

Resumen de proyecto

Título del Proyecto: *E. coli* La biopelícula

Autores: Diego Alberto Guerrero Aguirre; Mildred Salgado Ménez

Asesores del proyecto: Ricardo Oropeza, Alma Ayala.

De Tipo: Experimental

Escuela de procedencia: Centro Universitario Anglo Mexicano de Morelos, S. C.

Área de investigación: Ciencias biológicas.

1.-INTRODUCCIÓN

El propósito de este proyecto es el de conocer un aspecto de los procesos que intervienen dentro de la bacteria *Escherichia coli* para la formación de una biopelícula, como es el efecto de la alteración que tiene una secuencia de inserción sobre los genes que llevan a cabo el proceso de formación de la biopelícula. Se analizó la relación que guardan los genes *pga* que intervienen en la formación de la biopelícula de *E. coli* y el efecto que tiene una modificación en la región del mapa genético como lo es una secuencia de inserción (*IS1*), presente en una cepa llamada MC4100is1. Los genes *pga* forman un exopolisacárido que conforma la biopelícula, cuando la bacteria produce un regulador denominado RcsC; a partir del gen correspondiente clonado bajo un promotor inducible por arabinosa y apagado en glucosa.

2.-MARCO TEÓRICO

Del estudio de las bacterias se encarga la bacteriología, una rama de la microbiología. Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Se encuentran en todo hábitat de la tierra. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo. Comúnmente las bacterias tienen un único cromosoma circular cuyo tamaño puede ir desde sólo 160.000 pares de bases a los 12.200.000 pares de bases, pero no todas cumplen con esta norma, algunas no tienen un único cromosoma y éste no siempre es circular.

E. coli es la bacteria que utilizamos para la investigación porque que es de fácil manipulación en el laboratorio; ha sido caracterizada genéticamente y crece rápidamente por lo que ha sido utilizada como modelo de experimentación. *E. coli* es una de las bacterias cuyo cromosoma ha sido secuenciado y es posible estudiarla desde el punto de vista químico analizando los componentes de la expresión de sus genes: específicamente en nuestro caso, los llamados *pga* que codifican para la formación de un exopolisacárido que conforma la biopelícula. La secuencia que se estudia en el proyecto fue hallada en un aislado de la cepa MC4100is1 por el Dr. Ricardo Oropeza, investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias de inserción son fragmentos de ADN ajenos al ADN del organismo hospedante que pueden provocar mutaciones, ya que al insertarse interrumpen el ADN original, además de que pueden afectar la expresión de genes aledaños al sitio de inserción. La cepa de *E. coli* que utilizamos se caracteriza por tener una secuencia de inserción *is1*, localizada en la región líder del ARN mensajero del operón biosintético *pga*, que codifica las proteínas que sintetizan y exportan al polímero N-acetil-glucosamina.

Las biopelículas (que también pueden ser llamadas biofilms) son organizaciones microbianas que se adhieren a las superficies. Pueden contener diferentes tipos de células y están formadas aproximadamente de 15% de células y un 85% de matriz extracelular, generalmente polisacáridos que forman canales donde circulan los nutrientes, agua y desechos. Su forma de comunicarse es parecida a la de un tejido en un órgano, ya que las señales químicas que segregan funcionan como un lenguaje. El proceso de formación de la biopelícula está regulado por una compleja cascada de reguladores. En nuestro caso, estudiamos el efecto de RcsC, la cual es una proteína de la membrana interna de la bacteria, que se propone percibe señales externas para regular diferentes genes.

Algunas biopelículas en la naturaleza tienen muy pocas especies, entre diez y veinte. Las más complejas tienen de 100 a 1000. La capacidad de formación de la biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismo y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas. Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de la biopelícula es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de los desechos de las bacterias. Para adaptarse a su medio, las bacterias hacen cambios importantes en su estructura y metabolismo. Se han identificado genes que se "encienden" y "apagan" a través de las diferentes etapas de desarrollo de la comunidad. La bacteria ayuda a formar canales dentro de la biopelícula, los cuales transportan agua, alimento y desechos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés "polymerase chain reaction") es un procedimiento para amplificar fragmentos de ADN, obteniendo copias del fragmento original. Con esta prueba proponemos amplificar la región de ADN corriente arriba al operón *pga*, donde previamente se encontró una secuencia de inserción en la cepa MC4100, para corroborar su presencia en otras cepas. En el proceso de PCR se utiliza un termociclador, un fragmento de ADN, una polimerasa resistente a la desnaturalización como la enzima Taq ADN polimerasa, y los cebadores o primers que son secuencias cortas de ADN, complementarias a una de las 2 cadenas del ADN, que sirven para delimitar el punto a partir del cual comenzará la reacción de amplificación in vitro del ADN. Para empezar se desnaturaliza el ADN mediante altas temperaturas (al desnaturalizar el ADN se separan las cadenas de bases nitrogenadas), se baja la temperatura para que las cadenas de ADN separadas se unan a los primers. Aquí se añade la enzima para que las cadenas de ADN se unan a la enzima Taq ADN polimerasa y es entonces que replica el ADN. Finalmente se repiten todos estos pasos obteniendo más copias del ADN original.

La electroforesis de ácidos nucleicos es una técnica para la separación de moléculas de ADN que se realiza después del PCR. A las muestras de PCR se les añade un colorante para que sean más densas que el buffer que se usa en el proceso. Se hace en un gel de agarosa con pequeños orificios en donde se colocan las muestras de PCR, éste gel se sumerge en una cámara con buffer, se enciende la fuente de poder para que haya una diferencia de potencial, y así hacer que el ADN migre hacia la carga positiva, dado que el ADN tiene carga negativa. Las moléculas más grandes se quedarán cerca de los orificios donde colocamos las muestras de PCR, mientras que las más pequeñas podrán avanzar con mayor facilidad y se encontrarán más lejos de los orificios. El gel se tiñe con bromuro de etidio, se enjuaga y más tarde este gel es expuesto a rayos UV en una cámara conectada a una computadora donde se pueden observar los resultados. El programa solamente guarda las imágenes captadas por la computadora y este puede someterlas a diferentes modificaciones como un cambio de color.

El siguiente paso fue cuantificar la biopelícula que formó cada cepa. Para ello cada cepa se transformó y después cada una se dejó crecer toda una noche en tubos de ensayo. El medio de cultivo que pusimos fue de dos tipos, una sola cepa fue crecida en glucosa y también en arabinosa, y así sucesivamente con todas las 20 estudiadas.

Se preparó una dilución 1:100 en 200 µl de medio en un pozo de placa de Elisa. Se incubó en condiciones determinadas para después hacer la lectura de la densidad óptica a 620 nm (la cual mide el grado de absorción de luz del elemento óptico tomando en cuenta la unidad de distancia y

la longitud de onda). Después de medirlo se aspira el cultivo del pozo lavándolo 3 veces con 200 µl de PBS (un buffer hecho de fosfato y cloruro de sodio).

Más tarde se fija la biopelícula con 200 µl de metanol durante 15 min, de vacío. Después de dejarlo secar 10 min se tiñe con cristal violeta (200 µm a 2%) durante otros 10 min. Se vacía y se enjuaga para dejarlo secar durante 15 min. Con 200 µl al 33% de ácido acético se resolubiliza durante 15 min. Y finalmente se lee la densidad óptica a 570 µm.

3.-OBJETIVO

Evaluar 20 cepas de *E. coli* para conocer si en su ADN, más específicamente en los genes *pga*, se encuentra la secuencia de inserción *IS1*. También se determinó si cada cepa produce biopelícula.

4.-HIPÓTESIS

Ninguna cepa de *E. coli* tendrá la secuencia de inserción ya que esta solo la posee la cepa MC4100.

5.-PROCEDIMIENTO

Las cepas que utilizamos fueron las siguientes. Se caracterizaron tanto cepas para trabajo experimental de laboratorio, como patógenas de cuadros clínicos.

:

| | |
|------------------------|--------------------------------|
| 1.- <i>E. coli</i> 37* | 11.- 312A* |
| 2.- <i>E. coli</i> 17* | 12.- 331ALb* |
| 3.- <i>E. coli</i> 31* | 13.- UPEC F11 |
| 4.- <i>E. coli</i> 13* | 14.- EHEC 1240 |
| 5.- BW silvestret | 15.- ETEC 1337 |
| 6.- AJW silvestre | 16.- EHEC EDL |
| 7.- MI5 PREP4 | 17.- CSRA |
| 8.- BL21 | 18.- <i>E. coli</i> DH5α (24A) |
| 9.- 41 3** | 19.- MC4100is1 |
| 10.- UPEC 1131 | 20.- MC4100 |

*Aislados clínicos de diarreas

UPEC: *E. coli* uropatogénica

EHEC: *E. coli* enterohemorrágico

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica (diarrea)

5.1.-- De las 20 cepas de *E. coli* cultivadas tomamos una colonia aislada de cada una y la suspendimos en agua dentro de tubos de Eppendorf. En otros tubos, realizamos la mezcla de PCR.

5.2.- Más tarde añadimos a cada tubo de Eppendorf las dos mezclas y metimos éstos en la máquina de PCR.

5.3.-Terminado el proceso de PCR procedimos a preparar la prueba de electroforesis, hicimos el gel de agarosa y pusimos en los pequeños orificios de este, las muestras ya sometidas al PCR, fueron expuestas a rayos UV para revelar los resultados.

5.4.- Se hizo la cuantificación de la biopelícula que produce cada cepa, una muestra de cada una de las cepas se puso a crecer en glucosa y otra en arabinosa para poder comparar la biopelícula que se produce bajo la influencia de cada una. Después se midió la biopelícula para comprobar si la cepa MC4100 que contiene la secuencia de inserción produce más que las demás cepas, menos que ellas, o ninguna biopelícula.

6.-RESULTADOS

Las cepas 2,3,5,6,7,8,9,10,13,15,16,17,18, 19 y 20, fueron positivas para la presencia del gen *pgaA* por PCR. Realizamos dos veces el experimento por lo que podemos decir que las cepas ya mencionadas no contienen la secuencia de inserción a excepción de la número 19, ya que ésta es con la que trabajó el Dr. Oropeza con anterioridad. Las bandas electroforéticas fueron comparadas con las del marcador molecular.

Las cepas que mostraron una mayor formación de biopelícula fueron: 5, 6, 7, 17 y la 20. La biopelícula que mostró una formación mayor a las demás fue la cepa: MI5 PREP4 (Nº 7).

7.-CONCLUSIONES

La formación de biopelículas bajo el regulador RcsC depende de los genes *pga*. En una cepa donde la secuencia de inserción *IS1* se encuentra corriente arriba de los genes *pga*, no se produce biopelícula. No todas las cepas de *E. coli* presentaron los genes *pga*.

8.-BIBLIOGRAFÍA

<http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis>

http://es.wikipedia.org/wiki/Amplificaci%C3%B3n_gen%C3%A9tica

Harrison, Joe J.; Turner, Raymond J.; Marques, Lyriam L.R. y Ceri, Howard; Investigación y ciencia; Marzo 2006.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Biopel%C3%ADcula>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>

www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/porcinosenfermedades/escherichia-coli.htm

www.medicinabuenaaires.com/revistas/vol66-06/Supl-3/v66-s3-33-36.pdf

<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/colaba.html>