

Desarrollo de un sistema reportero para la detección de actividades anti-biofilm

Ana Díaz Navarro, Aroa López Sánchez, y Fernando Govantes Romero

Área de Microbiología, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo

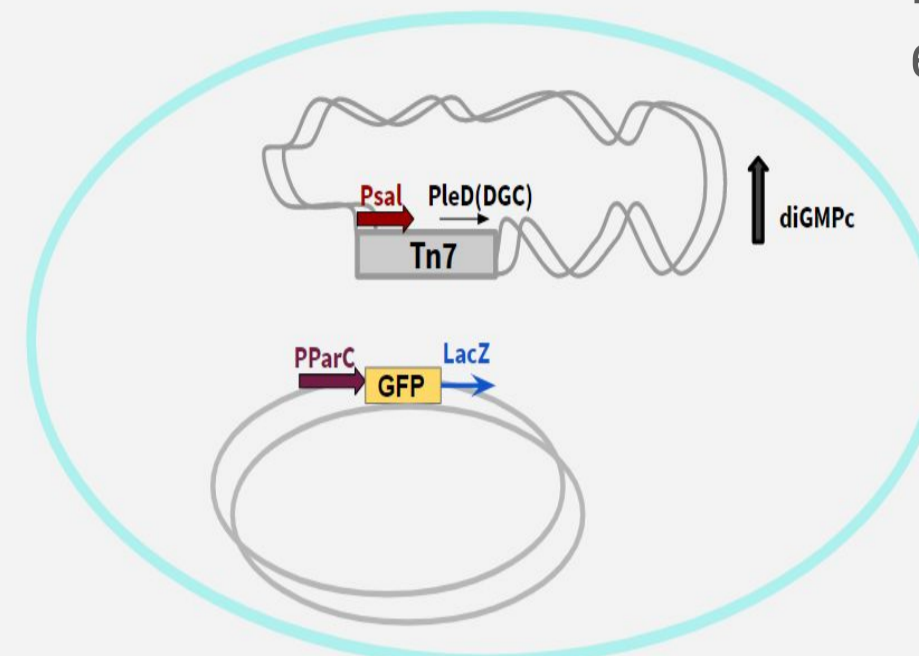
INTRODUCCIÓN

- El 80% de las infecciones crónicas están asociadas a microorganismos formadores de biofilm, por lo que se ha vuelto de vital importancia la búsqueda de agentes terapéuticos con dianas específicas en este proceso [1].
- Entre las múltiples estrategias, una de las aproximaciones mejor estudiadas es el tratamiento con enzimas degradadoras de los distintos componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, ya que la composición de la matriz varía entre distintos microorganismos, la aplicabilidad de este tipo de tratamiento es limitada [2].
- Una alternativa es interferir en las cascadas de señalización implicadas en la formación de biofilm. El mensajero secundario di-GMPc tiene un papel principal en este proceso y está ampliamente conservado. De esta forma, altos niveles promueven la formación de biofilm mientras que niveles bajos inducen la dispersión de este. Las enzimas responsables de la síntesis del di-GMPc a partir de GTP son las diguanilato ciclasas (DGC) [3].

OBJETIVO

Construcción de una estirpe indicadora de *P. putida* que nos ayude a reconocer inhibidores de la actividad DGC.

DISEÑO EXPERIMENTAL



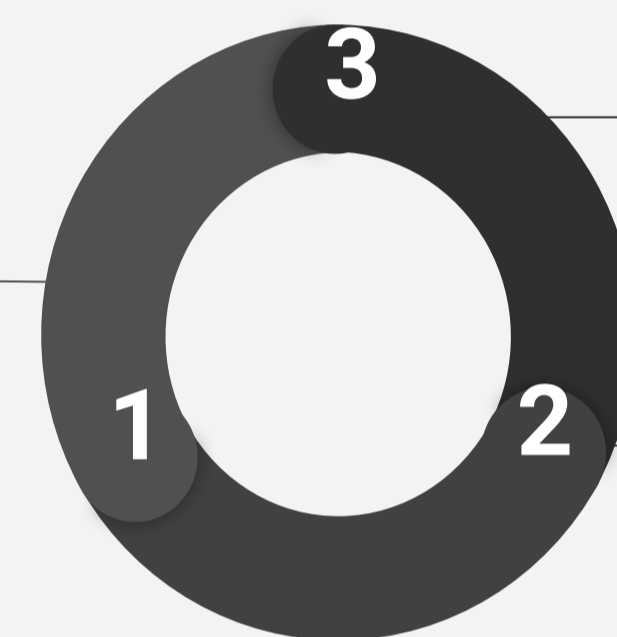
El diseño experimental contempla que la estirpe indicadora contenga:

- El gen que codifica la DGC PleD bajo el control del promotor PsaI, inducible por la presencia de salicilato gracias al regulador NahR en el cromosoma. Se integra con la ayuda del transposón Tn7 (que se sitúa tras el gen *glmS*).
- Fusión a *lacZ* de un promotor de *P. putida*, reprimible por di-GMPc.

En presencia de X-gal, un césped de nuestra estirpe indicadora contenida en agar de cobertera presentará color blanco, mientras que si se le añade algún compuesto capaz de inhibir a la DGC o interferir en la señalización por di-GMPc aparecerá un halo azul en la zona de la placa en la que se ha añadido.

METODOLOGÍA

Integración del transposón Tn7-*pleD* y Tn7 como control en cepa KT2442 por electroporación



Comprobación del sistema ensayando su capacidad de formar halos azules en presencia de sulfatiazol (inhibidor de la síntesis de di-GMPc).

Incorporación de plásmidos (promotores *PflgB*, *PflsS*, *PflgF* y *PparC* fusionados a *lacZ*) en KT2442-*pleD* y KT2442-Tn7 mediante conjugación triparental y selección.

RESULTADOS

1. Integración de *pleD* en el genoma de *P. putida* KT2442

La integración del gen que codifica la DGC PleD se comprobó mediante PCR con un oligonucleótido que hibrida en el extremo del transposón y otro en el gen *glmS*, de forma que la integración correcta resulta en una banda de 150 pb. Esta banda se detectó en todos nuestros transformantes (Fig.1), por lo que la integración del gen que codifica la DGC PleD fue exitosa.

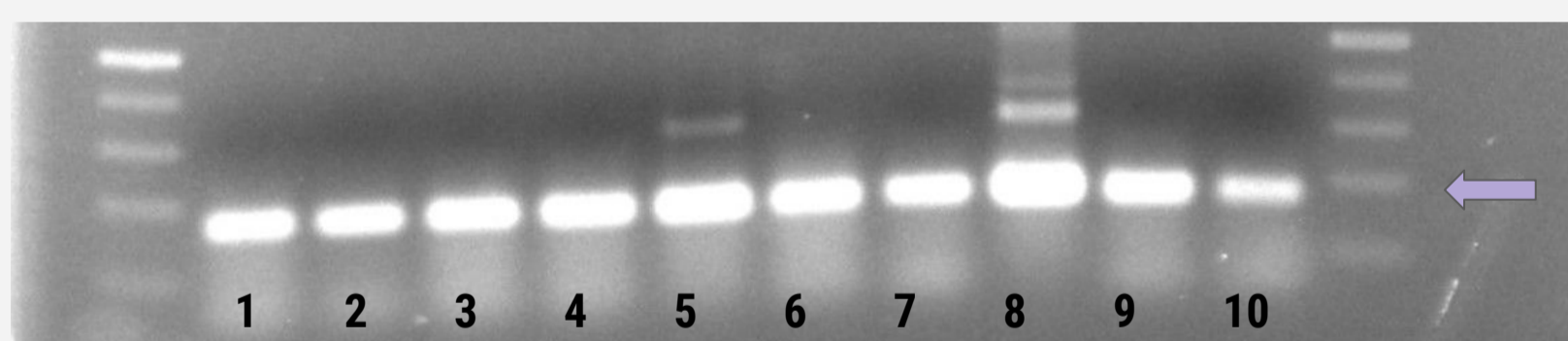


Figura 1. Comprobación de la integración de *pleD*. Gel de agarosa al 1.5% en el que se muestra la amplificación del fragmento de 150 pb del gen que codifica la DGC PleD en todos nuestros transformantes. 1 a 10) ADN de 10 candidatos KT2442-*pleD*.

2. Selección de la fusión transcripcional indicadora

Mediante análisis del color y medida de la actividad β -galactosidasas se comprobaron fusiones transcripcionales a *lacZ* de los promotores *PflgB*, *PflsS*, *PflgF* y *PparC*, descritos previamente por reprimirse por di-GMPc [Antonio Leal, sin publicar].

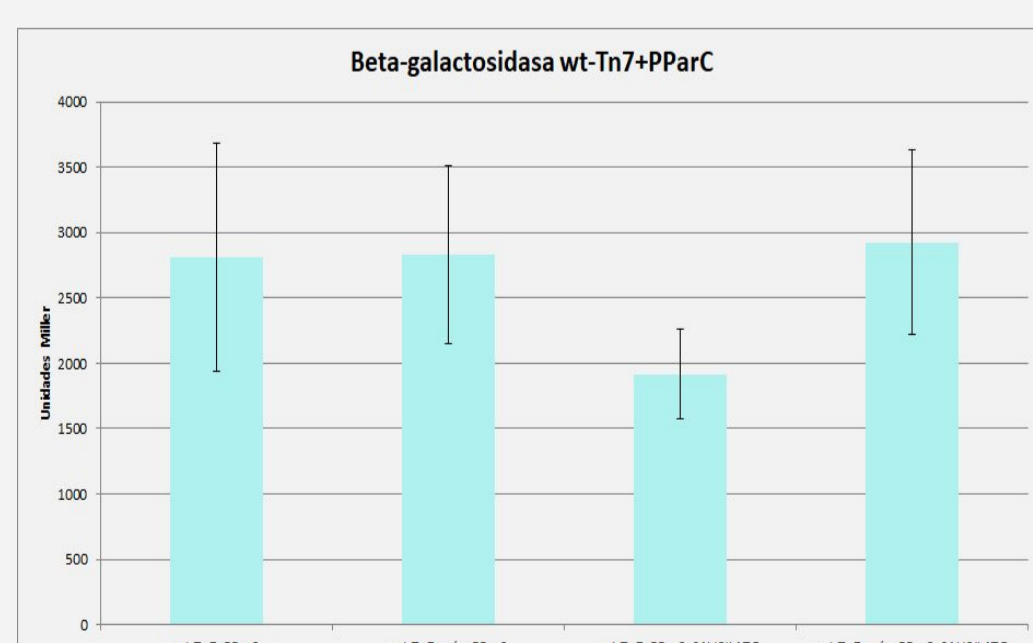
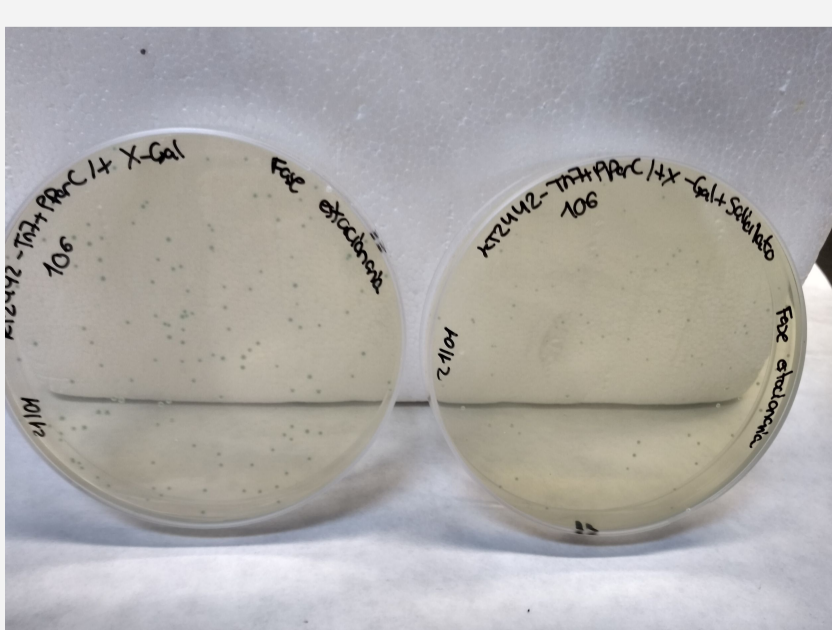


Figura 2. Fenotipo en placa (con X-Gal y X-Gal+Salicilato) (A) y actividad β -galactosidasa (B) de la estirpe KT2442-PleD + PparC-lacZ.

Como se observa en la figura 2, la estirpe indicadora mostró diferencias de color en placas con X-gal al añadir salicilato e inducir, por tanto, la expresión de PleD (fenotipo que varía de azul a blanco) (Fig2.A) y también una disminución de la actividad β -galactosidasa en presencia de salicilato (Fig2.B).

3. Comprobación del sistema mediante ensayos con sulfatiazol

El funcionamiento adecuado de nuestro sistema de escrutinio se basará en su capacidad de formar halos azules en contacto con un inhibidor de la síntesis de di-GMPc como el sulfatiazol. De esta forma, nuestra estirpe indicadora contenida en agar de cobertera fue puesta en contacto con 10 μ l de distintas concentraciones (2 μ g/ml, 10 μ g/ml y 50 μ g/ml) de sulfatiazol, observándose la aparición de un halo azul a una concentración de 50 μ g/ml de inhibidor (Fig.3).

Este resultado indica que hemos conseguido desarrollar un sistema eficaz en la detección de inhibidores de la actividad DGC y por tanto, de la formación de biofilms.

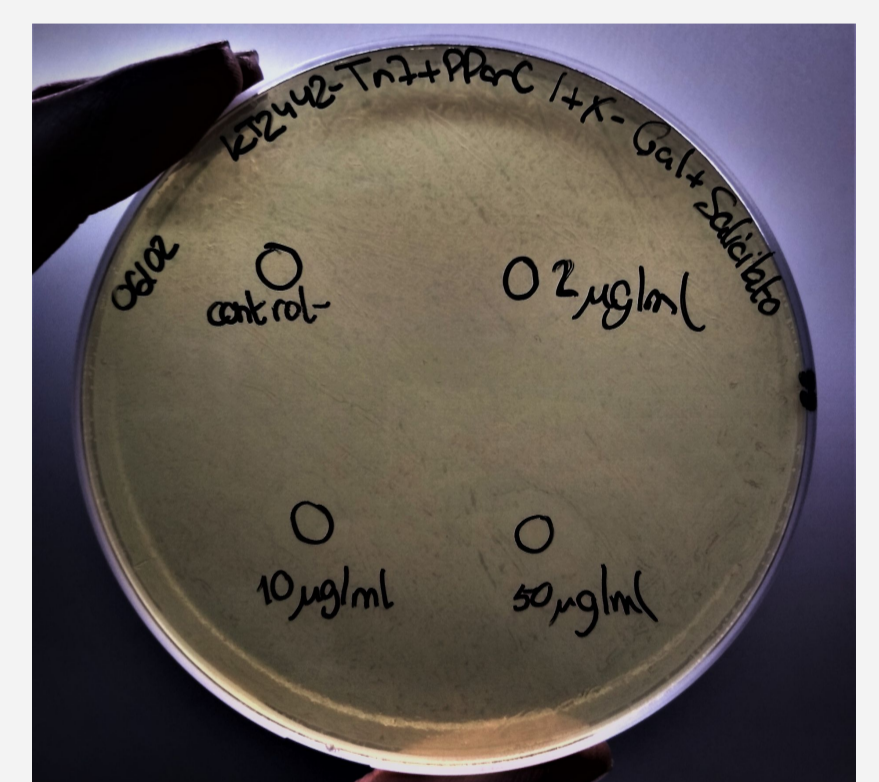


Figura 3. Estudios de variación de color en presencia de sulfatiazol a distintas concentraciones (2 μ g/ml, 10 μ g/ml y 50 μ g/ml).

CONCLUSIONES

Hemos conseguido desarrollar con éxito un sistema reportero de la actividad anti-biofilm por inhibición de la actividad DGC o la interferencia en la señalización por di-GMPc:

- Se seleccionó la fusión *PparC-lacZ* por mostrar una mayor diferencia de expresión en presencia de salicilato.
- La prueba de concepto con sulfatiazol ha resultado exitosa, lo que indica el funcionamiento adecuado de nuestro sistema de escrutinio.

REFERENCIAS

- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, 7(1), 1.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740.
- Sambanthamoorthy, K., Luo, C., Pattabiraman, N., Feng, X., Koestler, B., Waters, C. M., & Palys, T. J. (2014). Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling*, 30(1), 17-28.
- Antoniani, D., Bocci, P., Maciag, A., Raffaelli, N., & Landini, P. (2010). Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1095-1104.