

ESTUDIO DE GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS CON POTENCIAL IMPLICACIÓN EN LA PATOGENIA BACTERIANA UTILIZANDO LIBRERÍAS DE MUTANTS Tn5

Study of genes involved in biofilm formation with potential involvement in the pathogenesis bacterial using Tn5 mutants libraries

Irene GALÁN

Departamento de Microbiología y Genética, laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología Plaza Doctores de la Reina SN- Campus Miguel de Unamuno. Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.

Correo-e: irenegalan@usal.es

Paula GARCÍA-FRAILE

Departamento de Microbiología y Genética, laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología Plaza Doctores de la Reina SN- Campus Miguel de Unamuno. Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.

Correo-e: paulagf81@usal.es

Raúl RIVAS

Departamento de Microbiología y Genética, laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología Plaza Doctores de la Reina SN- Campus Miguel de Unamuno. Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Unidad Asociada USAL-IRNASA (CSIC), Salamanca, Spain.

Correo-e: raulrg@usal.es

RESUMEN: La formación de biofilms es importante en la patogenicidad de un gran número de bacterias. *Escherichia coli*, es un bacilo gram-negativo, facultativamente anaeróbico y coliforme comúnmente encontrada en el intestino de muchas especies animales. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, pero algunos serotipos pueden causar enfermedades graves en sus hospedadores. El desarrollo del biofilm de *E. coli* es un proceso complejo y significativo tanto en enfermedades como en aplicaciones de ingeniería. Por lo tanto, la identificación de genes implicados en el proceso de formación de biofilm presenta un interés alto. Por ello, mediante la inserción del transposón Tn5, hemos creado una colección de 40 mutantes de la cepa de *E. coli* DH5 α , para estudiar la posible implicación de los genes mutados en la formación de biofilm en esta bacteria. El descubrimiento de los genes implicados en la formación de biofilm de *E. coli* podrá ser de utilidad en futuras investigaciones de fármacos indicados contra infecciones causadas por esta bacteria.

Palabras clave: *Escherichia coli*; patogénesis; Tn5; biofilm; mutación.

ABSTRACT: Biofilm formation is important in pathogenesis of a big number of bacteria. *Escherichia coli*, is a gram- negative bacterium, rod-shaped, facultatively anaerobic, coliform bacterium commonly found in the intestine of many animal species. Most *E. coli* strains are non- pathogenic, but some serotypes can cause serious diseases in their hosts. *E. coli* biofilm development is a complex process important for disease and engineering applications. Therefore, the description of genes implicated in the biofilm formation process is of utmost importance. Consequently, in this study we have grown a collection of 40 different mutants from the DH5 α *E. coli* strain by using the Tn5 transposon insertion, in order to study the possible implications of the mutated genes in the biofilm formation process in this bacterium. The discovery of genes implicated in biofilm formation in *E. coli* may serve in future investigations of drugs against infections caused by this bacterium.

Key words: *Escherichia coli*; pathogenesis; Tn5; biofilm; mutant.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un importante comensal de la microbiota intestinal y normalmente inofensivo, sin embargo, existen cepas patógenas, agentes etiológicos de la gastroenteritis en muchos países desarrollados. Esto es peligroso, ya que existen

algunas complicaciones que pueden llegar a amenazar la vida del paciente: una diarrea severa o colitis hemorrágica que pueden dar como resultado el síndrome urémico y la muerte. Los tipos patógenos de *Escherichia coli* se transmiten a los seres humanos a través del agua y alimentos contaminados, también de animales y de persona a persona (Smith *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015).

E. coli, tiene la capacidad de formar biofilms bacterianos, tanto en una superficie inerte como en un tejido vivo (Reisner *et al.* 2006). El biofilm es un conjunto de microorganismos que crecen concentrados en una matriz de polímeros extracelulares constituyendo un estado de crecimiento natural para muchos microorganismos, siempre que la humedad y los nutrientes disponibles sean suficientes. Los biofilms tienen un gran impacto en la salud humana, ya que suelen estar implicados en las fases iniciales del proceso de infección, la matriz extracelular en la que están embebidos los microorganismos sirve para proteger al organismo evadiendo la respuesta inmune del huésped (Carey *et al.*, 2017).

Averiguando qué genes están implicados en la formación de estos biofilms, podríamos atacar directamente a la raíz de este problema y disminuir así las infecciones causadas por *E.coli* (Stewart & Costerton, 2001).

El uso del transposón Tn5 para generar librerías de mutantes ha sido ampliamente utilizado para identificar genes implicados en diversas funciones bacterianas (Lin *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2015; Mesarich *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2016).

En este trabajo se obtuvo una colección de mutantes diferentes de *E.coli* mediante inserción del transposón Tn5 con el objetivo de identificar potenciales genes implicados en la formación de biofilms.

2. OBJETIVOS

En este proyecto, el objetivo principal fue identificar genes de *E.coli* implicados en la formación de biofilm, para ello nos planteamos unos objetivos específicos:

Obtener una colección de mutantes de mutantes de la cepa de *E.coli* DH5 α_2 con inserciones al azar del transposón Tn5 en su genoma.

Aislar cepas mutantes en las que la capacidad de formación de biofilms esté afectada.

Identificar genes mutados en aquellos clones afectados en la formación de biofilms.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas bacterianas y los plásmidos empleados en este estudio están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Descripción	Fuente
DH5 α 2	Cepa salvaje resistente a Str	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca
pSUP2021	Plásmido donador del transposón Tn5	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca
pRk2013	Plásmido Helper 1	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca
pRk600	Plásmido Helper 2	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca
Mutante 16	Cepa de <i>E. coli</i> resistente a estreptomicina, ampicilina, kanamicina, tetraciclina que contiene el transposón Tn5	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca
Mutante 29	Cepa de <i>E. coli</i> resistente a estreptomicina, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, que contiene el transposon Tn5	Laboratorio 210. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca

3.2. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas de este estudio

Las cepas de *E. coli* y sus mutantes fueron cultivadas a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) suplementado con los antibióticos correspondientes para los mutantes. Para el estudio de la formación de biofilms, las cepas mutantes se

cultivaron en un medio líquido compuesto por Glucosa 1g/L, Peptona 1g/L y Extracto de levadura 0,5g/ L.

Para conservar cada una de las cepas, células frescas de cada una de ellas fueron recogidas en 4 tubos con glicerol al 20% que se mantienen congelados a -80°C.

3.3. *Generación de la librería de mutantes.*

Para obtener la galería de mutantes se realizó una conjugación de una cepa de *E.coli* DH5 α 2 conteniendo una mutación espontánea de resistencia a estreptomycin (StrR) con una cepa de *E.coli* donadora de un plásmido pSUP2021, que contiene el transposón Tn5, ayudada por dos cepas de *E.coli* conteniendo los plásmidos «helpers» pRk-2013 y pRk600. Puesto que la inserción del transposón Tn5, confiere resistencia a tetraciclina, ampicilina y kanamicina a la cepa silvestre, el aislamiento de cepas resultantes de la conjugación en medio de cultivo conteniendo cualquiera de estos tres antibióticos, que selecciona cepas que contienen el transposón, más estreptomycin, que selecciona la cepa receptora, permite la creación de la librería de mutantes.

El procedimiento para realizar la conjugación fue el siguiente. Cada una de las cepas mencionadas fue incubada de acuerdo con sus condiciones óptimas de crecimiento durante 24h, a 37°C en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a cada una de ellas. Posteriormente, se dispusieron en un tubo eppendorf 100 μ L de la cepa silvestre, 20 μ L de la cepa conteniendo el plásmido donador del transposón Tn5 y 20 μ L de una de las cepas conteniendo uno de los plásmidos «helper». El mismo procedimiento se realizó en un segundo tubo utilizando en este caso la cepa donadora del segundo de los plásmidos «helper». La mezcla se resuspendió y centrifugó durante 3 minutos a 3000rpm. Tras quedarnos con el precipitado, se resuspendió en glicerol y se sembró en 4 placas en cuyo centro se había dispuesto un disco MF-Millipore (Millipore®) de membrana de ésteres mixtos de celulosa hidrófila con un tamaño de poro de 47 μ m. Dos de las placas se inocularon con la mezcla que contiene el helper pRk2013 y las otras 2 con la mezcla conteniendo el helper pRk600, añadiendo de cada mezcla 10 μ L y 50 μ L, respectivamente. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C para así propiciar la conjugación entre las dos cepas. Pasadas las 24h, los discos que contienen las cepas mutantes creciendo sobre su superficie, fueron recogidos y trasladados a tubos con glicerol estéril al 20%, agitando mediante vortex para obtener una suspensión de células mutantes en glicerol. Después, a partir de esta suspensión, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁷ de solo uno de los tubos, en este caso el que contenía 10 μ L de la mezcla con el helper pR2013.

Para ello, en el primer eppendorf se pusieron 10 μ L de la mezcla con el mutante obtenido por conjugación y 90 μ L de agua, de este eppendorf se cogen 10 μ L y se

llevan a un segundo eppendorf con 90 μ L, y así hasta llegar al séptimo eppendorf consiguiendo una dilución 1:106.

De las diluciones 10-5, 10-6 y 10-7 se sembraron 2 placas por extensión con medio LB conteniendo los antibióticos Estreptomicina 100 μ g/mL que selecciona la cepa *E.coli* DH5 α 2StrR y kanamicina 50 μ g/mL, que selecciona aquellos mutantes que han adquirido el transposón Tn5 que confiere resistencia a kanamicina, entre otros antibióticos.

Tras 24h de incubación a 37°C se seleccionaron 40 colonias mutantes diferentes contenidas en esas 6 placas anteriores y se resembraron en nuevas placas individuales por agotamiento en estría para obtener cultivos puros.

3.4. *Análisis del biotipo en la formación de biofilms*

Para el estudio de la formación de biofilms se utilizó medio de cultivo LB con los antibióticos de selección indicados anteriormente.

De los 40 mutantes, se eligieron aleatoriamente 20 cepas y realizó el análisis de su capacidad para formar biofilms sobre superficies inertes siguiendo la siguiente metodología:

En primer lugar, se preparó un preinóculo en el que se pusieron células de cada mutante en tubos de cristal esterilizados con 3mL del medio con kanamicina 50 μ g/mL y estreptomicina 100 μ g/mL, y la cepa silvestre en un tubo con 3mL de medio sin antibiótico, dejándolos un día incubando a 37°C.

Posteriormente se indujo la formación de biofilm, sobre un portaobjetos de cristal introducido en tubos Falcon conteniendo 25 mL del medio LB líquido, en el caso de la cepa silvestre, y el mismo medio conteniendo además Kanamicina (50 μ g/mL) y Estreptomicina (100 μ g/mL) en el caso de las cepas mutantes. Para inocular estos tubos Falcon, partimos del preinóculo elaborado en la etapa anterior, equilibrando las concentraciones de células obtenidas para cada una de las cepas tras medir la absorbancia a una longitud de onda de 600nm, añadiendo la cantidad de preinóculo necesaria para obtener en todos los casos una concentración final de 10⁷ufc/mL en cada uno de los Falcon. Estos tubos Falcon inoculados se incuban durante 72 horas, a 37°C en un agitador a 150 rpm.

Finalmente, se seleccionaron las cepas que presentaban las más claras diferencias en cuanto a formación de biofilm tras observar los portaobjetos, que contenían muestras de cada cepa, teñidos con cristal violeta, en un microscopio óptico. Los portaobjetos se sometieron a la tinción con cristal violeta de concentración 10 mg/mL por ambos lados durante 2 minutos y posteriormente se hicieron 4 lavados con agua, se secaron, y se procedió a la observación al microscopio.

3.4. Secuenciación de la mutación

Para secuenciar la mutación se realizó una reacción conocida como PCR-Inversa (Figura 1). Para ello, se obtuvo ADN genómico de cada uno de los mutantes seleccionados utilizando el kit ultracleanMicrobial DNA isolation→, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se realizaron sendas digestiones enzimáticas del mismo con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (Figura 1), utilizando el kit FastDigest® (Thermo-Scientific). Siguiendo el protocolo del fabricante, se añadieron 15µL de agua, 5 µL de Buffer, 15µL de la enzima de restricción en cada caso y 25 µL del DNA aislado previamente. La mezcla se mantuvo a 37°C durante 10 minutos para la digestión del ADN y la reacción se detuvo calentando la mezcla durante 5 minutos a 80°C.

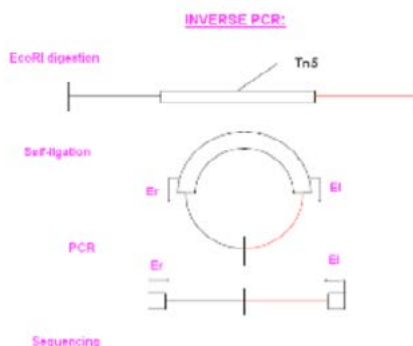


Figura 1. PCR inversa.

Tras ello, el producto de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, conteniendo bromuro de etidio para la visualización del ADN con luz U.V. en un transiluminador. Las bandas de ADN obtenidas fueron excisadas con un escalpelo y el ADN de las bandas fue purificado utilizando el kit de purificación Genejet gel extractor and DNA clean up micro kit®(Thermo-Scientific), según las instrucciones indicadas por el fabricante.

Después, se realizó una autoligación del ADN, para lo cual se empleó la enzima Ligasa T4 (Thermo-Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, para la amplificación del gen interrumpido por el transposón, se realizó una PCR utilizando los primers p310 y p176 y las siguientes condiciones: fase de activación de la polimerasa a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de tres etapas de 1 minuto cada una; disociación de cadenas (94°C), anillamiento por

el primer (53°C) y extensión (72°C), seguido de una elongación a 72°C durante 7 minutos. Al final de la PCR la temperatura baja a 4°C para conservar las muestras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se ha obtenido una colección de 40 cepas mutantes de *E. coli* DH5 α Tn5. La colección se mantiene a -80C en el laboratorio 210 del Edificio Departamental de Biología. De esta colección se han analizado 20 mutantes con respecto a su capacidad para producir biofilms (Figura 2).

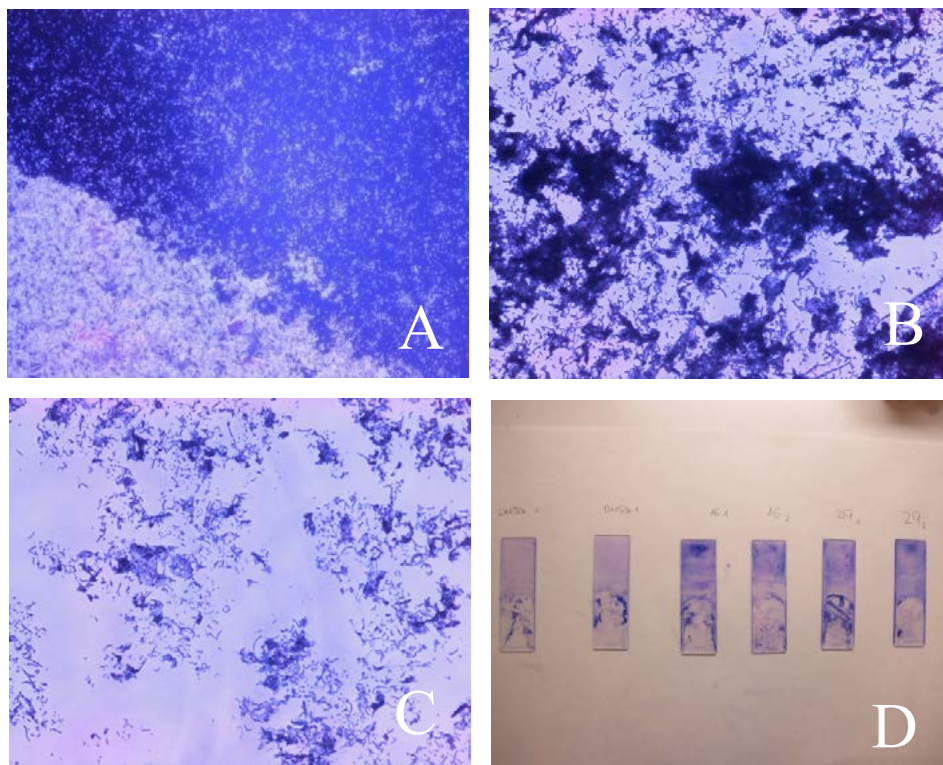


Figura 2. (A) cepa silvestre, (B) mutante 16, (C) mutante 29, (D) preparación de portaobjetos, utilizando tinción con cristal violeta, previa a la observación.

El análisis microscópico de la capacidad de las cepas mutantes para formar biofilms sobre una superficie inerte -vidrio- mostró que tanto la cepa silvestre como las cepas mutantes derivadas eran capaces de formar biofilms sobre el portaobjetos. Aunque todos los mutantes fueron capaces de producir biofilms, algunas cepas presentaban diferencias en cuanto a su capacidad de formar biofilm sobre la superficie del vidrio, frente a la cepa silvestre. Por ello, se decidió secuenciar la mutación en dos de estos mutantes, las cepas 16 y 29, con una capacidad para formar biofilms en vidrio superior e inferior, respectivamente (Figura 2). En primer lugar se realizó la digestión con la enzima EcoRI. Las bandas de ADN obtenidas fueron demasiado grandes y no se pudo secuenciar por PCR el fragmento conteniendo el transposón Tn5 para identificar el gen mutado. Por esta razón, repetimos la digestión con la enzima XhoI, para ver si los fragmentos resultantes de la digestión con esta enzima eran más pequeños y, por lo tanto, secuenciables. Desafortunadamente, los fragmentos obtenidos seguían siendo demasiado grandes para ser amplificados por PCR.

Sin embargo, a gran escala, la librería de mutantes generada puede tener muchas aplicaciones y en un futuro se podrá emplear para el estudio de este y otros fenotipos ya que su inserción, al tener una secuencia conocida sobre la que se pueden diseñar primers, denota más fácilmente el sitio del genoma afectado, el cual se puede localizar por diversos mecanismos basados en la técnica de la PCR, a diferencia de otros mecanismos de mutación.

5. CONCLUSIONES

El uso del transposón Tn5 para generar mutaciones aleatorias en el genoma de la bacteria mostró ser eficaz. Además de ser una herramienta para la obtención de librerías de mutantes, representa también una ventaja en la identificación de los genes afectados e involucrados en una vía o proceso de interés, ya que su inserción denota más fácilmente el sitio del genoma afectado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Carey PR, Gibson BR, Gibson JF, Greenberg ME, Heidari-Torkabadi H, Pusztai-Carey M, Weaver ST, Whitmer GR. Defining Molecular Details of the Chemistry of Biofilm Formation by Raman Microspectroscopy. *Biochemistry*. 2017; 56 (17): 2247-2250.
- Lin Z, Dong H, Li Y. Improvement of butanol production by *Escherichia coli* via Tn5 transposon mediated mutagenesis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2015; 31(12): 1711-9.
- Luo J, Qiu W, Chen L, Anjum SI, Yu M, Shan C, Ilyas M, Li B, Wang Y, Sun G. Identification of Pathogenicity-Related Genes in Biofilm-Defective *Acidovorax citrulli* by Transposon Tn5 Mutagenesis. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(12):28050-62.

- Mesarich CH, Rees-George J, Gardner PP, Ghomi FA, Gerth ML, Andersen MT, Rikkerink EH, Fineran PC, Templeton MD. Transposon insertion libraries for the characterization of mutants from the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. PLoS One. 2017;12(3):e0172790.
- Reisner A., Krogfelt K.A., Klein B.M., Zechner E.L., Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. Journal of bacteriology. 2006;188(10):3572-81.
- Rodríguez E.P., Soares P, Galvao P.G, Imada E.L, Simoes-Araújo J.L, Rouws L. F. M, de Oliveira A.L, Vidal M.S, Baldani J.I. Identification of Genes Involved in Indole 3 Acetic Acid Biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Strain Using Transposon Mutagenesis. Front. Microbiol. 2016; 7:1572.
- Smith J.L., Fratamico P.M. *Escherichia coli* as a Pathogen. Foodborne Diseases (Third edition). Elsevier. 2017; 189-208.
- Stewart, P.S. and Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet. 2001; 358:135-138.
- Yang R, Abraham S, Gardner GE, Ryan U, Jacobson C. Prevalence and pathogen load of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157/O145 serogroup in sheep faeces collected at sale yards and in abattoir effluent in Western Australia. Aust Vet J. 2017; 95 (5): 143-148.