

Estudios sobre expresión génica en bacterias y levaduras por citometría de flujo

Alberto M. Álvarez Barrientos.

Centro de Citometría de Flujo. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria s/n.
28040 Madrid.

Introducción

Para estudiar la eficiencia de la funcionalidad de los promotores, así como su regulación, se utilizan marcos abiertos de lectura (ORFs) codificantes para proteínas fácilmente detectables y cuantificables. Estas mismas proteínas se utilizan para detectar, mediante fusiones génicas, la actividad de determinados genes. Los ORFs más utilizados son los que codifican para cloranfenicol acetil transferasa (CAT), luciferasa y lacZ (Bassford et al., 1978; Berthold, 1990). El gen lacZ de *Escherichia coli* codifica para una β -galactosidasa, cuya actividad se suele detectar en extractos protéicos, usando o-nitrophenyl- β -d-galactoside (ONPG) como sustrato cromogénico.

En células de mamíferos Nolan et al., (1988) desarrollaron una técnica para citometría de flujo utilizando un sustrato fluorescente de la β -galactosidasa, el fluoresceín-di- β -D-galactopiranosido (FDG), que en presencia de este enzima origina fluorescencia cuya emisión puede ser detectada mediante citometría de flujo (CDF). La emisión es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la célula y, por tanto, a la expresión del gen LacZ. Este método fue mejorado por Fiering et al. (1991), utilizando inhibidores de la actividad β -galactosidasa endógena de las células de mamíferos.

Sin embargo, este protocolo no funciona en levaduras (Plovins et al, enviado a publicación), donde es necesario permeabilizar la célula para que el sustrato acceda al enzima. A su vez, disminuye la señal fluorescente rápidamente, debido

a que la fluoresceína no es retenida en la célula, pudiendo dar falsos positivos al entrar en otra célula permeabilizada.

Detección de β -galactosidasa en bacterias

En bacterias las fusiones genéticas con el gen *lacZ* son una poderosa técnica para el estudio de la expresión génica. La detección de la actividad β -galactosidasa in situ es importante para el estudio de genes relacionados con virulencia, ya que su expresión no está activada después de cultivarse en laboratorio. Para ello, hemos puesto a punto una variación del método de Nolan et al., (1981) para bacterias (Álvarez et al., 1993). El método se empleó para localizar posibles promotores en un plásmido críptico de *Salmonella enteritidis*, denominado pFM366 (Figura 1).

Investigamos el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del FDG, alcanzándose el valor mayor de FDG a la temperatura de 37°C. La incubación a temperatura ambiente produce unos resultados similares, aunque menos altos, por lo que dedujimos que la temperatura óptima de incubación son 37°C, aunque también es factible la incubación a temperatura ambiente (Figura 2).

También probamos diferentes tiempos de incubación a 37°C y observamos el máximo de fluorescencia después de 30 minutos de incubación. Observamos también que después de 45 minutos existe una disminución de la fluorescencia, debida tal vez a la salida de la fluoresceína de la célula, después de ser hidrolizado todo el FDG (Figura 2).

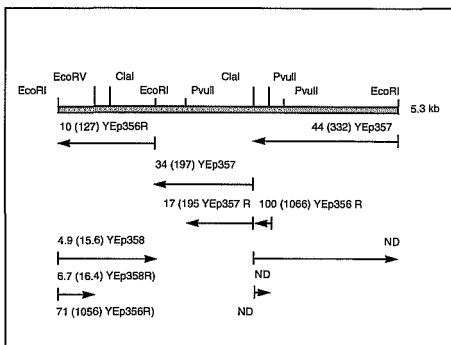


FIGURA 1.- Mapa de Restricción del plásmido pFM366. Las flechas representan los fragmentos de restricción fusionados con *lacZ* y su orientación. Los números indican las unidades de intensidad media de fluorescencia por bacteria y entre paréntesis las unidades de Miller debidas a la hidrólisis del ONPG, como resultado de la actividad β -galactosidasa.

Medición de β -galactosidasa en levaduras

La utilización de FDG para detectar la actividad β -galactosidasa mediante citometría de flujo, se ha restringido a mamíferos (Nolan et al., 1988; Parks et al., 1991) y bacterias (Finlay et al., 1992; García-del Portillo et al., 1992; Álvarez et al., 1993).

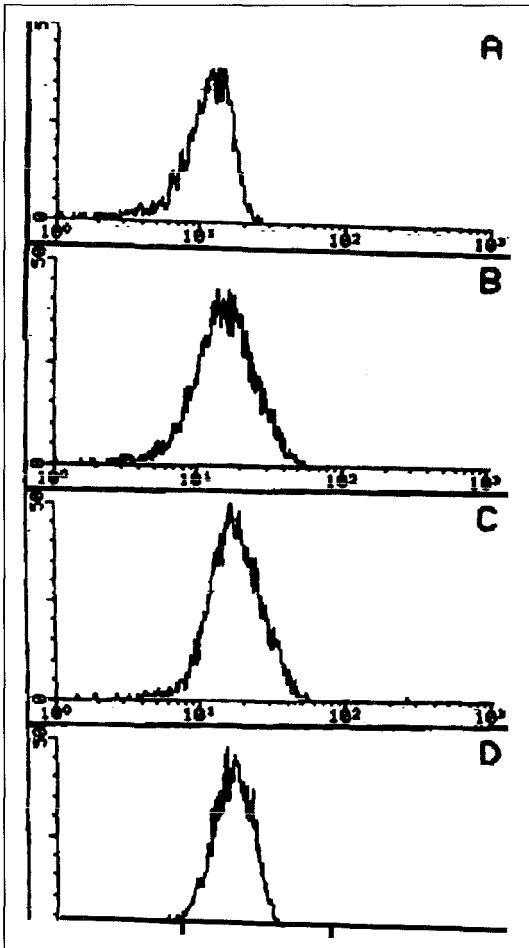


FIGURA 2.-Efecto de la temperatura de incubación (izquierda) y del tiempo (derecha) sobre la detección de actividad β -galactosidasa con FDG.

Para levaduras se han descrito diversos protocolos (Srienc, et al., 1984, 1985, 1986; Wittrup and Bailey, 1988; Eitzman et al., 1989) pero ninguno de ellos utiliza FDG como sustrato.

Zhang y cols (1992) describieron un sustrato que entraba en células vivas de mamíferos y en levaduras sin necesidad de permeabilizarlas. Este sustrato era el C12-FDG, es decir, el mismo que utiliza Nolan et al. (1988) al que se le ha añadido una cola de ácidos grasos que le hace más lipofílico, permitiendo su entrada rápida en la célula e impidiendo la salida de la fluoresceína, una vez ha sido degradado el C12-FDG.

Hemos utilizado este sustrato para detectar actividad β -galactosidasa por citometría de flujo en células de mamíferos, levaduras y bacterias, pero como demostramos el C12-FDG, no es capaz de entrar en levaduras vivas, ni en bacterias Gram-, siendo un sustrato óptimo para células de mamíferos (Plovins et al., enviado a publicación).

Para nuestro estudio hemos usado los dos sustratos (FDG y C12-FDG) utilizándolos en bacterias, levaduras permeabilizadas y sin permeabilizar, y en células vivas de ratón. Utilizamos el IP para discriminar las células vivas de las muertas en los ensayos sin permeabilizar y para constatar que se realizó la permeabilización (Figura 3).

En bacterias vivas Gram- el FDG entra sin ninguna dificultad en la célula y produce una fluorescencia dependiente de la cantidad de β -galactosidasa presente. Por el contrario, el C12-FDG no es capaz de entrar en *E. coli*, a no ser que la célula esté

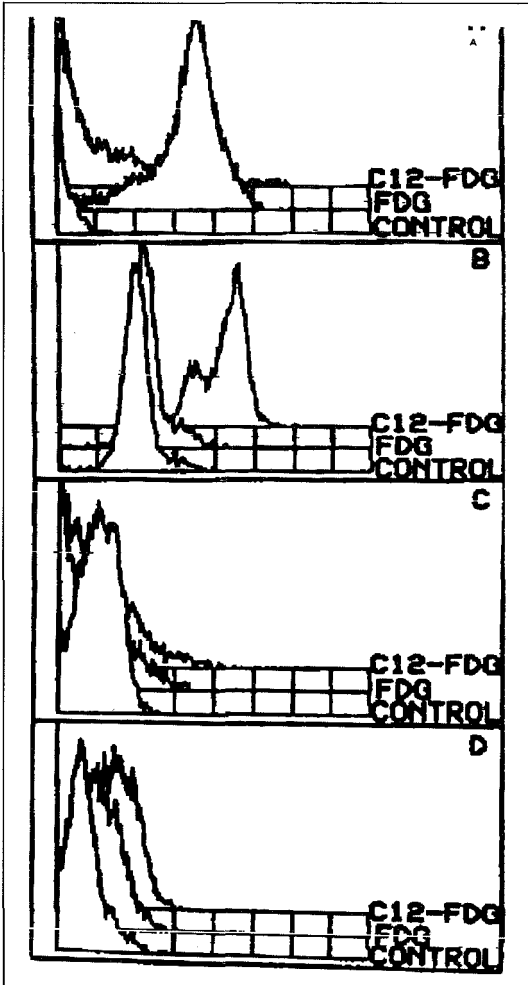


FIGURA 3.-Análisis por citometría de flujo de la fluorescencia producida por la hidrólisis del FDG y del C12-FDG por la β -galactosidasa en bacterias (A), células de mamífero (B), levaduras no permeabilizadas (C) y levaduras permeabilizadas (D). La intensidad de fluorescencia se representa en abscisas (unidades arbitrarias) y el número relativo de células en ordenadas.

ligeramente dañada o muerta, ya que la señal positiva que se observa en la figura 3A pertenece a células muertas (IP+).

En levaduras permeabilizadas (Figura 3D), la señal producida por el C12-FDG, es más intensa que la debida al FDG, lo que permite una mayor resolución a la hora de diferenciar entre dos señales parecidas. Sin embargo, cuando utilizamos levaduras sin permeabilizar (Figura 3C), ni el FDG, ni el C12-FDG son capaces de atravesar la pared celular, a no ser que la célula haya perdido su permeabilidad selectiva, ya que las células IP+ son las únicas positivas para β -galactosidasa.

Los mejores resultados con C12-FDG se obtienen en células de ratón. La señal debida al C12-FDG es del orden de 100 veces superior que la que se obtiene con el FDG, en este caso todas las células representadas están vivas (Figura 3B).

Si comparamos las señales debidas al C12-FDG, con las del FDG, tanto en mamíferos como en levaduras, observamos que con el C12-FDG se obtiene una señal mayor y más resolución. Esto se explica porque una vez liberada la fluoresceína por acción de la β -galactosidasa, la cola de ácidos grasos a los que está unida

impide que atraviese la membrana plasmática, quedándose dentro de la célula (Zhang y cols. 1992), aunque en el caso de las levaduras, habría que pensar más en una salida más lenta de la fluoresceína, ya que las células están permeabilizadas.

Por ahora, es imposible detectar por citometría de flujo actividad β -galactosidasa en levaduras sin permeabilizar. No obstante, el protocolo de utilización del C12-FDG es más sencillo que el que utilizan otros autores que usan como sustratos el a-naphtil- β -D-galactopiranosido (Srienc et al., 1984, 1985, 1989) o la resofurina- β -D-galactopiranosido (Wittrup and Bailey, 1988).

Como ya hemos mencionado anteriormente, no se pueden realizar estudios de expresión génica en levaduras vivas utilizando el gen LacZ de la β -galactosidasa. Para tratar de solucionar este problema, hemos diseñado (Cid et al., en prensa) un nuevo sistema de expresión génica, utilizando ORFs del gen EXG1 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica una exo-1,3- β -glucanasa (Vázquez de Aldana et al., 1991), y el gen homólogo de *Candida albicans* (Chambers et al., 1993).

Las exoglucanasas liberan monómeros de glucosa de las cadenas de glucano (Santos et al., 1979; Larriba et al., 1984). Estas enzimas, junto con las endo-1,3- β -glucanasas son las responsables de los procesos hidrolíticos que conlleva la formación de la pared en los procesos de morfogénesis que se producen durante el ciclo celular de las levaduras.

Las exoglucanasas de las levaduras son secretadas y parte de ellas se acumula entre el espacio periplásmico y la pared celular, en las células que crecen en condiciones normales. La pared celular es permeable al fluoresceín-di(β -D-glucopyranosido) (FDGP), la degradación de este sustrato produce fluoresceína cuya fluorescencia es detectada por citometría de flujo, sin requerir el proceso de permeabilización previa de la célula. Por lo tanto, trabajamos con células vivas que pueden ser separadas mediante CDF en función de su expresión de exoglucanasa (Figura 4), sin perder viabilidad y con las que se pueden realizar estudios posteriores.

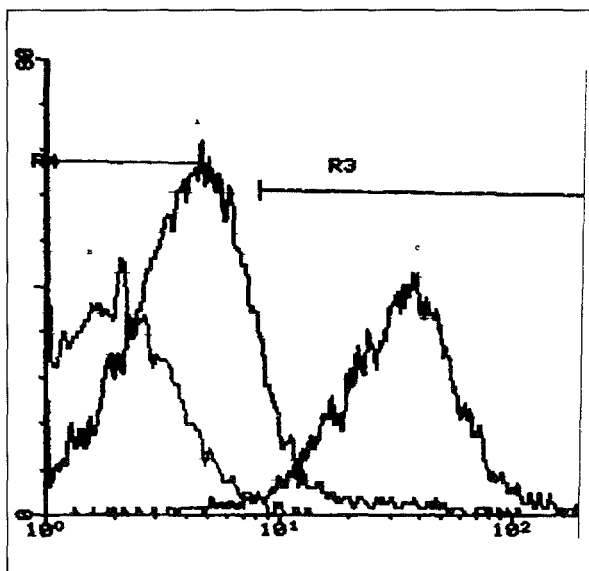


FIGURA 4.-Separación de levaduras vivas en función de la cantidad de exoglucanasa que presentan. A) Perfil de intensidad de fluorescencia de la población total. B) Fluorescencia de las células separadas en función de la región R3, es decir células negativas para exoglucanasa. C) Fluorescencia de las células separadas en función de la región R4, células con la máxima expresión de exoglucanasa.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Álvarez, A., Ibáñez, M. & Rotger, R. (1993). Simple method to detect β -galactosidase expression in bacteria by flow cytometry, *Biotechnology*, 15:974-976.
- 2.-Bassford, P., Beckwith, J., Berman, M., Brickman, E., Casadaban, M., Guarente, L., Saint-Girons, I., Sarthy, A., Schwartz, M., Shuman, H. & Silhavy, T. (1978). Genetic fusions of the lac operon: a new approach to the study of biological processes. In Miller, J. H., and Reznikoff, W. S. (Eds), *The Operon*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, pp. 245-262.
- 3.-Berthold, A. (1990). Advances in measurement of reporter genes: chloramphenicol acetyltransferase and firefly luciferase. *Biomed. Biochem. Acta* 49, 1243-1245.
- 4.-Chambers, R. S., Broughton, M. J., Cannon, R. D., Carne, A., Emerson, G., W. & Sullivan, P. A. (1993). An exo-b-(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J. Gen. Microbiol.* 139, 325-334.
- 5.-Cid, V.J., Álvarez, A.M., Santos, A.I., Nombela, C. & Sánchez, M. Yeast Exo-b-glucanases Can Be Used as Efficient and Easily Detectable Reporter Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (in press).
- 6.-De la Fuente, J.M., Álvarez, A., Nombela, C. & Sánchez, M. (1992). Flow Cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts, *Yeast* 8:39-45.
- 7.-Eitzman, P.D., Hendrick, J.L. & Srienc, F. (1989). Quantitative Immunofluorescence in Single *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cytometry* 10:475-483.
- 8.-Fiering, S.N., Roederer, M., Nolan, G.P., Mickelm, D.R., Parks, D.R. & Herzenberg, L.A. (1991). Improved FACS-GAL: Flow cytometric analysis and sorting of viable eukaryotic cells expressing reporter gene constructs, *Cytometry*, 12:291-301.
- 9.-Finlay, B.B., Leung K.Y., Rosenshine, I. & García-Del Portillo, F. (1992). Salmonella interactions with the Epithelial Cell, *ASM News*, 58:486-489.
- 10.-García-del Portillo, F., Foster, J.W., Maguire, M.E. & Finlay, B.B. (1992). Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, 6:3289-3297.
- 11.-Larriba, G., Villa, T. G., Nebreda, A. R., Olivero, I., Hernandez, L. M, Sanchez, A. & Ramirez, M. (1984). Exoglucanases in *Saccharomyces cerevisiae*: chemical nature, regulation, secretory pathway and cellular location. In Nombela, C. (Eds) *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 239-248.
- 12.-Nolan, G. P., Fiering, S., Nicolas, J. F. & Herzenberg, L. A. (1988). Fluorescence-activated cells analysis and sorting of viable mammalian cells based on

- b-D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli lacZ*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2603-2607.
- 13.-Plovins, A., Álvarez, A., Ibañez, M., Molina, M. & Nombela, M. (1993). The Use of FDG and C12-FDG as Substrates for β -Galactosidase Detection by Flow Cytometry in Various Types of Cells, App. & Environ. Microbiol. (submitted).
 - 14.-Santos, T., del Rey, F., Conde, J., Villanueva, J. R. & Nombela, C. (1979). *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in exo-(1,3)- β -glucanase production. J. Bacteriol. 139, 333-338.
 - 15.-Srienc, F., Bailey, J.E. & Campbell, J.L. (1985). Effect of ARS1 mutations on chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 5:1676-1684.
 - 16.-Srienc, F., Campbell, J.L. & Bailey, J.E. (1983). Detection of bacterial β -galactosidase activity in individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by flow cytometry. Biotechnology letters, 5:43-48.
 - 17.-Vazquez de Aldana, C. R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebreda, A. R., Mendez, E. & Del Rey, F. (1991). Nucleotide sequence of the exo-1,3- β -glucanase-encoding gene, EXG1, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 97, 173-182.
 - 18.-Wittrup, K.D. & Bailey, J.E. (1988). A single-cell assay of β -galactosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Cytometry 9:394-404.