funciones implicadas en procesos citoplasmáticos con el ADN de la bacteria en cuestión, que no es nuestro caso, como se discutirá más adelante.

Por el contrario, de nuevo la nucleasa G mostró un comportamiento diferente al no degradar el plásmido en absoluto. Este hecho es importante y se volverá a discutir posteriormente con el estudio de la cinética enzimática.

DISCUSION

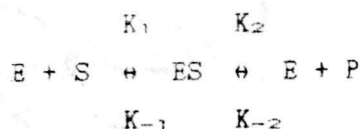
Hay que mencionar, por otra parte, que trabajos previos habian puesto de manifiesto que las tres DNasas degradaban ADN de lambda hasta su totalidad, sin producir bandas discretas, no degradaban ARN y sí degradaban ADN de cadena simple.

El ADN de cadena simple se consiguió mediante desnaturalización térmica del ADN de salmón y enfriamiento rápido en hielo para que la renaturalización fuera lo más desordenada posible, con una alta proporción de bucles y, por tanto, de ADN de cadena simple. El resultado fue la degradación total del sustrato en el caso de las nucleasas M y P, y en los tres casos la misma actividad que la obtenida con ADN control no desnaturalizado. Por ello, aún cuando no se puede indicar nada totalmente definitivo en este aspecto, sí obtenemos una información orientativa a favor de la degradación del ADN de cadena simple por parte de las tres DNasas. Esta es una cuestión aún abierta.

De todo esto nos queda, pues, que las DNasas de *M. coralloides* D parecen ser nucleasas específicas de ADN, tanto de cadena doble como simple que tienen actividad exo y endonucleolítica, con la excepción de la nucleasa G, que sólo se muestra como exonucleasa.

Las tres nucleasas de *M. coralloides* D tienen una cinética con respecto al sustrato típica de Michaelis-Menten. Según esta teoría, ideada en su concepción más simple para enzimas con un centro activo y un solo sustrato (Haldane, 1965), la reacción enzimática tiene lugar siguiendo la ecuación:

DISCUSION



Si la reacción es significativamente reversible, al principio de ésta, cuando [E] y [S] son muy altas, K_{-2} se puede considerar prácticamente nula, ya que el equilibrio de la reacción estará lejos de alcanzarse y habrá un desplazamiento neto hacia la derecha. En el caso de las nucleasas, la rotura del ADN no es reversible por lo que K_{-2} será, de hecho, cero. No es este el caso de la unión enzima-sustrato que sí puede ser perfectamente reversible.

En la cinética típica michaeliana, en un principio la formación de producto es de primer orden con respecto al sustrato, aumentando proporcionalmente cuando aumenta la concentración de éste. Esta situación se prolonga hasta que se produce la saturación del enzima, que alcanza la velocidad máxima de la reacción, y la curva se va acercando asintóticamente a este valor.

Este fue el caso de las tres DNasas, si exceptuamos una pequeña diferencia: tanto la nucleasa M como la P degradaron el ADN en su totalidad hasta alcanzar la saturación. Sin embargo, la DNasa G en ningún momento degradó todo el ADN de que disponía, sino que se limita a degradar una proporción más o menos constante de ADN, en torno al 65-70%, salvo, naturalmente, el caso de la saturación en que la degradación es paulatinamente más lenta.

Por otra parte, las constantes de Michaelis-Menten obtenidas para las tres nucleasas para ADN de salmón, a pH 8 y a sus temperaturas óptimas respectivas, son de 4.6×10^{-4} g.ml⁻¹ (DNasa P), 4.2×10^{-4} g.ml⁻¹ (DNasa M) y 4.6×10^{-4} (DNasa G). Esta constante engloba las constantes de la ecuación anterior, siendo:

DISCUSION

$$K_m = (K_{-1} + K_2)/K_1$$

y, por tanto, define la tendencia que hay en el sistema donde se da la reacción a deshacer el complejo ES, o lo que es lo mismo, su inversa es un indicativo de la afinidad del enzima por el sustrato.

Curiosamente, pues, los resultados obtenidos indican que a pesar de tener comportamientos cinéticos diferentes y una velocidad máxima distinta, los tres enzimas presentan una afinidad al sustrato muy similar, incluso la DNasa G cuya actividad global ha sido siempre mucho menor que la de sus compañeras.

El estudio de la degradación del sustrato respecto al tiempo dio resultados concordantes a los anteriores. El ensayo se realizó tomando tiempos de hasta una hora de incubación y eligiendo una relación [E]/[S] suficientemente baja como para asegurar que las nucleasas no degradarían el sustrato antes de tiempo.

En una cinética de este tipo encontramos tres fases diferentes que también se pueden observar en las DNasas de *M. coralloides*. La primera fase o estado presostenido, se caracteriza por que el cambio en [S] es insignificante en comparación con los cambios proporcionales en [E] o [ES]. La curva que representa la concentración de producto, que en su conjunto es sigmoideal, presenta aquí su primera zona más plana o zona "lag". Es el retardo que aparece en las tres dinámicas estudiadas, siendo más acusada en el caso de la DNasa G y menos, en la DNasa P. Este periodo "lag" no es extraño en el caso de las desoxirribonucleasas (Kaddurah-Daouk et al, 1985) aunque tampoco es general. Normalmente la preincubación con ADN suele disminuir esta fase, incluso la preincubación con ADN inespecífico (sin puntos de corte) en enzimas de restricción (Halford y Johnson, 1983). En nuestro caso, la preincubación, tanto

DISCUSION

del enzima como del sustrato, a la temperatura óptima disminuyó el periodo "lag" pero no lo eliminó.

La siguiente etapa es el estado sostenido, durante el cual no hay cambio en [ES], la evolución de [P] es de orden 1 con respecto al tiempo y es la fase ensayada rutinariamente en los estudios cinéticos (Halford y Goodall, 1987). Esta etapa también aparece en los tres enzimas, teniendo lugar una degradación del ADN proporcional al tiempo.

Si la reacción es reversible, esta segunda fase desemboca en el estado de equilibrio, donde los reactantes E y S han alcanzado sus concentraciones de equilibrio y ya no hay ningún cambio neto, aunque el flujo continúa en ambas direcciones.

Si la reacción es irreversible, se mantendrá en el estado sostenido hasta que se agote el sustrato. Este es el caso de las cinéticas estudiadas en las DNasas M y P.

El caso de la DNasa G vuelve a ser diferente, como era de esperar tras el estudio anterior. La velocidad de la reacción (que gráficamente es, en cada instante, la pendiente de la tangente a la curva) disminuye con el tiempo hasta que se anula. Sin embargo esto no es debido al estado de equilibrio puesto que la reacción no es significativamente reversible.

Parece ser que el factor que disminuye la actividad del enzima está directamente relacionado con el ADN disponible ya que es el único factor que varía en la cinética de Michaelis-Menten estudiada. Si el "techo" de actividad se debiera a la labilidad del enzima, que se inactivara en los diez primeros minutos de la reacción, el ADN degradado en la cinética con respecto a la

DISCUSION

concentración de sustrato sería siempre el mismo, y no proporcional a dicho sustrato disponible como de hecho ocurre.

El mismo caso es si el enzima necesitara de un cofactor que de alguna manera estuviera presente en la muestra y se agotara en los primeros minutos de incubación. Al ser éste el factor limitante de la reacción, la actividad pararía cuando dejara de ser disponible, independientemente de la proporción de sustrato.

El producto de la reacción, es decir, el ADN degradado, también podría ejercer inhibición sobre ésta, pero en este caso la inhibición sería mayor cuanto mayor sustrato estuviera presente. El porcentaje de ADN degradado sería cada vez menor y no constante, como ocurre aquí.

Por la misma razón, tampoco debe tratarse de una inhibición por exceso de sustrato. Este tipo de inhibición es muy común en aquellas nucleasas que necesitan estar en forma dimerica para cortar el ADN (Adler y Nathans, 1973). Al haber demasiados puntos de corte disponibles, las moléculas del enzima se reparten de forma que sólo una molécula de nucleasa se une a un punto de corte de ácido nucleico, sin que pueda llevarse a cabo la escisión.

Por último, sólo nos queda el caso de la disponibilidad de sustrato. Al caer la concentración de sustrato, obviamente, la actividad del enzima disminuye. Como se ha dicho anteriormente, en el ensayo se puso ADN en exceso, pero pudiera ser que no todo el ADN presente fuera sustrato idóneo para la DNasa G. En un principio se pensó que quizás esta nucleasa necesitara secuencias de corte específicas, y una vez agotadas estas secuencias, el ADN restante quedara sin degradar. Naturalmente esto exigiría que en cada corte la DNasa G produjera nucleótidos solubles en ácido, que es lo que realmente valora el método de la difenilamina mientras que los

DISCUSION

residuos de alto peso molecular precipitarían con el ácido tricloroacético. Esto, en sí, era posible. Así está el caso de los enzimas de restricción de tipo I que por cada corte realizado en el ADN liberan un número discreto de nucleótidos (Kimball y Linn, 1976). Sin embargo, esta teoría queda descartada dado que la DNasa G mostró que no tenía actividad endonucleolítica en el plásmido pBR322 ni producía bandas discretas en el ADN del fago λ .

Puede que la respuesta esté en que esta nucleasa necesita un tamaño molecular mínimo en el ADN para poder degradarlo a partir de un extremo. La necesidad de sustratos grandes no es extraña en el conjunto de las nucleasas. Así, *Hin* dIII necesita fragmentos de, al menos, 3000 pb (Piekarowicz y Brzezinski, 1980) aunque este fenómeno es más corriente en los enzimas de restricción, en concreto de tipo III, que en exonucleasas inespecíficas.

Otro capítulo de este estudio sobre las DNasas de *M. coralloides* D es el dedicado a su localización.

En principio se sabía que *M. coralloides* D no exportaba sus DNasas al exterior, ya que el sobrenadante de los medios de cultivo nunca había mostrado actividad. Puesto que la falta de detección podía ser debida a la dilución excesiva de las nucleasas al excretarse, dos litros de sobrenadante de un cultivo en fase exponencial fueron concentrados, mediante precipitación con sulfato amónico, a 5 ml y, tras dializar toda la noche se valoró la actividad nucleásica. El resultado siguió siendo el mismo.

Las nucleasas extracelulares presentan una frecuencia menor en la bibliografía que las unidas a fracciones celulares; son nucleasas inespecíficas y suelen estar relacionadas con un papel

DISCUSION

nutricional en la obtención de fosfato a partir de los ácidos nucleicos (Maeda y Taga, 1976; von Tigerstrom, 1981).

Sin embargo, es mucho más frecuente la detección de nucleasas celulares, quizás porque su búsqueda, directa o indirecta al estudiar enzimas de restricción, es mucho más intensa. Los enzimas de restricción suelen encontrarse normalmente en el espacio periplásmico o unidas a membranas (Mayer y Reichenbach, 1978; Kohring *et al*, 1985); también se han descrito nucleasas inespecíficas pero con un posible papel en la restricción de ADN extraño (Focareta y Manning, 1986; De los Reyes-Gavilán *et al*, 1987). En el caso de los sistemas metilación-restricción se han descrito casos en que, mediante anticuerpos marcados, se ha localizado la metilasa en el citoplasma y la endonucleasa en el espacio periplásmico (Gert-Wieland y Mayer, 1987), asegurando así mediante un doble mecanismo (metilación y diferente localización) la preservación del ADN propio de la función restrictiva.

Este segundo caso general es el de *M. coralloides* D por lo que el estudio se centró en la separación de las diferentes fracciones celulares, siguiendo una adaptación a nuestra bacteria de los métodos utilizados por Osborn *et al* (1972) para *Salmonella tiphimurium*, así como las variaciones aplicadas por Orndorff y Dworkin (1980) a *Myxococcus xanthus*.

Cabe resaltar que en este proceso, tanto para la obtención de esferoplastos como para su posterior lisis osmótica se necesitó más tiempo de incubación que el utilizado por Osborn *et al*, (1972). Esta variación ya está descrita en el primer caso para *M. xanthus*.

En cuanto a la separación de membranas, lo más destacable es la inversión de la localización de la membrana externa con respecto a la citoplasmática en el gradiente de densidad,

DISCUSION

apareciendo esta última con una mayor densidad que la externa. Este resultado es opuesto al descrito previamente en otras bacterias gram-negativas como *S. typhimurium* o *E. coli* (Schnaitman, 1970) sin embargo coincide con el resultado obtenido para *M. xanthus*. Este resultado, aunque es muy inusual, no es único. *Acinetobacter* sp también presenta esta característica aunque no de una forma tan clara y con la particularidad de que depende de las condiciones de cultivo (Scott et al, 1976)

Orndorff y Dworkin atribuyen la reversión de ambas membranas en *M. xanthus* a varios factores, entre ellos la pérdida de una alta cantidad de lipopolisacáridos durante la extracción de las membranas, el alto contenido fosfolipídico en la membrana externa (mucho menor en la mayoría de las bacterias gram-negativas) que disminuiría su densidad, y la presencia de los pigmentos típicos de mixobacterias de la membrana citoplasmática que aumentarían la densidad de ésta debido a su naturaleza hidrofílica. Estos pigmentos son también claramente visibles en *M. coralloides* D, dando una coloración rojiza a la banda correspondiente a la membrana citoplasmática, mientras que la membrana externa permanecía incolora.

Al valorar la actividad DNasa en cada una de las fracciones celulares destacó claramente el valor correspondiente al espacio periplásmico con una actividad específica de 1.7. Ninguna fracción igualó esta cantidad, incluida la membrana total con una cantidad específica de 0.074. Esto, en un principio, hizo descartar la idea de alguna DNasa unida a membrana. Sin embargo, al valorar las muestras correspondientes a las dos membranas diferenciadas se obtuvieron valores muy distintos. Si bien la membrana externa presentaba siempre valores residuales que no llegaban a superar nunca una actividad de 0.25 U por mg de proteína, en la membrana citoplasmática se llegaron a alcanzar valores de $1.1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

DISCUSION

Es necesario tener mucho cuidado al interpretar valores de actividad específica cuando la cantidad de proteína es o muy baja o muy alta porque pueden resultar actividades específicas "aparentes" que no reflejan la actividad real de la muestra. En el caso de la membrana citoplasmática el valor de actividad específica obtenido, bastante alto, podía ser consecuencia de este efecto, al haber baja cantidad de proteína. Sin embargo, la actividad neta era baja pero no despreciable y era al menos cuatro veces mayor que la hallada en la membrana externa, llegando incluso en alguna ocasión a multiplicarla por cuatro veces.

Por otra parte, la actividad neta obtenida en la fracción de membrana total era muy similar siempre a la hallada en la citoplasmática con la diferencia de que presentaba mucha más cantidad de proteína, lo que hacía caer enormemente la actividad específica.

Parece ser, por tanto, que la actividad obtenida en la membrana citoplasmática es real y con mucha probabilidad corresponde a la DNasa G si estudiamos sus características: eluye en los primeros tubos tras cromatografía en columna y, de forma constante, aparece acompañada de pigmentos citoplasmáticos.

Queda por resolver la cuestión de si la DNasa G es alguna de las otras dos nucleasas unida a membrana. La determinación de los pesos moleculares no ayudó a aclarar el problema. En la la Tabla 6 se encuentra un resumen de las principales características de las nucleasas. Como se puede observar, la DNasa G presenta más similitud con la M pero existen diferencias muy difíciles de obviar como son el diferente nivel de inhibición producido por la carbodiimida, la incapacidad de degradar el plásmido pBR322 por parte de la DNasa G

DISCUSION

Tabla 6. Resumen de las principales propiedades de las DNasas producidas por *M. coralloides* D.

| | DNasa G | DNasa M | DNasa P |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| Temp. óptima | 37°C | 33°C | 25°C |
| pH óptimo | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| Cofactor metálico | Mn ²⁺ | Mn ²⁺ | Mg ²⁺ |
| Fuerza iónica admitida (NaCl) | 0.15 M | 0.025 M | 0.025 M |
| Carga iónica a pH neutro | + | + | - |
| Peso molecular | 44000 | 49000 | 39000 |
| Inhibición por | | | |
| NEM | - | - | - |
| CYA | 10% | 30% | 20% |
| ATA | 100% | 100% | 100% |
| Act. endonucleasa | - | + | + |
| Km para ADN de salmón (g. ml ⁻¹) | 4.6x10 ⁻⁴ | 4.2x10 ⁻⁴ | 4.6x10 ⁻⁴ |
| Degradación del sustrato respecto al tiempo posible | No proporcional | Proporcional | Proporcional |
| localización | Mem. citopl. | Periplasma | Periplasma |

DISCUSION

y su incapacidad de degradar todo el sustrato disponible a lo largo del tiempo, cosa que no sucede con la DNasa M.

Parece ser, pues, que las tres actividades responden a enzimas diferentes y que *M. coralloides* D posee en su espacio periplásmico y/o unida a membranas tres desoxirribonucleasas inespecíficas que cubren un rango de acción amplio, como ya se ha dicho anteriormente, y que se mantienen con altos niveles de actividad a lo largo del tiempo de incubación del cultivo, aumentando incluso al final tanto del crecimiento vegetativo como de la formación de mixósporas, contrariamente a lo que ocurre con *M. xanthus*.

Su localización en el espacio periplásmico hace muy posible un papel restrictivo en la biología de esta mixobacteria, especialmente el caso de las nucleasas M y P. Son dos DNasas con un modo de acción similar, endonucleolíticas y periplásmicas, con una alta actividad y que son capaces de degradar ADN mientras esté disponible. Existen casos de restricción de este tipo. En concreto, en diversas especies de *Streptomyces* que parecían tener un sistema de restricción-modificación por el hecho de no presentar fagos propios (Sánchez *et al*, 1985) han mostrado tener desoxirribonucleasas inespecíficas en el espacio periplásmico, quizás unidas a membranas, que cubren esta función restrictiva (De los Reyes-Gavilán *et al*, 1987; Aparicio *et al*, 1988). Estas DNasas producen primero cortes endonucleolíticos en el ADN, degradándolo a continuación en su totalidad.

Es un retrato muy similar al de las DNasas M y P. Para un organismo que vive en el suelo, de la degradación de macromoléculas del ambiente, le debe ser mucho más económico producir nucleasas inespecíficas que sistemas de restricción-modificación, ya que con ellas puede cubrir otras posibles funciones de tipo nutritivo muy

DISCUSION

importantes también en este tipo de habitats. El hecho de que las nucleasas sean periplásmicas y no se exporten al exterior coloca al papel nutritivo en un segundo lugar pero no por ello menos importante. Las nucleasas no tienen acceso al ADN presente en el medio, pero una vez que el ADN penetra hasta el espacio periplásmico y tras haberse producido la función restrictiva, es mucho más positivo degradarlo en su totalidad. Con ello no sólo se evita la posible entrada en la célula de los restos del ácido nucléico y su posible recombinación con el ADN mixobacteriano, sino que además se proporciona fosfato, azúcares y bases nitrogenadas que pueden ser transportadas al interior.

En este sentido, las fosfatasas de *M. coralloides* D están también unidas a membranas (González et al, 1988) y, especialmente la fosfatasa alcalina, que tiene un pH óptimo de 8 y una temperatura óptima similar, podría cooperar con las nucleasas. La producción de fosfatasas y nucleasas ha sido estudiada en diversos microorganismos deslizantes como varias especies de *Capnocytophaga* (Poirier y Holt, 1983), *Cytophaga* y *Lysobacter enzimogenes* (von Tigerstrom, 1984; von Tigerstrom y Stelmaschuck, 1987).

Por otra parte, se ha descrito que durante la predación y fructificación se produce el lanzamiento de componentes del peptidoglicano desde las paredes celulares (Wireman y Dworkin, 1972; Sudo y Dworkin, 1972) con objeto de inducir ondulamiento en el enjambre. También durante la formación de mixósporas, las paredes celulares se debilitan y son mucho más sensibles a los agentes erosivos, favoreciendo más la lisis en la fructificación lo que para algunos autores (Zusman, 1984) da un significado no cooperativo a este fenómeno.

Esto nos indica que la compartimentación de los enzimas que se hayan en el espacio periplásmico no es algo rígido y que en

DISCUSION

un momento determinado en que sean necesarios (la predación o la fructificación) pueden ser lanzados al exterior y ponerse en contacto con el sustrato. Incluso, durante la fructificación, en que, según la teoría clásica, hay una autólisis del 80% de las células con objeto de "alimentar" al 20% restante, las nucleasas de las células lisadas entrarían en contacto con su propio ADN para degradarlo y proporcionar fósforo, azúcares y nitrógeno al resto de las células, asegurando al mismo tiempo que, en un momento en que las células supervivientes tienen unas membranas algo desorganizadas y lábiles, ningún ADN foráneo pueda penetrar y alterar el equilibrio genético del enjambre que en un futuro aparecerá a partir de este cuerpo fructificante.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las tres actividades DNasas detectadas en el extracto libre de células de *Myxococcus coralloides* D responden a tres enzimas diferentes denominados DNasa G, DNasa M y DNasa P, cuyos pesos moleculares se estiman en 44000, 49000 y 37000 daltons respectivamente.
2. De acuerdo con el efecto de los inhibidores específicos estudiados, la actividad de las tres nucleasas depende fuertemente de su unión al sustrato, recae parcialmente en grupos carboxilos y no depende de grupos sulfidrilos.
3. Dos de los enzimas estudiados, las DNasas M y P, tienen actividad endonucleolítica, mientras que no ocurre lo mismo con la DNasa G.
4. Las tres DNasas responden a una típica cinética de Michaelis-Menten, con Km similares. Tanto la DNasa M como la P degradan el ADN proporcionalmente hasta agotar el sustrato, mientras que la DNasa G no llega a degradarlo completamente.
5. Las DNasas M y P se encuentran localizadas en el espacio periplásmico, mientras que la DNasa G se relaciona con la membrana citoplasmática.
6. La actividad DNasa total de *Myxococcus coralloides* D se mantiene alta tanto a lo largo del crecimiento vegetativo como de la formación de mixósporas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adye, J.C. & Powelson, D.M. 1961. Microcyst of *Myxococcus xanthus*: Chemical composition of the wall. *J. Bacteriol.* 81: 780-785.
- Aiken, C. & Gumpert, R.T. 1988. Restriction endonuclease *Rsr* I from *Rhodobacter sphaeroides*, an isoschizomer of *Eco* RI: purification and properties. *Nucleic Acid Research*, 16:7901-7916.
- Alexandrescu, A. T., Mills, D.A., Ulrich E.L., Chinami, M. & Markley, J.L. 1988. *Biochemistry*, 27: 2158-2165.
- Ando, T. 1966. A nuclease specific for heat-denatured DNA isolated from a product of *Aspergillus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 114:158.
- Aparicio, J.F., De los Reyes-Gavilán, C.G., Barbés, C., Hardisson, C, Sánchez, J. 1988. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 2345-2351
- Araki, T. 1903. *Z. Physiol. Chem.* 38:84.
- Arber, W. & Dussoix. 1962. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage λ . *J. Mol. Biol.*, 5: 18.
- Arber, W. 1965 Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. V. The role of methionine in the production of host specificity. *J. Mol. Biol.*, 11: 247.
- Arber, W., Yuan, R. & Bickle, T.A. 1974. Strain specific modification and restriction of DNA in bacteria. *FEBS Proc. Meet.* 9: 3.

BIBLIOGRAFIA

- Arias, J.M. & Montoya, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides* D. *Microbios Letters*, 5: 81-84.
- Arias, J.M., Rodríguez, C. & Montoya E. 1979. Purification and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. *J. Antibiot. (Tokio)*, 32: 205-211.
- Báchi, B., Reiser, J. & Pirrotta, V. 1979. Methylation and cleavage sequences of the *Eco* PI restriction-modification enzyme. *J. Mol. Biol.*, 128: 143.
- Bacon, K. & Rosenberg, E. 1967. Ribonucleic acid synthesis during morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 94: 1883-1889.
- Behrens, H., Flossdorf, J. & Reichenbach, H 1976. Base composition of deoxyribonucleic acid from *Nannocystis exedens* (Myxobacterales). *Int. J. Systematic Bacteriol.*, 29: 561-562.
- Benhamú, C. 1978. Estudios sobre fenómenos de autólisis en *Myxococcus coralloides*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Bertani, G. & Weigle, J.J. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.*, 65: 113.
- Boyer, H.W., Scibiensky, E., Slocum, H. & Roulland-Dussoix, D 1971. The *in vitro* restriction of the replicative form of W.T. and mutant fd phage DNA. *Virology* 46: 703.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

BIBLIOGRAFIA

- Brown, N.L., Burchard, R.P., Morris, D.W., Parish, J.H., Stow, N.D. & Tsopanakis, D. 1976. Phage and defective phages of strains of *Myxococcus*. Arch. Microbiol. 108: 271-279.
- Burchard, A.C. 1974. Studies on gliding motility in *Myxococcus xanthus*. Arch. Microbiol., 99: 271-280.
- Burchard, A.C., Burchard, R.P. & Kloetzel, J.A. 1977. Intracellular, periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 132: 666-672.
- Cashel, M. & Gallant, J. 1969. Two compounds implicated in the function of the R.C. gene in *Escherichia coli*. Nature (London). 221: 838-841.
- Cedergren, R., Lang, B.F. & Gravel, D. 1987. A mechanism for the RNA-catalyzed formation of 5'-phosphates: The origin of nucleases. FEB, 226: 63-66.
- Cozzarelli, N.R. 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. Science, 207: 953.
- De los Reyes-Gavilán, C.G., Aparicio, J.F., Barbés, C., Hardisson, C. & Sánchez, J. 1988. An exocyttoplasmic Endonuclease with restriction function in *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol., 170: 1339-1345.
- Dworkin, M. & Gibson, S.M. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: Rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. Science. 146: 243-244.
- Dworkin, M. 1973. Cell-cell interactions in the myxobacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 23:125.

BIBLIOGRAFIA

Eisenberg, S. Griffith, J. & Kornberg, A. 1977. ϕ X174 cistron A protein is a multifunctional enzyme in DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 3198.

Eskin, B. & Linn, S. 1972. The deoxiribonucleic acid modification and restriction enzymes of *Escherichia coli* B. II: Purification, subunit structure and catalytic properties of the restriction endonuclease. J. Biol. Chem. 247: 6183.

Fernandez-Vivas, A., Arias, J.M. & Montoya E. 1983. Autolysis in *Myxococcus coralloides* D. FEMS Microbiol. Letters. 20: 97-101.

Finck, G. 1950. Biologische und stoffwechselphysiologische studien an Myxococcaceen. Arch. Mikrobiol. 15: 358-388.

Focareta, T. & Manning, P. A., 1987. Extracelular proteins of *Vibrio cholerae*: molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of the deoxirribonuclease (DNase) together with its periplasmic location in *E. coli*. Gene, 53: 31-40.

Gellert, M. 1981. DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem. 50: 879.

Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. & Trowitzsch, W. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. (Tokyo) 33: 1474-1479.

Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. 1982. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). J. Antibiot. (Tokyo). 35: 1101-1103.

BIBLIOGRAFIA

- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. & Trowitzsch, W. 1982. The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (*Myxobacterales*). J. Antibiot. (Tokyo). 35: 1454-1459.
- Gillen, J.R., Willis, D.K. & Clarck, A.J., 1981. Genetic analysis of the *recE* pathway of genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 145: 521.
- Goldmark, P.J. & Linn, S 1972. Purification and properties of the *recBC* DNase of *Escherichia coli* K 12. J. Biol. Chem., 247:1849.
- Golomb, M., Grandgenett, D.P. & Mason, W. 1981. Virus-coded DNA endonuclease from avian retrovirus. J. Virol., 38: 548.
- Gnospeilius, G. 1978a. Purification and preparations of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. J. Bacteriol. 133: 17-25.
- Gnospeilius, G. 1978b. Myxobacterial slime and proteolytic activity. Arch. Microbiol. 116: 51-59.
- González, F. 1988. Estudio de las fosfatasas y de aspectos del metabolismo del fosfato en *Myxococcus coralloides* D. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Greene, P.J., Heyneber, A.L.; Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Betlash, M.C.; Covarrubias, A.A.; Backman, K; Russel, D.J., Tait, R., Boyer, H.W. 1978. A general method for the purification of restriction enzymes. Nucleic Acids Research, 5: 2373-2358.
- Greene, P.J., Gupta, M., Boyer, H.W., Brown, W.E. & Rosenberg, J.M. 1981. Secuence analysis of the DNA encoding *Eco* RI endonuclease and methylase. J. Biol. Chem. 256: 2143.

BIBLIOGRAFIA

Greene, P.J., Ballard, B.T., Stephenson, F., Kohr, V.J., Rodriguez, H., Rosenberg, J.M., Boyer, H.W. 1988. Purification and characterization of the restriction endonuclease *Rsr* I, an isoeschizomer of *Eco* RI. *Gene*, 68: 43-52.

Gunthert, U, Freund, M. & Trautner, T.A. 1981. Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: Two DNA methyltransferases with *Bsu* RI specificity: Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 256: 9340.

Hadi, S.M., Bächli, B., Shepherd, J.C.W., Yuan, R., Ineichen, K. & Bickle, T.A.. 1979. DNA recognition and cleavage by the *Eco* P15 restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.*, 134: 655.

Halford, S.E. & Goodall, A.J. 1988. Modes of DNA cleavage by the *Eco* RV restriction endonuclease. *Biochemistry*, 27: 1771-1777.

Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. & Smith, C.A. 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 783.

Harcke, E., Hüttermann, A. & Kühlwein, H. 1971. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (*Myxobacterales*). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. *Arch. Microbiol.* 77: 86-95.

Harcke, E., Hüttermann, A. & Kühlwein, H. 1972. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (*Myxobacterales*). II. Identification of the bacteriolytic enzyme as a muramidase. *Arch. Microbiol.* 85: 6-12.

Haská, G. & Stabl, S. 1971. Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime. *Physiol. Plant*, 24: 136-142.

BIBLIOGRAFIA

Haská, G., Morén, B. & Odham, G. 1972. Effect of fatty acids on the activity of bacteriolytic enzymes. *Physiol. Plant.* 27: 187-194.

Haská, G. 1974. Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. IV. Purification and characterization of a D-alanyl- ϵ -N-lysine endopeptidase. *Physiol. Plant.* 31: 251-256.

Heumann, H. G. & Külwein, H. 1979. Effectes of drugs that influence eucariotic motile processes on motility of *Cystobacter fuscus* (*Myxobacterales*). *Z. Allg. Mikrobiol.*, 19: 547-552.

Hirsch, H.J. 1977. Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). *Arch. Microbiol.* 115: 45-49.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. 1979a. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*Myxobacterales*): genes controlling movements of single cells. *Mol. Gen. Genet.* 171: 167-176.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. 1979b. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*Myxobacterales*): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* 171: 171-191.

Irschik, H., Gerth, K., Kemmer, T., Steinmetz, H. & Reichenbach, H.. 1983. The myxovalargins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). *J. Antibiot. (Tokyo)* 36: 6-12.

Jahn, E. 1924. Beiträge zur botanischen Protistologie. I. Die poliangiden. Leipzig: Gebrüder Borntraeger.

Jack, W.E., Rubin, R.A., Newman, A. & Modrich, P. 1980. Structures and mechanisms of *Eco* RI restriction and modification enzymes. In *Gene amplification and analysis, vol. I: Restriction endonucleases*. Ed. J.G. Chirikjian, p.165. Elsevier-North Holland, New York.

BIBLIOGRAFIA

Kaddurah-Daouk, R., Cho, P. & Smith, H.O. 1985. Catalytic properties of the *Hha* II restriction endonuclease. *J. Biol. Chem.*, **260**: 15345-15351.

Kaiser, D. & Crosby, C. 1983. Cell movement and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motility*. **3**: 227-245.

Katnelson, H.K., Gillespie, D.C. & Cook, F.D. 1964. Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganisms. III. Lytic action of soil myxobacters on certain species of nematodes. *Can. J. Microbiol.*, **10**: 699-704.

Kauc, L & Pickarowicz, A. 1978. Purification and properties of a new restriction endonuclease from *Haemophilus influenzae* Rf. *Eur. J. Biochem.* **92**: 417-449.

Keller, K.H., Grady, M. & Dworkin, M. 1983. Surface tension gradients: feasible models for gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **155**: 1358-1366.

Kelly, S., Kaddurah-Daouk, R. & Smith, H.O. 1985. Purification of the *Hha* II restriction endonuclease from an overproducer *E. coli* clone. *J. Biol. Chem.*, **260**: 15339-15344.

Kerr, C. & Sadowski, P.D. 1972. Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. II. Mechanism of the reaction. *J. Biol. Chem.* **247**: 305.

Kerr, C. & Sadowski, P.D. 1975. The involvement of genes 3, 4, 5 and 6 in genetic recombination in bacteriophage T7. *Virology*, **65**: 281.

BIBLIOGRAFIA

Kimball, M. & Linn, S. 1976. The release of oligonucleotides by the *Escherichia coli* B restriction endonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **68**: 585.

Kohring, G.W. & Mayer, F. 1987. In situ distribution of *Eco* RI methylase and restriction endonuclease in cells of *E. coli* Bs 5. *FEB*, **216**: 207-210.

Kornberg, A. 1980. DNA replication. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

Kühlwein, H. 1953. Weitere Untersuchungen an Myxobakterien. *Arch. Microbiol.*, **19**: 365-371.

Kuninaka, A., Kibi, M., Yoshino, H. & Sakaguchi, K. 1961. Studies on 5' phosphodiesterase in microorganisms. Part II. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterase. *Agric. Biol. Chem.* **25**: 693.

Kunitz, M. 1950. Crystallin deoxyribonuclease. I. Isolation and general properties. Spectrometric method for measurement of deoxyribonuclease activity. *J. Gen. Physiol.* **33**: 349-362.

La Rossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. & Kaiser, D. 1983. Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*. Analysis of mutants. *J. Bacteriol.* **153**: 1394-1404.

Laskowski, M., Sr. 1959. Enzymes hydrolyzing DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **81**: 776.

Laskowski, M., Sr. 1985. Historical perspectives. In *Nucleases*. Ed. S.M. Linn & R.J. Roberts. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1985.

BIBLIOGRAFIA

- Laval, F. 1974. Endonuclease activity associated with purified PM2 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**: 4965.
- Linn, S. 1967. An endonuclease from *Neurospora crassa* specific for polynucleotides lacking an ordered structure. *Methods Enzymol.*, **12A**: 247.
- Little, J.W. 1967. AN exonuclease induced by bacteriophage λ . II. Nature of the enzyme reaction. *J. Biol. Chem.*, **242**: 679.
- Livingston, D.M. & Richardson, C.C. 1975. Deoxyribonucleic acid polymerase III of *Escherichia coli*. Characterization of associated exonuclease activities. *J. Biol. Chem.*, **150**: 470.
- Loebeck, M.E. & Klein, H.P. 1956. Substrates for *Myxococcus virescens* with special reference to eubacterial fractions. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 281-289.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. 1983. A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. *Arch. Microbiol.*, **135**: 58-62.
- Luria, S.E. & Human, M.L. 1952. A non-hereditary, host induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **64**: 557.
- MacDonald, M.R. 1955. Deoxyribonucleases. In *Methods in Enzymology*, vol. II. Ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan. Academic Press. New York. pp. 437-447.
- Maeda, M & Taga, N. 1976. Extracellular nuclease produced by a marine bacterium. II. Purification and properties of extracellular nuclease from a marine *Vibrio* sp. *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1443-1452.

BIBLIOGRAFIA

- Manachini, P.L., Parini, C. Fortina, M.G. & Benazzi, L. 1987. *Bli I*, a restriction endonuclease from *Bacillus licheniformis*. *FEB*, 214: 305-307.
- Mandel, M. & Leadbetter, E.R. 1965. Deoxiribohucleic acid base composition of myxobacteria. *J. Bacteriol.*, 90: 1795-1796.
- Manoil, C. & Kaiser, D. 1980. Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* 141: 297-304.
- Martin, S.A., Ullrich, R.C. & Meyer, W.L. 1986. Partial purification and properties of a nuclease from *Schizophillum commune* with a preference toward single-stranded nucleic acid. *Bioch. et Bioph. Acta*, 867: 67-75.
- Martínez-Cañamero, M. 1986. Desoxirribonucleasas de *Myxococcus coralloides* D. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Mason, D.J. & Powelson, D. 1958. The cell wall of *Myxococcus xanthus*. *Biochem. Biophys. Acta*, 29: 1-7.
- Mayer, H. & Reichenbach, H. 1978. Restriction endonucleases: general survey procedure and survey of gliding bacteria. *J. Bacteriol.* 136: 708-713.
- Meselson, M., Yuan, R. & Heywood, J. 1972. Restriction and modification of DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 447.
- McCurdy, H.D. & MacRae, T.H. 1974. Xanthacin. A bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb. *Can. J. Microbiol.*, 20: 131-135.

BIBLIOGRAFIA

McCurdy, H.D. & Wolf, S. 1967. Deoxiribonucleic acid base composition of fruiting Myxobacterales. *Can. J. Microbiol.*, 13: 1707-1708.

Meyer-Pietschmann, K. 1951. Lebendbeobachtungen an *Myxococcus rubescens*. *Arch. Mikrobiol.* 16: 163-176.

Modrich, P & Zabel, D. 1976. *Eco* RI endonuclease: Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.*, 252: 7273.

Morris, D.W. & Parish, J.M. 1976. Restriction in *Myxococcus virescens*. *Arch. Microbiol.* 108: 227-230.

Muñoz, J. 1985. Estudios sobre fagos y partículas similares a colas de fago de *Myxococcus coralloides* D. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Muñoz, J., Arias, J.M. & Montoya, E. 1984. Production and properties of a bacteriocin from *Myxococcus coralloides* D. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 69-74.

Nasri, M. & Thomas, D. 1987. Immobilization of the restriction Endonucleases *Fuv* II and *Hin* dIII. *Appl. Bioch. Biotech.*, 15: 119-130.

Newman, A.K., Rubin, R.A., Kim, S.H. & Modrich, P. 1981. DNA sequences of structural genes for *Eco* RI DNA restriction and modification enzymes. *J. Biol. Chem.*, 256: 2131.

Norén, B. 1955. Studies on myxobacteria. III. Organic factors in nutrition. *Särtryck Bot. Notiser.* 108: 81-134.

BIBLIOGRAFIA

O'Connor, K.A. & Zusmann, D.R. 1987. Reexamining the role of autolysis in the developmental cycle of *Myxococcus xanthus*. XIV International Conference on the Biology of the Myxobacteria. Pingree Park. Colorado.

Peterson, E.A., Gillespie, D.C. & Cook, F.D. 1966. A wide-spectrum antibiotic produced by a specie of *Sorangium*. Can. J. Microbiol. 12: 221-230.

Piekarowicz, A. 1982. *Hin* eI is an isoschizomer of *Hin* fIII restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 157: 373.

Piekarowicz, A., Kauc, L. & Glover, S. W. 1974. Host specificity of DNA in *Haemophilus influenzae*: the two restriction and modification systems in strains Rb and Rf. J. Gen. Microbiol., 81: 391.

Piekarowicz, A., Bickle, T. A., Shepherd, J.C.W. & Ineichen, K. 1981. The DNA sequence recognized by the *Hin* fIII restriction endonuclease. J. Mol. Biol., 146: 167.

Poirier, T.P. & Holt, S.C. 1983. Acid and alkaline phosphatases of *Capnocytophaga* species. I. Production and cytological localization of the enzymes. Can. J. Microbiol., 29: 1350-1360.

Orndorff, P. E. & Dworkin, M. 1980. Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of Vegetative cells of *Myxococcus xhantus*. J. Bacteriol. 141: 914-927.

Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., & Carson, J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella tiphimurium* iolación and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 274: 3962-3972.

BIBLIOGRAFIA

Ramón, D., Ferrer, S., Vicente, E. & Uruburu, F. 1986. Aurintricarboxilic acid as a nuclease inhibitor in fungal protoplasts. FEMS Microbiol. Letters,

Reichenbach, H. 1965. Untersuchungen an *Archangium violaceum*. Ein Beitrag zur Kenntnis der Myxobacterien. Arch. Mikrobiol., 52:376-403.

Reichenbach, H. 1974. Die biologie der myxobacterien. Biologie in unserer Zeit, 4:33-45.

Reichenbach, H. 1981. Taxonomy of the gliding bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 35: 339-364.

Reichenbach, H. 1984. Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes. In "Myxobacteria: development and cell interactions", ed. H. Rosenberg. Springer-Verlag. New York. pp 1-50.

Rodríguez, C., Arias, J.M. & Montoya, E. 1979. Demonstration of cell surface enzymes with esterase activity in *Myxococcus xanthus*. Microbios Letters. 8: 129-132.

Rodríguez, C. & Montoya, E. 1980. Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos producidos por *Myxococcus xanthus*. Anales de Edafología y Agrobiología. XXXIX (1-2): 169-176.

Rosamond, J., Endlich, B. & Linn, S. 1979. Electron microscopic studies of the mechanism of action of the restriction endonuclease of *Escherichia coli* B. J. Mol. Biol. 129: 619.

Rosenberg, E., Vacks, B & Zuckerberg, A. 1973. Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 507-513.

BIBLIOGRAFIA

Rosenberg, E. & Varon, M. 1984. Antibiotics and lytic enzymes in Myxobacteria: Development and cell interactions., Rosenberg, E., Ed, Springer-Verlag, New York, pp109-125.

Sain, B. & Murray, N.E. 1980. The *hsd* (host specificity) genes of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, 180: 35.

Sánchez, J., Barbés, C., Hernández, H., De los Reyes-Gavilán, C.R.G. & Hardisson, C., 1985. Restriction-modification systems in *Streptomyces antibioticus*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 942-946.

Schnaitman, C.A. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 104: 890-901.

Schneider, W.C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In *Methods in Enzymology*, vol. III. Ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan. Academic Press. New York. pp. 680-684.

Schmidt, G & Laskowski, M. 1961. Phosphate ester cleavage (survey). In *The Enzymes*, vol. 5. Ed. P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback. Academic Press. New York. pp. 3-35.

Scott, C.C.L., Makula, R.A., & Finnerty, W.R. 1976. Isolation and purification of membranes from an hydrocarbon-oxidizing *Acinetobacter* sp. *J. Bacteriol.* 127:469-480.

Serpesu, E.H., Shortle, D. & Mildvan, A.S. 1987. Kinetics and Magnetic Resonance Studies of Active-Site Mutants of *Staphylococcal Nuclease: Factors contributing to catalysis*. *Biochemistry*, 26: 1289-1300.

Shinkets, L. & Kaiser, D. 1982a. Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 152: 462-470.

BIBLIOGRAFIA

- Shinkets, L. & Kaiser, D. 1982b. Induction of coordinated cell movement in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 152: 451-461.
- Singh, B.N. & Sing, N.B. 1971. Distribution of fruiting myxobacteria in Indian soils, bark of trees and dung of herbivorous animals. Indian J. Microbiol. 11: 47-92.
- Smith, H.O. & Nathans, D. 1973 A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. J. Mol. Biol. 81: 419.
- Smith, L.A. & Chirikjian, J.G. 1979. Purification and characterization of the sequence-specific endonuclease *Bam* HI. J. Biol. Chem., 254: 1003.
- Sørhaug, T. 1974. Glycerol ester hydrolase, lipase of *Myxococcus xanthus* fb. Can. J. Microbiol. 20: 611-615.
- Stackebrand, E. & Woese, C.R. 1982. The evolution of procarriotes. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 32: 1-31.
- Stephens, K., Hegeman, G.D. & White, D. 1982. Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. J. Bacteriol. 149: 739-747.
- Sudo, S.Z. & Dworkin, M. 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 110: 236-245.
- Sung, S. C. & Laskowski, M. Sr. 1962. A nuclease from mung bean sprouts. J. Biol. Chem., 237: 506.
- Sutherland, I.W., Thompson, S. 1975. Comparison of polysaccharides produced by *Myxococcus* strains. J. Gen. Microbiol., 89: 124-132.

BIBLIOGRAFIA

Thaxter, R. 1892. On the myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Botan. Gazette*, 17: 389-406.

von Tigerstrom, R.G. 1981. Extracellular nucleases of *Lysobacter enzymogenes*: purification and characterization of a ribonuclease. *Can. J. Microbiol.* 27: 1080-1086.

von Tigerstrom, R.G. 1984. Purification of two phosphatases by *Lisobacter enzymogenes* and purification and characterization of the extracellular enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 693-698.

von Tigerstrom, R.G. & Stelmaschu K., S. 1987. Comparison of the *Lisobacter enzymogenes* with those of related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 3121-3127.

Warner, H.R., Persson, M.L., Bensen, R.J., Mosbaugh, D.W. & Linn, S. 1981. Selective inhibition by harmane of the apurinic/aprimidinic endonuclease activity of phage T4-induced UV endonuclease. *Nucleic acid Res.*, 9: 6083.

White, D., Dworkin, M. & Tipper, D.J. 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: Structure and relation to morphogenesis. *J. Bacteriol.* 95: 2186-2197.

Weiss, B. 1981. Exodeoxyribonucleases of *Escherichia coli*. In *The Enzymes*, vol. XIV. Ed. P.D. Boyer. Academic Press. New York. pp. 203-231.

Wireman, J. V. & Dworkin, M. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science*. 189: 516-522.

BIBLIOGRAFIA

Wireman, J.W. & Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 129: 796-802.

Yoakum, G.H. & Grossman, L. 1981. Identification of the *Escherichia coli* *uvrC* gene product. Nature, 292: 171.

Yoo, O.J. Agarwal, K.L. 1980. Isolation and characterization of two proteins possessing *Hpa* II methylase activity. J. Biol. Chem., 255: 6445.

Yuan, R. & Meselson, M. 1970. A specific complex between a restriction endonuclease and its DNA substrate. Proc. Natl. Acad. Sci., 65: 357.

Yuan, R., Bickle, T.A., Ebbers, W. & Brack, C. 1975. Multiple steps in DNA recognition by restriction endonuclease from *Escherichia coli* K. Nature, 256: 556.

Yuan, R., Hamilton, D.L. & Burckhardt, J. 1980. DNA translocation by the restriction enzyme from *Escherichia coli* K. Cell, 20: 237.

Zusman, D.R. 1984. Developmental program of *Myxococcus xanthus*. In "Myxobacteria: developmental and cell interactions. Ed. E. Rosenberg, Springer-Verlag, New York. pp 185-213.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de
fecha, constituido por:

- D. Enrique Montoya Gómez
- D. Francisco Muñillo Arango
- D. José M^a Arias Peñalver
- D. Eulogio J. Bedmar Gómez
- D. José Antonio Lupiáñez Cava

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Doña
María Magdalena Martínez Cañamero

se acordó por unanimidad otorgar la calificación de Apto con laude
y para que conste, se extiende firmada por los
componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 14 de Septiembre de 1989

El Secretario,



José A. Lupiáñez Cava

El Presidente,



Enrique Montoya Gómez

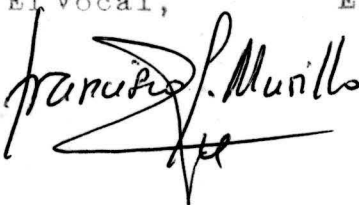
El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



José M. Arias Peñalver



Francisco Muñillo



Eulogio J. Bedmar

