

Condiciones para que las células incorporen ADN del medio ambiente

El proceso mediante el cual una célula altera su material genético mediante la incorporación de ADN del entorno (exógeno), es conocido como transformación, el estado fisiológico en el que la célula se encuentra apta para recibir ADN exógeno se denomina competencia.

Se pueden preparar células competentes de manera artificial de tal forma que sean electrocompetentes o quimiocompetentes. En el primer caso, las células son sometidas a un campo eléctrico que abre orificios en la membrana de tal forma que el ADN externo pueda entrar. Estos poros son rápidamente cerrados por los mecanismos de reparación de la membrana. Antes de este procedimiento se deben someter las células a varios lavados con agua y glicerol y se debe tener la muestra de ADN externo (comúnmente plásmidos) en bajas concentraciones de sales de tal forma que no se produzca una descarga eléctrica en la solución. Luego las células deben ser puestas en un medio rico en nutrientes a su temperatura óptima para ser recuperadas.

En el caso de quimiocompetencia, la transformación se logra mediante la adición de ciertos químicos y cambios abruptos de temperatura. Las células son puestas en una solución de cloruro de calcio a temperaturas bajas de tal forma que las cargas negativas de los fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana celular sean apantalladas, permitiendo al ADN (también cargado negativamente) adherirse a esta. Además, esto debilita la membrana (y pared celular, si existe) de tal forma que se hace más permeable al ADN. Posteriormente las células son sujetas a un shock de calor que produce un desbalance térmico entre su interior y su exterior, lo cual permite al ADN entrar más fácilmente.

También, este proceso lo pueden realizar las células naturalmente y las condiciones para que las células entren en estado de competencia varían según la especie. Usualmente la adquisición de competencia es regulada y se induce bajo ciertos factores, con excepción de algunos organismos como *N. gonorrhoeae*, que es constitutivamente competente. También, la competencia suele depender de la etapa del ciclo celular en la cual se encuentran los organismos y del número de células que hayan en cierta población. En algunos organismos el desarrollo de competencia es autónomo, mientras en otros está regulado por señales inter-celulares. Veamos los casos de algunas especies:

En *N. gonorrhoeae*, casi todas las células en un cultivo son competentes y no hay cambios en su grado de competencia a lo largo del ciclo celular, mientras que en *H. influenzae*, la competencia se desarrolla bajo condiciones que no permiten el crecimiento de las células tales como falta de nutrientes en el entorno. Un nivel alto de cAMP es una de las señales que estimula la competencia. En contraste al caso anterior, *S. Pneumoniae*, la competencia es activada por una sustancia que se acumula cuando las densidad de células se va aumentando y la mayoría de células se hacen competentes cuando la concentración de dicho activador es alta y la población se encuentra en fase exponencial. La competencia se inhibe cuando se alcanza la fase estacionaria y/o hay carencia de nutrientes. Por último, en *B. subtilis* el mecanismo regulador de la competencia es mucho más complejo y se regula por señales que indican la densidad de células en el medio, la cantidad de nutrientes y la fase de crecimiento de la población, pero en este caso, la competencia puede ocurrir tanto en fase exponencial como en fase estacionaria dependiendo de las demás condiciones. Otra diferencia notable con respecto a las demás es que sólo una parte de la población desarrolla competencia bajo condiciones óptimas.

Transferencia horizontal de genes (HGT)

La transferencia horizontal (o lateral) de genes se refiere al paso de genes entre distintos individuos de manera distinta a la reproducción. Se puede dar por transformación (que se explica más adelante en el segundo tópico), por transducción (donde el ADN es transmitido entre células a través de un virus), por conjugación (donde el ADN plasmídico se transfiere cuando dos bacterias entran en contacto) o por "Gene Transfer Agents" (que son partículas similares a los virus que son producidas por algunos tipos de bacteria y pasan material genético de un organismo a otro).

En el experimento realizado por Neilson et al., se realizaron experimentos para medir la tasa de transferencia horizontal de genes, precisamente del plásmido pJP4 (el cual contiene un módulo para la degradación de mercurio), entre *A. eutrophus* (donante) y *V. paradoxus* (receptor) procurando imitar las condiciones naturales de dichas bacterias. Ambas especies se crecieron juntas en un medio no selectivo y se obtuvo, luego de 24h de incubación y manteniéndose constante en tiempos posteriores, una frecuencia de transferencia de aproximadamente 1 transconjugante por cada 1000 células, resultado que se mantenía luego de varias repeticiones del experimento. Los autores asumieron que la transferencia ocurría por conjugación principalmente, aunque contemplan la posibilidad de que haya ocurrido también por transformación. Por otra parte, en bacterias extraídas directamente de muestras de suelo los resultados cambiaban notablemente con la temperatura en la que eran cultivadas posteriormente las bacterias. A 23 (grados) C, de 6.1×10^9 células donantes del plásmido y 2.5×10^9 células receptoras, se obtuvo un mínimo de 10^3 transconjugantes, sin embargo, a 4 (grados) C, con igual orden de magnitud de donantes y receptoras, el número de transconjugantes estaba por debajo del límite de detección.

Además, cuando los estudios de transferencia de genes se realizaron directamente en suelo estéril, obteniendo luego de 24h de incubación y manteniéndose aproximadamente constante en tiempos siguientes, un valor promedio de 1 transconjugante por cada 10^5 células, que es mucho menor que el resultado obtenido al realizar los estudios en un medio de cultivo. Por otra parte, al realizar el estudio en suelo no estéril, el número de transconjugantes estaba por debajo del límite de detección.

Otro dato relevante que obtuvieron los investigadores fue el número mínimo de células requeridas para obtener transconjugantes, el cual fue de 10^6 en medio de cultivo a 23 (grados) C, de 10^7 a 4 (grados) C también en medios de cultivo. Para células extraídas de muestras de suelo fue de 10^7 a 23 C y mayor de esta cifra a 4 C (pues como dijimos, no se detectaron transconjugantes). Por otra parte, el resultado de 1 transconjugante por cada 10^3 células donantes es consistente con lo obtenido en otro experimento realizado por Friedrich et al., quienes además obtuvieron una frecuencia de transmisión del mismo plásmido entre *A. eutrophus* y *E. coli* de entre 1 transconjugante por cada 1000 células y uno por cada 100 células.

Para concluir, el experimento mencionado anteriormente fue realizado para analizar la posibilidad de utilizar el mecanismo de transferencia horizontal de genes con el fin de transferir el módulo de degradación de mercurio a bacterias que viven en ciertos ambientes a partir de bacterias que han sido introducidas. Los resultados muestran que en este contexto la frecuencia de transferencia es muy bajo para lograr un esparcimiento significativo del plásmido. Además, en este caso se debe garantizar también que luego de transmitido el plásmido, el receptor sea capaz de expresar el gen. Sin embargo, esto no nos dice que los mecanismos de HGT no producen efectos considerables en general, pues si por ejemplo el gen (o genes) a transferir son de menor tamaño o confieren una ventaja evolutiva significativa, tanto su frecuencia de transmisión como su expresión aumentarán y su permanencia será mayor a medida que pasen generaciones de células, tal como ocurre con los antibióticos. Por lo tanto, si bien utilizada como

estrategia para biorremediación no es muy efectiva, los mecanismos de HGT deben ser tenidos en cuenta a la hora de tomar medidas de bioseguridad al trabajar en biotecnología.

Tasa de pérdida natural de plásmidos

Mientras cierto plásmido no sea fundamental para la bacteria que lo posea, este se puede perder con facilidad. Por lo tanto al utilizarlos en biotecnología se deben crecer las bacterias en un medio con antibióticos de los cuales el plásmido presente la resistencia, o bien, utilizar mecanismos de adicción como sistemas toxina-antitoxina. Los plásmidos se pierden cuando en un proceso de replicación celular, una de las células queda con plásmidos y la otra no.

En forma natural la pérdida de plásmidos depende de muchas variables, tales como la presión selectiva y el tamaño del plásmido en cuestión. Según la publicación de Smith et al., en medios no selectivos la tasa de pérdida de plásmidos era mayor en plásmidos de mayor tamaño. Esto se explica porque entre mayor sea el tamaño de los plásmidos, se tiende a presentar un menor número de copias del mismo en la célula, disminuyendo así la probabilidad de ser repartidos durante la replicación.

En un estudio realizado por Bahl et al. en el cual se buscaba comparar dos métodos para medir la tasa de pérdida de plásmidos (conteo CFU y citometría de flujo) se determinó el porcentaje de pérdida de un plásmido que tenía el gen para fluorescencia verde y se encontró que al agregar una sustancia que inhibía el crecimiento de las células pero les permitía seguir produciendo proteínas, se obtenían porcentajes de pérdida de entre el 3% y el 21% según la muestra y cuando no se utilizaba dicha sustancia se obtenían porcentajes menores al 0.5%. Las diferencias en el primer caso no son explicadas en el artículo pues su finalidad no está centrada en ello. Lo que sí se evidencia es que las células con el crecimiento inhibido presentan tasas de pérdida mucho mayores.

En 2013, Lau et al. utilizando nuevas técnicas experimentales que permitían mediciones de mayor precisión, y soportados en un modelo teórico, comprobaron que los valores que se habían obtenido para las tasas de pérdida de plásmidos son mucho menores de lo que se pensaba anteriormente y que dicha medida es altamente sensible a pequeños errores en el experimento. Encontraron que para cierto plásmido (par mini-R1) la tasa de pérdida es aproximadamente 10^{-3} por célula y generación, lo cual es extremadamente bajo. Esto sugiere que ciertos plásmidos pueden presentar mecanismos de estabilidad desconocidos hasta el momento relacionadas posiblemente con el control del número de copias o su replicación durante la división celular.

En conclusión, tener en cuenta la pérdida (o mantenimiento) de plásmidos es importante en biología sintética pues de esto depende la adquisición o la pérdida de resistencia a antibióticos y para que si los circuitos biológicos a ser diseñados son hechos en plásmidos, se tengan en cuenta las medidas a llevar a cabo para evitar su pérdida natural. Además, las tasas de pérdida varían según muchos parámetros y por lo tanto se hace necesario estudiar detalladamente el circuito específico, la célula y el entorno donde se va a utilizar el circuito biológico a realizar para determinarlas.

Referencias

- Bahl, M. I., Sorensen, S. J., Hansen, L. H. (2004). Quantification of plasmid loss in *Escherichia coli* cells by use of flow cytometry. FEMS Microbiology Letters. 232: 45-49.
- Billy T. C. Lau, Per Malkus, Johan Paulsson. (2013). New quantitative methods for measuring plasmid loss rates reveal unexpected stability. Plasmid. 70(3). 353-361.
- Boe, L. (1996). Estimation of plasmid loss rates in bacterial populations with a reference to the reproducibility of stability experiments. Plasmid, 36(3): 161-167 doi: 10.1006/plas.1996.0043
- Edwards, L. (2010). Horizontal gene transfer in microbes much more frequent than previously thought. Phys.org news. URL: <http://phys.org/news205389256.html>
- Gyles, C. & Boerlin, P. (2013). Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. Veterinary Pathology. 51: 328-340
- Ho, M-W. (Author), Syvanen, M. & Kado, C. (Editors) (2003). Horizontal Gene Transfer - Book Review. URL: <http://www.nature.com/hdy/journal/v90/n1/full/6800196a.html>
- Fall S., Mercier, A., Bertolla, F., Calteau, A., Gueguen, L., Perrière, G., Vogel, T. & Simonet, P. (2007). Horizontal Gene Transfer Regulation in Bacteria as a "Spandrel" of DNA Repair Mechanisms. doi: 10.1371/journal.pone.0001055
- Friedrich, B., Meyer, M., Schegel, H. G. (1983). Transfer and expression of the herbicide degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria. Arch. Microbiol. 134: 92-97.
- Kroll, J., Klintner, S., Schneider, C., Voß, I. and Steinbüchel, A. (2010). Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. Microbial Biotechnology, 3: 634-657. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00170.x
- Neilson, J. W., Josephson, K. L., Pepper, I. L., Arnold, R. B., Di Giovanni, G. D. & Sinclair, N. A. (1994). Frequency of Horizontal Gene Transfer of a Large Catabolic Plasmid (pJP4) in Soil. Applied and Environmental Microbiology. 6: 4053-4058
- Solomon J., Grossman, A. (1999). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. Trends in Genetics, 12: 150-155. doi: 10.1016/0168-9525(96)10014-7