

INTRODUCCIÓN

Matriz de EPS de *B. animalis* subsp. *lactis*

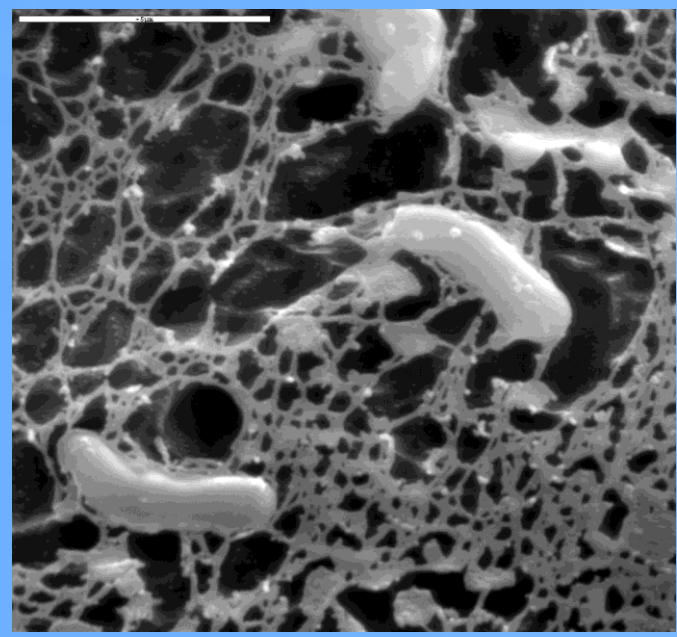


Foto 1

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de azúcares sintetizados por algunas bacterias los cuales pueden permanecer anclados a la pared bacteriana o formar una matriz extracelular. Los EPS tienen un papel especialmente importante en bacterias de la microbiota intestinal ya que pueden favorecer su supervivencia y persistencia en el tracto gastrointestinal. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* es uno de los componentes de la microbiota intestinal y, además, esta especie es comúnmente utilizada en la elaboración de productos lácteos fermentados y probióticos por su mayor resistencia a condiciones de estrés.

En trabajos previos de nuestro grupo hemos caracterizado cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* productoras de distintos EPS (Foto 1) que son capaces de conferir fenotipos variables a la cepa productora, como el fenotipo "ropy" caracterizado por la formación de un largo filamento al introducir un asa de siembra en la colonia (Foto 2). La aparición del fenotipo ropy está asociada a la síntesis de un EPS de alto peso molecular y alto contenido en ramnosa (Leivers y cols., 2011).

Cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* productora de un EPS ropy



Foto 2

La síntesis de EPS está mediada por un conjunto de genes organizados y agrupados formando los denominados "clusters eps" (Fig. 1). En trabajos anteriores se comprobó que aquellas cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* que sintetizaban un EPS ropy presentaban una mutación puntual en el gen *wzz*, el cual está implicado en la determinación de la longitud del EPS. Para demostrar este hecho se utilizó la cepa tipo de esta especie (DSM10140) y se construyeron mutantes en los que se deleccionó *wzz* en el cromosoma (cepa *wzz*-), y posteriormente se complementaron con un plásmido que porta el propio gen (cepa *wzz*+) o el gen mutado en el que una C cambia por T (cepa *wzz*^{S89L}+). Ésta última cepa adquirió el fenotipo ropy, además de la marca de resistencia a eritromicina transferida por el plásmido. Este modelo de cepas isogénicas nos ha permitido estudiar el papel que desempeñan distintos EPS en la interacción bifidobacteria-hospedador (Hidalgo-Cantabrana y cols, datos no publicados). Sin embargo, estudios preliminares muestran que el plásmido empleado es poco estable, ya que se pierde tras 30 generaciones, por lo cual es un factor limitante para su utilización en determinados modelos biológicos por la necesidad de usar el antibiótico como marca de selección.

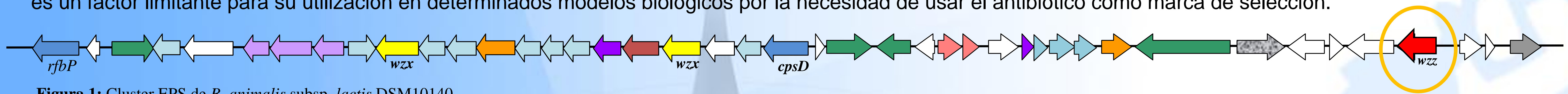


Figura 1: Cluster EPS de *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140

Objetivo: en este trabajo pretendemos obtener una cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* modificada genéticamente que porte en su cromosoma el gen *wzz*^{S89L} de forma estable y que produzca el EPS ropy.

DESARROLLO METODOLÓGICO Y RESULTADOS

1 Partimos de la cepa tipo de *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 en la que eliminamos el gen *wzz* mediante sobrecruzamiento (Hidalgo-Cantabrana y cols, datos no publicados) generando de esta manera la cepa Knock-out DSM10140- Δ *wzz* (cepa *wzz*-).

2 Para introducir el gen mutado (*wzz*^{S89L}) en el cromosoma de DSM10140- Δ *wzz* se utilizó como donante la cepa A1dOxR, la cual adquirió la mutación y el fenotipo ropy de forma espontánea tras un proceso de adaptación a sales biliares. A partir de la cepa A1dOxR se amplificó un segmento de 7,1kb que contiene el gen *wzz*^{S89L} y las regiones flanqueantes («upstream» y «downstream») las cuales permitirán su integración en el cromosoma bacteriano mediante recombinación homóloga. Con este amplicón se construyó el plásmido pCHC3 a partir de pJL74, el cual no es replicativo en *Bifidobacterium* y para que se exprese es necesario que se integre en el cromosoma.

3 El plásmido pCHC3 se introdujo mediante electrotransformación en la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140- Δ *wzz*. La integración del plásmido en el cromosoma se puede producir por recombinación del segmento «upstream» o «downstream», generando dos construcciones diferentes. Después de la transformación se seleccionaron los transformantes resistentes a espectinomina.

4 Las bacterias seleccionadas se crecieron sin antibiótico durante varias generaciones para favorecer la pérdida del plásmido. La salida del plásmido se puede producir, de nuevo, por recombinación homóloga de los segmentos «upstream» o «downstream». Si la salida se produce por el segmento de entrada (Fig. 2.4A), arrastrará el plásmido completo y nos encontraremos en el punto de partida, es decir, con la cepa DSM10140- Δ *wzz*.

Sin embargo, si la salida se produce por el segmento contrario al de entrada (Fig. 2.4B), el plásmido no sale completo y habremos conseguido introducir el gen *wzz*^{S89L} en el cromosoma bacteriano adquiriendo la cepa el fenotipo ropy. Una vez obtenida la cepa deseada (DSM10140-*wzz*^{S89L}), se comprobó mediante amplificación por PCR la presencia del gen *wzz*^{S89L} y la ausencia del gen de resistencia a espectinomina. Además se verificó que la secuencia del cluster eps en la que se había incluido el gen mutado no estaba alterada.

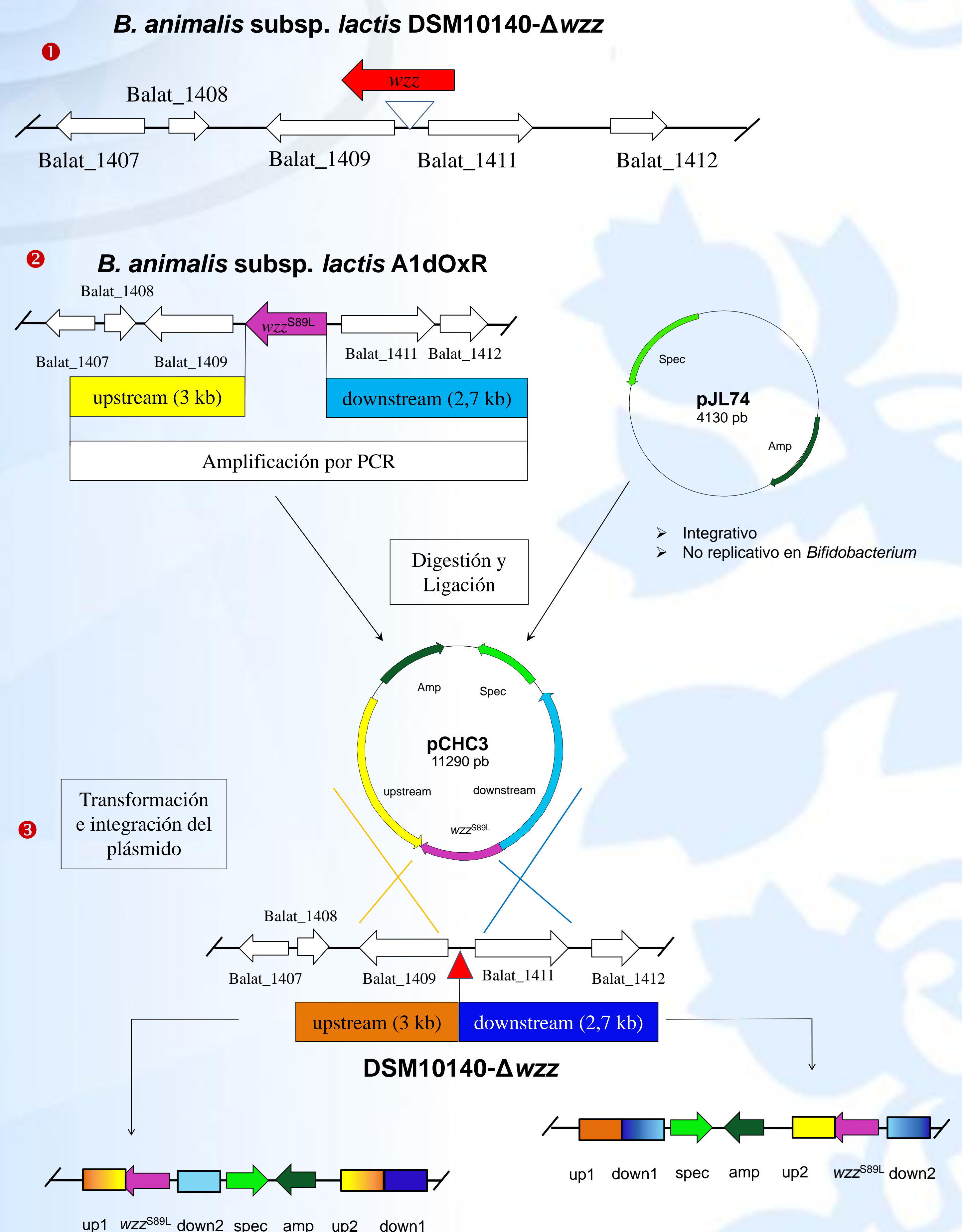


Figura 2: Esquema del flujo de trabajo del reemplazamiento génico.

CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

- Hemos conseguido generar la cepa recombinante ropy *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140-*wzz*^{S89L} utilizando la técnica de reemplazamiento génico que, hasta la fecha, no se había descrito en esta especie.

- El sistema de cepas DSM10140, salvaje productora de EPS no ropy, y DSM10140-*wzz*^{S89L}, recombinante productora de EPS ropy, nos permite disponer de un modelo estable para analizar la implicación de este tipo de polímeros en el diálogo entre la bifidobacteria y el hospedador.