

Buchnera aphidicola: primer genoma *made in Spain*



Enrique Viguera Mínguez

Profesor Titular del Área de Genética, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Universidad de Málaga
eviguera@uma.es

143

En mayo de 2001, tras cerca de cinco años de estancia postdoctoral en París estudiando mecanismos básicos de replicación y recombinación en bacterias, me incorporé a un atractivo proyecto: se empezaban a poner los cimientos del Centro de Astrobiología (CAB), un centro mixto del Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial (INTA) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), asociado al NASA Astrobiology Institute [NAI]. Liderado por el visionario [Dr. Juan Pérez-Mercader](#), el CAB iba a estar dedicado al estudio del origen y evolución de la vida con un claro enfoque transdisciplinar en el que trabajarían juntos biólogos, químicos, geólogos astrofísicos, informáticos e ingenieros. Embarcarse en un proyecto nuevo con tales objetivos, con investigadores en plena ebullición de ideas resultaba lo suficientemente atractivo como para decidir que era el momento de volver a España. ¿Quién iba a decirnos que once años más tarde algunos de estos investigadores iban a estar colaborando codo con codo con investigadores del Jet Propulsion Laboratory ([California Institute of Technology-NASA](#)), colaborando en la misión [Mars Science Laboratory](#) que lleva por primera vez en la historia un instrumento de diseño y fabricación española: [REMS](#).

En los inicios del CAB se puso en evidencia la necesidad de desarrollar un proyecto emblemático que supusiera un reto a la altura del centro de investigación que se diseñaba. En este punto el [Dr. Andrés Moya](#), en aquel momento tutor o asesor científico del centro, sugirió la posibilidad de secuenciar íntegramente el genoma de una bacteria endosimbionte en la que llevaba varios años trabajando junto con la [Dra. Amparo Latorre](#) y el [Dr. Francisco Silva](#) en su laboratorio del [Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva](#), en Valencia. Este trabajo iba a suponer la introducción de la genómica bacteriana en España. El candidato era *Buchnera aphidicola*, una bacteria que vive en el interior de unas células especializadas del pulgón *Baizongia pistaciae* denominadas bacteriocitos. De hecho, esta relación de simbiosis entre bacteria e insecto no es infrecuente en la naturaleza: se estima que al menos un 20% de todas las especies de insectos han desarrollado relaciones obligadas con microorganismos y suelen establecerse como consecuencia de una dieta limitada del hospedador en la que la bacteria aporta los nutrientes de los que éste carece. Así el pulgón, que se alimenta de la savia de las plantas, muy rico en azúcares pero pobre en compuestos nitrogenados, completa su dieta con aminoácidos esenciales que le aporta *Buchnera*. En otras relaciones insectos-bacteria, como por ejemplo en las moscas tse-tse, el insecto se alimenta de la sangre de los vertebrados, rico en aminoácidos en su dieta, por lo que la bacteria *Wigglesworthia glossinidia* le aporta vitaminas. En este ambiente, el insecto le proporciona a la bacteria un ambiente protegido y estable. Sin embargo, una característica fundamental de las bacterias endosimbiontes es la reducción genómica como consecuencia de la adaptación a la vida intracelular en insectos: en un ambiente estable que le proporciona todos los recursos que necesita se produce una pérdida de genes. Así, *B. aphidicola* con un genoma de unas 650 Kb, sufrió una reducción de siete veces su tamaño con respecto a *Escherichia coli*, su pariente de vida libre más próximo conocido. Por tanto, el estudio del genoma de una bacteria endosimbionte como *Buchnera* suponía también el aproximarse a conocer cuál sería el componente génico mínimo para mantener una vida endosimbiótica y, al compararlo con los genomas de bacterias de vida libre, inferir cuál sería el número mínimo de genes necesario para mantener un organismo con organización celular.

Sin embargo el estudio de un genoma endosimbionte presentaba una dificultad técnica importante: *B. aphidicola* no es una bacteria cultivable, por lo que las muestras debían tomarse a partir de los áfidos recolectados directamente de la naturaleza. Se trataba, por tanto, de uno de los primeros proyectos de genómica ambiental desarrollados hasta la fecha en el que varios genotipos iban a ser secuenciados a la vez. Uno de los primeros problemas de hecho, consistía en prevenir la contaminación de la muestra de DNA bacteriano con DNA nuclear o mitocondrial del pulgón. Esta dificultad se solventó tras someter los extractos celulares de los pulgones recolectados a sucesivas filtraciones para eliminar las células del insecto y a centrifugación suave para eliminar las bacterias intactas de las mitocondrias. La estrategia utilizada para la secuenciación del DNA bacteriano fue la de “*random shotgun*”, en la que el DNA genómico se fragmentó al azar mecánicamente por sonicación y los fragmentos obtenidos, del orden de 1,5-2 kb, se aislaron por Electroforesis en Campo Pulsante [*Pulsed-field Electrophoresis*-PFGE] y se clonaron en el plásmido pUC18 para generar la genoteca correspondiente. La secuenciación se realizó por secuenciación Sanger y se utilizó el robot de manejo de líquidos *MultiPROBE II* (*Perkin Elmer*), toda una novedad en aquel momento.

144

Me gustaría sin embargo, detallar las condiciones en que realmente se secuenció este primer genoma, que visto en la lejanía del tiempo no deja de ser anecdótico, pero en aquel momento suponía un handicap severo habida cuenta de que estábamos compitiendo con otros laboratorios extranjeros que perseguían los mismos objetivos. No hay que olvidar que las instalaciones del Centro de Astrobiología se inauguraron en enero de 2003 y en el momento del desarrollo del proyecto de secuenciación de *B. aphidicola*, todavía se veían excavadoras preparando el terreno! Afortunadamente, el INTA cedió uno de sus hangares para acoger a la avanzadilla de investigadores que comenzó el proyecto, dirigido en el CAB por el [Dr. Roeland Van Ham](#), brillante investigador –hoy día vicepresidente y director de Bioinformática en [Keygene](#) - y asistido en la parte técnica por las meticulosas manos de Judith Kamerbeek. Así, en un laboratorio improvisado de apenas 10 metros cuadrados se obtuvo el que iba a ser el primer genoma que se secuenciaba íntegramente en España, si bien es cierto que para arrancar el proyecto, una parte de la secuenciación tuvo que realizarse en la Universidad de Valencia.

Tras el ensamblaje y cierre de *gaps* hasta obtener un único *contig* de cerca de 620.000 nucleótidos, comenzó la fase de anotación funcional mediante búsquedas BLAST en las bases de datos no redundantes de proteínas y DNA del NCBI. Los resultados indicaron que el endosimbionte *B. aphidicola* era capaz de vivir con escasos 500 genes codificantes de proteínas, un número similar al que posee el genoma de *Mycoplasma genitalium* pero muy alejado de los aproximadamente 4150 genes que contiene el genoma de *E. coli* con la que comparte un mismo ancestro. De hecho, *B. aphidicola* no ha ganado ninguna función nueva dado que no posee ningún gen que no contenga *E. coli*, debido a que en este ambiente intracelular, en el que *Buchnera* es transmitida vía materna a través de los huevos, no se produce intercambio de genes por transferencia génica horizontal. La comparación del genoma de *B. aphidicola* con los genomas de otras dos *Buchneras* de diferentes especies de áfidos sugirió que la mayoría de la reducción genómica ocurrió justo después del establecimiento de la relación de endosimbiosis, pero antes de la diversificación de las principales líneas de áfidos.

No hay que olvidar que al tratarse de una muestra ambiental, el estudio nos permitió además, determinar la variación intrapoblacional. La identificación de polimorfismos que afectaban al marco abierto de lectura de algunos genes nos proporcionaba además, una *fotografía* del proceso por el que se iban inactivando los genes. Precisamente, el impacto mayor en la reducción genómica se observó en el conjunto de genes dedicados a replicación, recombinación y reparación del DNA (3R): *Buchnera* había perdido la mayoría de los genes implicados en la vía de reparación por recombinación, por lo que propusimos que en ausencia del gen *recA*, el complejo *recBCD* tendría una función general de exonucleasa de reparación.

Además otros componentes del sistema de reparación de daño oxidativo del DNA y componentes del reensamblaje de horquillas de replicación bloqueadas se habían perdido como consecuencia del proceso de reducción genómica. Quizá las pérdidas de genes más llamativas afectan al complejo de replicación: *B. aphidicola* carece de la subunidad Tau, implicada en la replicación coordinada de las hebras líder y retrasada. *polA*, codificante para la DNA polimerasa I había conservado únicamente el dominio 5'-3' exonucleasa, implicada en la eliminación de cebadores RNA durante la replicación, siendo por tanto Pol III la única DNA polimerasa presente en su genoma. Por tanto, concluimos que la reducción de las maquinarias 3R contribuyó notablemente a la inactivación génica en *B. aphidicola*.

Por otro lado, uno de los firmantes del trabajo, el [Dr. Ugo Bastolla](#), hoy día científico titular del CSIC en el centro de Biología Molecular Severo Ochoa [CBMSO], realizó un análisis que concluía que el sesgo mutacional hacia AT en bacterias con una relación de endosimbiosis obligada como *Buchnera*, generaba una disminución de la estabilidad termodinámica de las proteínas sintetizadas y por lo tanto, en el plegamiento correcto de las proteínas. Dado que la chaperona GroELS se expresa abundantemente en *Buchnera*, ésta actuaría como un mecanismo compensatorio para contrarrestar la acumulación de sustituciones de aminoácidos que desestabilizan las proteínas de *Buchnera*.

En síntesis, los datos obtenidos mostraban la existencia de un sesgo mutacional, pérdida de los sistemas reguladores (genes y secuencias reguladoras), acumulación de mutaciones que afectan a la estabilidad de proteínas, formación de pseudogenes y pérdida de genes en todas las categorías funcionales, un sesgo de inactivación de genes hacia la región del término de replicación y una reducción continua de los genes 3R. Por comparación con otros genomas podíamos identificar genes específicos de simbiosis, siendo este contenido dependiente del modo de vida de cada endosimbionte. Sin embargo, este estudio permitió identificar también el número mínimo de genes o dominios de proteínas esenciales implicados en los procesos básicos de mantenimiento de la célula: replicación, transcripción y traducción, así como rutas biosintéticas mínimas, proporcionando una valiosa información en los estudios de biología sintética.

Las conclusiones que planteamos fue que la evolución de *B. aphidicola* sería un caso de evolución degenerativa, más que adaptativa y el destino final sería la extinción. Años más tarde el grupo de la Dra. Amparo Latorre publicaría la existencia de endosimbiontes secundarios, *Serratia*, que sustituirían a *Buchnera*, lo que permitió obtener una visión global del proceso de endosimbiosis, reducción genómica, degeneración y sustitución de un endosimbionte por otro.

El trabajo fue aceptado para su publicación en *PNAS* a finales de 2002, siendo editado por el mismísimo [Craig Venter](#). Previamente había sido rechazado en *Science* por la editora por "cuestiones de espacio" a pesar de la opinión favorable y unánime de los tres *referees*... Esa limitación de espacio pareció no afectar a la posterior publicación en esta misma revista del trabajo de nuestros competidores a pesar de que el genoma que analizábamos había divergido de éste unos 100 millones de años antes. Esto nos permitió incluir en nuestro trabajo la comparación de los contenidos génicos de los tres genomas de *Buchnera* secuenciados y obtener conclusiones más profundas sobre contenido génico mínimo y el proceso de reducción de genomas. Prueba de ello son las más de 750 citas que acumula esta publicación. La continuación de esta línea de investigación en el Instituto Cavanilles de Valencia liderada por los Dres. Amparo Latorre y Andrés Moya ha sido una de las más productivas en España en los últimos diez años, con numerosas publicaciones incluyendo revistas de primer nivel como *Science* o *PNAS*. Este trabajo permitiría más tarde a este grupo liderar un proyecto europeo sobre biología sintética y comenzar estudios de metagenómica sobre el microbioma humano, poniendo una vez más de relieve la importancia de realizar y financiar la investigación básica.