

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Estudio de la expresión diferencial de proteínas de  
*Fusobacterium nucleatum* en biofilm vs. en estado  
planctónico**

Tutor: Profesor Doctor Mariano Sanz

Martina La Rosa

Madrid, 2016

# **Índice**

Resumen.....	2
<b>1. Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>12</b>
3.1 Cultivo y cepa bacteriana.....	12
3.2 Formación del biofilm monoespecie de <i>F. nucleatum</i> .....	12
3.3 Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico.....	13
3.4 Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas.....	13
3.5 Cuantificación de las muestras proteicas.....	15
3.6 Electroforesis bidimensional.....	16
3.6.1 Primera dimensión.....	16
3.6.2 Equilibrado tiras.....	16
3.6.3 Segunda dimensión.....	17
3.7 Identificación de las proteínas diferenciales.....	17
3.7.1 Tinción de geles con Coomassie coloidal.....	17
<b>4. Resultados.....</b>	<b>19</b>
4.1 Desarrollo del biofilm y el cultivo planctónico.....	19
4.2 Estudio de la expresión diferencial.....	20
<b>5. Discusión y conclusión .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Perspectivas futuras.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>27</b>

## **Resumen**

**Introducción:** Un biofilm es una comunidad de microorganismos sésiles que se caracteriza porque todas las células están irreversiblemente unidas a un sustrato o entre sí, y se hayan incluidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellas mismas, exhibiendo un fenotipo respecto a su tasa de crecimiento y expresión génica diferente al de los mismos microorganismos en estado planctónico. (Donlan & Costerton 2002). Estudios previos han establecido que la expresión del genoma bacteriano puede alterarse notablemente cuando las células forman un biofilm, lo que resulta que en muchos organismos se expresa un fenotipo radicalmente diferente tras la adhesión a una superficie (Marsh et al 2005).

**Objetivo:** El propósito de este estudio ha sido el análisis de la expresión diferencial de proteínas de *Fusobacterium nucleatum* DSM20482 cuando está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico. De esta forma, se pueden encontrar posibles blancos para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de bacterias patógenas a la placa bacteriana, e identificar proteínas que se expresan en la fase de biofilm claramente implicadas en la producción de una respuesta inmunogénica en el huésped y que podrían utilizarse en una primera aproximación como biomarcadores de la enfermedad periodontal.

**Material y Métodos:** Para el estudio de las proteínas diferenciales de *F. nucleatum* se desarrolló el biofilm de esta especie sobre portas (slides) cubiertos de hidroxiapatita con una concentración bacteriana de  $10^7$  unidades formadoras de colonias (ufc/mL) y 24 horas de incubación. El cultivo planctónico se realizó en las mismas condiciones. Después de la recuperación de las bacterias que están en el biofilm y en el cultivo planctónico, se procedió a la rotura de la célula en un tampón

adecuado y a la extracción de las proteínas bacterianas en ambos estados. Posteriormente, se limpiaron las muestras para eliminar impurezas que interfiriesen en la electroforesis bidimensional, se solubilizaron las proteínas y se cuantificaron por el método Bradford. Para comprobar la cantidad y calidad de las muestras proteicas se llevó a cabo a la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

**Resultados y Conclusiones:** Se ha puesto a punto la técnica de electroforesis bidimensional para el estudio de la expresión diferencial de proteínas de *F. nucleatum* cuando crece en estado de biofilm frente a cuando lo hace en estado planctónico. La separación e identificación de estas proteínas diferenciales nos va a proporcionar información sobre el desarrollo del biofilm de esta bacteria y la posible implicación de éste en la virulencia de la bacteria durante la enfermedad periodontal.

## **Introducción**

Con el termino “enfermedades periodontales” se describen las enfermedades de tipo infeccioso (Loe, Theilade et al 1965; Lindhe, Hamp et al 1975; Lindhe and Rylander 1975) que determinan cambios inflamatorios de las estructuras de soporte del diente, como son, la encía, el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento de la raíz. Tales cambios pueden conducir a la destrucción del tejido, a un soporte reducido del diente, y en última instancia, a la pérdida del elemento dentario. En los elementos periodontalmente sanos, la encía rodea los dientes aproximadamente al nivel de la unión cemento-esmalte y forma un surco superficial, que varía en profundidad entre uno y cuatro milímetros, en función de la anatomía local. Una acumulación de la placa dental sin alguna perturbación, en otras palabras, la biopelícula bacteriana que se forma sobre la superficie del diente en la zona del margen gingival, provoca una respuesta inflamatoria local. Esta lesión inflamatoria se denomina gingivitis, que se manifiesta a través de alteraciones en el color y en la textura de la encía, y por lo general se acompaña de sangrado tras la estimulación mecánica. En individuos susceptibles, la acumulación prolongada de la placa dental causa una inflamación que pueda resultar en la profundización gradual del surco gingival (denominado "bolsa periodontal") y en la destrucción concomitante del ligamento periodontal y el hueso alveolar, una condición patológica denominada periodontitis.

Debido al papel principal de las bacterias en la enfermedad periodontal (Socransky, Haffajee et al 1998), desde hace años se ha profundizado en el estudio de éstas con el fin de detener el avance de la enfermedad y establecer una situación de simbiosis entre el huésped y la microbiota oral. Dichas bacterias colonizan las

superficies tanto mucosas como dentales en la boca, formando estructuras tridimensionales compuestas por multitud de especies, denominadas biofilms.

Mucho de lo que se sabe actualmente sobre las propiedades y el metabolismo de las bacterias orales se ha aprendido del estudio de cultivos puros de especies individuales que crecen en probeta; esta forma de estudiar el comportamiento de las bacterias era la más conveniente y fiable. Sin embargo, el crecimiento de las poblaciones bacterianas en suspensión en medio líquido no es el modo normal de crecimiento de éstas en la cavidad oral, ya que aquí los microorganismos se organizan generalmente en biofilms. De hecho, la definición más simple de un biofilm es "un conjunto de microorganismos que colonizan una superficie y que están embebidos en una matriz rica en polímero". La placa dental es un ejemplo típico de un biofilm. Es importante destacar que, el reconocimiento de la microbiota oral, es fundamental para la comprensión de la ecología microbiana oral y el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Nuestra concepción de la formación de la placa dental se ha ampliado en los últimos años como consecuencia del desarrollo de varias metodologías poderosas para el estudio de los ecosistemas microbianos. El desarrollo de la microscopía confocal y otras técnicas microscópicas avanzadas, así como los enfoques moleculares para identificar y cuantificar las especies bacterianas no cultivables, ha revolucionado el estudio de la placa dental. Se ha sugerido que la mayoría de las bacterias no sobreviven en la naturaleza como organismos unicelulares pero sí lo hacen como biofilms o biopelículas. (Jenkinson 2014).

Estudios previos han establecido que la expresión del genoma bacteriano puede alterarse notablemente cuando las células forman un biofilm, lo que resulta que en muchos organismos se expresa un fenotipo radicalmente diferente tras la adhesión a una superficie (Marsh et al 2005). Además, la unión de las bacterias a receptores específicos del huésped también puede provocar cambios significativos en los patrones de expresión génica del mismo huésped.

El biofilm contiene múltiples especies bacterianas que presentan una amplia gama de interacciones físicas, metabólicas y moleculares. La cooperación entre varias especies de la comunidad microbiana proporciona diferentes ventajas potenciales para los organismos que la componen (Caldwell et al 1997; Shapiro et al 1998; Marsh & Bowden 2000.). Tales ventajas incluyen: un amplio rango de habitats para el crecimiento, un aumento de la eficiencia y diversidad metabólicas, una mejoría en la tolerancia a estrés ambiental, agentes antimicrobianos y factores de defensas del huésped, y por último, un aumento en la capacidad de causar enfermedad.

Los microorganismos que se encuentran en biofilms multiespecies no están distribuidos al azar sino que están organizados a nivel espacial y funcional. Los biofilms dentales se forman a través de una secuencia ordenada de eventos, los cuales resultan en una biopelícula microbiana estructuralmente y funcionalmente organizada. (Socransky y Haffajee 2002; Marsh et al 2005;. Kolenbrander et al 2006;. Marsh et al 2011). Las distintas etapas en la formación de la biopelícula dental incluyen:

1. La formación de la película adquirida.
2. La adhesión reversible entre la superficie de la célula microbiana y la película.
3. Un aumento de interacciones permanentes entre moléculas específicas de la superficie celular microbiana (adhesinas) y moléculas complementarias (receptores) presentes en la película.
4. La co-adherencia, en la que los colonizadores secundarios se adhieren a los receptores de las bacterias ya presentes en la superficie glicoproteica (Kolenbrander et al 2010), lo que lleva a un aumento en la diversidad microbiana.
5. La multiplicación de las células, lo que lleva a un aumento en la biomasa y la síntesis de exopolímeros para formar la matriz del biofilm (maduración placa).
6. El desprendimiento de células unidas para promover la colonización en otros lugares.

Un organismo clave en el desarrollo del biofilm de placa es *Fusobacterium nucleatum*. Esta especie puede co-adherirse a la mayoría de las bacterias orales, y actúa como un importante organismo “puente” entre las especies colonizadoras pioneras y tardías. La co-adhesión puede ayudar a asegurar que las bacterias se unan a otros organismos con funciones metabólicas complementarias.

*F. nucleatum* es una bacteria anaerobia gram-negativa (Baumgartner et al. 1992) y es uno de los organismos más detectados en las bolsas periodontales (Bolstad et al. 1996). Aunque *F. nucleatum* es también una de las especies más

comunes que se encuentran en el surco subgingival incluso en ausencia de la enfermedad (Bolstad et al. 1996), la categorización de esta bacteria como un patógeno tradicional o comensal es discutible. Sin embargo, en los modelos actuales de patogenicidad oral, los estados de salud o enfermedad no se estudiaron en el contexto de un solo organismo patógeno, sino más bien en el ámbito de la disbiosis de comunidades microbianas enteras (Hajishengallis y Lamont 2012).

*F. nucleatum* codifica varias adhesinas necesarias para las interacciones interespecies, incluyendo Fap2, RadD, y Aid1 (Kaplan et al 2010, Kaplan et al 2014). También se une a una variedad de células de mamífero, como células epiteliales y endoteliales, polimorfonucleares (PMNs), monocitos, eritrocitos, fibroblastos, y células NK, así como moléculas del huésped tales como macromoléculas salivales, proteínas de la matriz extracelular, la IgG humana, y cadherinas (Han et al 2000, Han et al 2004, Han et al 2011, Bachard et al 2006). La adhesión y la invasión son mecanismos esenciales para la colonización, la difusión, la evasión de defensa del huésped, y la inducción de respuestas inmunitarias.

Esta bacteria provoca diferentes respuestas del huésped (Han et al 2011). Induce  $\beta$ -defensinas a partir de células epiteliales orales a través de la proteína Fad-I humana (Gupta et al 2010), estimula los factores que predisponen a la aterosclerosis mediante GroEL (Kostic et al 2012) y activa la apoptosis de los linfocitos por Fap2 y RadD (Kaplan et al 2010). *F. nucleatum* es un potente estimulador de citoquinas inflamatorias, IL-6, IL-8 y TNF (Han et al 2000, Park et al 2014). También la unión de *F. nucleatum* a las células NK activa la respuesta inflamatoria implicada en la enfermedad periodontal (Chaushu et al 2012) Las infecciones periodontales son procesos complicados que requieren la comprensión

tanto de la flora microbiana y de los componentes inmunológicos del huésped, así como la interacción entre estos dos factores.

*F. nucleatum* también, además, de ser conocido por su capacidad de adherirse a diversas bacterias patógenas (Kolenbrander et al 1989), tiene la capacidad de reducir los niveles de oxígeno, ayudando así a los organismos menos aerotolerantes como *Porphyromonas. gingivalis* (Bradshaw y Marsh, 1998).

La secuenciación del genoma de un alto número de especies ha conducido a lo que se llama la era de la post-genómica. En 1994, Wilkins introdujo el término de proteoma como equivalente lingüístico al concepto del genoma (Sorimachi et al 1989). El proteoma se define como el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma. La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, cómo en la enfermedad, en los factores ambientales y fisiológicos como la edad, el estrés, y los agentes tóxicos y/o fármacos (Ono et al 2004, Kinbara et al 1998).

La electroforesis bidimensional es un método ampliamente utilizado para el análisis de mezclas complejas de proteínas extraídas de células, tejidos y otras muestras biológicas. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes: primero en función de su punto isoeléctrico, y segundo, en función de su masa molecular.

El estudio de la enfermedad periodontal a nivel proteómico se ha convertido cada vez más popular en los últimos años, como resultado de las mejoras en las tecnologías de la biología molecular. Esto ha permitido desarrollar estudios de la

expresión de proteínas en el líquido cervical gingival (GCF), por ejemplo. Se han llevado a cabo estudios *in vitro* sobre el proteoma celular y biofilms de especies múltiples o sobre modelos de infección en la interacción huésped-biofilm; todos los cuales tiene como objetivo el ampliar el conocimiento de las infecciones periodontales.

## **Objetivos**

El propósito de este estudio ha sido el estudio de la expresión diferencial de proteínas de *F. nucleatum* cuando está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico.

### **Objetivos Específicos**

- Búsqueda de proteínas que se expresan diferencialmente en el biofilm respecto al estado planctónico, como posibles blancos para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de bacterianas patógenas a la placa bacteriana;
- Identificar proteínas que se expresan exclusivamente en la fase de biofilm claramente implicadas en producir una respuesta inmunogénica en el huésped y por tanto, podrían utilizarse en una primera aproximación como biomarcadores de la enfermedad periodontal

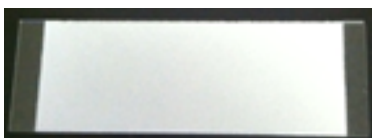
## **Materiales y Métodos**

### **Cultivo y cepa bacteriana**

La cepa utilizada en este trabajo ha sido *Fusobacterium nucleatum* DSM20482. La bacteria se cultivó en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) suplementado con un 5% de sangre de caballo (Oxoid), Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L) en condiciones de anaerobiosis (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y balance N<sub>2</sub>) a 37°C. Para el crecimiento en biofilm y en estado planctónico se utilizó el medio BHI modificado [medio Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company; USA), suplementado con Mucina (2,5 g/L), Extracto de levadura (1,0 g/L), Cisteína (0,1 g/L), Bicarbonato sódico (2,0 g/L), Hemina (5 mg/L), Menadiona (1 mg/L) y 0,25% de ácido glutámico (v/v)] en condiciones de anaerobiosis a 37°C.

### **Formación del biofilm mono especie de *F. nucleatum***

El biofilm mono especie se desarrolló sobre unos cristales (slides) de 7.5 cm x 2.5 cm cubiertos de hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA) (Figura 1) en una placa Petri. Por otro lado, el cultivo planctónico se incubó en unos tubos de plástico de 50 mL tipo Falcon.



**Figura 1.** Slide cubierto de hidroxiapatita

En ambos casos, a partir de un cultivo bacteriano de *F. nucleatum* en fase exponencial en medio BHI modificado, se ajustó la concentración bacteriana a  $10^7$  unidades formadoras de colonia (ufc)/mL y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 24 horas.

### **Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico**

Para recuperar las bacterias que forman el biofilm en esta superficie (slide) se procedió de la siguiente forma: se extrajo el slide de una placa de cultivo Petri y se añadió 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) raspando el biofilm con un rascador de células (scraper), recogiendo la suspensión, añadiéndola a un eppendorf y guardando a -20°C. Para recuperar las bacterias en estado planctónico, se centrifugó la suspensión bacteriana a 9000 rpm 10 min y el pellet se guardó a -20°C.

### **Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas**

El siguiente paso fue la extracción de las proteínas bacterianas que se encontraban en el biofilm y en las células planctónicas; y para ello, había que proceder a la rotura de la célula en un tampón adecuado para evitar la lisis de las proteínas, la agregación proteica y favorecer la resuspensión de éstas. Primero se centrifugaron las muestras de biofilm a 13000 rpm 5 minutos a 4°C para retirar el PBS y añadir el buffer adecuado (250 µL) para proceder a la extracción proteica. En el caso de las muestras de planctónico, se añadió al pellet el mismo buffer (3.5 mL) que se utilizó con las muestras de biofilm. Este buffer estaba compuesto de lo siguiente: PBS + 100 mM Dithiothreitol (DTT, agente reductor) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) + 100 mM Fluoruro de metil fenil sulfonato (PMSF, inhibidor de

proteasas) (Sigma, St. Louis, MO, USA) + mezcla nucleasa (GE Healthcare) + cocktail inhibidor proteasas 10X (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Germany).

Para romper y liberar el contenido celular, el método empleado fue la sonicación que consiste en la rotura de las membranas bacterianas producida por ondas de ultrasonido mediante un sonicador ultrasónico de punta (con 20 pulsos discontinuos de 10s y 1 pulso continuo de 10s). Posteriormente, se centrifugó para descartar el “debris” celular.

Una vez que se procedió a la ruptura de la membrana bacteriana y a la extracción proteica, debía realizarse la limpieza de la muestra para eliminar posibles restos de sales, detergentes, lípidos e impurezas varias, que van a interferir en el proceso de separación proteica por isoelectroenfoque que tiene lugar en la realización de los geles bidimensionales. Se observó que, tanto para las proteínas del biofilm como para las proteínas de las células planctónicas, el proceso óptimo era la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) al 10% y el lavado del pellet con el buffer de lavado de un kit de limpieza de la muestra (2D Clean-Up™ Kit (GE Healthcare)).

Las proteínas precipitadas debían ser resuspendidas y solubilizadas adecuadamente para poder ser separadas mediante los geles bidimensionales. Para resuspenderlas se empleó el buffer de solubilización DIGE™ (25mM Tris (GE Healthcare), 7M urea (GE Healthcare), 2M tiourea (GE Healthcare), 4% CHAPS (detergente zwitterónico) (GE Healthcare)) y se agitaron de forma constante durante 2h y media a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un paso intermedio de resuspensión en un baño de ultrasonidos (para favorecer la solubilización): las muestras se sometieron a ultrasonidos cuatro veces durante 5 min (poniéndolas en

hielo cada vez). Posteriormente, las muestras se centrifugaron para eliminar todo aquello que no se había solubilizado.

### **Cuantificación de las muestras proteicas**

El siguiente paso se correspondía con la cuantificación proteica de las muestras. Para ello, se utilizó el método Bradford que consistía en añadir el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a las muestras, incubar y medir la absorbancia a 595 nm empleando una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida.

Tras cuantificar las muestras, se procedió a la verificación mediante control de carga en un gel SDS-PAGE (condiciones desnaturizantes). Para ello se tomaron 20 µg de cada una de las muestras y se les añadió un volumen igual de tampón de carga (2x), que contenía 100mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS (dodecil sulfato sódico), 20% glicerol, azul de bromofenol y 200mM DTT. Las muestras se desnaturalizaron (incubando 5 min a 95°C y 2 min en hielo) y se centrifugaron a 13000 rpm 2 min. Para la electroforesis SDS-PAGE, se utilizó el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida se hicieron al 10% y el patrón de pesos moleculares que se empleó fue Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). El tampón de electroforesis que se utilizó contenía Tris 25mM, glicina 250mM y SDS 0.1%. El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 (0.25% azul de Coomassie R-250, 50% metanol, 9% ácido acético, 41% agua MilliQ (agua de máxima pureza)) durante al menos 2 horas y se destiñó con la solución de desteñido (40% metanol, 7% ácido acético, 53% agua MilliQ) hasta que se observaron las bandas proteicas correspondientes de biofilm y de estado planctónico de *F. nucleatum*.

## **Electroforesis bidimensional**

### **Primera dimensión**

En la primera dimensión, el gradiente de pH inmovilizado se encuentra presente en una tira seca que contiene una matriz de gel de poliacrilamida donde el gradiente de pH se ha generado mediante anfolitos. Esta tira debe hidratarse para poder trabajar con ella.

Se usaron tiras IPG (Immobilized pH gradients ) de pH entre 3 y 11 no lineal (*Immobiline™ DryStrip*, 18 cm, GE Healthcare) que se rehidrataron sin la muestra, con 340  $\mu$ L de solución de hidratación (8M urea, 4% CHAPS, 13 mM DTT, 1% anfolitos, trazas azul de bromofenol) entre 12 y 20 horas, cubriéndose con aceite mineral en la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) (hidratación pasiva). Posteriormente, las muestras (150  $\mu$ g) en las que se incluía muestra “pool” biofilm, muestra “pool” planctónico y estándar interno, se cargaron mediante pocillo (*Ettan IPGphor Cup Loading Manifold*, GE Healthcare). Para ello, a las muestras se les añadió tampón de carga 2x (8M urea, 4% CHAPS, 130 mM DTT, 2% anfolitos), se dejó actuar 10 min y tras centrifugar las muestras, éstas se cargaron en las tiras IPG rehidratadas. El programa de isoelectroenfoque que se utilizó fue el siguiente: 120 V, 1 hora; 300 V, 3 horas; de 300 a 1000 V en gradiente, 6 horas; de 1000 a 8000 V en gradiente, 3 horas; 8000 V, 7.5 horas; 500 V, 10 horas.

### **Equilibrado tiras**

Después de la primera dimensión, tiene lugar el equilibrado de las tiras. Este paso de equilibrado satura la tira de gradiente con el sistema de tampón SDS que se requiere para la separación en la segunda dimensión. Esta solución de equilibrado contiene: 6M urea, 30% glicerol, 50mM Tris-HCl pH 6.8 y 2% SDS. Primero se

equilibraron las tiras dejándolas 15 min en agitación suave en solución de equilibrado con 2%DTT y otros 15 min en solución de equilibrado con 2.5% iodoacetamida y azul de bromofenol.

### **Segunda dimensión**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 11.5% de acrilamida, sobre los que se depositaron las tiras IPG equilibradas y se sellaron con una solución de tampón de electroforesis con 0.5% de agarosa fundida. La electroforesis se llevó a cabo en el dispositivo *Ettan DaltSix Electrophoresis System* (GE Healthcare) con tampón de electroforesis 1x (25mM Tris, 192mM glicina, 0.2% SDS) en la cubeta inferior y tampón de electroforesis 2x (50mM Tris, 384mM glicina, 0.4% SDS) en la cubeta superior. La electroforesis se realizó a 1W/gel durante 1 hora y hasta un máximo de 17W/gel hasta su finalización.

### **Identificación de las proteínas diferenciales**

#### **Tinción de geles con Coomassie coloidal**

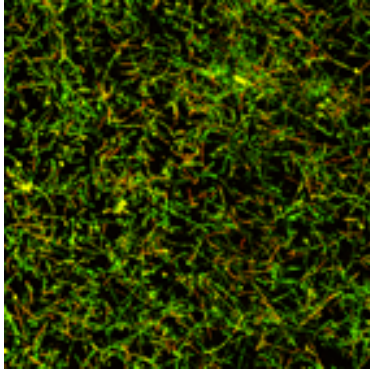
Para identificar las proteínas diferenciales, se tiñeron los geles bidimensionales con el método de Coomassie coloidal. Este método es compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Los pasos a desarrollar son los siguientes: los geles se fijaron con solución de fijación (50% etanol, 2% ácido fosfórico) un mínimo de 3 horas, tras lo que se hicieron tres lavados con agua MilliQ de 10 min cada uno para eliminar la solución de fijación. Los geles se dejaron agitándose en una solución de 17% sulfato amónico, 3% ácido fosfórico y 33% metanol durante una hora, tras lo cual se les añadió una solución de 5 mL de Coomassie Blue G-250 (Fluka, St. Louis, MO, USA) al 6.6% en metanol y se dejó en

agitación durante toda la noche. Después se destiñeron con sucesivos lavados con agua MilliQ hasta quedar visibles las manchas proteicas.

## **Resultados**

### **Desarrollo del biofilm y el cultivo planctónico**

Debido a la complejidad en el estudio de la expresión diferencial de proteínas bacterianas presentes en el biofilm y en células planctónicas mediante herramientas proteómicas basadas en geles bidimensionales, se procedió a la formación de dicho biofilm pero generado con una sola especie bacteriana (monoespecie) con la bacteria periodontopatógena *F. nucleatum*. Para ello se puso a punto la formación del biofilm (concentración de células y días de incubación empleados). Primero, se ensayaron las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$  y  $10^8$  ufc/mL de suspensión bacteriana en fase exponencial crecida en medio BHI modificado; y los biofilms se generaron sobre estos slides a los tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Se comprobó por CLSM (Microscopia Laser Confocal - Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM, por sus siglas en inglés) (Figura 2) y mediante análisis por cultivo bacteriano, que la concentración óptima era de  $10^7$  ufc/mL y el periodo óptimo de incubación era de 24 horas. En el caso de las células en estado planctónico se realizaron las mismas comprobaciones y se concluyó que la concentración de  $10^7$  ufc/mL y el tiempo de 24 horas eran los óptimos para la formación del biofilm en esta bacteria.

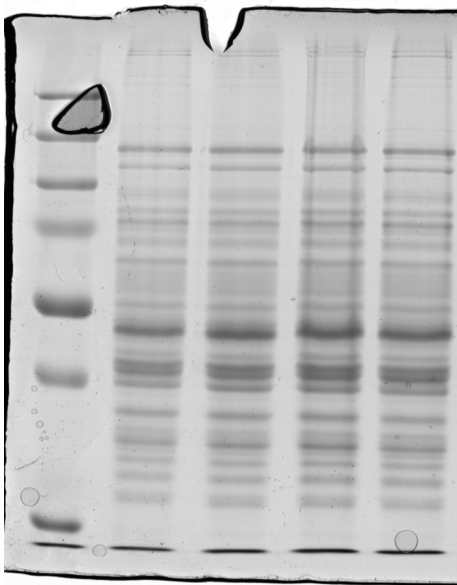


**Figura 2.** Imagen de Microscopia Confocal perteneciente a un biofilm de *F. nucleatum* ( $10^7$  ufc/mL) de 24 horas de incubación sobre slide cubierto de hidroxiapatita. <sup>9</sup>

### **Estudio de la expresión diferencial**

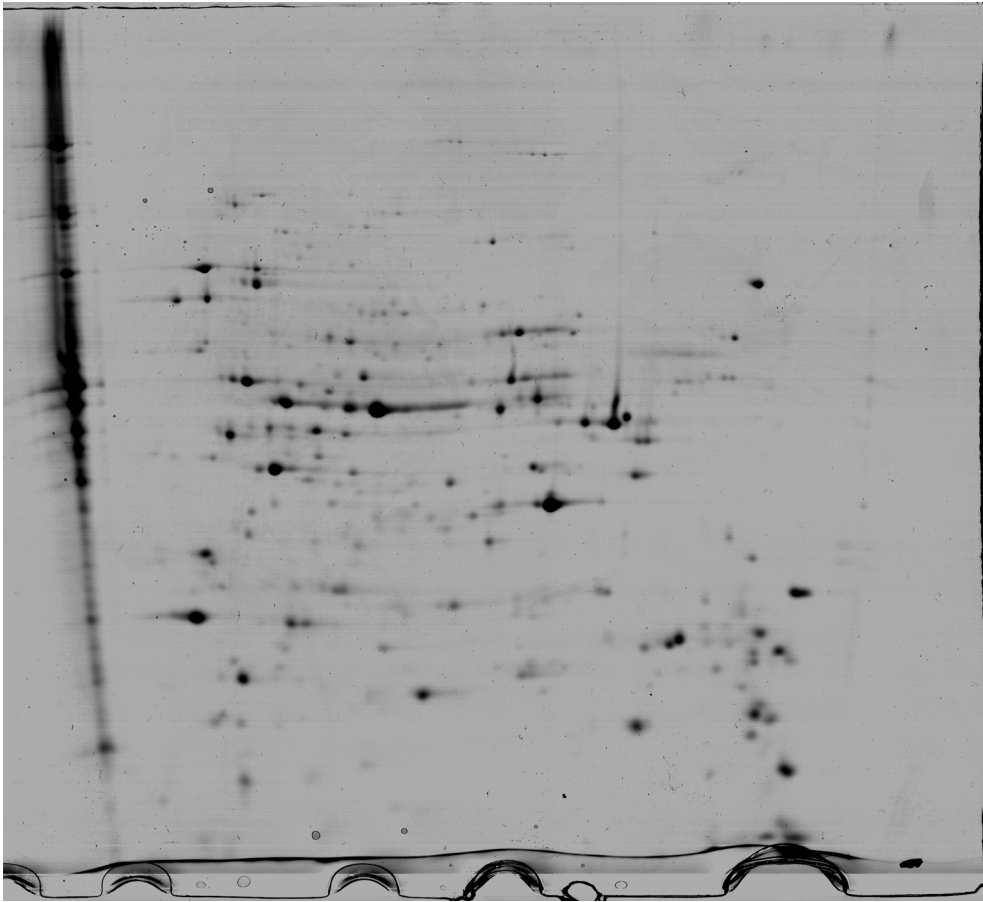
Para la realización del ensayo, se obtuvieron 24 experimentos independientes llevados a cabo en 24 días distintos en los que se comparaba biofilm vs. planctónico en las mismas condiciones. Toda la metodología se realizó de la misma forma para ambos estados (biofilm y planctónico). La recuperación de las bacterias, la extracción proteica, la limpieza y la solubilización de las proteínas se hizo como se ha descrito en Materiales y Métodos. Tras llevar a cabo la cuantificación, se observó que en el caso de las muestras de biofilm no se encontraba mucha cantidad de proteína, por lo que sería necesario hacer “pooles” o grupos de muestras para obtener la cantidad necesaria de proteína. Aunque en el caso de las células planctónicas sí que existía suficiente cantidad de proteína, sería necesario realizar también los mismos “pooles” para que la comparación entre biofilm-célula planctónica fuese la correcta. Los 24 experimentos independientes se agruparon en 4 pooles distintos que corresponderían a 4 réplicas biológicas.

Como se ha indicado anteriormente en Material y Métodos, tras el proceso de cuantificación, se realizó un gel de control de carga para comprobar que no existía ningún error en la cuantificación. Se llevó a cabo con las muestras correspondientes a los “pooles” de planctónico, ya que, aunque se formaron los “pooles” se comprobó que no había suficiente cantidad de proteína para las muestras de biofilm y que había que realizar más experimentos para recoger más muestra. Según se observa en la Figura 3, las cuatro muestras correspondientes a los “pooles” de planctónico tenían una cantidad igual, y por tanto, la cuantificación era correcta.



**Figura 3.** Gel SDS-PAGE al 10% correspondiente al control de carga

Para comprobar que las muestras estaban limpias, sin ningún tipo de contaminación que pudiese interferir en la separación de las proteínas, se realizó un gel bidimensional para muestras de planctónico, en el que se cargó una cantidad de proteína (150  $\mu\text{g}$ ) en la que estaban presentes de forma equimolecular los 4 “pooles” (Figura 4).



**Figura 4.** Imagen correspondiente a un gel bidimensional teñido con Coomassie coloidal de muestra de células planctónicas de *F. nucleatum*

## **Discusión y conclusión**

El estudio de la expresión diferencial de proteínas cuando la bacteria está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico es de gran interés ya que existe evidencia científica sobre el distinto comportamiento entre bacterias de la misma especie viviendo en ambos estados, sobre todo en cuanto a su expresión proteica (Keller et al. 2009). Sin embargo, en bacterias orales esta evidencia es escasa. En el modo de crecimiento de biofilm, los microorganismos muestran una mayor capacidad virulenta, un aumento en la resistencia a compuestos antimicrobianos (Halliman et al 2004; Holo et al 2004), presentan una mayor respuesta al estrés ambiental y desarrollan numerosos mecanismos de respuesta inmunológica frente al huésped (Costerton et al 1999).

Existe una gran variedad de métodos, reactivos, instrumentación y herramientas informáticas disponibles para el diseño, la realización y el análisis de datos de experimentos proteómicos (Fernández-Reyes et al 2009, Molloy et al 2004, Shilov et al 2007). En general, dichos experimentos suelen consistir en cuatro etapas básicas: 1) preparación de la muestra, 2) fraccionamiento de la muestra, 3) análisis por espectrometría de masas (MS) y 4) análisis informático de los datos. En la proteómica cuantitativa las proteínas son normalmente marcadas durante la preparación de la muestra y cuantificadas durante el fraccionamiento de la misma en la aproximación que se conoce como proteómica basada en la electroforesis bidimensional (o gel-based proteomics). En otra alternativa, las proteínas también pueden ser cuantificadas durante el análisis de MS en lo que se denomina como proteómica basada en la espectrometría de masas (gel-free ó MS-based proteomics). Todos los métodos usados en las distintas etapas están estrechamente relacionados

entre sí, por lo que el camino seguido durante la preparación de la muestra debe estar unido al posterior método de fraccionamiento y, de la misma manera, el análisis de MS debe ser seleccionado en base al método de fraccionamiento usado.

La electroforesis ha sido y sigue siendo una herramienta fundamental de separación de proteínas. En función de la complejidad de la muestra puede optarse por electroforesis mono o bidimensional, siendo esta última (2DE, 2-Dimensional Electrophoresis) la más adecuada para separar mezclas complejas de proteínas. La 2DE presenta diversas ventajas que explican su popularidad en los estudios proteómicos. Entre otras destaca el hecho de que permite realizar una visualización directa del mapa de proteínas del proteoma estudiado, a diferencia de los métodos de fraccionamiento cromatográfico. Ello permite la fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones post-traduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos existentes en las bases de datos. Por ejemplo, la base de datos de SWISS- 2DPAGE (accesible en <http://www.expasy.ch/ch2d/>), contiene unas 1.200 entradas para 36 mapas proteicos de referencia en humano, ratón, *Arabidopsis thaliana*, *Dictyostelium discoideum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus* (N315) (Rasmussen et al 2005, Choi et al 2005). La resolución de los geles 2DE es suficiente para detectar unas 2.000 proteínas de manera rutinaria, pero el uso de geles de electroforesis de gran tamaño, así como la múltiple superposición de distintos gradientes inmovilizados de pH (IPG), permiten la identificación de entre 5.000 y 10.000 proteínas (Panmanee et al 2008, Wylie et al 1995). El desarrollo de los IPG eliminó gran parte de las limitaciones que presentaban los geles 2DE basados en anfolitos portadores, tales como la baja reproducibilidad o la dificultad de detección de proteínas muy ácidas, básicas o de

baja abundancia (Panmanee et al 2008, Iacono et al 2008). Los progresos en la preparación de muestras para 2DE han facilitado también el análisis de proteínas de membrana, tradicionalmente difíciles de estudiar a través de esta técnica (Vijayakumar et al 2004).

En nuestro caso, debido a la insuficiente cantidad de muestra de biofilm, aunque se hayan realizado “pooles” con las muestras recogidas, no ha sido posible realizar los experimentos de expresión diferencial, por lo que se hace necesario continuar con la recogida de muestras correspondientes a este estado de crecimiento.

Con estos resultados previos en los que se ha puesto a punto la formación del biofilm de esta bacteria, la preparación de la muestra y la separación proteica mediante geles bidimensionales, y junto con los estudios proteómicos realizados con la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Llama-Palacios et al 2016) en los cuales se ha utilizado la misma metodología, se puede concluir que esta técnica es apropiada para estudiar la expresión diferencial de las proteínas de *F. nucleatum* en estado planctónico vs estado de biofilm.

## **Perspectivas futuras**

Una vez que hayamos obtenido la cantidad suficiente de proteínas para realizar los ensayos de expresión diferencial procederemos a estudiar estas diferencias proteicas con el sistema DIGE™ basado en el marcaje de las muestras proteicas con diferentes fluorocromos.

## **Bibliografía**

Bachrach, G., Ianculovici, C., Naor, R., Weiss, E.I. (2005). Fluorescence based measurements of *Fusobacterium nucleatum* coaggregation and of fusobacterial attachment to mammalian cells. *FEMS Microbiology Letters*; 248,235–240.

Baumgartner, J. C., Jr, Falker, W.A., and Beckerman, T. (1992). Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*; 7, 253–256.

Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., *et al.* (2006). Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* ;440, 303-307.

Bolstad, A. I., Jensen, H. B., and Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Clinical Microbiology*; 9, 55–71.

Bradshaw, D. J., Marsh, P. D. (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities *in vitro*. *Caries Research*; 32, 456–462.

Caldwell, D.E., Wolfaardt, G.M., Korber, D.R. & Lawrence J.R. (1997). Do bacterial communities transcend Darwinism? In: Jones, J. G., ed. *Advances in Microbial Ecology*; Vol. 15. New York: Plenum, pp. 105–191.

Chaushu, S., Wilensky, A., Gur, C., Shapira, L., Elboim, M., Halftek, G., Polak, D., Achdout, H., Bachrach, G., Mandelboim, O. (2012). Direct recognition of *Fusobacterium nucleatum* by the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease. *PLoS Pathogens*; 8, e1002601.

Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., *et al.* (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*; 7, 1127-1138.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*; 15, 167–193.

Fernández-Reyes, M., Rodríguez-Falcón, M., Chiva, C., Pachón, J., *et al.* (2009). The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics*; 9, 1632-1645.

Gupta, S., Ghosh, S.K., Scott, M.E., Bainbridge, B., Jiang, B., Lamont, R.J., McCormick, T.S., Weinberg A. (2010). Fusobacterium nucleatum-associated beta-defensin inducer (FAD-I): identification, isolation, and functional evaluation. *Journal of Biological Chemistry*; 285,36523–36531.

Hajishengallis, G., and Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*; 27,409–419.

Halliman, D. G., Ahearn, D. G. (2004). Relative susceptibilities to vancomycin and quinupristin-dalfopristin of adhered and planktonic vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible coagulase-negative staphylococci. *Current Microbiology*; 48, 214– 218.

Han, Y.W. *Fusobacterium nucleatum* interaction with host cells (2011). In: Kolenbrander, P., editor. Chapter 15; In: *Oral Microbial Communities: Genomic Inquiry and Interspecies Communication*. ASM Press; 2011

Han, Y.W., Redline, R.W., Li, M., Yin, L., Hill, G.B., McCormick T.S. (2004). *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection and Immunity* ;72, 2272–2279

Han, Y.W., Shi, W., Huang G.T., Kinder Haake, S., Park, N.H., Kuramitsu, H., Genco, R.J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infection and Immunity*; 68,3140–3146.

Hola, V., Ruzicka, F., Votava, M., (2004). Differences in antibiotic sensitivity in biofilm-positive and biofilm-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Epidemiology, Microbiology, Immunology*. 53, 66–69.

Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., *et al.*, (2008). Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52, 2616-2625.

Jekinson H.F. (2014). Introduction to Fundamental Concepts of Oral Microbial Ecology, Chapter 1, In: *Richard J. Lamont, George N. Hajishengallis, Howard F. Jenkinson -Oral Microbiology and Immunology-2<sup>o</sup> ed, ASM Press*, pp 20-23.

Kaplan, A., Kaplan, C.W., He, X., McHardy, I., Shi, W., Lux, R. (2014). Characterization of *aid1*, a novel gene involved in *Fusobacterium nucleatum* interspecies interactions. *Microbial Ecology*; 68,379–387.

Kaplan, C.W., Ma, X., Paranjpe, A., Jewett, A., Lux, R., Kinder-Haake, S., Shi, W. (2010). *Fusobacterium nucleatum* outer membrane proteins Fap2 and RadD induce cell death in human lymphocytes. *Infection and Immunity*; 78,4773–4778.

Keller, M., Hettich, R., (2009). Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 73, (1), 62-70.

Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K. (1998). Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function. *Biochemical Pharmacology*; 56, 415–420.

Kolenbrander, P. E., & Andersen, R. N. (1989). Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infection and Immunity*; 57(10), 3204–3209.

Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr. Rickard, A.H. *et al.* (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*; 42, 47–79.

Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Periasamy, S. & Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*; 8, 471–480.

Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., *et al.* (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*; 22,292–298.

Lindhe, J. and Rylander, H. (1975). Experimental gingivitis in young dogs. *Scandinavian Journal of Dental Research*; 83(6),314-326

Lindhe, J., Hamp, S.E. and Loe, H. (1975). Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *Journal of Periodontal Research*; 10(5),243-255

Llama-Palacios, A., Potupa, O., Sánchez, MC., Blanc, V., León, R., Figuro, E., Herrera, D. and Sanz, M. Proteomic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms: role of the outer membrane proteins in the virulence of bacteria (en preparación).

Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B. (1965). Experimental Gingivitis in Man. *Journal of Periodontology*; 36,177-187

Marsh, P. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*;32, 7–15.

Marsh, P.D. & Bowden, G.H.W. (2000). Microbial community interactions in biofilms. In: Allison, D.G., Gilbert, P, Lappin-Scott, H.M. & Wilson, M., eds. *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Society for Microbiology Symposium 59. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 167–198.

Marsh, P.D. & Devine, D.A. (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology*; 38 Suppl 11, 28–35

Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B., Rabilloud, T., *et al.* (2004). Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2000;267, 2871-2881

Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., *et al.* (2004). Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *Journal of Biological Chemistry*;279, 2761–2771.

Panmanee, W., Gomez, F., Witte, D., Pancholi, V. *et al.* (2008). The peptidoglycan-associated lipoprotein OprL helps protect a Pseudomonas aeruginosa mutant devoid of the transactivator OxyR from hydrogen peroxide-mediated killing during planktonic and biofilm culture. *Journal of Bacteriology*; 190, 3658-3669.

Park,S.R., Kim, D.J., Han, S.H., Kang, M.J., Lee, J.Y., Jeong, Y.J., Lee, S.J., Kim, T.H., Ahn, S.G., Yoon, J.H., *et al.* (2014). Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. *Infection and Immunity*; 82,1914–1920.

Rasmussen, A. A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., *et al.* (2005). Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Molecular Microbiology*;58, 1421-1429.

Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Valova, V. A., Harty, D. W., Jacques, N. A. (2005). Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoretic analysis of Streptococcus mutans biofilms. *Journal of Proteome Research*; 4,(6), 2161-73.

Shapiro, J.A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Reviews of Microbiology*; 52, 81–104.

Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., *et al.* (2007). The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular and Cellular Proteomics*;6, 1638-1655.

Socransky, S. S., A. D. Haffajee, Cugini, M.A., Smith C. and Kent, R.L., (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*;25(2),134-144.

Socransky, S.S. & Haffajee, A.D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*;28, 12–55.

Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., et al. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*; 264, 20106–20111.

Vijayakumar, S. R., Kirchhof, M. G., Patten, C. L., Schellhorn, H. E. (2004). RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random lacZ fusion mutagenesis. *Journal of Bacteriology*; 186, 8499-8507.

Wylie, J. L., Worobec, E. A. (1995). The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*; 177(11), 3021–3026.