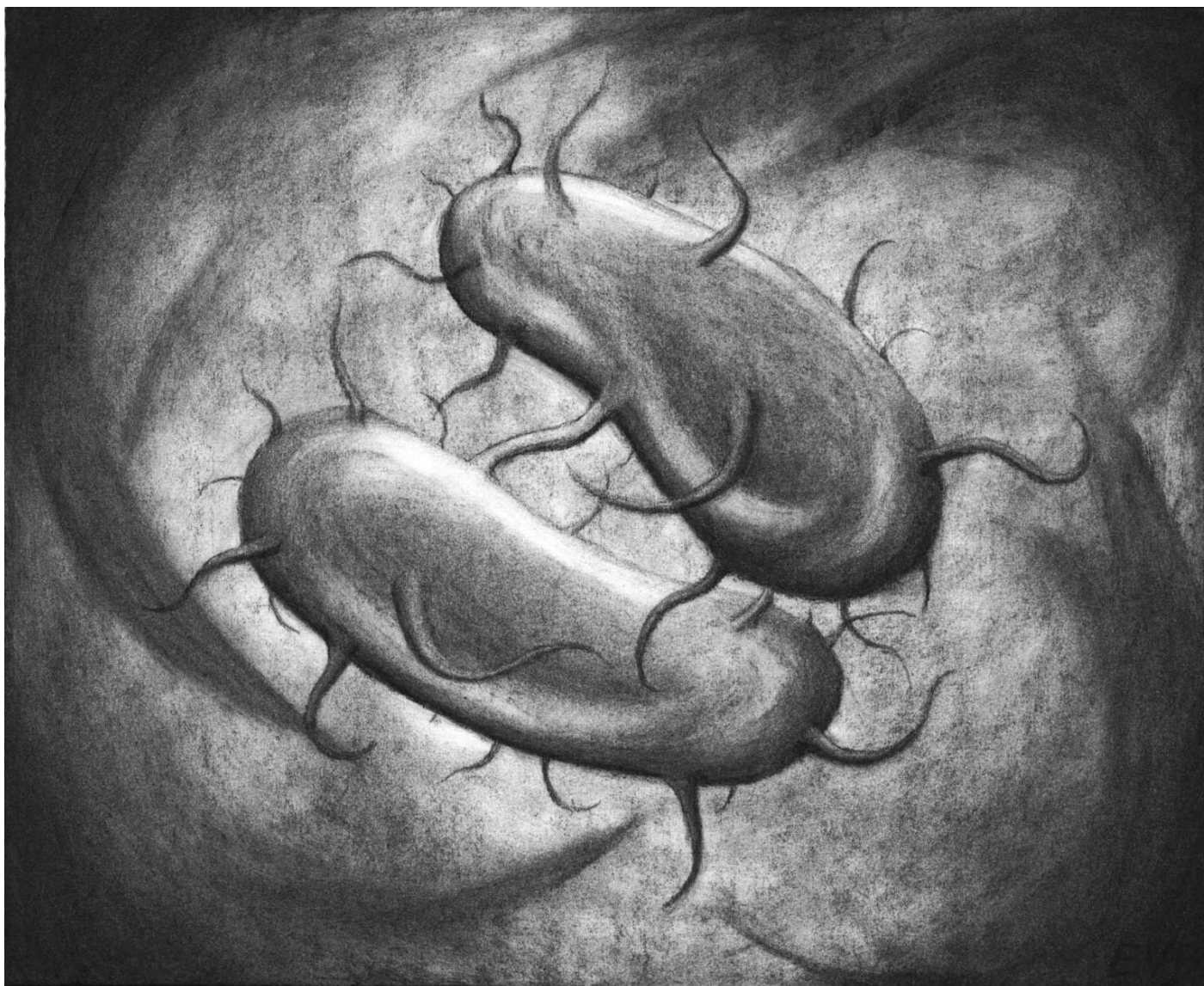


EL SEXO DE LAS BACTERIAS

Elsa Velasco Benito



Estamos a punto de adentrarnos en un mundo fascinante. Un mundo de seres microscópicos, invisibles a nuestros ojos y sin embargo ubicuos en nuestro entorno. Un mundo donde la única regla es la supervivencia del más apto, y todo vale para conseguirlo. Un mundo oscuro y a la vez maravilloso por su complejidad.

Hablamos del mundo de la **biología molecular bacteriana**. Un mundo estudiado en detalle en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, en el grupo de investigación dirigido por los doctores Carlos Balsalobre y Cristina Madrid. Desde hace muchos años se dedican a descubrir nuevas piezas del enorme rompecabezas que son las redes de regulación de genes bacterianos, en el intento de averiguar cómo responden las bacterias a los cambios en el entorno.

El mundo bacteriano

Probablemente todo el mundo ha oído hablar de las **bacterias**: unos organismos microscópicos con cierta mala fama, a menudo inmerecida. Si bien es cierto que en ocasiones algunas de ellas nos lo hacen pasar mal, la mayoría son totalmente inofensivas. Para hacernos una idea, las bacterias dominan el mundo. Literalmente. Están en todas partes: en el suelo, el agua, el aire e incluso en nuestro interior. Y la mayor parte del tiempo eso no nos causa ningún problema.

Al igual que nosotros, las bacterias están formadas por **células**. De hecho, cada una de ellas es una sola célula **procarionta**, ligeramente distinta de nuestras células, que son **eucariotas**. Las células procariontas son en general menos complejas y más pequeñas que las eucariotas. Además del tamaño, la diferencia principal es que el interior de las células eucariotas se encuentra altamente compartimentado, y el material genético o DNA (ácido desoxirribonucleico) se halla contenido dentro de un núcleo. En cambio, las células procariontas carecen de compartimentos y el DNA está libre en su interior. Pero, a pesar de las apariencias, el mundo de las bacterias es mucho más diverso y versátil que el nuestro.

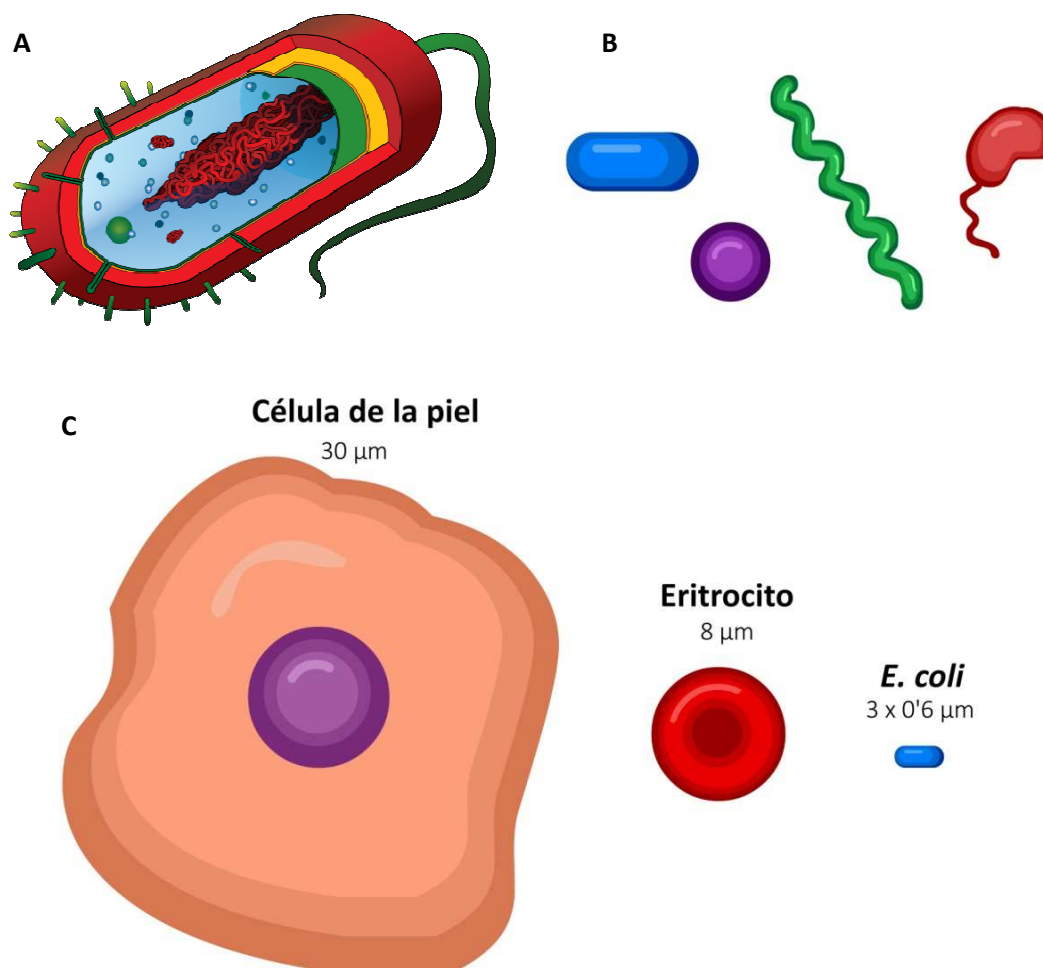


Figura 1. **A:** Estructura de una célula procarionta. **B:** Diversas morfologías bacterianas. **C:** Comparación del tamaño de dos células humanas (célula de la piel y eritrocito o glóbulo rojo) y una célula bacteriana (*Escherichia coli*).

El lado oscuro de las bacterias

Dentro de la versatilidad de las bacterias se encuentra, desgraciadamente, la capacidad de infectar otros organismos y causarles enfermedades. Las bacterias que poseen esta capacidad se califican como **patógenas**, y la capacidad en sí se denomina **patogenicidad**.

Hay otros agentes infecciosos que también provocan enfermedades, como los **virus**, y algunos **hongos** y **protistas**. Hay que evitar confundirlos, ya que son radicalmente diferentes de las bacterias, aunque pueden dar lugar a síntomas parecidos. Algunos ejemplos de enfermedades causadas por infecciones bacterianas son la tuberculosis, la faringitis estreptocócica, el tétanos, la peste negra, la salmonelosis, el tifus o la neumonía. Como se puede ver, las infecciones bacterianas pueden ser desde leves hasta mortales, y han supuesto un grave problema a la humanidad desde sus inicios. Afortunadamente, hoy en día prácticamente hemos olvidado la amenaza que suponen gracias al descubrimiento de los antibióticos.

Antibióticos: ¿el fin de las infecciones bacterianas?

Un antibiótico es una sustancia de origen biológico, producida por microorganismos y que tiene la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Los antibióticos, por tanto, no son un invento humano, sino que probablemente han existido desde hace muchos millones de años. Sin embargo, en la actualidad también los producimos nosotros de forma artificial, y es por eso que se utiliza el término **antimicrobiano**, que incluye todas las sustancias, sintéticas y biológicas, con actividad inhibitoria contra microorganismos.

El primero en describir el efecto de los antibióticos fue el médico escocés Alexander Fleming (figura 2A), en el año 1928. Fleming descubrió la existencia de la **penicilina** prácticamente por casualidad, trabajando con cultivos bacterianos en el laboratorio. Observó que un cultivo se había contaminado con un hongo del género *Penicillium*, y que a su alrededor no crecían bacterias (figura 2B). A partir de aquí dedujo que el hongo producía una sustancia tóxica para las bacterias, a la cual llamó *penicilina*.

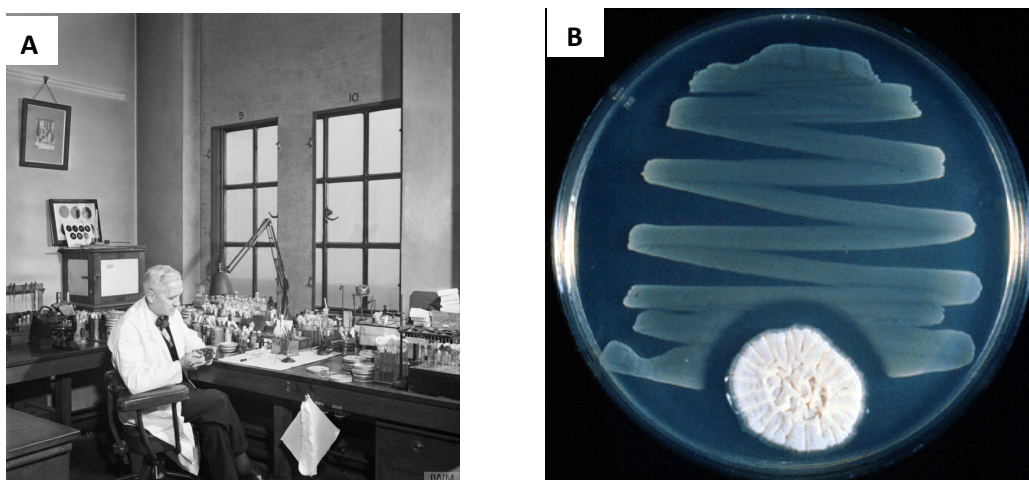


Figura 2. A: Fotografía de Alexander Fleming trabajando en su laboratorio. **B:** Cultivo en placa de un hongo *Penicillium* sobre una estría de bacterias. Se observa un halo de inhibición rodeando el hongo, a causa de la penicilina.

El descubrimiento de los antibióticos marcó un antes y un después en la medicina; gracias a ellos la esperanza de vida de la población se incrementó de forma abrupta. Su eficacia queda demostrada por el hecho de que actualmente, al menos en Occidente, la mayoría de la población no vive con miedo de infectarse con tuberculosis o fiebre tifoidea, por ejemplo.

No obstante, cabe recordar la gran adaptabilidad característica de las bacterias. Otra diferencia con los eucariotas es que tienen una tasa de **mutación** más elevada: su DNA sufre cambios bastante a menudo, y eso hace que se puedan adaptar a condiciones desfavorables con relativa facilidad. Es decir: en un entorno hostil probablemente gran parte de una población bacteriana morirá; pero, si esta población presenta una gran variabilidad genética (gracias a una tasa de mutación elevada), es posible que existan algunos individuos que puedan sobrevivir. Estas bacterias podrán reproducirse con ventaja y finalmente sustituirán la población original. Este mecanismo es un tipo de **selección natural**, que es la base de la **evolución**.

Retomando el tema inicial, cuando tomamos antibióticos estamos creando unas condiciones hostiles para las bacterias que se encuentran en nuestro cuerpo. Si, casualmente, algunas de estas bacterias presentan **resistencia** al antibiótico administrado, se estará produciendo un proceso de selección: estaremos favoreciendo la reproducción de las bacterias resistentes (figura 3).



Figura 3. Proceso de selección de una bacteria resistente por el tratamiento con un antibiótico. La población original, de gran diversidad, queda sustituida por bacterias resistentes.

Inevitablemente, el uso (y en ocasiones abuso) sistemático de antibióticos ha llevado a la aparición y propagación de bacterias multirresistentes, que pueden sobrevivir sin problemas en presencia de varios antibióticos a los que antes eran susceptibles. La situación empieza a resultar preocupante, ya que el ritmo al cual se desarrollan nuevos agentes antimicrobianos se está reduciendo, mientras que el fenómeno de resistencia no deja de crecer.

Además, la resistencia a antibióticos es también un fenómeno que se desarrolló en la naturaleza, mucho antes del uso clínico de estos fármacos, en ambientes donde convivían especies productoras de antibióticos con otras bacterias. Existen múltiples formas de resistencia, algunas altamente sofisticadas. Y en estos momentos también se encuentran en bacterias patógenas. ¿Cómo han llegado hasta ahí?

Promiscuidad bacteriana

Como ya se ha visto, uno de los motivos por los cuales las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación es que sufren mutaciones con mayor frecuencia que otros organismos. Pero no es la única estrategia de que disponen. De hecho, poseen una mucho más potente: el **sexo**.

Las bacterias se reproducen por **fisión binaria**. Eso significa que en el momento de reproducirse cada célula bacteriana replica su DNA y a continuación se divide en dos células idénticas entre sí y respecto a la célula progenitora. Se trata, pues, de un tipo de **reproducción asexual**. Sin embargo, eso no significa que no tengan otras formas de sexo, entendiendo como tal la generación de individuos genéticamente distintos a partir de la combinación de material genético de organismos diferentes.

En nuestro caso, y a pesar de lo que algunos puedan pensar, el objetivo biológico de la sexualidad es la reproducción: la fecundación es la fusión de dos células con información genética proveniente de dos seres diferentes, y da lugar a un individuo único. En el mundo bacteriano, en cambio, el sexo no tiene finalidades reproductivas. Es por eso que a menudo a la sexualidad bacteriana se la llama **parasexualidad**.

Existen diversos mecanismos de parasexualidad bacteriana: la **transformación** (incorporación directa de material genético que se encuentre libre en el entorno), la **transducción** (transporte de DNA de una bacteria a otra a través de un virus) y la **conjugación** (transmisión directa de DNA de una bacteria a otra). En este texto nos centraremos en el último, pero antes hay que profundizar un poco más en la genética bacteriana.

DNA de bolsillo

El término **cromosoma** es bastante conocido. Básicamente, un cromosoma es un fragmento de DNA. Normalmente cada célula eucariota tiene muchos, pero las bacterias sólo tienen uno, y con forma circular. Sin embargo, muchas de ellas poseen además pequeños fragmentos de DNA (también circulares) llamados **plásmidos**, y cada bacteria puede tener varios (figura 4).

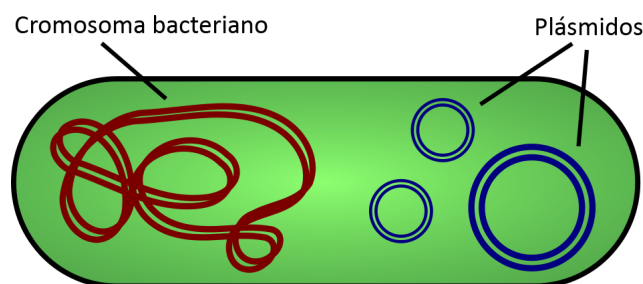


Figura 4. Esquema de una célula bacteriana, con su cromosoma y tres plásmidos.

Los plásmidos se denominan **elementos genéticos móviles** porque son fácilmente intercambiables entre células. Además, son capaces de replicarse, del mismo modo que el cromosoma. Así pues, cuando las células bacterianas se dividen los plásmidos se reparten entre ellas, con lo que suelen tener una herencia estable. Eso provoca que los plásmidos se diseminen fácilmente y se mantengan en las poblaciones.

Hay otros tipos de elementos genéticos móviles, pero en este texto sólo mencionaremos uno más: los **transposones**. Los transposones son secuencias de DNA que pueden *saltar* al azar de un lugar a otro en el DNA, tanto cromosómico como plasmídico. Se trata de una fuente de variabilidad genética dinámica y de gran importancia, ya que según dónde se insieran provocarán unos efectos u otros. Por ejemplo, pueden activar o desactivar completamente la expresión de un gen.

Tanto los plásmidos como los transposones pueden contener **genes de resistencia a antibióticos**, y de hecho son los principales vehículos de su propagación. Muchos genes de resistencia surgieron en la naturaleza y han llegado a nivel clínico gracias a estos elementos genéticos móviles.

Regalando genes: la conjugación

Algunos plásmidos confieren a las bacterias portadoras una capacidad singular: la de transmitir dichos plásmidos a otras bacterias que no los tengan. Se trata de los **plásmidos conjugativos**, y que el proceso de transmisión se denomina **conjugación**. En el modelo más simple de conjugación bacteriana se transfiere el plásmido conjugativo de una bacteria donadora (normalmente llamada *fértil*) a otra receptora (figura 5).

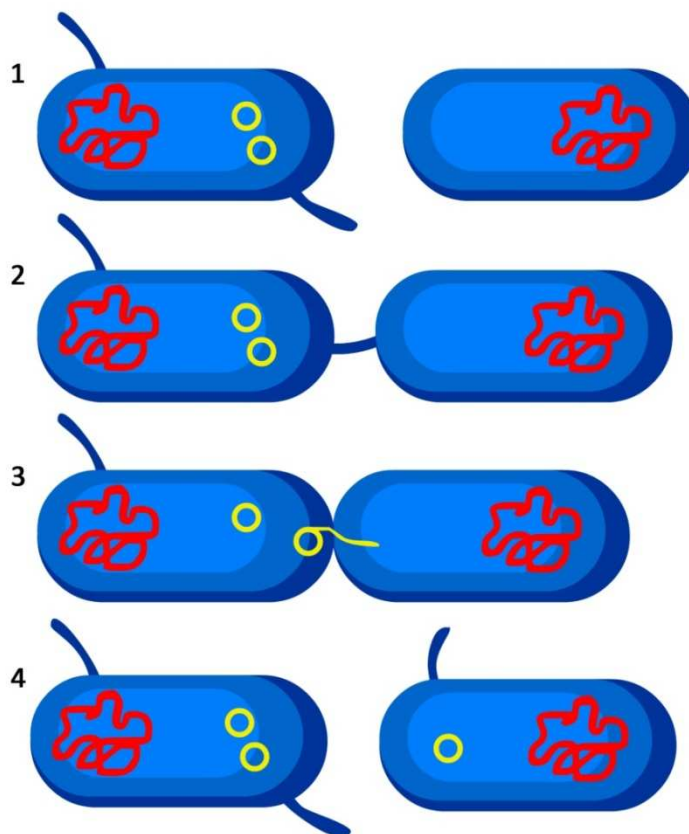


Figura 5. Representación esquemática del proceso de conjugación. El plásmido conjugativo se representa en color amarillo, y el cromosoma en rojo.

Los plásmidos conjugativos contienen todos los genes necesarios para que tenga lugar la conjugación. Las células que los poseen pueden producir unos orgánulos llamados **pili sexuales**

(*pilus* en singular), que son estructuras proteicas alargadas y retráctiles situadas en la superficie de la célula. En su extremo poseen receptores que se enganchan a otras bacterias, lo que permite acercarlas a la célula donadora hasta que establecen un contacto íntimo. En este contacto se forma un canal a través del cual se bombea el plásmido conjugativo desde la célula donadora a la receptora.

Si el plásmido conjugativo se transmite íntegramente, la célula receptora se convertirá en fértil y podrá transferirlo a otras células. Además, no es necesario que dos bacterias sean de la misma especie para que puedan llevar a cabo una conjugación. Por esas dos razones, la conjugación es un mecanismo extraordinariamente eficiente de transmisión de genes dentro de poblaciones bacterianas.

Un entremés de biología molecular

Hoy en día prácticamente todo el mundo conoce la palabra **gen**. Todos tenemos genes, que heredamos de nuestros padres y transmitimos a nuestros hijos. Los genes determinan una parte muy importante de lo que somos. Pero ¿cómo lo hacen?

De los genes a las proteínas

Se podría decir que el DNA es el libro de instrucciones que permite que un organismo funcione correctamente. Como todo libro, contiene letras organizadas en forma de palabras y frases, con significados concretos. Pero el libro por sí sólo no hace que funcionen los organismos; alguien tiene que leer las instrucciones y construir la maquinaria necesaria.

La lectura se realiza en dos etapas (figura 6). La primera se denomina **transcripción**, y es el proceso por el cual el mensaje escrito en el DNA se transcribe a otro ácido nucleico: el RNA (ácido ribonucleico) mensajero (mRNA). A continuación, el mRNA es leído por unos orgánulos llamados **ribosomas** en lo que se conoce como **traducción**: los ribosomas fabrican **proteínas** leyendo las instrucciones del mRNA. Curiosamente, el lenguaje en que están escritos los libros de instrucciones de todos los seres vivos es prácticamente universal; se llama **código genético**.

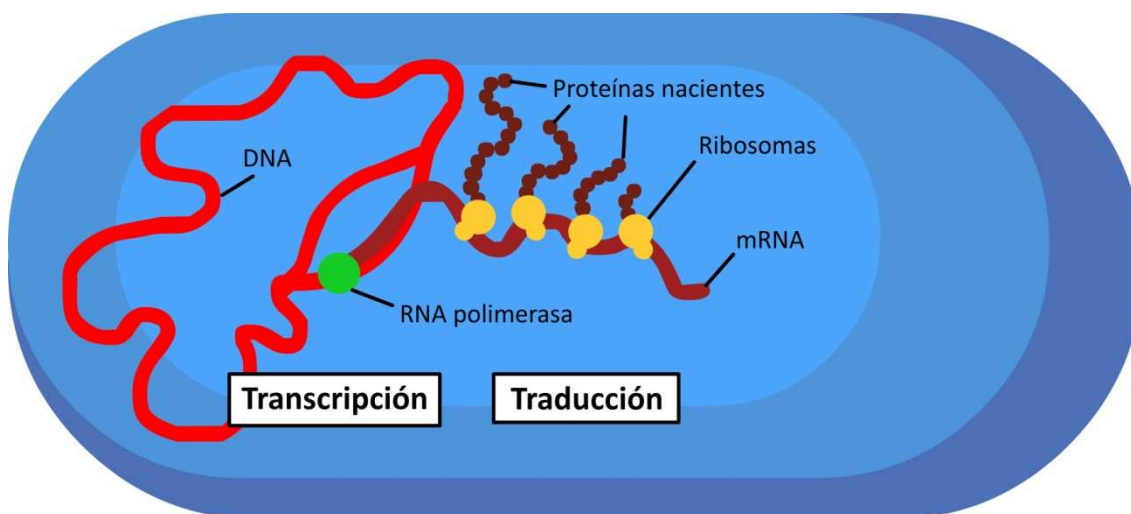


Figura 6. Ilustración de la transcripción y la traducción en bacterias.

Las proteínas son el principal elemento estructural y funcional de las células: son la maquinaria que las mantiene vivas. Un tipo particularmente importante son las **enzimas**. Se trata de proteínas que catalizan las reacciones químicas. La vida, en esencia, no deja de ser un enorme conjunto de reacciones químicas y físicas, pero para que se produzcan hacen falta dos cosas: energía y velocidad. La energía se obtiene de diversas fuentes, y la velocidad la proporcionan las enzimas. Sin enzimas, las reacciones necesarias para la vida serían tan lentas que directamente sería como si no se produjeran.

Pero regresemos al libro de instrucciones. La transcripción de los genes también se denomina **expresión génica** y, evidentemente, no se produce en todos los genes a la vez (sería como una orquesta en la que todos los músicos tocasen a la vez y sin ningún orden). Al contrario: se halla estrictamente regulada.

Una orquesta con muchos directores

La transcripción la realiza una enzima llamada **RNA polimerasa**, que fabrica el RNA mensajero a partir de lo que lee en el DNA. Para poder llevar a cabo su labor tiene que unirse al DNA, pero no puede hacerlo por sí sola: necesita la ayuda de otras proteínas que reciben el nombre de **factores de transcripción**. Concretamente, éstos pueden tanto facilitar como impedir la unión de la RNA polimerasa al DNA.

Los factores de transcripción son capaces de unirse a secuencias específicas en el DNA, situadas justo antes del inicio de los genes. Estas secuencias se llaman **promotores**, y pueden tener influencia sobre uno o más genes. Generalmente, a cada promotor se pueden unir varios factores de transcripción, que regulan la expresión de los genes bajo el control de dicho promotor. Son los directores de la orquesta génica.

La situación concreta en que se halla una célula determina qué factores de transcripción se unen a los distintos promotores. De esta forma se puede controlar qué genes se expresan en cada momento en función de las necesidades que tenga la célula. Esto sucede en todos los seres vivos, desde las bacterias hasta nosotros. Por ejemplo, si una bacteria se encuentra con una gran cantidad de lactosa (el azúcar de la leche), expresará los genes específicos para metabolizar dicho azúcar. Pero no lo hará si hay otros azúcares más fácilmente aprovechables, como la glucosa, ya que estaría malgastando energía innecesariamente; los seres vivos tienden a optimizar al máximo sus procesos biológicos.

Hay otros mecanismos más complejos de regulación de la expresión génica, que implican modificaciones en el propio DNA, RNA que no codifica para proteínas, y probablemente otros que ni siquiera conocemos. El genoma es la orquesta con más directores del mundo.

Biología molecular bacteriana en la Facultad de Biología

En el Departamento de Microbiología hallamos un grupo de investigación sobre biología molecular bacteriana, dirigido por los doctores Cristina Madrid y Carlos Balsalobre. En este grupo se investiga la regulación de diversos genes implicados en la virulencia de bacterias entéricas patógenas (bacterias que normalmente causan infecciones del tracto gastrointestinal). Tradicionalmente han trabajado con lo que se denomina **reguladores globales de la expresión génica**, en las bacterias *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. Están interesados en cómo responden las bacterias a distintos estímulos ambientales a través de la regulación de la expresión de sus genes.

Debido a la crisis económica, y con tal de conseguir mejores oportunidades de financiación, en los últimos años el grupo ha realizado un cambio de orientación para trabajar en líneas de investigación más aplicadas. Han desarrollado un importante proyecto sobre conjugación bacteriana, del cual hablaremos a fondo más adelante. Desde más recientemente están investigando la regulación de la formación de biofilms por *Salmonella enterica*, con el objetivo final de buscar inhibidores para reducir la contaminación de alimentos por esta bacteria. El último proyecto que han iniciado consiste en el estudio de diferentes cepas de *Campylobacter* para determinar en qué se caracterizan las cepas patógenas. Sin embargo, quieren mantener el espíritu de la investigación básica, y seguir indagando en la regulación de la expresión génica, ámbito en el que todavía queda mucho por descubrir, y que es lo que más les interesa.

Bacterias entéricas patógenas

En este grupo de investigación se trabaja sobre todo con *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, aunque en el último año también se ha iniciado un proyecto sobre *Campylobacter*.

Escherichia coli (figura 7A) es una bacteria que normalmente se encuentra en nuestro intestino. Existen infinidad de cepas, y muchas de ellas son patógenas. Pueden causar diversas afecciones gastrointestinales, desde diarrea leve (como por ejemplo la diarrea del viajero) hasta colitis hemorrágica, potencialmente mortal. Algunas cepas extraintestinales provocan infecciones en otras partes del cuerpo, como infecciones de orina o meningitis.

En el género ***Campylobacter*** (figura 7B) hay algunas especies que provocan enfermedades en humanos. Las más relevantes son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Ambos provocan gastroenteritis y se contagian ingiriendo alimentos contaminados, ya que su reservorio son las aves de granja. Tienen una elevada incidencia en Europa, y en algunos casos pueden dar lugar a complicaciones graves.

Salmonella enterica (figura 7C) es una especie fundamentalmente patógena en humanos. Se conocen cuatro tipos principales causantes de infecciones: *S. enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* serovar Typhimurium provocan una gastroenteritis llamada **salmonelosis**, mientras que *S. enterica* serovar Typhi y *S. enterica* serovar Paratyphi causan **fiebre tifoidea**, más grave. En nuestro entorno es más conocida la salmonelosis, pero la fiebre tifoidea constituye un problema sanitario en muchos países en vías de desarrollo. En todos los serovares se están

extendiendo resistencias a múltiples antibióticos, lo cual complica el tratamiento de estas enfermedades. Se ha observado que muchas de estas resistencias están asociadas a plásmidos.

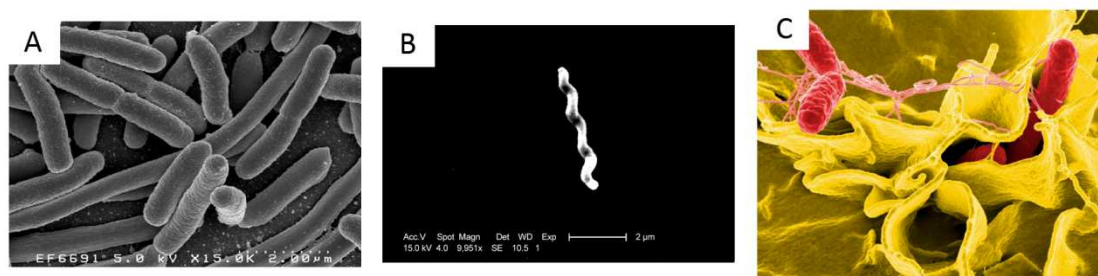


Figura 7. Fotografías realizadas con microscopio electrónico de rastreo de: **A:** *Escherichia coli*; **B:** *Campylobacter jejuni*; **C:** *Salmonella enterica* (en ésta última el color se ha añadido por ordenador).

El plásmido R27 de *Salmonella enterica*

Los plásmidos bacterianos son extremadamente diversos, pero según sus características se pueden clasificar en grupos. En este texto no entraremos a fondo en la clasificación, pero sí mencionaremos un grupo: los **plásmidos IncHI1**. Estos plásmidos son **conjugativos** y se encuentran principalmente en los serovares de *S. enterica* causantes de fiebre tifoidea, donde son en parte responsables de la adquisición de resistencias a múltiples antibióticos. Sin embargo, también se pueden transferir a otras enterobacterias, como *Escherichia coli*.

El **plásmido R27** es el que mejor se ha estudiado de este grupo. Se aisló, no obstante, a partir de una cepa de *S. enterica* Typhimurium (causante de salmonelosis) resistente al antibiótico **tetraciclina**, en el Reino Unido en 1961. En este proyecto se ha investigado cómo se regula la conjugación de dicho plásmido.

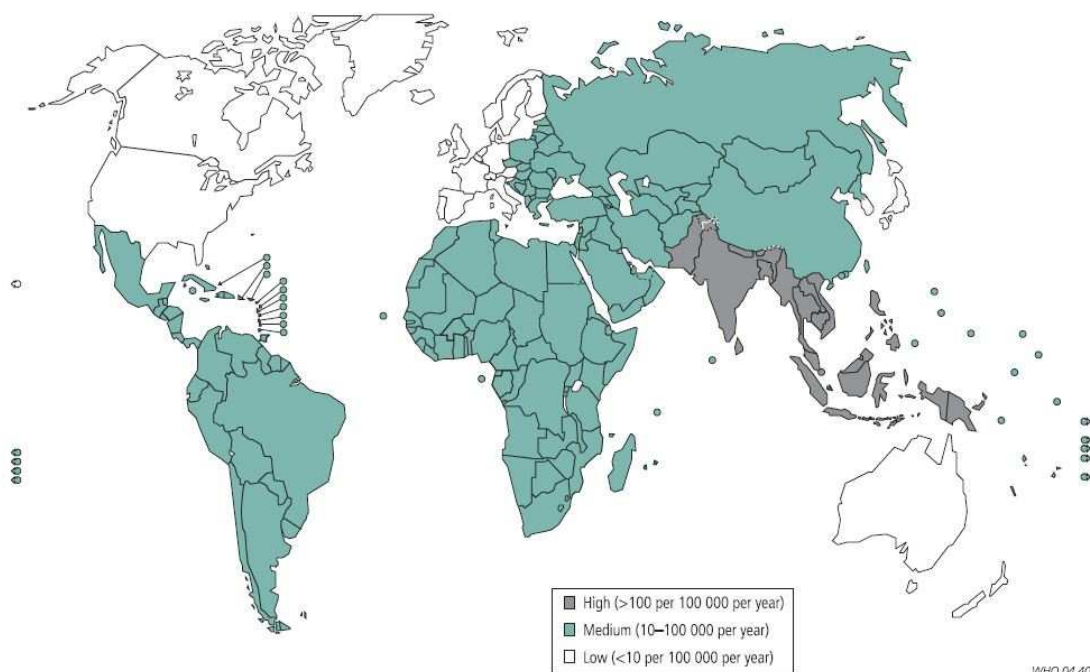


Figura 8. Mapa de distribución de la fiebre tifoidea con una escala de colores según la incidencia en los distintos países.

El rasgo más característico de la conjugación de los plásmidos IncHI1 es que se produce sólo a temperaturas inferiores a 37°C, la temperatura corporal de los mamíferos. Este hecho es sorprendente porque significa que no pueden ser diseminados mientras las bacterias portadoras se encuentran en el interior de sus huéspedes. La temperatura óptima de conjugación de estos plásmidos se encuentra entre los 22 y los 28°C, rango que coincide con la temperatura ambiente en muchas regiones con clima tropical, donde la fiebre tifoidea es endémica (figura 8). Así pues, se cree que los plásmidos IncHI1, incluyendo R27, contribuyen a la propagación de resistencias a antibióticos y otras características ventajosas mientras *Salmonella enterica* se halla fuera de sus huéspedes.

De hecho, se sabe que el hecho de que una bacteria posea este plásmido tiene una gran influencia en la expresión de los genes del cromosoma, lo que le confiere características singulares, no sólo en el ámbito de la patogenicidad. Eso hace pensar que el plásmido R27 evolucionó en el ambiente hasta que en algún momento llegó cepas patógenas. En este punto probablemente fue seleccionado por el uso de tetraciclina, aunque es posible que también aporte otras características beneficiosas para la patogenicidad de *S. enterica*.

La orquesta del plásmido R27

R27 (figura 9) es un plásmido muy grande: 180 kilobases, o 180.000 pares de bases (las **bases nitrogenadas** vendrían a ser las letras del texto escrito en el DNA). Contienen multitud de genes; la función de la mayoría de ellos (más del 65%) se desconoce en estos momentos. Los genes más estudiados son los que codifican para proteínas que participan en la conjugación, así como algunos reguladores propios. También se sabe que contiene varios transposones, y concretamente en uno de ellos se encuentran los genes de resistencia a la tetraciclina.

Los genes responsables de la conjugación se encuentran en dos regiones llamadas **Tra1** y **Tra2**. Dentro de ellas, los genes se distribuyen formando en total seis **operones**, que son agrupaciones de genes controlados por un mismo promotor. Estos seis operones reciben el nombre de **operones tra**, y contienen, por ejemplo, los genes necesarios para que se fabriquen los pili sexuales y para que el plásmido sea transferido a las células receptoras.

En el propio Departamento de Microbiología se han descrito diversos reguladores de la conjugación de R27, y que por tanto afectan a la expresión de los operones *tra*. Inicialmente se caracterizó cómo se controla la conjugación en función de la temperatura, a través de dos reguladores (llamados H-NS y Hha), que curiosamente se hallan codificados tanto en el cromosoma bacteriano como en el plásmido R27.

Más tarde se descubrió que cuatro de los seis operones *tra* están regulados por un factor propio del plásmido, que recibe el nombre de **HtdA**. Se observó que cuando el gen *htdA*¹ presenta una mutación que elimina su función la frecuencia con que se produce la conjugación

¹ En la nomenclatura estándar los nombres de los genes se escriben en minúscula y cursiva, y los de las proteínas en letra normal.

de R27 aumenta muchísimo (más de 1.000 veces). Así pues, se concluyó que **HtdA es un regulador negativo de la conjugación**. Concretamente, ejerce su función reprimiendo la expresión de cuatro de los seis operones *tra*: si estos genes no se expresan, la célula no produce pili sexuales y por lo tanto no puede efectuar la conjugación.

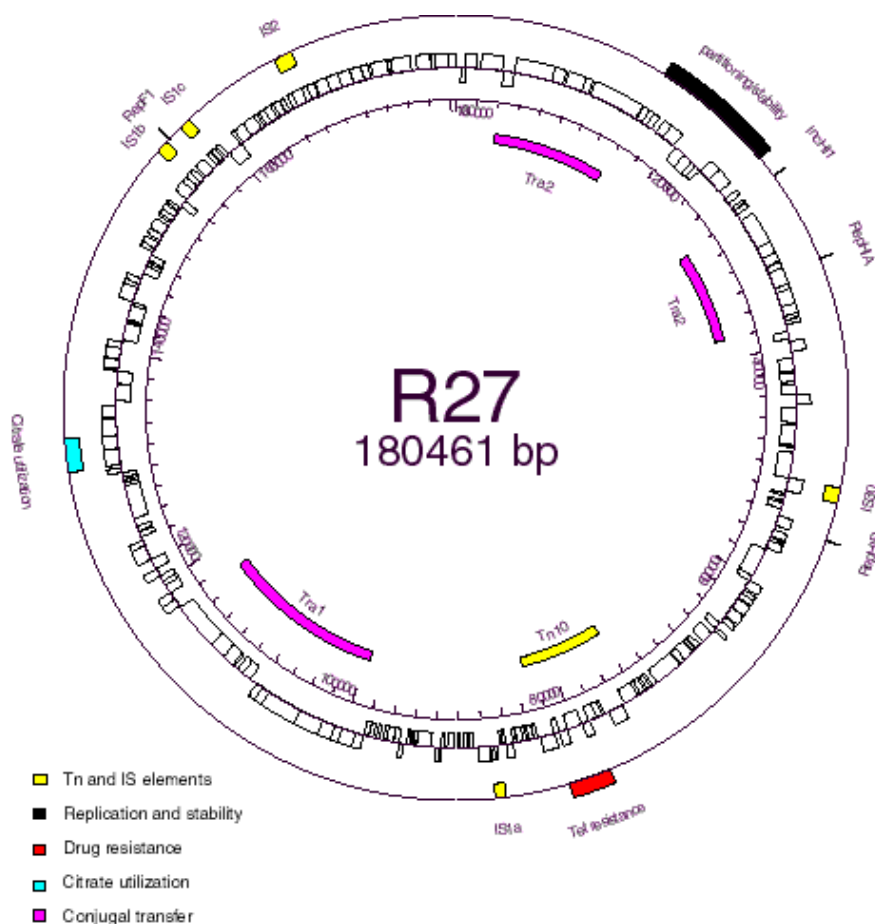


Figura 9. Esquema del plásmido R27.

A partir de aquí, el grupo se propuso estudiar más a fondo el mecanismo de regulación en que está implicado HtdA. La primera parte de los resultados de este trabajo ha sido publicada en su último artículo en la revista *Molecular Biology*.

El estudio de los genes mediante ingeniería genética

Una herramienta muy potente en los estudios de biología molecular es la manipulación del DNA para crear construcciones artificiales que permitan entender cómo funcionan los genes. Ésta es la base de la **ingeniería genética**. Por ejemplo, se puede provocar una mutación en un gen para observar qué efectos causa su ausencia, y a partir de ahí deducir cuál es su función. También se puede copiar un gen de una bacteria, introducirlo en un plásmido artificial, y finalmente transferirlo a otra bacteria para generar más copias del gen. En esto consiste la **clonación** de genes.

En el estudio de la regulación de la conjugación de R27 se han llevado a cabo numerosos y complejos experimentos de ingeniería genética, de un diseño elegante por su lógica. Aquí presentaremos los resultados de algunos de los que llevaron a la identificación de una red de regulación de la que aún queda mucho por descubrir.

Existe un recurso muy útil para estudiar la expresión génica: los **genes reporteros**. Son genes naturales el producto de los cuales es fácilmente cuantificable por distintos métodos. Su potencial radica en el hecho de que se pueden fusionar con promotores de otros genes, poniéndoles bajo su control. De esta forma, detectando el producto del gen reportero se puede cuantificar la actividad del promotor del gen estudiado, y por lo tanto su expresión.

Uno de los genes reporteros más usados es el gen **lacZ**. Este gen codifica para la enzima **β-galactosidasa**, que degrada la lactosa. La actividad de esta enzima se puede detectar de diversos modos: existen varios sustratos parecidos a la lactosa que cambian de color al ser degradados por la β-galactosidasa. Además, en bacteriología se utiliza un medio de cultivo sólido llamado **agar MacConkey** que contiene, entre otros componentes, lactosa y un indicador de pH. Cuando una bacteria metaboliza la lactosa porque está expresando β-galactosidasa, se acidifica el pH del medio y éste adquiere un color rojo intenso.

Para estudiar la regulación ejercida por HtdA sobre los operones *tra* de R27 se construyó una cepa modelo de *Escherichia coli* (más fácil de manipular genéticamente que *Salmonella*). En esta cepa el gen *lacZ* propio no es funcional, de forma que no produce β-galactosidasa. Así, si se introduce una fusión de un promotor con el gen *lacZ*, toda la actividad de la enzima que se detecte corresponderá al promotor del gen que se esté estudiando. Concretamente, en el cromosoma de esta cepa se introdujo una fusión del promotor de uno de los operones *tra* (el operón F) con el gen *lacZ*.

En la cepa modelo también se introdujo el plásmido R27 en dos variantes: la variante natural o salvaje (R27) y una variante con *htdA* no funcional, llamada drR27 porque su conjugación se halla desreprimida. Se cultivaron la cepa original sin el plásmido, la cepa con la variante salvaje y la cepa con drR27 en agar MacConkey y se observó el aspecto de sus colonias (figura 10).

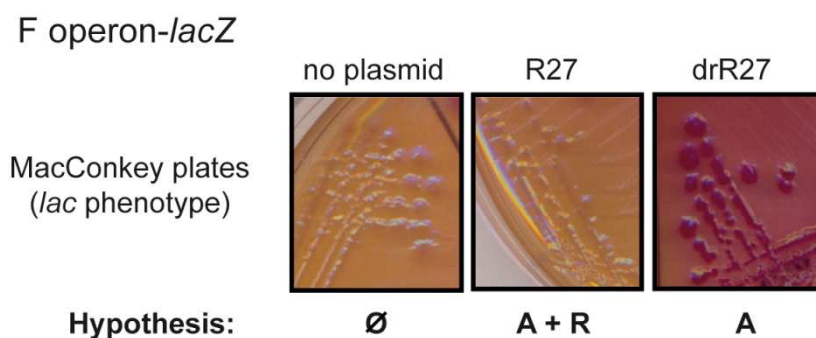


Figura 10. Cultivo en agar MacConkey de las cepas mencionadas. Debajo de cada imagen se muestran las hipótesis que explicarían los resultados. ∅: ausencia tanto de activador como de represor; A + R: presencia de un activador y un represor; A: presencia de un activador.

La cepa que contiene el plásmido con la mutación en el represor *htdA* genera colonias de color rojo porque es capaz de fermentar la lactosa. Eso significa que produce β -galactosidasa en grandes cantidades. En cambio, la cepa si plásmido y la cepa con R27 salvaje tienen un color blanquecino. Por lo tanto, en ausencia de HtdA el operón F se expresa mucho, pero no lo hace si tampoco está el plásmido R27. De ahí se deduce que la expresión del operón F necesita algún factor activador propio de R27.

Con el objetivo de encontrar este presunto activador se clonaron diversos fragmentos del plásmido R27 y se introdujeron independientemente (dentro de un plásmido artificial llamado pBAD) en la cepa modelo que contiene el gen reportero. A continuación se realizó un ensayo para detectar qué fragmentos, al estar presentes, provocaban un aumento en la expresión del operón F. De este modo se identificó uno que probablemente contenía el supuesto activador (figura 11). Este fragmento contenía cuatro genes correspondientes a dos operones *tra*. Cortándolo en trozos más pequeños y provocando mutaciones se descubrió que el activador se encontraba en el **operón R**.

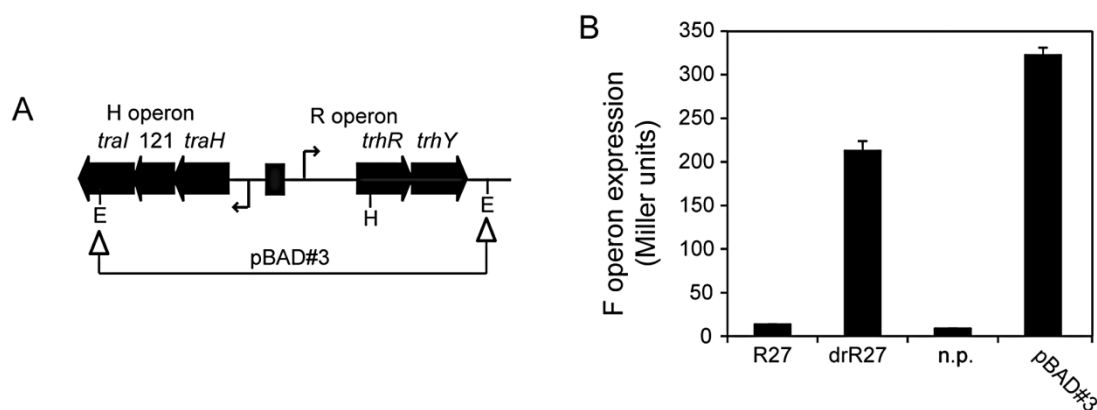


Figura 11. A: Esquema del fragmento clonado que contiene el activador del operón F. **B:** Expresión del operón F cuantificada según la actividad de la β -galactosidasa (unidades de Miller) cuando la cepa modelo del operón F contiene el plásmido R27, R27 con la mutación en *htdA* (drR27), el plásmido con el fragmento activador (pBAD#3) o bien no tiene ningún elemento añadido (n.p.). Se puede observar cómo el operón F se expresa mucho en presencia del activador cuando no hay represor (HtdA).

No obstante, en el fragmento había dos genes del operón R (*trhR* y *trhY*); el activador podía ser cualquiera de los dos o quizá incluso los dos a la vez. Para descubrirlo se clonaron los genes *trhR* y *trhY* por separado y conjuntamente en plásmidos pBAD. Este tipo de plásmido se utiliza habitualmente para controlar la expresión de los genes clonados, ya que contiene un promotor que responde al azúcar **arabinosa**. Así pues, los genes de interés se insertan justo a continuación de dicho promotor, y se puede inducir su expresión añadiendo arabinosa al medio de cultivo. Si no se añade, su expresión queda reprimida. En la figura 12 se recogen los resultados de este experimento.

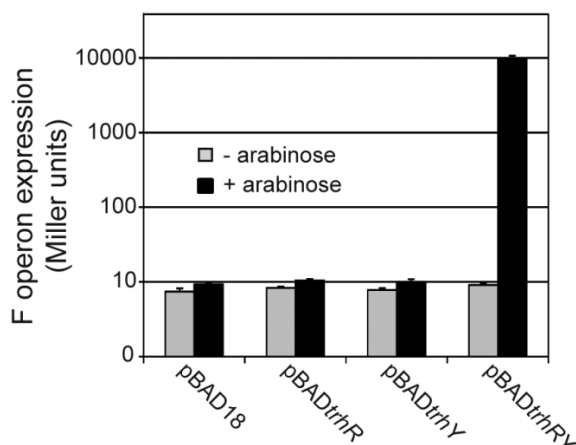


Figura 12. Expresión del operón F en la cepa modelo con los cuatro plásmidos especificados: pBAD18 es el plásmido vacío (sin ningún gen clonado); pBADtrhR contiene el gen *trhR*; pBADtrhY contiene *trhY* y pBADtrhRY contiene ambos genes. Este experimento demuestra que sólo si se expresan ambos activadores a la vez, TrhR y TrhY (en presencia de arabinosa), se produce una inducción de la expresión del operón R.

Así pues, se descubrieron dos activadores esenciales para que tenga lugar la conjugación (las mutaciones que desactivan el operón R impiden totalmente la conjugación) que actúan de forma contraria a HtdA.

A continuación, los investigadores se preguntaron si esta red de regulación tiene algún papel en la influencia que ejerce la temperatura ambiente sobre la conjugación, estudiada anteriormente en el Departamento. Con experimentos similares a los anteriores se determinó que, efectivamente, la regulación ejercida por H-NS en respuesta a la temperatura tiene un efecto en la expresión del operón R. Es decir: a una temperatura de 37°C, H-NS reprime la expresión del operón R; por lo tanto, no se expresan los activadores de la conjugación y ésta queda inhibida. En cambio, a temperaturas inferiores (22-28°C), H-NS no impide que se exprese el operón R, con lo cual se puede activar la conjugación. HtdA actúa como represor en esta situación.

Finalmente, para caracterizar mejor la red de regulación se realizó una serie de experimentos que aportan una idea de cómo interaccionan las proteínas. El fundamento es complejo, pero los resultados permitieron establecer un modelo de regulación hipotético, si bien aún se puede investigar más a fondo.

Conclusiones

En la figura 13 se pueden ver dos posibles modelos planteados por el grupo a partir de los resultados obtenidos. Ya que las proteínas y genes implicados están muy conservados (son muy similares) dentro de los plásmidos IncHI, este trabajo representa un paso muy importante en la comprensión de la regulación de la conjugación de este grupo de plásmidos, del cual R27 es modelo.

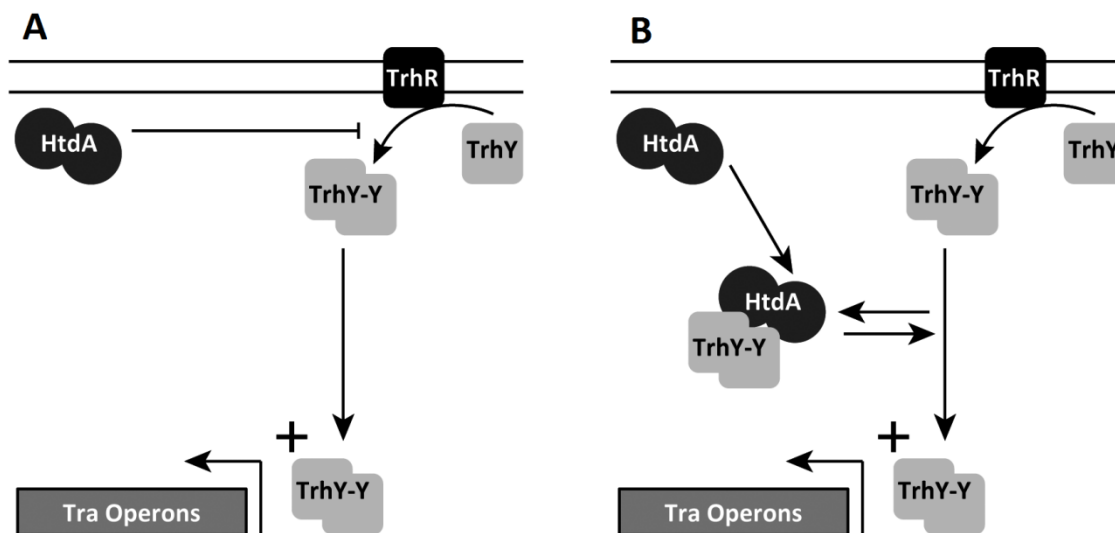


Figura 13. Esquemas de dos posibles versiones del modelo de regulación de la expresión de los operones *tra*, ejercida por HtdA, TrhR y TrhY, y que en última instancia regula la conjugación del plásmido R27. Estudios bioinformáticos indican que TrhR es una proteína que se halla insertada en la membrana celular y que TrhY se puede unir al DNA (posiblemente como factor de transcripción). Por otro lado, los estudios de interacciones revelan que HtdA y TrhY formarían agrupaciones con sí mismos y probablemente también entre sí. El modelo sugiere que TrhR actuaría como algún tipo de sensor que induciría la agrupación y activación de TrhY. Cuando eso sucediera, TrhY se uniría al DNA y promovería la expresión de los operones *tra*. HtdA podría actuar inhibiendo la activación de TrhY (modelo A) o bien secuestrándolo para que no se pudiera unir al DNA (modelo B).

Aunque a veces la investigación básica, como la que se ha realizado en este estudio, pueda parecer abstracta, a la larga es la que permite avanzar a la ciencia y, con el tiempo, acaban surgiendo aplicaciones clínicas. Puede que ahora mismo las enfermedades infecciosas no nos preocupen demasiado, pero si la resistencia a antibióticos se continúa propagando al ritmo actual pronto volverán a suponer un problema. El sexo bacteriano es en parte la causa de esta diseminación; por lo tanto, conocer a fondo los mecanismos de regulación de la conjugación de diferentes tipos de plásmidos podría ayudarnos, en un futuro, a frenar la diseminación de la multirresistencia a antibióticos en bacterias patógenas.

Una visita al laboratorio: conociendo a los investigadores

Entrevista con Tania Gaviria Cantin



Tania es una estudiante de doctorado, actualmente en su cuarto año. Estudió Biología en Colombia y vino a realizar el Máster en Biotecnología Molecular en la Universidad de Barcelona. Estudia el control de la expresión génica por reguladores globales en *Salmonella*.

Elsa: ¿Desde cuándo te ha interesado la ciencia?

Tania: Bueno, es una pregunta difícil. No puedo dar una fecha exacta, pero yo creo que desde siempre. Cuando estaba en el colegio, cuando nos daban a escoger las asignaturas, siempre iba por la parte de biología, química... Y bueno, creo que desde más o menos ese momento, desde el colegio.

¿Qué te trajo a España?

Cuando me preguntan qué me trajo a España, o por qué escogí España, digo que creo que más bien España me escogió a mí. Cuando terminé la carrera estaba buscando dónde hacer un máster, y solicité a varias universidades en Colombia y aquí. Digamos que pensé primero en España por el idioma, pero al final tuve la oportunidad de escoger entre quedarme en mi país, en una muy buena universidad o venir a Barcelona, que es una ciudad de bastante renombre en Suramérica. Sin embargo, no fue por un interés en particular. Simplemente quería ocuparme, hacer un máster, y en Barcelona se me dio la oportunidad. Fue el sitio donde primero me contestaron, y donde había más facilidades de pago.

¿Y cómo llegaste a este grupo de investigación?

Al grupo de investigación llegué porque cuando estaba haciendo el máster estaba buscando un grupo donde trabajaran en biotecnología de alimentos, que era lo que en principio quería hacer. Entonces me puse a mirar las asignaturas, una de ellas era Biotecnología Alimentaria, y encontré que el coordinador era Antonio Juárez, que era también parte de nuestro grupo de investigación. Contacté con él y obviamente en paralelo también con otros grupos, porque en principio yo quería trabajar en la parte industrial. Antonio me contestó muy rápido y me dijo que sí, que había un proyecto. Entonces vine, hablé con él, y empecé a trabajar en biotecnología alimentaria. Y a partir de ahí las cosas cambiaron un poco, pero en un principio fue eso.

¿Cómo es tu día a día como estudiante de doctorado?

El día a día es un poco difícil decirlo... Depende del día, la semana, el año de doctorado... Pero bueno, para resumirlo un poco: no me puedo quejar, porque de momento tengo un buen jefe y el proyecto hasta ahora ha dado buenos resultados. Podría decir que estoy satisfecha, aunque claramente hay días más complicados, en que las cosas no salen. Pero así en general puedo decir que los días son buenos, con todo lo que comporta estar en un laboratorio. O sea, a veces es muy fácil, a veces frustrante... Pero en general bien.

¿Qué es lo que te gusta de este grupo de investigación?

Lo primero, y como digo a todo el mundo, es mi jefe. Creo que tengo un buen jefe y creo que es el mejor que he tenido hasta ahora en mi corta carrera profesional. El estar con un jefe como Carlos lo agradezco de verdad, y lo que más me gusta del grupo es la dedicación que él demuestra hacia los estudiantes; siempre tiene un momento para resolver una duda. Y además las personas del grupo están muy unidas, saben trabajar en equipo. Si tienes alguna duda también están dispuestas a ayudarte. Y obviamente la investigación que hacemos, que aunque no continúe con la línea de biotecnología alimentaria, es biología molecular y genética, que es lo que siempre me ha gustado.

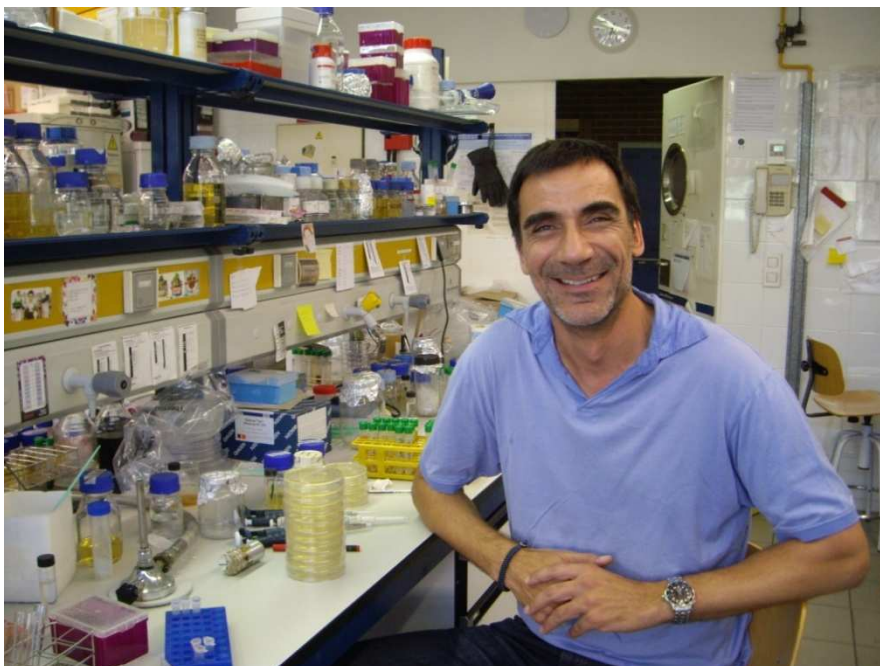
¿Qué te ha aportado la experiencia del doctorado?

Primero de todo, ha sido una experiencia de vida bastante importante. Porque es salir de tu país, conocer otra cultura, otros pensamientos, otra gente, otro tipo de metodología de trabajo... Pero sobre todo, en cuanto a la parte más experimental, las técnicas que utilizamos en el laboratorio. Porque todas las técnicas que he aprendido hasta ahora han sido nuevas para mí. En la carrera me las enseñaron de manera muy superficial, teórica, pero aquí le he dado aplicación, lo he hecho por mí misma. Eso para a mí ha sido una aportación enorme, porque creo que, si en un futuro me quiero seguir dedicando a esto, tengo una buena base.

¿Y tienes algo pensado para después de la tesis?

Bueno, ésa es la pregunta del millón (ríe). Siendo sincera, me gustaría cambiar un poco la línea de investigación. No tanto por la metodología o las técnicas, pero sí cambiar un poco el tema. No quiero hacer un *postdoc*, de momento. Si más adelante sale, pues genial, pero me gustaría más ir al lado industrial, que es la idea inicial que tenía yo al venir a Barcelona. Me gustaría

trabajar en una empresa, algo de I+D, o en producción. Algo un poco más aplicado, diría yo, más biotecnología.

Entrevista con Carlos Balsalobre Parra

Carlos Balsalobre es doctor en Biología y profesor del Departamento de Microbiología. Estudió Biología en la Universidad de Barcelona, donde también se doctoró en Microbiología. A continuación realizó una estada postdoctoral en Suecia, y allí se quedó siete años, los últimos cuatro como líder de grupo. Finalmente regresó a Barcelona como Investigador Ramón y Cajal. Desde entonces es líder de su propio grupo de investigación, y actualmente trabaja en colaboración con la doctora Cristina Madrid. Su objetivo es pasárselo bien haciendo ciencia.

Elsa: ¿En qué momento empezó a gustarte la ciencia?

Carlos: (ríe) Eso es muy curioso. Yo no debería estar aquí, en principio. Fui muy mal estudiante... El director de mi instituto recomendó a mis padres que no fuera a la universidad. Lo único que yo aprobaba era biología. Me gustaba. No sabría decirte cuándo me empezó a gustar la ciencia; yo creo que me gustó mucho el ambiente universitario, realmente me gustaba aprender, especialmente dentro de lo que era la biología. De hecho, me empecé a sentir atraído por la microbiología y supe que quería hacer algo más que estudiar el primer día de clase de Microbiología de tercero. Me dio la clase Anna Maria Solanas, catedrática que ahora está retirada, y me quedé patitieso, porque pensé: yo quiero trabajar con eso. Sí, me encantó.

¿Y qué es lo que más te gusta de la microbiología?

Yo diría, de hecho, que ahora mismo no es tan importante que sea microbiología. Para mí ahora la microbiología es cómoda, porque sé, y sé cómo trabajar. Pero realmente después de muchos años, pienso que a mí realmente lo que me gusta es intentar entender mecanismos tanto de regulación como de procesos celulares. Y las bacterias tienen aún mucho por mostrarnos; muchas cosas que tienen aplicabilidad y pueden dar soluciones a problemas

reales de la sociedad. Y eso me gusta. Muchas veces pienso que no tendrían por qué ser bacterias, pero creo que realmente la *micro* es mucho más importante de lo que a veces puede parecer. Estoy de acuerdo en que enfermedades como el cáncer, cardiovasculares, neurodegenerativas... son muy importantes, y quiero que se investigue mucho en eso. Pero las enfermedades infecciosas aún causan muchos problemas. Aún hay mucha gente que pasa hambre, y se tira mucho alimento, porque se considera que microbiológicamente hablando no es aceptable. Cualquier cosa que se pueda hacer para mejorar eso implicaría que más gente podría comer. Y por otro lado, las bacterias fueron el primer modelo para el estudio en biología. Todos los procesos biológicos básicos (transcripción, traducción, replicación...) están descritos en *Escherichia coli*; han sido un modelo fantástico para entender la vida. Y creo que aún tienen mucho que dar, porque mucha mecanística está conservada en eucariotas.

¿En estos momentos qué es lo que más te gusta de tu trabajo?

Podría decir que hay diferentes cosas que me gustan mucho. Como profesor universitario tengo la dualidad de poder hacer docencia e investigación. A mí la docencia me gusta mucho, y creo que está muy bien cuando eres un investigador y tienes la posibilidad de dar clases relacionadas con lo que aquello en lo que trabajas, porque puedes enriquecerlas mucho. Puedes dar clases en que los alumnos se lo pasen bien porque eres capaz de proporcionar ilusión. Otra cosa relacionada, y de las que más me gustan a mí, es formar científicos. Me gusta que vengan estudiantes al laboratorio, que aprendan, se lo pasen bien y si puede ser que hagan una buena investigación. Me gusta dejar que piensen. Generalmente estoy muy contento del trabajo que hacen mis estudiantes. Y lo que más me gusta de la ciencia es coger las pipetas con las manos y ponerme a trabajar, pero eso lo puedo hacer en muy pocos ratos; tenemos muy pocas posibilidades de hacerlo. Y es una cosa que no entiendo del sistema. Porque la gente que hace una buena tesis, es decir, la gente que tiene unas buenas manos y una buena cabeza, son los que consiguen continuar más adelante. Y entonces te quitan las pipetas de las manos. Es muy difícil estar en la poyata. De hecho, si te fijas, Cristina y yo somos de los pocos profesores que todavía vamos al laboratorio. Nos gusta mucho, pero podemos estar muy poco.

¿Cuál ha sido el momento más gratificante en tu carrera científica?

¿El momento más gratificante? Ha habido muchos. Yo creo que la carrera científica es una carrera en la que se sufre, pero a la vez tienes igual o más satisfacción. Recuerdo con mucho cariño el día de mi tesis, pero también el día de mis oposiciones o cuando me habilité. Mi tesis y mi habilitación, que era un proceso necesario cuando me incorporé para ser profesor titular, han sido momentos en que yo he explicado mi trayectoria de muchos años a otras personas. Es duro, porque todo el mundo pasa nervios, pero es un día en el que puedes mirar atrás, explicar hasta dónde has llegado y tener una discusión. A mí me gusta mucho hablar, el intercambio de opiniones. También es muy gratificante cuando has publicado un artículo muy bueno, pero eso cada vez menos. Y las tesis de mis alumnos también me gustan mucho.

¿Cuáles piensas que son las cualidades más importantes en un investigador?

La honestidad. En una frase que escribí en los agradecimientos a mi director de tesis le agradecí que “me enseñó la importancia de cualidades como la honestidad y la perseverancia

a la hora de llevar a cabo un trabajo científico, conocimientos que no están en los protocolos pero que sin duda son mucho más valiosos". Y realmente es así. Éste es un mundo de muchos egos, todo el mundo quiere ser *premio Nobel*, también a pequeña escala. Es un mundo donde hay mucha competitividad, sobre todo cuando te mueves en el extranjero. Siempre hay gente que tiene los pies muy lejos del suelo. Yo creo que es muy importante ser honesto, intentar entender las cosas y si no se entienden, pues no se entienden. Seguramente no se entienden porque no tienes las herramientas suficientes, o quizá porque no eres suficientemente inteligente, tanto da. No creo que para ser un buen científico sea necesario tener un punto más de inteligencia respecto a los demás. Pero realmente creo que hay que ser honesto y hacer las cosas con humildad. Y ser perseverante. No puedes ponerte a llorar cada vez que tienes un mal resultado, o cuando te dicen que no al pedir una beca. Porque hay muchos *nos* en ciencia. También es muy importante el trabajo en equipo, diseñar los experimentos con la participación de más de una persona. Resumiendo, se ha de ser honesto, perseverante y constante, porque todo lo demás se puede aprender.

Agradecimientos

Agradezco a Carlos y a Tania que me hayan concedido parte de su tiempo para las entrevistas, y a David que me diera la oportunidad de escribir un artículo para B-ON.

Bibliografía

- 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.

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

Referencias de las imágenes

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

Figura 1A: Mariana Ruiz Villarreal LadyofHats, vía 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, vía 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, vía 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.*