

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## Aplicación de la Mutagénesis por Transposición y Secuenciación Masiva para el Estudio Funcional de Genes Codificados por *Enterococcus faecium*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Cristina García Bonillo**

*Curso Académico: 2014-2015*

TUTORA: Dra. Ana Jiménez Belenguer  
CO-TUTOR: Dr. Carles Úbeda Morant

Valencia, Junio 2015



# **Aplicación de Mutagénesis por Transposición y Secuenciación Masiva para el Estudio Funcional de Genes Codificados por *E. faecium***

Autor: **Cristina García Bonillo**

Tutor: **Dra. Ana Jiménez Belenguer**

Co-tutor: **Dr. Carles Úbeda Morant**

Valencia, Junio 2015

En el presente trabajo se pretende poner a punto la metodología necesaria para identificar genes codificados por cepas multirresistentes de *Enterococo* necesarios para la colonización del tracto intestinal. Para ello, se utilizará un sistema de mutagénesis por transposición y secuenciación masiva.

Se transformará la cepa E1162 de *Enterococcus faecium* con el plásmido pZXL5, que contiene un transposón que codifica para resistencia a gentamicina y que se insertará aleatoriamente en el genoma bacteriano. El plásmido pZXL5 es termosensible, por lo que a una temperatura superior a 30°C no es capaz de replicarse.

La cepa transformada con el plásmido será crecida a una temperatura superior a 30°C en medio que contengan gentamicina, creciendo por tanto solo aquellas bacterias donde el transposón se haya insertado aleatoriamente en el genoma, ya que el plásmido no puede replicarse a dicha temperatura. Dichas bacterias serán sensibles a cloranfenicol, ya que habrán perdido el plásmido.

Posteriormente, utilizando la técnica de secuenciación masiva, se identificará el lugar de inserción del transposón en el cromosoma y la abundancia relativa de los mutantes obtenidos.

## **Palabras clave:**

Mutagénesis; Secuenciación masiva; *Enterococcus faecium*; Colonización del tracto intestinal.

---

## **Application of Mutagenesis by Transposition and Massive Sequencing for the functional study of genes coded by *E. faecium***

Author: **Cristina García Bonillo**

Supervisor: **Dra. Ana Jiménez Belenguer**

Co-supervisor: **Dr. Carles Úbeda Morant**

Valencia, June 2015

The aim of this work is to elaborate an appropriate methodology to identify genes encoded by multidrug-resistant strains of *Enterococcus faecium* which are necessary for colonization of the intestinal tract. In order to do so, a mutagenesis system by transposition and massive sequencing will be used.

The strain E1162 *Enterococcus faecium* will be transformed with the pZXL5 plasmid which contains a gentamicin resistant coding transposon that will be randomly inserted into the bacterial genome. The pZXL5 plasmid is temperature sensitive making it unable to replicate at temperatures above 30°C.

The strain transformed with the plasmid will be grown in medium with gentamicin at a temperature above 30°C, obtaining only those bacteria where the transposon was randomly inserted in the genome.

Finally, by massive sequencing technique, the transposon insertion site in the chromosome will be identified and the relative abundance of mutants will be measured.

### **Key words:**

Mutagenesis; Massive sequencing; *Enterococcus faecium*; Intestinal tract colonization.

---

*'Entra con el pie derecho'.*

Querría dar las gracias con estas palabras en primer lugar a las chicas de Carles Úbeda, me han ayudado, acompañado y hecho reír durante todo este año de trabajo, demostrándome que los doctorandos también pueden ser felices y acrecentando mis ganas de llegar algún día a estar en su posición.

A mi tutor, Carles Úbeda, por introducirme con santa paciencia en el mundo de la investigación. Me ha hecho valorar muchísimo más la labor que desempeñan los investigadores en España, y que el trabajo duro, constante y exacto da siempre sus frutos.

A mi tutora. Gracias por la paciencia, los consejos y el positivismo que irradias. Gracias por introducirme en el mundo de la microbiología, por darme la oportunidad de conocer tu trabajo. Sin aquellas prácticas a tu lado sabría que me gusta este mundo, pero no que me apasionase tanto. Espero poder decir algún día que inicié mi carrera con Ana Jiménez.

Gracias a mis biotecs, los nuevos y los viejos. En particular, gracias a Jose, Andrea y Álvaro, la 'Pensión Cris' no sería lo mismo sin vosotros. Gracias por las cenas de gordos tras los exámenes, por dormir en mi sofá, por no dejarme sola jamás, por sacarme más sonrisas que cervezas, por las bromas, los cotilleos, por las carcajadas en la biblioteca, por hacerme llorar y no de pena, por perdernos por los cerros de Benidorm, por nuestra Hazienda Secreta, por las fotos bajo el mar de México, por los carnavales y, en definitiva, por ser mi familia en esta tierra.

A Manu, por su tiempo, por entenderme y escucharme. Gracias por las sonrisas, los chinos, los bailes, por no fallar nunca, por la telepatía, los ánimos y los empujones. Tu búsqueda de grandes metas que alcanzar y tu fuerza de voluntad para conseguirlas son admirables.

A mis chicas del pueblo por mandarme un 'Ánimo Cris' cada día que me podía la desesperación. Por las cenas, las risas y el futuro que nos aguarda juntas. En especial, gracias a Ángela y Caribel, por las fiestas sin nadie más que nuestra tontería, las conversaciones de sofá, las excursiones culturales buscando galerías por Valencia, los consejos y los silenciosos 'te lo dije', el constante apoyo... Gracias por hacerme saber que ni los kilómetros ni los años cambiarán lo que somos.

Por último y más importante, quiero dar las gracias a mi familia.

El primer día de carrera y de prácticas mi madre me dijo la frase que da comienzo a este apartado. Con el derecho entré y con el derecho salgo gracias a ella. Ejemplo para mí de fuerza, gracias mamá por ser la piedra angular de la familia, por ser en la que todo el mundo se apoya y la que nos empuja a seguir. Para mí vale más tu sonrisa cuando me dices lo orgullosa que estás de mí que todas las matrículas del mundo.

Gracias a mi padre, él me ha enseñado cómo trabajar. La humildad, la perfección y la dedicación son las tres cualidades que intentaré imitar de él cada vez que tenga la oportunidad de trabajar. Gracias papá por tu humor, por escucharme aún sin entender nada, por tu apoyo y tu fe en mí. Tus documentales y revistas son las que hicieron germinar en mí la curiosidad que propició la elección de Biotecnología como carrera.

A mi hermana, Ana. No somos la clase de hermanas que cuelgan fotos de amor cada día; nosotras demostramos que nos queremos con puyazos, diciendo lo poco interesante que es la carrera de la otra, discutiendo, invadiendo la habitación... pero sé que estarás ahí para lo que necesite. Eres perseverante (mucho) y eso es lo que quiero aprender de ti.

*'Ser cabezona es un don'.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1. Importancia clínica del Enterococo</b> .....	1
1.1.1. Enterococo.....	1
1.1.2. Patogenicidad y virulencia.....	2
<b>1.2. El microbioma humano</b> .....	3
1.2.1. El microbioma y su relación con las infecciones producidas por Enterococo.....	3
<b>1.3. Colonización del tracto intestinal por <i>E. faecium</i></b> .....	4
<b>1.4. Métodos de mutagénesis por transposición para el estudio de             las funciones de los genes codificados por un microorganismo</b> .....	5
1.4.1. Mutagénesis por transposición para identificar al función de genes codificadas por VRE.....	6
1.4.2. La mutagénesis por transposición unido a la secuenciación masiva para el estudio funcional del genoma.....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3. MATERIALES y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Cepas bacterianas</b> .....	11
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	11
3.1.2. <i>E. faecium</i> E1162 .....	11
<b>3.2. Plásmidos</b> .....	11
3.2.1. pZXL5 .....	11
<b>3.3. “Primers”</b> .....	12
<b>3.4. Medios de cultivo y condiciones</b> .....	13
3.4.1. DH5 $\alpha$ .....	13
3.4.2. <i>E. faecium</i> E1162 .....	13
<b>3.5. Cepas competentes y transformaciones</b> .....	14
3.5.1. DH5 $\alpha$ .....	14
3.5.1.1. Preparación de DH5 $\alpha$ competentes.....	14
3.5.1.2. Transformación DH5 $\alpha$ con eñ plásmido pZXL5.....	14
3.5.2. <i>E. faecium</i> E1162 .....	15
3.5.2.1. Preparación <i>E. faecium</i> competentes.....	15

3.5.2.2.	Transformación <i>E.faecium</i> con el plásmido pZXL5.....	15
<b>3.6.</b>	<b>Manipulaciones del DNA</b> .....	<b>15</b>
3.6.1.	Extracciones de plásmido .....	15
3.6.2.	Integración del transposón .....	16
3.6.3.	Extracciones de DNA .....	16
3.6.3.1.	Extracción DNA “PSP®Spin Stool DNA Plus Kit” .....	16
3.6.3.2.	Extracción DNA “QIAmp® DNA Stool Mini Kit (50)” .....	16
3.6.3.3.	Extracción DNA “QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)” .....	16
3.6.3.4.	Extracción DNA método fenol-cloroformo.....	17
3.6.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	17
3.6.5.	Cuantificación del DNA .....	17
3.6.6.	Purificación del DNA.....	18
3.6.6.1.	Purificación del DNA en placa .....	18
3.6.6.2.	Purificación del DNA mediante perlas metálicas.....	18
3.6.6.3.	Purificación del DNA a partir de gel de agarosa.....	18
3.6.7.	PCRs.....	19
3.6.7.1.	PCR del gen <i>acc(6')-aph(2'')</i> que codifica resistencia a gentamicina .....	19
3.6.7.2.	PCR gen <i>cat</i> que codifica resistencia a cloranfenicol.....	19
3.6.7.3.	PCR primaria para secuenciación masiva.....	19
3.6.7.4.	PCR secundaria para secuenciación masiva.....	20
3.6.8.	Secuenciación masiva.....	20
3.6.8.1.	Resumen de la secuenciación masiva.....	20
3.6.8.2.	Fragmentación del DNA por nebulización.....	20
3.6.8.3.	Análisis de los fragmentos de DNA.....	21
3.6.8.4.	Adición de cola poli-C.....	21
3.6.8.5.	Reacción de secuenciación masiva.....	21
<b>3.7.</b>	<b>Análisis de las secuencias</b> .....	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	
<b>4.1.</b>	<b>Propagación del plásmido pZXL5 en la cepa DH5<math>\alpha</math></b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.</b>	<b>Transformación de la cepa E1162 de <i>E. faecium</i> con el plásmido pZXL5</b> .....	<b>24</b>

4.2.1. Selección de la cepa <i>E. faecium</i> E1162 .....	24
4.2.2. Optimización del protocolo de transformación de Enterococo.....	24
4.2.3. Transformación de la cepa E116 de <i>E. faecium</i> .....	26
4.2.4. Extracción del plásmido pZXL5 y comprobaciones.....	26
<b>4.3. Creación de la biblioteca de mutantes .....</b>	<b>28</b>
4.3.1. Integración del transposón en el genoma.....	28
4.3.2. Comprobaciones de la inserción del transposón.....	29
4.3.2.1. Extracción de DNA.....	29
4.3.2.2. PCR del gen <i>aac(6')-aph(2'')</i> que codifica la resistencia a gentamicina.....	30
4.3.2.3. PCR del gen <i>cat</i> que codifica la resistencia a cloranfenicol..	31
<b>4.4. Secuenciación masiva.....</b>	<b>31</b>
4.4.1. Fragmentación del DNA.....	31
4.4.2. Adición de la cola poli-C y PCR primaria.....	32
4.4.3. PCR secundaria.....	33
4.4.4. Análisis de las secuencias.....	34
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de transposón clase II.....	5
Figura 2. Esquema de la metodología de mutagénesis por transposición utilizada por Zhang et al., 2012.....	7
Figura 3. Secuenciación masiva por Illumina.....	8
Figura 4. Plásmido pZXL5.....	12
Figura 5. Resumen del sistema de secuenciación masiva .....	20
Figura 6. Esquema de la secuenciación por Illumina.....	22
Figura 7. Extracción de plásmido pZXL5 de la cepa DH5 $\alpha$ y plásmido original pZXL5.....	24
Figura 8. Extracción de plásmido pZXL5 de la cepa transformada E1162 de <i>E. faecium</i> .....	26
Figura 9. Extracción de plásmido pZXL5 de la cepa DH5 $\alpha$ transformada con el plásmido procedente de <i>E. faecium</i> 1162.....	27
Figura 10. Sitios de restricción para BamHI en el plásmido pZXL5.....	27
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pZXL5 con BamHI.....	28
Figura 12. Comparación de diferentes métodos de extracción de DNA.....	29
Figura 13. PCR del gen <i>acc(6')-aph(2'')</i> que codifica la resistencia a gentamicina.....	31
Figura 14. PCR del gen <i>cat</i> que codifica la resistencia a cloranfenicol.....	31
Figura 15. Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos tras la nebulización.....	32
Figura 16. PCR primaria para la secuenciación de los mutantes por transposición.....	33
Figura 17. Control de amplificación específica. PCR primaria.....	33
Figura 18. PCR secundaria.....	34
Figura 19. Distribución de las secuencias analizadas.....	35
Figura 20. Abundancia de mutantes.....	36
Figura 21. Alineamiento de secuencias de Illumina y el genoma de la cepa <i>E. faecium</i> E1162.....	37



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Lista de los “primers” utilizados.....	12
Tabla 2. Programa utilizado para la reacción de PCR.....	19
Tabla 3. Reactivos para la reacción de PCR.....	19
Tabla 4. Primer experimento para determinar la concentración de glicina.....	25
Tabla 5. Segundo experimento para determinar la concentración de glicina.....	25
Tabla 6. Cuantificación del DNA extraído.....	29
Tabla 7. Estudio de la reproducibilidad de los métodos utilizados para la extracción de DNA de Enterococo.....	30

## ABREVIATURAS

BHI: Infusión de cerebro y corazón	OD: Densidad óptica
BLAST: " <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> "	pb: Pares de bases
BYGT: BHI, Extracto de levadura, Glucosa, Tris	PBS: " <i>Phosphate Tampón Saline</i> "
cDNA: RNA transcrito a DNA	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria	rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosómico
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	RNA: Ácido ribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato	RNAsa: RNA nucleasa
<i>E. coli: Escherichia coli</i>	rpm: Revoluciones por minuto
EDTA: Ácido Etilendiaminetetracético	SDS: Dodecilsulfato sódico
<i>E. faecium: E. faecium</i>	SI: Sistema Inmunológico
EtOH: Etanol	SM: Secuenciación masiva
H <sub>2</sub> O up: Agua ultrapura	TBE: Tris-Borato-Ácido Etilendiaminetetracético
iPCR: Reacción inversa en cadena de la polimerasa	TE: Tris-Ácido Etilendiaminetetracético
LB: Luria-Beltani	Tm: Temperatura de hibridación media
MCS: Sitio de clonaje múltiple	TRIS: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
MDR: " <i>Multi-Drug Resistant</i> "	UV.: (Luz) Ultravioleta
NCBI: " <i>National Center for Biotechnology Information</i> "	VRE: Enterococo-vancomicina resistente
N-Terminal: Amino-Terminal	

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia clínica del Enterococo.

### 1.1.1. Enterococo

El género *Enterococcus* está incluido en la familia *Enterococcaceae* junto a los géneros *Bavariococcus*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. (Lebreton *et al.*, 2014). Este género se compone de especies, en su mayoría comensales, cuyo entorno de desarrollo se encuentra en el tracto gastrointestinal tanto de humanos y animales como de insectos. No obstante, algunas de estas especies han conseguido adaptarse para subsistir en alimentos fermentados, productos lácteos y diferentes ambientes como el suelo, el agua o los cultivos herbáceos.

El *Enterococcus* es un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, que se caracteriza por ser cocos dispuestos en parejas o cadenas. Una clave importante para su amplia distribución en la naturaleza deriva de ser organismos notablemente resistentes en ambientes extremos: altas concentraciones de sal, temperatura (10 °C a 45 °C), rangos de pH (4.5 a 10.0) y pueden llegar a crecer en presencia de un 40 % de bilis (Porte *et al.*, 2007). Todas estas características les permiten habitar un amplio espectro de nichos.

La taxonomía de este género ha sido modificada continuamente durante la última década. En la actualidad, el género incluye 35 especies (Euzéby, 2013) y 8 más (*Enterococcus lactis*, *plantarum*, *quebecensis*, *rivorum*, *rotai*, *ureasiticus*, *ureilyticus*, y *viikiensis*) caracterizadas entre 2012 y 2013 (Morandi *et al.*, 2012; Niemi, *et al.*, 2012; Sedláček, *et al.*, 2013) con metabolismos exclusivos, características fenotípicas diferentes y adaptadas a entornos distintos. Algunas de las especies más destacadas de este género son *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, ya que son las más abundantes en la materia fecal humana (Devriese *et al.*, 1994) y son las responsables de la mayoría de las enfermedades asociadas a este género (Malani *et al.*, 2002).

### 1.1.2. Patogenicidad y virulencia

En los últimos años el género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia clínica a nivel internacional debido a la elevada incidencia en las enfermedades nosocomiales y por la adquisición de resistencias a penicilinas, cefalosporinas de varias generaciones y aminoglucósidos. Algunas de las especies del género *Enterococcus* son consideradas patógenos oportunistas para los humanos pudiendo causar diferentes enfermedades como: endocarditis, bacteriemias, infecciones del tracto urinario, neonatales, intra-abdominales y pélvicas (Porte *et al.*, 2007).

En general las especies del género *Enterococcus* tienen poco potencial patogénico en huésped sano. De hecho se pueden encontrar como habitantes habituales del intestino sin causar enfermedad. Sin embargo, en humanos de edad avanzada y pacientes inmunocomprometidos, estos microorganismos pueden producir infecciones graves. Dentro de los factores de virulencia codificados por este género encontramos: hemolisinas-citolisinas (Cyl) codificadas en islas de patogenicidad presentes en el 30 % de *E. faecalis* capaces de lisar glóbulos rojos; así como sustancias de agregación, bacteriocinas, proteasas como GelE y SprE que afectan a la degradación de tejido y modulación de la activación del sistema inmune (SI) y

aglutininas; que desarrollan un papel fundamental en la formación de biofilms y *quorum sensing* (Arias y Murray, 2012). Además, los carbohidratos de la pared celular y sitios de unión a fibronectina favorecen la adherencia a los tejidos gástricos del huésped, incrementando la patogenicidad (Dupón et al., 2008).

## **1.2. El microbioma intestinal humano**

El sistema digestivo humano es el lugar donde habitan miles de millones de microorganismos que juegan un papel clave en muchos procesos relacionados con el huésped que tienen un profundo efecto en la salud humana y el desarrollo o evolución de enfermedades. Esta compleja comunidad se conoce como el microbioma intestinal, siendo definido con frecuencia como “*la gran colección de microorganismos simbióticos en el sistema gastrointestinal humano y la interacción de sus genomas*” (Kimross et al., 2011).

La microbiota intestinal está altamente jerarquizada, cada especie juega un papel específico para crear los microambientes necesarios para su supervivencia sin interferir con el huésped, dando lugar a un equilibrio relativamente estable. Los principales componentes de la flora microbiana intestinal humana son los filos Bacteroidetes y Firmicutes. Bacterias de ambos filos interactúan entre sí, lo que lleva a un equilibrio a nivel intestinal. Por ejemplo, bacterias pertenecientes al filo Firmicutes (*Bifidobacterium longum*) alteran la expresión de glicosilasas en *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, perteneciente al filo Bacteroidetes (Sonnenburg et al., 2006), lo que influye en el crecimiento de este último.

El microbioma juega un papel fundamental en el desarrollo del individuo, su sistema inmune y nutrición (Kau et al., 2012). Por tanto, no es de extrañar que en la última década se hayan relacionado diversas enfermedades con trastornos de la microbiota intestinal (Kimross et al., 2011).

### **1.2.1. El microbioma y su relación con las infecciones producidas por Enterococo.**

Dentro de las funciones del microbioma destacamos la resistencia a la colonización (Volleard y Clasener, 1994). Esta es la función por la que el microbioma impide la entrada de bacterias exógenas, incluyendo patógenos oportunistas como el Enterococo. Los mecanismos por los que la microbiota protege frente a patógenos incluyen el ataque activo a través de la producción de bacteriocinas por parte de ciertas bacterias comensales, la competencia por los mismos nutrientes o, de manera más indirecta, a través de la activación del sistema inmune (Stecher y Hardt).

Variaciones drásticas de la microbiota intestinal pueden provocar un balance negativo en las interacciones entre especies comensales, que conduzcan a un riesgo potencial de desarrollar una infección (Ubeda et al., 2010). Estas variaciones pueden venir dadas por el uso de sustancias antibióticas. De hecho, estudios de los cambios de la microbiota intestinal, basados en la secuenciación masiva del gen 16S rDNA han demostrado los cambios y pérdidas notables de la diversidad microbiana asociados a un tratamiento con antibióticos, lo que promueve la colonización del intestino por parte de microorganismos resistentes (Ubeda et al., 2013). Por ejemplo, Ubeda y colaboradores mostraron que tanto en humanos como en ratones, el tratamiento con antibióticos produce cambios drásticos en la microbiota, lo que

permite al Enterococo-vancomicina resistente (VRE) alcanzar elevados niveles en el intestino lo que a su vez promueve la posterior diseminación a sangre (Ubeda, et al., 2010).

Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de las bacterias comensales como defensa frente a patógenos oportunistas se ha despertado el interés sobre su uso como probióticos. La idea detrás del uso de probióticos es la restauración de las especies bacterianas beneficiosas que ayudan a combatir las infecciones.

Estudios previos demuestran que la transferencia de la microbiota de un donante sano en un receptor enfermo por medio de bacterioterapia (trasplante fecal), puede provocar su recuperación a través del restablecimiento de la microbiota normal (Khoruts et al., 2010). Por lo tanto, la manipulación dirigida del microbioma intestinal se presenta clínicamente prometedora.

En relación con el Enterococo recientes estudios realizados por Úbeda y colaboradores (Ubeda et al., 2013) han identificado poblaciones bacterianas relacionadas con la eliminación de este patógeno oportunista en el tracto gastrointestinal. En dichas investigaciones, utilizando el ratón como modelo experimental se demostró que las bacterias pertenecientes al género *Barnesiella* se asocian con la resistencia frente a la colonización intestinal del VRE. De hecho, ratones que no habían recuperado *Barnesiella* eran altamente susceptibles a la infección por VRE. Más aun, en este mismo estudio se demostró que aquellos pacientes hospitalizados con menores niveles de *Barnesiella* en heces eran más susceptibles de ser posteriormente colonizados con VRE. En el mismo estudio, los autores descartaron la inducción del SI como mecanismo por el cual *Barnesiella* pudiera estar inhibiendo la colonización intestinal de VRE. Estos resultados sugieren que otros mecanismos como la producción de sustancias inhibitorias o la competición por nutrientes podrían tener un papel importante en la eliminación de VRE por parte de la microbiota. La identificación de dichos mecanismos podría dar lugar a tratamientos alternativos frente a un patógeno que es resistente a la mayoría de antibióticos disponibles (Zhang et al., 2012).

### **1.3. Colonización del tracto intestinal por *E. faecium*.**

Con el fin de tratar de impedir la colonización intestinal por parte de VRE y teniendo en cuenta la importancia de la microbiota en su protección, diversos estudios como los comentados anteriormente han tratado de identificar las especies comensales que nos protegen frente a VRE. Sin embargo, si queremos en un futuro ser capaces de desarrollar fármacos capaces de inhibir la colonización intestinal de VRE, es imprescindible conocer los factores codificados por VRE en su genoma que le permiten colonizar y persistir en el intestino.

Estudios anteriores han abordado esta cuestión centrándose en genes que se suponía estaban relacionados con la colonización intestinal. En concreto, el trabajo de Zhang y colaboradores identifica un locus que codifica para el sistema fosfotransferasa (PTS). Este sistema se encuentra en muestras fecales de aislados clínicos pero no en muestras de humanos sanos. La delección de *pstD*, que codifica para la subunidad IIID de PTS, provoca una colonización deficitaria de *E. faecium* en el tracto gastrointestinal de ratón durante y después del tratamiento con antibióticos (Zhang et al., 2013).

Estudios de aislados clínicos de *E. faecium* han revelado otros elementos genéticos candidatos para la colonización gastrointestinal y procesos infectivos del Enterococo, entre ellos, un plásmido que codifica para una hialuronidasa de la familia glicosiltransferasas (Hylfm) (Rice et al., 2003), MSCRAMMs (componente de la superficie microbiana), EmpABC (involucrado en la formación de pili) (Sillanpaa et al., 2008) y la proteína de superficie Esp (Willems et al., 2001). Esta última proteína fue descartada recientemente como esencial para la colonización del tracto gastrointestinal de ratón por Heikens y colaboradores demostrando en su trabajo que la capacidad de adhesión a células epiteliales intestinales de ratón no se veía afectada significativamente por la deficiencia en esta proteína (Heikens et al., 2009).

Por otro lado, es posible que VRE suprima activamente la defensa innata inducida por la microbiota intestinal y que, junto a las poblaciones bacterianas que no se recuperan tras la retirada del antibiótico y que no oponen resistencia a su expansión, ésta sea la principal causa de la colonización y persistencia de VRE durante largos periodos de tiempo en el intestino (Arias y Murray, 2012).

#### 1.4. Métodos de mutagénesis por transposición para el estudio de las funciones de los genes codificados por un microorganismo.

Como se ha comentado en el apartado anterior, diversos estudios han identificado la función de genes utilizando técnicas de biología molecular mediante las que se puede delecionar un gen en concreto. Sin embargo, dicha metodología no nos permite un estudio en conjunto de los genes que necesita el Enterococo para colonizar el intestino. Para poder estudiar de manera general la funcionalidad del genoma del Enterococo, es necesario utilizar metodologías basadas en el uso de transposones.

Los transposones son elementos genéticos móviles (Fig. 1) que se pueden escindir e integrarse en distintos sitios del genoma. Al insertarse un transposón en un gen en concreto, se obtendría una bacteria modificada que habría perdido la función ejercida por dicho gen. Puesto que la inserción en el genoma es aleatoria, utilizando transposones se pueden obtener mutantes en los distintos genes que componen el genoma de una bacteria. De esta manera, mediante el uso de transposones, se puede realizar un estudio general de la funcionalidad de los genes codificados por el genoma de una bacteria. La figura 1 muestra la estructura de un transposón tipo II utilizado en los estudios de mutagénesis por transposición. Dichos transposones codifican una transposasa y están flanqueados por repeticiones terminales invertidas que incluyen los sitios de unión a la transposasa necesarios para que se lleve a cabo la transposición. La transposición resulta en la escisión del elemento del DNA en el que se encontraba y su integración en una nueva región del DNA genómico. (Ivics et al., 2009).



**Figura. 1. Esquema de transposón clase II.** ITR: Repeticiones inversas. **Caja blanca ITR:** Puntos de unión de la Transposasa. **Caja amarilla:** DNA que compone el transposón (genes de interés, marcadores de resistencia, etc) **Caja azul:** Transposasa. Estos elementos pueden hallarse en el mismo plásmido, en plásmidos separados o regiones diferentes del genoma.

Los sitios preferentes de integración determinan muchas veces la utilidad de los transposones. Para seleccionar mutantes que cubran el mayor número de genes de un organismo es preferible que tiendan a insertarse dentro de genes y regiones codificantes, sin que existan preferencias o patrones de inserción (“hotspots” y “cold regions”) (Ivics et al., 2009).

La mutación por transposición como método para identificar los genes necesarios para realizar funciones de interés ha sido utilizada en numerosos trabajos. Por ejemplo, Kristich y colaboradores (Kristich et al., 2008) utilizaron este mismo sistema de mutagénesis para determinar los genes involucrados en la formación de biofilm en *Enterococcus faecalis*, así como en recientes estudios de Camino y colaboradores (Camino et al., 2014) en los que utilizan el plásmido pZXL5 y el método de mutagénesis por transposición para determinar genes de resistencia a diferentes antibióticos en el patógeno nosocomial *Enterococcus faecalis*. Otro ejemplo es el trabajo realizado por Reinaldo y colaboradores en el que, utilizando un sistema similar al expuesto de mutagénesis por transposición consiguieron identificar un cluster de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Reinaldo et al., 1999).

#### **1.4.1. Mutagénesis por transposición para identificar la función de genes codificados por VRE.**

Aunque existen diversos artículos como los descritos anteriormente, en los que se demuestra la importancia de algunos genes concretos en la colonización intestinal por VRE, se desconoce el papel que la mayoría de los genes codificados por VRE pudieran tener en la colonización intestinal.

Un método eficaz para abordar un análisis global de la funcionalidad del genoma del VRE es el utilizado por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2012) con el fin de identificar los genes que otorgan a *E. faecium* resistencia a ampicilina. Para ello utilizaron el plásmido pZXL5 (Fig. 4), que contiene un transposón que confiere resistencia a gentamicina. Puesto que el plásmido es termosensible, a una temperatura superior a 30 °C, el plásmido no puede replicarse, así que las únicas bacterias que mantienen la resistencia a gentamicina son aquellas en las que el transposón se ha integrado en el genoma de la bacteria (método de selección de los mutantes por transposición). Por otro lado, puesto que la transposasa es eliminada junto con el plásmido (está codificada en el plásmido fuera del transposón), la inserción del transposón es permanente una vez se ha perdido el plásmido. Una vez desarrollado el proceso de mutagénesis por transposición, se obtuvo una librería de mutantes en las que en cada bacteria el transposón se había integrado al azar el genoma de la bacteria. Dicha librería puede ser crecida en distintas condiciones, en el caso del estudio, en presencia o ausencia de ampicilina, para estudiar cómo afecta el cambio en las condiciones de cultivo al crecimiento de los mutantes obtenidos. Por ejemplo, si el transposón se integra en un gen que codifica resistencia para ampicilina pero que no es necesario para el crecimiento de la bacteria en ausencia del antibiótico, dicho mutante no crecerá cuando haya ampicilina en el medio. Una vez crecida la librería de mutantes en presencia/ausencia de ampicilina, los autores utilizaron el método descrito en la figura 2 con el fin de identificar mutantes que habían crecido menos en presencia de ampicilina y poder identificar genes que confieren resistencia a ampicilina a *E. faecium*.

Dicha metodología se basa en:

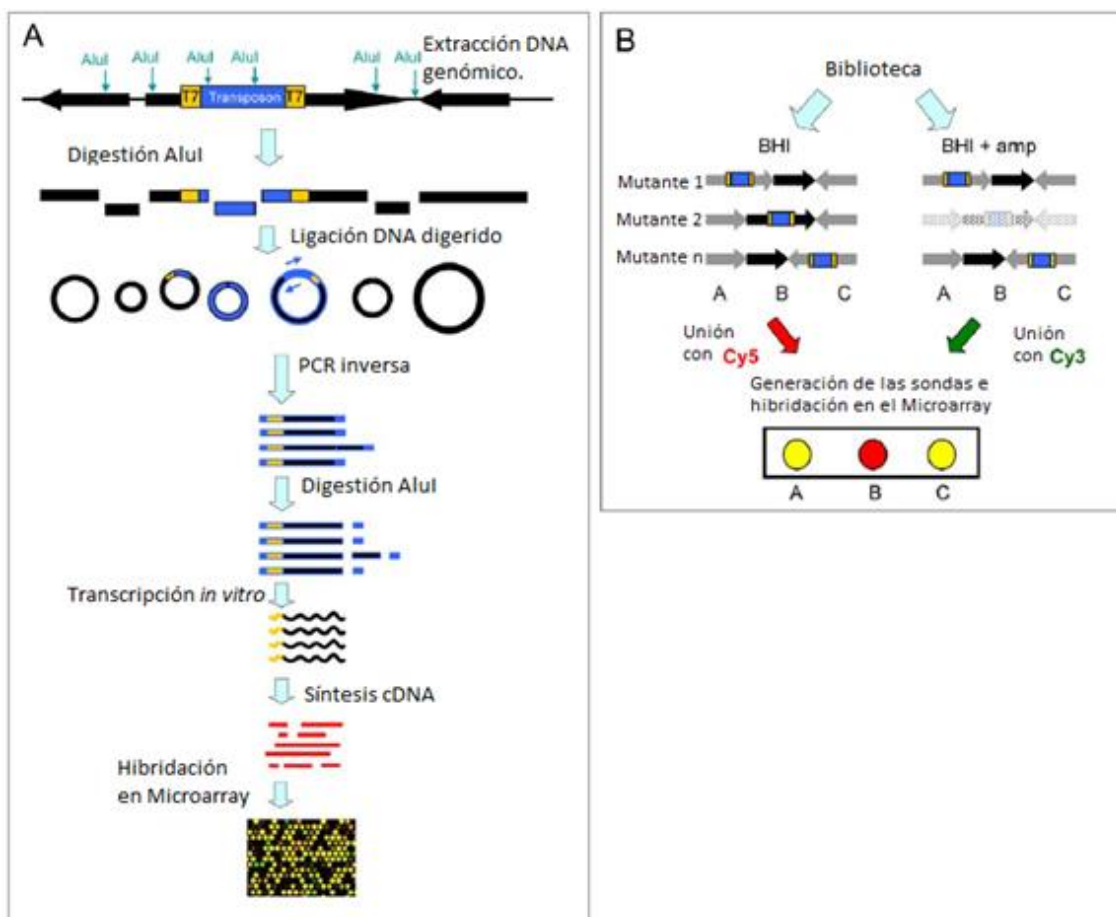
(i) extracción y digestión del DNA obtenido de la librería de mutantes.

(ii) amplificación del fragmento de DNA donde se ha insertado el transposón mediante ligación de los fragmentos obtenidos en la digestión y PCR inversa mediante oligos que hibridan en el transposón.

(iii) obtención de RNA que incluye la región flanqueante al transposón (sitio de inserción) mediante la inducción de la expresión *in vitro* a partir del promotor T7 presente al final del transposón. Posterior conversión de RNA a cDNA.

(iv) hibridación del cDNA frente a un “micro-array” que representa el genoma de dicha cepa de *E. faecium*.

(v) comparación de la abundancia de mutantes en las dos condiciones de cultivo mediante análisis de los niveles de hibridación con las distintas sondas del “micro-array”.



**Figura 2. Esquema de la metodología de mutagénesis por transposición utilizada Zhang et al., 2012.**

**(A)** Esquema del sistema M-TraM screening. En azul: Transposón, contiene el gen de resistencia a gentamicina. En amarillo: Repeticiones finales anexas a éste (ITRs) y promotor T7, reconocido por una RNA polimerasa específica.

El DNA genómico fue aislado de la biblioteca de mutantes de *E. faecium*. El DNA fue digerido con el enzima *AluI* y los fragmentos fueron ligados consigo mismos. Los fragmentos del pull que contienen el transposón junto a un fragmento de DNA genómico fueron amplificados mediante PCR con oligos que hibridan en el transposón (flechas azules). Se digirió con *AluI* de nuevo para eliminar los fragmentos de DNA pertenecientes al transposón. Los fragmentos purificados se



transcribieron *in vitro* para obtener cadenas de RNA que posteriormente fueron transcritas a cDNA. Después de esto se llevó a cabo la hibridación en el “micro-array”.

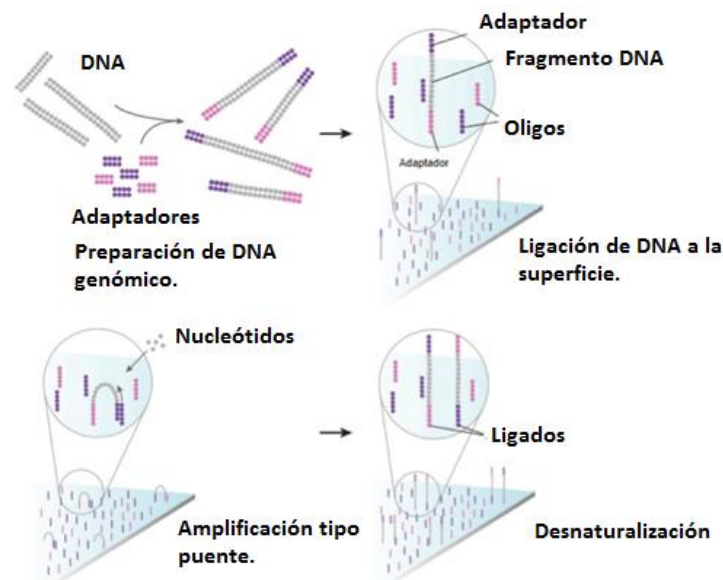
- (B) Esquema-resumen de la estrategia utilizada para identificar genes mediante M-TraM. Se comparan tres genes (A, B y C) procedentes de mutantes diferentes (1, 2...n). Cada mutante contiene una única copia del transposón insertado en su genoma (azul), interrumpiendo un gen determinado y como consecuencia, su función.

La librería de mutantes fue crecida en un control (BHI) y en presencia de Ampicilina (BHI + Amp). Posteriormente se realizó un “micro-array” con sondas específicas para cada uno de los genes codificados por VRE, con el fin de identificar la abundancia relativa de los distintos mutantes de la librería. Mientras que la abundancia de los mutantes en genes A y C es la misma en medio con y sin antibiótico, la abundancia del gen B es menor en medio con ampicilina. Este resultado indica que el gen B podría ser importante para que el *Enterococo* pueda crecer en presencia del antibiótico.

#### 1.4.2. La mutagénesis por transposición unido a la secuenciación masiva para el estudio funcional del genoma.

Recientemente se han comenzado a utilizar técnicas de secuenciación masiva (SM), sustituyendo a los “micro-arrays”, para identificar la abundancia relativa de los mutantes obtenidos por transposición crecidos en distintas condiciones. La SM surge del desarrollo de la Secuenciación de Siguiete Generación (NGS), la cual ha permitido el desarrollo de técnicas eficientes y de alto rendimiento, menos costosa y más rápida (Quince et al., 2011). Las plataformas más utilizadas son Illumina (Solexa®) y Pirosecuenciación 454 (Roche®).

En el presente de Trabajo Fin de Grado (TFG) se ha utilizado la técnica de SM desarrollada por Illumina. Ésta es una técnica basada en la secuenciación por síntesis (PCR tipo puente descrita en la figura 3), la cual provee de lecturas de hasta 400 pares de bases (pb). Dado que la secuenciación es simultánea se consiguen obtener miles de lecturas en pocos días (Mardis, 2008).



**Figura 3. Secuenciación masiva por Illumina.** Imagen modificada de Mardis (2008). Tras ligar el DNA a los oligos se añaden nucleótidos marcados en el extremo 3'-OH extendiendo las hebras un nucleótido. Después, los nucleótidos no añadidos y las DNA polimerasas son lavadas; seguidamente, se escanea cada hebra para conocer si el nucleótido se ha unido y se añaden los productos que escinden los

marcadores de los nucleótidos dejando libre el extremo 3'-OH para volver a añadir nucleótidos y DNA polimerasa. Este ciclo es repetido hasta obtener la secuencia completa del fragmento.

La secuenciación masiva unida a la mutagénesis por transposición fue utilizada por Klein y colaboradores (Klein et al., 2012) para identificar genes esenciales para el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis in vitro*. Los autores desarrollaron una técnica de mutagénesis por transposición similar a la descrita anteriormente para el Enterococo. De la misma manera, una única copia del transposón se integraba de manera aleatoria en el genoma de *P. gingivalis*. Posteriormente, mediante fragmentación del DNA, amplificación de los fragmentos que contienen el transposón y secuenciación masiva de dichos fragmentos, consiguieron identificar los sitios del genoma donde se había integrado el transposón (posteriormente en material y métodos se describe con más detalle el proceso de mutagénesis y secuenciación masiva). De esta manera los autores pudieron estudiar la abundancia relativa de los distintos mutantes en la librería de mutantes e identificar aquellos genes esenciales para el crecimiento de *P. gingivalis in vitro* (genes donde la abundancia de mutantes era muy baja o nula).

La aplicación de la secuenciación masiva tiene ciertas ventajas con respecto al uso "micro-array" para determinar la abundancia de los mutantes obtenidos por transposición:

- (i) La SM es una técnica más cuantitativa que el "micro-array"; se puede conocer con exactitud el número de veces que un mutante se encuentra representado en una librería de mutantes, mientras que con el "micro-array" se comparan niveles de fluorescencia.
- (ii) La técnica puede aplicarse a cualquier cepa bacteriana, independientemente de que exista un "micro-array" comercialmente disponible de dicha cepa.
- (iii) Resulta más económico, gracias a los bajos costes actuales de la SM.
- (iv) La SM permite un análisis global del genoma, incluyendo partes no codificantes, micro-RNAs y no se centra en el estudio de genes candidatos que han de estar representados por sondas en el "micro-array".
- (v) Puede detectarse, en caso de que hubiera, aquellos fragmentos de DNA contaminantes de otras especies bacterianas (como ocurre *in vivo* en el intestino, donde se pretende aplicar dicha tecnología). En el caso del "micro-array", el DNA contaminante podría interferir con los resultados en el caso que las secuencias del mismo fueran similares a una de las sondas del "micro-array".

Por todos estos motivos, creemos que la secuenciación masiva podría dar mejores resultados a la hora de identificar los genes necesarios por VRE para colonizar el intestino (actual tema de estudio del grupo donde realizo el TFG). Sin embargo dicha metodología no ha sido utilizada hasta la fecha para la identificación de mutantes en el género Enterococo. Por tanto el objetivo global de mi TFG consiste en poner a punto dicha metodología con el fin de poder estudiar aquellos genes que VRE necesita para poder colonizar el tracto gastro-intestinal.

## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo pretende poner a punto la metodología de mutagénesis por transposición en combinación con la técnica de secuenciación masiva con el fin de estudiar la funcionalidad de genes codificados en el genoma de *E. faecium*. Dicha metodología será utilizada en un futuro por el grupo de investigación donde realizo el trabajo de fin de grado con el fin de identificar genes codificados por *E. faecium* necesarios para colonizar el tracto gastrointestinal.

Los objetivos concretos de este Trabajo Fin de Grado son:

1. Identificación de las condiciones óptimas de cultivo para poder transformar con el plásmido pZXL5 la cepa de *E. faecium* E1162 siguiendo el protocolo de (Li et al., 1995).
2. Puesta a punto del protocolo de mutagénesis por transposición desarrollado por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2012). Comprobación de que la mutagénesis por transposición ha sido efectiva mediante métodos microbiológicos (siembra selectiva en distintos medios de cultivo conteniendo distintos antibióticos) y métodos moleculares (PCR de los mutantes por transposición obtenidos).
3. Identificación de un método de extracción de DNA de *E. faecium* que dé resultados reproducibles y suficiente cantidad de DNA para poder realizar la posterior secuenciación masiva de los sitios del genoma donde se ha integrado el transposón.
4. Desarrollo de la metodología necesaria para identificar mediante secuenciación masiva los sitios del genoma donde se ha integrado el transposón.
5. Análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva con el fin de identificar los sitios del genoma donde se ha integrado el transposón.

### 3. MATERIALES y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas bacterianas

##### 3.1.1. DH5 $\alpha$

La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se utilizó para propagar y amplificar el plásmido pZXL5. Esta cepa es muy útil en procedimientos de DNA recombinante y proporciona un buen soporte para obtener transformaciones con alta eficiencia debido a que posee mutaciones como endA<sup>-</sup>, que elimina la actividad de la Endonucleasa I, y hsd, que provoca fallos en el sistema de metilación del DNA aumentando la eficiencia de transformación.

##### 3.1.2. *Enterococcus faecium* E1162

La cepa de *E. faecium* E1162 fue aislada a partir de una infección de sangre en un paciente hospitalizado en Francia en 1996 (Van Schaik, et al., 2010). Dicha cepa es la que utilizamos en el estudio de mutagénesis por transposición ya que:

- (i) *E. faecium* coloniza fácilmente el tracto gastrointestinal de ratón (modelo experimental que utiliza el grupo donde se realizó el presente TFG (Rice et al., 2009).
- (ii) Su genoma se encuentra secuenciado completamente (Lam et al., 2012) y está disponible en **KEGG GENOME** como genoma de referencia
- (iii) Ha sido utilizada previamente en un estudio de mutagénesis por transposición utilizando el mismo transposón que utilizamos en el TFG (Zhang et al., 2012)

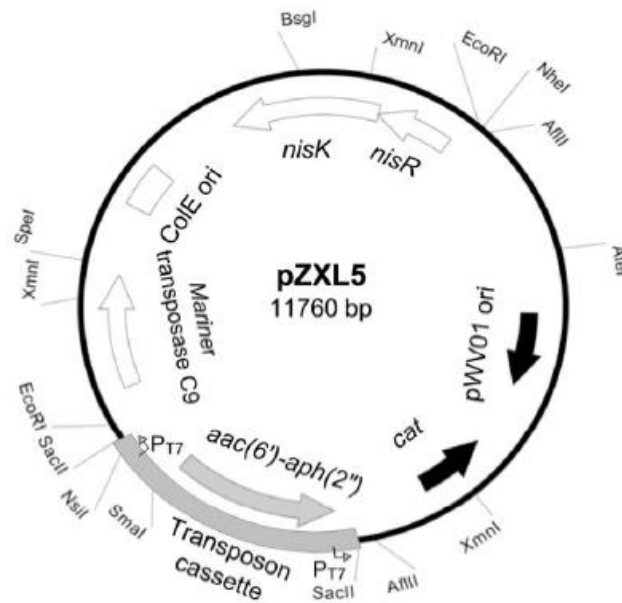
#### 3.2. Plásmidos

##### 3.2.1. pZXL5

El plásmido pZXL5 (Fig.4) fue desarrollado por Zhang et al., 2012 con el fin de identificar los genes de resistencia a Ampicilina en *E. faecium* mediante el método de mutagénesis por transposición descrito en la introducción (apartado 1.4).

El plásmido pZXL5 contiene:

- (i) Un origen de replicación ColE1 que le permite propagarse en *E. coli*.
- (ii) Un replicón Gram-positivo termosensible (repA(ts)). De manera que el plásmido puede replicarse en Enterococo pero únicamente a temperaturas inferiores a 30°C.
- (iii) Un gen que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) que confiere a la bacteria resistencia a cloranfenicol.
- (iv) El "casset" (*acc(6')-aph(2'')*) que confiere a la bacteria resistencia a gentamicina. Dicho "casset" está flanqueado por dos repeticiones inversas que son reconocidas por una transposasa (C9) que codifica el plásmido. Dicha transposasa está regulada bajo un promotor inducible por nisina. De esta manera, si se le añade nisina al medio, la transposasa permitirá la integración del gen que codifica resistencia a gentamicina en un punto aleatorio en el genoma del Enterococo. Las resistencias tanto a gentamicina como a cloranfenicol se expresan en *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. faecium* E1162 confiriendo resistencia a estos antibióticos. La concentración de antibiótico a utilizar en el presente trabajo se obtuvo a partir de estudios previos de CMI en estas cepas. (Zhang et al., 2012)



**Figura 4. Plásmido pZXL5.** Las flechas indican la dirección de la transcripción. Se muestran los sitios de restricción únicos o relevantes. Se indican los genes que confieren resistencia a gentamicina (aac(6)-aph(2") gene) flanqueados por repeticiones inversas que reconoce la transposasa C9 y el gen *cat* que confiere resistencia a cloranfenicol y a cloranfenicol. Los genes *nisK* y *nisR* reprimen la expresión de la transposasa C9. Dicha represión es eliminada por la presencia de nisina en el medio. pWV01 ori permite la replicación del plásmido en bacterias Gram positivas a una temperatura inferior a 30°C. ColE ori permite la replicación del plásmido en *E. coli*.

El plásmido pZXL5 fue generosamente donado por el Dr. Willem van Schaik. Dicho plásmido fue transformado en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  con el objetivo de propagarlo y obtener suficiente cantidad del mismo para transformar la cepa *E. faecium* E1162.

*E. faecium* fue transformado posteriormente con este mismo plásmido pZXL5 con el objetivo de insertar en su genoma el transposón de manera aleatoria, interrumpiendo los genes constituyentes del genoma de *E. faecium* al azar.

### 3.3. "Primers"

**Tabla 1. Lista de los "primers" utilizados.**

"Primers"	Secuencia	Descripción	Referencias
genta_probe_F	5'-ACAGAGCCTTGGGAAGATGA-3'	Primer directo utilizado para amplificar el gen de resistencia a gentamicina en el transposón de pZXL5.	Zhang, et al. (2012)
genta_probe_R	5'-TGCCTTAACATTTGTGGCATT-3'	Primer reverso utilizado para amplificar el gen de resistencia a gentamicina en el transposón de pZXL5.	Zhang, et al. (2012)
MiSeq-poliG	5'-TCGTCGGC AGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGGGGGGG GGGGGGGGGG-3'	Primer utilizado para la adicción del adaptador I al DNA mediante unión a cola poli-C.	Este trabajo

<b>MiSeq-Himar1</b>	5'-GTCTCGTGG GCTCGGAGATG TGTATAAGAGACAGG TTCGCTGGGTTTAAATACG ACTCACT-3'	Primer utilizado para la adición del adaptador II al DNA mediante unión al transposón.	Este trabajo
<b>CmR-1F</b>	5'-CGACGGAGAGTTAGGTTATTGGG- 3'	Primer directo utilizado para la identificación del gen <i>cat</i> (Resistencia a cloranfenicol) Plásmido pZXL5	Este trabajo
<b>CmR-2R</b>	5'-GCCAGTCATTAGGCCTATCTGAC-3'	Primer reverso utilizado para la identificación del gen <i>cat</i> (Resistencia a cloranfenicol) Plásmido pZXL5	Este trabajo

### 3.4. Medios de cultivo y condiciones.

Los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C y 1 atmósfera de presión.

Los compuestos termosensibles se añadieron tras la esterilización en campana de flujo laminar y siempre y cuando el medio de cultivo se encontrase a una temperatura inferior a 40 °C.

#### o Cultivos líquidos.

Los medios de cultivo en estado líquido se almacenaron a temperatura ambiente (entre 18 y 22 °C). Para crecer las cepas en caldo de cultivo se utilizaron tubos estériles de 15 mL soportados por una gradilla fijada a la estufa en constante agitación para asegurar una buena aireación.

#### o Cultivos sólidos.

Estos medios se guardaron a una temperatura no superior a 4 °C ni inferior a 2.2 °C. Los cultivos sólidos se crecieron en estufa en placas Petri de 100x15 mm, invertidas y estáticas a la temperatura que requirieran las cepas correspondientes.

#### 3.4.1. DH5α.

- ⇒ Sin transformar. *E. coli* se cultivó a 37 °C en agitación (200 rpm) en LB (Luria-Bertani) líquido, compuesto por 0.01 g/L triptona, 0.005 g/L de extracto de levadura y 0.01 g/L de NaCl.
- ⇒ Transformada con pZXL5. En este caso se necesitó crecer *E.coli* en presencia de cloranfenicol y gentamicina para comprobar la presencia del plásmido pZXL5. Se cultivó a 37 °C en medio LB líquido en presencia de 10 µg/mL de cloranfenicol y 25 µg/mL de gentamicina y en agitación (200 rpm). Las condiciones son idénticas para el cultivo en LB-Agar en estático. El medio LB sólido fue suplementado con European Bacteriological Agar (15 g/L).

#### 3.4.2. *E. faecium* E1162.

- ⇒ Sin transformar. *E. faecium* se cultivó a 37 °C en agitación (200 rpm) en medio BHI (Brain Heart Infusion), compuesto por una infusión de cerebro-corazón (5 g/L), fosfato de sodio (2.5 g/L), D-Glucosa (2g/L), peptona (10 g/L), cloruro sódico (5

g/L) a pH  $7.4 \pm 0.2$  (25 °C). Para cultivos sólidos se añadió European Bacteriological Agar (15 g/L).

- ⇒ Transformado con pZXL5. Para la selección de las cepas de *E. faecium* se cultivó a 28 °C en agitación (200 rpm) y medio BHI líquido con 4 µg/mL de cloranfenicol y 300 µg/mL de gentamicina. Para cultivar en medio sólido se suplementó dicho medio con European Bacteriological Agar (15 g/L) manteniendo la temperatura a 28 °C.
- ⇒ Pérdida de pZXL5. *E. faecium* se cultivó a 37 °C en agitación (200 rpm) y medio BHI líquido con 300 µg/mL de gentamicina. Para cultivar en placa Petri se añadió European Bacteriological Agar (15 g/L).
- ⇒ Medios para la transformación. Los medios para la electroporación se prepararon como se describe en (Li *et al.*, 1995; Arias and Murray, 2012):
  - BYGT: BHI (19 g/L), extracto de levadura (5 g/L), dextrosa (2 g/L), Tris (12.1 g/L). pH=8.
  - BYGT (6%) α: BHI (19 g/L), extracto de levadura (5 g/L), dextrosa (2 g/L), α (60 g/L), Tris (12.1 g/L). pH=8.
  - BYGT-Sacarosa: BHI (19 g/L), extracto de levadura (5 g/L), dextrosa (2 g/L), Tris (12.1 g/L), sacarosa (85.5 g/L). pH=8.
  - Sacarosa-MgCl<sub>2</sub>: Sacarosa (213 g/L), cloruro de magnesio hexahidratado (0.2 g/L). pH=4.

### 3.5. Cepas competentes y transformaciones.

#### 3.5.1. DH5α.

La cepa de *E. coli* DH5α fue transformada siguiendo el método choque térmico; para ello las células se llevaron al estado de competencia previamente haciéndose permeables al DNA foráneo por medios químicos (CaCl<sub>2</sub> 0.1M) creando porosidades en la membrana que hacen que, al incrementar la temperatura rápidamente en un breve periodo de tiempo, el DNA extraño se introduzca en las células bacterianas (Panja *et al.*, 2008).

##### 3.5.1.1 Preparación de DH5α competentes.

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se sembró una colonia en 10mL de medio líquido LB en tubo "falcon" y se dejó crecer durante toda la noche (24 h) a 37 °C en agitación (200 rpm). De este tubo "falcon" se traspasó 1mL a un matraz con 50mL de medio líquido LB. Posteriormente se creció el cultivo a 37 °C hasta alcanzar una absorbancia de 0.3-0.4 (2 h). Se incubó durante 10 min en hielo. Se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C durante 5 min y se resuspendió el precipitado en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M). Tras centrifugar durante 5 min a 3000 rpm, 4 °C se resuspendió el precipitado en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> y se alicuotaron las células en alícuotas de 200 µL.

##### 3.5.1.2. Transformación de DH5α con el plásmido pZXL5.

Para introducir el plásmido en las bacterias competentes se utilizaron 200 µL de éstas y se incubaron durante 30 min en hielo con 10 ng/µL del plásmido pZXL5. El choque térmico se llevó a cabo incubando a 42 °C las células durante 90s y posteriormente se incubaron en hielo. Finalmente se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron las células 30 min en agitación a 37 °C.

Las células transformadas se sembraron en medio sólido LB con 10 µg/mL de cloranfenicol y 25 µg/mL de gentamicina, con el fin de seleccionar las cepas correctamente transformadas. Las placas se incubaron durante toda la noche (24 h) a 37 °C.

Todo el procedimiento contó con un control negativo (no se añadió plásmido en el primer paso de la transformación).

### **3.5.2. *E. faecium*.**

Debido a que, por lo general, *E. faecium* es más difícil de transformar, se optó por la técnica de electroporación que también requiere que las células bacterianas sean competentes previamente. La exposición de las células a un impulso eléctrico provoca un aumento de la conductividad eléctrica y un consecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana dejando pasar al interior al DNA foráneo.

La transformación de *E. faecium* se llevó a cabo según el protocolo descrito en (Li et al. 1995, Arias y Murray, 2012) modificándolo en los puntos en los que fue necesario.

#### **3.5.2.1. Preparación de *E. faecium* competentes.**

Para que las bacterias adquirieran la competencia primero se crecieron en 3 mL de medio BYGT (BHI, extracto de levadura, dextrosa y Tris) suplementado con glicina al 5%, siendo ésta la concentración óptima para la inhibición del crecimiento a 37 °C. Las bacterias se crecieron durante toda la noche (24 h) en agitación (200 rpm).

El cultivo obtenido se diluyó en 30 mL de BYGT con glicina al 5% y se incubó 1h a 37°C en agitación (200 rpm). Tras la incubación se centrifugó a 3750 rpm y 4 °C durante 15 min. El sedimento obtenido fue lavado dos veces con 10 mL de Sacarosa-MgCl<sub>2</sub>. Se resuspendieron las células en 500 µL de Sacarosa-MgCl<sub>2</sub> y se incubaron en hielo 45 min para su posterior e inmediata transformación.

#### **3.5.2.2. Transformación de *E. faecium* con el plásmido pZXL5.**

Para la transformación se utilizaron 50 µL de células competentes y se mezclaron con 2 µg del plásmido purificado.

Inmediatamente después se introdujeron las células en las cubetas de 0.2 cm.

La electroporación se llevó a cabo con Bio-Rad “Gene Pulser” a un voltaje de 2.5KV. Tras la electroporación, las bacterias se incubaron en 1 mL de BYGT-Sacarosa durante 2 h a 28 °C en agitación (200 rpm).

Finalmente las bacterias transformadas se crecieron en placas con BHI-agar conteniendo 4 µg/mL de cloranfenicol y 300 µg/mL de gentamicina 10 µL con el fin de seleccionar aquellas bacterias que habían adquirido el plásmido.

Todo el procedimiento contó con un control negativo (no se añadió plásmido en el primer paso de la transformación.)

## **3.6. Manipulaciones del DNA.**

### **3.6.1. Extracciones de plásmido.**

Para extraer plásmido de las cepas se utilizó el kit “Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin MiniPrep kit and a Microcentrifuge” (protocolo de la pág. 22) de QIAGEN®. El protocolo se modificó tanto en *E. coli* como en *E. faecium* de manera que el plásmido se eluyó en agua en lugar de tampón EB para disminuir las sales del tampón de elución, las cuales podrían interferir con el proceso de transformación.

En el caso de *E. faecium*, además se modificó el primer paso del protocolo: 5 mL de un cultivo crecido durante toda la noche fue resuspendido en 210 µL de PBS y 40 µL de lisozima (50 mg/mL) y fue incubado durante 1 h a 37 °C para facilitar la lisis del mismo. Tras dicha incubación, se siguió el protocolo desde el paso 2 del kit anteriormente mencionado, cuyo



procedimiento está basado en la lisis alcalina de las células y la absorción del DNA en una membrana de silicagel en presencia de altas concentraciones de las sales que componen los tampones.

### 3.6.2. Integración del transposón.

Para que el transposón contenido en el plásmido se integre en el DNA genómico de la célula transformada es necesario tratarlo con nisina, la cual induce la expresión de la transposasa.

El tratamiento con nisina consistió en crecer una sola colonia de *E. faecium* transformada con pZXL5 en 50 mL de medio BHI líquido con 4 µg/mL de cloranfenicol y 300 µg/mL de gentamicina durante toda la noche a 30 °C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una absorbancia no menor a 0.44 ( $1 \cdot 10^8$  células). Se resuspendieron 100 µL de ese medio en 200 mL de medio BHI conteniendo 300 µg/mL de gentamicina y nisina (25 ng/mL) y se dejó crecer el cultivo 24 h a 37 °C en agitación (200 rpm). La nisina favorece la integración del transposón en el genoma de la bacteria. A 37°C el plásmido no puede replicarse por lo que se seleccionan aquellas bacterias donde el transposón se ha intergrado en el genoma. Posteriormente, se resuspendieron 100 µL del cultivo en 200 mL de medio BHI con 300 µg/mL de gentamicina sin nisina y se dejó crecer 24h a 37°C en constante agitación (200 rpm).

Finalmente se alícuotó el cultivo obtenido en alícuotas de 1mL (50% glicerol v/v), las cuales se congelaron a -80°C.

Para comprobar la eficiencia del tratamiento con nisina se llevaron a cabo controles positivos y negativos descongelando una de las alícuotas elegida al azar, plaqueándose con bolas de vidrio en placas de BHI-agar, BHI-agar con 300µg/mL de gentamicina, BHI-agar con 4µg/mL de cloranfenicol y BHI-agar con 4µg/mL de cloranfenicol y 300µg/mL de gentamicina, debiendo ser negativos los dos últimos controles.

### 3.6.3. Extracciones de DNA.

Para la extracción de DNA de *E. faecium* se testaron varios kits comerciales y un protocolo basado en extracción por fenol-cloroformo.

#### 3.6.3.1. Extracción DNA “PSP®Spin Stool DNA Plus Kit”

Se siguió el protocolo de “PSP® Spin Stool DNA Plus Kit” de PSP® para muestras de difícil extracción.

#### 3.6.3.2. Extracción DNA “QIAmp® DNA Stool Mini Kit (50)”

Se siguió el protocolo de QIAGEN® con algunas modificaciones: Tras centrifugar el cultivo bacteriano, el precipitado fue resuspendido en 1.4mL del tampón ASL. Se añadieron 500 µL de perlas de vidrio de 0.1 mm, y la mezcla fue agitada a máxima velocidad en un “vortex” durante 5 min. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 13.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL y se incubó a 95 °C durante 7 min. Tras este paso previo de lisis mecánica, se continuó con el protocolo estándar de QIAGEN®.

#### 3.6.3.3. Extracción DNA “QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)”

El kit de extracción “QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)” de QIAGEN® elimina la adición de la InhibitEX Tablet, que reducía el volumen a recuperar considerablemente en el kit anterior.

#### 3.6.3.4. Extracción de DNA por el método fenol-cloroformo.

Debido a la pequeña cantidad de DNA recuperada mediante los kits anteriormente mencionados se decidió utilizar el método de fenol-cloroformo.

Soluciones empleadas:

- Tampón de extracción: 200 mM Tris (pH=8.0), 200 mM NaCl y 20 mM EDTA.
- Dodecilsulfato sódico (SDS) 20%
- Fenol-Cloroformo-Isoamílico: 25:24:1
- Acetato sódico 3 M (pH=5.2), Etanol (EtOH) 70% y 100%

Se resuspendió el precipitado en 500 µL de tampón de extracción, se añadieron 210 µL de SDS, 500 µL de fenol/cloroformo/isoamílico y 500 µL perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro (BioSpec Products) en un tubo de 2 mL. La mezcla se agitó durante 5 min y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se llevó a un nuevo tubo de 1.5 mL.

Después se añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo/isoamílico que sobrenadante se recuperó, se agitó y se centrifugó a 13000rpm durante 5min.

Se recogió la fase acuosa (la superior) y se midió el volumen recuperado.

Para la precipitación del DNA se añadió 1/10 parte del volumen recuperado de acetato sódico (3 M pH=5.2), se mezcló y se añadieron 2 volúmenes de EtOH 100%. Tras incubar 20 min a -80 °C se centrifugó la mezcla durante 20 min a 13.000 rpm a una temperatura de 4 °C.

Se descartó todo el sobrenadante y se hicieron dos lavados del sedimento con EtOH 70%. Se dejó evaporar todo el EtOH y se resuspendió el precipitado en el volumen deseado de Tris-Ácido Etilendiaminetetracético (TE).

Posteriormente el DNA resuspendido se incubó con 1 µL de RNAsa (20 µg/mL) durante 15-20 min.

#### 3.6.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Todas las electroforesis se llevaron a cabo en gel de agarosa (0.8 o 1.4 mg/L dependiendo del tamaño esperado del fragmento de DNA) utilizando una solución tampón de TBE (Tris/Borato/EDTA; 89 mM Tris (pH 7,6), ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Se corrieron 4 µL de muestra de DNA mezclada con 1 µL de tampón de carga (60 mL TBE 10X, 30 mL Glicerol 30%, 0.125 g Xilencianol, 0.125 g azul de bromofenol en un volumen final de 100 mL) al que se le añade 5 µL de Gel-Red por cada mL de tampón de carga con el fin de visualizar posteriormente el DNA. Por otro lado, en todos los geles se corrió un marcador de pesos moleculares de "GeneRuler™".

Todos los geles se corrieron durante un periodo no inferior a 25 min y no superior a 30 min y se aplicó un campo eléctrico de 120 V.

El gel se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

#### 3.6.5. Cuantificación del DNA.

El método de cuantificación utilizado sólo detectan DNA de doble cadena, siendo necesario un gel de electroforesis para comprobar la ausencia de RNA.

Para cuantificar el DNA se utilizó PicoGreen® diluyendo el reactivo 1:200 en TE y colocando, por muestra: 25 µL del reactivo, 24 µL de tampón TE y 1 µL del DNA muestra. Siendo el volumen total igual a 50 µL. El mix se incubó en oscuridad durante 3min.

### **3.6.6. Purificación del DNA.**

#### **3.6.6.1. Purificación del DNA en placa.**

La purificación del DNA se llevó a cabo en placas de purificación de 96 pocillos “Excela Pure 96-Well UF Plate” de EdgeBio®. Este sistema de purificación permite filtrar los contaminantes (nucleótidos, sales, polimerasas y “primers”) reteniendo el DNA en la membrana. Los productos purificados se pueden recuperar después de una elución en agua.

Se colocaron de 25 a 50  $\mu\text{L}$  de DNA añadiendo agua hasta un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  y se dejó durante 10 min en una bomba de vacío. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua mili-Q y se dejó durante 10 min la placa en la bomba de vacío. Finalmente se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de agua mili-Q, se dejó reposar durante 10 min y se extrajo de los pocillos el DNA concentrado y purificado.

#### **3.6.6.2. Purificación del DNA mediante perlas.**

Con el fin de eliminar fragmentos de DNA de menor tamaño (<200 pb) se utilizaron perlas metálicas “Agencourt® AMPure® XP” de Beckman Coulter, que permiten purificar DNA de distintos tamaños dependiendo de la concentración de perlas que se añadan a la muestra. Las perlas magnéticas son un método sencillo y fiable de purificación genómica que, en condiciones optimizadas, une el DNA selectivamente a la superficie de las perlas mientras que el resto de contaminantes (enzimas, polimerasas, sales o nucleótidos) permanecen en la solución. Las perlas magnéticas con el DNA retenido se pueden separar del resto mediante una placa imantada. Finalmente, el DNA se puede eluir en tampón TE y eliminar las perlas con la placa imantada, recogiendo el sobrenadante con el DNA.

Para eliminar los fragmentos que estén entre 100 y 200 pb se añadieron al DNA 40  $\mu\text{L}$  de perlas en una proporción 1:0.8 a un volumen de DNA final de 50  $\mu\text{L}$ . Tras descartar el sobrenadante, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de TE y se recogió el sobrenadante. Se añadieron los 50  $\mu\text{L}$  a un nuevo tubo de 1.5 mL y se adicionaron de nuevo perlas en una proporción 1:0.6 (30  $\mu\text{L}$ ) y se descartó el sobrenadante. Las perlas se resuspendieron en 25  $\mu\text{L}$  de TE y se guardó el sobrenadante conteniendo el DNA purificado.

#### **3.6.6.3. Purificación del DNA a partir de gel de agarosa.**

Para la purificación de las bandas corridas en gel de agarosa se utilizó un kit de Roche® “High Pure PCR Product Purification Kit” Versión 16, protocolo de purificación (pág 8-9) sin modificar. Este kit elimina cebadores, sales, nucleótidos no incorporados, DNA polimerasas y elementos que puedan inhibir reacciones enzimáticas posteriores. La muestra se mezcla con una sal caotrópica y se aplica a la fibra de vidrio polar en un tubo de centrifuga. Bajo las condiciones del tampón, los ácidos nucleicos se unen a la fibra de vidrio en el tubo mientras que las sustancias contaminantes no lo hacen. Los pasos de lavado eliminan estos contaminantes y, una vez purificados los ácidos nucleicos pueden ser eluidos fácilmente en un pequeño volumen de tampón de elución.

La purificación desde gel de agarosa nos permite obtener exactamente los fragmentos de DNA de un determinado tamaño, sin embargo no es tan eficiente como la purificación mediante perlas o mediante placa. Por ello se utilizaron distintos protocolos de purificación, según las necesidades requeridas en cada uno de los protocolos en los que trabajamos con fragmentos purificados de DNA.

### 3.6.7. PCRs.

El protocolo general para la realización de la PCR mostrado en la tabla 2 se utilizó para todas las reacciones de PCR con las variaciones necesarias en cada caso. Los reactivos de la reacción de PCR se muestran en la tabla 3, variando según la finalidad de la reacción de PCR en la cantidad de DNA y agua.

**Tabla 2. Programa utilizado para la reacción de PCR**

Ciclo	Número de Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min	94°C
Desnaturalización	25*	30 s	94°C
Hibridación		30 s	56°C**
Extensión		1 min	68°C
Extensión final	1	5 min	72°C
Pausa	END	-	4°C

\* El número de ciclos varió según el propósito de la reacción de PCR.

\*\* La temperatura de hibridación depende de la secuencia de los “primers”.

**Tabla 3. Reactivos para la reacción de PCR**

	Volumen/reacción
Tampón Thermo pol (10x)	2.5 µL
Polimerasa (1 U/µL)	0.5 µL
dNTPs (10 mM)	0.625 µL
Primer directo (10 mM)	0.5 µL
Primer reverso (10 mM)	0.5 µL
Agua miliQ	19.375 µL*
DNA	1 µL*

\* Cantidades variables según la concentración de DNA requerida para cada reacción de PCR

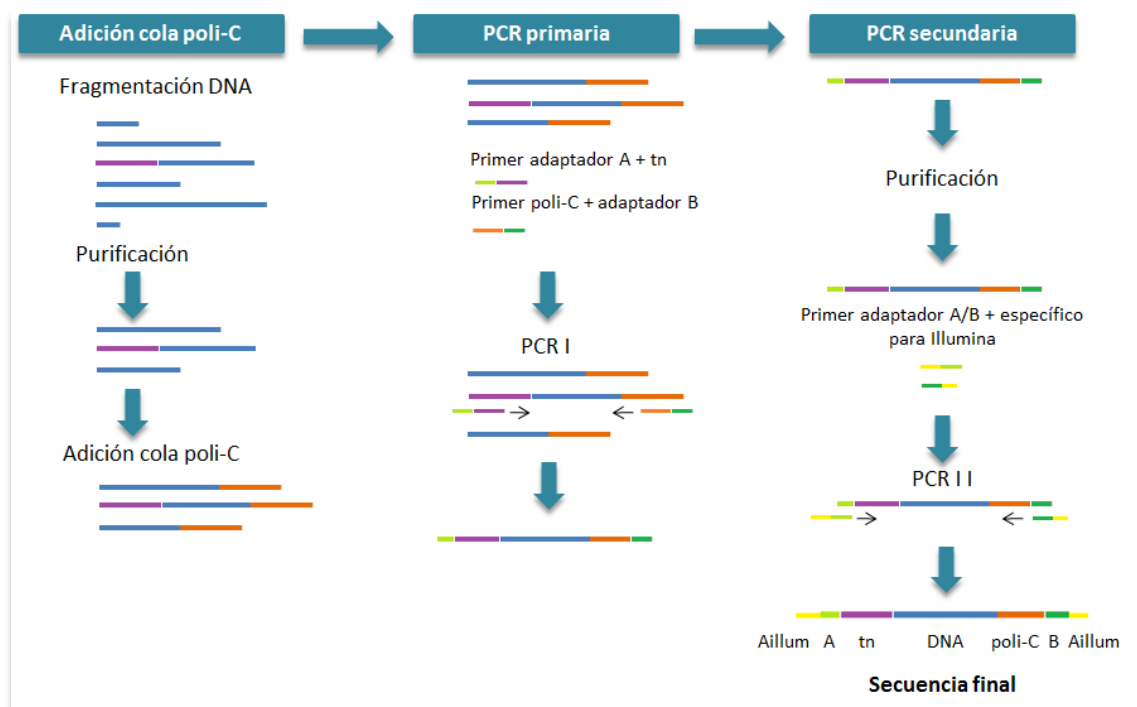
- 3.6.7.1. PCR del gen *aac(6′)-aph(2′)* que codifica la resistencia a gentamicina.** Se realizó una PCR para amplificar exclusivamente la secuencia del gen de resistencia a gentamicina para comprobar que el transposón se hallaba en el genoma de las bacterias transformadas. Esta PCR se llevó a cabo utilizando los “primers” Genta\_probe\_R y Genta\_probe\_F de Zhang y colaboradores con una T<sub>m</sub> de 57 °C siguiendo el protocolo indicado anteriormente.
- 3.6.7.2. PCR del gen *cat* que codifica la resistencia a cloranfenicol.** Se realizó una PCR para amplificar el gen de resistencia a cloranfenicol que únicamente se haya en el plásmido pZXL5 para verificar que éste se ha perdido. Los “primers” utilizados fueron CmR-1R y CmR-2F siguiendo el protocolo indicado anteriormente.
- 3.6.7.3. PCR primaria para secuenciación masiva. Illumina.** Se realizó una PCR tras la fragmentación del DNA y la adición de la cola poli-C a los fragmentos de DNA (ver siguiente apartado) utilizando los oligos MiSeq-poliG y MiSeq-

Himar1 y variando las condiciones al añadir 5  $\mu\text{L}$  de DNA, 15.375  $\mu\text{L}$  de agua y 28 ciclos de PCR.

**3.6.7.4. PCR secundaria para secuenciación masiva. Illumina.** Utilizando 25 ng como molde de la PCR primaria obtenida en el apartado 3.6.7.3. se realizó una PCR secundaria utilizando los primer S508, N711 y N712 que provienen del kit para secuenciación por Illumina de Agilent®. Las condiciones para esta PCR se modificaron en: 12 ciclos, la  $T_m$  de los oligos se fijó en 55  $^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de extensión en 45 s. En el apartado siguiente (3.6.12) se describe con detalle la finalidad de ambas PCRs.

### 3.6.8. Secuenciación masiva.

#### 3.6.8.1. Resumen de la preparación del DNA para la secuenciación masiva.



**Figura 5. Resumen del sistema de secuenciación masiva.** Azul: DNA, Violeta: Transposón (tn) insertado en el DNA, Naranja: Cola poli-C. Verdes-amarillo: Adaptadores (A, B, Aillum). La preparación del DNA para la secuenciación masiva se compone de 3 pasos: **(1)** Adición de la cola poli-C al DNA previamente fragmentado y purificado (se seleccionan los fragmentos de alrededor de 600 pb de longitud). **(2)** PCR primaria (PCR I) que amplifica de manera exponencial los fragmentos que contienen el transposón insertado y la cola poli-C mediante unos primer compuestos por un fragmento que hibrida con el transposón o la cola poli-C y un adaptador (verde). **(3)** PCR secundaria (PCR II). Tras purificar el producto de la PCR I, se realiza una segunda reacción de PCR con los “primers” que hibridan en el adaptador introducido por los “primers” de la PCR I. Estos “primers” contienen las regiones necesarias (Aillum) para que se lleve a cabo la secuenciación por Illumina. La secuencia final estará compuesta por los adaptadores para Illumina, secuencia del transposón, DNA genómico y cola poli-C.

#### 3.6.8.2. Fragmentación del DNA por nebulización.

La nebulización de material genético consiste en fragmentar el DNA aplicando altas presiones. La fuerza de la presión obliga al DNA a atravesar los pequeños agujeros de las

unidades de nebulización, lo que resulta en la formación de un rocío que contiene el DNA fragmentado, depositado en el fondo del frasco de nebulización. El tamaño de los fragmentos se determina por la presión del gas utilizado para empujar el DNA a través del nebulizador.

El siguiente protocolo de fragmentación por nebulización mediante nitrógeno, fue puesto a punto para fragmentar 500 ng de DNA en fragmentos entre 500 y 800 pb ya que son tamaños adecuados para la secuenciación por Illumina. En nuestro caso, puesto que necesitábamos una mayor cantidad de DNA (2  $\mu\text{g}$ ), el protocolo se repitió cuatro veces consecutivas.

Brevemente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón de nebulización Roche® a 500 ng de DNA resuspendidos en 100  $\mu\text{L}$  de tampón TE. La mezcla se homogeneizó con ayuda de un vortex y se colocó en un frasco de nebulización. Se insufló nitrógeno al frasco de nebulización a una presión de 2.5 atmósferas durante 1 min y 10 s.

Posteriormente, se purificó el DNA fragmentado utilizando las columnas de purificación de DNA "High Pure Spin Filter Tube" (Roche®). Se añadieron 2.5 mL del tampón PB (tampón de unión a la columna) y 500  $\mu\text{L}$  de muestra. Se añadió la muestra a una columna y se centrifugó la misma a 13000 rpm durante 30 s. El DNA queda retenido en la columna. Tras esto, se lavó el DNA mediante la adición de 750  $\mu\text{L}$  de tampón PE. Tras centrifugar durante 1 min, se descartó el sobrenadante y se eluyó el DNA en 25  $\mu\text{L}$  de tampón TE.

#### **3.6.8.3. Análisis del tamaño de los fragmentos del DNA.**

Tras la fragmentación se llevó a cabo un análisis del tamaño de los fragmentos de DNA obtenido mediante la nebulización para verificar que los más abundantes eran los correspondientes al tamaño buscado (500-800 pb).

Para realizar este análisis se utilizó el instrumento Bioanalyzer mediante un chip "Agilent High Sensitivity DNA Kit de Agilent®". El kit contiene chips y reactivos diseñados para identificar la longitud de los fragmentos de DNA contenidos en una muestra. Cada chip contiene unos microcanales interconectados que son usados para la separación de los fragmentos según su tamaño por electroforesis. Se utilizó un chip de alta sensibilidad, añadiéndose a los pocillos 9  $\mu\text{L}$  del gel-dye mix, 1  $\mu\text{L}$  del marcador para tener un referente y 1  $\mu\text{L}$  de la muestra. Se agitó bien en un "vortex" a 2400 rpm durante 1 min y se corrió en un Agilent 2000 Bioanalyzer durante 45 min.

#### **3.6.8.4. Adición de la cola poli-C.**

La adición de la cola poli-C a los fragmentos de DNA para la secuenciación masiva se llevó a cabo según Klein y colaboradores. Para esta reacción se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de DNA, enzima TdT de Promega® (0.5  $\mu\text{L}$ ), tampón de reacción TdT de Promega® 5X (4  $\mu\text{L}$ ), nucleótidos deoxicitosina (dCTP) (475  $\mu\text{M}$ ) y dideoxicitosina (ddCTP) (25  $\mu\text{M}$ ) utilizado como terminador de la reacción de adición y agua hasta completar un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ .

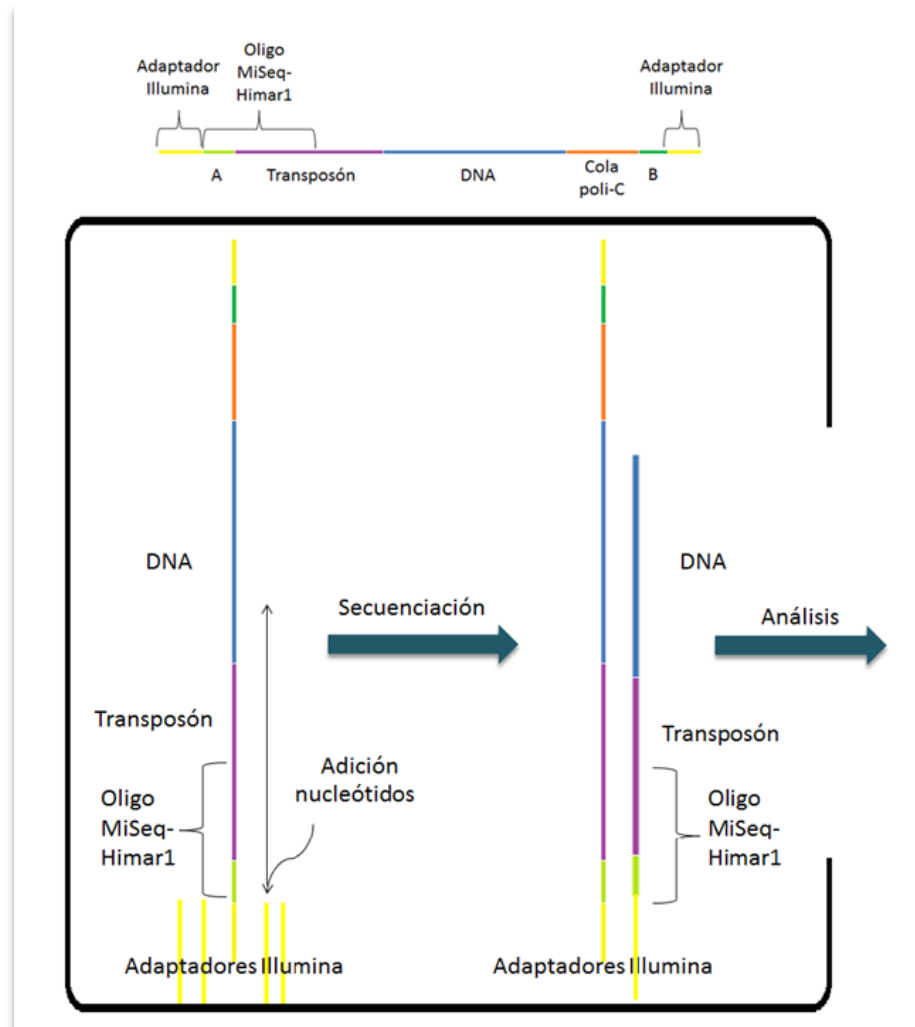
La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. Posteriormente se incubó durante 20 min a 75 °C para conseguir la inactivación de la enzima.

#### **3.6.8.5. Reacción de secuenciación masiva.**

La reacción de secuenciación masiva se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 1.4.2. La figura 6 muestra un esquema de la estructura de las secuencias que se secuenciaron: adaptadores de Illumina, "primers" de la PCR primaria (MiSeq-Himar1 (adaptador y un

fragmento de la secuencia del transposón) y MiSeq-PoliG (adaptador y cola poli-G)), transposón integrado y DNA. La secuenciación puente de Illumina permite secuenciar hasta 400 pb, por lo que las secuencias obtenidas por este método contendrán: el “primer” MiSeq-Himar1 seguido del resto de secuencia del transposón y la parte contigua al transposón correspondiente al DNA genómico, que será utilizado para identificar el sitio de inserción del transposón en el genoma.

La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación masiva de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO). Para ello se utilizó el kit “MySeq Reagent Kit V3” de Illumina®.



**Figura 6. Esquema de la secuenciación por Illumina.** Amarillo: Adaptadores para la secuenciación por Illumina. Verde A y B: Adaptadores PCR primaria. Violeta: Transposón. Azul: DNA de la cepa *E. faecium* E1162. Naranja: Cola poli-C. Flecha negra: Sentido de la secuenciación. Se secuenciará el “primer” MiSeq-Himar1, el transposón y, por último el DNA de *E. faecium* E1162. Las secuencias tienen un tamaño entre 500-700 pb, suficiente para secuenciar un fragmento de DNA de la cepa E1162 e identificarlo en posteriores análisis.

### 3.7. Análisis de las secuencias.

Se utilizaron 3 bases de datos para confrontar las secuencias obtenidas en la secuenciación masiva con las referentes. La base de datos del genoma de la cepa E1162 fue creada a partir de las secuencias descargadas de **PATRIC**:

- (i) ORFs de *E. faecium* E1162. 2.694 CDS, 2.699.489 pb. secuenciados 2010-03-26 por el “Dept. of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht”
- (ii) Base de datos de todas las secuencias de bacterias (NCBI)
- (iii) Secuencia del transposón.

Dichas bases de datos se crearon utilizando el programa Blast en Linux utilizando la función: formatdb.

Las secuencias obtenidas de Illumina fueron procesadas mediante el programa mothur para eliminar todas aquellas de un tamaño menor a 100 pb y eliminar la parte final de la secuencia que contuviera nucleótidos con una calidad inferior a 20, siendo 40 la mayor calidad posible y 0 una indeterminación (la parte final de la secuencia siempre es de menor calidad). Por otro lado, todas aquellas secuencias que no contuvieran la secuencia del oligo correspondiente al transposón fueron eliminadas.

Aquellas secuencias que pasaron los filtros se compararon con las bases de datos generadas utilizando Blast y los parámetros por defecto del programa.

Finalmente, filtramos el mejor alineamiento obtenido para cada una de las secuencias.



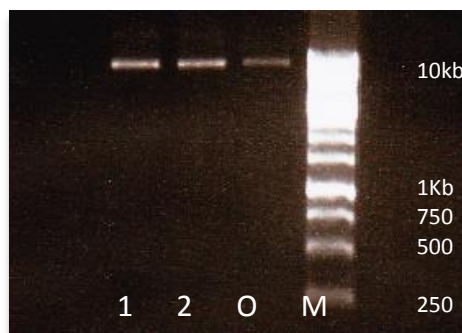
## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1. Propagación del plásmido pZXL5 en la cepa DH5 $\alpha$ .

El plásmido pZXL5 fue amablemente donado por el Dr. Van Schaik. Para mantener el plásmido y amplificarlo se decidió transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* con el fin de obtener suficiente cantidad para transformar la cepa E1162 de *E. faecium*.

La transformación de la cepa DH5 $\alpha$  se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.5.1.2. Posteriormente se creció el cultivo transformado en 4 placas: LB-agar sin antibiótico, LB-agar con gentamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), LB-agar con cloranfenicol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y medio LB-agar con gentamicina y cloranfenicol a las mismas concentraciones para comprobar las resistencias a los antibióticos. Se obtuvieron colonias resistentes tras incubar durante toda la noche a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó un control negativo sin plásmido para la transformación, en cuyo caso no se obtuvo ninguna colonia de DH5 $\alpha$ .

Tras la transformación de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se comprobó que el plásmido se hallaba en el interior de las bacterias y que la resistencia adquirida a los antibióticos era debida a su causa. Para ello se procedió a extraer el plásmido (Fig. 7) mediante el proceso descrito en el apartado 3.6.1. de este mismo trabajo.



**Figura 7. Extracciones de plásmido de la cepa DH5 $\alpha$  y plásmido pZXL5 original (Zhang et al., 2012).** 1,2: Réplicas de las extracciones del plásmido pZXL5. O: Plásmido original pZXL5. M: Marcador de pesos moleculares.

### 4.2. Transformación de la cepa E1162 de *E. faecium* con el plásmido pZXL5.

#### 4.2.1. Selección de la cepa *E. faecium* E1162.

Para llevar a cabo el presente trabajo se propusieron varias cepas de *E. faecium*, entre las que se seleccionó la cepa E1162 debido a la existencia de estudios previos (Zhang et al., 2012) que aseguraban la sensibilidad a los antibióticos utilizados como control en este proyecto (cloranfenicol para la transformación y gentamicina para la inserción del transposón en el genoma bacteriano). Una de las cepas testadas fue VRE-ATCC700221, previamente utilizada por el grupo, pero se descartó dado que poseía resistencia a gentamicina (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.2.2. Optimización del protocolo de transformación de Enterococo.

Debido a que el Enterococo es una bacteria de difícil transformación se optimizó este proceso adicionando glicina al medio de cultivo (Li et al., 1995; Arias y Murray, 2012) ya que se ha observado que, pese a tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, permite

una mayor eficiencia de transformación, probablemente a través de la debilitación de la pared celular.

Puesto que la inhibición óptima del crecimiento por glicina depende de la cepa, se realizaron varios estudios para determinar la concentración de glicina óptima para alcanzar una inhibición del crecimiento del 70 % (Li et al., 1995). Dicha inhibición del crecimiento es la que da una mayor eficiencia a la transformación. Para ello se creció la cepa E1162 en medio BYGT con concentraciones decrecientes de glicina (tabla 4).

**Tabla 4. Primer experimento para determinar la concentración de glicina.**

Medio BYGT + glicina	ABS 600 nm	Crecimiento (%) <sup>1</sup>	Inhibición (%) <sup>2</sup>
BYGT Ø glicina	1,869	100,00	0,00
BYGT + 6 %	0,17	9,10	90,90
BYGT + 3%	0,808	43,23	56,77
BYGT + 1.5%	1,477	79,03	20,97
BYGT + 0.75%	1,545	82,66	17,34
BYGT + 0.25%	1,856	99,30	0,70
BYGT + 0.1%	2,002	107,12	-7,12

1,2. El porcentaje de crecimiento e inhibición se calculó con respecto al cultivo sin glicina.

Como se puede observar en la tabla 4, una concentración del 6% de glicina provocó una inhibición del crecimiento del 90 %. Sin embargo, la siguiente concentración utilizada (3 %) produjo un 56 % de inhibición, inferior a la óptima requerida (70 %). Por ello, para determinar la concentración de glicina óptima se decidió realizar otro experimento con un amplio rango de concentraciones (tabla 5).

**Tabla 5. Segundo experimento para determinar la concentración de glicina.**

Medio BYGT + glicina	ABS 600 nm	Crecimiento (%) <sup>1</sup>	Inhibición (%) <sup>2</sup>
BYGT Ø glicina	1,582	100,00	0,00
BYGT + 6 %	0,19	12,01	87,99
BYGT + 5%	0,458	28,95	71,05
BYGT + 4.5%	0,817	51,64	48,36
BYGT + 4%	0,972	61,44	38,56
BYGT + 3.5%	1,085	68,58	31,42
BYGT + 3%	1,184	74,84	25,16
BYGT + 1.5%	1,316	83,19	16,81
BYGT + 0.75%	1,478	93,43	6,57
BYGT + 0.25%	1,56	98,61	1,39
BYGT + 0.1%	1,556	98,36	1,64

1,2. El porcentaje de crecimiento e inhibición se calculó con respecto al cultivo sin glicina

Como se puede observar en la tabla 5, la concentración de glicina del 5% es la idónea (inhibición del 70%). Cabe resaltar que existe variabilidad entre los dos experimentos respecto a la concentración de glicina del 3%. Sin embargo, la repetición del experimento a una concentración del 5% nos proporcionó los mismos resultados de inhibición del 70%. Por ello se concluye que se debe utilizar un 5% de glicina en medio BYGT como concentración óptima para proceder a transformar la cepa E1162 de *E. faecium*.

#### 4.2.3. Transformación de la cepa E1162.

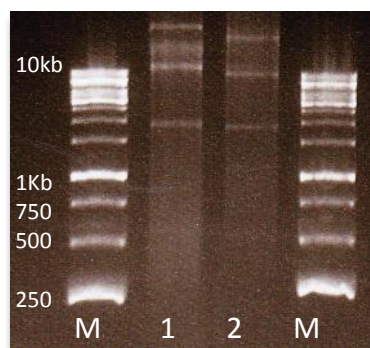
La transformación de *E. faecium* E1162 con el plásmido pZXL5 obtenido de la transformación de la cepa DH5 $\alpha$  se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.5.2.2. mediante electroporación y habiéndose crecido el cultivo durante toda la noche en medio BYGT al 5 % de glicina.

Tras la electroporación, las bacterias se incubaron en 4 placas de BHI-agar a 28 °C durante toda la noche: BHI-agar, BHI-agar suplementado con gentamicina (300  $\mu$ g/mL), BHI-agar con cloranfenicol (4  $\mu$ g/mL) y BHI-agar con gentamicina y cloranfenicol a mismas concentraciones. En todas las pruebas se obtuvo un cultivo de colonias visibles a las 24 h salvo en el caso de las placas que contuviesen cloranfenicol o cloranfenicol/gentamicina, cuyos resultados eran visibles a las 48 h.

Se realizó un control negativo omitiendo la adición del plásmido pZXL5 en el proceso de transformación. En este caso tan solo se observó crecimiento en el medio control BHI-agar sin antibióticos, quedando confirmada la sensibilidad que la cepa E1162 posee a estos antibióticos.

#### 4.2.4. Extracción del plásmido pZXL5 y comprobaciones.

Una vez la transformación de la cepa E1162 con pZXL5 fue positiva, se extrajo plásmido con el fin de comprobar su presencia en el interior de la bacteria (Fig. 8). Tras correr el plásmido en un gel de agarosa se observaron varios fragmentos de DNA de distintos tamaños, a diferencia del plásmido extraído de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , donde únicamente se observó un fragmento de DNA correspondiente al plásmido pZXL5.



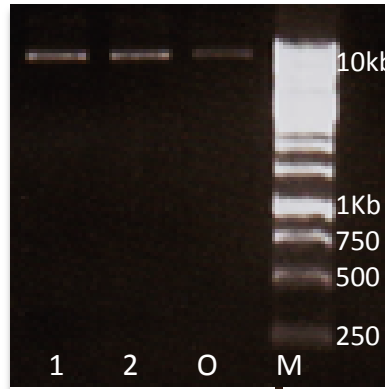
**Figura 8. Extracción de plásmido pZXL5 de la cepa transformada E1162 de *E. faecium*.** 1,2: Réplicas de las extracciones de plásmido pZXL5. M: Marcador de pesos moleculares.

Uno de los fragmentos obtenidos tenía un tamaño similar al del plásmido extraído de *E. coli* pero, además, se observó la existencia de dos fragmentos de DNA adicionales de tamaño superior e inferior al plásmido pZXL5. Estos fragmentos adicionales podrían explicarse de dos maneras:

- (i) La cepa E1162 de *E. faecium* no es deficiente en endonucleasas (*endA*) como lo es la cepa DH5 $\alpha$ , por lo que podrían apreciarse las diferentes conformaciones que puede adquirir este plásmido.
- (ii) Las bandas observadas se deben a plásmidos de la cepa E1162 que se extrajeron junto con el plásmido pZXL5.

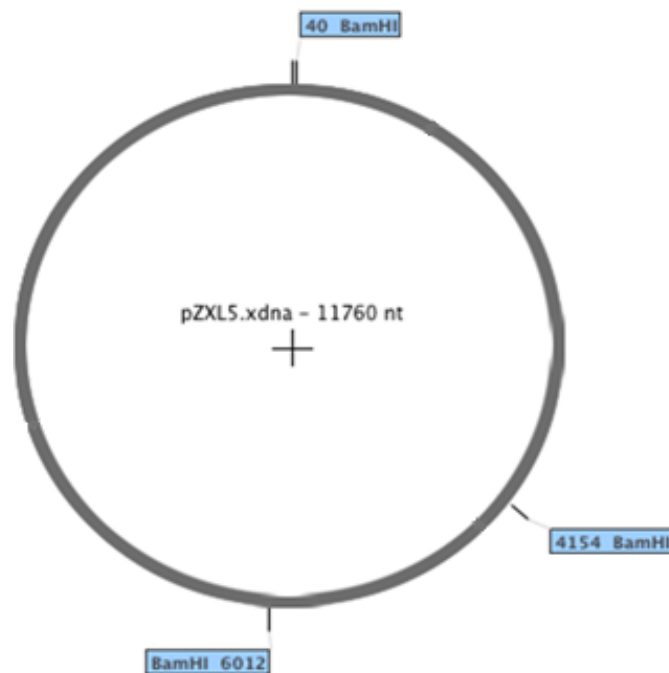
Para comprobar la existencia del plásmido sin que interfiriesen las endonucleasas ni plásmidos presentes en la cepa, se procedió a transformar la cepa DH5 $\alpha$  con el plásmido pZXL5 obtenido de la extracción de plásmido de *E. faecium* E1162 siguiendo el mismo método y condiciones. Como era de esperar, se obtuvieron colonias resistentes a gentamicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloranfenicol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sin embargo, en el control negativo sin el plásmido pZXL5 no se obtuvo ninguna colonia en los medios de LB-agar suplementados con estos antibióticos.

Posteriormente, se extrajo de estas colonias plásmido pZXL5 (Fig. 9) y, tras correr un gel de agarosa, se observó un único fragmento de DNA del mismo tamaño que el plásmido original, confirmando que las bandas observadas en la figura 8 corresponden al plásmido pZXL5.



**Figura 9. Extracción de plásmido pZXL5 de la cepa DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido procedente de *E. faecium* E1162. 1,2:** Réplicas de las extracciones de pZXL5. **O:** Plásmido original pZXL5 (Zhang et al., 2012). **M:** Marcador de pesos moleculares.

Para corroborar que el plásmido transformado en la cepa E1162 se trataba en efecto del plásmido pZXL5, se procedió a digerir el plásmido con BamHI, enzima que corta el plásmido en 3 sitios específicos, generando por tanto 3 fragmentos (Fig. 10)

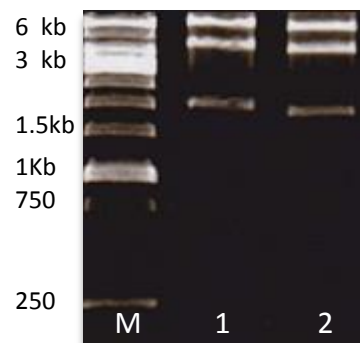


**Figura 10. Sitios de restricción para BamHI en el plásmido pZXL5.** Mapa obtenido con el programa SerialCloner en el se indican los sitios del plásmido donde digeriría la enzima BamHI. Dicha enzima

digiere en los nucleótidos (5'-G/GATCC-3') generando 3 fragmentos de tamaño 4114 pb, 1858 pb y 5748 pb. En el interior del círculo se indica el tamaño total del plásmido pZXL5.

El plásmido pZXL5 se digirió durante 2 h a una temperatura de 37 °C. Como se puede observar en la figura 11, tanto el plásmido propagado originalmente en DH5 $\alpha$ , como el plásmido obtenido en DH5 $\alpha$  procedente de la cepa E1162, dieron lugar a patrones de bandas idénticos. Se observaron 3 bandas, correspondientes a los 3 fragmentos que se obtienen tras digerir el plásmido pZXL5 con BamHI. Las bandas corresponden, en orden descendiente, a: fragmento de 5.7 Kb, fragmento de 4.1 Kb y fragmento de 1.8 Kb.

Así se pudo confirmar que el plásmido no sufría ninguna variación al ser transformado en la cepa E1162 de *E. faecium*.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pZXL5 con BamHI.** M: Marcador de pesos moleculares. 1: pZXL5 digerido con *BamHI* procedente de DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido original (Zhang et al., 2012). 2: pZXL5 digerido con *BamHI* procedente de DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido extraído de E1162. Gel de agarosa 0.8%. pZXL5 digerido con *BamHI* presentó patrones de digestión idénticos en ambos casos.

#### 4.3. Creación de la biblioteca de mutantes.

Una vez transformada la cepa E1162 con el plásmido pZXL5 y comprobado que la transformación fue correcta se procedió a insertar el transposón en el genoma bacteriano y a la posterior eliminación del plásmido.

##### 4.3.1. Integración del transposón en el genoma.

La integración se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.6.2. protocolo obtenido de Zhang y colaboradores, por el que aseguran que el transposón se insertará una única vez por genoma bacteriano, de manera completamente aleatoria, sin preferencias por un sitio concreto. Para ello fue necesario tratar las bacterias transformadas con nisina, la cual indujo la expresión de la transposasa C9 contenida en el plásmido pZXL5. Dicho tratamiento con nisina se realizó a partir de un cultivo incubado durante toda la noche a 30 °C y suplementado con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloranfenicol y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina. Este cultivo se diluyó como se indica en materiales y métodos y tras alcanzar una absorbancia de 0.44, se creció el cultivo a 37°C en medio sin nisina y tan sólo con gentamicina (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), evitando que el plásmido pZXL5 se replicase.

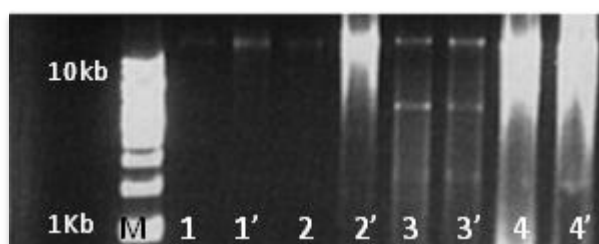
#### 4.3.2. Comprobaciones de la inserción del transposón.

Para comprobar la eficiencia del tratamiento con nisina se creció la librería obtenida de mutantes tras el tratamiento con nisina en BHI-agar, BHI-agar con 300 µg/mL de gentamicina, BHI-agar con 4 µg/mL de cloranfenicol y BHI-agar con 4 µg/mL de cloranfenicol y 300 µg/mL de gentamicina obteniéndose colonias tan sólo en el medio control con BHI-agar y en el medio con gentamicina, puesto que la resistencia a cloranfenicol la otorga el plásmido pZXL5 que no puede replicarse a 37 °C.

Para comprobar la inserción del plásmido en el genoma bacteriano y la completa pérdida del plásmido pZXL5 se plaquearon bacterias de la librería de mutantes obtenida en placas de BHI-agar con gentamicina (300 µg/mL) y se comprobó en 20 colonias individuales la presencia del gen que confiere resistencia al antibiótico gentamicina (*aac(6′)-aph(2″)*) (apartado 4.3.2.1.) y la ausencia del gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) (apartado 4.3.2.2.).

##### 4.3.2.1. Extracciones de DNA.

Para la realización de las PCR descritas frente al gen de resistencia a gentamicina y cloranfenicol y posteriormente para la secuenciación masiva de la librería de mutantes, se extrajo DNA mediante diferentes kit y métodos buscando aquel con el que se obtuviese un mayor rendimiento de extracción (Fig. 12) y mayor reproducibilidad (Tabla 7). Se probaron todos los kits y métodos descritos en el apartado 3.6.3. extrayendo DNA de un cultivo de la cepa E1162 crecida durante toda la noche en 5 mL de medio BHI (1-4). Todas las extracciones se realizaron por duplicado (N y N’).



**Figura 12. Comparación de diferentes métodos de extracción de DNA.** M: Marcador de pesos moleculares. Electroforesis en gel de agarosa del DNA extraído de un cultivo de la cepa E1162 utilizando distintos métodos de extracción. **1/1'**: "PSP®Spin Stool DNA Plus Kit". **2/2'**: "QIAmp® DNA Stool Mini Kit (50)". **3/3'**: "QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)". **4/4'**: Método fenol-cloroformo.

Para comparar de manera cuantitativa las extracciones de DNA de *E. faecium* E1162 se cuantificó el DNA obtenido (Tabla 6).

**Tabla 6. Cuantificación del DNA extraído.**

Método empleado	Réplica 1 (ng/µL)	Réplica 2 (ng/µL)
"PSP®Spin Stool DNA Plus Kit"	1.43	3.05
"QIAmp® DNA Stool Mini Kit (50)"	2.05	17.04
"QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)"	5.86	7.51
Fenol-Cloroformo	43.58	36.03

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica se realizó la media de las cantidades extraídas y se obtuvo la desviación estándar de los valores obtenidos divididos por la media tal y como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Estudio de la reproducibilidad de los métodos utilizados para la extracción de DNA.

Método empleado	R1 (ng/ $\mu$ L) <sup>1</sup>	R2 (ng/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	Media (M)	R1/M	R2/M	Desviación Estándar <sup>3</sup>
“PSP® Spin Stool DNA Plus Kit”	1,43	3,05	2,24	0,64	1,36	0,51
“QIAmp® DNA Stool Mini Kit (50)”	2,05	17,04	9,55	0,21	1,79	1,11
“QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (50)”	5,86	7,51	6,69	0,88	1,12	0,17
Fenol-Cloroformo	43,58	36,03	39,81	1,09	0,91	0,13

1: Réplica 1; 2: Réplica 2; cantidad de DNA obtenido por el método descrito. **Media (M)**: Se realizó la media de las cantidades obtenidas en las réplicas 1 y 2. **3**: La desviación estándar de cada método se calculó con los datos obtenidos al dividir las réplicas 1 y 2 entre su media.

Como se puede observar en la figura 12 y las tablas 6 y 7 el método por el que se obtuvo una mayor cantidad de DNA por  $\mu$ L correspondió al método fenol-cloroformo, mientras que con el resto de métodos se obtuvieron cantidades insuficientes para las posteriores reacciones de secuenciación masiva. Con respecto a la reproducibilidad, el método fenol-cloroformo es el más reproducible debido a que fue el método con el que se obtuvo una desviación estándar menor (0.13 frente a valores como entre 0.17 y 1.1 del resto de métodos), convirtiéndolo en el método más fiable para la obtención de réplicas.

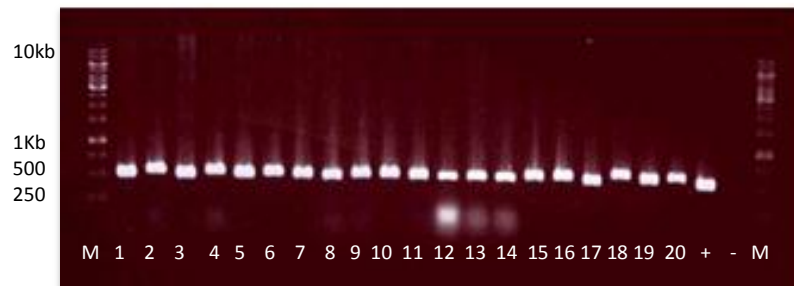
Por todo ello, se decidió extraer el DNA mediante el método fenol-cloroformo según lo descrito en el apartado 3.6.3.4. de materiales y métodos.

Tras poner a punto el protocolo de extracción de DNA de Enterococo, se procedió a comprobar la presencia o ausencia de los genes de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y gentamicina (*aac(6')-aph(2'')*) en colonias crecidas en gentamicina a partir de la librería de mutantes obtenida.

#### 4.3.2.2. PCR del gen *aac(6')-aph(2'')* que codifica la resistencia a gentamicina.

Según lo descrito en el apartado 3.6.7.1., se llevó a cabo una PCR con el DNA extraído, por el método de fenol-cloroformo, de 20 colonias individuales crecidas en medio BHI suplementado con gentamicina (300  $\mu$ g/mL). Como control positivo se utilizó el plásmido original pZXL5 y como control negativo una colonia de *E. faecium* E1162 sin transformar. Para realizar la PCR se utilizaron los “primer” específicos del gen *acc(6')-aph(2'')* descritos en la tabla 1. El producto de PCR amplificado debía tener un peso molecular de 500 pb.

En la figura 13 se puede observar una única banda de producto amplificado por muestra y del mismo tamaño (500 pb) en todos los casos salvo en el control negativo, en el que no se apreció banda alguna, como se esperaba puesto que la cepa E1162 de *E. faecium* sin transformar no posee el gen *acc(6')-aph(2'')* de resistencia a gentamicina, quedando confirmada la inserción del transposón en el genoma bacteriano.

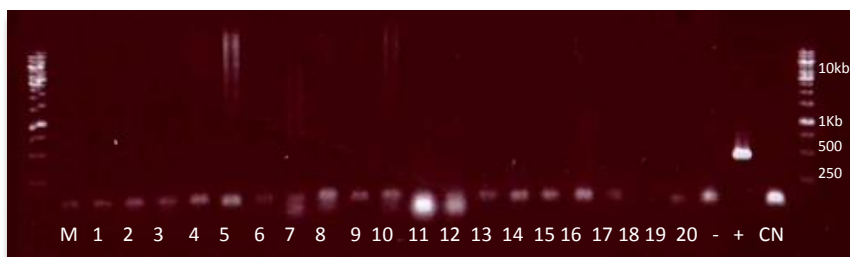


**Figura 13. PCR del gen *acc(6')*-*aph(2'')* que codifica la resistencia a gentamicina. M:** Marcador de pesos moleculares. **1-20:** DNA extraído de colonias individuales de *E. faecium* E1162 transformadas con el plásmido pZXL5, obtenidas tras el proceso de mutagénesis por transposición. **+**: Plásmido pZXL5 original. **-**: Cepa de *E. faecium* E1162 sin transformar.

#### 4.3.2.3. PCR del gen *cat* que codifica la resistencia a cloranfenicol.

Para comprobar la ausencia del plásmido en las colonias, además de la sensibilidad al antibiótico cloranfenicol, se realizó una PCR del gen de resistencia a éste, obteniendo tan sólo un producto amplificado, el del control positivo que corresponde a la cepa E1162 de *E. faecium* transformada con el plásmido pZXL5. El producto de PCR amplificado debía tener un peso molecular de 401 pb.

En la figura 14 se puede apreciar que ninguno de los mutantes obtenidos por transposición contenía el gen *cat* de resistencia a cloranfenicol. Se observó una banda de muy bajo peso molecular que probablemente corresponda a la formación de “primer-dimer” y la banda correspondiente al control positivo.



**Figura 14. Resultado de la PCR del gen de resistencia a cloranfenicol. M:** Marcador de pesos moleculares. **1-20:** Colonias de *E. faecium* E1162 transformadas con pZXL5, obtenidas tras el proceso de mutagénesis por transposición. **-**: Cepa de *E. faecium* E1162 sin transformar. **+**: Cepa E1162 transformada con pZXL5. **CN:** Control negativo de la PCR.

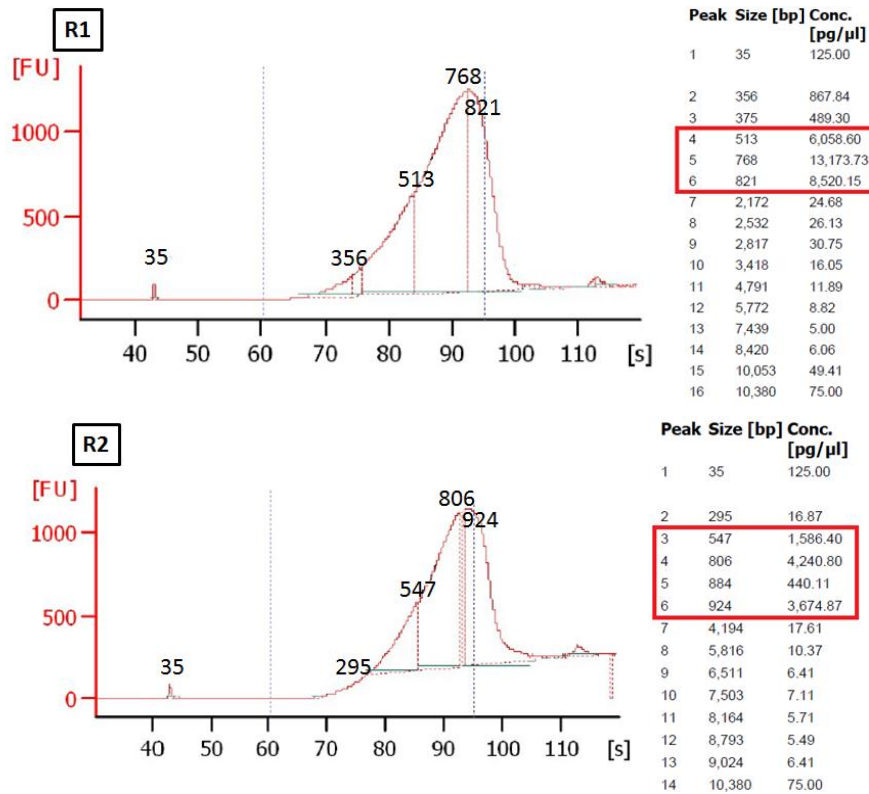
#### 4.4. Secuenciación masiva.

La preparación del DNA para la secuenciación masiva se llevó a cabo según el apartado 3.6.8.

##### 4.4.1. Fragmentación del DNA.

En primer lugar, se fragmentó el DNA obtenido de la colección de bacterias mediante el proceso de nebulización descrito en el apartado 3.6.8.2. Posteriormente, utilizando un Bioanalyzer se identificaron los fragmentos (Fig. 15). Para realizar este análisis se utilizó un chip “Agilent High Sensitivity DNA Kit de Agilent®” que contiene unos microcanales interconectados usados para la separación de los fragmentos según su tamaño por electroforesis.



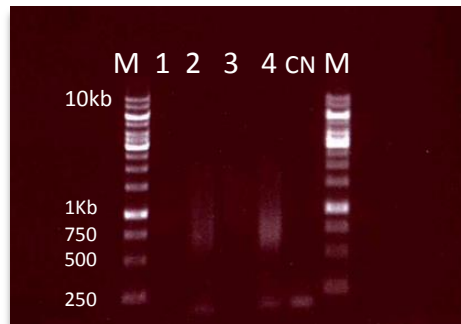


**Figura 15. Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos tras la nebulización.** El DNA fue extraído de la biblioteca de mutantes y fragmentado por nebulización con gas nitrógeno. **Eje Y (Rojo):** Fluorescencia [FU] la fluorescencia registrada en un tiempo determinado depende de la concentración de DNA. **Eje X (negro):** Tiempo en segundos (s) que tarda el DNA en recorrer los microcanales del chip, depende del tamaño de los fragmentos de DNA. **R1:** Réplica 1. **R2:** Réplica 2. **Cuadro rojo:** Tamaño (500-820/900 pb) de los fragmentos de DNA más abundantes (en pg/μL).

Se fragmentó el DNA de dos réplicas (R1 y R2) y se pudo comprobar que en ambos casos se generaban fragmentos de entre 500 y 800-920 pb, siendo el tamaño buscado entre 600-700 pb puesto que es el tamaño óptimo para la secuenciación masiva por Illumina, por lo que se consideró correcta la fragmentación del DNA genómico.

#### 4.4.2. Adición de la cola poli-C y PCR primaria.

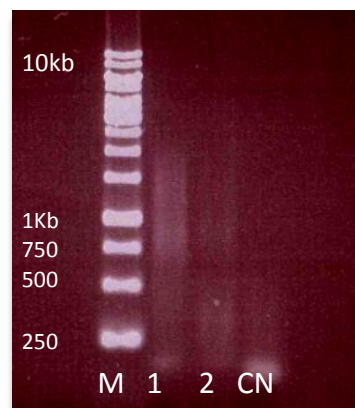
En primer lugar se purificaron las muestras R1 y R2 para eliminar los fragmentos menores a 200 pb utilizando la purificación mediante perlas magnéticas. Una vez obtenidas réplicas purificadas se llevó a cabo la reacción de adición de la cola poli-C a las hebras de DNA tal y como se describe en el apartado 3.6.8.4. de materiales y métodos. Posteriormente, se purificó la mezcla mediante perlas metálicas para eliminar sales y nucleótidos no adicionados y se realizó una PCR (Fig. 16) con los “primers” MiSeq-poliG y MiSeq-Himar1, que amplifican de manera exponencial los fragmentos que contienen el inserto del transposón y la cola poli-C.



**Figura 16. PCR primaria para la secuenciación de los mutantes por transposición.** **M:** Marcador de pesos moleculares **1:** DNA fragmentado con cola poli-C añadida, R1. **2:** PCR primaria, R1. **3:** DNA fragmentado con cola poli-C añadida, R2. **4:** PCR primaria, R2. **CN:** Control negativo de la PCR.

Los carriles 1 y 3 del gel de agarosa mostrado de la figura 15 corresponden al DNA molde (DNA fragmentado con la cola poli-C añadida) previo a someterlo a la reacción en cadena de la polimerasa. Estos carriles se aprecian vacíos porque se incluyó muy poca cantidad (4.8 ng), mientras que en los carriles correspondientes a la PCR (2 y 4) se puede apreciar una clara amplificación de los fragmentos comprendidos entre 1 Kb y 500 pb tras someter el DNA molde a una reacción de amplificación de 28 ciclos.

Para comprobar que los fragmentos amplificados por la PCR correspondían al DNA genómico con el transposón se realizó un control con DNA fragmentado de *E. faecium* E1162 sin transformar con pZXL5 tras haberle adicionado la cola poli-C tal (Fig. 17). En ambos casos la PCR se realizó con la misma cantidad de DNA molde.



**Figura 17. Control de amplificación específica. PCR primaria.** **M:** Marcador de pesos moleculares. **1:** PCR primaria de E1162 transformado con pZXL5. **2:** PCR primaria de E1162 sin transformar con pZXL5. **CN:** Control negativo de la PCR.

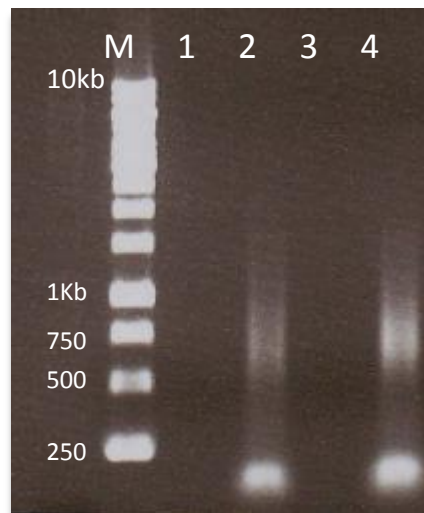
Como se aprecia en la figura 17, existe una pequeña amplificación inespecífica visible en el carril 2, que corresponde a la cepa E1162 de *E. faecium* sin transformar con el plásmido pZXL5. Esta amplificación sin embargo, es menor que el resultado de la PCR obtenido de la muestra con el transposón.

#### 4.4.3. PCR secundaria.

En primer lugar se purificó el producto obtenido en la PCR primaria, mostrado en la figura 15, desde la banda del gel de agarosa según el protocolo de extracción de DNA descrito

en el apartado 3.6.6.3. Posteriormente, se realizó una PCR secundaria con los “primers” S508, N711 y N712 que provienen del kit para secuenciación por Illumina de Agilent® tal y como se describe en el apartado 3.6.7.4. Dichos “primers” contienen una región específica para los “primers” utilizados en la PCR primaria y un adaptador necesario para la secuenciación masiva.

Para comprobar que la PCR amplificó correctamente se corrió la misma cantidad de DNA inicial en un gel de agarosa y se realizó una electroforesis (Fig. 18).



**Figura 18. PCR secundaria.** M: Marcador de pesos moleculares. 1: PCR primaria, R1. 2: PCR secundaria, R1. 3: PCR primaria, R2. 4: PCR secundaria, R2.

Como se puede observar en la figura 18, los carriles 1 y 3 se encuentran vacíos. En estos carriles se incluyó el DNA molde previo a realizar la PCR. Los carriles 1 y 4 reflejan el DNA obtenido tras la realización de la PCR indicando que claramente ha habido amplificación tras 15 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa.

Posteriormente, se secuenciaron las muestras R1 y R2 según lo descrito en el apartado 3.6.8.5. en el servicio de secuenciación del departamento de Genómica y Salud (FISABIO).

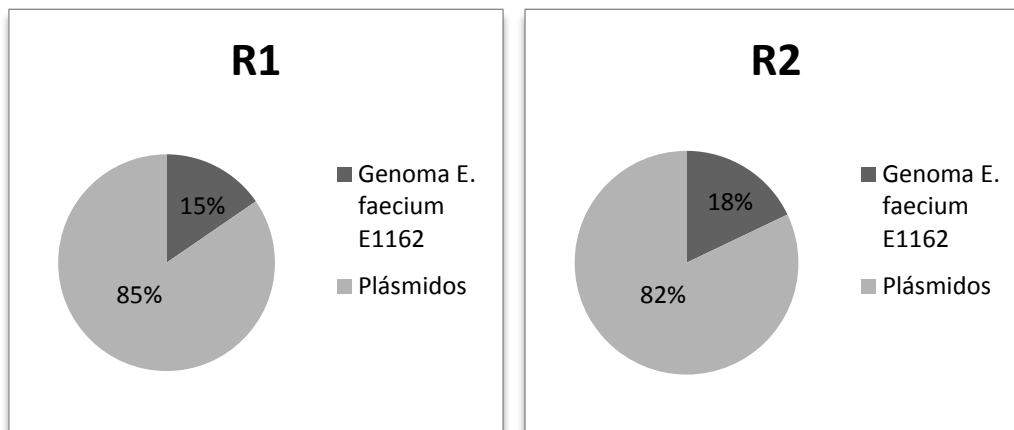
#### 4.4.4. Análisis de las secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias por el método de secuenciación masiva, se identificaron las secuencias que contenían el oligo frente al transposón y se descartaron aquellas secuencias que no contuvieran dicho oligo. En total se obtuvieron 2.620 secuencias correspondientes a la réplica 1 (R1) y 4.465 correspondientes a la réplica 2 (R2). El número de secuencias obtenidas fue menor del esperado. Esto pudo deberse a que en el mismo “run” de secuenciación se secuenciaron otras muestras que contenían un amplicón distinto (gen 16S rRNA). Debido al menor tamaño de este amplicón con respecto a nuestras secuencias, puede que se hubieran secuenciado de manera más eficiente las muestras correspondientes al 16S rRNA. En trabajos posteriores se intentará secuenciar exclusivamente las muestras de mutagénesis por transposición, sin mezclarlas en el mismo “run” con otro tipo de secuencias.

Posteriormente se compararon las secuencias obtenidas con las bases de datos generadas: (i) el genoma de *E. faecium* 1162, (ii) la secuencia del transposón, (iii) la base de

datos completa de secuencias de bacterias del NCBI para identificar el origen de cualquier secuencia que no correspondiera ni al transposón ni a *E. faecium* 1162.

Como se puede observar en la figura 19, aproximadamente entre un 15-18% de las secuencias obtenidas pertenecían al genoma de *E. faecium* 1162. Con el fin de conocer la identidad de las secuencias restantes, se realizó un blast contra la base de datos de NCBI que contiene todas las secuencias procedentes de bacterias. Sorprendentemente dichas secuencias eran similares a plásmidos de Enterococo. Cabe destacar que la cepa *E. faecium* 1162 presenta plásmidos (Van Schaik et al., 2010). Sin embargo, en la secuencia referencia de la cepa E1162 no se indica la presencia de plásmidos. Con el fin de dar respuesta a esta contradicción, se estudiaron los métodos empleados por Van Schaik y colaboradores para secuenciar el genoma de *E. faecium* cepa E1162 (Van Schaik et al., 2010). Tal y como se describe en su estudio, los autores utilizaron el kit de extracción de DNA de Promega®: “Wizard Genomic DNA Purification kit”. Dicho kit está diseñado para la purificación de moléculas de DNA de gran tamaño con el fin de enriquecer DNA genómico. Por tanto, es posible que en dicho estudio no se obtuviera DNA plasmídico y por tanto no se obtuvieran las secuencias relativas a los plásmidos que presenta esta cepa.

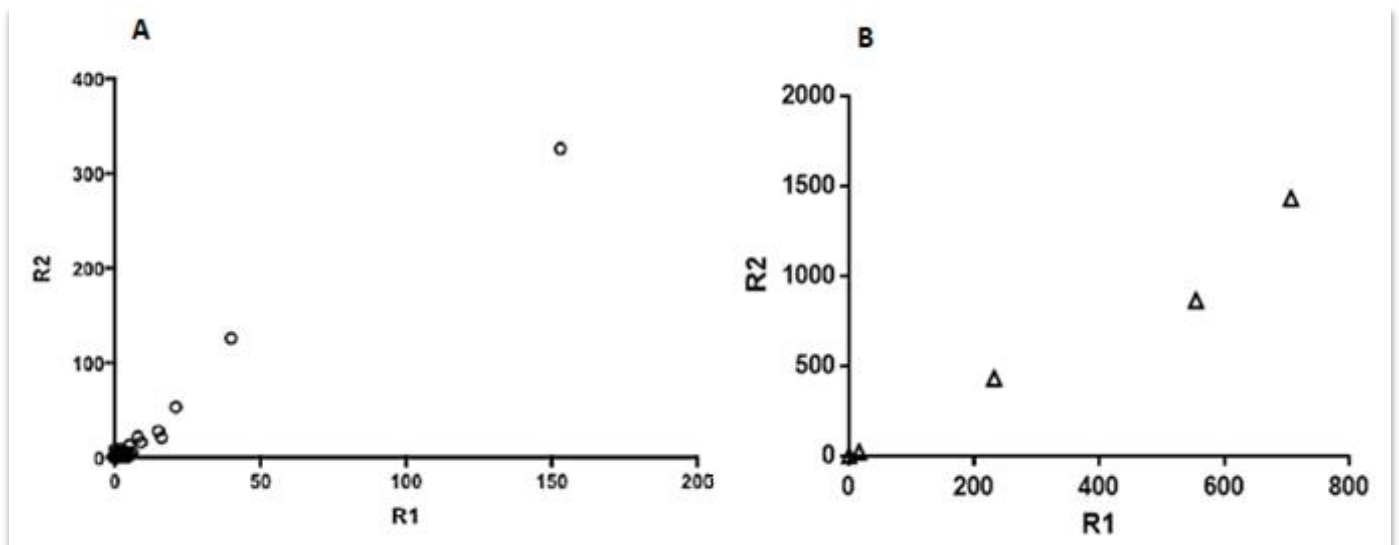


**Figura 19. Distribución de las secuencias analizadas. R1:** Réplica 1. **R2:** Réplica 2. Los gráficos muestran la distribución de las secuencias obtenidas por el método de secuenciación masiva de Illumina al ser enfrentadas a las bases de datos de secuencias creadas. Las bases de datos corresponden a: Genoma de *E. faecium* E1162 y una base de datos que contiene todas las secuencias bacterianas de NCBI.

Como puede observarse en la figura 19, en las réplicas R1 y R2 se obtuvo una variación mínima de los resultados, considerando el experimento reproducible.

Posteriormente, se procedió a analizar a qué ORFs pertenecían las secuencias obtenidas. Como se muestra en la figura 20, la mayoría de las secuencias se asemejaban a unas pocas ORFs, tanto en el caso de secuencias similares a *E. faecium* (Fig. 20A) como en el caso de aquellas similares a plásmidos de *E. faecium* (Fig. 20B). Este resultado era inesperado porque en el estudio previamente publicado (Zhang et al., 2012) se indicaba que el transposón se integraba en el genoma de *E. faecium* sin tener preferencias por sitios específicos. En contra, en nuestro estudio parecía que el transposón tenía preferencia por sitios exclusivos del genoma de *E. faecium*. Por otro lado, es posible que algunas de las secuencias obtenidas fueran el resultado de una amplificación inespecífica del genoma de *E. faecium*. Es decir, que el

oligo específico del transposón pudiera hibridar en sitios concretos del genoma de *E. faecium* y que las secuencias obtenidas no fueran resultado de la inserción del transposón sino de una amplificación inespecífica de sitios concretos del genoma de *E. faecium*.

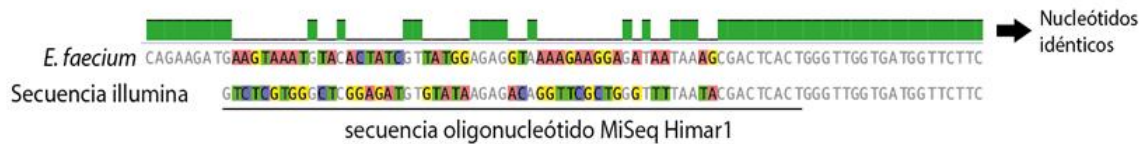


**Figura 20. Abundancia de mutantes.** Número de veces que el transposón se ha insertado en cada ORF de la base de datos de: **A:** la cepa *E. faecium* E1162. **B:** plásmidos de *E. faecium*. **R1:** Réplica 1. **R2:** Réplica 2. Existe una clara correlación entre el número de veces que está representada una ORF en la réplica 1 y en la 2. La abundancia es mayor en general en la réplica 2 debido al mayor número de secuencias obtenidas en esta réplica. La mayoría de las secuencias pertenecen a unas pocas ORFs.

Con el fin de averiguar si las secuencias obtenidas provenían de una amplificación inespecífica del genoma de *E. faecium*, se analizó la secuencia adyacente al oligo utilizado para amplificar los fragmentos que contenían el transposón. Según la estrategia utilizada, dicha secuencia debía contener el final del transposón y posteriormente la secuencia del genoma de *E. faecium*. Por el contrario, si había existido una amplificación inespecífica de fragmentos que no contenían el transposón, se debería observar directamente la secuencia del genoma de *E. faecium*. Sorprendentemente, ninguna de las secuencias obtenidas presentaba la parte final del transposón (ni las similares al genoma de *E. faecium*, ni las similares a plásmidos de *E. faecium*).

Para identificar el motivo de dicha amplificación inespecífica, se analizó con detalle la secuencia del genoma de *E. faecium* adyacente a la secuencia obtenida por secuenciación masiva. Como ejemplo (Fig. 21) se indica el análisis obtenido con la secuencia de la ORF más abundante (EfmE1162 2207). Resultados similares fueron obtenidos para otras ORFs.

Como se muestra en la figura 21, el final del oligonucleótido utilizado para amplificar el transposón hibrida de manera perfecta con la ORF secuenciada justo en el punto previo a la secuencia obtenida de dicha ORF.



**Figura 21. Alineamiento de secuencias de Illumina y del genoma de la cepa *E. faecium* E1162.** Secuencia representativa de las obtenidas por secuenciación masiva alineada contra el genoma de *E. faecium* 1162. En la parte superior de la figura se indica en verde las zonas de ambas secuencias que contienen nucleótidos idénticos. Se indica la parte de la secuencia de Illumina perteneciente al oligonucleótido utilizado para realizar la PCR primaria (oligonucleótido específico del transposón pero que, como se observa en la figura, comparte varios nucleótidos con el genoma de *E. faecium*, principalmente en su extremo 3').

Este análisis sugiere que ciertos fragmentos de *E. faecium* fueron amplificados de manera inespecífica por la presencia en el genoma de *E. faecium* de secuencias similares al oligonucleótido utilizado. De hecho, como se puede observar en la figura 17, los “primers” utilizados amplificaban de manera inespecífica ciertos fragmentos de *E. faecium*, aunque en teoría de manera menos eficiente que los fragmentos que contenían el transposón. La amplificación inespecífica podría también explicar por qué se obtuvieron más secuencias de genes de plásmidos (los plásmidos se suelen encontrar en multi-copia lo que favorecería la amplificación de genes del plásmido con secuencias similares al oligonucleótido).

Nuestro análisis da una explicación al resultado observado de obtener secuencias que no contenían la parte final del transposón. Sin embargo, quedaría otra pregunta por resolver: ¿Cuál es el motivo de que no se observase ninguna secuencia que contuviera la parte final del transposón? Sobre todo teniendo en cuenta que los fragmentos que contienen el transposón se amplifican de manera más eficiente que los que no lo contienen (Fig. 17). No conocemos con exactitud la respuesta a dicha pregunta. Es posible que el final del transposón forme una estructura secundaria que haga menos eficiente la secuenciación masiva de fragmentos que contengan dicha secuencia. Por otro lado, es posible que en la PCR secundaria, los fragmentos que contiene la secuencia del transposón se amplifiquen de manera menos eficiente. En futuros experimentos, que no han podido realizarse por el tiempo limitado del TFG, será necesario estudiar cuál de estas posibilidades ha sido la causante de la secuenciación de fragmentos amplificados de manera inespecífica y la no secuenciación de los fragmentos que contenían el transposón. Una vez conocidos los motivos, un nuevo diseño de oligos o cambios en las condiciones de la reacción de PCR y secuenciación serán necesarios para incrementar la eficiencia de la secuenciación de aquellos fragmentos que contienen el transposón.

## 5. CONCLUSIONES

1. Tras poner a punto el protocolo de transformación de *E. faecium* (Li et al., 1995), se puede concluir que una concentración de glicina del 5 % es la óptima para conseguir una inhibición del 70 % de crecimiento, necesaria para transformar de manera más eficiente la cepa de *E. faecium* E1162.
2. Los experimentos realizados con el plásmido pZXL5 confirman los resultados obtenidos por Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2012):
  - (i) El replicón de bacterias gram-positivas de dicho plásmido es termosensible (el plásmido se pierde al crecer *E. faecium* a 37 °C)
  - (ii) La adición de nisina al medio de cultivo es eficaz para inducir la inserción del transposón en el genoma de *E. faecium*, aunque no se descarta que también se integrara el transposón en los plásmidos presentes en la cepa.
3. La utilización de la técnica de nebulización es eficaz para generar fragmentos del tamaño deseado (aproximadamente 700 pb) para posteriormente someter dichos fragmentos a secuenciación masiva. Los parámetros óptimos de nebulización para obtener fragmentos de dicho tamaño son: 2.5 atmósferas durante 1 min y 10 s.
4. El método de extracción de DNA basado en la extracción por fenol/cloroformo es el más eficaz de los distintos métodos utilizados para extraer DNA de *E. faecium*, incluyendo: “PSP®Spin Stool DNA Plus Kit”, “QIAmp® DNA Stool Mini Kit” y “QIAmp® fast DNA Stool Mini Kit”. El método fenol/cloroformo es más reproducible y permite la obtención de una mayor cantidad de DNA.
5. Las secuencias obtenidas por secuenciación masiva sugieren que la cepa *E. faecium* E1162 contiene plásmidos que no fueron secuenciados en el estudio realizado previamente (Van Schaik et al., 2010). Probablemente esto sea debido a la metodología utilizada para extraer el DNA de dicha cepa.
6. Los oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos que contienen el transposón también amplifican de manera inespecífica otros fragmentos del genoma y de plásmidos de la cepa E1162 de *E. faecium*. Futuros estudios deberán optimizar las condiciones de PCR o deberán utilizar oligonucleótidos distintos para conseguir una amplificación más específica de los fragmentos de DNA que contienen el transposón.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 266-278. doi:10.1038/nrmicro2761
- BRANDL, K.; PLITAS, G.; MIHU, CN.; UBEDA, C.; JIA, T.; FLEISHER, M.; SCHNABL, B.; DeMATTEO, RP.; PAMER, EG. (2008) Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*, Oct 9;455(7214):804-7. doi: 10.1038/nature07250.
- CAMINO, E.; THOMAS-LOPEZ, D.; CARRILERO, L.; GONZALEZ-ZORN, B.; (2014) Adaptación de un protocolo de mutagénesis por transposición aleatoria para la identificación de determinantes de resistencia a antibióticos en el patógeno nosocomial *Enterococcus faecalis*. Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas, Universidad Complutense, Madrid, España, 24 de abril de 2014.
- DEVRIESE, L.A.; POT, B.; VAN DAMME, L.; KERSTERS, K.; HAESBROUCK, F. (1994). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int J Food Microbiol*, 26(2):187-197.
- DUPÓN, H.; VAEL, C.; MULLER-SERIEYS, C.; CHOSIDOW, D.; MANTZ, J.; MARMUSE, JP.; et al. (2008) Prospective evaluation of virulence factors of *Enterococci* isolated from patients with peritonitis: Impact on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(3):247-53.
- EUZÉBY, JP. (2013) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. (A. C. Parte, Editor) Retrieved December 7, 2013, from List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature:
- HEIKENS, E.; LEENDERTSE, M.; WIJNANDS, LM.; VAN LUIT-ASBROEK, M.; BONTEN, MJM.; VAN DER POLL, T.; WILLEMS, RJL. (2009) Enterococcal Surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *E. faecium* in mice. *BMC Microbiology* 2009, 9:19 doi:10.1186/1471-2180-9-19
- IVICS, Z.; LI, MA.; MÁTÉS, L.; BOEKE, JD.; BRADLEY, A.; IZSVÁK, Z. (2009) Transposon-mediated genome manipulations in vertebrates. *Nat Methods*. 2009 June ; 6(6): 415-422. doi:10.1038/nmeth.1332.
- KAU, A.L.; AHERN, P.P.; GRIFFIN, N.W.; GOODMAN, A. L.; GORDON, J.I. (2012). Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. *Nature*, 474 (7351): 327-336.
- KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J.K. (2011). Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine*, 3:14
- KLEIN, BA; TENORIO, EL; LAZINSKI, DW; CAMILLI, A; DUNCAN, MJ; HU, LT. (2012) Identification of Essential Genes of the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Genomics*, 13:578.
- KRISTICH, CJ.; NGUYEN, VT.; LE, T.; BARNES, AM.; GRINDLE, S.; (2008) Development and use of an efficient system for random mariner transposon mutagenesis to identify novel genetic determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. *Appl Environ Microbiol* 74: 3377-3386
- KHORUTS, A.; DICKSVED, J.; JANSSON, J.K.; SADOWSKY, M.J. (2010). Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Gastroenterol* , 44:354-360.
- LAM, M. M. C.; SEEMANN, T.; BULACH, D.M.; GLADMAN, S. L.; CHEN, H.; HARING, V.; MOORE, R.J.; BALLARD, S.; GRAYSON, L. M.; JOHNSON, P. D. R.; HOWDEN, B. P.; STINEARA, T. P. (2012). Comparative Analysis of the First Complete *E. faecium* Genome. *Journal of Bacteriology*, 194 (9): 2334-2341.
- LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. (2014). *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization, 2014 Feb 2. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Gilmore M.S, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-.
- LI, X.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. (1995). Generation of Auxotrophic Mutants of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.*, 177: 6866-6873.
- MALANI, P.N.; KAUFFMAN, C.A.; ZERVOS, M.J. (2002). Enterococcal disease, epidemiology, and treatment, En: GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B. *The Enterococci: Pathogenesis., Molecular Biology., and Antibiotic Resistance* (pp. 385-408). Washington, D. C.: ASM Press.
- MARDIS, ER. (2008) Next-Generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- McMURRY, LM. and LEVY, SB. (2006) Tetracycline resistance determinants in Gram-positive bacteria. *In Gram-positive pathogens*, edited by Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J. Washington DC: ASM Press; 2006:801-820.
- MORANDI S, CREMONESI P, POVOLO M, BRASCA M. (2012) *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt 8):1992-1996.



- NIEMI RM, OLLINKANGAS T, PAULIN L, SVEC P, VANDANNE P, KARKMAN A, et al. (2012) *Enterococcus rivorum* sp. nov. from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol.*;62(Pt 9):2169–2173
- PANJA, S.; AICH, P.; JANA, B.; BASU, T. (2008). How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*. *Molecular Membrane Biology*, 25: Pages 411-422
- PORTE, L.; HERVÉ, B.; PRAT, S.; CHANQUEO, L. (2007) *Enterococcus* sp. I. *Rev Chil Infect* 2007;24(3):231.
- QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, RJ.; TURNBAUGH, PJ. (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* 2011, 12:38 doi:10.1186/1471-2105-12-38
- REINALDO, L.; ENSERGUEIX, D.; PEREZ, E.; GICQUEL, B.; GUILHOT, C.; (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology* (1999) 34(2), 257±267
- REUTER, G. (1992) Culture media for *Enterococci* and group D-*Streptococci*. *Internat J Food Microbiol.* 1992;17(2):101-11.
- RICE, LB.; BELLAIS, S.; CARIAS, LL.; HUTTON-THOMAS, R.; BONOMO, RA.; CASPERS, P.; PAGE, MGP.; GUTMANN, L. (2004) Impact of specific *pbp5* mutations on expression of beta-lactam resistance in *E. faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 48:3028-3032.
- RICE, LB.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, SR.; HUANG, W.; MURRAY, BE. (2003) A potential virulence gene hylefm predominates in *E. faecium* of clinical origin. *J. Infect. Dis.* **187**:508–512.
- RICE, LB.; LAKTICOVÁ, V.; CARIAS, L. L.; RUDIN, S.; HUTTON, R.; MARSHALL, S.H. (2009). Transferable Capacity for Gastrointestinal Colonization in *E. faecium* in a Mouse Model. *J Infect Dis.*,199 (3): 342-349.
- SEDLÁČEK I, HOLOCHOVÁ P, MASLANOVA I, KOSINA M, SRPÖER C, BRYNDOVÁ H, et al. (2013) *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov. two novel urease producing enterococci from the environment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt 2):502–510
- SEKIROV, I. (2008) Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect Immun.* 2008;76(10):4726–4736.
- SILLANPAA, J.; NALLAPAREDDY, SR.; PRAKASH, VP.; QIN, X.; HOOK, M.; WEINSTOCK, GM.; MURRAY, BE. (2008) Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *E. faecium*. *Microbiology* **154**:3199–3211.
- SILLANPAA, J.; PRAKASH, VP.; NALLAPAREDDY, SR.; MURRAY, BE. (2009) Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *E. faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **47**:896–901.
- STECHEER, BA. and HARDT, WD. (2011) Mechanisms Controlling Pathogen Colonization of the Gut. *Current Opinion in Microbiology* 14 (1). Elsevier Ltd: 82–91. doi:10.1016/j.mib.2010.10.003.
- UBEDA, C.; TAUR, Y.; JENQ, RR.; EQUINDA, MJ.; SON, T.; SAMSTEIN, M.; VIALE, A.; SOCCI, ND.; VAN DEN BRINK, MRM.; KAMBOJ, M.; PAMER, EG.; (2010) Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of Clinical Investigation*.
- UBEDA, C.; BUCCI, V.; CABALLERO, S.; DJUKOVIC, A.; TOUSSAINT, NC.; EQUINDA, M.; LIPUMA, L.; MARCEL, RM.; JOAO, B; LING G.,X and E.; YING, T.; JENQ, RR.(2013) Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant *E. faecium* Colonization. Published Ahead of Print 14 January 2013. *Infect. Immun.* 2013, 81(3):965. DOI: 10.1128/IAI.01197-12. Pamer
- VAN SCHAİK, W.; TOP, J.; RILEY, DR.; BOEKHORST, J.; VRIJENHOEK, JE. (2010) Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *E. faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 11: 239.
- VOLLAARD, EJ. and CLASENER, HA. 1994. Colonization Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (3): 409–14.
- WILSON, AC.; PEREGO, M.; HOCH, JA. (2007) New transposon delivery plasmids for insertional mutagenesis in *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods* 71: 332–335.
- ZHANG, X.; TOP, J.; DE BEEN, M.; BIRSCHENK, D.; ROGERS, M.; LAENDERSTSE, M.; BONTEN, JM.; DER POLL, T.; WILLEMS, R.J.L.; VAN SCHAİK, W. (2013) Identification of a Genetic Determinant in Clinical *E. faecium* Strains That Contributes to Intestinal Colonization During Antibiotic Treatment. *The Journal of Infectious Diseases* 2013;207:1780–6
- ZHANG, X.; PAGANELLI, F.L.; BIRSCHENK, D.; KUIPERS, A.; BONTEN, JM.; WILLEMS, R.J.L.; VAN SCHAİK, W. (2012) Genome-Wide Identification of Ampicillin Resistance Determinants in *E. faecium*. *Plos Genetics*. 2012 June 28; doi:10.1371/journal.pgen.1002804