

Construcción de un reportero fluorescente para caracterizar la vía de señalización WSP que controla el cambio de estilo de vida en bacterias

Benitez, Agustín

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL)
Laboratorio de Microbiología Molecular
Directora: Soldano, Anabel
Codirectora: Studdert, Claudia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: localización, WSP, metiltransferasa

INTRODUCCIÓN

La vía WSP es un sistema de transducción de señales que regula la formación de biofilms en varias bacterias. Los biofilms son comunidades estructuradas de microorganismos inmersos en una matriz extracelular que crecen adheridos a una superficie o entre sí y les permiten a las bacterias sobrevivir frente a condiciones adversas. La vía WSP, descrita por primera vez en bacterias del género *Pseudomonas*, consiste en un grupo de proteínas que se activan cuando las células entran en contacto con una superficie. El estímulo sentido inicia una cascada de señalización que aumenta los niveles de c-di-GMP e induce la expresión de genes que permiten la adhesión a la superficie y el desarrollo de biofilms (1, 2).

Un sistema de señalización similar al WSP presente en *Pseudomonas* se identificó en *Halomonas titanicae* KHS3 (*Ht-KHS3*), una bacteria autóctona del Mar Argentino (3). Si bien se han estudiado ciertas proteínas que participan en la mencionada vía, hasta el momento no hay información respecto a la localización y dinámica de los complejos de señalización involucrados y no se ha explorado o caracterizado su funcionamiento. Es por esto que el presente trabajo propone construir un reportero fluorescente que sirva para caracterizar la disposición celular de los componentes del sistema tipo WSP presente en *Ht-KHS3*.

OBJETIVOS

- Construir un sistema reportero fusionando la metiltransferasa CheR2 de la vía WSP de *Ht-KHS3* a la proteína fluorescente amarilla (YFP) en un plásmido bajo el control de un promotor inducible por IPTG.
- Emplear el sistema reportero en cepas de *Pseudomonas putida* que tienen mutaciones en los componentes de la vía WSP para caracterizar su distribución celular cuando la vía de señalización se encuentra encendida o apagada.
- Utilizar el sistema reportero para estudiar la localización celular de la vía de señalización tipo WSP en *Ht-KHS3*.

Título del proyecto: "Sistema quimiosensorial que regula la formación de biofilms: estudio de la vía tipo Wsp en la bacteria marina *Halomonas titanicae* KHS3"
Instrumento: PICT
Año convocatoria: 2020
Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica
Director/a: Studdert, Claudia.

METODOLOGÍA



Construcción del reportero fluorescente YFP-CheR2

Para generar una proteína que contenga la proteína fluorescente amarilla (YFP) unida a la metiltransferasa de *Ht-KHS3* (CheR2) en su extremo N-terminal, se fusionaron los genes que codifican YFP y CheR2 en el plásmido pBBR1-MCS2. Este vector tiene un marcador de resistencia a kanamicina y un promotor inducible por IPTG.

El gen CheR2 de *Ht-KHS3* fue amplificado por PCR desde el plásmido pFR15 (4) usando oligonucleótidos que introducen sitios de restricción BamHI y XbaI. El gen de YFP se amplificó desde el vector pPA803 (5) con primers que añadieron los sitios EcoRI y BamHI.

Los fragmentos de DNA amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, usando SYBR Green para visualizar los ácidos nucleicos bajo luz UV o LED azul y el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Plus Ladder para confirmar el tamaño.

Los genes purificados a partir del gel de agarosa fueron digeridos con las enzimas de restricción: YFP con EcoRI y BamHI; CheR2 con BamHI y XbaI. Posteriormente, las secuencias digeridas se clonaron en el vector pBBR1-MCS2. Primero, YFP se insertó entre los sitios EcoRI/BamHI, y el vector fue transformado en células *Escherichia coli* TOP10. Los transformantes se seleccionaron con kanamicina, y se confirmó la presencia del inserto de interés por PCR en colonia, utilizando los primers correspondientes. Se extrajo el ADN plasmídico de los clones con el producto de amplificación deseado (~780 pb) y se secuenció para confirmar la integridad del inserto.

Tras verificar que la secuencia de YFP era correcta, se procedió a clonar CheR2 usando el mismo protocolo. El vector y CheR2 se digirieron con BamHI/XbaI. La fusión YFP-CheR2 se confirmó por PCR en colonia y secuenciación.

Transformación *Halomonas titanicae* KHS3 y mutante

La transformación de *Halomonas* fue realizada a través de conjugación triparental por estría directa utilizando como cepa dadora la bacteria *E. coli* S-17 λ pir transformada previamente con el plásmido reportero y como cepa helper la bacteria *E. coli* CC118 + pK600. Las cepas receptoras del plásmido fueron *Ht-KHS3* salvaje y *Ht-KHS3* Δ *cheB2*, mutante delecional en el gen que expresa la metilesterasa de la vía WSP.

Las bacterias fueron incubadas durante 72 h a 32 °C en medio H1 con 2% NaCl y 0,2% citrato de sodio en presencia de kanamicina (H12C-km). Una vez que se desarrollaron colonias en aquella estría que contenía a las 3 bacterias, se purificó la cepa conjugada. Para ello, se realizó un nuevo repique en medio H12C-km y luego de un segundo repique en medio LB con 2% NaCl. A partir de esta placa se realizó una PCR de colonia para verificar que las bacterias crecidas eran *Halomonas* (amplificación del gen específico CheW3) y otra para amplificar el gen de YFP y verificar la correcta transferencia de la construcción fluorescente.

Transformación de *Pseudomonas putida* KT2440 y mutantes

La transformación de *P. putida* KT2440 y las mutantes (Δ *wspA*, Δ *wspC*, Δ *wspF*) fue realizada mediante electroporación (6). La selección positiva se realizó por crecimiento en placas de LB con kanamicina, incubadas durante 16 h a 32 °C.

Obtención de imágenes

Las bacterias fueron fotografiadas a partir de preparados frescos utilizando el microscopio de fluorescencia Eclipse E200 con el filtro para GFP y fotografiadas con la cámara fotográfica Nikon "D5300" con 1 segundo de exposición.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se construyó un reportero fluorescente fusionando la metiltransferasa CheR2 de la vía WSP de *Ht-KHS3* al extremo C-terminal de la proteína YFP en un plásmido bajo el control de un promotor inducible por IPTG. La secuenciación de la construcción no mostró mutaciones.

Fue posible introducir el reportero fluorescente en cepas de *P. putida* que tienen mutaciones en los componentes de la vía WSP para caracterizar la distribución de la proteína CheR2 dependiendo el estado de la vía. Al crecer las cepas transformadas en presencia del inductor se corroboró que la construcción YFP-CheR2 se expresaba de manera correcta y volvía a las bacterias fluorescentes. En la cepa salvaje KT2440 así como también en las mutantes $\Delta wspF$ (delección de la metilesterasa que vuelve a la vía WSP constitutivamente activa) y $\Delta wspC$ (delección de la metiltransferasa) se observó una localización del reportero fluorescente principalmente focalizada en los polos de las bacterias, aunque también se evidenciaron focos de fluorescencia en la región media de las mismas (Figura 1A-C). En cambio, en la mutante $\Delta wspA$, la cual contiene una delección del receptor que inactiva la vía WSP, se observó una distribución mayoritariamente homogénea de la fluorescencia a lo largo de las bacterias (Figura 1D). Esto indica que al estar ausente el receptor, se impide que CheR2 forme complejos de señalización.

Mediante conjugación triparental en estricta se logró introducir la construcción del reportero fluorescente en las cepas *Ht-KHS3* salvaje y *Ht-KHS3* $\Delta cheB2$. La presencia del gen que codifica para YFP fue corroborado mediante PCR en colonia. Sin embargo, al observar las cepas transformadas en el microscopio no se observó fluorescencia. Al momento se desconocen los motivos por los cuales no parece funcionar o expresarse el reportero en *Halomonas*, pero se continúa con dichos estudios.

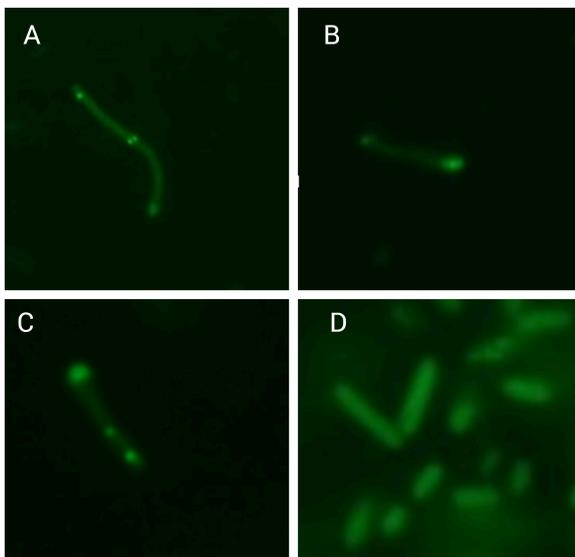


Figura 1. Localización celular del reportero fluorescente YFP-CheR2 en *Pseudomonas putida*. Observación microscópica de los focos de fluorescencia en la cepa salvaje *P. putida* KT2440 (A) y en las mutantes $\Delta wspF$ (B), $\Delta wspC$ (C), y $\Delta wspA$ (D).

REFERENCIAS

1. **Hickman, JW et al.** 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 14422-14427
2. **O' Neil, L et al.** 2022. The Wsp system of *Pseudomonas aeruginosa* links surface sensing and cell envelope stress. *PNAS* 119 (18) e2117633119
3. **Gasperotti, AF et al.** 2018. Identification of two different chemosensory pathways in representatives of the genus *Halomonas*. *BMC Genomics*. 19:266
4. **Ramos Ricciutti, F.** 2023. Caracterización funcional de un sistema de quimiosensado de *Halomonas titanicae* KHS3 (tesis doctoral, Universidad Nacional del Litoral)
5. **Zhou, Q et al.** 2011. Biphasic control logic of HAMP domain signalling in the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *Molecular Microbiology*, 80(3), 596-611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07577.x>
6. **Choi, KH et al.** 2006. High-efficiency DNA transformation of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas putida* by electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 388, 47-53.