

MICROARRAYS DE ADN EN MICROBIOLOGÍA DNA MICROARRAYS IN MICROBIOLOGY

Mónica Aguado

Tutor: M^o del Mar Blanco

Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

RESUMEN

Durante la última década, el desarrollo tecnológico de los equipos de secuenciación automatizada y de la bioinformática ha permitido el aumento exponencial en el número de trabajos científicos centrados en la secuenciación de genomas completos. De la mano de toda esta información genómica se han desarrollado nuevas herramientas para su análisis, como la tecnología de microarrays de ADN, que ha permitido el estudio de la homología del ADN y/o de la expresión génica para miles de genes en un solo experimento. Esta tecnología se ha usado durante los últimos años para el estudio de perfiles transcripcionales y de variaciones en el genoma de gran variedad de microorganismos. Gracias al incremento en el número de genomas microbianos secuenciados por completo, los microarrays de ADN se están convirtiendo en una herramienta fundamental en las principales áreas de investigación en Microbiología como son la fisiología, epidemiología, ecología, patogénesis y filogenia microbianas.

ABSTRACT

During the last years, the development of the sequencing technology and the bioinformatic tools has allowed a great increase in the scientific studies focused on sequencing complete genomes. New tools for the analysis of this high amount of data have been developed in parallel to the genomes sequencing, such as DNA microarray technology. DNA microarrays allow the analysis of DNA homology or gene expression for thousands of genes in a single experiment. Over the past few years, this powerful technology has been used to explore transcriptional profiles and genome differences for a variety of microorganisms. Thanks to the increase in the complete microbial genome sequences, DNA microarrays are becoming a common tool in many areas of microbial research, including physiology, pathogenesis, epidemiology, ecology and phylogeny.

Palabras Clave: Microarray de DNA, genómica funcional, genómica comparativa, perfil de expresión génica, detección de microorganismos.

Key Words: DNA Microarray, functional genomics, comparative genomics, expression profile, microorganism detection.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la investigación en microbiología a nivel molecular está viviendo grandes cambios. Desde los años noventa, se ha pasado de la publicación de artículos científicos basados en la secuenciación de un solo gen o un operón, a las publicaciones que describen la secuencia de genomas completos de diferentes organismos. Este cambio ha sido posible gracias al desarrollo tecnológico de los equipos de secuenciación automática y de la bioinformática como herramienta fundamental para el almacenamiento y análisis de la enorme cantidad de datos generados. En Microbiología, el número de genomas microbianos secuenciados por completo aumenta cada día, lo que abre las puertas de la investigación microbiológica molecular a escala genómica y del desarrollo de nuevas tecnologías, como es el caso de los Microarrays de ADN. A continuación, se explican brevemente los fundamentos de esta tecnología, así como su papel en la Microbiología molecular actual y sus futuras aplicaciones.

La tecnología de Microarrays de ADN

La base de la tecnología de microarrays o *chips* de ADN es la automatización y robotización de las técnicas clásicas de biología molecular *Southern* y *Northern blotting*, siendo el fundamento de la técnica la hibridación de ácidos nucleicos. La principal ventaja con respecto a las técnicas clásicas es la posibilidad de inmovilizar en la superficie del microarray miles de sondas de ADN, permitiendo el análisis de la presencia/ausencia o de la expresión de miles de genes, incluso de genomas completos, en un solo experimento.

Un microarray de ADN se define como una serie de sondas de ADN unidas a una superficie sólida en una disposición regular y prefijada. La muestra problema se marca con un fluorocromo y puede ser, según el tipo de experimento, ADN: para estudios de búsqueda de secuencias específicas o de variaciones en las mismas; o ARN: para análisis de perfiles de expresión. El soporte utilizado comúnmente es el formato porta de vidrio de microscopía debido, sobre todo, a su baja fluorescencia basal y a que admite tratamientos de superficie para la unión covalente de las sondas de ADN. Un experimento típico con microarrays de ADN sigue los siguientes pasos: fabricación de array, preparación de la muestra, hibridación y análisis de los datos. Existen dos tipos de microarrays en función de la naturaleza de la sonda: los microarrays de productos de PCR y los microarrays de oligonucleótidos.

Microarrays de productos de PCR

Los microarrays de productos de PCR o *Spotted Microarrays* están formados por sondas (*spots*) sintetizadas previamente y depositadas en la superficie del microarray mediante un robot (*microarray spotter*). En este tipo de arrays cada *spot* representa a un gen.

En un experimento común de obtención y comparación de perfiles de expresión, se comparan dos muestras: el ARN control (del microorganismo crecido en condiciones estándar) y el ARN problema (microorganismo crecido en condiciones determinadas). A partir del ARN se obtiene el ADNc para cada muestra, marcando cada una de las muestras con un fluorocromo de diferente color (Cy3 y Cy5). Los ADNc marcados hibridarán de manera competitiva en el mismo *chip*. El último paso es el escaneado del *chip* y la posterior interpretación de los resultados numéricos de intensidades de fluorescencia, comparando las fluorescencias del control y el problema. Un punto clave para la interpretación de los datos es fijar un ratio a partir del cual se considerará que se está induciendo la expresión de un gen en el tratamiento y otro por debajo del cual se considera que se está reprimiendo.

La principal ventaja de los *spotted microarrays* es la flexibilidad en el diseño experimental, sin embargo esta mayor manipulación en todos los pasos de generación del array provoca una reducción en la reproducibilidad entre *chips*.

Microarrays de oligonucleótidos

Los microarrays de ADN también pueden ser contruidos con oligonucleótidos cortos, es el caso de los *High Density Microarrays*. En el sistema Affymetrix (empresa líder en la construcción de microarrays comerciales), los oligonucleótidos son sintetizados directamente en la superficie de vidrio del array, permitiendo la síntesis de una elevadísima cantidad de sondas en un solo *chip* (*GeneChip*). Cada sonda tiene una longitud de 25 nucleótidos, por lo que para completar un gen se agrupan varias sondas, lo que se denomina *group set* o grupo de sondas. Dentro de un *group set*, cada sonda de 25 oligonucleótidos con la secuencia perfecta (*perfectmatch probe*), va acompañada de un control negativo, que es la misma secuencia con un cambio de base en el centro de la sonda (*missmatch probe*), así se pueden detectar y eliminar las hibridaciones inespecíficas. En la tecnología *GeneChip* se hibrida una sola muestra por *chip*, de

manera que para la comparación de perfiles de expresión de un control y un tratamiento se comparan los resultados para cada gen en cada *chip*.

Las principales ventajas de esta tecnología son: su alta reproducibilidad, la posibilidad de estudiar genomas microbianos completos debido a su elevadísima densidad de sondas, y la sencillez en la interpretación de los datos obtenidos. Sin embargo, en la actualidad, el coste de esta tecnología es muy elevado y hay pocos arrays de microorganismos ofertados por la empresa, y el diseño de arrays “a la carta” supone un coste aún mayor. Además se trata de una plataforma muy cerrada.

Microarrays y genómica funcional en investigación microbiológica

Gracias a esta nueva herramienta de investigación se pueden generar **perfiles de expresión génica**, que pueden considerarse como una “huella” de un organismo determinado bajo unas circunstancias determinadas. Desde los comienzos de esta tecnología, su elevado potencial ha captado el interés y la imaginación de investigadores de todo el mundo. Desde entonces, se ha pasado de la aproximación para la elucidación de la función de genes bacterianos de “un gen = un postdoc”, a la posibilidad de monitorizar en un solo experimento la expresión de un genoma bacteriano completo. La gran ventaja de la genómica funcional es que permite relacionar genes sin caracterizar con funciones no descritas para los mismos con anterioridad. Los microarrays de ADN nos permiten predecir funciones génicas mediante el agrupamiento de genes con patrones de expresión similares.

La interpretación y el análisis de los datos generados mediante esta tecnología deben ser exhaustivos. Los resultados deben ser tratados con gran objetividad y se deben considerar como nuevas hipótesis, que han de ser validadas con métodos más tradicionales de biología molecular Hughes *et al.* (2000). Estos métodos de validación incluyen ensayos enzimáticos, sistemas de genes *reporter*, o sistemas de cuantificación directa de ARN, como la PCR cuantitativa a tiempo real.

APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA EN LAS QUE LA MUESTRA ES ARN

Perfiles de expresión génica microbiana

La primera y principal aplicación para la que se han usado los microarrays de ADN ha sido la generación de perfiles transcripcionales o de expresión génica. Mediante esta aproximación es posible medir la actividad transcripcional para cada gen o región génica de un microorganismo, crecido bajo determinadas condiciones ambientales, pudiendo comparar así los niveles de ARNm en distintas condiciones de crecimiento. Gracias a este tipo de experimentos se han podido comprender mejor, las respuestas frente cambios ambientales y la expresión génica global de los microorganismos. Así, en los últimos años, está ganando aceptación el concepto de **respuesta transcripcional global** entendido como un **fenotipo molecular** que se expresa bajo unas condiciones ambientales determinadas Hughes *et al.* (2000). Algunas aplicaciones derivadas de estos estudios son las siguientes:

- *Estudios de patogenicidad*

Gracias al desarrollo de los perfiles de expresión se ha podido abordar el estudio de la patogenicidad bacteriana a escala genómica. Los perfiles de expresión obtenidos en bacterias crecidas en un medio que reproduce las condiciones en el hospedador, proporcionan información sobre interacciones entre rutas metabólicas, fases de desarrollo y rutas de regulación de la infección microbiana. El objetivo principal de este tipo de estudios en bacterias patógenas es la **identificación de genes bacterianos que son expresados diferencialmente durante la infección**, incluyendo: genes de adaptación del microorganismo al ambiente hospedador-específico y genes que codifican para factores de virulencia Schoolnik (2002).

Una adaptación típica a microambientes del hospedador por parte de algunos microorganismos es la capacidad de sobrevivir a pH muy ácido, superando con éxito la barrera del ácido gástrico. Es el caso del estudio de las respuestas transcripcionales de *H. pylori* a bajo pH, en el que se observó que de los 1534 ORFs impresos en el microarray, 80 estaban sobre regulados en estas condiciones Ang *et al.* (2001).

- *Determinación de respuestas del hospedador y de interacciones microorganismo-hospedador en la infección*

El conocimiento de las respuestas que se dan en el hospedador ante una infección es necesario para entender las bases de la patogénesis microbiana. La caracterización de las respuestas de las células hospedadoras ante una infección, se ha venido realizando *in vitro*, mediante el uso de sistemas modelo de infección, como cultivos de células u órganos, analizando los cambios en el perfil transcripcional de las células tras la infección. Gracias a esta estrategia se han podido **identificar moléculas microbianas responsables de la inducción de cambios en el perfil transcripcional de la célula hospedadora.**

Las respuestas son variadas dependiendo del tipo de infección y de la célula hospedadora. Un trabajo importante en este campo fue el realizado por Huang *et al.* (2001). En él se compararon las respuestas transcripcionales de células dendríticas frente a una infección por una bacteria (*E. coli*), un virus (*influenza A*) y un hongo (*C. albicans*), y se demostró que existe un grupo de 166 genes que son inducidos por los tres microorganismos durante la infección de las células dendríticas, que resultaron ser genes de respuesta inmune inespecífica.

- *Farmacogenómica.*

La inhibición de un determinado proceso celular por un fármaco puede dar como resultado la activación de mecanismos reguladores en la célula, lo que conlleva cambios en el perfil de expresión celular. El estudio de estos cambios en los perfiles de expresión mediante microarrays de ADN puede **revelar información sobre el modo de acción de fármacos, inhibidores o compuestos tóxicos.** Los microarrays de ADN se han usado para explorar los cambios en la expresión génica de *Mycobacterium tuberculosis* inducidos por el fármaco antituberculoso isoniazida Wilson *et al.* (1999). Este experimento mostró que la isoniazida inducía la expresión de varios genes que codificaban proteínas fisiológicamente relevantes para el modo de acción del fármaco. Con este tipo de estudios se pueden definir nuevas dianas terapéuticas y así sintetizar nuevos compuestos que actúen sobre ellas Schollnik (2002).

APLICACIONES EN MICROBIOLOGÍA EN LAS QUE LA MUESTRA ES ADN

Microarrays en genómica comparativa, genotipado y filogenia microbianas

La filogenia microbiana basada en el ARNr/DNAr es capaz de clasificar a los microorganismos con precisión hasta el nivel de especie. Sin embargo, el fenómeno de la

transferencia lateral de genes es un mecanismo muy importante de evolución en los procariotas, complicando los análisis filogenéticos que se basan en el estudio de unos pocos genes Lucchini *et al.* (2001). La variabilidad genética entre cepas adaptadas a un microambiente hospedador-específico, da como resultado diferencias fenotípicas entre biotipos comensales no patógenos y biotipos virulentos. La comparación de cepas mediante la hibridación del DNA genómico con microarrays (**genotipado**) es una nueva aproximación frente a la secuenciación completa de docenas de cepas. Las comparaciones genómicas entre cepas de la misma especie con diferente grado de patogenicidad informan sobre los genes necesarios para la virulencia o la adaptación a un nicho hospedador-específico; éste el caso de las islas de patogenicidad, que codifican factores de virulencia.

La comparación mediante microarrays de ADN de genomas secuenciados completamente y genomas no secuenciados, pero próximos filogenéticamente, proporciona valiosa información sobre la diversidad y la evolución de patógenos y comensales Ochman y Moran (2001).

Varios ejemplos pioneros de la genómica comparativa basada en la hibridación con microarrays de ADN, son los estudios realizados sobre las variaciones en el genoma para: diferentes cepas de *Helicobacter pylori* Salama *et al.* (2000); diferentes aislados de *Streptococcus pneumoniae* Hakenbeck *et al.* (2001) y entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y los Bacilos de Calmette-Guérin (BCG) Behr *et al.* (1999). Otros estudios han demostrado que la hibridación genómica con microarrays de ORFs puede ser una buena aproximación para la búsqueda de nuevos genes en un organismo no secuenciado, mediante una hibridación heteróloga de su DNA genómico con un microarray en el que se representan todos los ORFs de otro microorganismo secuenciado de distinta especie, pero filogenéticamente próximo Dong *et al.* (2001).

En definitiva, este método de genotipado y análisis del contenido genético por hibridación con microarrays es una herramienta potencial para el genotipado epidemiológico de patógenos, así como para el diagnóstico y detección de microorganismos.

Microarrays como herramienta de diagnóstico y detección de microorganismos

Una de las aplicaciones más importantes para la Microbiología Médica y Veterinaria de los microarrays de ADN es su potencialidad como herramienta de diagnóstico y detección de

patógenos. Se espera que en el futuro esta tecnología sustituya a los métodos tradicionales de detección de patógenos en los laboratorios, tanto de microbiología clínica como de control de calidad de la industria, principalmente la alimentaria. En la actualidad, muchos grupos trabajan en el diseño de microarrays que permitan la detección e identificación de una elevada cantidad de microorganismos con una sola hibridación, es decir, poder realizar el diagnóstico diferencial de enfermedades infecciosas con un solo microarray. Un ejemplo es el diseño de un array de oligonucleótidos panmicrobiano para el diagnóstico de enfermedades infecciosas que incluye 29455 sondas de 60 oligonucleótidos para virus, bacterias, hongos y parásitos. Este array se testó con muestras clínicas de personas con varias enfermedades infecciosas, confirmando la presencia de los virus y bacterias que habían sido identificados por otros métodos Palacios *et al.* (2007).

CONCLUSIÓN

Gracias a la disponibilidad de las secuencias de genomas completos de gran cantidad de microorganismos, la tecnología de microarrays de ADN se ha convertido en una herramienta muy potente para la exploración de perfiles de expresión y para la búsqueda de diferencias en el contenido genético en genomas completos. El genotipado de microorganismos mediante esta técnica puede revolucionar la identificación bacteriana, y se espera que en el futuro sea incluida para el diagnóstico clínico y el control de calidad en la industria. La aplicación de los perfiles de expresión bacterianos promete seguir siendo muy útil en la investigación microbiológica y está limitada solamente por la imaginación del investigador.

La dificultad para llevar a cabo una buena interpretación de los datos generados mediante microarrays hace difícil llegar a conclusiones con los datos obtenidos sin otras evidencias que lo apoyen. Por tanto, es necesaria la confirmación de los resultados mediante métodos proteómicos, bioquímicos, de genética molecular clásica o fisiológicos.

El continuo desarrollo tecnológico hará posible próximamente la mejora de la técnica de microarrays de ADN, haciéndola mucho más efectiva y pudiendo responder con más eficacia a cuestiones a escala genómica, o lo que es lo mismo, del organismo completo. Esto marcará el paso de la era genómica, que estamos viviendo en la actualidad, a la era post-genómica, que promete ser el periodo más interesante para la historia de la Microbiología.

BIBLIOGRAFÍA

- Ang, S., Lee, CZ., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, MA. y Wang, JT.** 2001. *Acid-induced expression in Helicobacter pylori: study in genomic scale by microarray.* Infect. Immun. 69: 1679-1686.
- Behr, MA., Wilson, MA., Gill, WP., Salamon, H., Schoolnik, GK., Rane, S. y Small, PM.** (1999). *Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray.* Science 284: 1520-1523.
- Dharmandi, Y. y González, R.** 2004. *DNA Microarrays: experimental issues, data analysis and application to bacterial systems.* Biothechnol. Prog. 20: 1309-1324.
- Dong, Y., Glasner, JD., Blattner, FR. Y Triplett, EW.** 2001. *Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, Klebsiella pneumoniae 342, by microarray hybridization with Escherichia coli K-12 Open Reading Frames.* Appl. Environ. Microbiol. 67: 1911-1921.
- Ehrenreich A.** 2006. *DNA microarray technology for the microbiologist: an overview.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 255-273.
- Garaizar, J., Rementería, A. y Porwollic, S.** 2006. *DNA Microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens?* Immunol. Med. Microbiol. 47: 178-189.
- Hakenbeck, R., Balmelle, N., Weber, B., Gardes, C., Keck, W. y de Saizieu, A.** 2001. *Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of Streptococcus pneumoniae.* Infect. Immun. 69: 2477-2486.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., et al.** 2001. *The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components.* Science 294: 870-875.
- Hughes, TR., Marton, MJ., Jones, AR. y diecinueve autores más.** 2000. *Functional discovery via a compendium of expresión profiles.* Cell 102: 109-126.
- Lucchini, S., Thompson, A. y Hinton, JCD.** 2001. *Microarrays for microbiologists.* Microbiology 147: 1403-1414.
- Ochman, H. y Moran, NA.** 2001. *Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis.* Science 292: 1096-1098.
- Palacios, G., Quan, PL., Jabado, OJ., Conlan, S., Hirschberg, DL., Liu, Y., Zhai, J., Renwick, N., Hui, J., Hegyi, H. y 14 autores más.** 2007. *Panmicrobial Oligonucleotide Array for diagnosis of infectious diseases.* Emerg. Infect. Dis. 13: 73-81.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, TK., Sherlock, G., Tompkins, L. y Falkow, S.** 2000. *A whole-genome microarray reveals genetic diversity among Helicobacter pylori strains.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 14668-14673.

Schoolnik, GK. 2002. *Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria*. Curr. Opin. Microbiol. 5: 20-26.

Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, HH., Imboden, P., Rane, S., Bronw, PO. y Schoolnik, GK. 1999. *Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 12833-12838.