

El papel del ribosoma en la resistencia cruzada inducida por estrés

Jesús Mato Boado

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade de Vigo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Esta redacción es la memoria del proyecto final del Máster en Biotecnología Avanzada, realizado en el grupo de investigación PRONAMAR, perteneciente al departamento de Química Fundamental de la UDC, bajo la tutoría de:

- Dr. Antón Vila Sanjurjo
- Dr. Carlos Jiménez González
- Dr. Jaime Rodríguez González

Los títulos del proyecto en inglés y en gallego son los siguientes:

- Role of the ribosome on stress induced cross resistance
- O papel do ribosoma na rsistencia cruzada mediada polo estrés.

Índice de contenido

1. Introducción.....	3
Estrés bacteriano.1,2.....	3
Fase estacionaria.2,3.....	3
Choque térmico.1,2,4,5.....	4
Relación entre el estrés bacteriano y la resistencia cruzada.....	5
El papel de los ribosomas en la resistencia cruzada inducida por el estrés.....	5
2. Objetivos.....	8
3. Experimentación.....	9
Ensayos enzimáticos beta-galactosidasa.....	9
Objetivos.....	9
Material y métodos.....	9
Procedimiento.....	9
Resultados y conclusiones.....	10
2. Expresión de GFPmut 3.1 en E.coli JM101 y JM101 KsgA19 con arabinosa como sistema de inducción.....	16
Objetivos.....	16
Material y métodos.....	17
Procedimiento.....	17
3.1.2 Estudios de crecimiento celular.....	24
Objetivos.....	24
Material y métodos.....	24
Procedimiento.....	25
Resultados y conclusiones.....	25
4. Bibliografía.....	31

1. Introducción.

Estrés bacteriano.^{1,2}

El estrés bacteriano puede ser definido como una cascada de alteraciones en la expresión génica y en la actividad proteica, con el propósito de sobrevivir a cambios rápidos y potencialmente dañinos. Conocer y entender los mecanismos usados por los microorganismos durante la respuesta al estrés es crucial si se quiere poder controlar a éstos en sus nichos ecológicos naturales.

Las cepas de *E. coli* usadas en el laboratorio han sido seleccionadas para tener unas tasas de crecimiento y eficiencia en la traducción máximas. Lo que quiere decir que durante la fase logarítmica de crecimiento la mayoría de los ribosomas están formando polisomas y se encuentran en alguna de las fases de la traducción. Estudios recientes han arrojado luz sobre los cambios estructurales y funcionales sufridos por la maquinaria de traducción en *E. coli* durante el choque de calor y de frío y la entrada en fase estacionaria. En estas situaciones, tanto la composición como la partición de esta maquinaria en los diferentes grupos de ribosomas celulares, son modificados. Como resultado, la capacidad de traducción de la célula se altera drásticamente.

Fase estacionaria.^{2,3}

Cuando un cultivo de *E.coli* está creciendo logarítmicamente y se acaba un nutriente esencial en el medio, entra en la llamada fase estacionaria de crecimiento, en la que, la composición, la estructura y la función de las partículas ribosomales, se alteran dramáticamente. Las células en fase estacionaria son muy resistentes a diferentes tipos de estrés ambiental. Esta resistencia cruzada se produce en gran medida por la unión del factor de transcripción σ^S a la ARN polimerasa. La expresión de *rpoS*, el gen que codifica σ^S , está regulada por la guanosina 3',5'-(bis)difosfato (ppGpp), que se acumula después de diferentes tipos de estrés nutricionales.

En *E. coli*, existe una correlación entre el número de ribosomas funcionales y

la viabilidad celular durante la fase estacionaria. La entrada en la fase estacionaria provoca una fuerte disminución de la capacidad de traducción de las células de *E. coli*. La viabilidad celular se reduce en un 50% del valor de la fase logarítmica durante los primeros 5 o 6 días en la fase estacionaria. Después de esta disminución inicial de la viabilidad, hay una rápida degradación de los ribosomas y una caída dramática de la viabilidad celular a menos del 10% del valor que tiene durante la fase logarítmica. La degradación del ribosoma durante la fase estacionaria es un ejemplo extremo de la alteración en la capacidad de traducción de la célula (existiendo otros mecanismos como la variación en el ratio de proteínas ribosómicas, la metilación del factor EF-Tu, la conversión de los monómeros 70S en dímeros 100S...).

Choque térmico.^{1,2,4,5}

Se ha sugerido que el ribosoma juega un papel importante como sensor de la temperatura en la célula. Sin embargo, el mecanismo subyacente para esta actividad ribosomal sigue siendo desconocido. Lo que está claro, sin embargo, es que la función y la composición de la maquinaria de traducción están afectadas de forma dramática por la temperatura, en particular, por los cambios descendentes de temperatura. Cuando las células de *E. coli* se alejan de la temperatura óptima de crecimiento (37°C), a temperaturas por debajo de 20°C pero por encima de la temperatura mínima de crecimiento de 7.5 a 7.8°C, entran en un período de adaptación al frío o aclimatación. La síntesis de proteínas se inhibe para todas las proteínas excepto para un subconjunto de proteínas, nombrado factores de choque frío (CSF).

Parece que la síntesis de los CSF es esencial para la recuperación del crecimiento a temperaturas bajas al final de dicha aclimatación (alrededor de 4 - 6 horas después de la reducción de la temperatura). En este punto, la situación se invierte y la síntesis de proteínas se reanuda, mientras que la de los CSF se inhibe. Mientras las funciones específicas de la mayoría de los CSF siguen siendo poco claras, se ha propuesto que algunos de ellos actúan sobre el aparato de traducción.

Los CSF que se conoce que afectan directamente a la función ribosomal en el frío son PY, cuya función probablemente sea la de almacenar los ribosomas como monómeros 70S, cuando la célula necesita un número reducido de ribosomas y los tres factores de iniciación.

Relación entre el estrés bacteriano y la resistencia cruzada.^{6,7}

A diferencia de algunas especies bacterianas que pueden diferenciarse en estructuras resistentes tales como endosporas y mixosporas, la mayoría de las bacterias, incluyendo muchos patógenos humanos y animales, no se someten a tales cambios morfológicos en respuesta al estrés ambiental. Estas bacterias pueden, sin embargo, adquirir un estado de alta resistencia como una consecuencia de la exposición al estrés. Por ejemplo, cuando en fase logarítmica células de *E. coli* agotan un nutriente esencial en el medio, entran en la llamada fase estacionaria, en el que las células se vuelven muy resistentes a diferentes tipos de estrés ambiental.

Dado que en sus entornos naturales, las bacterias rara vez se encuentran con condiciones que permiten el crecimiento exponencial, la comprensión de los mecanismos detrás de la resistencia cruzada inducida por estrés es de suma importancia para el control de las poblaciones bacterianas. En particular, la epidemiología y la virulencia de muchos seres humanos, animales, y patógenos de las plantas, parece estar relacionada con la resistencia cruzada inducida por el estrés. Se cree que los fenómenos tales como la formación de biopelículas, son la consecuencia directa de la exposición al estrés ambiental. Por lo tanto, la comprensión de las estrategias de supervivencia de las bacterias tiene importantes implicaciones médicas y económicas.

E. coli es el organismo del que existe la imagen más detallada de fisiología celular y se ha usado comúnmente como un modelo para el estudio de la síntesis de proteínas bacterianas y respuesta al estrés. Investigaciones previas con este organismo han descubierto un vínculo importante entre el ribosoma (Vila-Sanjurjo,

inédito) y el proceso de resistencia cruzada inducida por estrés.

El papel de los ribosomas en la resistencia cruzada inducida por el estrés.^{8,9}

Debido a su papel central en la expresión génica, el ribosoma bacteriano es uno de los principales objetivos para los antibióticos. Por ello, la comprensión de la estructura y la función ribosomal tiene amplias implicaciones para la salud humana. Se han hecho estudios que señalan el importante papel que desempeñan los ribosomas durante la respuesta a diferentes tipos de estrés.

La existencia de residuos en el rRNA altamente conservados aboga por un importante papel de estas bases en el desempeño de la actividad ribosomal. A pesar de desempeñar un rol importante en el ribosoma se ha observado que existen residuos que pueden aceptar cambios de bases, con, a lo sumo, modestos efectos en la viabilidad celular.

Ejemplos de este tipo de residuos, altamente conservados y que aceptan cambios de base (sin producir unos efectos drásticos en el comportamiento celular), son los residuos A794, G926 y A1519 del gen 16S RNA. Se han aislado tres mutaciones en el ARN ribosomal que confieren resistencia al antibiótico kasugamicina utilizando una cepa de *Escherichia coli* en la que todos del rRNA se transcriben a partir de un operón *rrn*. Éstas son las mutaciones A794G, G926A y A1519C.

Estudios de mutagénesis dirigidas muestran que prácticamente todas las mutaciones en estos tres sitios confieren resistencia a la kasugamicina y tienen efectos muy leves sobre el crecimiento celular. Como el residuo A1518 también es modificado post transcripcionalmente por la metilasa *ksgA* en las células de tipo salvaje, se incluye esta posición en el análisis de mutagénesis. Se sabe que la ausencia de modificaciones post-transcripcional en los residuos A1519 y adyacente A1518, en cepas que carecen de la metilasa *KsgA* funcional, producen un fenotipo de resistencia a kasugamicina. Las mutaciones en A1519 confieren resistencia kasugamicina y tienen un menor efecto sobre el crecimiento celular, mientras que las mutaciones en 1518 no confieren resistencia y aumentan

significativamente el tiempo de duplicación de las células.

Curiosamente, el único sitio donde los cambios de base afectan seriamente a la función del ribosoma, es el residuo A1518. La mutación A1518U es muy perjudicial y los transformantes no se pueden mantener de una manera estable, ni en la cepa de tipo salvaje ni en la KsgA19. Los plásmidos que contienen la mutación A1518G producen transformantes estables en ambas cepas. La mutación A1518C muestra el fenotipo menos perjudicial de los tres, mostrando unas tasas de crecimiento muy bajas. En contraste con la A1518 mutante, virtualmente todos los cambios de base en el adyacente A1519, así como en A794 y G926, dieron como resultado células con poblaciones homogéneas de ribosomas mutantes en la cepa salvajes. Por otra parte, las mutaciones en estos tres sitios, producen células con tasas de crecimiento ligeramente más altas en relación a las células de tipo salvaje, lo que indica que las mutaciones no afectan significativamente a la función ribosomal.

La expresión de las mutaciones en A1518/A1519 en una cepa deficiente de la metilasa ksgA tiene efectos divergentes sobre el fenotipo, lo que sugiere que la identidad de las bases, en ambas posiciones, afecta a la metilación en el sitio adyacente.

Los residuos A794 y G926 están protegidos de modificaciones químicas por la kasugamicina y el ARNt, y tienen un papel en la iniciación de la síntesis de proteínas. Asimismo, a pesar de ser residuos universalmente conservados y de la importancia funcional que tienen, la identidad de las bases no es crítica para la función ribosomal.

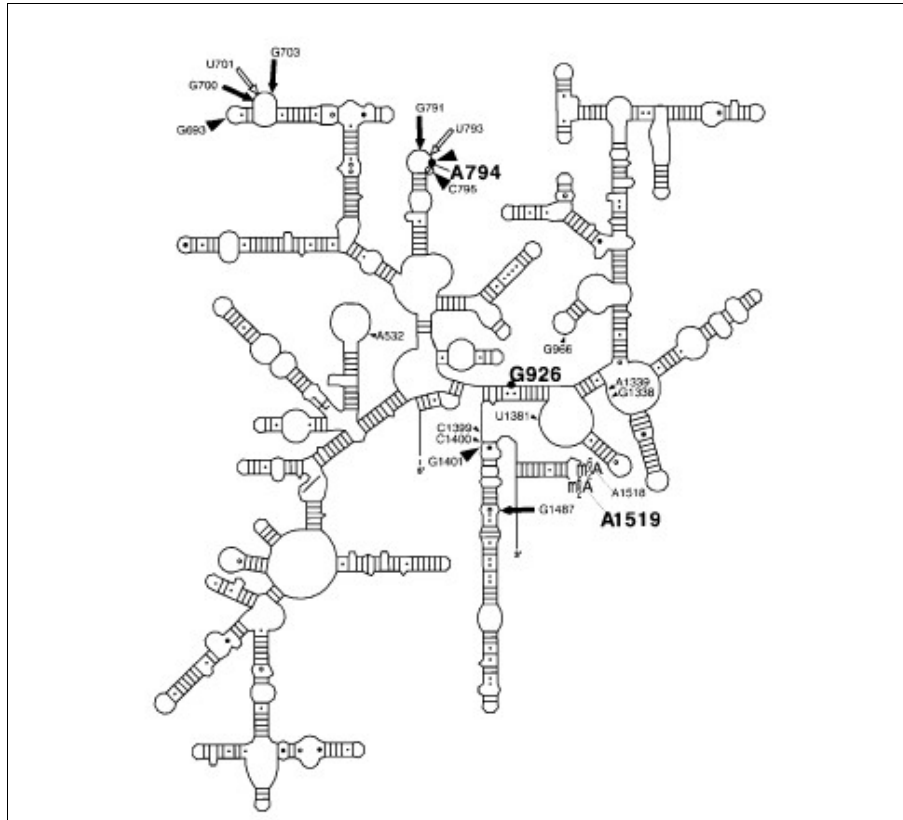


Figura 1. Estructura secundaria del ARN ribosómico 16S. Las mutaciones que confieren resistencia a la kasugamicina está en negrita.

La expresión de las mutaciones en una cepa deficiente de la metilasa KsgA19 tiene marcados y divergentes efectos sobre el crecimiento celular. Por ejemplo, la combinación de *ksgA19* y, A1519C o G926A dieron como resultado un aumento del tiempo de duplicación en relación con la de tipo salvaje.

Por último, decir que la falta de modificaciones post-transcripcionales en el loop que contiene los residuos A1518 y A1519, no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las células que poseen la mutación A794G. Estos resultados indican que la acción de la *ksgA* metilasa modula el efecto que, algunas de las mutaciones del ARN ribosómico, tienen sobre la función del ribosoma.

Todos los cambios de base en cada uno de los tres sitios (794, 926, y 1519) confieren resistencia a la kasugamicina. Algunos de los cambios de bases contruidos in vitro han conferido niveles más altos de resistencia que las

mutaciones originales obtenidas por selección genética.

Se ha observado recientemente que las células de *E. coli* que llevan mutaciones en G926 y las *KsgA* deficientes muestran un fenotipo sensible al frío. Dicha sensibilidad parece que se relaciona con el tiempo de permanencia en la fase estacionaria (Vila-Sanjurjo, no publicado). Mientras que estos mutantes pueden crecer normalmente en el frío después de un cambio descendente de temperatura, durante el crecimiento logarítmico a 37°C, se observa que pierden gradualmente la viabilidad a bajas temperaturas después de un cultivo prolongado en fase estacionaria (Villa-Sanjurjo, no publicado). Estas observaciones identifican el ribosoma como un elemento crítico para la inducción de resistencia cruzada durante un choque de frío en la fase estacionaria y establecen las mutaciones en el G926 y los *KsgA* deficientes como modelos válidos para el análisis de este fenómeno .

2. Objetivos.

El objetivo a largo plazo de este proyecto es profundizar en el estudio del papel del ribosoma en el desarrollo de resistencia cruzada en *Escherichia coli*, mediante el estudio de los fenotipos de las cepas JM101 SDL wild type y *KsgA19*, con las diferentes mutaciones, mencionadas anteriormente, en los residuos del ARN ribosómico, bajo condiciones de estrés bacteriano (fase estacionaria y choque térmico).

Para poder realizar dicho estudio se necesita un método que nos permita calcular o estimar la tasa de traducción. Para ello se ha intentado poner a punto un ensayo basado en el método de Miller y se ha construido un plásmido con un sistema de señalización que nos permitirá estudiar las bacterias sin necesidad de lisarlas y de una manera individual.

3. Experimentación

Ensayos enzimáticos beta-galactosidasa.

Objetivos.

La finalidad de estos experimentos es la optimización de un método para poder realizar futuros estudios en la actividad ribosómica bajo estrés ambiental. El protocolo diseñado se basa en el método de Miller¹² y en su adaptación en placas de 96 pocillos.^{11,13}

Material y métodos.

Cepas:

Se han utilizado las cepas JM101 SDL y JM101 SDL KsgA19 de *E.coli*. Ambas cepas son resistentes a kanamicina, antibiótico usado para la selección. Además la cepa *Ksg A19* es resistente a la kasugamicina.

Medios y buffers:

Para la realización de estos experimentos se ha utilizado el medio mínimo M9 con kanamicina como antibiótico de selección Y buffer Z (16.1 g/l Na₂HPO₄·7H₂O, 5.5 g/l NaH₂PO₄·H₂O, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l MgSO₄·7H₂O, ajustar el pH a 7).

Para el procedimiento de la lisis celular se ha usado un reactivo comercial: **Cell Lytic B (sigma)**.

Procedimiento.

Preparación de alícuotas:

En primer lugar se sembraron, en placas de LB agar con kanamicina, células de ambas cepas (conservadas en glicerol a -80°C) y se dejaron crecer durante toda la noche, a 37°C. De estas placas, se seleccionaron 8 colonias diferentes de

cada cepa y se cultivaron, por separado, en LB líquido con kanamicina. Una vez alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, estos cultivos se alicuotaron y se disolvieron (1:1) con glicerol 20%, para poder conservar las alícuotas a -80°C.

Protocolo:

En todos los ensayos se parte de cultivos realizados en tubos de ensayo con 3mL de medio mínimo M9 con una dilución 1:100 de células provenientes de las alícuotas conservadas a -80°C, en una incubadora con agitación a 37°C.

Se realizan ensayos en dos fases diferentes del crecimiento celular, en fase estacionaria y en fase logarítmica.

Para la fase logarítmica, se añaden 180uL de medio mínimo (con kanamicina) y 20uL de cultivo overnight a cada pocillo y se dejan crecer las células durante 2 horas, a 37°C y a 700 rpm. Una vez transcurridas estas dos horas, se procede de la misma manera que con la fase estacionaria: se añade primero la kasugamicina, después el IPTG y se deja incubar durante otras dos horas, a 37°C y con agitación.

Para **lisar** las células se añade 20uL de cultivo y 20uL de buffer de lisis a cada pocillo, se mezcla bien (mediante pipeteo) y se deja actuar durante 10 minutos en hielo..

Para el Ensayo enzimático beta-galactosidasa se realiza lo siguiente: en cada pocillo se añaden 25uL de lisado de 100uL de buffer Z y 25 uL de ONPG (0,67 mg/mL concentración final). Una vez se han añadido todos los reactivos, se mide la absorbancia a 420nm durante 1 hora cada 5 minutos.

Los valores de actividad beta-galactosidasa han sido normalizados a la densidad celular del cultivo.

Resultados y conclusiones.

Con la realización de estos ensayos en placas de 96 pocillos se pretende simplificar el método, reducir los errores y aumentar el número de condiciones a estudiar dentro de un mismo ensayo.

En primer lugar se muestran resultados conseguidos en la fase logarítmica.

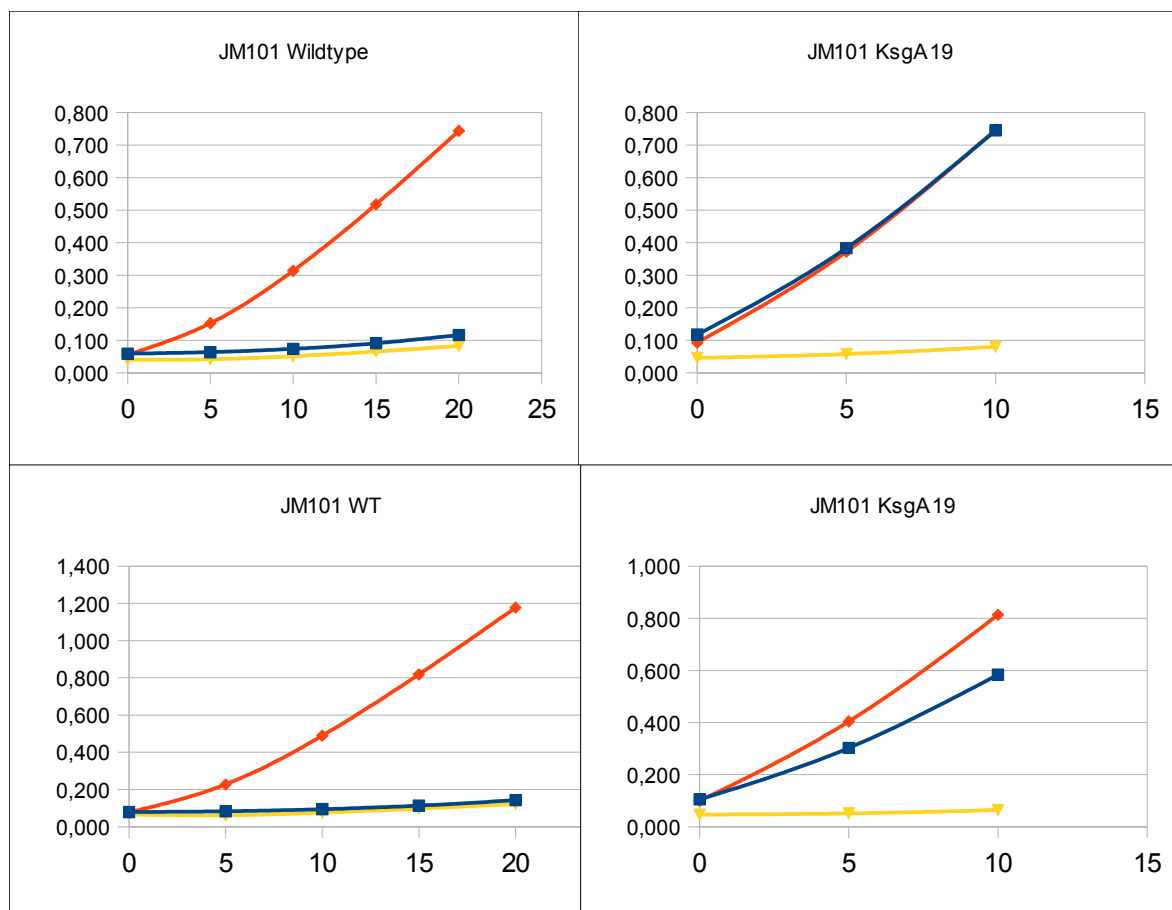


Figura 2. Las 4 gráficas muestran la actividad beta-galactosidasa de las muestras en fase logarítmica después 4 horas de crecimiento y tras 2 horas de inducción con 100ug/mL de Ksg y 1mM de IPTG. En azul, muestra con Ksg e IPTG, en naranja, muestra con IPTG y en amarillo el control. En el eje Y se expresa la absorbancia a 420nm, y en el eje X el tiempo en minutos.

Estas gráficas representan ensayos con 4 horas de crecimiento y dos horas de inducción. Se hicieron ensayos con tres clones diferentes de cada cepa y en todas y cada una de las gráficas, los perfiles han sido los mismos, por lo que en fase logarítmica, con este protocolo, se ha conseguido que el ensayo sea reproducible. Los resultados obtenidos son coherentes, ya que solo existe

inhibición en la cepa salvaje y éstos coinciden con los conseguidos por Antón Vila y su equipo¹⁰, habiendo inhibición de la traducción solo en las cepas salvajes.

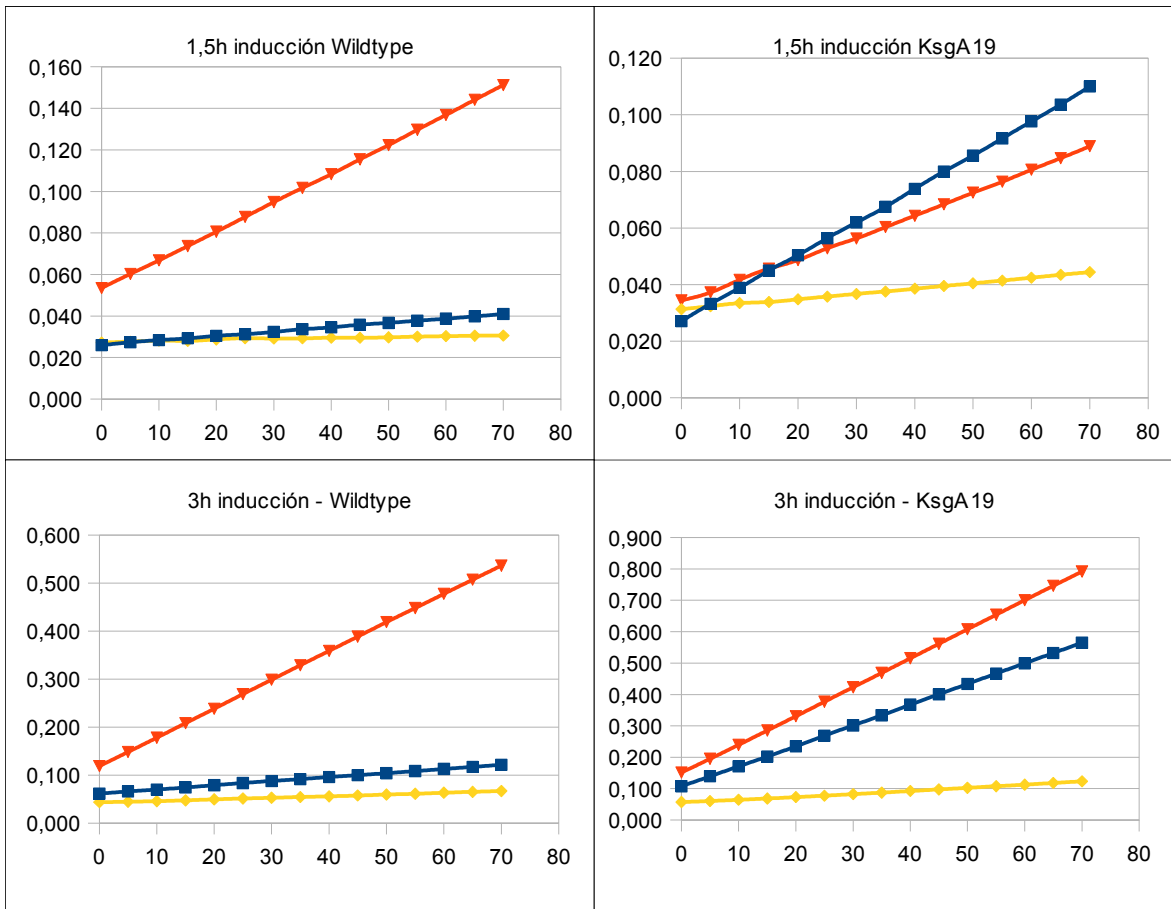


Figura 3. Las 4 gráficas muestran la actividad beta-galactosidasa de las muestras en fase logarítmica, 1,5 horas de crecimiento y tras 1,5 y 3 horas de inducción con 100ug/mL de Ksg y 1mM de IPTG. En azul, muestra con Ksg e IPTG, en naranja, muestra con IPTG y en amarillo el control. En el eje Y se expresa la absorbancia a 420nm, y en el eje X el tiempo en minutos.

En estas cuatro gráficas se muestran ensayos en fase logarítmica. Los cultivos que han tenido más tiempo de inducción (3 horas) tienen más actividad relativa y las muestras inducidas presentan más actividad que las que no lo fueron. Además, las muestras de la cepa salvaje que han sido incubados con kasugamicina están completamente inhibidas.

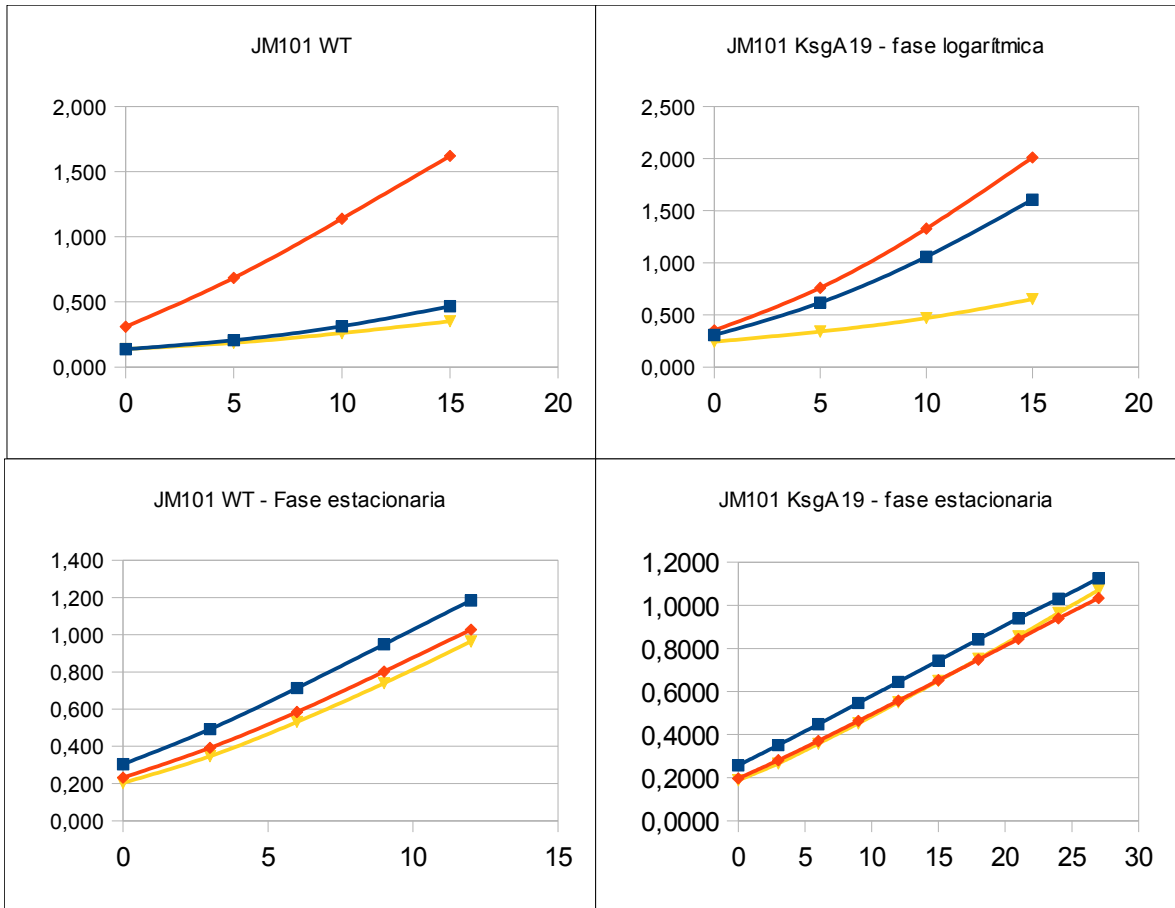


Figura 4. Las dos gráficas superiores muestran la actividad beta-galactosidasa de las muestras en fase logarítmica, 1,5 horas de crecimiento y 3 horas de inducción con 100ug/mL de Ksg y 1mM de IPTG. Las dos gráficas inferiores muestran ensayos en fase estacionaria. En azul, muestra con Ksg e IPTG, en naranja, muestra con IPTG y en amarillo el control. En el eje Y se expresa la absorbancia a 420nm, y en el eje X el tiempo en minutos.

Los ensayos que representan estas gráficas, se llevaron a cabo del mismo modo que el mostrado en la figura anterior, pero esta vez, se han comparado con la fase estacionaria. La fase logarítmica vuelve a mostrar el mismo perfil, y de nuevo, los resultados son reproducibles. No obstante, en fase estacionaria parece que el sistema de inducción sigue sin funcionar correctamente, mostrando todas las muestras y el control, la misma actividad relativa.

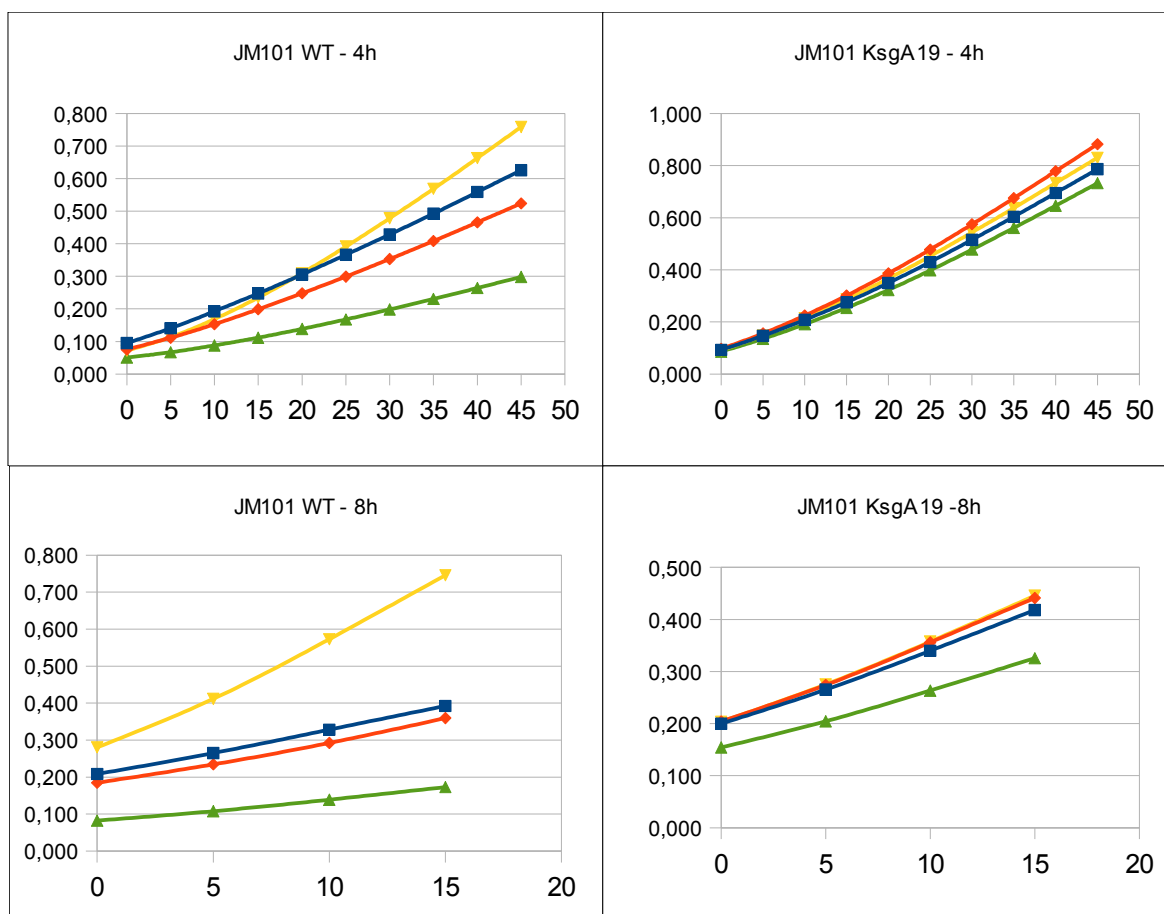


Figura 5. Las dos gráficas superiores muestran ensayos realizados en fase logarítmica con 4 horas de inducción y las dos inferiores con 8 horas de inducción. En azul, 300 ug/mL ksg, en naranja 100 ug/mL ksg, en amarillo IPTG, y en verde sin nada. En el eje X se representa el tiempo (min) y en el Y la absorbancia a 420.

En este ensayo la etapa de crecimiento y la inducción se realizaron a 18°C. Se hicieron ensayos a las 4 horas y a las 8 horas de inducción. Los resultados, de 8 clones diferentes para cada cepa, han sido similares a los obtenidos a 37°C. En fase estacionaria siguen existiendo problemas, parece no haber diferencias entre las diferentes muestras, hayan sido, o no, inducidas por IPTG. Sin embargo, en fase logarítmica, se obtienen unos resultados claros, mostrando la inhibición sufrida por la cepa salvaje en la tasa de traducción en los cultivos a los que se le ha añadido kasugamicina. En la introducción se ha hablado de todos los cambios

que sufre la célula cuando se encuentra bajo condiciones de estrés, como en la fase estacionaria, y claramente, a pesar de no saber qué es lo que realmente está pasando, algo está influyendo para que los resultados tengan una variabilidad tan alta y para que el sistema de inducción no funcione correctamente.

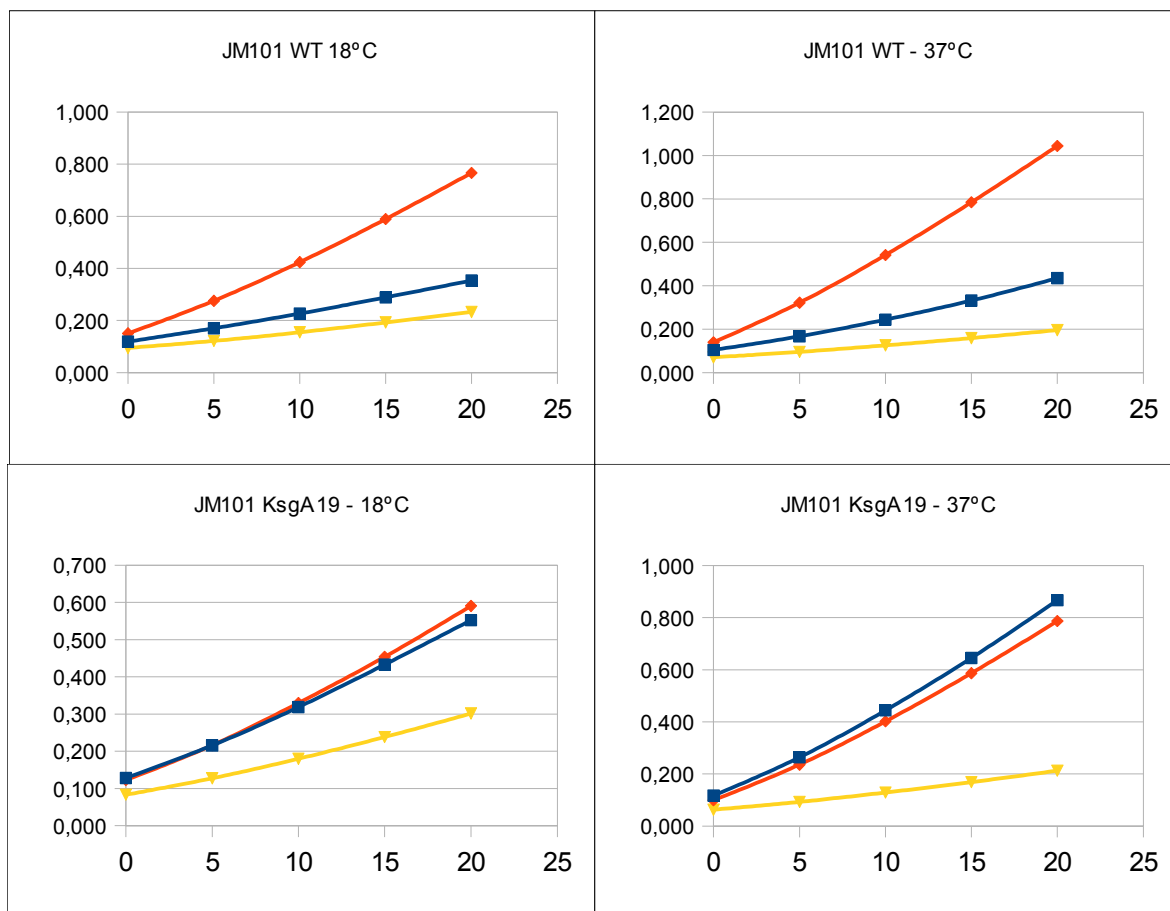


Figura 6. Choque térmico. 1,5 horas crecimiento a 37°C y después 1,5 horas inducción a 18°C (izquierda) y a 37°C (derecha). En azul 300 ksg, en naranja IPTG, y en amarillo el control, sin IPTG ni Ksg.

Por último, se muestra un ensayo en el que se sometió a las células a un choque térmico, bajándose la temperatura de 37°C a 18°C en la fase de inducción. Se han obtenido los mismos resultados para cada uno de los cuatro ensayos realizados con clones diferentes de cada cepa, quedando de manifiesto la reproducibilidad del método. Por otro lado, no se observan diferencias entre las que han sido sometidas al choque térmico y las que no, a no ser por un leve aumento de la actividad relativa en las que no ha sufrido el choque térmico.

Todos los resultados obtenidos en los ensayos realizados en cultivos que estaban en fase estacionaria, no han sido claros ni reproducibles, mostrando perfiles diferentes de inhibición. No sabemos qué es lo que ocurre durante esta fase para que no se pueda medir la tasa de traducción inducida por IPTG.

Sin embargo, en fase logarítmica, hemos conseguido que los resultados tengan una alta reproducibilidad y que coincidan con los conseguidos previamente por Antón Vila usando un protocolo diferente, por lo que se puede decir que, tanto el crecimiento y la inducción realizada en placas de 96 pocillo, como el nuevo método de lisis, usando el reactivo de sigma, funcionan.

Independientemente de que los resultados sean o no concluyentes, **existen diferencias claras entre cómo se comportan las células durante la fase logarítmica y la estacionaria. Durante la fase estacionaria la cepa salvaje parece mostrar una resistencia a la kasugamicina que no muestra cuando no está sometida a estrés durante la fase logarítmica.** Siendo estos resultados preliminares, habrá que seguir realizando ensayos y ver si este suceso se repite con cierta frecuencia para que los resultados tengan significado estadísticamente.

2. Expresión de GFPmut 3.1 en *E.coli* JM101 y JM101 KsgA19 con arabinosa como sistema de inducción.

Objetivos.

La finalidad de estos experimentos es la construcción de un plásmido que contenga un sistema de señalización diferente al lacZ, GFPmut3.1, y que posea, como sistema de inducción, la arabinosa. Con este plásmido se transformarán las cepas JM101 y JM101 *KsgA19* de *E. coli* para poder repetir el estudio realizado y observar las diferencias entre ambas cepas en condiciones de estrés.

La utilización de este sistema de señalización e inducción nos permitirá realizar todos los ensayos realizados con anterioridad, sin la necesidad de lisar las células, por lo que se podrán estudiar, en un mismo ensayo, diferentes

tiempos de inducción y, a la vez, medir la tasa de crecimiento. Además de estas ventajas, con este sistema se podrán realizar estudios de cómo se comportan las células individualmente dentro una colonia o cultivo.

Material y métodos.

Vector de expresión:

Se usa un vector llamado **SDL**(referencia) que presenta:

- Gen lacZ inducible por IPTG.
- Contiene el gen resistente a la kanamicina.

El segundo vector utilizado ha sido un plásmido derivado de **pBAD**, que tiene las siguientes características:

- Promotor PBAD inducible por arabinosa.
- Contiene el gen de resistencia a la ampicilina.

Procedimiento.

En primer lugar tenemos que amplificar el gen GFPmut3.1 que queremos insertar dentro de SDL. Para ello se diseñan unos primers que: sirvan para amplificar el gen GFPmut3.1 del vector pFU34 y que, además, el producto generado contenga secuencias en 5' y en 3' complementarias al plásmido SDL. Para ello se han utilizado las siguiente secuencias:

```
GCGGATAACAATTTACACAAAGGAAACACCCATGAGCACAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGC  
TTGAGGACGCATCTGGTTCCGGTAGCGGTGGTTCTATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGT  
CCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTG  
ATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACT  
TGTCACTACTTTGCGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTTC  
AAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGCTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGAC  
ACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGA
```

AGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAA
CAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGAC
CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAA
TCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTG
GGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAACCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG. .

Se representa en negro la secuencia de SDL; en verde, el promotor *lacI*; en azul el linker GS (pJD779); en rojo el gen GFPmut3.1 (GenBank: JF796079.1) y en morado el gen *lacZ* de SDL. Los primer que se diseñaron fueron:

F-*lacI*-GS-GFP

5'-
CCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCATCTGGTTCCGGTAGCGGTGGTT
CT
ATGCGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGG - 3'

R-GFP-*lacZ*

5' -
CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC - 3'

Se realiza una prueba del primer paso de la *ciPCR* con la enzima *taq* polimerasa, con un gradiente de temperatura entre 45 y 70°C, para comprobar que la reacción funciona y qué temperatura de hibridación es la óptima..

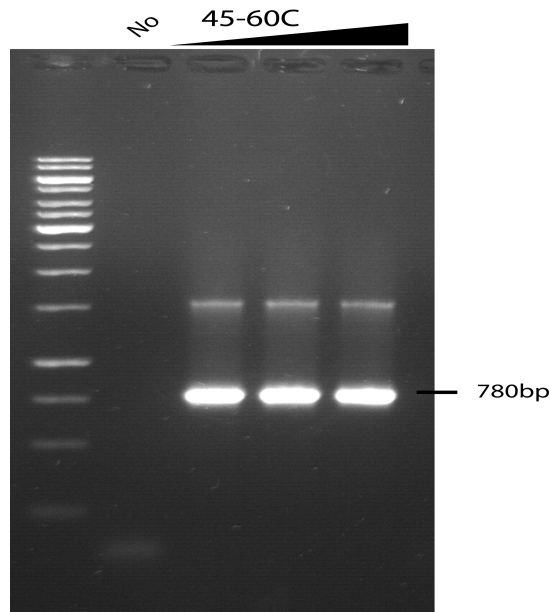


Imagen 1. Gel de agarosa 1%. Resultados PCR con los primers F-lacI-GS-GFP y R-GFP-lacZ. En la primera linea se cargo el Marker. En la segunda el control negativo, Y en la tercera, cuarta y quinta los productos de la reacción en orden ascendente de temperatura de hibridación.

Una vez se comprueba que la reacción funciona, como se muestra en la figura, se repite el primer paso de colony-PCR con la enzima Pfu polimerasa, para evitar posibles mutaciones que pueda introducir la taq, con una temperatura de hibridación de 60° y con un tiempo de elongación de un minuto. El producto de la PCR se ha purificado usando PCR Clean-up Kit (Sigma).

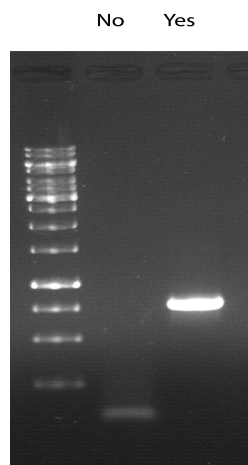


Imagen 2. Gel de agarosa 1%. En la linea 1, marker, en la linea 2, y en la linea 3 se cargó el producto de la PCR con una temperatura de hibridación de 60°C.

Como se muestra en la figura, ahora tenemos el inserto purificado para introducirlo en el plásmido SDL. El segundo paso de la colony-PCR consiste en la técnica overlap extension PCR cloning⁸. Un factor importante en esta técnica es el ratio vector inserto. En esta reacción se han usado 2uL de plásmido SDL-cl-lacZ y 5uL del inserto purificado para una reacción de 100 uL. Los ciclos y temperaturas usados han sido diseñados para este propósito por Antón Vila-Sanjurjo.

95°C 5 min

5X:

95°C 1 min,

70°C 30 sec,

60°C 30 sec,

72°C 9 min

20X:

98°C 30 sec,

70°C 20 sec,

60°C 20 sec,

72°C 9 min

25X:

98°C for 30 sec,

75°C 15 sec,

72°C 9 min

Una vez finalizada la reacción se digieren los productos con DpnI durante 6 horas a 37°C para eliminar los plásmidos que estén totalmente metilados y así, dejar solo los que han sido sintetizados durante la reacción de PCR. El producto digerido se utilizó para transformar, mediante choque térmico células de *E.coli* de la cepa JM101 SDL WT que previamente habían sido sometidas a sucesivos lavados con CaCl₂ para volverlas competentes. Estas células se sembraron en una placa de LB con kanamicina para seleccionar las que poseían el inserto.

Se obtuvieron alrededor de 30 colonias resistentes a ampicilina que se analizan mediante una colony-PCR usando los primers PCR-F-SDL y Seq-LacZ-R, un minuto de tiempo de elongación y con una temperatura de hibridación de 60°. Los primers usados son flanqueantes de la región donde se ha realizado el inserto.

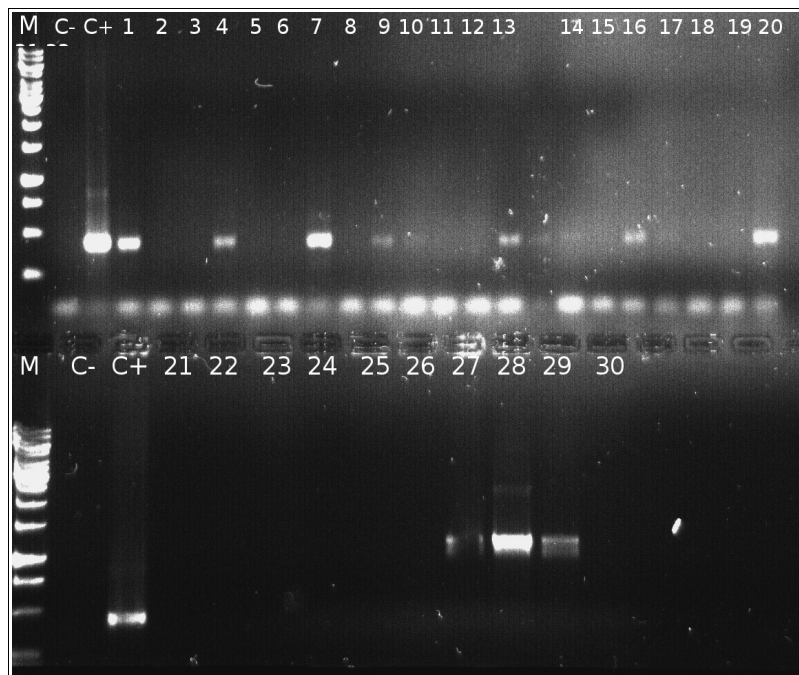


Imagen 3. Gel de agarosa 1%. Productos de colony PCR de las colonias transformadas con el plásmido SDL-GFP.

Las colonias que presentan un inserto del tamaño esperado (1150pb) (27, 28 y 29 como se muestra en la figura) se sembraron en placas de LB agar con kanamicina y se cultivaron “overnight”. Cada una de las colonias se cultivó en medio líquido LB con kanamicina y, con estos cultivos, se hizo una extracción del ADN plásmidico mediante extracciones fenol-cloroformo. El producto de PCR de las colonias 27, 28 y 29 se digirió con la enzima NdeI durante 1 hora a 37°C esperándose fragmentos de 469 y 698 pares de bases.

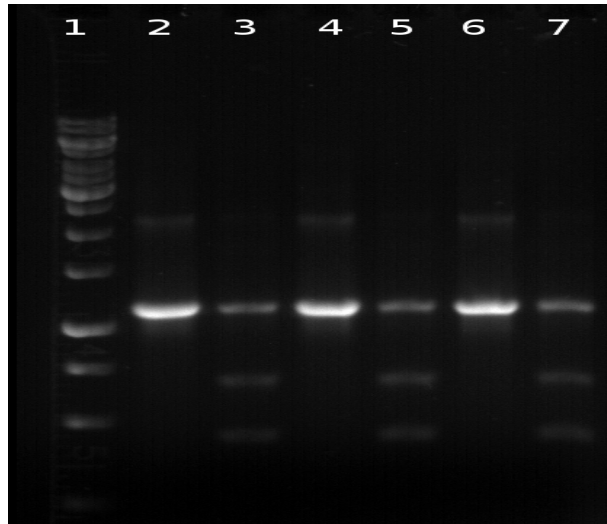


Imagen 5. Gel agarosa 1%. Digestión de las extracciones plasmídicas de las colonias 27, 28 y 29 Línea 1, Marker, línea 2, 4 y 6, plásmidos de las colonias 27, 28 y 29 respectivamente. Líneas 3, 5 y 7, plásmidos de las colonias 27, 28 y 29 digeridos con NdeI.

El análisis de restricción mostró que todas las colonias poseen el inserto correcto.

Partiendo de las mismas placas de donde se extrajo el ADN plasmídico, se cultivaron en medio líquido LB con kanamicina e IPTG (1mM), para inducir la expresión de GFPmut3.1. Se dejaron crecer durante 1,5 horas y cada uno de los cultivos se observó en un microscopio de epifluorescencia.

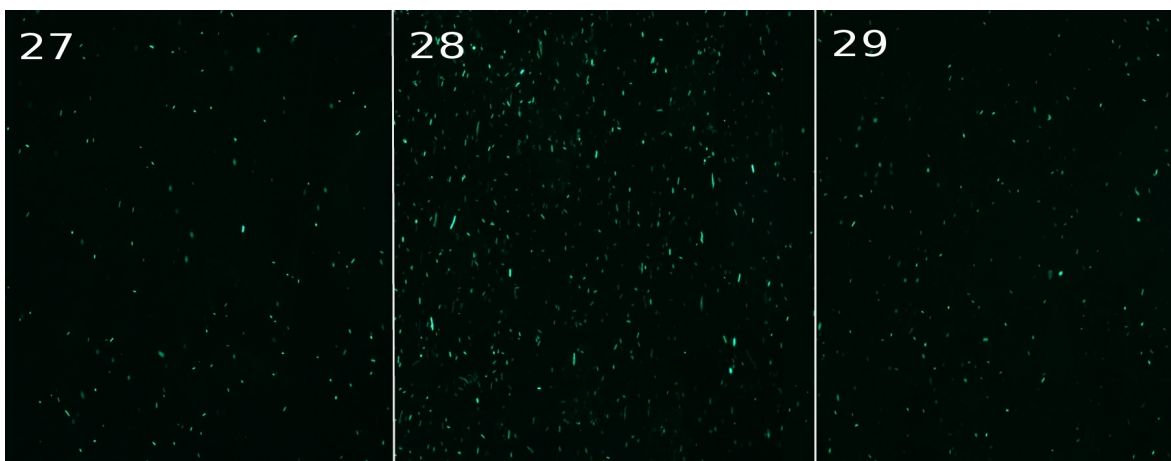


Imagen 6. Fotos de las células de las colonias 27, 28 y 29 tomadas con un microscopio de epifluorescencia.

En la imagen 6 se observa que las tres colonias transformadas presentan fluorescencia cuando son inducidas con IPTG (1mM), lo que demuestra que tanto la estrategia de clonación como la transformación han funcionado.

Una vez hemos insertado el gen GFPmut3.1 en SDL y hemos comprobado su funcionalidad, el siguiente paso es cambiar el sistema de inducción. Queremos que el sistema de inducción sea la arabinosa por lo que se insertará el gen en un plásmido derivado de pBAD, pBAD-Fvta, en el que sustituiremos el gen Fvta por el GFPmut3.1. Para ello se diseñan unos primers teniendo en cuenta la secuencia del gen que queremos insertar y la secuencia del plásmido. También hay que tener en cuenta donde queremos hacer el inserto en el plásmido para así eliminar el gen Fvta mediante la técnica overlap extension PCR⁸. A estos primers se les llamará pBADGFP-F y pBADGFP-R y su secuencia es la siguiente:

pBADGFP-F

5' -CGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAAGG - 3'

pBADGFP-R

5'- CGAATT CCAATG ACAACT CCG TCT TCC TTA TTT GTA TAG TTC ATC C -3'

Para extender nuestro producto se realiza una PCR con la extracción plasmídica de una de las colonias que poseían el inserto (27, 28 y 29), los primers pBADGFP-F, con una temperatura de hibridación de 50°C, y un minuto de tiempo de elongación. Como producto obtendremos el gen GFPmut3.1 con secuencias en 5' y 3' complementarias al plásmido pBAD con un tamaño de 882 pares de bases.

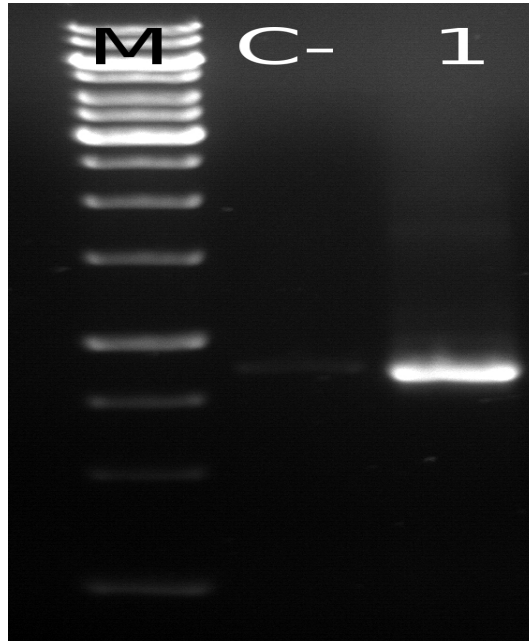


Imagen 7. Gel de agarosa 1%. En la primera linea se cargó el marker. En la segunda el control negativo, y en la tercera el producto de la PCR.

Con el producto pBADGFP-F y el plásmido pBAD-Fvta se hacen dos reacciones diferentes de overlap extension PCR:⁸

	A(uL)	B(uL)
Plásmido pBADFvta 2.2	0,5 (1:100)	0,5 (1:10)
Producto pBADGFP	5	5
dNTP's (10 mM)	4	4
MgCl ₂ (50 mM)	2	2
X5 Phusion HF Buffer	20	20
PFU pol	1	1
DdH ₂ O	64	73
Volumen total	100	100

Tabla1. Reactivos para las reacciones de Overlap Extension PCR con el inserto pBADGFP y el plásmido pBADFvta.

Una vez finalizada la reacción se digieren los productos con DpnI durante 6 horas a 37°C para eliminar los plásmidos que estén totalmente metilados y así, dejar solo los que han sido sintetizados durante la reacción de PCR. Con el producto digerido se transforman, mediante choque térmico, bacterias *E. coli* de la cepa TG-1 que previamente han sido lavadas con CaCl₂ para hacerlas competentes. Las células se siembran en placas de LB agar con ampicilina como antibiótico de selección y se dejan crecer todo la noche a 37°C. Solo se observan colonias en la placa de las bacterias transformadas con el producto de la reacción B.

Con las colonias resultantes de la transformación de la reacción B se realiza una colony-PCR con los primers pBAD-F y pBAD-R, que tienen una secuencia que flanquea por ambos lados el inserto, de este modo se evitan falsos positivos. La temperatura de hibridación es de 60°C y el tiempo de extensión es de un minuto. El tamaño esperado del producto de PCR con estos primers es de 1029 pares de bases.

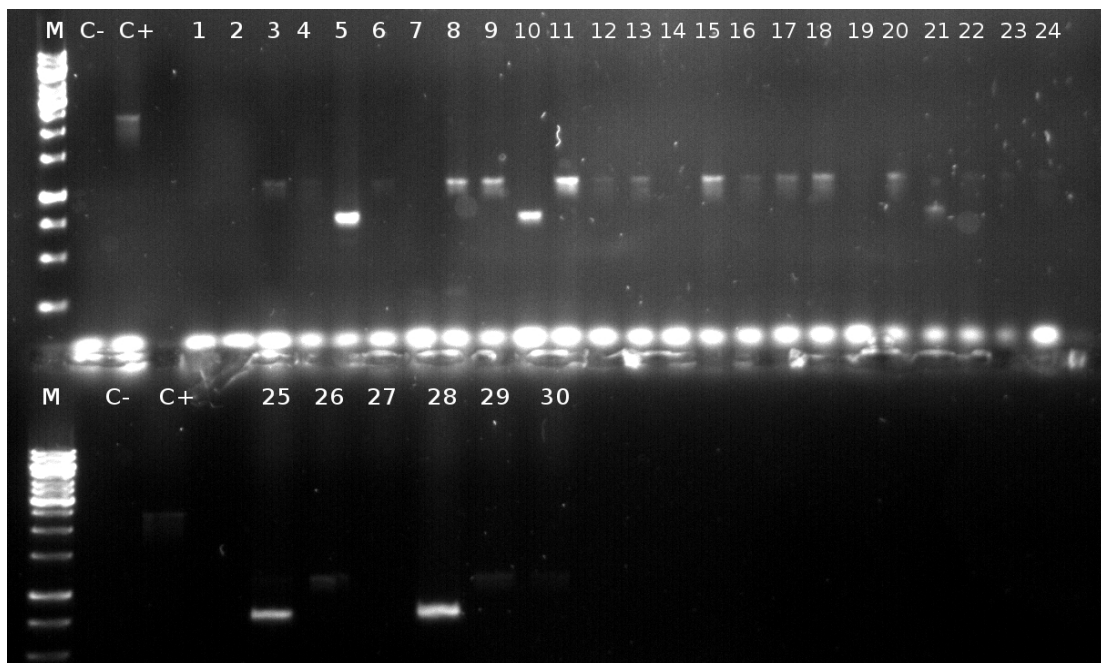


Imagen 8. Gel de agarosa 1%. Colony-PCR de las colonias transformadas con el plásmido pBADGFP.

En la figura 8 se observa que, excepto las colonias 5, 7, 10, 14, 19,21, 23, 24,

25, 27 y 28, tienen el tamaño adecuado, alrededor de los 1000 pares de bases.

Las colonias que presentaron el inserto, se cultivaron en medio LB con ausencia y presencia de arabinosa, mostrando solo fluorescencia aquellas que habían sido inducidas, demostrando así que la estrategia de clonación y la transformación, funcionaron.

3.1.2 Estudios de crecimiento celular.

Objetivos.

El objetivo de estos experimentos es tratar de reproducir y corroborar los resultados obtenidos por Antón Vila en los que la cepa JM101 *KsgA19* presenta un fenotipo sensible a la kasugamicina después de haber pasado por fase estacionaria y siendo cultivada en placas de agar a 23°C.

Material y métodos.

Cepas:

Se utilizan las mismas cepas que en los ensayos anteriores, JM101 SDL y JM101 SDL *KsgA19*. Como se ha explicado en el apartado anterior, ambas cepas poseen el gen de resistencia a la kanamicina, y la cepa *KsgA19* presenta una mutación que le confiere resistencia a la kasugamicina, mientras que la cepa salvaje es sensible a este antibiótico.

Medio de cultivo:

El medio de cultivo es el mismo que se ha utilizado en el apartado anterior, medio mínimo M9, al que se le añade kanamicina como antibiótico de selección.

Software:

Los cálculos necesarios para hallar el tiempo de doblaje se han realizado una herramienta online llamada "Cell-calculator" (<http://www.doubling-time.com/compute.php>)

Procedimiento.

Partiendo de cultivos “overnight” se hacen diferentes diluciones celulares en placas de 96 pocillos con un volumen total de 200 uL, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de kasugamicina, cultivándose a 18° o 37°C y a 700rpm durante 7 horas. Cada media hora se mide la O.D.595 y con los datos obtenidos. se construyen las curvas de crecimiento y se calculan los tiempos de duplicación.

Resultados y conclusiones.

Se ha observado que al igual que con la mutación G926, la mutación *KsgA19* presenta un fenotipo sensible a la kasugamicina (Vila-Sanjurjo, sin publicar) cuando crece a bajas temperaturas después de haber pasado por fase estacionaria. Este cambio de fenotipo se ha estudiado en placas, como se muestra en las siguientes imágenes.

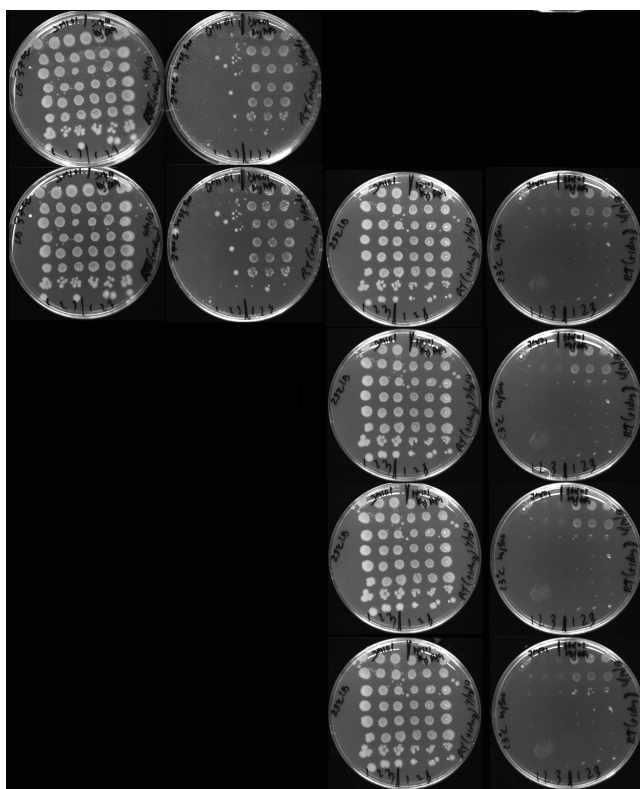


Imagen 9: Viabilidad celular de las cepas JM101 SDL WT y KsgA19 a 37 y 23°C

Tres colonias de cada cepa fueron cultivadas a temperatura ambiente “overnight”; al día siguiente se sembraron en placas, con ausencia y presencia de kasugamicina. Se observó que las tres colonias de ambas cepas crecieron tanto a 23° como a 37° en ausencia de kasugamicina y que las colonias de la cepa JM101 SDL WT no crecieron en presencia de kasugamicina a ninguna de las temperaturas. Sin embargo, la cepa resistente a la kasugamicina, sólo crece a 37°C, mostrando un fenotipo sensible a la kasugamicina.

Como existen numerosas diferencias entre los cultivos en placa y en medio líquido (concentración, difusión, aireación...) se han realizado diferentes ensayos de crecimiento en medio líquido para poder comparar los resultados con los obtenidos en medio sólido.

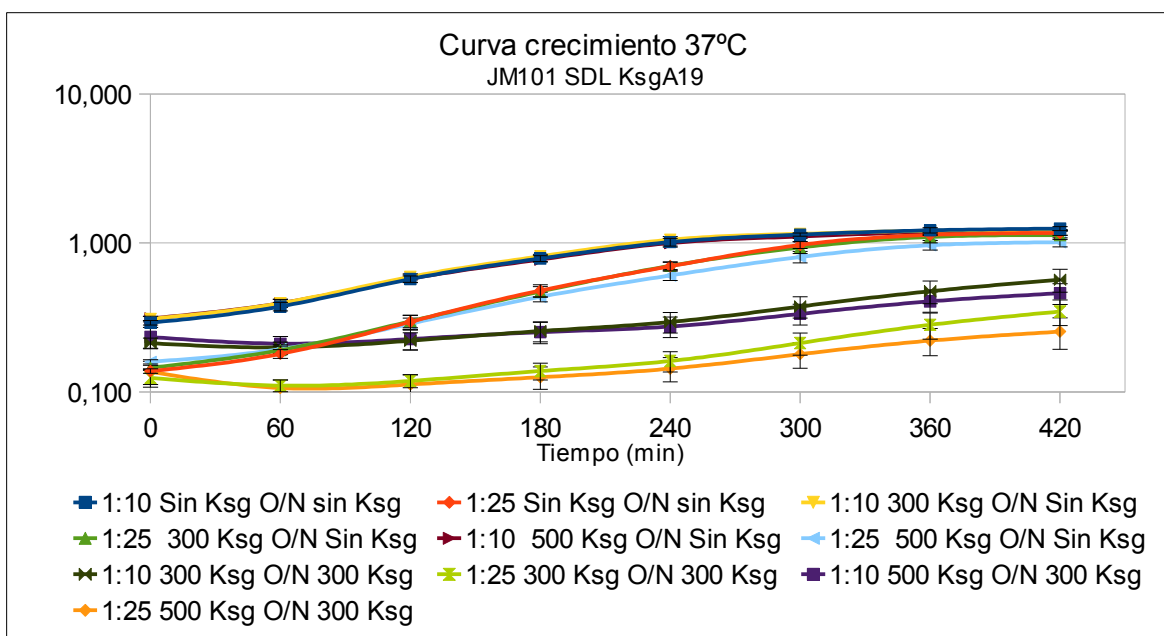


Figura 10: Se representan las curvas de crecimiento de la cepa KsgA19 partiendo de cultivos overnight en presencia o ausencia de Ksg (300ug/mL) a 37°C.

Para simular las condiciones a las que sometieron las células en los ensayos en placas, en este ensayo se partió de dos cultivos “overnight” diferentes. Uno de ellos en ausencia de kasugamicina y en el otro con una concentración de 300ug/mL. Se observa que todos los cultivos presentan crecimiento. Por lo que, a

37°C, aún habiendo pasado por fase estacionaria, las células siguen mostrando resistencia a altas concentraciones de kasugamicina.

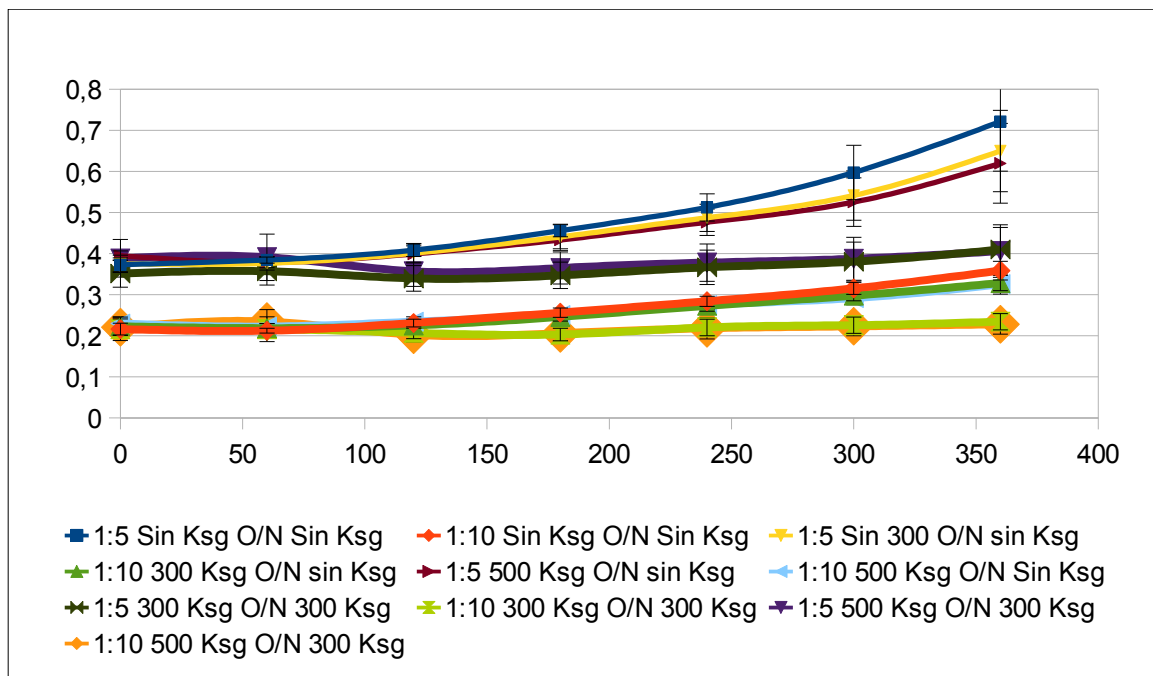


Figura 11: La figura representa los diferentes tiempos de duplicación de las dos cepas usadas a diferentes concentraciones de Kasugamicina y a diferentes temperaturas.

Se ha repetido el ensayo anterior pero a una temperatura de 18°C para reproducir el estrés al que fueron sometidas las células en los experimentos en medio sólido. Se observa que los cultivos que no han sido tratados con kasugamicina durante la fase estacionaria son resistentes a la kasugamicina y siguen creciendo incluso a 18°C, pero los cultivos que fueron tratados con kasugamicina durante la fase estacionaria han desarrollado sensibilidad a la kasugamicina. Aún habiendo diluido las células en medio de cultivo nuevo, parece que no son capaces de salir de la fase estacionaria y volver a crecer.

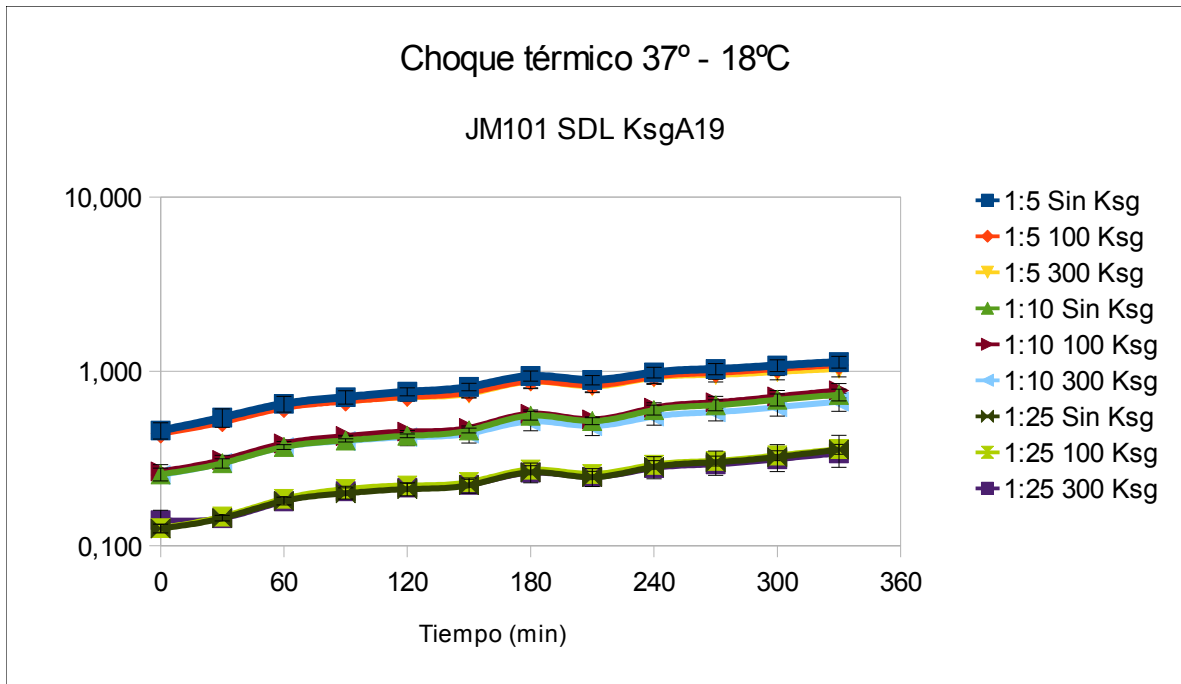


Figura 12: Curvas de crecimiento de diferentes cultivos tras un choque térmico. En el minuto 90 se cambió la temperatura de 37°C a 18°C.

En este ensayo las células de la cepa *KsgA19* han sido sometidas a un choque de frío. A los 90 minutos de cultivo se ha bajado la temperatura de 37 a 18°C. Se observa crecimiento en todos los cultivos, lo que indica que la resistencia adquirida a la kasugamicina no es producida por un choque térmico, si no que está relacionada con el hecho de haber estado en contacto con la kasugamicina durante la fase estacionaria.

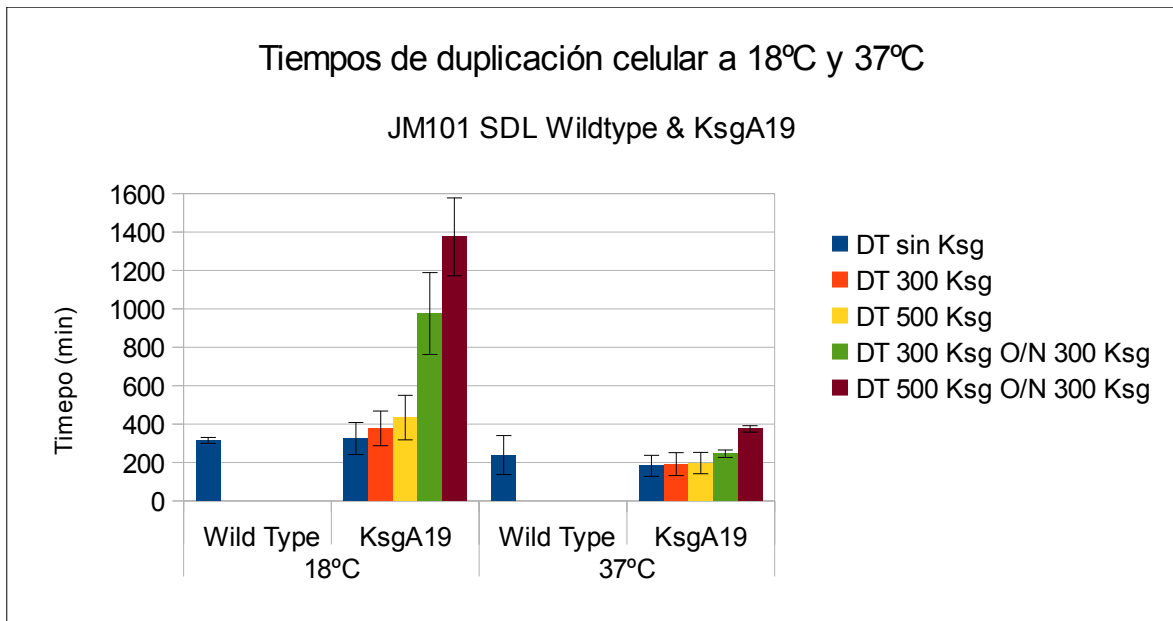


Figura 13: Se representan los diferentes tiempos de duplicación celular (DT) a diferentes temperaturas y a diferentes concentraciones de kasugamicina. En verde y en morado cultivos realizados

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se calcularon los tiempos de duplicación de las diferentes cepas, a diferentes temperaturas y con diferentes concentraciones de kasugamicina, utilizando la herramienta online “Cell calculator”.

Como era de esperar, los tiempos de duplicación a 18°C aumentan en relación con los obtenidos a 37°C y, a mayores concentraciones de kasugamicina, mayores son los tiempos de duplicación.

Junto con el hecho de que a 23°C las células de la cepa JM101 SDL KsgA19 no son capaces de crecer en un medio sólido con kasugamicina, se observa que los cultivos que partieron de cultivos overnight con 300ug/mL de kasugamicina a 18°C tampoco son capaces de crecer y, con los resultados que se muestran en esta gráfica, se puede decir que la cepa JM102 SDL KsgA19 presenta un fenotipo sensible a la kasugamicina a bajas temperaturas después de haber pasado por fase estacionaria.

4. Bibliografía.

- 1.- Giuliodori, A. *et al.* **Review on Bacterial Stress Topics.** 2007. Annals of the New York Academy of Sciences.
- 2.- Vila-Sanjurjo, A. **Modification of the Ribosome and the Translational Machinery during Reduced Growth. Due to Environmental Stress.** 2008. doi: 10.1128/ecosal.2.5.6
- 3.- Ramírez Santos, J., Contreras Ferrat, G., Gómez Eichelmann, M.C. **La fase estacionaria en la bacteria *E.coli*.** 2005. Revista latinoamericana de microbiología. Vol. 47, No 3-4.
- 4.-Yamanaka, K. **Cold Shock Response in *Escherichia coli*.** 1999. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1(2): 193-202.
- 5.-Goldstein, J., Pollitt, N.S. and Inouye, M. **Major cold shock protein of *Escherichia coli*.** 1990. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 283-287.
- 6.- Poole, K. **Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance.** 2012. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. doi:10.1093/jac/dks196.
- 7.- McMahon, A.S., Xu, J., Moore, J.E., Blair, I.S and McDowell, D.A. **Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens.** 2007. Applied and environmental microbiology. Vol. 73, No. 1, p. 211–217.
- 8.- Vanbogelen R.A., Neidhardt F.C. **Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*.** 1990. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 5589-5593
- 9.-Vila-Sanjurjo, A., Squires, C.L. and Dahlberg, A.E. **Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*.** 1999. *J.Mol.Biol.* 293, p1-8.
- 10.- Schuwirth, B.S., Day, J.M., Hau, C.W., Janssen, G.R., Dahlberg, A.E., Cate, J.H. And Vila-Sanjurjo, A. **Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation.** 2006. *Nature structural & molecular biology.* Vol.13, N°10.

- 11.-Thibodeau, S.A., Fang, R. and Joung, K. **High-throughput beta-galactosidase assay for bacterial cell based reported system. 2004.** Biotechniques. Vol. 36. N°3.
- 12.- Miller, J.H. **Experiments in molecular genetics. 1972.** CHS Laboratory Press.
- 13.- Held, P. **Kinetic analysis of beta-galactosidase activity using POWERWAVE HT and Gen5 data analysis software.** Biotek instruments.