

MECANISMOS DIFERENCIALES DE INCORPORACION DE ADN HOMOLOGO Y HETEROLOGO EN CELULAS COMPETENTES DE *BACILLUS SUBTILIS*

por

M.^a TERESA PEREZ-UREÑA, E. GARCIA, PALOMA LOPEZ
y M. ESPINOSA

Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, C. S. I. C., Madrid (España)

Durante el proceso de transformación genética, el ADN donador se une, penetra y se expresa en la población bacteriana receptora que se encuentra en estado de competencia (Lacks, 1977). En los últimos años, se ha conseguido separar experimentalmente las primeras etapas de este proceso, tanto en el sistema de *Streptococcus pneumoniae* (Seto y cols., 1975; Lacks, 1977) como en el de *Bacillus subtilis* (Buitenwerf y Venema, 1978; García y cols., 1978). Así, durante la etapa de unión, el ADN se asocia a la superficie externa de las células competentes, siendo accesible a la acción de la desoxirribonucleasa (DNasa) pancreática. Posteriormente, una de las hélices del ADN penetra en las células a medida que la otra hélice es degradada por nucleasas celulares dependientes del magnesio (Lacks, 1977). Durante esta etapa, el ADN donador no puede ser eliminado por la adición de DNasa I.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (López y cols., 1977; López, 1978; García y cols., 1978) hemos puesto a punto un procedimiento que permite que el ADN homólogo se una normalmente a las células receptoras sin que exista posterior penetración. Este método consiste, esencialmente, en la omisión de los cationes de magnesio del medio de cultivo

donde se desarrolla la competencia. No obstante, quisimos comprobar si dicho fenómeno se producía también cuando el ADN donador provenía de un bacteriófago, con el fin de determinar si las primeras etapas de la transformación (ADN cromosómico) y de la transfección (ADN fágico) eran comunes. De esta forma, en el presente trabajo estudiamos la unión, incorporación y expresión de ADN homólogo y fágico en medios de competencia suplementados o no con Mg^{2+} .

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Como estirpe receptora se utilizó *Bacillus subtilis* RUB 300 (*lys-3 met B-10 his B-2*). Como bacteria indicadora en los ensayos de transfección se usó *B. subtilis* MCB (*rec 1⁺ rec 2⁻ her⁻*) la cual se empleó también para obtener los lisados del bacteriófago SPPI. El ADN transformante se preparó a partir de la estirpe *B. subtilis* OG1 (protótrofa), mientras que el ADN tritiado se purificó a partir de la estirpe *B. subtilis* 2G7 (*ind₁₆₈ thy*). El ADN transfectante tritiado o no se obtuvo a partir del bacteriófago SPPI.

Medios de cultivo

Los medios de competencia fueron los descritos por Bott y Wilson (1968) (BWC) y por Young y Wilson (1974) (GM1). El recuento de células viables y transfectantes se hizo en placas con medio TY (García, 1974), mientras que el de transformantes se hizo en medio mínimo (López y cols., 1977), seleccionándose para el carácter *met⁺*.

Obtención de ADN y método de competencia

El ADN bacteriano (marcado o no) se aisló siguiendo el procedimiento de nuestro laboratorio (García y cols., 1978). El ADN fágico se obtuvo mediante tratamiento con fenol (Gar-

cía, 1974). El método de competencia fue el de Young y Wilson (1974) con las siguientes modificaciones: los cultivos precompetentes (concentrados 10 veces y almacenados a -70°C) se descongelaron rápidamente y se diluyeron 1/100 en medio GM1 o BWC, suplementado o no con Mg^{2+} (3,3 mM). Los cultivos se incubaron a 37°C , con agitación vigorosa (300 rpm) durante sesenta minutos, en cuyo momento alcanzaron el máximo de competencia.

Procedimiento de transformación y transfección

Los cultivos competentes recibieron ADN bacteriano (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o fágico (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron a 37°C durante cuarenta y cinco y treinta minutos respectivamente, procediéndose según se ha descrito por López (1978).

Unión e incorporación de ^3H -ADN a células competentes

Los cultivos competentes se centrifugaron y resuspendieron en medio fresco (con o sin Mg^{2+}) para dar una concentración de 10^8 células/ml. A continuación, se añadió ^3H -ADN bacteriano (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o fágico (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubándose a 37°C y 300 rpm durante diez minutos. Para determinar la cantidad de ADN unido se procedió según se ha descrito previamente (López y cols., 1977), mientras que la determinación del ADN incorporado se realizó por la adición de 10.000 unidades/ml de DNasa I (Worthington, actividad específica: 90 unidades/ μg) y posterior incubación durante cinco minutos, en las mismas condiciones. Finalmente, las muestras se trataron por el procedimiento descrito por López y cols. (1977). Los valores del fondo variaron entre 40 y 60 cpm, y fueron descontados a cada muestra.

RESULTADOS

En primer lugar, quisimos estudiar los niveles de transformación y transfección obtenidos en dos medios de cultivo diferentes suplementados o no con Mg^{2+} . Como puede comprobarse en el

cuadro 1, el número de transformantes se redujo considerablemente en los medios carentes de Mg^{2+} , mientras que las frecuencias de transfección se mantenían relativamente elevadas.

Cuadro 1. Niveles de transformación y transfección en medios suplementados o no con 3.3 mM de Mg^{2+}

Origen del ADN donador	Medio de cultivo	Células viables/ml ($\times 10^7$)	Transformantes o transfectantes/ml	Frecuencias (%) (%)	Porcentajes
<i>B. subtilis</i> OG1	GM1 + Mg	3,9	$5,5 \times 10^5$	1,4	100
	GM1 - Mg	2,6	$8,6 \times 10^3$	0,033	2,4
	BWC + Mg	2,2	10^5	0,45	100
	BWC - Mg	1,6	$2,1 \times 10^3$	0,013	2,9
Fago SPP1	GM1 + Mg	3,6	$1,4 \times 10^6$	3,8	100
	GM1 - Mg	3,2	8×10^5	2,5	65,7
	BWC + Mg	2,8	$2,4 \times 10^5$	0,86	100
	BWC - Mg	1,9	7×10^4	0,37	43

(*) Frecuencias = $\frac{\text{Transformantes/ml}}{\text{viables/ml}} \times 100$. Cada cifra es la media de, al menos, 4 experimentos.

Dado que los niveles de transfección en ausencia de Mg^{2+} son menores en un medio simple, como es el BWC, supusimos que el medio GM1 podría contener trazas de Mg^{2+} debido a alguno de sus componentes (por ejemplo, el extracto de levadura). Además, el simple procedimiento de dilución lleva consigo el arrastre de pequeñas cantidades de Mg^{2+} que podrían falsear los resultados. Por ello, llevamos a cabo la preparación de cultivos competentes tanto en las condiciones habituales como realizando lavados previos con solución salina. Como puede observarse en el cuadro 2, cuanto más drásticas fueron las condiciones de preparación de los cultivos competentes, menores niveles de transfección íbamos encontrando. No obstante, la transformación no se vio afectada por la eliminación de trazas de Mg^{2+} , lo que indica que este proceso es mucho más dependiente de aquel catión que el proceso de transfección.

Este hecho fue confirmado por experiencias posteriores, cuyos resultados se muestran en el cuadro 3. Para realizar estos ensayos, los cultivos competentes se prepararon en condiciones de lavado exhaustivo (cinco veces) en solución salina, antes de ser resuspendidos (1/100) en medio de cultivo suplementado con cantidades crecientes de Mg^{2+} . Como puede deducirse de los resultados expuestos en el cuadro 3, los niveles de transformación tan

Cuadro 2. Dependencia del magnesio en transformación y transfección con ADN de SPP1

Condiciones de ensayo	Frecuencias y porcentajes de transformación o de transfección			
	ADN homólogo		ADN fágico	
	+ Mg	- Mg	+ Mg	- Mg
<i>Ensayo I: (*)</i>				
Resuspensión de cultivos precompetentes	2,35	0,052	4,0	2,48
DNasa: 10^4 unidades/ml (en 50 mM Mg^{2+})	100	2,2	100	62
<i>Ensayo II:</i>				
Resuspensión previo lavado (2 x) en sol. salina	0,92	0,046	1,34	0,23
DNasa: 10^4 unidades/ml (en 50 mM Mg^{2+})	100	5,0	100	17,2
<i>Ensayo III:</i>				
Resuspensión previo lavado exhaustivo (5 x) en sol. salina	0,96	0,045	1,07	0,09
DNasa: 10^4 unidades/ml (en 1,4 mM Mn^{2+})	100	4,6	100	8,4

(*) Cantidad residual aproximada de Mg^{2+} en las muestras — $Mg^{2+}: 3 \times 10^{-3}$ mM.

sólo comienzan a incrementarse a partir de una concentración de Mg^{2+} de 10^{-2} mM. Sin embargo, las frecuencias de transfección van aumentando en función de la concentración de Mg^{2+} en el medio.

Por otra parte, cuando determinamos los niveles de competencia en función del tiempo de incubación (*figura 1*), comprobamos que en cualquier punto de la curva de competencia, los niveles de transformación fueron siempre inferiores en más de una unidad logarítmica en los cultivos no suplementados con Mg^{2+} , mientras que estas diferencias son mucho más pequeñas cuando la competencia se determinó por transfección.

Cuadro 3. Niveles de transformación y transfección alcanzados en cultivos competentes de B. subtilis RUB 300 en función de la concentración de Mg^{2+}

Concentración de Mg^{2+} (mM)	Frecuencias de transformación	Frecuencias de transfección
10^{-6}	0,061	0,092
10^{-5}	0,063	0,097
10^{-4}	0,069	0,11
10^{-3}	0,062	0,13
10^{-2}	0,13	0,23
10^{-1}	0,24	0,45
1	0,49	0,93
3,3 (control)	0,93	1,4

La transfección con SPP1 presenta una curva de respuesta a la dosis de ADN con pendiente de 2 (Trautner y Spatz, 1973), lo que indica que se necesita la cooperación de dos genomas fágicos para dar lugar a un centro infectivo. Estos hechos, junto con los altos niveles de transfección alcanzados en cultivos no suplementados con Mg^{2+} (*figura 1*), nos llevaron a estudiar las curvas de respuesta a la dosis de ADN de SPP1 en presencia o en ausencia de Mg^{2+} . Como se deduce de la *figura 2*, en ambas condiciones, las curvas son paralelas y de pendiente 2, lo que demuestra que en los cultivos no suplementados con Mg^{2+} se sigue requiriendo la recombinación primaria para la reconstitución de un genoma fágico completo. Una confirmación de este hecho se presenta en la *figura 3*, ya que la incorporación de ADN transfectante en función del tiempo da una respuesta sigmoideal cuando

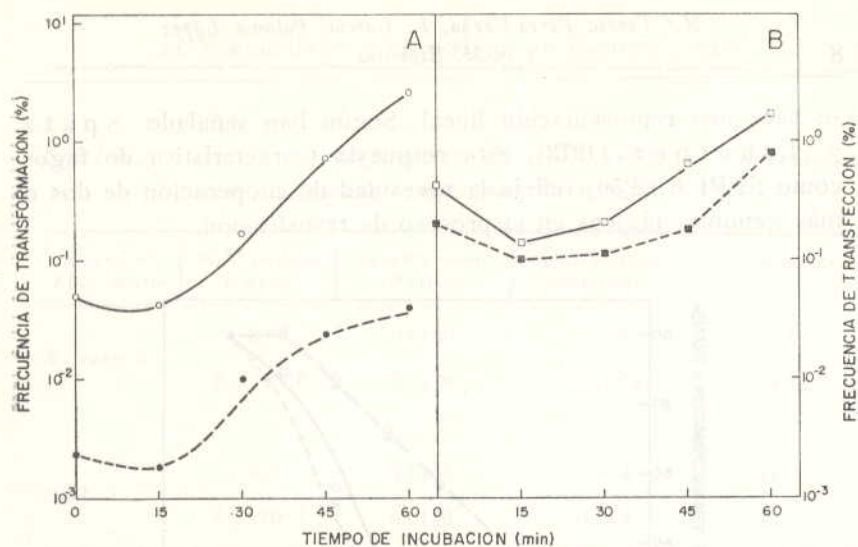


Figura 1 Desarrollo de la competencia de *B. subtilis* RUB 300 por transformación (A) y por transfección (B) en medio GM1 suplementado (○; □) o no (●; ■) con Mg²⁺ 3,3 mM

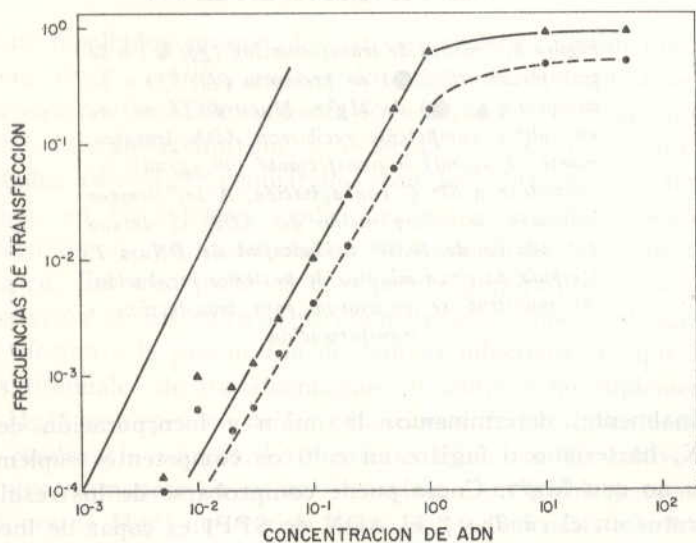


Figura 2. Curva de respuesta a la dosis con ADN de SPP1 en presencia (▲) o en ausencia (●) de Mg²⁺. La recta representa una línea de segundo orden (x²) con pendiente de 2

se hace una representación lineal. Según han señalado Spatz y Trautner (1973), esta respuesta (característica de fagos como SPP1 o SP50) refleja la necesidad de cooperación de dos o más genomas fágicos en el proceso de transfección.

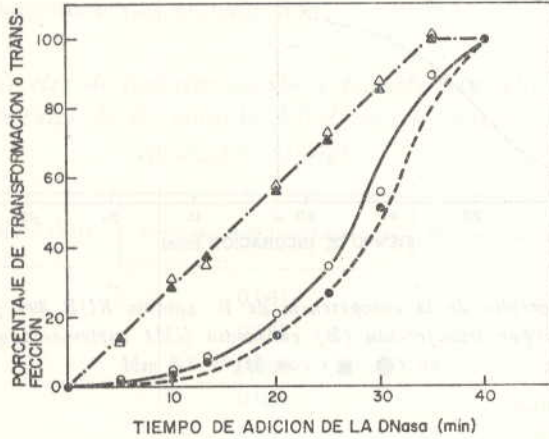


Figura 3. Cinética de transformación (Δ; ▲) o de transfección (○; ●) en presencia (Δ; ○) o en ausencia (▲; ●) de Mg²⁺. Muestras (1 ml) de un cultivo competente recibieron ADN transformante (1 μg/ml) o transfectante (10 μg/ml), incubándose a 37° C con agitación. A los tiempos indicados, la incorporación del ADN se detuvo por adición de 10.000 unidades/ml de DNasa I. Después de cinco minutos de posterior incubación, las muestras se ensayaron para transfección y transformación

Finalmente, determinamos la unión e incorporación de ³H-ADN, bacteriano o fágico, en cultivos competentes suplementados o no con Mg²⁺. Como puede comprobarse de los resultados expuestos en el cuadro 4, el ADN de SPP1 es capaz de incorporarse al interior de las células competentes en condiciones en las que el ADN transformante es totalmente accesible a la DNasa exógena.

Cuadro 4. Unión e incorporación de ADN tritiado, bacteriano o fágico, a células competentes de *B. subtilis* (*)

Origen del ADN donador	Mg ²⁺ (mM) en el medio	µg ADN unido/10 ⁸ células	µg ADN incorporado/10 ⁸ células	Porcentaje de ADN incorporado
<i>B. subtilis</i>	3,3	0,0180	0,0081	45,0
	3 × 10 ⁻³	0,0176	0,00078	4,4
SPP1	3,3	0,0165	0,0074	44,8
	3 × 10 ⁻³	0,0146	0,0063	43,1

(*) Los cultivos competentes, suplementados o no con Mg²⁺, se prepararon según las condiciones del Ensayo I del Cuadro 2.

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo indican que, en el sistema de *B. subtilis*, existen dos mecanismos implicados en la incorporación de ADN exógeno. En efecto, los relativamente altos niveles de transfección que se detectan en los cultivos no suplementados con Mg²⁺ comparados con los obtenidos en transformación, en las mismas condiciones experimentales (cuadro 1), parecen sugerir un procesamiento diferencial del ADN bacteriano y fágico. Por otra parte, si bien parece importante el método de preparación de los cultivos precompetentes, estas condiciones tan sólo afectan a la producción de centros infectivos, ya que los niveles residuales de transformación en cultivos no suplementados con Mg²⁺ no dependen de las condiciones de puesta en competencia (cuadro 2). Además, la transformabilidad de los cultivos competentes permanece en un nivel residual e invariable para concentraciones de Mg²⁺ que varían entre 10⁻⁶ y 10⁻³ mM, mientras que los niveles de transfección se incrementan a medida que la cantidad de Mg²⁺ se hace mayor (cuadro 3). Estas diferencias (cuadros 2 y 3) sugieren que la incorporación del ADN del fago SPP1 requiere una concentración de Mg²⁺ de 100 a 1.000 veces menor

que la necesaria para el ADN homólogo. Estos requerimientos no dependen del mayor o menor grado de competencia de los cultivos (*figura 1*).

Por otra parte, dada la pequeña cantidad de Mg^{2+} necesaria para alcanzar altos niveles de transfección, podría suponerse que, en medios no suplementados con Mg^{2+} , la curva de respuesta a la dosis debería variar de una pendiente de 2 a una pendiente de 1. En efecto, en ausencia de Mg^{2+} sólo se requeriría un genoma fágico para dar un centro infectivo, puesto que, en estas condiciones, el ADN de SPP1 no está sometido a degradación exonucleolítica (resultados no publicados). No obstante, los resultados de las *figuras 2 y 3* demuestran claramente la necesidad de recombinación primaria para el ADN de SPP1 en medios suplementados o no con Mg^{2+} . Este hecho, parecería indicar un procesamiento similar al ADN bacteriano y fágico si bien tal procesamiento no se produce a nivel de unión (*cuadro 4*) (López, 1978), puesto que ambos ADNs son capaces de unirse normalmente en presencia o en ausencia de Mg^{2+} . No obstante, el hecho de que, en ambas condiciones, el ADN de SPP1 se incorpore en la misma cantidad, lo que no ocurre con el ADN homólogo (*cuadro 4*), indica que el ADN fágico es procesado por las células competentes de un modo diferente al ADN transformante y que la necesidad de recombinación primaria en medios no suplementados con Mg^{2+} (*figuras 2 y 3*) podría deberse a alguna inactivación intracelular del ADN fágico.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos hacer constar nuestro agradecimiento al Dr. A. Portolés por la lectura crítica del manuscrito, así como a las señoritas M. T. Alda y M. L. del Pozo por su experta asistencia técnica. Agradecemos también a D. Aurelio Hurtado la confección de los gráficos.

RESUMEN

La eliminación de los cationes de magnesio en el medio de desarrollo de competencia de *B. subtilis* inhibe la incorporación y expresión del ADN transformante. En las mismas condiciones experimentales, el ADN del bacteriófago SPP1 da lugar a niveles de transfección relativamente elevados. Ambos ADNs se unen a las células receptoras en las mismas cantidades y tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} . No obstante, en estas condiciones sólo el ADN de SPP1 es capaz de penetrar en las células competentes, sin que se aprecie ninguna alteración en las curvas de respuesta a la dosis de ADN. Se comprueba que, para la incorporación del ADN del fago SPP1, las células competentes requieren de 100 a 1.000 veces menos Mg^{2+} que para incorporar ADN homólogo. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo diferencial en la incorporación de ADN transformante o transfectante por las células competentes de *B. subtilis*.

SUMMARY

The removal of magnesium ions in the competence medium of *B. subtilis* inhibits the uptake and phenotypic expression of transforming DNA. Under the same experimental conditions, DNA of bacteriophage SPP1 is able to transfect competent cells in a rather high extent. Both, transforming and transfecting DNAs are able to bind to competent cells in similar amounts, not only in the absence but in the presence of Mg^{2+} as well. However, in the first conditions, only SPP1 DNA is taken up by the bacteria. No alteration is observed in the dose-response curve to SPP1 DNA in the absence of Mg^{2+} . In addition, competent cells require 100 to 1000 more Mg^{2+} to take up transforming DNA as compared to SPP1 DNA. The results presented here suggest that competent cells of *B. subtilis* possess a differential mechanism in the process of uptake of DNA: one could be Mg^{2+} -dependent (for homologous and transfecting DNA) and the other could be relatively independent of Mg^{2+} (for transfecting SPP1 DNA).

BIBLIOGRAFIA

- BOTT, K. F., and WILSON, G. A.
1968. Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *B. subtilis*. *Bacteriol. Rev.*, **32**, 370-378.
- BUITENWERF, J., and VENEMA, G.
1978. Transformation in *B. subtilis*. Biological and physical evidence for a novel DNA-intermediate in synchronously transforming cells. *Molec. Gen. Genet.*, **156**, 145-155.
- GARCÍA, E.
1974. Características fisiológicas del estado de competencia en sistemas transfectantes de *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
- GARCÍA, E.; LÓPEZ, P.; PÉREZ UREÑA, M. T., and ESPINOSA, M.
1978. Early stages in *B. subtilis* transformation: association between homologous DNA and surface structures. *J. Bacteriol.*, **135**, 731-740.
- LACKS, S.
1977. Binding and entry of DNA in pneumococcal transformation, p. 35-44. En: A. Portolés, R. López and M. Espinosa (ed.). *Modern trends in bacterial transformation and transfection*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- LÓPEZ, P., PÉREZ UREÑA, M. T., GARCÍA, E., ESPINOSA, M. y PORTOLÉS, A.
1977. Efecto de cationes divalentes en el sistema de transformación de *B. subtilis*. *Genet. Iber.*, **29**, 235-251.
- LÓPEZ, P.
1978. Interacciones entre ADN y la membrana plasmática durante el estado de competencia de *B. subtilis*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.
- SETO, H.; LÓPEZ, R., and TOMASZ, A.
1975. Cell surface-located deoxyribonucleic acid receptors in transformable pneumococci. *J. Bacteriol.*, **122**, 1339-1350.
- TRAUTNER, T. A., and SPATZ, H. CH.
1973. Transfection in *B. subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **62**, 61-88.
- YOUNG, F. E., and WILSON, G. A.
1972. Genetic of *B. subtilis* and other gram-positive sporulating bacilli. H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell (eds.). *Spores V* 77-106. Amer. Soc. Microbiol. Washington, D. C.