

Detección *in silico* de elementos genómicos asociados al crecimiento de biopelículas en *Lactobacillus delbrueckii* sub. *lactis* y *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus*

C.O. Sedano-Juárez¹, M.C.C. Condado-Huerta², A.I. Barrera-Molina², y J. Vichi-Lozada¹

1 Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos. 2 Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. jvchi@upemor.edu.mx.

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica que ha aumentado en las últimas décadas y su causa está asociada a múltiples factores, entre los que se encuentra la composición de la microbiota intestinal. La ingesta continua de productos probióticos y prebióticos restablece los parámetros de una microbiota sana. Adicionalmente, se conoce que la formación de biopelículas de bacterias probióticas favorece la adherencia a la mucosa y el crecimiento estable de bacterias beneficiosas y un impacto mayor en los efectos positivos en la salud. El objetivo del presente estudio es detectar mediante herramientas de genómica comparativa secuencias asociadas a la formación de biopelículas en *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (*Lb. lactis*) y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*). Los resultados mostraron que la pilina se identificó en el 100 % de los genomas de *Lb. lactis* y de *Lb. bulgaricus* en forma de prepilina en un operón altamente conservado. La sortasa de clase A, gen que participa en la adherencia celular a superficies bióticas y abióticas, mostró una identidad superior al 97 % entre ambas subespecies. Enzimas de tipo glicosil-transferasa como la inulosucrasa, sólo se detectó en el genoma de *Lb. lactis*, con un 41 % de identidad y de acuerdo a la conservación de dominios tiene función de levansucrasa.

Palabras clave: biopelículas, genes y probióticos.

ABSTRACT

Obesity is a chronic condition that has become more prevalent in recent decades, and its origin is caused by a combination of factors, including the intestinal microbiota composition. The continuous intake of probiotics and prebiotics products restores the parameters of a healthy microbiota. Furthermore, it is known that the production of probiotic bacteria biofilms supports mucosal adhesion and persistent growth of beneficial bacteria, as well as a stronger impact on the favorable health implications. The aim of the present study was to detect sequences associated with biofilm formation in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (*Lb. lactis*) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) using comparative genomics tools. The findings revealed that pilin was found in the form of prepilin in a highly conserved operon in 100 percent of the genomes of *Lb. lactis* and *Lb. bulgaricus*. Class A sortase, a gene involved in cell adhesion to biotic and abiotic surfaces, showed more than 97 % identity between the two subspecies. Glycosyltransferase-like enzymes like inulosucrase were only found in the genome of *Lb. lactis*, with 41% identity and it has the function of levansucrase, based on domain conservation.

Keywords: biofilms, genes and probiotics.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de Salud Pública con mayor complejidad, trascendencia económica y social son las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECTN), pues su incidencia ha ido en aumento exponencial en las últimas décadas (Castiglione, 2015) y representan la causa de defunción más importante en el mundo con aproximadamente el 63 % de muertes anuales (OMS, 2013). La Organización Mundial de la Salud reportó que cerca de 2.8 millones de personas mueren anualmente por sobrepeso o condiciones asociadas a la obesidad como la hipertensión arterial, dislipidemia, cardiopatía coronaria asociada a resistencia a la insulina, entre otras. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Manejo Integral de la Obesidad (NOM-174-SSA1-1998), la obesidad y el sobrepeso se definen como una enfermedad crónica y se caracteriza por un aumento excesivo de tejido adiposo en el organismo que se manifiesta en conjunto de desórdenes metabólicos que afectan de forma general el bienestar físico, mental y social (SSA, 2000).

En la actualidad, la microbiota intestinal es un factor que tiene repercusión en el metabolismo energético y la obesidad; está interactúa con nuestro metabolismo en varios puntos (Turnbaugh et al. 2006). Backhed y colaboradores en el 2004 demostraron mediante modelos de ratones libres de gérmenes que las variaciones en la composición de la microbiota intestinal está relacionado con un aumento de los niveles séricos de glucosa, ácidos grasos de corta cadena, incremento en la producción de triglicéridos en el hígado, la adiposidad y reducción en la tolerancia a la glucosa. Establecida esta relación metabólica con la microbiota intestinal, numerosos trabajos se han enfocado en asociar los géneros bacterianos presentes en la microbiota intestinal de individuos con obesidad e individuos normopesos y el papel de organismos probióticos como alternativa para el tratamiento de esta afección crónica.

Según la OMS, los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del consumidor. A la fecha se conoce que existen factores importantes que afectan la capacidad de colonización y se ha demostrado que la formación de biopelículas permite el crecimiento estable de los organismos probióticos en la mucosa intestinal y una mayor duración de sus efectos benéficos (Bowen et al. 2011; Trujillo, 2017). Son pocos los estudios realizados con respecto a la descripción y caracterización de los elementos genómicos a la formación de biopelículas en las bacterias ácidos lácticas (BAL) empleadas como probióticos. Expuesta esta problemática, el objetivo principal del estudio es detectar genes asociados a la formación de las biopelículas en las especies *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Estas especies son empleadas en los cultivos iniciadores de derivados lácteos y se han demostrado sus propiedades como productos probióticos.

El uso de herramientas bioinformáticas de genómica comparativa mostró la presencia de tres genes asociados a la formación de biopelículas en las especies mencionadas, dos de estos se detectaron en el 100 % de los genomas analizados. El producto de estos genes son la pilina y la sortasa, relacionados con la adhesión a superficies e intervienen en la primera etapa de formación de biopelículas, lo que nos permite inferir que dichas especies presentan los elementos genéticos para desarrollar la formación de biopelículas en la superficie intestinal y se hace necesario describir los aspectos moleculares asociados vinculado a este tipo de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación y detección de genes relacionados con la formación de las biopelículas en el genoma de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Para ejecutar el objetivo planteado se consultó la literatura y se realizó una lista de genes asociados a la formación de biopelículas en BAL con evidencia experimental, y con especial enfoque en genes vinculados con la adherencia a superficies. Los genes elegidos fueron la pilina, la sortasa clase A y la Inulosucrasa. En cada caso, los genes se detectaron en el genoma de *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* KCCM 34717, mediante un alineamiento local de secuencias nucleotídicas y peptídicas, empleando el programa BLAST. Una vez detectada su secuencia se determinó su conservación en 12 genomas pertenecientes a la especie *Lb. ssp. bulgaricus* recuperados de la base de datos Genbank. Los genomas corresponden a las cepas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 11842 = JCM 1002, ND02, LJJ, KLDS1.1011, MN-BM-F01, 2038, KLDS1.0207, DSM 20080, ND04, ATCC BAA-365, ACA-DC 87, L99. Por último, se consultaron las bases de datos UniProt e InterPro para determinar a qué familia de proteína pertenecen y la organización de los dominios proteicos.

Determinación de unidades transcripcionales y operones en *L. bulgaricus*.

Para los genes de mayor conservación en los genomas de estudio se investigó el contexto genómico donde se encontraban. Esta parte del proyecto se realizó con el software Artemis que facilitó la localización y visualización de los genes previamente descritos y permitió analizar si los genes se encuentran en unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas. Para la determinación de operones tanto en *Lb. ssp. lactis* como en *Lb. ssp. bulgaricus*, se empleó el programa *Operon-mapper* y finalmente el paquete de visualización genómica VISTA para la comparación de ambos genomas de las subespecies estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proteínas de adhesión en el género *Lactobacillus* son fundamentales para la adherencia eficiente a las células epiteliales intestinales, dar lugar a la agregación y la formación de las biopelículas (Leeber et al. 2012). La secuencia nucleotídica de la pilina, proteína involucrada en la adhesión y agregación se identificó con el nombre de *Prepilin-type N-terminal* de 324 nucleótidos proveniente de *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* KCCM 34717 con las coordenadas genómicas 1151290-1151613. El alineamiento local de la secuencia de nucleótidos con los genomas previamente mencionados de *Lb. bulgaricus* mostró que el gen de la pre-pilina se encuentra en el 100 % de los genomas con alta conservación, y posee un porcentaje de identidad inferior a 98.77 % y superior a 97.20 %. Por su parte, la secuencia peptídica mostró pocas variaciones y sólo se detectaron modificaciones en 3 aminoácidos que se encuentran en lazos de unión entre dominios, Tabla I. La secuencia peptídica de la pre-pilina, pertenece a la familia de la proteína de competencia Com GC, y conserva diferentes elementos como el sitio de metilación procarionota N-terminal, el dominio de escisión N-terminal y el motivo de metilación procarionota N-terminal. Dicha proteína no presenta función anotada para los genomas ND02, LJJ y ND04.

El análisis del contexto genómico mostró que el gen correspondiente a la pre-pilina se encuentra en un operón asociado a la síntesis de proteínas de membrana como el gen *tadA* que participa en la vía de secreción tipo II, Figura 1. Al realizar un conteo de operones, sólo se detectaron 269 en el genoma de *Lb. lactis*. Los operones relacionados a síntesis de compuestos y los operones ribosomales se detectaron fácilmente, sin embargo, el programa *Operon-mapper* no detectó el operón en el que se encuentra la pre-

pilina, suponemos que esto se debe a que parte de las secuencias no presentan funciones anotadas en el archivo Genbank correspondiente al genoma de *Lb. lactis*. La comparación con el genoma de *Lb. bulgaricus* DSM 20080 reveló una alta conservación y la preservación del operón donde se encuentra la pre-pilina.

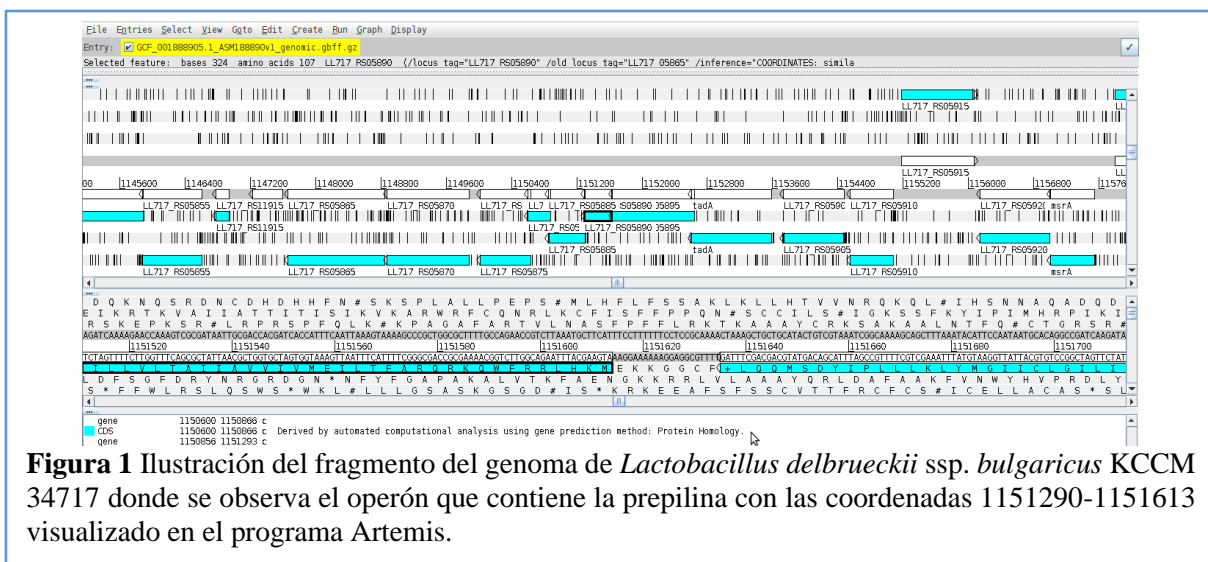


Figura 1 Ilustración del fragmento del genoma de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* KCCM 34717 donde se observa el operón que contiene la prepilina con las coordenadas 1151290-1151613 visualizado en el programa Artemis.

Tabla I. Alineamiento de las secuencias peptídicas de la Prepilin-type N-terminal de *Lb. lactis* KCCM 34717, (1151290-1151613) con respecto a los genomas de *Lb. bulgaricus*.

Nombre de cepas de <i>Lb. bulgaricus</i>	% Id	Posición de cambio (Aminoácidos sustituidos)
ATCC 11842 = JCM 1002, KLDS1.1011, MN-MB-F01, 2038, KLDS1.0207, DSM20080, ATCC BAA-365, ACA-DC 87, L99.	98.14 %	Q9P, V21L
ND02	98.14 %	Q9P, A73V
LJ	97.20 %	Q9P, V21L, A98V
ND04	97.20 %	Q9P, V21L, G100V

Los resultados del gen *srtA*, que participa en el anclaje de la pilina a la pared celular (Oxaran et al. 2012) mostró su presencia en el 100 % de los genomas de *Lb. bulgaricus* con un rango de identidad entre 99.29 % y 98.15 %, Tabla II. El gen se localizó en las coordenadas genómicas 553977-554678 en *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* strain KCCM 34717. De acuerdo con Guiton et al. en 2009, factores como las sortasas, la autolisina y el ADN extracelular se han asociado a la producción de las biopelículas. Evidencias experimentales revelan que, cuando es eliminado el gen *srtA* se ve afectada la etapa de maduración de biopelículas en *Enterococcus faecalis*. En el caso de *Lb. bulgaricus* y *Lb. lactis* el gen de la *srtA* se encuentra en el mismo operón que los genes *hrcA*, *dnaK*, *dnaJ*, *lepA* y *recJ*, que están relacionados con procesos de reparación y recombinación del ADN. Este hallazgo explica la relación que tiene la expresión *srtA* en la adquisición de ADN exógeno. Por su parte, el alineamiento realizado con respecto al gen de la inulosucrasa no detectó secuencias homólogas en los genomas seleccionados de *Lb. bulgaricus* y *Lb. lactis* KCCM 34717. Sin embargo, al comparar la secuencia peptídica se detectó homología con una secuencia peptídica codificada en el genoma de *L. delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20072, con 44 % de identidad. La secuencia peptídica de la inulosucrasa tiene un tamaño de 798 aminoácidos.

Tabla II. Alineamiento de las secuencias peptídicas de la sortasa, de *Lb. lactis* KCCM 34717, (1151290-1151613) con respecto a los genomas de *Lb. bulgaricus*.

Nombre de cepas de <i>Lb. bulgaricus</i>	% Id	Posición de cambio (Aminoácidos sustituidos)
ATCC 11842 = JCM 1002, KLDS1.1011, MN-BM-F01, KLDS1.0207, DSM 20080 y ND04.	99.15 %	A148G, N204D
ND02	99.57 %	V103I
LJJ	98.71 %	A148G, D182G, N204D
2038	99.15 %	Y176D, N204D
ATCC BAA-365	98.71 %	R16S, A148T, N204D
ACA-DC 87	99.15 %	A94T, N204D
L99	99.14 %	N204D

El gen codificante a la inulosucrasa se reportó en el genoma de *Lactobacillus reuteri* TMW 1106 está asociado a la formación de biopelículas. *L. reuteri* es una BAL que forma biopelículas y se ha encontrado con mayor prevalencia en individuos con obesidad que en individuos con normopeso (Million et, al 2012), hecho que lo relaciona con problemas de obesidad, sin embargo, Jones y colaboradores en el 2009, demostraron que la biopelícula formadas por *L. reuteri* modula la producción de citocinas y produce sustancias antiinflamatorias. Por tanto, detectar secuencias homólogas con respecto a esta enzima es un elemento importante para deducir los factores genéticos asociados a la formación de biopelículas. Esta proteína pertenece al grupo de las fructosiltransferasas, enzimas responsables de catalizar la formación de polímeros de fructosa ya sean lineales o ramificados a partir de sacarosa y son sintetizados por un amplio rango de bacterias (Dedonder, 1996). La inulosucrasa, está directamente relacionada con el metabolismo de la inulina, polímero de fructosa y sustancia utilizada como prebiótico e inductora de crecimiento del género *Lactobacillus* (López-Mungía, 2013). La repetición del análisis de alineamiento con un mayor rango de flexibilidad, mostró similitud con proteínas hipotéticas, en los genomas seleccionados de *Lb. bulgaricus* 2038, *Lb. bulgaricus* ATCC 11842 (JCM 1002) y *Lb. bulgaricus* ATCC BAA-365, con una longitud de 321, 162 y 381 aminoácidos respectivamente. Las bases de datos UniProt y Pfam mostraron que la secuencia peptídica recuperada pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas y levansucrasa/invertasas y comparten el dominio de las proteínas de superficie en bacterias gram positivas. Este resultado es altamente significativo, puesto que las especies pertenecientes al grupo de *Lactobacillus delbrueckii* presentan genomas muy similares, de hecho, no se pueden diferenciar al utilizar la secuencia del *rrs* que codifica el RNA 16S. Nuestro hallazgo confirma el hecho de utilizar la fermentación de azúcares como ensayo para caracterizar las diferentes especies y subespecies dentro del grupo de los lactobacilos, incluso aquellos genéticamente idénticos como los representantes del grupo de *Lactobacillus delbrueckii*.

Lb. lactis y *Lb. bulgaricus* son dos subespecies dentro del grupo de *Lactobacillus delbrueckii*, con genes altamente conservados. Según los resultados encontrados en el presente estudio se concluye que, las especies *Lb. lactis* y *Lb. bulgaricus* presentan elementos genéticos para formar biopelículas, especialmente los genes relacionados a mecanismos de adhesión, la pilina y el gen *srtA*, correspondientes a la primera etapa de formación de biopelículas. Ambas especies son utilizadas de forma comercial como cultivos iniciadores en la producción de derivados lácteos y consideradas organismos probióticos que ofrecen beneficios a la salud humana, sin embargo, aún no existen investigaciones profundas acerca de la formación de crecimiento de tipo biopelículas en la mucosa intestinal. Los genes detectados como la pilina y la *srtA* forman parte de unidades policistrónicas conservadas, por lo que es necesario realizar estudios enfocados a revelar qué estímulos ambientales y redes de interacción biológica están vinculados a la formación de biopelículas.

BIBLIOGRAFÍA

- Castiglione, M. S. (2015). Las enfermedades crónicas no transmisibles. *Revista de Direito Sanitário*, 15(2), 66–72.
- World Health Organization. (2013). 10 datos sobre las enfermedades no transmisibles. OMS. https://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/es/
- Secretaria de Salud. (2000). NORMA Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad. *Salud.gb.mx*. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/174ssa18.html>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(712), 1027–1031.
- Bowen, W., & Koo, H. (2011). Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45(1), 69–86.
- Trujillo M (2017). Microbial biofilms, Universidad de La Laguna, 1-30.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., de Vos, W. M., De Keersmaecker, S. C. J., & Vanderleyden, J. (2011). Functional Analysis of Lactobacillus rhamnosus GG Pili in Relation to Adhesion and Immunomodulatory Interactions with Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 185–193.
- Guiton, P. S., Hung, C. S., Kline, K. A., Roth, R., Kau, A. L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K. W., Caparon, M. G., & Hultgren, S. J. (2009). Contribution of Autolysin and Sortase A during Enterococcus faecalis DNA-Dependent Biofilm Development. *Infection and Immunity*, 77(9), 3626–3638.
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J. M., Péchoux, C., Meylheuc, T., Briandet, R., Juillard, V., & Piard, J. C. (2012). Pilus Biogenesis in Lactococcus lactis: Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation. *PLOS ONE*, 7(12).
- M. E., & López-Mungía, A. (2013). Caracterización de la inulosacarasa de Leuconostoc citreum CW28. *Instituto de Biotecnología UNAM*, 1.
- Dedonder, R. (1966). Levansucrase from Bacillus subtilis. *Methods in Enzymology*, 500–505.
- Rutherford, Kim & Parkhill, Julian & Crook, James & Horsnell, Terry & Rice, Peter & Rajandream, Marie-Adèle & Barrell, Bart. (2000). Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16. 944-5.
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., Merino, E., (2018). Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes, *Bioinformatics*, 34, (4118–4120).
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M., & Dubchak, I. (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), 273–279.
- Million, M.; Maraninchi, M.; Henry, M.; Armougom, F.; Richet, H.; Carrieri, P.; Valero, R.; Raccach, D.; Viale, B.; Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. *International Journal of Obesity*, 36, 817–825.
- Jones, S.E., Versalovic, J. (2009). Probiotic Lactobacillus reuteri biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol* 9, 35.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15718–15723.