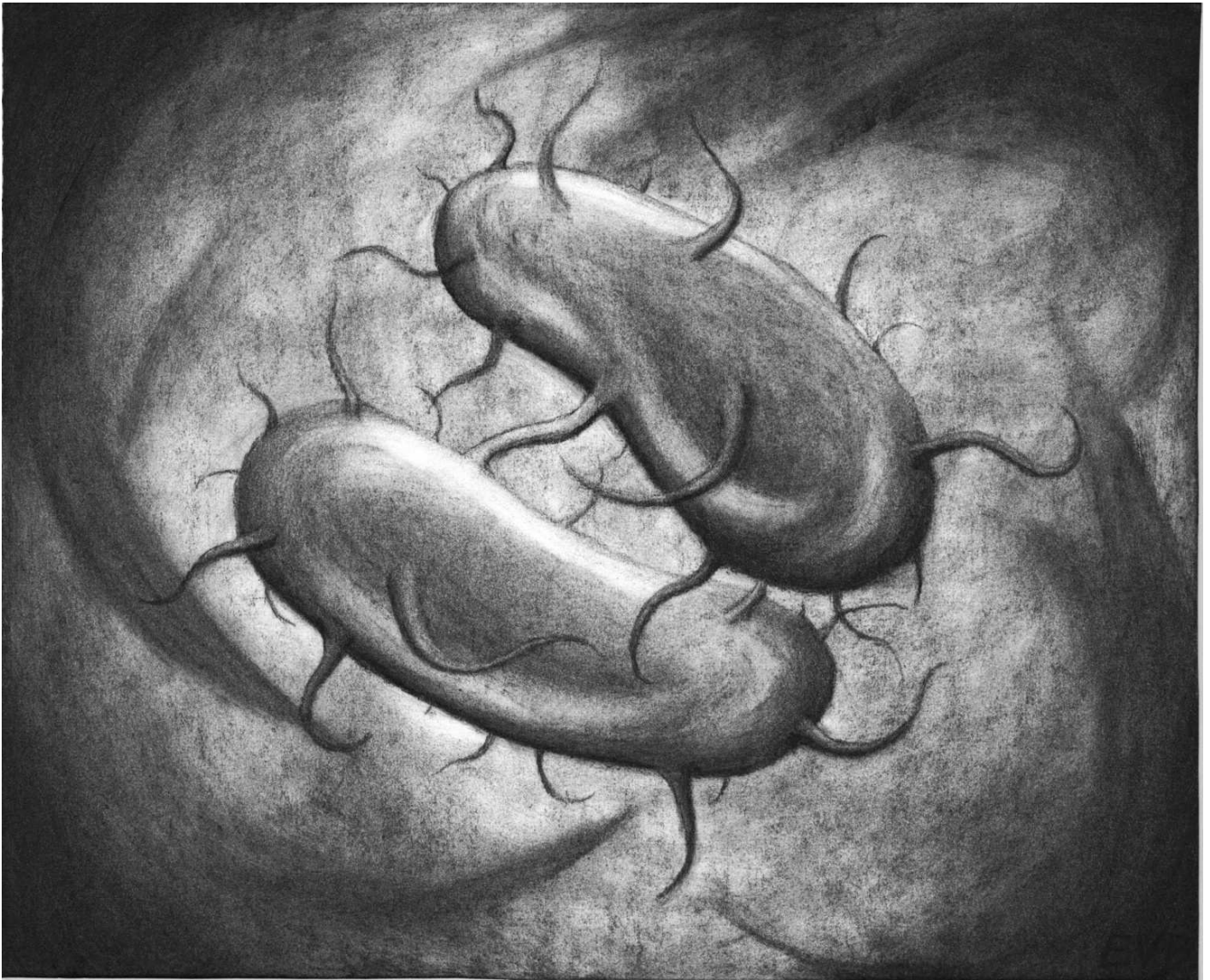


EL SEXE DELS BACTERIS

Elsa Velasco Benito



Estem a punt d'endinsar-nos en un món fascinant. Un món d'éssers microscòpics, invisibles als nostres ulls i tanmateix ubics en el nostre entorn. Un món on l'única regla és la supervivència del més apte, i tot s'hi val per aconseguir-ho. Un món obscur i alhora meravellós per la seva complexitat.

Parlem del món de la **biologia molecular bacteriana**. Un món estudiat en detall al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia, al grup de recerca dirigit pels doctors Carlos Balsalobre i Cristina Madrid. Des de fa molts anys es dediquen a descobrir noves peces de l'enorme trencaclosques que són les xarxes de regulació de gens bacterians, en l'intent d'esbrinar com responen els bacteris als canvis en l'ambient.

El món bacterià

Probablement tothom ha sentit a parlar dels **bacteris**: uns organismes microscòpics amb certa mala fama, sovint immerescuda. Si bé és cert que en ocasions alguns d'ells ens ho fan passar malament, la majoria són totalment inofensius. Per fer-nos una idea, els bacteris dominen el món. Literalment. Hi són pertot arreu: al sòl, a l'aigua, a l'aire i fins i tot a dins nostre. I la major part del temps això no ens causa cap problema.

De la mateixa manera que nosaltres, els bacteris estan formats per **cèl·lules**. De fet, cadascun d'ells és una sola cèl·lula **procariota** (figura 1A i 1B), lleugerament diferent de les nostres cèl·lules, que són **eucariotes**. Les cèl·lules procariotes són en general menys complexes i més petites que les eucariotes (figura 1C). A banda de la mida, la diferència principal és que l'interior de les cèl·lules eucariotes es troba altament compartimentat, i el material genètic o DNA (àcid desoxiribonucleic) es troba contingut dins un nucli. En canvi, les cèl·lules procariotes manquen de compartiments i el DNA està lliure en l'interior de la cèl·lula. Però, malgrat les aparences, el món dels bacteris és molt més divers i versàtil que el nostre.

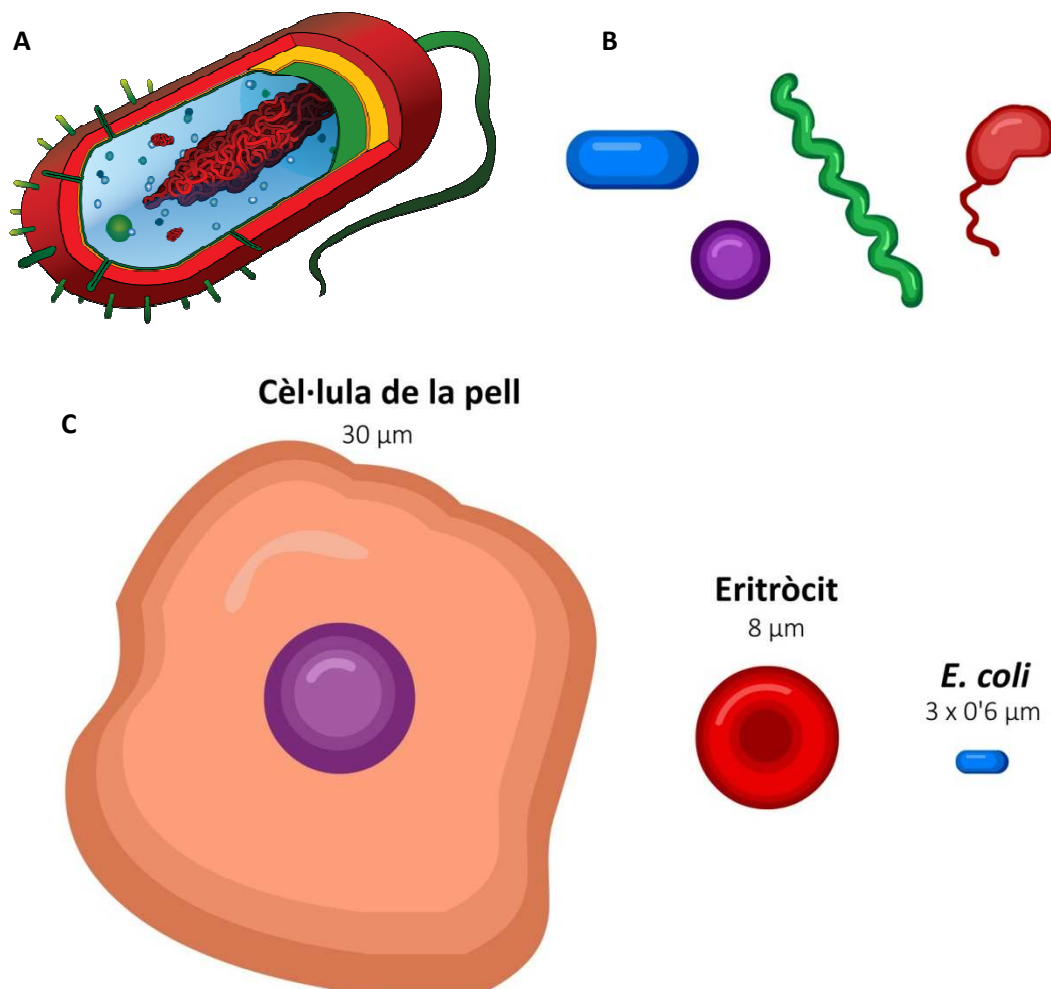


Figura 1. **A:** Estructura d'una cèl·lula procariota. **B:** Diverses morfologies bacterianes. **B:** Comparació de la mida de dues cèl·lules humanes (cèl·lula de la pell i eritròcit o glòbul vermell) i una cèl·lula bacteriana (*Escherichia coli*).

El costat fosc dels bacteris

Dins de la versatilitat dels bacteris trobem, malauradament, la capacitat d'infectar altres organismes i produir-los malalties. Els bacteris que posseeixen aquesta capacitat es qualifiquen com a **patògens**, i la capacitat en si s'anomena **patogenicitat**.

Hi ha altres agents infecciosos que també provoquen malalties, com els **virus**, i alguns **fongs** i **protists**. Cal evitar confondre'ls, ja que són radicalment diferents dels bacteris, tot i que poden donar lloc a símptomes semblants. Alguns exemples de malalties causades per infeccions bacterianes són la tuberculosi, faringitis estreptocòccica, el tètanus, la pesta negra, la salmonel·losi, el tifus o la pneumònia. Com es pot veure, les infeccions bacterianes poden ser des de lleus fins a mortals, i han suposat un greu problema per a la humanitat des dels seus inicis. Afortunadament, avui dia gairebé hem oblidat l'amenaça que suposen gràcies al descobriment dels **antibiòtics**.

Antibiòtics: la fi de les infeccions bacterianes?

Un antibiòtic és una substància d'origen biològic, produïda per microorganismes, i que té la capacitat d'eliminar o inhibir el creixement d'altres microorganismes. Els antibiòtics, per tant, no són un invent humà, sinó que probablement han existit des de fa milions d'anys. Tanmateix, en l'actualitat també en produïm nosaltres de forma artificial, i és per això que també s'utilitza el terme **antimicrobià**, que inclou totes les substàncies, sintètiques i biològiques, amb activitat inhibidora contra microorganismes.

El primer en descriure l'efecte dels antibiòtics va ser el metge escocès Alexander Fleming (figura 2A), l'any 1928. Fleming va descobrir l'existència de la **penicil·lina** pràcticament per casualitat, treballant amb cultius bacterians al laboratori. Va observar que un cultiu s'havia contaminat amb un fong del gènere *Penicillium*, i que al seu voltant no creixien bacteris (figura 2B). A partir d'això va deduir que el fong produïa una substància tòxica per als bacteris, a la qual va anomenar *penicil·lina*.

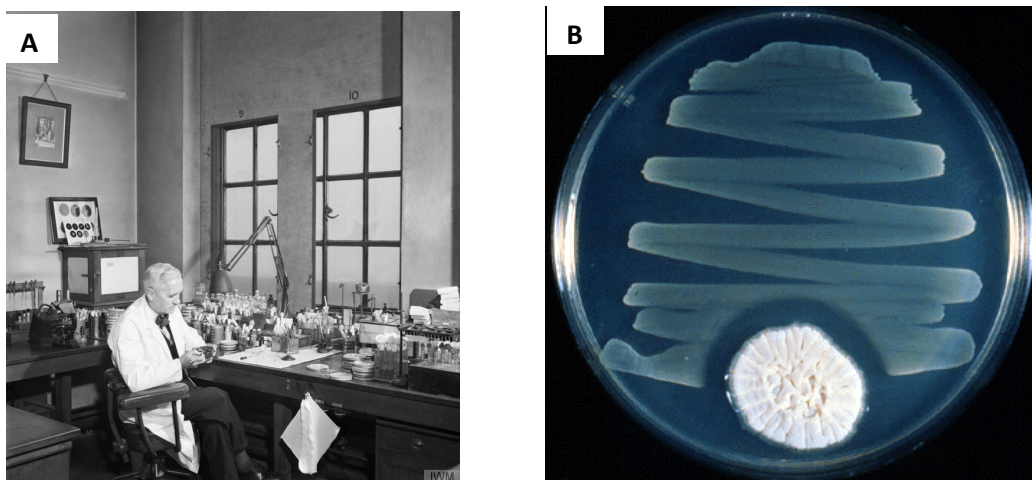


Figura 2. A: Fotografia d'Alexander Fleming treballant al seu laboratori. **B:** Cultiu en placa d'un fong *Penicillium* a sobre d'una estria de bacteris. S'hi observa un halo d'inhibició envoltant el fong, a causa de la **penicil·lina**.

El descobriment dels antibiòtics va marcar un abans i un després en la medicina; gràcies a ells l'esperança de vida de la població que hi va tenir accés es va incrementar de forma abrupta. La seva eficàcia queda demostrada pel fet que actualment, almenys a Occident, la majoria de la població no viu amb por d'infectar-se amb tuberculosi o febre tifoide, per exemple.

No obstant això, cal recordar la gran adaptabilitat característica dels bacteris. Una altra diferència amb els eucariotes és que tenen una taxa de **mutació** més elevada: el seu DNA pateix canvis prou sovint, i això fa que es puguin adaptar a condicions desfavorables amb relativa facilitat. És a dir: en un entorn hostil probablement gran part d'una població bacteriana morirà; però, si aquesta població presenta una gran variabilitat genètica (gràcies a una taxa de mutació elevada), és possible que existeixin alguns individus que puguin sobreviure. Aquests bacteris podran reproduir-se de forma avantatjosa i finalment substituïran la població original. Aquest mecanisme és un tipus de **selecció natural**, que és la base de l'**evolució**.

Reprement el tema original, quan prenem antibiòtics estem creant unes condicions hostils per als bacteris que es troben en el nostre cos. Si, casualment, alguns d'aquests bacteris presenten **resistència** a l'antibiòtic administrat, s'estarà produint un procés de selecció: estarem afavorint la reproducció d'aquests bacteris resistents (figura 3).

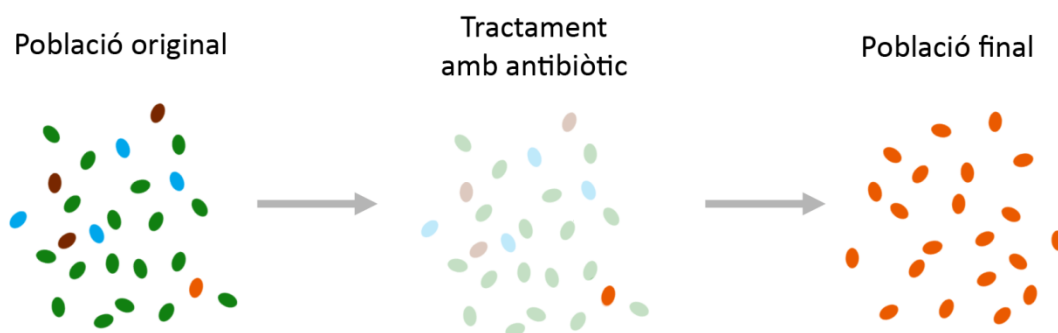


Figura 3. Esquema del procés de selecció d'un bacteri resistent a causa del tractament amb un antibiòtic. La població original, de gran diversitat, queda substituïda per bacteris resistents.

Inevitablement, l'ús (i en ocasions abús) sistemàtic d'antibiòtics ha portat a l'aparició i propagació de bacteris multiresistents, que poden sobreviure sense problemes en presència de diversos antibiòtics als quals abans eren susceptibles. La situació comença a resultar preocupant, ja que el ritme al qual es desenvolupen nous agents antimicrobians s'està reduint, mentre que el fenomen de la resistència no deixa de créixer.

A més a més, la resistència a antibiòtics és també un fenomen que es va desenvolupar en la natura, molt abans de l'ús clínic d'aquests fàrmacs, en ambients on convivia espècies productores d'antibiòtics amb altres bacteris. Existeixen múltiples formes de resistència, algunes de les quals són altament sofisticades. I en aquests moments també es troben en bacteris patògens. Com hi han arribat?

Promiscuïtat bacteriana

Com ja s'ha vist, un dels motius pels quals els bacteris tenen una gran capacitat d'adaptació és que pateixen mutacions amb major freqüència que altres organismes. Però no és l'única estratègia de què disposen. De fet, en tenen una de molt més potent: el **sexe**.

Els bacteris es reproduïxen per **fissió binària**. Això significa que en el moment de reproduir-se cada cèl·lula bacteriana replica el seu DNA i tot seguit es divideix en dues cèl·lules idèntiques entre si i respecte la cèl·lula progenitora. Es tracta, doncs, d'un tipus de **reproducció asexual**. Tanmateix, això no vol dir que no tinguin altres formes de sexe, entenent com a tal la generació d'individus genèticament distints a partir de la combinació de material genètic d'organismes diferents.

En el nostre cas, i malgrat el que hom pugui pensar, l'objectiu biològic de la sexualitat és la reproducció: la fecundació és la fusió de dues cèl·lules amb informació genètica provinent de dos éssers diferents, i dona lloc a un individu únic. En el món bacterià, en canvi, el sexe no té finalitats reproductives. És per això que a la sexualitat bacteriana se l'anomena sovint **parasexualitat**.

Existeixen diversos mecanismes de parasexualitat bacteriana: la **transformació** (incorporació directa de material genètic que es trobi lliure en l'entorn), la **transducció** (transport de DNA d'un bacteri a un altre a través d'un virus) i la **conjugació** (transmissió directa de DNA d'un bacteri a un altre). En aquest text ens centrarem en l'últim, però abans cal aprofundir una mica més en la genètica bacteriana.

DNA de butxaca

El mot **cromosoma** és prou conegut. Bàsicament, un cromosoma és un fragment de DNA. Normalment cada cèl·lula eucariota en té molts, però els bacteris només en tenen un, i amb forma circular. Tanmateix, molts d'ells posseeixen a més a més petits fragments de DNA (també circulars) anomenats **plasmidis**, i cada bacteri en pot tenir diversos (figura 4).

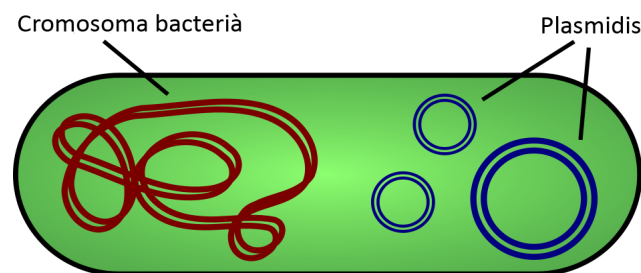


Figura 4. Esquema d'una cèl·lula bacteriana, amb el cromosoma i tres plasmidis.

Els plasmidis s'anomenen **elements genètics mòbils** perquè són fàcilment intercanviables entre cèl·lules. A més a més, són capaços de replicar-se, de la mateixa manera que ho fa el cromosoma. Així doncs, quan les cèl·lules bacterianes es divideixen els plasmidis es reparteixen entre elles, amb la qual cosa solen tenir una herència estable. Això fa que els plasmidis es disseminin fàcilment i es mantinguin en les poblacions.

Hi ha altres tipus d'elements genètics mòbils, però en aquest text només n'esmentarem un més: els **transposons**. Els transposons són seqüències de DNA que poden *saltar* a l'atzar d'un lloc a un altre en el DNA, tant cromosòmic com plasmídic. Es tracta d'una font de variabilitat genètica dinàmica i de gran importància, ja que segons on s'insereixin provocaran uns efectes o altres. Per exemple, poden activar o desactivar completament l'expressió d'un gen.

Tant els plasmidis com els transposons poden contenir **gens de resistència a antibiòtics**, i de fet són els principals vehicles de la seva propagació. Molts gens de resistència a antibiòtics van aparèixer a la natura i han arribat a nivell clínic gràcies a aquests elements genètics mòbils.

Regalant gens: la conjugació

Alguns plasmidis confereixen als bacteris portadors una capacitat singular: la de transmetre aquests plasmidis a altres bacteris que no els tinguin. Es tracta dels **plasmidis conjugatius**, ja que el procés de transmissió s'anomena **conjugació**. En el model més simple de conjugació bacteriana es transfereix el plasmidi conjugatiu d'un bacteri donador (sovint anomenat *fèrtil*) a un altre receptor (figura 5).

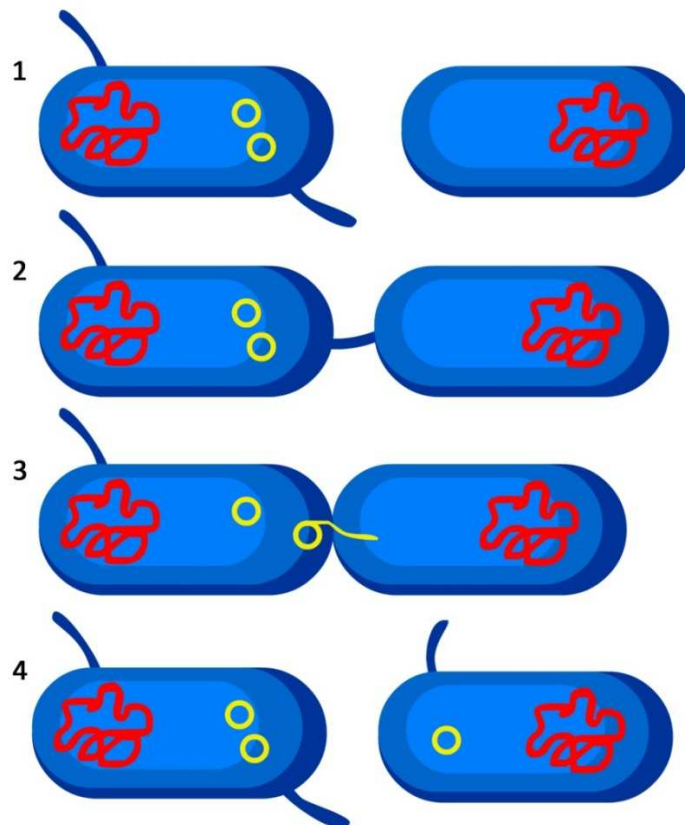


Figura 5. Representació esquemàtica del procés de la conjugació. El plasmidi conjugatiu es troba representat en color groc, i el cromosoma bacterià en vermell.

Els plasmidis conjugatius contenen tots els gens necessaris perquè tingui lloc la conjugació. Les cèl·lules que els posseeixen poden produir uns òrgans anomenats **pili sexuals** (*pilus* en singular), que són estructures proteiques allargades i retràctils situades a la superfície de la cèl·lula. En el seu extrem presenten receptors que s'enganxen a altres bacteris, fet que permet apropar-los a la cèl·lula donadora fins que estableixen un contacte íntim. En aquest contacte es

forma un canal a través del qual es bombeja el plasmidi conjugatiu des de la cèl·lula donadora a la receptora.

Si el plasmidi conjugatiu es transmet íntegrament, la cèl·lula receptora esdevindrà fèrtil i podrà transferir-lo a altres cèl·lules. A més a més, no cal que dos bacteris siguin de la mateixa espècie perquè puguin dur a terme una conjugació. Per aquestes dues raons, la conjugació és un mecanisme extraordinàriament eficient de transmissió de gens dins de poblacions bacterianes.

Un tast de biologia molecular

Avui dia pràcticament tothom coneix la paraula **gen**. Tots tenim gens, que heretem dels nostres pares i transmetem als nostres fills. Els gens determinen una part molt important del que som. Però com ho fan?

Dels gens a les proteïnes

Es podria dir que el DNA és el llibre d'instruccions que permet que un organisme funcioni correctament. Com tot llibre, conté lletres organitzades en forma de paraules i frases, amb significats concrets. Però el llibre per si sol no fa que els organismes funcionin; cal que algú llegeixi les instruccions i construeixi la maquinària necessària.

La lectura es produeix en dues etapes (figura 6). La primera s'anomena **transcripció**, i és el procés pel qual el missatge escrit en el DNA es transcriu a un altre àcid nucleic: el RNA (àcid ribonucleic) missatger (mRNA). A continuació, el mRNA és llegit per uns orgànuls anomenats **ribosomes** en el que es coneix com a **traducció**: els ribosomes fabriquen **proteïnes** llegint les instruccions escrites en el mRNA. Curiosament, el llenguatge en què estan escrits els llibres d'instruccions de tots els éssers vius és pràcticament universal, i s'anomena **codi genètic**.

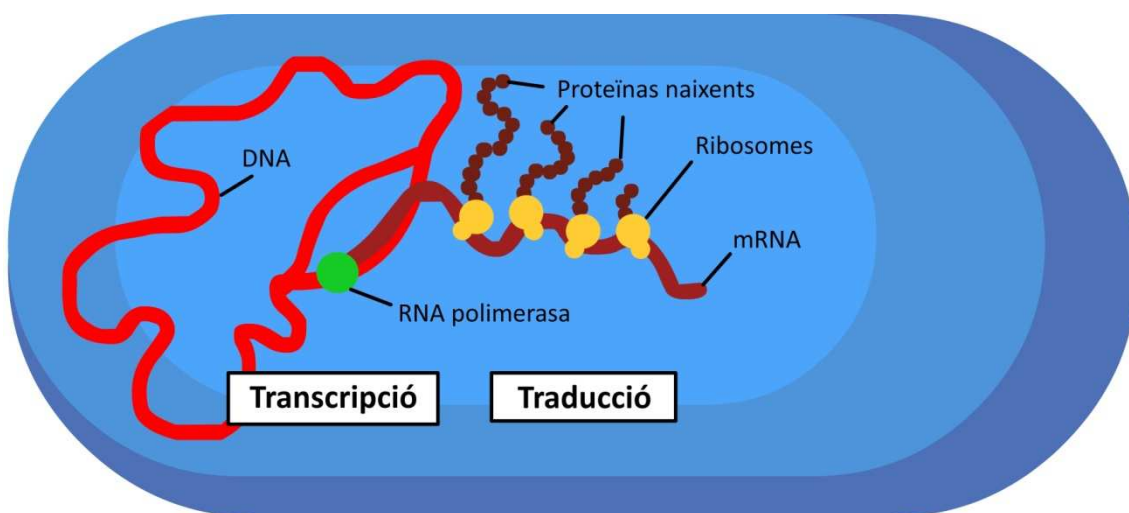


Figura 6. Il·lustració de la transcripció i la traducció en bacteris.

Les proteïnes són el principal element estructural i funcional de les cèl·lules: són la maquinària que les manté vives. Un tipus particularment important en són els **enzims**. Es tracta de proteïnes que catalitzen reaccions químiques. La vida, en essència, no deixa de ser un enorme conjunt de reaccions químiques i físiques, però perquè es produeixin calen dues coses: energia

i velocitat. L'energia s'obté de diverses fonts, i la velocitat la proporcionen els enzims. Sense enzims, les reaccions necessàries per la vida serien tan lentes que directament seria com si no es produïssin.

Però tornem al llibre d'instruccions. La transcripció dels gens també s'anomena **expressió gènica** i, evidentment, no es produeix en tots els gens alhora (seria com una orquestra en què tots els músics toquessin alhora i sense cap ordre). Al contrari: es troba estrictament regulada.

Una orquestra amb molts directors

La transcripció la realitza un enzim anomenat **RNA polimerasa**, que fabrica el RNA missatger a partir del que llegeix al DNA. Per poder dur a terme la seva tasca cal que s'uneixi al DNA, però no pot fer-ho per si sola: cal que l'ajudin altres proteïnes que reben el nom de **factors de transcripció**. Concretament, aquests poden tant facilitar com impedir la unió de la RNA polimerasa al DNA.

Els factors de transcripció són capaços d'unir-se a seqüències específiques en el DNA, situades just abans del començament dels gens. Aquestes seqüències s'anomenen **promotors**, i poden tenir influència sobre un o més gens. Generalment, a cada promotor s'hi poden unir diversos factors de transcripció, que regulen l'expressió dels gens sota el control de dit promotor. Són els directors de l'orquestra gènica.

La situació concreta en què es troba una cèl·lula determina quins factors de transcripció s'uneixen als diferents promotors. D'aquesta manera es pot controlar quins gens s'expressen en cada moment en funció de les necessitats que tingui la cèl·lula. Això succeeix en tots els éssers vius, des dels bacteris fins a nosaltres. Per exemple, si un bacteri es troba amb una gran quantitat de lactosa (el sucre de la llet), expressarà els gens específics per metabolitzar aquest sucre. Però no ho farà si hi ha altres sucres més fàcilment aprofitables, com la glucosa, ja que estaria malgastant energia innecessàriament; els éssers vius tendeixen a optimitzar al màxim els seus processos biològics.

Hi ha altres mecanismes més complexos de regulació de l'expressió gènica, que impliquen modificacions en el propi DNA, RNA que no codifica per proteïnes, i probablement d'altres que ni tan sols coneixem. El genoma és l'orquestra amb més directors del món.

Biologia molecular bacteriana a la Facultat de Biologia

Al Departament de Microbiologia trobem un grup de recerca sobre biologia molecular bacteriana, dirigit pels doctors Cristina Madrid i Carlos Balsalobre. En aquest grup s'investiga la regulació de diversos gens implicats en la virulència de bacteris entèrics patògens (bacteris que normalment causen infeccions del tracte gastrointestinal). Tradicionalment han treballat amb el que s'anomena **reguladors globals de l'expressió gènica**, en els bacteris *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*. Estan interessats en com responen els bacteris a diferents estímuls ambientals a través de la regulació de l'expressió dels seus gens.

A causa de la crisi econòmica, i per tal d'aconseguir millors oportunitats de finançament, en els darrers anys el grup ha realitzat un canvi d'orientació per treballar en noves línies d'investigació més aplicades. Han desenvolupat un important projecte sobre conjugació bacteriana, del qual parlarem a fons més endavant. Des de més recentment estan investigant la regulació de la formació de biofilms per *Salmonella enterica*, amb l'objectiu final de buscar inhibidors per tal de reduir la contaminació d'aliments per aquest bacteri. L'últim projecte que han iniciat consisteix en l'estudi de diferents soques de *Campylobacter* per esbrinar en què es caracteritzen les patogèniques. Tanmateix, volen mantenir l'esperit de la recerca bàsica, i seguir investigant la regulació de l'expressió gènica, un àmbit on encara queda molt a descobrir, i que és el que més els interessa.

Bacteris entèrics patògens

En aquest grup de recerca es treballa sobretot amb *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*, tot i que en el darrer any també s'ha iniciat un projecte sobre *Campylobacter*.

Escherichia coli (figura 7A) és un bacteri que es troba normalment en el nostre intestí. N'existeixen infinitud de soques, i moltes d'elles són patògenes. Poden causar diverses afeccions gastrointestinals, des de diarrea lleu (com per exemple la diarrea del viatger) fins a colitis hemorràgica, potencialment mortal. Algunes soques, anomenades extraintestinals, provoquen infeccions en altres parts del cos, com infeccions urinàries o meningitis.

En el gènere ***Campylobacter*** (figura 7B) es troben algunes espècies que provoquen malalties en humans. Les més rellevants són *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Ambdós provoquen gastroenteritis i es contagien ingerint aliments contaminats, ja que el seu reservori són les aus de granja. Tenen una elevada incidència a Europa, i en alguns casos poden donar lloc a complicacions greus.

Salmonella enterica (figura 7C) és una espècie fonamentalment patògena en humans. Se'n coneixen quatre tipus principals causants d'infeccions: *S. enterica* serovar Enteritidis i *S. enterica* serovar Typhimurium provoquen una gastroenteritis anomenada **salmonel·losi**, mentre que *S. enterica* serovar Typhi i *S. enterica* serovar Paratyphi causen **febres tifoïdes**, més greu. En el nostre entorn és més coneguda la salmonel·losi, però la febre tifoïde constitueix un problema sanitari en molts països en vies de desenvolupament. Malauradament, en tots els serovars s'estan estenent resistències a múltiples antibiòtics, cosa que complica el tractament

d'aquestes malalties. S'ha observat que moltes d'aquestes resistències estan associades a plasmidis.

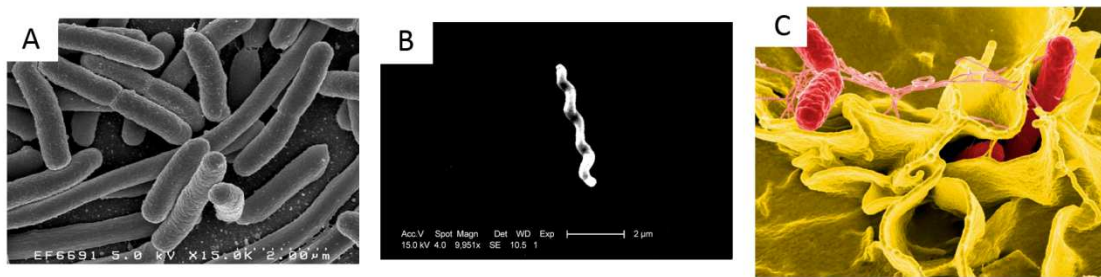


Figura 7. Fotografies realitzades amb microscopi electrònic de rastreig de: **A:** *Escherichia coli*; **B:** *Campylobacter jejuni*; **C:** *Salmonella enterica* (en aquesta última el color s'ha afegit per ordinador).

El plasmidi R27 de *Salmonella enterica*

Els plasmidis bacterians són extremadament diversos, però atenent a les seves característiques es poden classificar en grups. En aquest text no entrarem a fons en aquesta classificació, però sí n'esmentarem un grup: els **plasmidis IncHI1**. Aquests plasmidis són **conjugatius** i es troben principalment als serovars de *Salmonella enterica* causants de febre tifoide, on són en part responsables de l'adquisició de resistències a múltiples antibiòtics. Tanmateix, també es poden transferir a altres enterobacteris, com *Escherichia coli*.

El **plasmidi R27** és el que millor s'ha estudiat d'aquest grup. Va ser aïllat, però, a partir d'una soca de *S. enterica* Typhimurium (causant de salmonel·losi) resistent a l'antibiòtic **tetraciclina**, al Regne Unit l'any 1961. En aquest projecte s'ha investigat com es regula la conjugació d'aquest plasmidi.

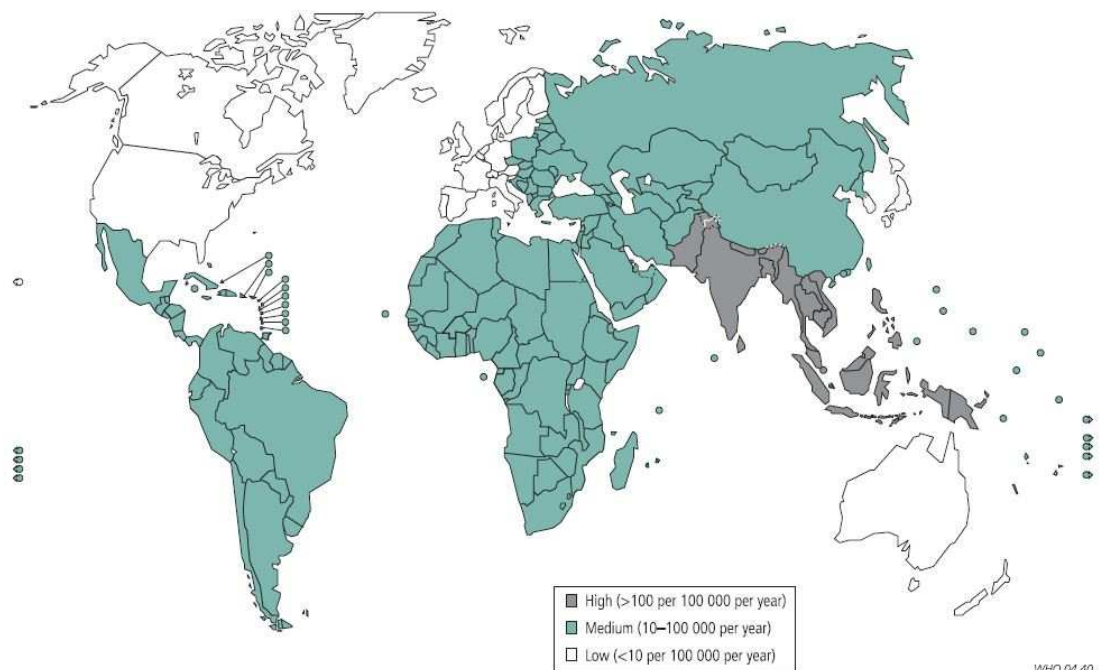


Figura 8. Mapa de distribució de la febre tifoide amb una escala de colors segons la incidència en els diferents països.

El tret més característic de la conjugació dels plasmidis IncHI1 és que es produeix només a temperatures inferiors a 37°C, la temperatura corporal dels mamífers. Aquest fet és sorprenent perquè significa que no poden ser disseminats mentre els bacteris portadors es troben a l'interior dels seus hostes. La temperatura òptima de conjugació d'aquests plasmidis es troba entre els 22 i els 28°C, rang que coincideix amb la temperatura ambient en moltes regions amb clima tropical, on la febre tifoide és endèmica (figura 8). Així doncs, es pensa que els plasmidis IncHI1, incloent el R27, contribueixen a la propagació de resistències a antibiòtics i altres característiques avantatjoses mentre *Salmonella enterica* es troba a fora dels seus hostes.

De fet, es sap que el fet que un bacteri posseeixi aquest plasmidi té una gran influència en l'expressió dels gens del cromosoma, la qual cosa li confereix característiques singulars, no només en l'àmbit de la patogenicitat. Això fa pensar que el plasmidi R27 va evolucionar al medi ambient fins que en algun moment va arribar a soques patògenes. En aquest punt probablement va ser seleccionat per l'ús de tetraciclina, tot i que és possible que també aporti altres trets beneficiosos per a la patogenicitat de *S. enterica*.

L'orquestra del plasmidi R27

R27 (figura 9) és un plasmidi d'una mida molt gran: 180 kilobases, o 180.000 parells de bases (les **bases nitrogenades** vindrien a ser les lletres del text que hi ha escrit al DNA). Conté multitud de gens, la funció de la majoria dels quals (més del 65%) es desconeix en aquests moments. Els gens més estudiats són els que codifiquen per proteïnes que participen en la conjugació, així com alguns reguladors propis. També es sap que conté diversos transposons, i concretament en un d'ells es troben els gens que confereixen resistència a la tetraciclina.

Els gens responsables de la conjugació es troben en dues regions anomenades **Tra1** i **Tra2**. Dins d'elles, els gens es distribueixen formant en total sis **operons**, que són agrupacions de gens controlats per un mateix promotor. Aquests sis operons reben el nom d'**operons tra**, i contenen, per exemple, els gens necessaris perquè es fabriquin els pili sexuals i perquè el plasmidi sigui transferit a les cèl·lules receptores.

En el propi Departament de Microbiologia s'han descrit diversos reguladors de la conjugació de R27, i que per tant afecten l'expressió dels operons *tra*. Inicialment es va caracteritzar com es controla la conjugació en funció de la temperatura, a través de dos reguladors (anomenats H-NS i Hha) que curiosament es troben codificats tant en el cromosoma bacterià com en el plasmidi R27.

Més tard es va descobrir que quatre dels sis operons *tra* estaven regulats per un factor propi del plasmidi, que rep el nom d'**HtdA**. Es va observar que quan el gen *htdA*^A presenta una mutació que elimina la seva funció la freqüència amb què es produeix la conjugació de R27

^A En la nomenclatura estàndard els noms dels gens s'escriuen en minúscula i cursiva, i els de les proteïnes en lletra normal.

augmenta moltíssim (més de 1.000 vegades). Així doncs, es va concloure que **HtdA és un regulador negatiu de la conjugació**. Concretament, exerceix la seva funció reprimint l'expressió de quatre dels sis operons *tra*: si aquests gens no s'expressen, la cèl·lula no produeix pili sexuals i per tant no pot efectuar la conjugació.

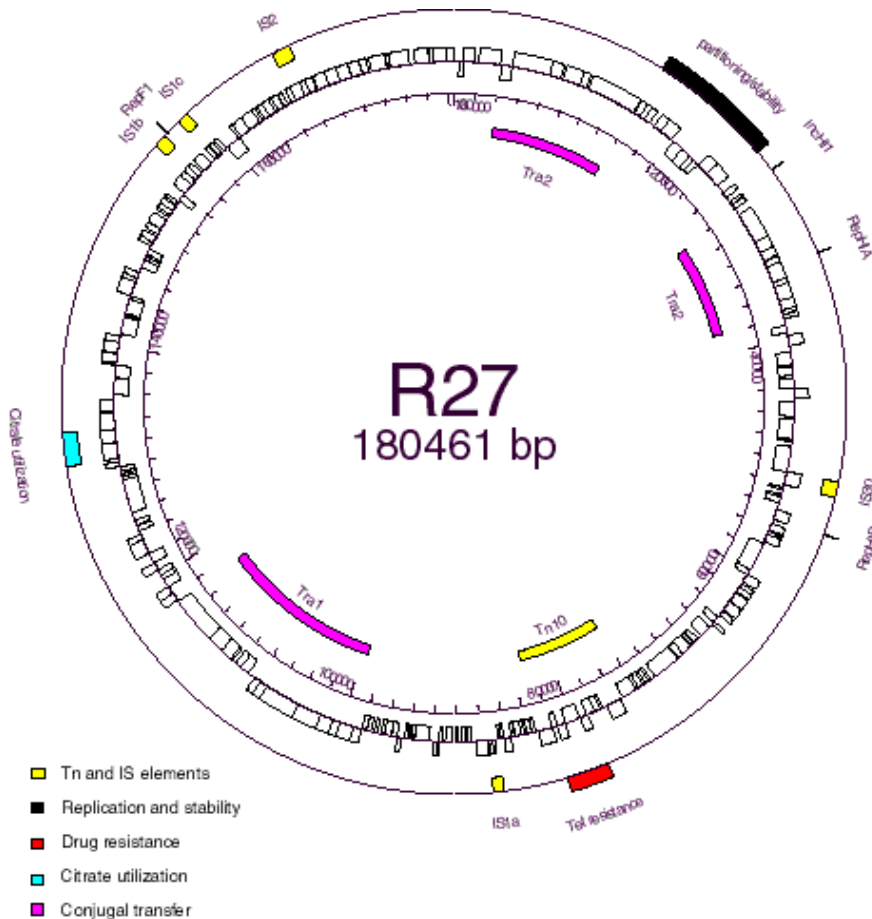


Figura 9. Esquema del plasmidi R27.

A partir d'aquí, el grup es va proposar estudiar més a fons el mecanisme de regulació en què està implicat HtdA. La primera part dels resultats d'aquest treball ha estat publicada en el seu darrer article a la revista *Molecular Biology*.

L'estudi dels gens mitjançant enginyeria genètica

Una eina molt potent en els estudis de biologia molecular és la manipulació del DNA per crear construccions artificials que permetin entendre com funcionen els gens. Aquesta és la base de l'**enginyeria genètica**. Per exemple, es pot provocar una mutació en un gen per observar quins efectes causa la seva absència, i a partir d'això deduir quina és la seva funció. També es pot copiar un gen d'un bacteri, introduir-lo en un plasmidi artificial, i finalment transferir-lo a un altre bacteri per generar més còpies del gen. En això consisteix el **clonatge** de gens.

En l'estudi de la regulació de la conjugació de R27 s'han dut a terme nombrosos i complexos experiments d'enginyeria genètica, d'un disseny elegant per la seva lògica. Aquí presentarem

alguns dels que van portar a la identificació d'una xarxa de regulació de la qual encara queda molt per descobrir.

Existeix un recurs molt útil per estudiar l'expressió gènica: els **gens reporters**. Són gens naturals el producte dels quals és fàcilment quantificable per diferents mètodes. El seu potencial radica en el fet que es poden fusionar amb promotors d'altres gens, posant-los sota el seu control. D'aquesta manera, detectant el producte del gen reporter es pot quantificar l'activitat del promotor del gen que s'està estudiant, i per tant la seva expressió.

Un dels gens reporters més utilitzats és el gen **lacZ**. Aquest gen codifica per l'enzim **β -galactosidasa**, que degrada la lactosa. L'activitat d'aquest enzim es pot detectar de diferents maneres: existeixen diversos substrats semblants a la lactosa que canvien de color en ser degradats per la β -galactosidasa. A més a més, en bacteriologia s'utilitza un medi de cultiu sòlid anomenat **agar MacConkey** que conté, entre altres components, lactosa i un indicador de pH. Quan un bacteri metabolitza la lactosa perquè està expressant β -galactosidasa, s'acidifica el pH del medi i aquest adquireix un color vermell intens.

Per estudiar la regulació exercida per HtdA sobre els operons *tra* de R27 es va construir una soca model d'*Escherichia coli* (més fàcilment manipulable genèticament que *Salmonella*). En aquesta soca el gen *lacZ* propi no és funcional, de forma que no produeix β -galactosidasa. Així, si s'hi introdueix una fusió d'un promotor amb el gen *lacZ*, tota l'activitat de l'enzim que es detecti correspondrà al promotor del gen que s'estigui estudiant. Concretament, en el cromosoma d'aquesta soca es va introduir una fusió del promotor d'un dels operons *tra* (l'operó F) amb el gen *lacZ*.

A la soca model també se li va introduir el plasmidi R27 en dues variants: la variant natural o salvatge del plasmidi (R27) i una variant amb *htdA* no funcional, anomenada drR27 perquè la seva conjugació es troba desreprimida. Es van cultivar la soca original sense el plasmidi, la soca amb el plasmidi salvatge i la soca amb drR27 en agar MacConkey i es va observar l'aparència de les seves colònies (figura 10).

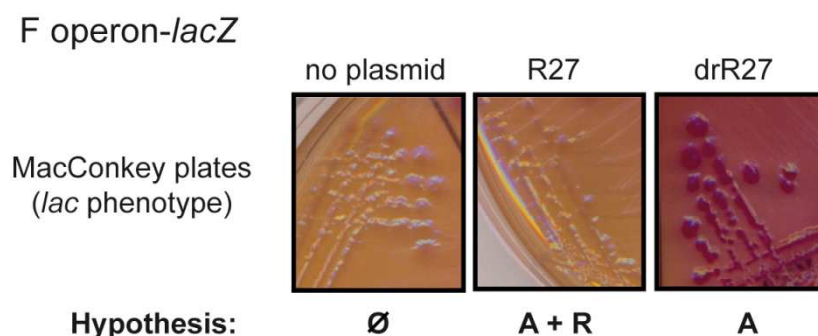


Figura 10. Cultiu en agar MacConkey de les soques esmentades. A sota de cada imatge es mostren les hipòtesis que explicarien els resultats. \emptyset : absència tant d'activador com de repressor; A + R: presència d'un activador i un repressor; A: presència d'un activador.

La soca que conté el plasmidi amb la mutació en el repressor *htdA* genera colònies de color vermell perquè és capaç de fermentar la lactosa. Això significa que produeix β -galactosidasa en

grans quantitats. En canvi, la soca sense plasmidi i la soca amb R27 salvatge tenen un color blanquinós. Per tant, en absència d'HtdA l'operó F s'expressa molt, però no ho fa si tampoc hi és el plasmidi R27. D'aquí es dedueix que l'expressió de l'operó F necessita algun factor activador propi de R27.

Per tal de trobar aquest presumpte activador es van clonar diversos fragments del plasmidi R27 i es van introduir independentment (a dins d'un plasmidi artificial anomenat **pBAD**) en la soca model que conté el gen reporter. A continuació es va realitzar un assaig per detectar quins fragments, en estar presents, provocaven un augment en l'expressió de l'operó F. D'aquesta manera se'n va identificar un que probablement contenia el suposat activador (figura 11). Aquest fragment contenia quatre gens corresponents a dos operons *tra*. Tallant-lo en trossos més petits i provocant mutacions es va descobrir que l'activador es trobava en l'operó R.

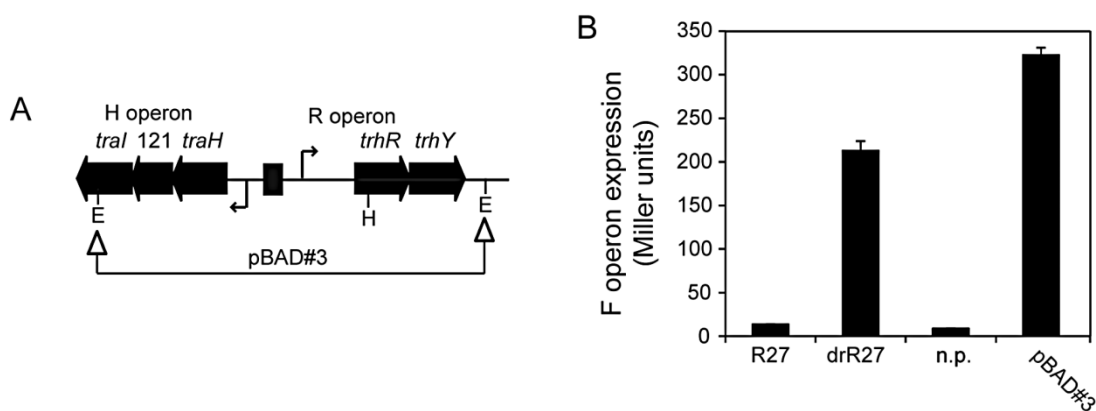


Figura 11. A: Esquema del fragment clonat que conté l'activador de l'operó F. B: Expressió de l'operó F quantificada segons l'activitat de la β-galactosidasa (unitats de Miller) quan la soca model de l'operó F conté el plasmidi R27, R27 amb la mutació en *htdA* (drR27), el plasmidi amb el fragment activador (pBAD#3) o bé no té cap element afegit (n.p.). Es pot observar com l'operó F s'expressa molt en presència de l'activador quan no hi és el repressor (HtdA).

Tanmateix, en el fragment hi havia dos gens de l'operó R (*trhR* i *trhY*); l'activador podia ser qualsevol dels dos o potser fins i tot els dos alhora. Per tal d'esbrinar-ho es van clonar els gens *trhR* i *trhY* per separat i conjuntament en plasmidis pBAD. Aquest tipus de plasmidi s'utilitza habitualment per controlar l'expressió dels gens clonats, ja que conté un promotor que respon al sucre **arabinosa**. Així doncs, els gens d'interès s'insereixen just a continuació d'aquest promotor, i se'n pot induir l'expressió afegint arabinosa al medi de cultiu. Si no s'hi afegeix, la seva expressió queda reprimida. A la figura 12 es recullen els resultats de l'experiment.

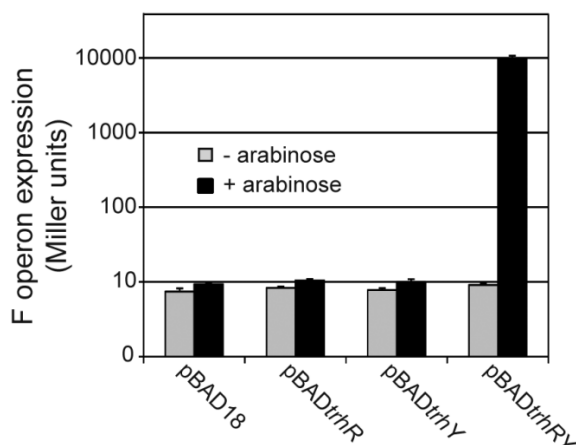


Figura 12. Expressió de l'operó F en la soca model amb els quatre plasmidis especificats: pBAD18 és el plasmidi buit (sense que s'hi hagi clonat cap gen); pBADtrhR conté el gen *trhR*; pBADtrhY conté *trhY* i pBADtrhRY conté tots dos gens. Aquest experiment demostra que només si s'expressen tots dos activadors alhora, TrhR i TrhY (en presència d'arabinosa), es produeix una inducció de l'expressió de l'operó F.

Així doncs, es van descobrir dos activadors essencials perquè tingui lloc la conjugació (les mutacions que desactiven l'operó R impedeixen totalment la conjugació) que actuen de forma contrària a HtdA.

Tot seguit, els investigadors es van preguntar si aquesta xarxa de regulació té algun paper en la influència que exerceix la temperatura ambient sobre la conjugació, estudiada anteriorment en el Departament. Amb experiments similars als anteriors es va determinar que, efectivament, la regulació exercida per H-NS en resposta a la temperatura té un efecte en l'expressió de l'operó R. És a dir: a una temperatura de 37°C, H-NS reprimeix l'expressió de l'operó R; per tant, no s'expressen els activadors de la conjugació i aquesta queda inhibida. En canvi, a temperatures inferiors (22-28°C), H-NS no impedeix que s'expressi l'operó R, amb la qual cosa es pot activar la conjugació. HtdA actua com a repressor en aquesta situació.

Finalment, per caracteritzar millor la xarxa de regulació es van realitzar un seguit d'experiments que aporten una idea de com interaccionen les proteïnes. El fonament és complex, però els resultats van permetre establir un model de regulació hipotètic, si bé encara es pot investigar més a fons.

Conclusions

A la figura 13 es poden veure dos possibles models plantejats pel grup a partir dels resultats obtinguts. Ja que les proteïnes i gens implicats estan molt conservats (són molt similars) dins dels plasmidis IncHI, aquest treball representa un pas molt important en la comprensió de la regulació de la conjugació en aquest grup de plasmidis, del qual R27 és model.

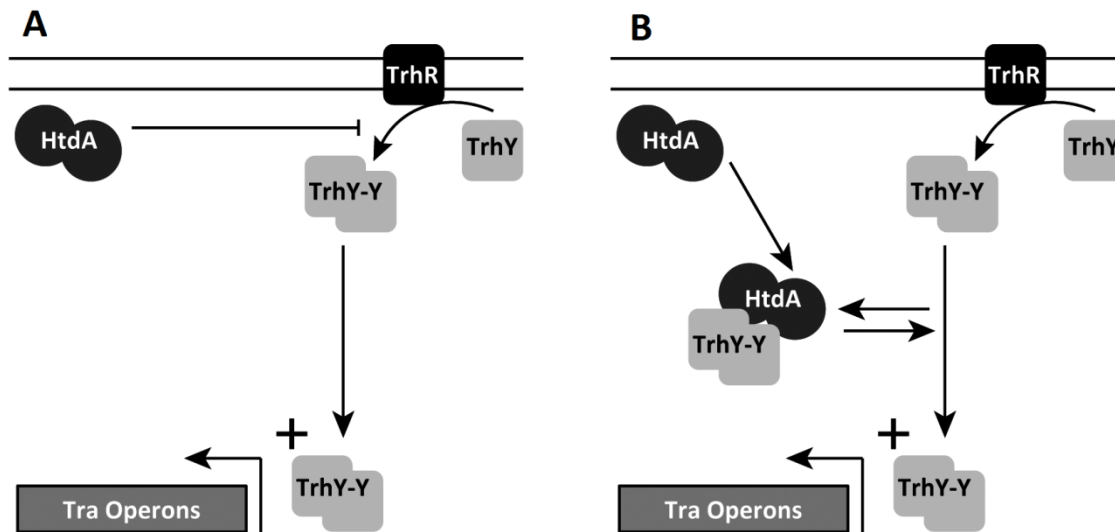
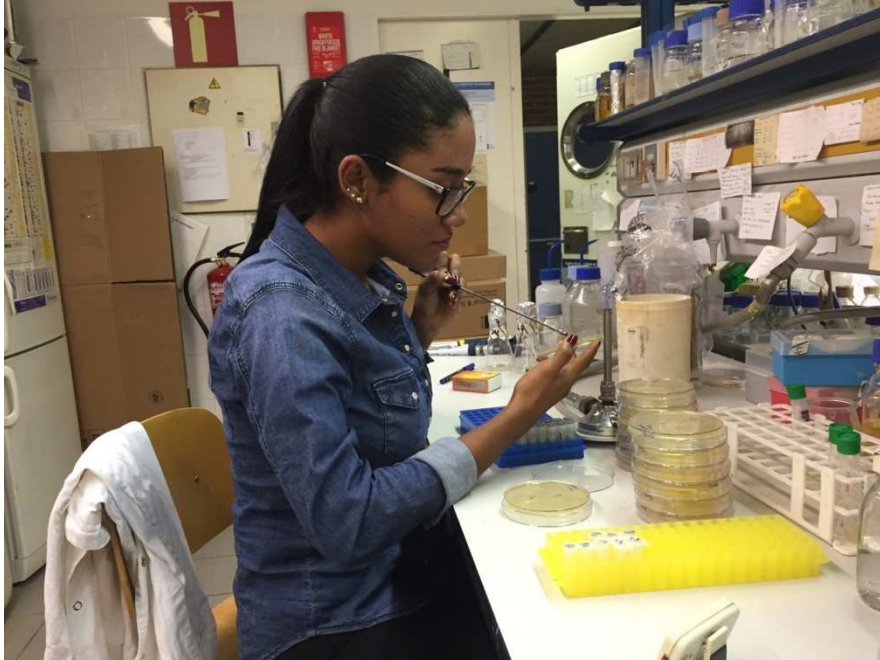


Figura 13. Esquemes de dues possibles versions del model de regulació de l'expressió dels operons *tra*, exercida per HtdA, TrhR i TrhY, i que en última instància regula la conjugació del plasmidi R27. Estudis bioinformàtics indiquen que TrhR és una proteïna que es troba inserida en la membrana cel·lular i que TrhY es pot unir al DNA (possiblement com a factor de transcripció). D'altra banda, els estudis d'interaccions revelen que HtdA i TrhY formarien agrupacions amb si mateixos i probablement també entre si. El model suggereix que TrhR actuaria com a algun tipus de sensor que induiria l'agrupació i activació de TrhY. Quan això succeís, TrhY s'uniria al DNA i promouria l'expressió dels operons *tra*. HtdA podria actuar inhibint l'activació de TrhY (model A) o bé segrestant-lo de forma que no es pogués unir al DNA (model B).

Tot i que de vegades la recerca bàsica, com és la que s'ha realitzat en aquest estudi, pugui semblar abstracta, a la llarga és la que fa avançar la ciència i, amb el temps, acaben sorgint-ne aplicacions clíniques. Potser ara mateix les malalties infeccioses no ens preocupen gaire, però si la resistència als antibiòtics es continua propagant al ritme actual aviat tornaran a suposar un problema. El sexe bacterià és en part la causa d'aquesta disseminació; per tant, conèixer a fons els mecanismes de regulació de la conjugació de diferents tipus de plasmidis podria ajudar-nos, en un futur, a frenar la disseminació de la multiresistència a antibiòtics en bacteris patògens.

Una visita al laboratori: coneixent els investigadors

Entrevista amb Tania Gaviria Cantin



La Tania és una estudiant de doctorat, actualment en el seu quart any. Va estudiar Biologia a Colòmbia i va venir a realitzar el Màster en Biotecnologia Molecular a la Universitat de Barcelona. Estudia el control de l'expressió gènica per reguladors globals a *Salmonella*.

Elsa: Des de quan t'ha interessat la ciència?

Tania: Bé, és una pregunta difícil. No puc donar una data exacta, però jo crec que des de sempre. Quan estava a l'escola, quan ens deixaven escollir assignatures, sempre anava per la part de biologia, química... I bé, crec que des de més o menys aquell moment, des de l'escola.

Què et va portar a Espanya?

Quan em pregunten que em va portar a Espanya, o per què vaig escollir-la, dic que crec que més aviat Espanya em va escollir a mi. Quan vaig acabar la carrera, estava buscant on fer un màster, i vaig sol·licitar-ho a diverses universitats a Colòmbia i aquí. Diguem que vaig pensar primer en Espanya per l'idioma, però al final vaig tenir l'oportunitat d'escollir entre quedar-me al meu país, en una molt bona universitat, o venir a Barcelona, que és una ciutat amb bastant renom a Sud-Amèrica. Tanmateix, no va ser per un interès en particular. Simplement volia ocupar-me, fer un màster, i a Barcelona se'm va donar l'oportunitat. Va ser el lloc on primer em van contestar, i on hi havia més facilitats de pagament.

I com vas arribar a aquest grup de recerca?

Al grup de recerca vaig arribar perquè quan estava fent el màster estava buscant un grup on treballessin en biotecnologia d'aliments, que era el que en principi volia fer. Aleshores em vaig

posar a mirar les assignatures, una d'elles era Biotecnologia Alimentària, i vaig trobar que el coordinador n'era Antonio Juárez, que era també part del nostre grup de recerca. Vaig contactar amb ell i òbviament en paral·lel també amb altres grups, perquè en principi jo volia treballar en la part industrial. L'Antonio em va contestar molt ràpid i em va dir que sí, que hi havia un projecte. Aleshores vaig venir, vaig parlar amb ell, i vaig començar a treballar en biotecnologia alimentària. I a partir d'aleshores les coses van canviar una mica, però en un principi va ser això.

Com és el teu dia a dia com a estudiant de doctorat?

El dia a dia és una mica difícil de dir... Depèn del dia, la setmana, l'any de doctorat... Però bé, per resumir-ho una mica: no em puc queixar, perquè de moment tinc un bon director i el projecte fins ara ha donat bons resultats. Podria dir que estic satisfeta, tot i que clarament hi ha dies més complicats en què les coses no surten. Però així en general puc dir que els dies són bons, amb tot el que comporta estar en un laboratori. O sigui, de vegades és molt fàcil, de vegades frustrant... Però en general bé.

Què és el que t'agrada d'aquest grup d'investigació?

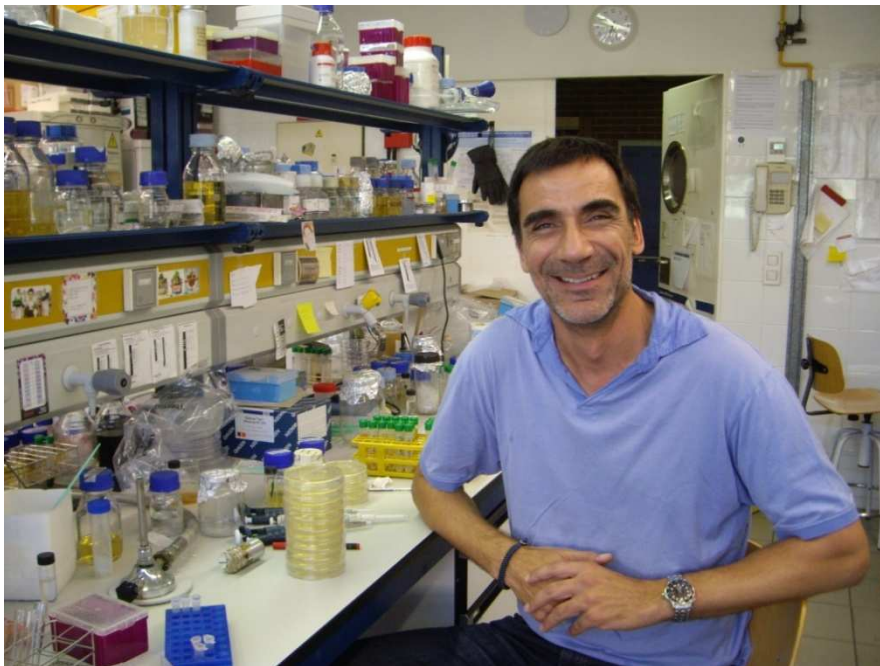
El primer, i com dic a tothom, és el meu director de tesi. Crec que tinc un bon cap i crec que és el millor que he tingut fins ara en la meua curta carrera professional. Agraïxo de debò estar amb un cap com en Carlos, i el que més m'agrada del grup és la dedicació que ell mostra envers els estudiants; sempre té un moment per resoldre un dubte. I a més a més, les persones del grup estan molt unides, saben treballar en equip. Si tens algun dubte també estan disposats a ajudar-te. I òbviament la recerca que fem, que encara que no continuï amb la línia de biotecnologia alimentària, és biologia molecular i genètica, que és el que sempre m'ha agradat.

Què t'ha aportat l'experiència del doctorat?

Abans que res, ha estat una experiència vital bastant important. Perquè és sortir del teu país, conèixer una altra cultura, altres pensaments, altra gent, un altre tipus de metodologia de treball... Però sobretot, quant a la part més experimental, les tècniques que utilitzem al laboratori. Perquè totes les tècniques que he après fins ara han estat noves per a mi. A la carrera me les van ensenyar d'una manera molt superficial, teòrica, però aquí li he donat aplicació, ho he fet per mi mateixa. Això per a mi ha estat una aportació enorme, perquè crec que, si en un futur em vull seguir dedicant a això, tinc una bona base.

I tens quelcom pensat per després de la tesi?

Aquesta és la pregunta del milió (riu). Sent sincera, m'agradaria canviar una mica la línia de recerca. No tant per la metodologia o les tècniques, però si canviar una mica el tema. No vull fer un *postdoc*, de moment. Si més endavant surt, doncs genial, però m'agradaria més anar al vessant industrial, que és la idea inicial que tenia jo en venir a Barcelona. M'agradaria treballar en una empresa, en I+D o en producció. Quelcom més aplicat, diria jo, més biotecnologia.

Entrevista amb Carlos Balsalobre Parra

En Carlos Balsalobre és doctor en Biologia i professor del Departament de Microbiologia. Va estudiar Biologia a la Universitat de Barcelona, on també es va doctorar en Microbiologia. A continuació va fer una estada postdoctoral a Suècia, i allà va quedar-se set anys, els últims quatre com a líder de grup. Finalment va tornar a Barcelona com a Investigador Ramón i Cajal. Des d'aleshores és líder del seu propi grup de recerca, i actualment treballa en col·laboració amb la doctora Cristina Madrid. El seu objectiu és passar-s'ho bé fent ciència.

Elsa: En quin moment et va començar a agradar la ciència?

Carlos: (riu) Això és molt curiós. Jo no hauria d'estar aquí, en principi. Vaig ser molt mal estudiant... El director del meu institut va recomanar als meus pares que no anés a la universitat. L'única cosa que jo aprovava era biologia. M'agradava. No sabia dir-te quan em va començar a agradar la ciència; jo crec que em va agradar molt l'ambient universitari, realment m'agradava aprendre, especialment dins el que era la biologia. De fet, em vaig començar a sentir atret per la microbiologia i vaig saber que volia fer alguna cosa més que estudiar el primer dia de classe de Microbiologia de tercer. Em va donar la classe Anna Maria Solanas, catedràtica que ara està retirada, i em vaig quedar garratibat, perquè vaig pensar: jo vull treballar amb això. Sí, em va encantar.

I què és el que més t'agrada de la microbiologia?

Jo diria, de fet, que ara mateix no és tan important que sigui microbiologia. Per a mi ara la microbiologia és còmode, perquè en sé, i sé com treballar-hi. Però realment després de molts anys, penso que a mi realment el que m'agrada és intentar entendre mecanismes tant de regulació com de processos cel·lulars. I els bacteris tenen encara molt per mostrar-nos; moltes coses que tenen aplicabilitat i poden donar solucions a problemes reals de la societat. I això

m'agrada. Molts cops penso que no tindrien perquè ser bacteris, però crec que realment la *micro* és molt més important del que de vegades pot semblar. Estic d'acord en què malalties com el càncer, cardiovasculars, neurodegeneratives... són molt importants, i vull que es faci molta recerca en això. Però les malalties infeccioses encara causen molts problemes. Encara hi ha molta gent que passa gana, i es llença molt aliment, perquè es considera que microbiològicament parlant no és acceptable. Qualsevol cosa que es pugui fer per millorar això implicaria que més gent podria menjar. I per altra part, i els bacteris van ser el primer model per l'estudi en biologia. Tots els processos biològics bàsics (transcripció, traducció, replicació...) estan descrits en *Escherichia coli*; han estat un model fantàstic per entendre la vida. I crec que encara tenen molt per donar, perquè molta mecanística està conservada en eucariotes.

En aquests moments què és el que més t'agrada de la teva feina?

Podria dir que hi ha diferents coses que m'agraden molt. Com a professor universitari tinc la dualitat de poder fer docència i recerca. A mi fer docència m'agrada molt, i crec que està molt bé quan ets un investigador i tens la possibilitat de fer classes relacionades amb allò en què tu treballes, perquè pots enriquir-les molt. Pots fer classes en què els alumnes s'ho passen bé perquè ets capaç de proporcionar il·lusió. Una altra cosa relacionada, i de les que a mi m'agraden més, és formar científics. M'agrada que vinguin estudiants al laboratori, que aprenguin, s'ho passin bé i si pot ser que facin una bona recerca. M'agrada deixar que pensin. Generalment estic molt content de la feina que han fet els meus estudiants. I el que més m'agrada de la ciència és agafar les pipetes amb les mans i posar-me a treballar, però això ho puc fer en molt poques estones; tenim molt poques possibilitats de fer-ho. I és una cosa que no entenc del sistema. Perquè la gent que fa una bona tesi, és a dir, la gent que té bones mans i un bon cap, són els que aconsegueixen continuar més endavant. I aleshores et treuen les pipetes de les mans. És molt difícil estar a la poiatà. De fet, si et fixes, la Cristina i jo som dels pocs professors que encara anem al laboratori. Ens agrada molt, però podem estar-hi molt poc.

Quin ha estat el moment més gratificant en la teva carrera científica?

El moment més gratificant? N'hi ha hagut molts. Jo crec que la carrera científica és una carrera en què es pateix, però al mateix temps tens igual o més satisfacció. Recordo amb molt *carinyo* el dia de la meva tesi, però també el dia de les meves oposicions o quan em vaig habilitar. La meva tesi i l'habilitació, que era un procés necessari quan vaig incorporar-me per ser professor titular, han estat moments en què he jo he explicat la meva trajectòria de molts anys a altres persones. És dur, perquè tothom passa nervis, però és un dia en què pots mirar enrere, explicar fins on has arribat i tenir una discussió. A mi m'agrada molt parlar, l'intercanvi d'opinions. També és molt gratificant quan has publicat un article molt bo, però això cada vegada menys. I les tesis dels meus alumnes també m'agraden molt.

Quines penses que són les qualitats més importants en un investigador?

L'honestedat. En una frase que vaig escriure en els agraïments al meu director de tesi li vaig agrair que "em va ensenyar la importància de qualitats com l'honestedat i la perseverança a l'hora de dur a terme un treball científic, coneixements que no hi són als protocols però que sens dubte són molt més valuosos". I realment és així. Aquest és un món de molts egos,

tothom vol ser *premi Nobel*, també a petita escala. És un món on hi ha molta competitivitat, sobretot quan et mous a l'estranger. Sempre hi ha gent que té els peus molt lluny de terra. Jo crec que és molt important ser honest, intentar entendre les coses i si no s'entenen, doncs no s'entenen. Segurament si no s'entenen és perquè no tens les eines suficients, o potser perquè no ets prou intel·ligent, tant fa. No crec que per ser un bon científic sigui necessari tenir un punt més d'intel·ligència respecte els altres. Però realment crec que cal ser honest i fer les coses amb humilitat. I ser perseverant. No pots posar-te a plorar cada cop que tens un mal resultat, o quan et diuen que no en demanar una beca. Perquè hi ha molts *nos* en ciència. També és molt important el treball en equip, dissenyar els experiments amb la participació de més d'una persona. Resumint, s'ha de ser honest, perseverant i constant, perquè tota la resta es pot aprendre.

Agraïments

Agraïco a en Carlos i la Tania que m'hagin concedit part del seu temps per les entrevistes, i a en David que em donés l'oportunitat d'escriure un article per a B-ON.

Bibliografia

- Arutyunov, D., Frost, L. S. (2013) F conjugation: Back to the beginning. *Plasmid* 70, 18–32.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., Arechaga, I. (2014) Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 81–95.
- Crump, J. A., Luby, S. P., Mintz, E. D. (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.* 346–353.
- Forns, N., Baños, R. C., Balsalobre, C., Juárez, A., Madrid, C. (2005) Temperature-dependent conjugative transfer of R27: Role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* 187, 3950–3959.
- Gibert, M., Juárez, A., Zechner, E. L., Madrid, C., Balsalobre, C. (2014) TrhR, TrhY and HtdA, a novel regulatory circuit that modulates conjugation of the IncHI plasmids. *Mol. Microbiol.*
- Gibert, M., Juárez, A., Madrid, C., Balsalobre, C. (2013) New insights in the role of HtdA in the regulation of R27 conjugation. *Plasmid* 70, 61–68.
- Margulis, L., Sagan, D., Thomas, L., Guerrero, R. (Tusquets, 1995) *Microcosmos*: cuatro mil años de evolución desde nuestros ancestros microbianos.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Microbiología médica*: sexta edición. (Elsevier España, 2009).
- Paytubi, S. *et al.* (2014) A novel role for antibiotic resistance plasmids in facilitating Salmonella adaptation to non-host environments. *Environ. Microbiol.* 16, 950–962.
- Sherburne, C. K. (2000) The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from Salmonella typhi that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* 28, 2177–2186.

Willey, J. M. et al. *Microbiología*: séptima edición. (McGraw/Hill Interamericana de España, 2009).

Referències de les imatges

Portada, figures 1B, 1C, 3, 5 i 6: Elsa Velasco Benito.

Figura 1A: Mariana Ruiz Villarreal LadyofHats, via Wikimedia Commons.

Figura 2A: Imperial War Museum (<http://media.iwm.org.uk/iwm/mediaLib//22/media-22075/large.jpg>)

Figura 2B: Christine L. Case (<http://www.smccd.edu/accounts/case/antibiotics.html>)

Figura 4: Spaully, via Wikimedia Commons (editada).

Figura 7A: CDC/ Dr. Patricia Fields, Dr. Collette Fitzgerald (CDC Public Health Image Library: <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>)

Figura 7B: Elapied, via Wikimedia Commons.

Figura 7C: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (CDC Public Health Image Library: <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>).

Figura 8: Crump, J. A., Luby, S. P., Mintz, E. D. (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.* 346–353.

Figura 9: *E. coli* Genome Project – University of Wisconsin-Madison (<http://www.genome.wisc.edu/plasmid/r27.htm>).

Figures 10-13: Gibert, M., Juárez, A., Zechner, E. L., Madrid, C., Balsalobre, C. (2014) TrhR, TrhY and HtdA, a novel regulatory circuit that modulates conjugation of the IncHI plasmids. *Mol. Microbiol.*