

# Práctico 9

## Genómica comparada

Objetivo: Mediante la comparación de dos genomas completos de bacterias cercanamente emparentadas, una infecciosa y otra no, se pretende destacar las potencialidades de la genómica comparada como herramienta para poner a prueba hipótesis en biología evolutiva.

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular causante de listeriosis, tanto epidémica como esporádica. Es una enfermedad transmitida por el alimento, particularmente peligrosa en recién nacidos, ancianos, embarazadas y pacientes inmunodeprimidos. Una vez ingerida, se dirige desde el lumen intestinal hacia el sistema nervioso y a la placenta, causando meningitis, meningo-encefalitis, septicemia, aborto espontáneo, infecciones perinatales y gastroenteritis. Se ha encontrado en varios animales domésticos y en un amplio rango de condiciones (temperatura, salinidad, etc.), incluso extremas. Poco se conocía sobre las bases moleculares de su patogenicidad, hasta que en 2003 fue secuenciado completamente su genoma y el de una especie cercanamente emparentada no patógena, *L. innocua*.

Buchrieser y cols. (2003), plantean que la patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la adquisición (por transferencia horizontal), de genes de proteínas de superficie, en particular internalinas, InlB (necesarias para entrar a las células eucariotas) o ActA, que juega un papel clave en la movilidad basada en actina. Así mismo, ambas especies presentan un conjunto de genes homólogos a los de *Salmonella* que les permitirían tener metabolismo anaeróbico.

### Familiarización con el programa

Descargar el programa Artemis Comparison Tool (ACT) del sitio web del Instituto Sanger (<http://sanger-pathogens.github.io/Artemis/ACT/>) y elegir la opción de acuerdo a su sistema operativo (Windows, Linux, Mac). Este programa requiere de la plataforma Java para poder ejecutarse. Descargar la versión actualizada de Java del siguiente sitio: <https://www.oracle.com/java/technologies/javase-jdk15-downloads.html>.

Abrir el programa Artemis Comparison Tool (ACT) haciendo click derecho sobre el archivo [act.jar](#), “abrir con” e indicar la aplicación Java. Cargar los siguientes tres archivos en el siguiente orden:

Ir a File / Open...

Sequence file 1: [L\\_innocua.embl](#) - genoma de *L. innocua*,

Comparison file 1: [comp\\_innocua\\_vs\\_monocytogenes.txt](#) - comparación entre ambos genomas

Sequence file 2: [L\\_monocytogenes.embl](#) - genoma de *L. monocytogenes*

Estas secuencias con su descripción se pueden obtener de internet en forma gratuita.

Una vez abierto el programa ACT reconocer las diferentes regiones de la interfase: la secuencia de *L. innocua* aparece arriba, la comparación en el medio y la secuencia de *L. monocytogenes* abajo. Utilizando los cursores verticales y horizontales es posible acercar y desplazar. Probar opción "Locked" para una mejor visualización (botón derecho sobre la zona media).

Trabajar con una de las secuencias, por ejemplo, la de *L. innocua*. Se sugiere realizar la siguiente secuencia de pasos:

- Poner el máximo de aumento y visualizar los tres marcos de lectura. Con las opciones del botón derecho del mouse (BD), active y desactive diferentes funciones (Ej.: codones stop).
- Desactivar la anotación automática (BD, [Entries](#), desmarcar el archivo *Nombre de la especie.embl*), y moverse sobre la secuencia.
- Identificar los marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames: ORFs).
- Verifique que los ORF por Ud. identificados se corresponden con genes ya anotados, volviendo a activar el archivo .embl. Identificar la orientación de los mismos. Cuente el número de genes en cada organismo ([View / L\\_innocua / Overview](#)).

*¿Qué mecanismos podrían explicar la diferencia en el número de genes entre ambas especies?*

- Seleccione uno de esos genes y vea sus propiedades (nombre, función, largo, etc.) (BD, [View](#), [View Selected Features](#)).
- Usar la opción [Graph](#) del menú principal para graficar el contenido GC ([GC content %](#)) en una de las secuencias y luego el [GCskew](#) o [GCdeviation](#)

*¿Qué factores evolutivos pueden dar cuenta de los patrones observados? ¿Cómo pueden afectar estos sesgos mutacionales a las reconstrucciones filogenéticas o los estudios de evolución molecular?*

- Buscar algún gen particular, por ejemplo *Imo0459* en *L. monocytogenes* (BD, [Goto](#), [Navigator, feature with gene name](#)).

### **Trabajar con secuencias la comparación entre las secuencias**

En esta etapa, puede ser útil eliminar los marcos de lectura (Menú principal, Display). Se sugiere comenzar por el principio de las secuencias, a un nivel medio de aumento.

- Visualizar códigos de colores rojo (sintenia: se mantiene el orden y orientación relativa de genes ortólogos), azul (regiones invertidas), blanco (sin homología), amarillo (selección del usuario).
- Identificar genes especie específicos e invertidos.

*¿Cómo diría que es el grado de sintenia entre ambas especies? ¿Tiene esto algún significado biológico?*

→ Establezca algunos genes especie específicos y agregue la mayor cantidad posible de información que los caractericen.

*¿Tienen estos genes algún significado biológico en relación con la diferente patogenicidad de las especies?*

*¿Qué tipo de información puede ser útil para saber si ha ocurrido transferencia horizontal de esos genes? ¿Qué otras formas de adquisición de genes serían posibles?*

*El programa ACT acepta la inclusión de otros genomas y comparaciones. ¿Qué información puede aportar al estudio el hecho de incorporar un grupo externo al análisis?*

*Con las herramientas y datos disponibles, ¿aceptaría o rechazaría la hipótesis planteada por Buchrieser y cols. (2003)?*

### **Material suplementario**

- MedlinePlus Enciclopedia Médica Listeriosis (información de la enfermedad): <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001380.htm>

- Trabajo original: Buchrieser C, Rusniok C, The Listeria Consortium, Kunst F, Cossart P and Glaser P. 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35: 207-213.