



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y
FARMACIA



**Regulación génica del sistema lactocina
Lac705. Aplicación en un sistema cárneo
modelo**

Lic. María Cecilia Aristimuño Ficoseco

Año 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Gabriela del Valle Perdigón
Dra. María Inés Gómez
Dra. María Eugenia Mónaco
Mag. Adriana Correa Zeballos
Máster María Regina Rintoul
Bioq. Cecilia Hebe Noemí Orphée
Lic. Agustín Javier del Valle Paz
Sr. Walter Ricardo Gómez
Sr. Franco Diaz
Sr. Gonzalo Lascano
Srta. Gabriela Abdo

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

Director:

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora:

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Comité Académico:

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Lucia Clapz

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**Regulación génica del sistema lactocina Lac705. Aplicación en un sistema
cárneo modelo**

TESISTA:

Lic. María Cecilia Aristimuño Ficoseco

DIRECTOR

Dr. Raúl R. Raya

DIRECTOR ASOCIADO

Dra. Graciela Vignolo de Bartolucci

COMISION DE SUPERVISION

Dra. Elvira María Hébert

Dra. Mónica Alejandra Delgado



Este trabajo de Tesis Doctoral se financió a través de becas y subsidios provistos por las siguientes instituciones: el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT).

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA).

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi Director el Dr. Raúl Raya por darme la oportunidad de realizar esta tesis con él, por su constante apoyo y confianza en mi trabajo, por haber compartido conmigo su tiempo y su amplio conocimiento, por transmitirme día a día la pasión por el trabajo y en equipo, por enseñarme que “donde hay una voluntad, hay un camino”, por su cariño y generosidad, por la formación a nivel académico y personal y por ser, para mí, un ejemplo a seguir, me siento afortunada por eso.

A la Dra. Graciela Vignolo por brindarme su generosa colaboración y cálido trato, por darme la posibilidad de realizar una experiencia laboral en el exterior y enriquecerme a nivel profesional.

A mi Comisión de Supervisión de tesis, Dra. Elvira María Hébert y Dra. Mónica Alejandra Delgado por sus valiosos consejos en las reuniones y en la corrección del manuscrito.

Al Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) por la posibilidad de desarrollar mi tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas (CONICET) por las becas otorgadas para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la Universidad Nacional de Tucumán y a la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de grado y posgrado.

A mis compañeros del laboratorio de Tecnología y Desarrollo y Genética, María Eugenia Ortiz, Silvina del Carmen, Jonathan Laiño, Guillermo Marcial, Lorena Carrizo, Luciana Ruiz Rodríguez, Nadia Suarez, Juliana Bleckwedel, Julieta Bonacina, Lucrecia Terán, Antonieta Rodríguez de Olmos, Alejandra Correa Deza, Lucía Brown, Carolina Torres, Micaela Pescuma, por todos los momentos compartidos, buenos y malos, dentro y fuera del CERELA, por el asesoramiento y disposición, por el gran cariño y afecto que les tengo, por brindarme generosamente su colaboración y amistad.

A las Dras. Lucía Mendoza y Cecilia Rodrigues por brindarme su ayuda desinteresada en todo lo que necesitaba, por los consejos y el cariño.

A la Dra. Lucila Saavedra y la Dra. Elvira María Hébert por toda la ayuda brindada en el desarrollo de esta tesis y por su gran cariño y calidad humana.

A los Dres. Marisa Garro, Jean Guy LeBlanc, y María Inés Torino, brindarme su generosa colaboración.

A la Dra. Fernanda Mozzi, Dra. Graciela Rollán, Dra. Virginia Rodrigues, Dra. Silvina Fadda y Elena Bru por su gran calidez humana.

A la Dra. Fátima Nader por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A la Dra. Cecilia Haro, por brindarme su amistad, te quiero mucho Ceci!!!

A Lu Mendoza, Ceci Haro y Migue Ullivarri, por las meriendas que seguimos compartiendo, por su amistad, los quiero.

A mis viejos amigos del CERELA, Natalia Maldonado, Pri de Gregorio y Esteban Vera, Majo Vildosa, Lourdes Gultermiriam, Natalia Barbieri, los quiero.

A Pri de Gregorio, mi amiga incondicional, hermana de corazón, que a pesar de la distancia está siempre presente, te quiero mucho amiga querida.

A Mabel Taljuk, amiga y fiel confidente, tantos momentos, tantas alegrías y lágrimas compartidas, me sobran las palabras para expresar el gran aprecio que te tengo, y me siento afortunada de que formes parte de mi vida te quiero mucho!

A Patricia Castellano, Carolina Maldonado, Azul Zorzoli por sus consejos y el cariño que les tengo.

A todos los becarios, gracias por los momentos compartidos y por las experiencias vividas en el transcurso de estos años.

A todo el personal, la Dra. Marta Medici , José Luis Alvarado ,Vicky Martos, Sebastián Soria, Luis, Mario Vidal, Miguel Herrera, Rocío Garro, Yoli Borchia por su colaboración y gentil trato.

A mis amigas de la vida Ri, Ana, Flor; por todos los momentos, buenos y malos, que vivimos a lo largo de todos estos años, en especial aquellos que dibujaron, en mí, una sonrisa cuando estaba mal.

A mis padres; por el apoyo incondicional que me brindaron durante todo el Doctorado, por el amor y los consejos que me impulsaron a seguir adelante y a ser mejor persona. Los amo.

A mi hermana; por su amor, compañerismo y paciencia. Por ser un pilar en mi vida, por traer al mundo a la personita que me ilumina día a día, Clemente. Te adoro!!

A mi familia; tías, tíos, primos (Nati y Ale), abuela, por su gran cariño y estímulo.

Introducción

Bacterias lácticas. Generalidades	4
Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas	5
<i>Clasificación</i>	6
<i>Determinantes genéticos</i>	10
<i>Modo de acción y receptores</i>	11
<i>Mecanismos de resistencia</i>	14
Sistemas toxina-antitoxina	15
<i>Sistema de adicción a plásmido (PAS; Plasmid addiction system)</i>	16
<i>Sistema TA tipo I</i>	17
<i>Sistema TA tipo II</i>	18
<i>Sistema TA tipo III</i>	20
<i>Sistema TA tipo IV</i>	20
<i>Sistema TA Tipo V</i>	21
Sistemas Toxina Antitoxina en Bacterias Lácticas	22
Antecedentes de los sistemas lactocina Lac705 y antilisteria AL705, bacteriocinas producidas por <i>Lb. curvatus</i> CRL705	22

Objetivos

25

Resultados

Caracterización de la actividad antilisteria AL705 de <i>Lb. curvatus</i> CRL705	26
<i>Introducción</i>	26
<i>Efecto de la fase de crecimiento, de la temperatura y de los componentes del medio de cultivo en la producción de las bacteriocinas lactocina (Lac705) y antilisteria (AL705)</i>	27
<i>Efecto de los componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento de la cepa CRL705 y producción de Lac705 y AL705</i>	31
<i>Estudio de la regulación de los promotores divergentes del plásmido pRC18 por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) y PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)</i>	33
<i>Identificación y caracterización de potenciales genes responsables de la producción del factor AL705 presentes en el genoma de <i>Lb. curvatus</i> CRL705</i>	35
<i>Sistema sakacinas P y Q</i>	36
<i>Sistemas sakacinas T/X y enterocina_NKR_5_3D</i>	48
<i>Análisis comparativo de las proteínas de transporte ABC de los sistemas de sakacinas P/Q y T/X de <i>Lb. curvatus</i> CRL705 y <i>Lb. sakei</i> Lb674, y del sistema lactocina Lac705 del plásmido pRC18</i>	56
Aislamiento y caracterización de variantes de <i>Lb. curvatus</i> CRL705 curadas de plásmidos	65
<i>Introducción</i>	65
<i>Curado de los fenotipos Lac705+ y AL705+ en CRL 705 a 39°C</i>	66
<i>Estudios comparativos entre las cepas <i>Lb. curvatus</i> CRL705 y AR3</i>	68
<i>Sistema cárneo modelo</i>	68
<i>Estudios comparativos entre Sac7 y AR3, variantes Lac705 -/s de <i>Lb. curvatus</i> CRL705.</i>	70
<i>Diferencia en la sensibilidad a lactocina Lac705</i>	70
Sistema de toxina (RelE) y antitoxina (YefM/Phd) del plásmido pRC18	73
<i>Comparación con otros sistemas y familias TA</i>	75
<i>El sistema TA del plásmido pRC18 contribuye al fenotipo de una mayor sensibilidad a la lactocina Lac705</i>	77
<i>Inducción de la función RelE por Bacitracina</i>	79

Discusión

82

Materiales y Métodos

Condiciones para el cultivo de microorganismos	90
--	----

Índice

<i>Medios de cultivos</i>	90
<i>Determinación de la actividad de la bacteriocina Lac705</i>	91
<i>Determinación de la actividad de la bacteriocina AL705</i>	91
<i>Método diferido de determinación de la actividad de bacteriocina en placa</i>	91
<i>Preparación de células competentes de E. coli por "Shock Térmico"</i>	92
<i>Transformación</i>	92
<i>Preparación de células competentes de bacterias lácticas por electroporación</i>	92
<i>Electroporación</i>	93
Ensayos de Curado y Estabilidad de Plásmidos	93
<i>Curado de plásmido</i>	93
<i>Estabilidad de Plásmidos</i>	93
Caracterización de variantes libres de plásmido	94
<i>Reacción RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)</i>	94
<i>Perfil proteico en geles en condiciones desnaturalizantes (PAGE_SDS)</i>	95
<i>Detección de actividad/resistencia a Lac705 y AL705</i>	95
<i>Velocidad de crecimiento</i>	95
<i>Fermentación de sacarosa</i>	95
<i>Construcción del plásmido pRA1TA</i>	95
Métodos de extracción de ADN	96
<i>Extracción de ADN cromosómico de bacterias lácticas</i>	96
<i>Protocolo de extracción de ADN plasmídico para E. coli</i>	96
<i>Extracción de ADN plasmídico a partir de lactobacilos</i>	97
<i>Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción y reacción de ligado de fragmentos de ADN</i>	98
<i>PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	99
Aislamiento y cuantificación de ARN total	101
<i>Extracción de ARN con macaloide</i>	101
<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)</i>	101
<i>PCR en tiempo real</i>	102
<i>PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa (RT-qPCR) para la cuantificación relativa de la expresión de los genes estructurales y de inmunidad del sistema Lac705</i>	102
Análisis Bioinformáticos	103
Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)	104
<i>Preparación del Inóculo</i>	104
<i>Preparación del Antibiótico (ATB)</i>	104
<i>Ensayo de determinación de CIM</i>	104
Referencias	106

Tablas

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram Positivas	9
Tabla 2. Valores de CT de los genes α/β , inm y gyrB, a 30 y 39°C	34
Tabla 3. Bacteriocinas identificadas en el genoma de <i>Lb curvatus</i> CRL705 mediante el programa Bagel3	35
Tabla 4. Tamaño de los amplicones esperados y observados	38
Tabla 5 Identidad entre los sistemas sakacina P y Q determinada por comparación de los fragmentos CRL705p/q (<i>Lb. curvatus</i> CRL705) y Lb674p/q (<i>Lb. sakei</i> Lb674)	41
Tabla 6. Bases mutadas presentes en el fragmento CRL705p/q respecto a su secuencia homóloga del fragmento Lb674 p/Q	42
Tabla 7. Tamaño de los amplicones esperados y observados	50
Tabla 8. Identidad entre los sistemas de sakacinas X y T y enterocina_NKR_5_3D de <i>Lb. curvatus</i> CRL705 y <i>Lb. sakei</i> 5	53
Tabla 9. Bases mutadas presentes en el fragmento CRL705x/t respecto a su secuencia homóloga del fragmento Lb5x/t	53
Tabla 10. Índices de alineamiento de los dominios peptidasa	61
Tabla 11. Frecuencia de mutantes Lac705- y protocolos utilizados	65
Tabla 12. Fenotipos de las cepas <i>Lb. curvatus</i> CRL705, Sac7 y AR3	70
Tabla 13. Análisis Clustal W entre secuencias correspondientes a la antitoxina del plásmido pRC18	76
Tabla 14. Análisis Clustal W entre secuencias correspondientes a la toxina del plásmido pRC18	76
Tabla 15. Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) a bacitracina de las cepas CRL705, Sac7, AR3, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA)	81
Tabla 16. Microorganismos empleados	89
Tabla 17. Plásmidos empleados	90
Tabla 18. Reacción de PCR	94
Tabla 19. Mezcla de trabajo para digestión con enzimas de restricción	98
Tabla 20. Mezcla de trabajo para la reacción de ligado	98
Tabla 21. Mezcla de trabajo para una reacción PCR	99
Tabla22. Secuencias nucleotídicas y Tm de los cebadores utilizados en este trabajo y tamaño de los amplicones esperados	100

Figuras

Figura 1. Esquema general de la organización genética del operón “bacteriocina”	10
Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de “quorum sensing” de tres componentes en la biosíntesis de bacteriocinas	11
Figura 3. Esquema del sistema de adición a un plásmido	16
Figura 4. Esquema de regulación de sistemas TA tipo I	18
Figura 5. Esquema de regulación de sistemas TA tipo II	19
Figura 6. Esquema de regulación de sistemas TA tipo III	20
Figura 7. Esquema de regulación de sistemas TA tipo IV	21
Figura 8. Esquema de regulación de sistemas TA tipo V	21
Figura 9. Representación de los operones del sistema lactocina Lac705	24
Figura 10. Curvas de crecimiento de la cepa CRL705 en MRS y producción de lactocina Lac705 y antilisteria AL705, a 30°C y 39°C	28
Figura 11. Esquema del protocolo de estabilidad de las bacteriocinas a 39°C.	28
Figura 12. Niveles de AL705 producidos por <i>Lb. curvatus</i> Sac7 (p3.3) a diferentes temperaturas	29
Figura 13. Esquema del plásmido p3.3, que porta una delección en el gen Lac705 α	30

Figura 14. Crecimiento de <i>Lb. curvatus</i> CRL705, a 30°C, en diferentes medios	32
Figura 15. Estudio de la expresión de los genes α/β , <i>inm705</i> y <i>gyrB</i>	34
Figura 16. Esquema de la organización del fragmento Lb674p/q que contiene el operón de las sakacinas SakP y SakQ en <i>Lb. sakei</i> 674	37
Figura 17. <i>Contigs</i> de la cepa <i>Lb. curvatus</i> CRL705 homólogos a la secuencia Lb674p/q	38
Figura 18. Productos de amplificación con los cebadores 118f-84r, 111f-84r, 111f-53rc	38
Figura 19. Esquema comparativo de los operones P/Q entre las cepas CRL705 y Lb674	39
Figura 20. Región homóloga entre las secuencias de los sistemas CRL705p/q y Lb674p/q	48
Figura 21. Estructura del locus sakacina TX de la cepa <i>Lb. sakei</i> 5	49
Figura 22. <i>Contigs</i> de la cepa <i>Lb. curvatus</i> CRL705 homólogos a la secuencia Ls5t/x	50
Figura 23. Productos de amplificación con los cebadores 47f-101r, 101f-123r, y 123f-88r 88f-23r	50
Figura 24. Esquema comparativo de los operones X/T entre las cepas CRL705 y <i>Lb. sakei</i> 5	51
Figura 25. Región homóloga entre las secuencias de los sistemas CRL705x/t y Ls5x/t	55
Figura 26. Construcción del plásmido p3.3 y transformación de la cepa Sac7	57
Figura 27. Comparación de las secuencias de aminoácidos correspondiente al transportador ABC del sistema sakacina P/Q de la cepa <i>Lb. sakei</i> Lb674 con la proteína ABC presente en el plásmido pRC18.	59
Figura 28. Comparación de los dominios presentes en los sistemas ABC de la cepas Lb.674 y del plásmido pRC18	60
Figura 29. Esquema de los dominios presentes en los sistema ABC	61
Figura 30. Alineamiento de los dominios peptidasa de las proteínas ABC de los sistemas lactocina Lac705 (pRC18), sakacina PQ (SppT), y sakacina TX (StxT) de <i>Lb. curvatus</i> CRL705 y de ComA	61
Figura 31. Estructura tridimensional del dominio peptidasa (residuos 5-141) del factor de competencia ComA de <i>Streptococcus mutants</i>	62
Figura 32. A. Alineamiento de secuencias líderes de los prepéptidos estudiados; B. Valores de identidad entre las secuencias líderes	64
Figura 33. Electroforesis en geles de agarosa de: A) ADN plasmídico de <i>L. curvatus</i> CRL705 y B) Amplicones obtenidos con cebadores específicos al plásmido pRC18	66
Figura 34. A. Productos de PCR realizadas con cebadores específicos al plásmido pRC18 con ADN de las cepas CRL705 y las variantes AR3, AR49 y AR54; B. Amplificación polimórfica del ADN con el cebador M13 ("RAPD"); C. Análisis de proteínas totales mediante electroforesis en geles SDS-PAGE; D. Amplificación polimórfica del ADN con el cebador (GTG) ₅ (idénticos resultados fueron observados para las variantes AR49 y AR54)	69
Figura 35. Curvas de crecimiento de las cepas CRL705, Sac7 y AR3 en medio MRS a 30°C	71
Figura 36. Sensibilidad de las cepas AR3 y Sac7 a lactocina Lac705	72
Figura 37. Representación esquemática de la principal diferencia entre la cepa Sa7 y AR3	72
Figura 38. Esquema del operón TA presente en el plásmido pRC18 y secuencia de nucleótidos y aminoácidos del sistema TA de pRC18	74
Figura 39. Construcción del plásmido pRA1TA	78
Figura 40. Sensibilidad de Sac7, AR3(p3B1), y AR3(pRA1TA) a lactocina Lac705	79
Figura 41. Sensibilidad de Sac7, AR3(p3B1), y AR3(pRA1TA) al antibiótico bacitracina	80
Figura 42. Sensibilidad de las cepas Sac7, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA) a bacitracina	81
Figura 43. Modelo de interacción entre los blancos de acción de lactocina Lac705 y de bacitracina con el sistema toxina-antitoxina (TA) en <i>Lb. curvatus</i> CRL 705	87

Resumen

En el presente trabajo de Tesis se determinó que los niveles de las bacteriocinas lactocina Lac705 y antilisteria AL705, producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705, varían durante las fases de crecimiento del microorganismo y la temperatura de incubación: a 30°C, mientras los niveles de AL705 se detectan a partir de estadios tempranos y se incrementan conforme avanza el crecimiento exponencial, los niveles de Lac705 son detectables principalmente al final de la fase exponencial y comienzos de la fase estacionaria. Los resultados de expresión de los promotores divergentes del operón lactocina Lac705 sugieren un control post-transcripcional negativo a 39°C. Los estudios bioinformáticos permitieron identificar la presencia de los operones *sakp/q* y *sakt/x* en el cromosoma de *Lb. curvatus* CRL705. Los sistemas de transporte ABC en ambos operones serían inactivos: en el operón *sakp/q* por la presencia de una secuencia IS de la familia IS30, y en el operón *sakt/x* por la presencia de una secuencia IS y de dos fragmentos extra de ADN no caracterizados. La mayor identidad entre las proteínas ABC, peptidasas y secuencias líderes de los prepéptidos fue observada entre los sistemas de lactocina Lac705 y sakacina SakPQ. Los resultados sugieren que la actividad antilisteria AL705 sería atribuible a SakP. A pesar del reordenamiento genético y la pérdida de función observada en los operones *sakp/q* y *sakt/x* de *Lb. curvatus* CRL705, los mismos muestran una identidad >97% en sus secuencias nucleotídicas con operones similares presentes en otras cepas de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, lo que indica que estos genes tienen un origen común y que se diseminan permanentemente. Un aporte muy importante de este trabajo de Tesis es haber definido las condiciones experimentales para el curado de los plásmidos naturalmente presentes en *Lb. curvatus* CRL705. La frecuencia de pérdida del plásmido pRC18 fue del 3-5% a 39°C; la gran estabilidad de este plásmido se atribuyó a la presencia de los operones Lac705 y toxina-antitoxina (TA). Se caracterizó el sistema TA como un sistema “híbrido” organizado en un operón que produce una antitoxina de 92 aminoácidos (aa), miembro de la superfamilia YefM/Phd, y una toxina de 118 aa, de la superfamilia RelE. El sistema TA contribuye a una mayor sensibilidad a la bacteriocina Lac705 y al antibiótico bacitracina en células susceptibles. Nuestro modelo propone que el receptor para lactocina Lac705 es la proteína de membrana UppP, fosfatasa responsable de la defosforilación del undecaprenil-pirofosfato (Upp), compuesto esencial en la biosíntesis del péptido-glicano. Los fenotipos observados en la cepa Sac7, hipersensible a Lac705, podrían explicarse por niveles aumentados de UppP en la misma. UppP actuaría como nexo entre el complejo toxina-antitoxina y el estrés generado por la unión de Lac705 a la fosfatasa o de la bacitracina a Upp; esto llevaría a una degradación de la antitoxina dejando libre la toxina libre, la cual ejercerá su efecto tóxico a nivel intracelular. Así, el efecto de lactocina Lac705 sería potenciado por la activación de la toxina del sistema TA, lo que ejercería una potente presión selectiva contra células curadas de pRC18.

Abreviaturas

BAL	Bacterias Lácticas
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
TA	Toxina Antitoxina
Lac705	Lactocina 705
AL705	Antilisteria
Bac	Bacitracina
CAT	Cloranfenicol Acetil Transferasa
Cm	Cloranfenicol
CSP	Cantidad Suficiente para completar Volumen
DO	Densidad óptica
Amp	Ampicilina
Inm	Inmunidad
h	Horas
IS	Secuencia de Inserción
Kb	Kilobases
LDR	Leche descremada reconstituida
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MCS	Sitio múltiple de clonado
min	Minutos
ml	Mililitros
miliseg	Milisegundos
nd	No determinado
NG	Nitrosoguanidina
NA	Naranja de Acridina
o/n	17 horas
PM	Peso Molecular
rpm	Revoluciones por minuto
R	Resistente
S	Sensible
SAC	Sacarosa
Seg	Segundos
Acc	Accesoria
µg	Micro gramos
µL	Micro litros
µF	Micro Faraday (capacitancia)
g	Gramos
M	Molar
MLA	Marco de Lectura Abierto
mM	Mili Molar
nm	Nanómetros
pb	Pares de Bases
U	Unidades enzimática
UFC/mL	Unidades Formadoras de colonias por mililitro
Vf	Volumen Final
Vol	Volumen
Sb	Sobrenadante
CIM	Concentración inhibitoria mínima

UA/ml
G+
G-

Unidades arbitrarias por mililitro
Gram positivos
Gram negativos

Introducción

Bacterias lácticas. Generalidades

Las bacterias del ácido láctico (BAL) incluyen un amplio y variado grupo de microorganismos microaerófilos Gram-positivos, catalasa negativos, no esporulados, inmóviles, que producen principalmente ácido láctico a partir de la fermentación de los azúcares. Esta clasificación funcional incluye una variedad de géneros industrialmente importantes, tales como *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, y *Lactobacillus*. Las BAL emplean dos vías principales para metabolizar hexosas: una vía homofermentativa en la cual el ácido láctico es el producto principal (microorganismos estrictamente homofermentativos) y una vía heterofermentativa en la que, además de ácido láctico, se producen CO₂, ácido acético, y/o etanol (microorganismos heterofermentativos facultativos o heterofermentativos estrictos) (Makarova y col 2006). En la actualidad, las BAL juegan un papel destacado en la producción mundial de alimentos, realizando las principales bioconversiones en la fermentación de carnes, verduras, y productos lácteos, como así también son fundamentales en la producción de vino, café, ensilaje, cacao, y panes fermentados. La fermentación debe ser controlada y repetible por lo que se recurre a cultivos iniciadores (*starters*) que contienen cepas seleccionadas con propiedades definidas.

Las BAL pueden ser aisladas a partir de diversos nichos (i.e., plantas, productos lácteos, y animales), lo que indica la amplia distribución y adaptación especializada de estos microorganismos a diversos hábitats. Las BAL forman parte de la microbiota natural presente en el tracto intestinal y urogenital del hombre y animales. En este sentido, ciertas especies y cepas de BAL son utilizadas como probióticos (microorganismos vivos que al ser suministrados en una determinada dosis como suplemento dietario ejercen un efecto positivo en la salud del consumidor) ya que, entre otros, estimulan el sistema inmune; contribuyen a disminuir los niveles de colesterol en sangre del hospedador; y participan en la exclusión competitiva de microorganismos patógenos (Perdigón y col 2001). Las BAL son también utilizadas para la producción de compuestos homólogos y heterólogos y consideradas como vectores en el diseño de vacunas vivas.

El metabolismo de las BAL ha sido explotado históricamente por todas las sociedades en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, por su contribución en la proteólisis, generación de compuestos de sabor y aroma y producción de sustancias antimicrobianas (Gasson, 1993). Los compuestos con actividad antimicrobiana incluyen ácidos orgánicos, alcoholes, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno, y bacteriocinas, entre otros. Muchos de éstos son metabolitos de bajo peso molecular que tienen un amplio espectro de actividad inhibitoria contra otras especies. Sin embargo, las bacteriocinas inhiben principalmente a especies estrechamente relacionadas a la bacteria productora (Holzapfel y col 1995).

Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas

La producción de péptidos antimicrobianos es una característica conservada en todos los ámbitos de la vida y abarca desde los péptidos de defensa producidos por el sistema inmune innato de las plantas, los animales y los seres humanos, a las arqueas y bacteriocinas producidas por arqueas y bacterias, respectivamente (O'Connor y Shand 2002; Zasloff 2002). Las bacteriocinas son antimicrobianos extremadamente potentes y son muy específicos hacia las bacterias que inhiben. La primera bacteriocina, denominada "colicina", fue identificada hace aproximadamente 100 años en cultivos de *Escherichia coli* V y descrita como un producto lábil al calor y tóxico para *E. coli* S (Gratia 1925). Estos compuestos son producidos tanto por bacterias Gram-positivas (i.e., *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*), como por bacterias Gram-negativas (i.e., *E. coli*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*); el 99% de las bacterias puede producir por lo menos una bacteriocina y, a su vez, algunas bacterias producen múltiples bacteriocinas (Klaenhammer 1988). Con el descubrimiento de nuevas bacteriocinas que tienen características únicas se ha hecho evidente que son un grupo muy diverso y heterogéneo (Pérez y col 2014). BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>) es una base de datos de acceso abierto designada para la clasificación de bacteriocinas y tiene incorporada más de 200 secuencias (Nishie y col 2012). La gran mayoría de las bacteriocinas descritas en la literatura corresponden a las producidas por las BAL y el interés por su estudio refleja la aplicación potencial de estos microorganismos productores y de sus metabolitos como agentes conservantes de alimentos naturales (Karpinski y Szkaradkiewicz, 2013). A diferencia de los conservantes químicos y de los antibióticos, las bacteriocinas, como la nisina, son consideradas GRAS ("generalmente reconocidos como seguros"), lo que sugiere su uso como conservantes seguros de alimentos de origen vegetal, lácteo, de carnes y otros productos alimenticios, al inhibir a los microorganismos contaminantes en los procesos de producción. Por otro lado son sensibles a las proteasas lo cual las hace inofensivas para el cuerpo humano y el medio ambiente circundante (Yang y col 2014).

Las bacteriocinas se definen como péptidos antimicrobianos sintetizados en los ribosomas de las bacterias, cuya acción requiere de la presencia de receptores específicos en la superficie de las células sensibles (Tagg y col 1976; Nes y col 1996; Riley y Wertz 2002). Así, dos características principales distinguen a las bacteriocinas de los antibióticos clásicos: las bacteriocinas se sintetizan a nivel ribosomal y tienen un espectro relativamente reducido de toxicidad. La producción de una bacteriocina otorga a la bacteria productora una ventaja competitiva, respecto a bacterias estrechamente relacionadas, en la lucha por un nicho ecológico particular (Eijsink y col 2002). Sirven además como un medio de comunicación celular intra-especie

(mecanismo de *quorum-sensing*), ya que generalmente se sintetizan cuando los cultivos alcanzan altas densidades celulares y los recursos nutricionales son escasos (Nes y col 2006).

Clasificación

Las bacteriocinas producidas por BAL incluyen a péptidos de una gran diversidad en términos de tamaño, células diana, mecanismos de acción, de secreción y de inmunidad (Gillor y col 2008). La primera clasificación de estos compuestos fue realizada en 1993 por Klaenhammer (1993), la que es periódicamente modificada en función del descubrimiento de nuevas bacteriocinas y de nuevos estudios sobre su estructura, secuencia de aminoácidos y mecanismo de acción (Cotter y col 2005; Nissen-Meyer y col 2010; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2013). Las diversas clasificaciones propuestas discriminan a estos péptidos antimicrobianos en dos clases, basadas en si han sufrido (clase I) o no (clase II) modificaciones post-traduccionales (Tabla 1).

La **clase I** incluye a los **lantibióticos**, un gran grupo de péptidos pequeños, de aproximadamente 19-38 residuos, que contienen lantionina (Lan) y β -metillantionina (M-Lan). Estos residuos son producto de una modificación post-traducciona l y se originan a partir de la deshidratación de serina y treonina, con la formación posterior de un enlace tioéter con los residuos de cisteína, para dar lugar a Lan y M-Lan, respectivamente. Las enzimas deshidratasa y ciclasa, responsables de estas reacciones, son enzimas específicas cuyos genes se ubican en el mismo operón que los genes estructurales de la bacteriocina. Un prototipo de lantibiótico es la nisina, con su estructura cíclica intramolecular característica (Bierbaum y col 1996). Cotter y col (2005) han subdividido a los lantibióticos en 11 grupos en base al modo de acción, la estructura y similitud en la secuencia de los péptidos. Otros aminoácidos modificados descritos en los lantibióticos son la didehidroalanina (DHA), la didehidrobutirina (Dhb), y la D-alanina. Existen también lantibióticos cuya actividad óptima requiere dos componentes. En la clase I se incluyen además dos subgrupos: **Ib**, que incluye a laberintopeptinas, tales como el péptido globular laberintopeptina A2 (Meindl y col 2010); y **Ic**, o sactibióticos, bacteriocinas circulares que presentan puentes disulfuros, como la subtilosina A producida por *Bacillus subtilis* (Kawulka y col 2004) y la turicina CD, bacteriocina de dos componentes lineales producida por *Bacillus thuringiensis* (Rea y col 2010).

La **clase II** incluye a las bacteriocinas no modificadas post-traduccionalmente [o modificadas mínimamente: algunas de ellas pueden presentar puentes disulfuro (Fimland y col 2000), tener formilado su metionina amino-terminal (Liu y col 2011), o bien ser circulares (Martin-Visscher y col 2009)]. Esta clase de bacteriocinas está

Introducción

compuesta por péptidos de 30-60 aminoácidos (<10 kDa), que poseen carga positiva y exhiben propiedades únicas, como la tolerancia al calor. Las bacteriocinas de clase II son subdivididas en cuatro subclases (Cotter y col 2013):

Clase IIa: estas bacteriocinas tienen un reducido espectro antimicrobiano y son conocidas por sus propiedades anti-listeria y actividad anti-enterococos. Poseen una secuencia consenso de aminoácidos (YGNGVXaaC) en el extremo N-terminal, conocida como la "caja de pediocina" y uno o dos enlaces disulfuro intra-catenarios (Lozano y col 1992; Nes y Holo, 2000): i.e., pediocina PA-1 (Henderson y col 1992) y carnobacteriocina X (Tulini y col 2014). Las bacteriocinas de clase IIa se sintetizan como precursores con una secuencia líder N-terminal, conocida como secuencia líder del tipo "doble glicina" (Havarstein y col 1994), la cual es escindida por un transportador ABC dedicado y una proteína accesoria, durante el proceso de secreción al medio extracelular del péptido activo. Tales secuencias líderes y sistemas de transporte ABC se encuentran también entre algunos lantibióticos (Havarstein y col 1995).

Clase IIb: estas bacteriocinas requieren de **dos péptidos** no modificados y **no idénticos** para formar un complejo activo: i.e., lactacina F (Allison y col 1994), ABP-118 (Flynn y col 2002), y lactocina Lac705 (Cuozzo y col 2000). Los péptidos que conforman una bacteriocina de clase IIb se sintetizan con una secuencia líder del tipo "doble glicina", como la mayoría de las bacteriocinas la clase IIa, y son generalmente péptidos catiónicos, con regiones hidrofílicas y anfifílicas; por separado, cada péptido por separado ejerce una actividad antimicrobiana nula o muy baja (Nissen-Meyer y col 2010).

Clase IIc: son péptidos circulares, caracterizados por un enlace covalente de cabeza a cola (van Belkum y col 2011; Gabrielsen y col 2014): i.e., carnociclina A (Gong y col 2009; MartinVisscher y col 2009), y enterocina AS-48 (Martínez-Bueno y col 1994). Estas bacteriocinas se caracterizan por su espectro de inhibición relativamente amplio y por su resistencia al calor, a condiciones extremas de pH e, incluso, a muchas proteasas.

Por último, las bacteriocinas de **Clase II d** incluye bacteriocinas de un solo componente, péptidos lineales del tipo "no pediocina"; i.e., epidermicina NI01 (Sandiford y Upton, 2012) y lactococina A (Holo y col 1991). Esta clase se puede dividir en base a la naturaleza de sus secuencias líder en: (i) las bacteriocinas sec-dependientes; contienen una secuencia líder que dirige los péptidos para su exportación por la vía secretora general; (ii) las bacteriocinas con secuencia líder "doble glicina"; y (iii) las bacteriocinas sin secuencia líder, que con frecuencia son secretadas por transportadores ABC dedicados (Kastin 2006). Algunas de estas bacteriocinas sin secuencia líder retienen el grupo formilo en el residuo de metionina N-terminal (Liu y col 2011). A su vez, es frecuente observar que las células que producen este tipo de bacteriocinas sin secuencia líder, producen simultáneamente dos o más péptidos homólogos; por

Introducción

ejemplo, las bacteriocinas homólogas enterocina A y B producidas por *Enteroccus faecium*: ambos péptidos poseen actividad antibacteriana *per se* y cuando actúan juntos se observa una sinergia (Cintas y col 1998). Otro ejemplo descrito es el de cuatro bacteriocinas homólogas sin secuencia líder, cuyos genes se ubican en el mismo operón, que actúan sinérgicamente y son producidas por una cepa de *Staphylococcus aureus* Netz y col (2001).

Introducción

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram Positivas (modificado de Cotter y col 2005)

Clasificación	Características	Bacteriocina	Peso molecular (Da)	Cepa productora	Referencias
Clase I	Bacteriocinas modificadas post-traduccionalmente, pueden ser péptidos lineales o globulares que contienen lantionina, metil- β lantionina y aminoácidos deshidratados	Nisina A	3352	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Field y col 2012
		Nisina U	3029	<i>Streptococcus uberis</i>	Wirawan y col 2006
		Nisina Z	3493	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Mulders y col 1991
		Mersacidin	1824	<i>Bacillus</i> sp. Y8554728	Chatterjee y col 1992
		Salivaricin A	2315	<i>Streptococcus salivarius</i>	Ross y col 1993; Wescombe y col 2006
Clase II	Estables al calor, sin modificación, no contienen lantionina; clase heterogénea de pequeños péptidos				
Clase IIa	Bacteriocinas tipo pediocina, con actividad anti-listeria	Pediocin PA-1	4629	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0	Henderson y col 1992
		Carnobacteriocina X	3602	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> C2	Tulini y col 2014
Clase IIb	Compuesta por dos péptidos	Lactacin F	4755	<i>Lactobacillus</i> spp.	Fremaux y col 1993
		Lactocina Lac705	~3400 (cada péptido)	<i>Lb. curvatus</i> CRL 705	Vignolo y col 1996
Clase IIc	Bacteriocinas circulares	CarnociclinaA	5860	<i>C. maltaromaticum</i> UAL307	Martin-Visscher y col 2008
		Subtilosin A	5813	<i>Bacillus subtilis</i>	Shelburne y col 2007
Clase IId	Bacteriocinas de un componente "no-pediocina"	Leucocina B	3466	<i>Leuconostoc carnosum</i> 4010	Wan X y col 2015

Determinantes genéticos

Los genes de las bacteriocinas de BAL pueden estar localizados en plásmidos o en el cromosoma de la bacteria productora. En la Figura 1 se presenta un esquema de la organización genética de estos sistemas. En general, se requieren al menos cuatro genes para la producción de una bacteriocina: (i) el gen estructural, que codifica una pre-bacteriocina; (ii) el gen de inmunidad, que codifica una proteína que protege a la cepa productora de la acción antimicrobiana de su propia bacteriocina; (iii) un gen que codifica un transportador ABC necesario para la secreción; y (iv) un gen que codifica una proteína accesoria (*Acc*), de función desconocida. Tres componentes más pueden estar presentes en algunos sistemas: (i) el péptido inductor (una feromona, al igual que una bacteriocina, se sintetiza a nivel ribosomal); (ii) la proteína histidina quinasa (HK) (proteína de membrana que detecta la presencia de la feromona); y (iii) el regulador de la respuesta (RR), que actúa como factor de transcripción y es modulado por la HK (Dridier y col 2006). En algunos casos, los cuatro genes necesarios para la producción y la secreción de las bacteriocinas se encuentran en un sólo operón (lactococina G); mientras que en otros casos (enterocina 1071, plantaricina E/F, y plantaricina J/K), un operón contiene los genes estructurales y de inmunidad; un segundo operón contiene los genes para la secreción de bacteriocina; y un tercer operón contiene los genes implicados en la regulación de la producción de bacteriocinas.

La gran mayoría de las bacteriocinas y el péptido inductor se sintetizan como pre-péptidos, con una extensión N-terminal o secuencia líder de 15-30 residuos. Esta pre-secuencia se elimina por escisión proteolítica específica de sitio durante la exportación, por la actividad peptidasa localizada en el extremo N-terminal de la proteína de transporte ABC, cuando la bacteriocina madura es secretada. De esta manera la secuencia líder desempeña un doble papel: i) actúa como una señal de reconocimiento para su exportación; y ii) protege a la célula productora, al mantener inactiva a la bacteriocina recientemente sintetizada (Dridier y col 2006).

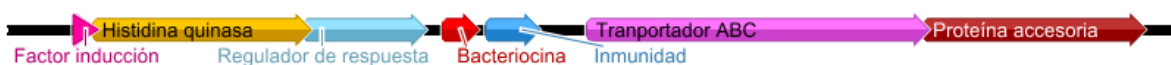


Figura 1. Esquema general de la organización genética del operón “bacteriocina”. Se indican tres operones que contienen el o los genes estructurales de la bacteriocina, los genes de inmunidad y de las proteínas de transporte ABC y accesoria y los genes que participan en la traducción de señales (péptido inductor, histidina quinasa y regulador de respuesta)

La expresión de los genes de algunas bacteriocinas es constitutiva, mientras que la de otras (i.e., nisina, plantaricina E/F, plantaricina J/K, ABP-118, y NC8) están regulados transcripcionalmente a través de un sistema de tres componentes que

Introducción

consiste en una feromona, una proteína HK, y un RR (Nissen-Meyer y col 2010). La Figura 2 representa un esquema general de un sistema de transducción de señales de tres componentes (sistema “*quorum sensing*”). En ella se observa que la pre-bacteriocina y el pre-péptido inductor, ambos sintetizados a nivel ribosómico, son procesados y secretados por el transportador ABC. El inductor o molécula señal (feromona) es secretado a un ritmo bajo pero constante por la mayoría de las células en una población bacteriana. La concentración de esta feromona refleja así la densidad celular durante el crecimiento y, a una cierta concentración de feromona, el sistema de regulación dependiente de la feromona (HK y RR) se activa y se inician los procesos celulares. El péptido inductor maduro interactúa con su receptor HK, proteína de membrana que se autofosforila en el dominio citosólico, el que transfiere luego el grupo fosfato al RR, el cual a su vez se activa y funciona como un activador transcripcional de los genes relacionados con la producción de la bacteriocina.

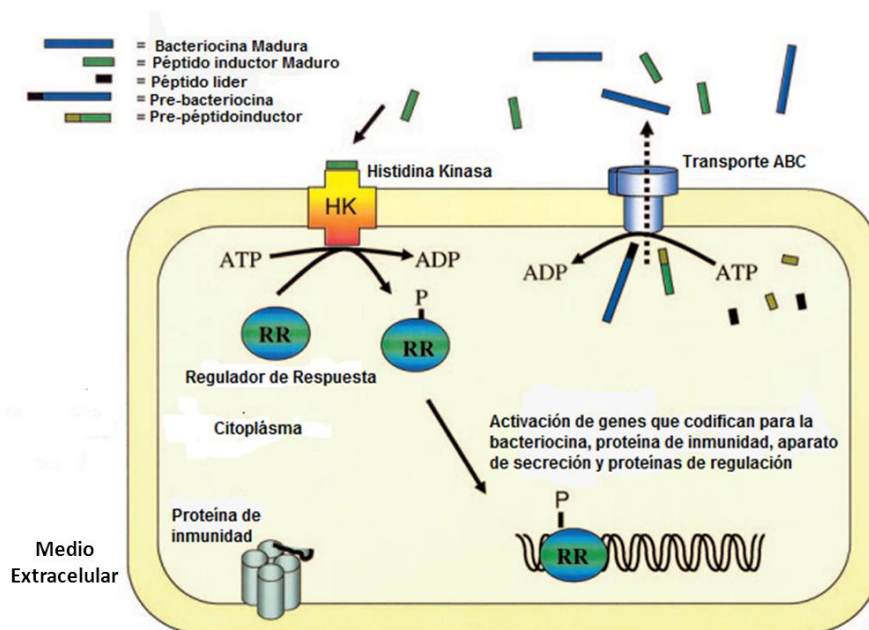


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de “*quorum sensing*” de tres componentes en la biosíntesis de bacteriocinas (modificado de Drider y col 2006). En el ejemplo de la figura, el péptido maduro secretado a través del sistema ABC es detectado por la HK la cual, por una cascada de fosforilación, activa al factor de transcripción RR

Modo de acción y receptores

Las bacteriocinas producidas por BAL son moléculas activas a nivel de membrana, con un espectro generalmente restringido a bacterias Gram-positivas; esto posiblemente se deba a la dificultad de estas bacteriocinas para encontrar sus blancos

celulares al ser su acceso restringido a través de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. En general, las bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana de la célula blanco formando poros selectivos de iones que causan disipación de la fuerza protón motriz y la pérdida del ATP intracelular y/o de la fuga de aminoácidos e iones (Cui y col 2012). El mecanismo de acción descrito para bacteriocinas de dos componentes (i.e., plantaricina E/F, plantaricina J/K, lactococina G, thermophilin 13, lactacina F, y lactocina 705) indica que las membranas de las bacterias sensibles se vuelven permeables a pequeñas moléculas. Dichos estudios revelaron también que las bacteriocinas no solo diferencian el tipo de moléculas que transportan a través de las membranas, sino también que difieren en sus especificidades (Nissen-Meyer y col 2010). Por ejemplo, plantaricina E/F y plantaricina J/K permeabilizan las membranas para los iones monovalentes, incluyendo H⁺ (en contraste con lactococina G), pero no para iones divalentes tales como el fosfato y Mg²⁺.

Aunque se ha determinado que las bacteriocinas de BAL forman poros en la membrana celular de las células dianas, éstas requieren interactuar previamente con una molécula receptora o de acoplamiento. Los receptores celulares descritos comparten el rasgo común de ser proteínas de membrana.

Las bacteriocinas de clase Ia tienen un amplio espectro antimicrobiano. Algunos lantibióticos interactúan con el lípido II, precursor de la biosíntesis de la pared celular (Brotz y col 1998; Wiedemann y col 2001; Wiedeman y col 2006), reconociendo diferentes sitios de la molécula. La nisina, por ejemplo, se une al pirofosfato del lípido II (Hsu y col 2004), lo que a su vez facilita el doble efecto de la bacteriocina sobre las células diana: (i) la inhibición de la biosíntesis del péptido-glicano por la interacción con y el secuestro del lípido II y (ii) la formación de poros en la membrana citoplásmica (Wiedemann y col 2001). La nisina tiene una estructura modular, con una estructura anillo N-terminal (conocida como la "jaula pirofosfato") esencial para su unión al pirofosfato del lípido II, y una región C-terminal capaz de insertarse en la membrana citoplásmica, oligomerizar y formar un poro que consta de ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípidos II (Hasper y col 2004). La región bisagra que separa estos módulos es importante para el movimiento de los mismos en relación uno al otro, y por lo tanto también vital para la formación de poros (Yuan y col 2004). La unión de nisina al lípido II es independiente de la actividad formadora de poros; sin embargo, la formación *in vitro* de poros en ausencia de lípido II ocurre a concentraciones micromolares de nisina (Brotz y col 1998), mientras que en presencia de lípido II se requieren concentraciones en el rango nanomolar de la bacteriocina; es decir, lípido II aumenta 1.000 veces la actividad de nisina (Breukink y col 1999). Módulos estructurales similares a los de nisina se cree que forman unidades funcionales también en otros lantibióticos; la jaula pirofosfato está conservada, por ejemplo, en el grupo nisina y epidermina (Sahl y Bierbaum, 1998). Las variaciones en estas estructuras pueden, por lo tanto, tener en cuenta las diferencias observadas en la actividad

Introducción

antimicrobiana y el espectro de diferentes tipos de lantibióticos. Sin embargo, no todos los lantibióticos comparten el mecanismo de formación de poros con nisina, sino que se dirigen a las reacciones enzimáticas: mersacidina y nukacina ISK-1 se unen al lípido II e inhiben la biosíntesis del péptido-glicano en las células sensibles (Brotz y col 1998; Asaduzzaman y col 2009), mientras que los lantibióticos del grupo cinamicina se unen a la fosfatidiletanolamina en la membrana celular e inhiben la actividad de la fosfolipasa A2 (Marki y col 1991). El receptor identificado para Smb, un lantibiótico de dos componentes producido por una cepa de *Streptococcus mutans*, es una proteasa de la familia de las CAAX presente en las células sensibles (Biswas y Biswas 2014).

Respecto a las bacteriocinas de la clase II, en general poseen un espectro de actividad limitado. El modo de acción descrito indica que las mismas interactúan con un receptor celular y permeabilizan la membrana citoplasmática, o interfieren con su integridad, en células susceptibles (Chikindas y col 1993; Moll y col 1999). Algunas bacteriocinas de la clase IIa y lactococcin A (bacteriocina clase II d) interactúan con los componentes transmembrana IIC y IID del sistema fosfotransferasa de la manosa (Man-PTS) (Diep y col 2007), provocando cambios estructurales en el complejo PTS que hacen que la permeasa permanezca abierta de manera irreversible, formando un poro que conduce a la fuga de solutos, la alteración de la integridad de la membrana celular y, finalmente, la muerte celular (Kjos y col 2011). La interacción entre los receptores de Man-PTS y la bacteriocina es muy específica: las bacteriocinas de la clase IIa reconocen e interactúan solo con uno de los cuatro sistemas Man-PTS presentes en *Listeria monocytogenes* (Kjos y col 2009).

Con respecto a las bacteriocinas clase IIb, recientemente Kjos y col (2014) aislaron 12 variantes de la cepa *L. lactis* IL1403 resistentes a lactococina G y determinaron, mediante la secuenciación del genoma de las mutantes, que la mutación en todas ellas se encontraba en o cerca del gen *uppp* (también conocido como *baca*), que codifica una fosfatasa del undecaprenil-pirofosfato (Upp). UppP, una proteína que presenta nueve dominios trans-membrana, defosforila el Upp a undecaprenilfosfato (Bickford y Nick, 2013). La importancia de este gen se confirmó a través de su expresión heteróloga en *Streptococcus pneumoniae*, al conferir un fenotipo sensible a la bacteriocina en una cepa naturalmente resistente. El mismo patrón de resistencia y sensibilidad inducida fue evidente en otras dos bacteriocinas de la clase IIb, enterocina 1071 (Kjos y col 2014) y lactococina Q (Zendo y col 2006).

Una permeasa ABC de maltosa fue identificada como el receptor de garvicina ML (bacteriocina cíclica; clase IIc) (Gabrielsen y col 2012), y una proteasa dependiente de cinc, unida a membrana y miembro de la familia de proteasas M50, como receptor para la bacteriocina Lsbb (bacteriocina de clase II d; sin secuencia líder) (Ovchinnikov y col 2014). Finalmente, algunas bacteriocinas de clase II (i.e., lactococina 972 (clase II d) y la garvicina A cíclica) pueden actuar inhibiendo la formación del septo (Martínez y col

2008; Maldonado-Barragán y col 2013), aunque no se ha confirmado si esta actividad es mediada por receptores.

Mecanismos de resistencia

Las bacterias sensibles a una bacteriocina pueden desarrollar resistencia a la misma, con frecuencias que varían en función del tipo de bacteriocina y de la naturaleza del mecanismo de acción (Gravesen y col 2002). Se han descrito también mecanismos de resistencia intrínsecas (Collins y col 2010). A su vez, la sensibilidad a una bacteriocina en particular puede variar mucho entre los diferentes aislamientos de una misma especie; i.e., los valores de la concentración mínima inhibitoria de 200 cepas de *L. monocytogenes* a pediocina PA1 y a sakacina P variaron entre 60-70 veces (Katla y col 2003).

Entre los múltiples mecanismos de resistencia adquirida identificados, se mencionan:

- i) la pérdida o reducción de la expresión del receptor, lo que resulta en una mayor resistencia a la bacteriocina correspondiente; i.e., una mutación en el receptor Man-PTS en *L. monocytogenes* y *L. lactis* afecta, respectivamente, la sensibilidad de las células sensibles a las bacteriocinas de clase IIa y a lactococina A (Ramnath y col 2000; Kjos y col 2011);
- ii) los cambios en la composición de la membrana y de la pared celular bacteriana (Vadyvaloo y col 2002). Por ejemplo, los cambios en el tipo de ácido graso y en la composición de fosfolípidos en la membrana afectan negativamente la interacción de la misma con nisina (Crandall y Montville, 1998); o la interacción de las bacteriocinas de clase IIa con los componentes del sistema Man-PTS, aún cuando las células sensibles de *L. monocytogenes* expresen niveles normales del receptor (Vadyvaloo y col 2004);
- iii) la presencia y expresión de genes homólogos con función de inmunidad en cepas no productoras, como los descritos en *Bacillus licheniformis* y *Enterococcus faecium* hacia el lantibiótico de dos componentes lacticina 3147 (“mimetismo de inmunidad”) (Draper y col 2009); se cree que dichos genes son restos de operones de bacteriocina inactivados o eliminados que, sin embargo, otorgan a la cepa no productora una ventaja competitiva;
- iv) la presencia de una proteasa en la célula sensible que degrada a la bacteriocina, lo que conduce a la pérdida o disminución de la actividad antimicrobiana: i.e., para nisina se conocen dos enzimas, la nisinasa y una proteína de resistencia a la nisina (NRS), que específicamente degradan o modifican el extremo C-terminal del péptido y por consiguiente reducen la sensibilidad a la bacteriocina (Jarvis, 1967; Sun y col 2009);

- v) la presencia de sistemas dedicados (ABC permeasa/ATPasa) activados por sistemas de traducción de señales de dos componentes (HK yRR) contribuyen también a la resistencia intrínseca de una célula sensible a la acción antimicrobiana de una bacteriocina (Draper y col 2008; Kemperman y col 2003).
- vi) otros: el secuestro de las bacteriocinas; la adquisición de nuevos genes que incrementan la tolerancia; la remodelación del peptidoglicano; etc. (Roces y col 2012).

Sistemas toxina-antitoxina

Los sistemas toxina-antitoxina (TA) son complejos formados por una toxina de naturaleza proteica relativamente estable, cuya función es la de inhibir blancos específicos intracelulares, y por una antitoxina que neutraliza la acción de la toxina. La antitoxina, la cual puede ser una proteína o un ARN antisentido al ARN mensajero de la toxina (Wang y col 2011; Gottfredsen and Gerdes, 1998), es mucho más inestable que la toxina y es degradada de forma continua por lo que se requiere de su síntesis permanente para mantener el complejo TA inactivo (Hayes y Suer, 2003). Los primeros sistemas TA fueron descritos y caracterizados en la década de los 80', localizados en plásmidos de bajo número de copias; la función que se les asignó fue la de mantener estable el plásmido durante el crecimiento de las poblaciones bacterianas (Tsilibaris y col 2007); la presencia de un sistema TA en un plásmido garantizaría la persistencia del mismo durante la replicación haciendo a las bacterias "adictas" al mismo, ya que sólo las células hijas que contienen el plásmido sobreviven después de una división celular (Figura 3; Makarova y col 2009). Sin embargo, los sistemas TA se encuentran también presentes en el cromosoma de muchas bacterias; i.e., en *E. coli* hay siete sistemas TA, incluyendo a *mazEF*, *chpBIK*, *relBE*, *yefM-yoeB* y *dinJ-yafQ* (Amitai y col 2004). Entre las funciones atribuidas a estos sistemas se mencionan la formación de células persistentes, resistencia a bacteriófagos o bilis, muerte celular programada, entre otros.

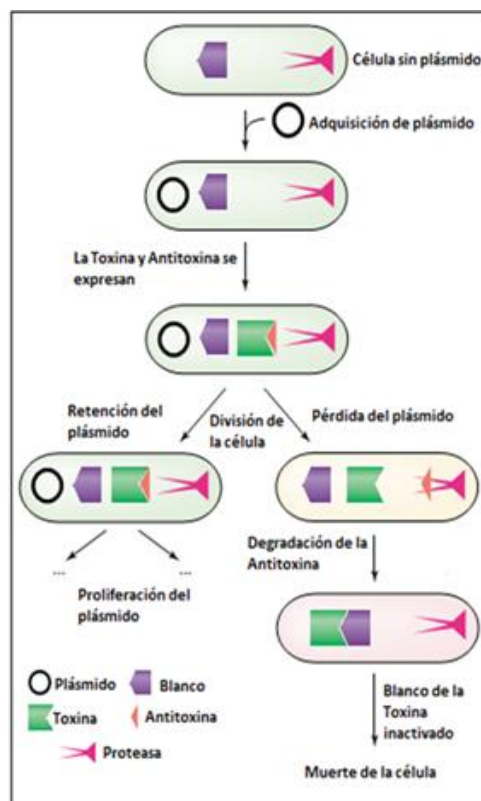


Figura 3. Esquema del sistema de adicción a un plásmido (Modificado de Buts y col 2005). El sistema TA se “activa” en aquellas células, que durante la división celular, no recibieron una molécula del plásmido

Sistema de adicción a plásmido (PAS; Plasmid addiction system)

Cuando un plásmido contiene un operón TA funcional y es introducido en una célula, tanto la toxina como la antitoxina son expresadas en bajos niveles. Debido a la formación de un complejo entre la toxina y la antitoxina, la célula está protegida de la acción de la toxina (Figura 3). La transcripción del operón es regulada por el complejo toxina-antitoxina el cual actúa como represor. Si la célula retiene por lo menos una copia del plásmido, la situación permanece estable; si el plásmido se pierde, el sistema TA se activa. La antitoxina es continuamente degradada por proteasas específicas y como no se puede producir toxina y antitoxina fresca en las células libres de plásmido, la toxina remanente queda libre. Como resultado, la acción de la toxina sobre su blanco celular inhibe el crecimiento, lo que puede llevar a un estado de “persistencia” o a la muerte celular (Buts y col 2005).

En base a la naturaleza de la antitoxina y el modo de inhibición de la toxina, los sistemas TA se clasifican en cinco tipos (I-V) (Makarova y col 2009). En los sistemas tipo I y III las antitoxinas son pequeños ARNs no codificantes, mientras que las antitoxinas de las otras clases son de naturaleza proteica (Unterholzner y col 2013).

Sistema TA tipo I

Estos sistemas fueron descritos tanto en plásmidos como en cromosomas (Unterholzner y col 2013). En los sistemas TA de tipo I la antitoxina es un ARN antisentido. En la mayoría de los casos la expresión de la toxina es reprimida por apareamiento de bases entre el ARN antisentido de la antitoxina y el ARNm estable de la toxina. Esta interacción previene la unión al ribosoma y por lo tanto evita la traducción del ARNm de la toxina. Un ejemplo de este tipo es el sistema *symR/symE* de *E. coli* (Figura 4A). La síntesis de la toxina SymE está fuertemente reprimida en múltiples niveles: por el represor LexA a nivel de la transcripción, por el ARN antisentido SymR a nivel de la estabilidad del ARNm y la traducción, y por la proteasa Lon a nivel de la estabilidad de proteínas. Este control es probablemente una forma efectiva de mantener la toxina SymE a un nivel intracelular lo suficientemente bajo como para no dañar la célula hasta que se requiera de la misma (Kawano, 2012).

Otro ejemplo de un sistema TA regulado por la inhibición de la traducción del ARNm de la toxina es el sistema *hok/sok* codificado por el plásmido R1 (Figura 4B) (Unterholzner y col 2013). El ARN *sok* de la antitoxina se expresa a partir de un promotor fuerte, pero el transcripto tiene una vida media muy corta de aproximadamente 0,5 min. En contraste, el ARNm de la toxina *hok* es expresado a partir de un promotor muy débil, pero tiene una vida media de aproximadamente 20 min. El transcripto de *hok* muestra una extensa estructura secundaria en donde el extremo 3' se pliega hacia el extremo 5'; el ARNm plegado no es accesible para el ribosoma ni para la antitoxina *sok*. El ARN antisentido de *sok* no muestra complementariedad con la secuencia Shine-Dalgarno de *hok*. Así, el procesamiento del ARNm plegado por la RNasaII elimina una parte del extremo 3' dando lugar a una reorganización estructural del ARN mensajero, lo que permite tanto la traducción como la unión al ARN-Sok. El locus *hok/sok* contiene, además de la toxina *hok* y la antitoxina *sok*, un tercer gen llamado *mok* (modulador de la muerte), que se solapa con casi todo el gen *hok*. Estudios con mutaciones puntuales revelaron que la prevención de la traducción *mok* abolió la expresión eficaz de *hok*, indicando que los marcos de lectura abiertos *hok* y *mok* se acoplan en la traducción y que el ARN-sok regula la traducción de *hok* indirectamente a través de la prevención de la traducción de *mok*. El completo toxina-antitoxina formado por el ARNm de *hok* y el ARN-Sok son degradados por la RNasaIII, que es el paso inicial para la descomposición del ARNm de *hok* pero no para su regulación. En contraste, para algunos sistemas TA de tipo I incluyendo *txpA/ratA* (Figura 4C), *bsrG/sr4*, y *yonT/as-yonT* de *Bacillus subtilis*, la escisión por la RNasaIII de regiones de ARN de doble cadena creados por la unión del ARN de la antitoxina y el ARNm de la toxina es crucial para la regulación de la expresión de la toxina.

Introducción

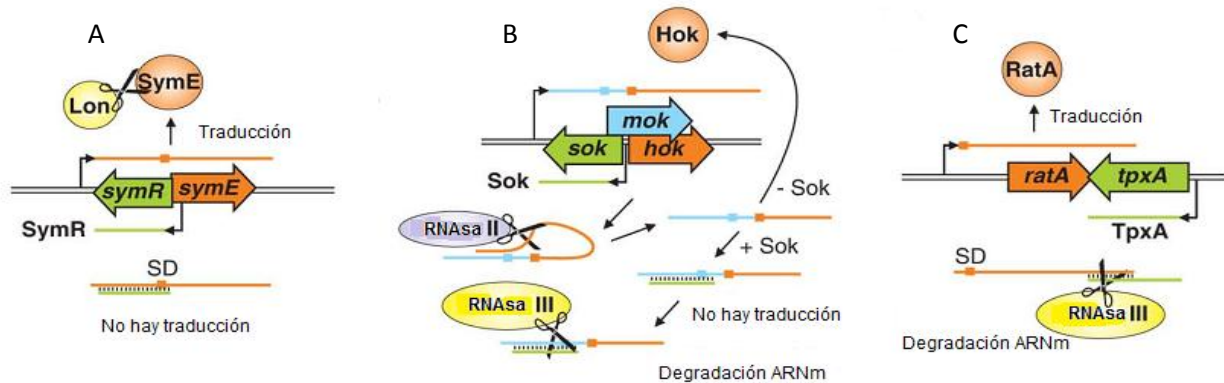


Figura 4. Esquema de regulación de diferentes mecanismos de sistemas TA tipo I (modificado de Unterholzner y col 2013). A. La unión del ARN antisentido, SymR, bloquea directamente la traducción del ARN mensajero de la toxina; B. La unión del ARN antisentido, Sok, bloquea la traducción de Mok e indirectamente la traducción del ARN mensajero de la toxina Hok; C. La unión del ARN antisentido, TpxA, bloquea la traducción del ARN mensajero de la toxina RatA. En B y C se requiere de una actividad RNasa III para regular o no, respectivamente, la expresión de la toxina

Sistema TA tipo II

Los sistemas TA tipo II son la clase mejor estudiada con respecto a los sistemas TA. En esta clase, tanto la toxina como la antitoxina son proteínas pequeñas. La antitoxina forma un complejo proteína-proteína con la toxina lo cual resulta en su neutralización (Figura 5). Mientras que la proteína de la toxina es estable, la antitoxina se degrada rápidamente por las proteasas de la familia Clp o por Lon. El operón de módulos TA de tipo II comprende típicamente dos pequeños marcos de lectura abiertos en donde el gen que codifica la antitoxina se encuentra corriente arriba. Sin embargo, hay excepciones sobre esta organización de genes conservados; por ejemplo, el sistema *higB/higA*, donde el gen de la toxina *higB* se encuentra corriente arriba del gen de la antitoxina *higA*. Generalmente, la transcripción del operón TA se autorregula mediante la unión de la antitoxina o por el complejo toxina-antitoxina al promotor.

Dependiendo de la relación estequiométrica antitoxina/toxina varios tipos de complejos se pueden formar con afinidades distintas al promotor. Por ejemplo, en presencia de un exceso de RelB (antitoxina) un complejo RelB₂RelE (complejo 2: 1) se forma e inhibe el promotor *relB/relE* (Figura 5A). El complejo RelB₂RelE tiene un efecto inhibitor más fuerte sobre el promotor *relB/relE* que RelB₂ y por lo tanto RelE actuaría como un co-represor transcripcional. Por el contrario, en presencia de un exceso de RelE₂ se forma un complejo 2:2 (RelB₂RelE₂) el cual no puede unirse al promotor y, en consecuencia, la transcripción se activa. Este modo de regulación se llama con frecuencia cooperatividad condicional y se cree que es importante para la estabilización del nivel de antitoxina en células que crecen rápidamente para

minimizar la inducción aleatoria de *relB/relE*. Otros sistemas TA, como el *phd-doc* del bacteriofago P1 de *E. coli* y el *vapB/vapC* de *Salmonella entérica*, están regulados por la cooperatividad condicional.

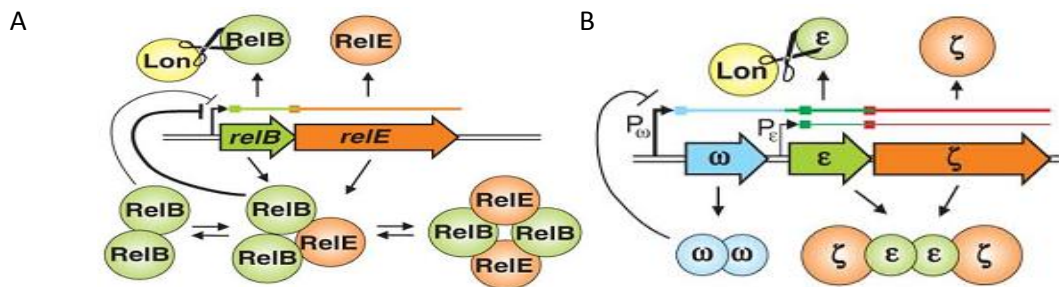


Figura 5. Esquema de regulación de sistemas TA tipo II de dos y tres componentes (modificado de Unterholzner y col 2013). A. Sistema de dos componentes: los complejos RelB2 y RelB2RelE actúan como inhibidores de la expresión del promotor *relB/relE*, mientras que la formación del complejo RelB2RelE2 activa la expresión de dicho promotor. (Figura 5. cont. fig.) B. Sistema de tres componentes: la expresión del promotor P_ω está regulada por el dímero ω_2 , un regulador global de la transcripción. En ambos casos la toxina se activa por la degradación proteolítica de la antitoxina

En los sistemas TA de tipo II se han descrito también sistemas de tres componentes. Un ejemplo de esta organización genética extraordinaria es el módulo ω - ϵ - ζ codificado por el plásmido pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (Figura 5B). El efecto citotóxico de la proteína ζ se contrarresta por el dímero de la antitoxina ϵ_2 , que forma un complejo hetero-tetramérico estable $\zeta_2\epsilon_2$. En contraste con otros sistemas de TA de tipo II ni la toxina ζ ni la antitoxina ϵ , o el complejo $\zeta_2\epsilon_2$ regulan su propia expresión. En lugar de ello, la actividad del promotor P_ω está regulada por un dímero ω_2 , un regulador global de la transcripción. Además, los niveles basales de ζ y ϵ son expresados por un promotor constitutivo pero muy débil P_ϵ . También el módulo de *paR-paaA-parE* codificado por un operon de *E. coli* O157: H7 representa un sistema de tres componentes donde *parR* ubicado corriente arriba es necesario para el control transcripcional del módulo TA. Sin embargo, en contraste con ω - ϵ - ζ , el complejo *parE-paaA* está implicado en la regulación de su propia transcripción. El prototipo del tercer grupo de los sistemas TA tipo II de tres componentes es el módulo *pasA/pasB/pasC* del plásmido pTF-FC2 de *Thiobacillus ferrooxidans*, donde la autorregulación se logra mediante la antitoxina PasA y su complejo con la toxina PasB. El tercer componente, PasC, no está involucrado en la regulación de la expresión, pero mejora la formación del complejo toxina-antitoxina (Lioy y co 2012; Unterholzner y col 2013).

Sistema TA tipo III

Al igual que los sistemas de Tipo I, la antitoxina de los sistemas tipo III es un ARNs. Sin embargo, el modo de interacción es diferente. Hasta ahora el único miembro caracterizado de esta clase es el módulo *toxI/toxN* del plásmido pECA1039 de *Pectobacterium carotovorum*, que fue descrito originalmente como un sistema de protección de las bacterias contra la infección por bacteriófagos. El gen *toxN* está precedido por una repetición invertida corta y por una disposición en tándem de repeticiones directas (Figura 6). La repetición invertida sirve como un terminador de la transcripción, y regula los niveles de ARN de la antitoxina y ARNm de la toxina. La proteína ToxN tiene actividad ARNasa y corta al transcripto *toxI/toxN* en las repeticiones directas para liberar el ARN activo de la antitoxina de 36 nt. En contraste con los sistemas TA tipo I, el ARN de la antitoxina de tipo III neutraliza la toxina uniéndose directamente a ella. En un estudio filogenético se identificaron un total de 125 posibles sistemas TA del tipo III y fueron asignados a 3 familias, *toxIN*, *cptIN* y *tenpIN*. La mayoría de los sistemas de tipo III están codificado en el cromosoma bacteriano pero aproximadamente el 15% de *toxIN* y *tenpIN* son codificados en plásmidos, y sólo un módulo *toxIN* está codificado en un profago (Unterholzner y col 2013).

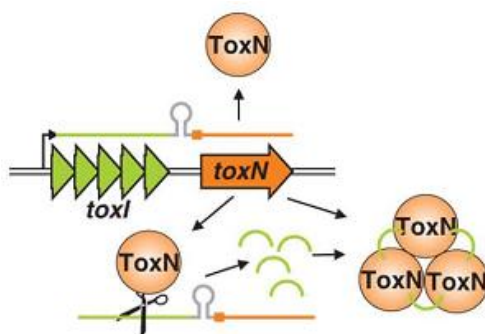


Figura 6. Esquema de regulación de sistemas TA tipo III (modificado de Unterholzner y col 2013). La toxina, ToxN, y los transcritos, ToxI, forman un complejo tripartito ToxN-ToxI. La degradación de ToxI, por un mecanismo desconocido, libera la toxina la ToxN, con actividad endonucleasa

Sistema TA tipo IV

La designación de un sistema TA tipo IV fue propuesto para el módulo *yeeU/yeeV* (también llamado *ctbA/ctbB*) de *E. coli*. Un análisis funcional de este módulo reveló que la toxina YeeV interactúa con MreB y FtsZ y por lo tanto interfiere en la polimerización y ensamblado del citoesqueleto MreB-FtsZ (Figura 7). La proteína de la antitoxina YeeU contrarresta a YeeV al estabilizar los polímeros de MreB y FtsZ. Un

Introducción

modo de acción similar también se informó para *cptA/cptB* (*ygfX/ygfY*), otro módulo TA de *E. coli*. Mientras que la toxina y la antitoxina de todas las demás clases TA interactúan ya sea en el ARN o a nivel de proteínas, la toxina y la antitoxina de esta clase TA no interactúan directamente (Unterholzner y col 2013).

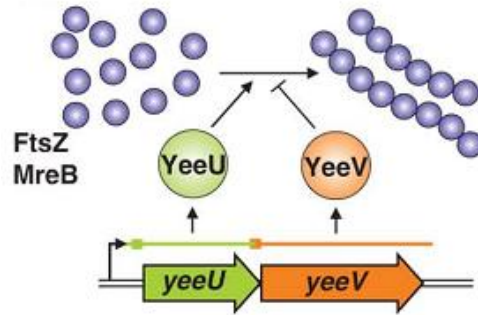


Figura 7. Esquema de regulación de sistemas TA tipo IV (modificado de Unterholzner y col 2013). La toxina YeeV interfiere en la polimerización de FtsZ y MreB en la formación del citoesqueleto. La antitoxina YeeU estabiliza los polímeros de FtsZ y MreB

Sistema TA Tipo V

Recientemente, el módulo *ghoS/ghoT* de *E. coli* fue designado como un sistema TA tipo V (Figura 8). La proteína de la antitoxina GhoS tiene una actividad endorribonucleasa específica de secuencia para la escisión del ARNm de la toxina GhoT y por lo tanto impide la traducción de la misma (Unterholzner y col 2013).

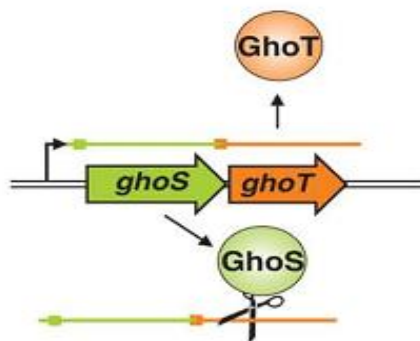


Figura 8. Esquema de regulación de sistemas TA tipo V (modificado de Unterholzner y col 2013). La antitoxina, GhoS, es una endorribonucleasa que degrada el ARN mensajero de la toxina, GhoT, impidiendo su traducción

Sistemas toxina antitoxina en bacterias lácticas

Los estudios sobre los sistemas TA en BAL son escasos y han sido localizados principalmente, luego de un análisis *in silico*, en el ADN cromosómico y plasmídico de algunas especies de *Lactobacillus*. Klimina y col (2013) identificaron cinco posibles sistemas TA en el genoma de *Lb. rhamnosus*. Alpert y col (2003) describieron un sistema TA tipo I en el plásmido pRV500 de *Lactobacilo sakei* RV332. A su vez, Sorvig y col (2005) encontraron que los ORF2 y ORF3 del plásmido p256 de *Lb. plantarum* NC7 son homólogos a PemI y PemK, respectivamente, dos miembros que pertenecen a la familia de proteínas de mantenimiento de plásmidos. Fang y col (2007) encontraron, en el plásmido pSF118-44, dos sistemas TA similares a la familia RelB y RelE y, en el plásmido pSF118-20, un sistema TA de la familia PemI y PemK. Finalmente, Alegre y col (2009) describieron la presencia de un sistema TA en el plásmido pRS5 de *Pediococcus pentosaceus*, una cepa aislada de vino. Un sistema TA tipo III fue descrito por Samson y col (2013) el cual forma parte de un mecanismo AbiQ (*abortive infection*), o sistema de defensa contra el ataque de bacteriófagos en *L. lactis*.

Antecedentes de los sistemas lactocina Lac705 y antilisteria AL705, bacteriocinas producidas por *Lb. curvatus* CRL705

La cepa *Lb. curvatus* CRL705 ha sido aislada en nuestro laboratorio a partir de una muestra obtenida de salame artesanal argentino, y ha sido usada como modelo de estudio por su capacidad de producir bacteriocinas (Vignolo y col 1993). La cepa CRL705 pertenece al grupo de BAL heterofermentativas facultativas, ya que fermenta las hexosas por la vía de Embden-Meyerhof, con producción de lactato, y las pentosas por medio de una fosfocetolasa inducible. La especie *Lb. curvatus* está filogenéticamente relacionada a la especie *Lb. sakei* (Fadda, 1999). Las cepas de ambas especies son aisladas de diversos hábitats, i.e., a partir de pre-masa en la elaboración de panes, de vegetal fermentado y de carnes frescas y fermentadas. Ambas poseen un gran valor tecnológico, por lo que se utilizan cada vez más como cultivos iniciadores al contribuir en los procesos de fermentación y conservación de la carne. Un análisis numérico de los patrones RAPD de cepas de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus* reveló dos subgrupos dentro de cada especie, con uno de los subgrupos de *Lb. curvatus* más estrechamente vinculado a los subgrupos de *Lb. sakei* (Berthie y col 1999).

Lb. curvatus CRL705 produce dos bacteriocinas: lactocina 705 (Lac705; activa contra la flora deteriorante de embutidos) y AL705 (activa contra *L. monocytogenes*). Lactocina 705 es una bacteriocina del tipo IIb, cuya actividad antimicrobiana depende

Introducción

de la acción complementaria de los péptidos Lac705-alfa y Lac705-beta. Estos péptidos se sintetizan como prepéptidos de 54 y 56 aminoácidos, respectivamente, con una secuencia líder en sus extremos amino terminal, y ambos son secretados como péptidos activos de 33 aminoácidos (*en los Bancos de Datos no se encuentran depositadas secuencias homólogas a lactocina Lac705*). *Lb. curvatus* CRL705 posee dos plásmidos, pRC12 y pRC18, de 12,5 y 18,6 kb, respectivamente. El fenotipo de lactocina Lac705 fue asociado al plásmido pRC18, el cual fue completamente secuenciado (Cuozzo 2002). El genoma de este plásmido contiene 18.664 pares de bases con un porcentaje de G + C de 34,5%. El análisis de sus 25 marcos de lectura abierta (MLA) sugiere que pRC18 posee una estructura en mosaico, producto de múltiples eventos de recombinación, principalmente entre ADN de origen plasmídico (proteínas de replicación y MLAs 6, 17, 21 y 23); fágico (MLAs 1 y 4, que codifican posiblemente para un represor y una proteína de recombinación sitio específica, respectivamente); y de elementos transponibles (MLAs 8, 10, 18, 19 y 22). El sistema genético de lactocina Lac705 (Figura 9) está integrado por dos operones divergentes y superpuestos (P_{ap} y P_i). El primer promotor controla la expresión de los genes estructurales de *lac705a* y *lac705b* los que expresan los genes estructurales para los prepéptidos Lac705 α y Lac705 β , respectivamente. El segundo promotor controla a los genes que codifican para las proteínas de inmunidad (*inm705*) y las del sistema de transporte tipo ABC y su proteína accesoria (genes *abc705* y *acc705*, respectivamente, que participan en el procesamiento, transporte y secreción de Lac705). Se confirmó experimentalmente que la proteína Inm705 es la proteína de inmunidad de Lac705, y que los sistemas de inmunidad de lactocina 705 y del factor antilisteria AL705 son sistemas independientes. La localización de promotores divergentes y superpuestos sugiere un sistema de regulación coordinado. Por otro lado, *la actividad antilisteria AL705 no ha sido caracterizada aún*, aunque Cuozzo (2002) observó que *la proteína ABC del sistema Lac705 es necesaria también para la secreción de AL705*.

Introducción



Figura 9. A. Representación del sistema genético de lactocina Lac705, presente en el plásmido pRC18. Se indica la posición de los promotores divergentes y superpuestos $P_{\alpha\beta}$ y P_i que controlan, respectivamente, la expresión de los genes estructurales de Lac705 y los de inmunidad, proteína de transporte ABC y proteína accesoria. Las flechas indican el sentido de la expresión. B. Secuencia de aminoácidos y actividad complementaria de los péptidos 705 α y 705 β (Lac705)

Los cultivos de *Lb. curvatus* CRL705 fueron sometidos a diferentes tratamientos con el objetivo de aislar variantes curadas de plásmidos y negativas en la producción de Lac705 (Cuozzo 2002). Las distintas estrategias aplicadas fueron principalmente: a) aislamiento de mutantes espontáneas; b) uso del agente curante naranja de acridina; y c) mutagénesis (mediante el uso de nitrosoguanidina o de vectores de integración). Aunque varias mutantes Lac705^{-/s} fueron aisladas, ninguna de ellas fue realmente curada de pRC18, resultados que sugieren que el plásmido pRC18 es muy estable. Al no disponer de una variante de *Lb. curvatus* CRL705 libre de pRC18, nos propusimos como objetivo establecer las condiciones que permitan el curado de este plásmido, considerando que la cepa curada es un ambiente isogénico ideal para realizar futuros estudios de regulación de los promotores divergentes del sistema de la lactocina Lac705. A su vez, la variante curada permitirá optimizar los protocolos de electroporación con vectores genéticos basados en las funciones de replicación de pRC18, al eliminar potenciales mecanismos de incompatibilidad.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar las bacteriocinas producidas por la cepa *Lb. curvatus* CRL705, a fin de aplicarlas en un sistema cárneo modelo. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. **Caracterizar las actividades antilisteria AL705 y lactocina Lac705:**
 - -Determinar el efecto de la fase de crecimiento, de la temperatura, y de los componentes del medio de cultivo en la producción de las bacteriocinas lactocina (Lac705) y antilisteria (AL705);
 - -Regulación génica del sistema lactocina Lac705
 - -Identificar y caracterizar los potenciales genes responsables del factor AL705 presentes en el genoma de *Lb. curvatus* CRL705; y
2. **Aislar y caracterizar variantes de *Lb. curvatus* CRL705 curadas de plásmidos.**

Resultados

Caracterización de la actividad antilisteria AL705 de *Lb. curvatus* CRL705

Introducción

La capacidad de *Lb. curvatus* CRL705 de producir una bacteriocina activa contra cepas de las especies *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc lactis*, *B. subtilis*, *St. aureus*, y *L. monocytogenes* fue descrita por Vignolo y col. (1993). Estudios posteriores determinaron el efecto de los parámetros de crecimiento en la producción de esta bacteriocina [Vignolo y col. 1995; Palacios 2000]: se observó que posee un limitado espectro de inhibición, y que su óptima producción se observa en el medio MRS sin el agregado de peptona, a una temperatura de crecimiento entre 15 a 30°C. La bacteriocina fue detectada en el sobrenadante del cultivo celular a partir de las 4 h de crecimiento (a 30°C), alcanzando el máximo nivel en la fase estacionaria (9 h), manteniéndose constante durante 18-20 h de cultivo. Posteriormente, Cuozzo (2002) puso en evidencia que *Lb. curvatus* CRL705 produce al menos dos bacteriocinas a las que denominó Lac705, activa contra *Lb. plantarum* CRL691, y AL705, con actividad antilisteria. Demostró también que la presencia de ambas bacteriocinas en el sobrenadante de la cepa CRL705 requiere de la función de un mismo transportador ABC (gen *abc*) del sistema Lac705. Estos últimos estudios pusieron en evidencia que Vignolo y col. (1995) y Palacios (2000) describieron las condiciones de producción de lactocina Lac705 y no los de la bacteriocina antilisteria AL705, ya que los mencionados investigadores utilizaron siempre en sus estudios a *Lb. plantarum* CRL691, como cepa indicadora de la actividad antimicrobiana.

En base a lo expuesto, nos propusimos evaluar la expresión de la actividad antilisteria AL705 a la largo de la fase de crecimiento de *Lb. curvatus* CRL705 e identificar y caracterizar los potenciales determinantes genéticos responsables de dicha actividad. Se estudió también el efecto de los componentes del medio de cultivo y de la temperatura en la producción de ambas bacteriocinas (Lac705 y AL705).

Efecto de la fase de crecimiento, de la temperatura y de los componentes del medio de cultivo en la producción de las bacteriocinas lactocina (Lac705) y antilisteria (AL705)

La producción de Lac705 y AL705 se estudió primero usando el medio De Man-Rogosa-Sharpe (MRS), un medio de crecimiento nutricionalmente muy rico y ampliamente utilizado para la producción de bacteriocinas de BAL (Appukuttan y Kadirvelu, 2014). Los niveles de ambas bacteriocinas en los sobrenadantes de las células de *Lb. curvatus* CRL705 fueron determinados en medio MRS a 30 y 39°C, respectivamente. Para su detección se usaron como células indicadoras a *Lb. plantarum* CRL691 y *L. monocytogenes*. Como se muestra en la Figura 10, a 30°C la producción de Lac705 se observó a las 6 h de crecimiento (fase exponencial tardía; 12.800 UA/ml), lo que confirma las observaciones realizadas por Vignolo y col. (1995) y Palacios (2000). Sin embargo, a esta temperatura la actividad AL705 fue detectada a partir de las 3 h de crecimiento, alcanzando el máximo en fase exponencial (12.800 - 25.600 /UA/ml a las 6 h). Con respecto al crecimiento a 39°C, no se observó producción de Lac705 en ninguna de las fases estudiadas, mientras que la producción de AL705 no variaba a lo largo de la fase de crecimiento. La temperatura de 39°C es una temperatura subóptima de crecimiento para la cepa *Lb. curvatus* CRL705 (Figura 10). Para descartar la posibilidad que estos resultados se deban a un efecto directo de la temperatura sobre la actividad de las bacteriocinas y no sobre la producción de las mismas, se realizaron pruebas de estabilidad incubando a 39°C durante 48 h el sobrenadante libre de células de un cultivo *Lb. curvatus* CRL705 crecido a 30°C y midiendo luego la actividad remanente de ambas bacteriocinas (Figura 11). Idénticos títulos de actividad se observaron entre las muestras tratadas o no, lo que indica que ambas bacteriocinas son estables a 39°C, y que los valores observados en la Figura 10 se deben a un efecto de la temperatura sobre la producción de las bacteriocinas o sobre su liberación al medio de cultivo.

Resultados

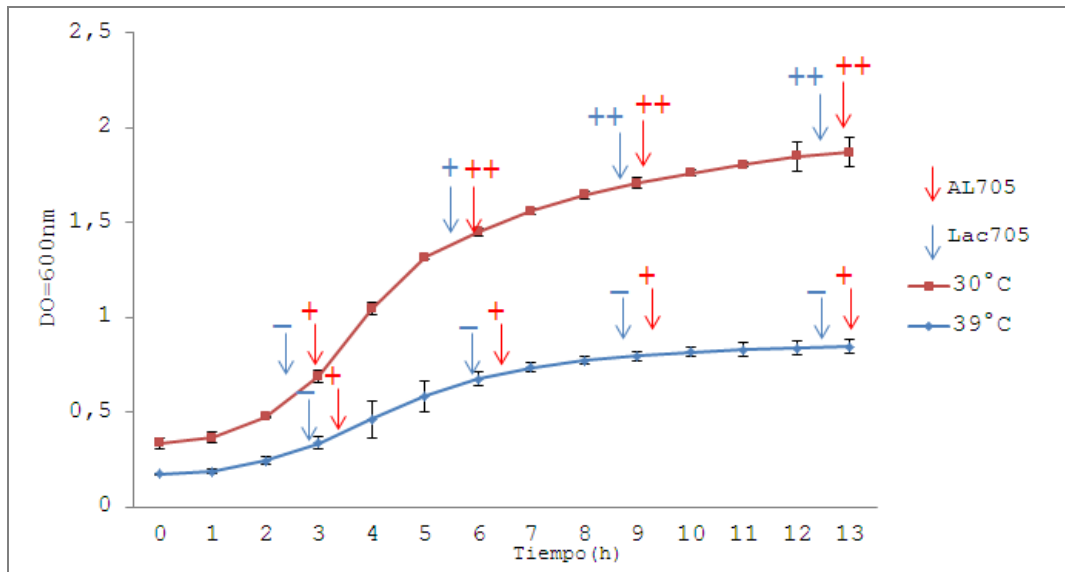


Figura 10. Curvas de crecimiento de la cepa CRL705 en MRS y producción de lactocina Lac705 y antilisteria AL705, a 30°C y 39°C (+ = 200UA/ml; - = no detectable). Los experimentos fueron realizados por triplicado

Sin embargo, las altas temperaturas podrían afectar también la estabilidad del plásmido pRC18, inducir su pérdida y generar células curadas del mismo, lo que podría explicar el fenotipo “no productor” de ambas bacteriocinas observado a 39°C. Sin embargo, descartamos esta última posibilidad ya que ambos fenotipos fueron reversibles a 30°C. Cuando las células crecidas a 39°C fueron sembradas en un medio MRS agarizado e incubadas a 30°C, mostraron el fenotipo “productor” de Lac705 y AL705, lo que indica la permanencia de pRC18 en ellas. Así, concluimos que la producción de las bacteriocinas estudiadas varía durante la fase de crecimiento de *Lb. curvatus* CRL705: mientras la producción de AL705 se inicia en estadios tempranos de crecimiento y es continua durante la fase exponencial, la producción de Lac705 es tardía y se observa principalmente al final de la fase exponencial y comienzos de la fase estacionaria.

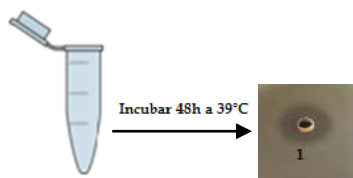


Figura 11. Esquema del protocolo de estabilidad de las bacteriocinas a 39°C. Similares resultados se observaron para Lac705 y AL705

Resultados

Los resultados observados sugieren también que la actividad detectada en los sobrenadantes de ambas bacteriocinas estaría modulada por la temperatura, siendo menor su detección a mayores temperaturas. Para confirmar esta predicción, se determinaron los niveles de AL705 en células crecidas en medio MRS en un rango de temperatura de 20 a 39°C (Figura 12). En estos experimentos, las células usadas fueron *Lb. curvatus* Sac7 transformadas con el plásmido p3.3 (Figura 13), plásmido que carece del gen estructural de Lac705 α y que complementa la función ABC necesaria para detectar la actividad AL705. A la temperatura óptima de crecimiento de 30°C, el título máximo de AL705 fue 25.600 UA/ml. Conforme la temperatura fue aumentando la actividad AL705 detectada y el crecimiento celular disminuyeron, observándose valores mínimos de 200 UA/ml a temperaturas superiores a 37°C. Los valores máximos de actividad (51.200 UA/ml) fueron detectados en el rango de 20-30°C, temperaturas no óptimas para el crecimiento celular.

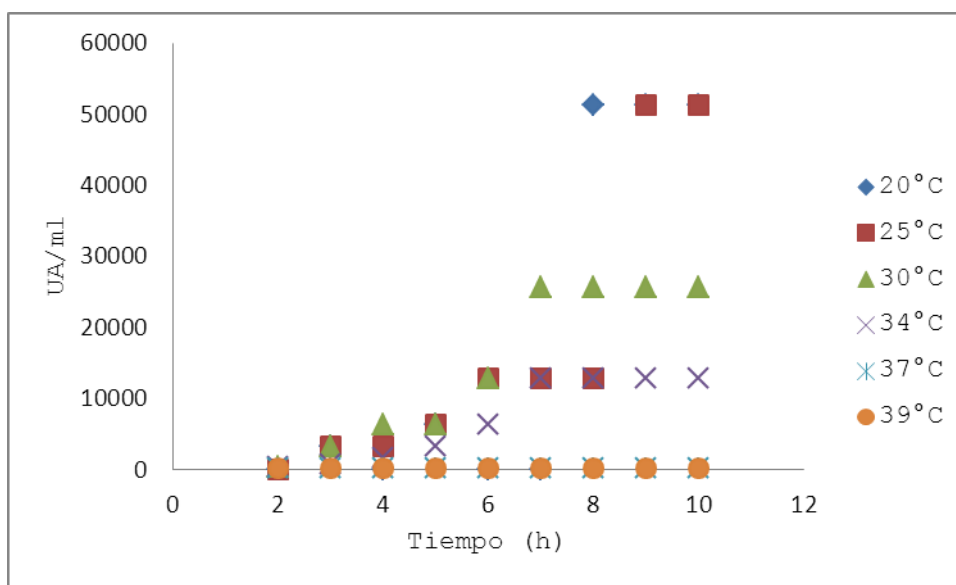


Figura 12. Niveles de AL705 producidos por *Lb. curvatus* Sac7 (p3.3) a diferentes temperaturas. Los experimentos fueron realizados por triplicado

Resultados

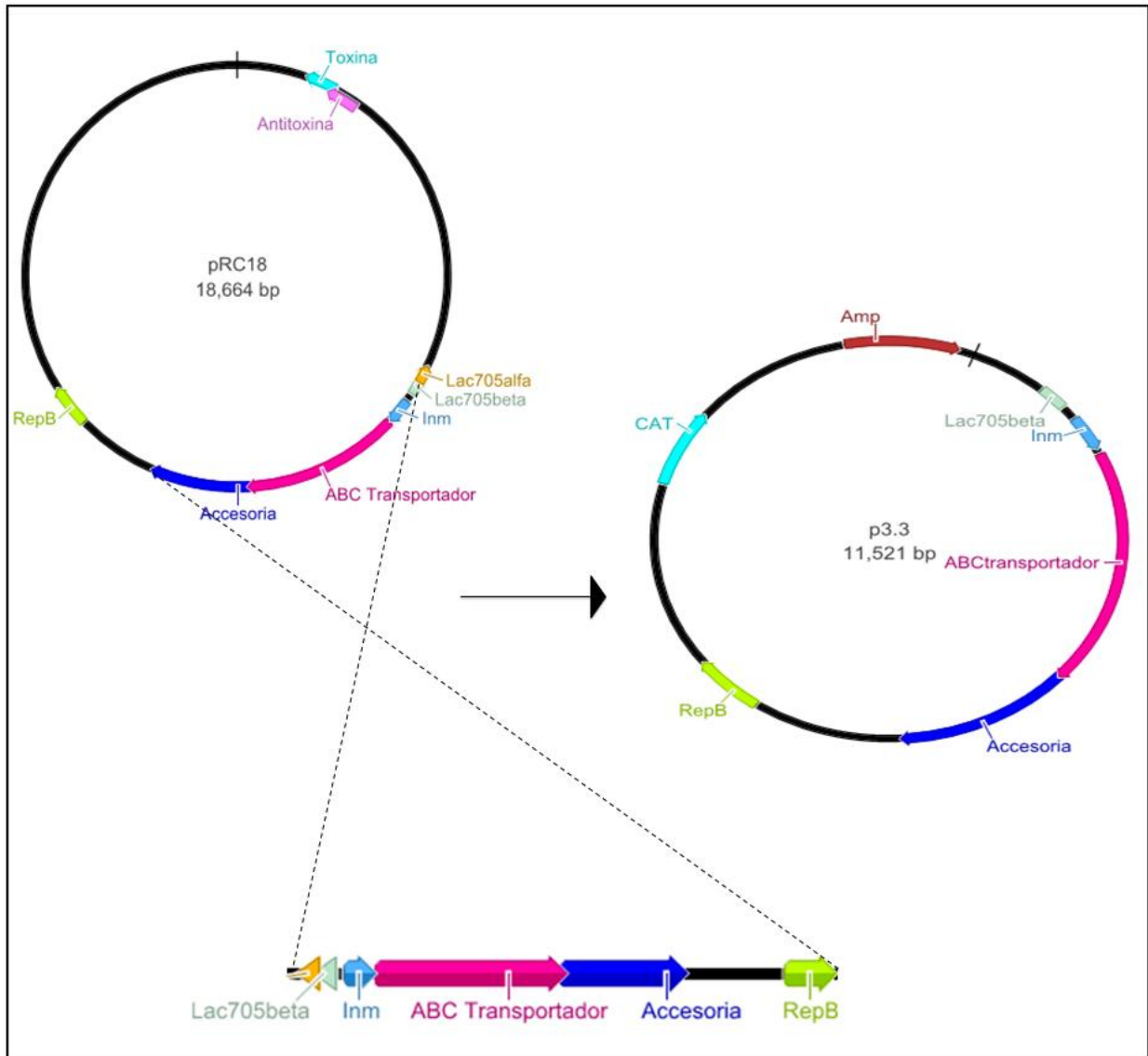


Figura 13. Esquema del plásmido p3.3, que porta una delección en el gen Lac705 α . La región del plásmido pRC18, marcada entre líneas, fue clonada en el plásmido pBlueScriptSK::Cm, resultando el plásmido p3.3. Este plásmido complementa la actividad AL705 en *Lb. curvatus* Sac7

Resultados

Efecto de los componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento de la cepa CRL705 y producción de Lac705 y AL705

El crecimiento de las cepas productoras de bacteriocinas y la producción de las mismas depende de los nutrientes suministrados por el medio de cultivo. Por lo tanto, se realizaron estudios comparativos sobre el efecto de diferentes medios de cultivo, nutricionalmente simples o complejos, en la producción de Lac705 y AL705. Los medios utilizados en una primera instancia fueron: MRS, BHI+TW80, LB+Gluc+TW80, M9, TS+TW80 (Figura 14A). Los resultados mostraron que a 30°C el medio MRS fue el óptimo tanto para el crecimiento como para la detección de ambas bacteriocinas (máximo título observado para ambas de 12.800 UA/ml). Títulos máximos de 6.400 UA/ml fueron obtenidos para AL705 en los medios BHI+TW80, LB+Gluc+TW80 y TS+TW80, mientras que los títulos máximos para Lac705 fueron de 800 UA/ml en el medio BHI+TW80 y de 400 UA/ml en los medios LB+Gluc+TW80 y TS+TW80. No se observó crecimiento en el medio mínimo M9. Estos resultados indican que la producción de Lac705 está fuertemente asociada con el crecimiento celular.

Por otro lado se probaron diferentes variantes del medio MRS quitando algunos de sus componentes, como el acetato, citrato, fosfato (PO_4^-) o $\text{Mg}^{++}/\text{Mn}^{++}$ (Figura 14B). *Lb. curvatus* CRL705 mostró un mayor crecimiento en los medios MRS modificados libres de acetato, PO_4^- o citrato, mientras que la ausencia de las sales de Mg y Mn limitaron su crecimiento al 50% respecto al medio control MRS (24h). En todas las condiciones, la producción de AL705 no se vio afectada (12.800 UA/ml), mientras que los niveles de Lac705 fueron de 6.400 UA/ml en los medios MRS-modificados. Similares observaciones fueron realizadas en medios MRS modificados donde se eliminaron en forma conjunta 2 ó 3 sales (medios MRS-acetato- PO_4^- y MRS-acetato- PO_4^- -citrato), indicando que el agregado de estos tres componentes no es necesario para el crecimiento de *Lb. curvatus* CRL705 y producción de AL705, en las condiciones ensayadas, pero si reducen los niveles máximos de Lac705 (6.400 UA/ml; Figura 14B). Por último, el reemplazo de la peptona del medio MRS por extracto de carne (0,1%) o Casaaminoácidos (0,1%), redujo el crecimiento celular y los niveles detectados de Lac705 (3.200 UA/ml en los medios modificados), sin modificar los niveles de AL705 (12.800UA/ml) respecto al control (Figura 14C).

Resultados

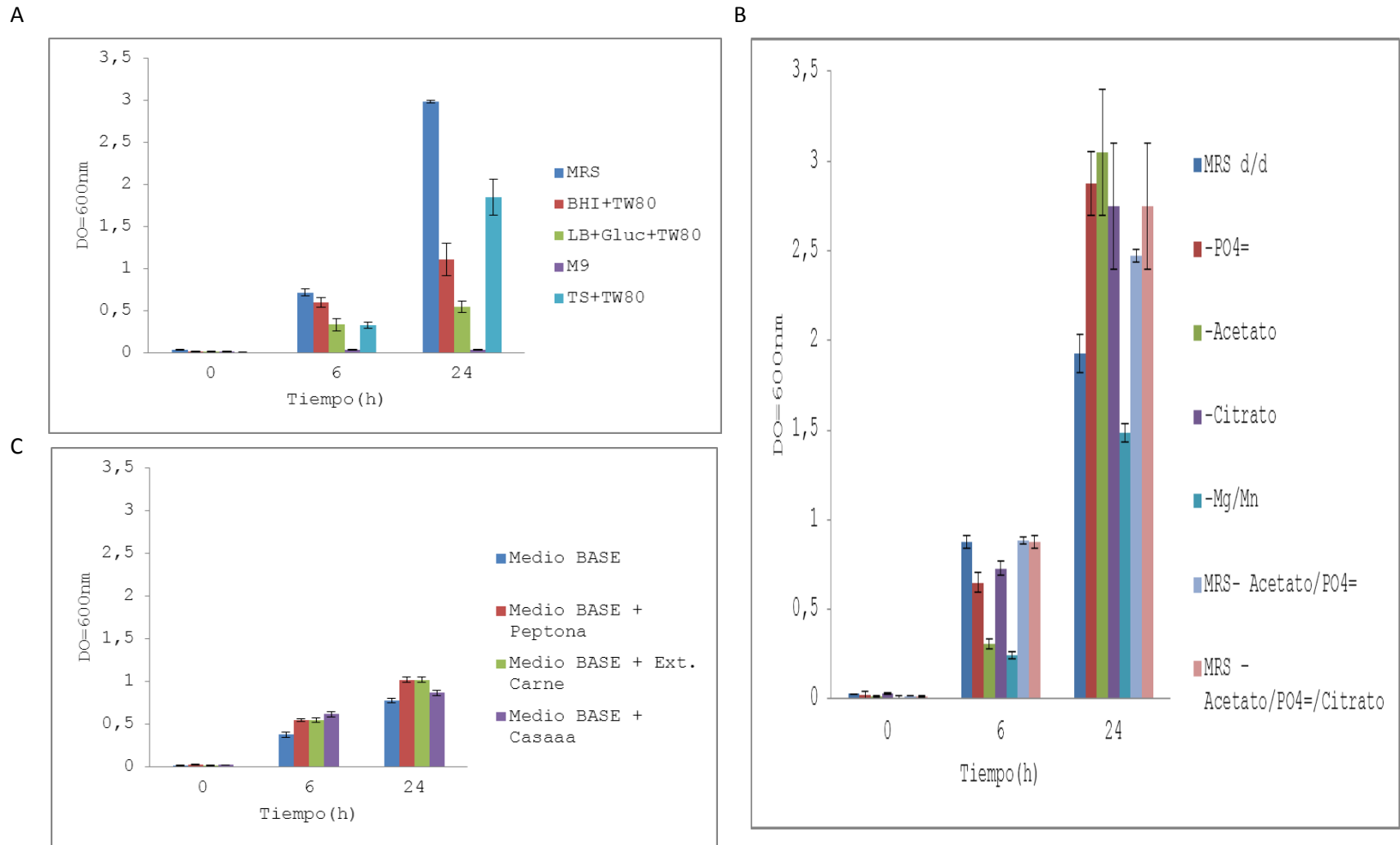


Figura 14. Crecimiento de *Lb. curvatus* CRL705, a 30°C, en: A) MRS, BHI+TW80, LB+GLUC+TW80, M9 y TS+TW80, a 30°C; B) MRS (“droga por droga”), MRS-fosfato, MRS-acetato, MRS-citrato, MRS-sales de Mg/Mn, MRS -acetato-fosfato, MRS-acetato-fosfato-citrato; C) Medio base, Medio base + peptona, Medio base + ext. carne, Medio base + Casaaa. GL=glucosa; TW80=Tween 80; TS= Triptona de soja

Estudio de la regulación de los promotores divergentes del plásmido pRC18 por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) y PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)

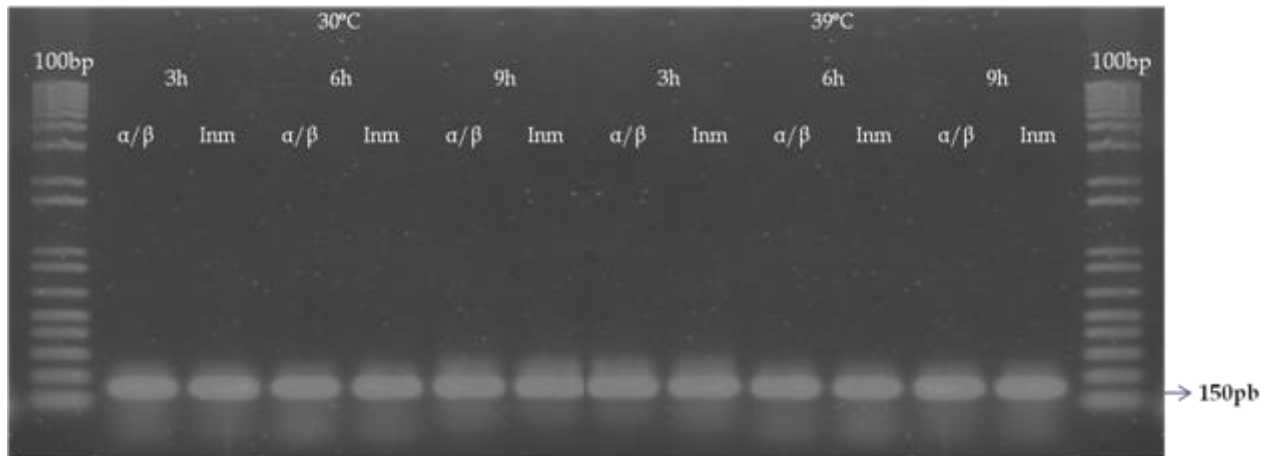
El sistema genético de lactocina Lac705 está integrado por dos operones divergentes y superpuestos; el primero contiene los genes estructurales de Lac705-alfa y Lac705-beta, que se transcribe en sentido inverso al segundo operón que contiene el gen de inmunidad (*imm705*), los genes de un sistema de transporte tipo ABC y su proteína accesoria (genes *abc705* y *acc705*, respectivamente). Se evaluó el efecto de la temperatura y de la fase de crecimiento en la expresión de los promotores divergentes usando cebadores específicos a los genes estructurales (*lac705-alfa* y *lac705-beta*) y al gen de inmunidad (*imm705*) (Tabla 22, MyM). Las extracciones de ARN se realizaron a partir de cultivos celulares en las fases de crecimiento exponencial (temprana y tardía) y estacionaria, a 30 y a 39°C. En los estudios de RT-PCR, la presencia de amplicones en todas las condiciones ensayadas sugiere que ambos promotores son activos a 30 y 39°C y en todas las fases de crecimiento (Figura 15A).

Los estudios de qRT-PCR en tiempo real fueron realizados con ADN copia de células en fase exponencial (6 h), crecidas a 30 y 39°C. Como gen normalizador se utilizó el gen *gyrB* (que codifica para la enzima ADN girasa) y los valores de expresión relativa (CT) de los genes se determinaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008). En la Figura 15B se muestra una gráfica representativa de las señales fluorescentes correspondientes a las diferentes condiciones ensayadas en función de los ciclos de amplificación. La intersección entre la línea *threshold* y cada curva de amplificación determina el CT (o Ciclo umbral; del inglés *threshold cycle*) de cada muestra; ciclo en el que el aumento de la fluorescencia es mayor al nivel basal y es inversamente proporcional a la concentración inicial del ADN presente en la muestra. Las curvas de *melting* correspondientes a las muestras de los genes α/β y de *imm705* generaron un solo pico, en las distintas condiciones, a la temperatura esperada de 75°C, indicando la especificidad de los amplicones (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos muestran que no hay cambios en los niveles de expresión para los genes α/β y de inmunidad respecto al gen interno (Tabla 2). Esto indica que, en las condiciones ensayadas, no hay cambios en los niveles de actividad de ambos promotores y que las diferencias observadas en los niveles de ambas bacteriocinas, detectados en los sobrenadantes de los cultivos celulares, estarían controladas a nivel post-transcripcional.

Resultados

A



B

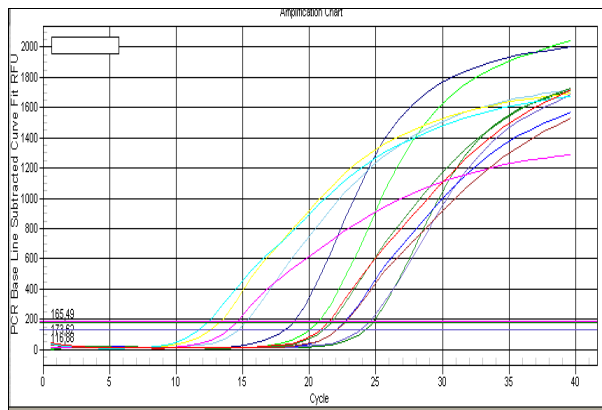


Figura 15. Estudio de la expresión de los genes α/β , *inm705* y *gyrB*. A. Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones de la reacción RT-PCR a 3, 6, y 9 h, a 30 y a 39°C; B. Curva de amplificación (intensidad de fluorescencia contra ciclos de amplificación CT) indicando la diferencia de expresión de cada gen representada por sus correspondientes CT a las 6h, a 30 y a 39°C.

Tabla 2. Valores de CT de los genes α/β , *inm* y *gyrB*, a las 6h

	CT(30°C)	CT(39°C)
<i>gyrB</i>	20,62	18,74
<i>Inm</i>	13,95	11,76
α/β	15,29	13,36

Resultados

Identificación y caracterización de potenciales genes responsables de la producción del factor AL705 presentes en el genoma de Lb. curvatus CRL705

Como se indicó, la cepa CRL705 produce dos bacteriocinas: lactocina Lac705 y antilisteria AL705. Mientras que la bacteriocina de dos componentes Lac705 ha sido caracterizada y asociada al plásmido pRC18, los determinantes genéticos de la actividad antilisteria AL705 no han sido aún determinados. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha obtenido la secuencia nucleotídica del genoma de *Lb. curvatus* CRL705 (número de acceso en GenBank: AGBU01000000). Procedimos por lo tanto a identificar, mediante el uso de herramientas de bioinformática, la presencia de potenciales genes de bacteriocinas en el genoma de *Lb. curvatus* CRL705 y asociarlos a la actividad AL705.

El genoma de *L. curvatus* CRL705 consiste en un cromosoma circular de 1.833.251 pares de bases (con un contenido GC de 41.9%); su secuencia no está completa y ha sido anotada como un “borrador” de 145 “contigs”. La cepa CRL705 posee además dos plásmidos: pRC12 (12.342 pb) y pRC18 (18.664 pb; GenBank AF200347.3). La búsqueda de los genes asociados a bacteriocinas presentes en el genoma de CRL705 se realizó con el programa Bagel3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>), y se complementó con una análisis sistemático de los genes anotados mediante el programa Blastp (en este caso, haciendo uso de secuencias de bacteriocinas descritas en la especie *Lb. curvatus*; i.e., sakacina A, sakacina G, etc.).

Tabla 3. Bacteriocinas identificadas en el genoma de *Lb curvatus* CRL705 mediante el programa Bagel3

Bacteriocina	Contig	Actividad antilisteria
sakacina Q	53	sí (Mathiesen et al. 2005)
sakacina Talfa/Tbeta	88	no
sakacina X	88	sí (Vaughan et al. 2003)
sakacina P	84	sí (Holck et al. 1994)
enterocina_NKR_5_3D	47	sí (Ishibashi et al. 2012)
¿? (XT)	23	
Lactocina (Lac705 alfa/beta)	plásmido pRC18	no

¿? = Bagel3 no brinda un informe detallado

Resultados

El programa Bagel permitió identificar la presencia de los genes estructurales de 6 bacteriocinas en 5 *contigs* del genoma de CRL705 (uno de ellos, el plásmido pRC18; Tabla 3). El programa también detectó al *contig*00023, aunque no identificó en el mismo a ninguna bacteriocina (como se describe a continuación, en el mismo se ubica parte del operón sakacina T/X). Cuatro de las bacteriocinas detectadas (sakacinas P, Q, X y enterocina_NKR_5_3D) poseen actividad antilisteria; no así las bacteriocinas de dos componentes, sakacina T y lactocina Lac705. Enterocina_NKR_5_3D es un péptido homólogo (91% identidad) a IP-TX, un péptido inductor de las sakacinas X y T. Estas bacteriocinas han sido estudiadas en cepas de *Lb. sakei* y sus determinantes genéticos están localizados en dos operones distintos: operones *sakp/q* y *sacx/t*. A continuación se describen los pasos realizados en la caracterización de estos sistemas en la cepa CRL705.

Sistema sakacinas P y Q

Sakacina P es una bacteriocina de tipo IIa, descrita por primera vez en *Lb. sakei* Lb673 (Tichaczek y col. 1994), pero también presente en las cepas de *Lb. sakei* Lb674 (Huhne y col. 1996) y I151 (Urso y col. 2006a). La producción de esta bacteriocina requiere de los siguientes tres grupos de genes, todos ellos precedidos por promotores inducibles (Figura 16): i) un operón que consiste de los genes estructurales de la sakacina P (*sppA*) y su gen de inmunidad (*spiA*); ii) un operón de regulación basado en un sistema de *quorum-sensing* que codifica para un péptido inductor (*sppIP*), una histidina quinasa (*sppK*), que detecta al péptido inductor, y un regulador de respuesta (*sppR*), el cual activado por la histidina quinasa induce a los promotores *spp*; y (iii) un operón que codifica un sistema de transporte ABC (*sppT*) y su proteína accesoria (*sppE*), necesarios para el transporte y el procesamiento de la bacteriocina y del péptido inductor. Los promotores que preceden estos operones son designados como P_{sppA} , P_{sppIP} , y P_{sppT} , respectivamente. Tanto la bacteriocina como el péptido inductor contienen una secuencia amino terminal que presenta una señal típica “doble glicina”, la cual es reconocida por la maquinaria de transporte (Nissen-Meyer y col 2010).

Corriente abajo del grupo de genes de la sakacina P se ubica el grupo de genes que codifica para la sakacina Q, bacteriocina que pertenece a la clase IId de las bacteriocinas. Tanto el gen estructural para la sakacina Q, *sppQ*, como su gen de inmunidad, *spiQ*, se encuentran en marcos de lecturas superpuestos. *sppQ* está precedido por el promotor P_{sppQ} el cual se encuentra bajo el control de los mismos genes que regulan el sistema de la sakacina P (Figura 16) (Holck y col. 1994; Brurberg y col. 1996; Hühne y col. 1996; Mathiesen y col. 2005).

Resultados

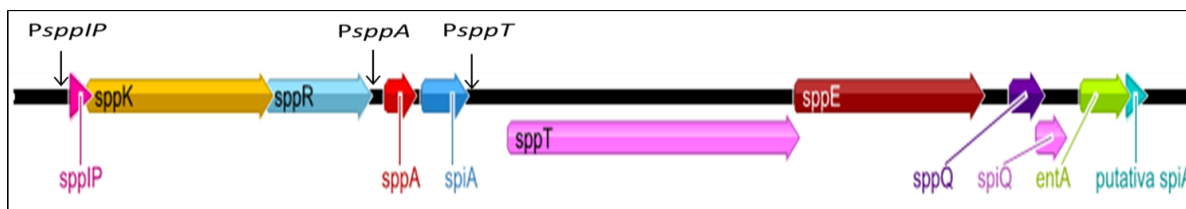


Figura 16. Esquema de la organización del fragmento Lb674p/q que contiene los operones de las sakacinas SakP y SakQ en *Lb. sakei* Lb674. Se indica la posición de los promotores P_{sppA} , P_{sppIP} , y P_{sppT} . Las flechas indican el sentido de la expresión de los genes

Los operones de las sakacinas P y Q fueron originalmente descritos en *Lb. sakei* como sistemas independientes, y sus secuencias nucleotídicas fueron incorporadas en el GenBank con los números de acceso Z48542 (sakP; 7.597 pb) y AJ844594 (sakQ; 1.602 pb). Sin embargo, ambas secuencias son contiguas en el genoma de la cepa *Lb. sakei* Lb674, siendo los 365 pb del extremo 3' de Z48542 (sakP) idénticas a la secuencia 5' de AJ844594 (sakQ), por lo que procedimos a unificar las mismas (secuencias Z48542 y AJ844594) en un único fragmento de ADN de 8.537 bp, que denominamos Lb674p/q. Cuando comparamos la secuencia Lb674p/q con la secuencia del genoma de CRL705, mediante el programa Blastn2Seq, observamos que se correspondía a cuatro *contigs* de CRL705; se ubicaban de la siguiente forma: *contig118rc* (rc=reverso complementario), *contig84*, *contig111rc* y *contig53rc* (Figura 17).

Para confirmar que estos 4 fragmentos son contiguos y se localizan en el genoma de CRL705 de la forma propuesta en la Figura 17, se realizaron reacciones PCR, utilizando cebadores específicos diseñados a partir de los extremos 5', del primer *contig*, y 3' del segundo *contig*. En la Tabla 4 se indican los tamaños esperados y observados (Figura 18) de los amplicones. Los fragmentos amplificados con la mezcla de cebadores 118f-84r y 84f-111r, de 385 y 434 pb, respectivamente, se corresponden con los tamaños esperados. Sin embargo, el tamaño del amplicón generado con los cebadores 111f-53r, denominado PQ*contig111f-53r*, de 1.400-1.500 pb, es aproximadamente 1.000-1.100 pb mayor al esperado (420 pb). Cuando PQ*contig111f-53r* fue secuenciado, se observó que la secuencia nucleotídica interna del mismo se corresponde con la secuencia del *contig113rc* de CRL705 (Figura 17).

Por ello, se procedió a unir las secuencias de los 5 *contigs*: 118rc-84-111rc-113rc-53rc (eliminando las bases duplicadas en los extremos), lo que dio lugar al fragmento CRL705p/q, de 16968 pb. De esta manera, se localizaron los operones de las sakacinas P y Q en la cepa CRL705.

Resultados

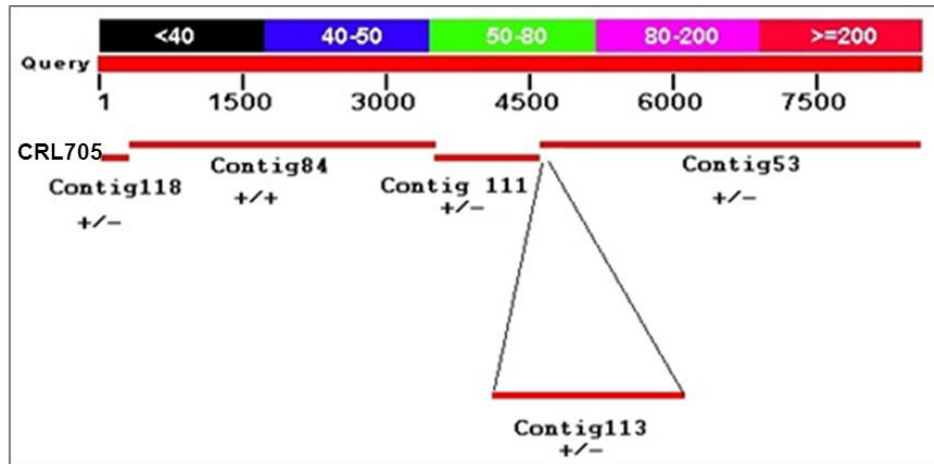


Figura 17. Contigs de la cepa *Lb. curvatus* CRL705 homologos a la secuencia Lb674p/q (marcada como *Query*) generados mediante el programa Blastn2Seq. +/- indica que la secuencia del *contig* en la cepa CRL705 es complementaria reversa de la secuencia presente en Lb674p/q. +/+, indica que la secuencia del *contig* en la cepa CRL705 es idéntica a la secuencia presente en Lb674p/q

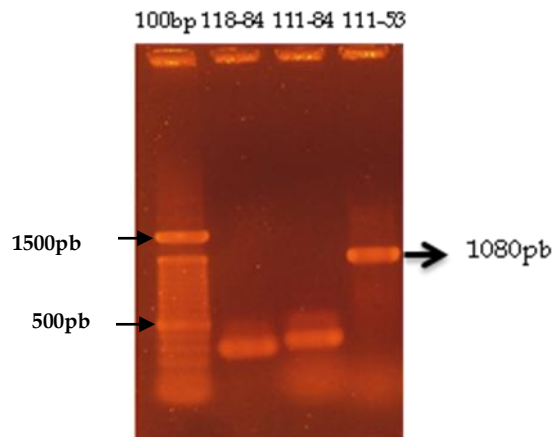


Figura 18. Productos de amplificación obtenidos ("tamaño observado" en Tabla 4) con los cebadores 118f-84r, 111f-84r, 111f-53rc (Tabla 22)

Tabla 4. Tamaño de los amplicones esperados y observados

Nombre del fragmento	Esperado (pb)	Observado (pb)
PQContig118-84	385	385
PQContig84-111	434	434
PQContig111-53	420	Aprox. 1.500

Resultados

Un análisis comparativo entre las secuencias Lb674p/q (8.537 nt) y CRL705p/q (16.968 nt), realizado con el programa Blast (bl2seq), indica que las mismas comparten 8492 nt: las regiones de nucleótidos 46-4.594 y 4.590-8.537 de Lb674p/q se corresponden con las regiones de nucleótidos 646-5.194 y 6.248-10.198 de CRL705p/q, respectivamente.

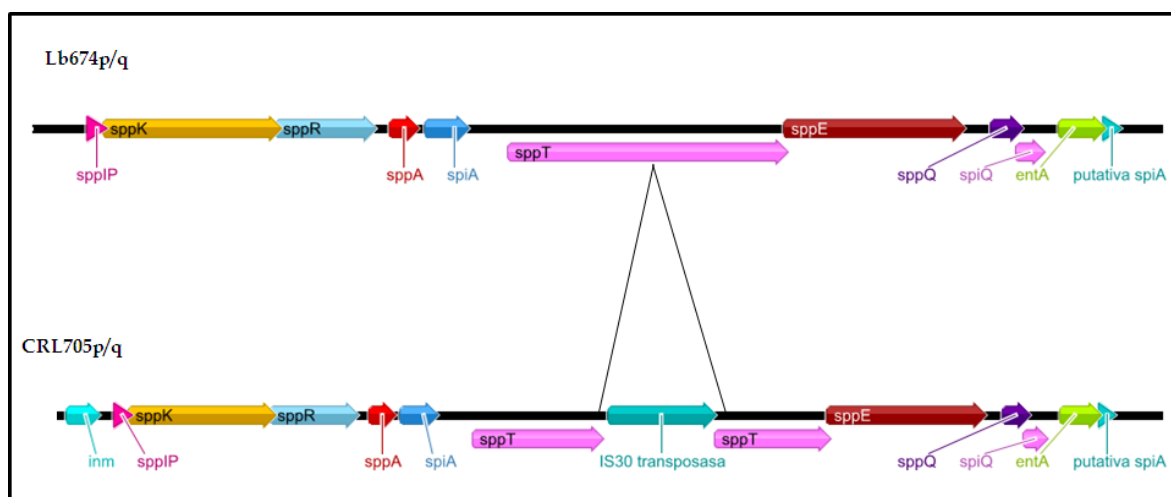


Figura 19. Esquema comparativo de los operones P/Q entre las cepas CRL705 y Lb674. La principal diferencia entre ambos sistemas es la presencia de una secuencia IS, inserta en el gen ABC, y de un gen extra de inmunidad localizado en el extremo 5' del fragmento (celeste)

En la Figura 19 se observa una organización del operón SakP/SakQ de *Lb. curvatus* CRL705 similar a la descrita en la cepa de *Lb. sakei* Lb674: el orden de los genes *sppIP*, *sppK*, *sppR*, *sppA*, *spiA*, *sppT*, *sppE*, *sppQ*, *spiQ*, *entA*, y *spiA putativa* se corresponden en ambas cepas. Los genes *sppIP*, *sppK*, y *sppR* constituyen el operón de un sistema regulador de tres componentes y codifican para las proteínas péptido inductor de sakacinas P y Q, respectivamente, histidina quinasa, y el regulador de la respuesta. A su vez, los genes *sppA*, *spiA*, *sppT*, y *sppE* constituyen un segundo operón y codifican, respectivamente, para las proteínas sakacina SakP, proteína de inmunidad a sakacina SakP, transportador ABC, y proteína accesoria. Estas dos últimas proteínas participan en el transporte y procesamiento de los prepéptidos de las bacteriocinas y factores de inducción. Los genes *sppQ* y *spiQ* forman el tercer operón y codifican para la sakacina SakQ y la proteína de inmunidad a sakacina SakQ, respectivamente. Finalmente, los pseudogenes *entA* y *spiA* forman el cuarto operón y codifican, respectivamente, para proteínas truncas de inmunidad de la familia de enterocina EntA (homóloga al extremo carboxilo de las mismas; región de aa 40 a 95) y para una posible proteína de inmunidad a sakacina P.

Resultados

Los fragmentos Lb674p/q y CRL705p/q comparten una identidad del 99% (Tabla 5); las principales diferencias observadas en esta región compartida son (Figura 20; Tabla 6):

- a) un fragmento extra de 1.058 nt, presente en CRL705p/q, entre los nucleótidos 5195-6247, el cual corresponde a una IS insertada en la posición 4590 del fragmento Lb674p/q; la inserción de la IS duplica en ambos extremos la secuencia de 5 nt, CTATG (Figuras 19 y 20) e inactiva el gen *sppT* (transporte ABC)
- b) una diferencia de 28 nucleótidos (se muestran en rojo en la secuencia de la Figura 20; Tabla 6), de los cuales 13 nt se ubican en regiones intergénicas [10 nt entre los genes *Imm1* (proteína putativa de inmunidad) y *sppIP* (péptido inductor IP-P); 2 nt entre los genes *sppE* y *sppQ*; y 1 en el extremo 3' del fragmento Lb674p/q] y 15 nt en regiones codificantes. Como se indica en la Tabla 4, 5 de estas mutaciones son neutras (no modifican el aa en la secuencia primaria de las proteínas), 3 modifican un aminoácido en la secuencia de las proteínas SppK (L232F), SpiA (F80S), y SppQ (G55D); y dos modifican dos aminoácidos en la proteína SppE (F11L e I416T). La IS (con una transposasa de 284aa) interrumpe la secuencia de la proteína SppT (718 aa), dejando una proteína SppT trunca e inactiva de 387 aa. Otras tres mutaciones observadas en la proteína SppT (Y491H y las bases extras en posición nt 7067-7068, que producen un "frameshift") se ubican en la región carboxilo de la misma, luego de la IS.

Además, corriente abajo del gen *spiA putativa* en *Lb. curvatus* CRL705 (extremo 3'; no mostrado), se encontraron genes no relacionados con sistemas de bacteriocinas y comprometidos aparentemente con el metabolismo de treonina y NAD, entre otros. Mientras que la secuencia comprendida entre los nucleótidos 1-645 del extremo 5' CRL705p/q no se encontró en el fragmento Lb674p/q. En esta región (Figuras 19 y 20) localizamos dos genes que codifican para proteínas que presentan una alta identidad con proteínas de inmunidad a bacteriocina: i) la proteína Imm1 (84 aa), homóloga a la proteína Imm_{Lac705} del sistema lactocina 705, presente en el plásmido pRC18; y ii) la proteína Imm_EntA (33 aa) la que presenta identidad con proteínas de inmunidad de la familia EntA. Esta proteína ha sido descrita también en el extremo 5' del grupo de genes de sakacinas P y Q en la cepa *Lb sakei* LTH673, aunque en esta región no se detectó homología a nivel de ADN entre LTH673 y CRL705p/q.

Resultados

Tabla 5. Identidad entre los sistemas sakacina P y Q determinada por comparación de los fragmentos CRL705p/q (*Lb. curvatus* CRL705) y Lb674p/q (*Lb. sakei* Lb674)

MLA (Marco de lectura abierto)	Gen	Proteína	Tamaño (aa)	Identidad con sistema P/Q <i>Lb.</i> <i>sakei</i> 674 (%) Observaciones
296..550	<i>inn1</i>	Proteína de inmunidad	84	71
720..833	<i>sppip</i>	Factor inducción	37	97
840..2198	<i>sppk</i>	Histidina kinasa	460	99
2200..2946	<i>sppr</i>	Regulador de respuesta	248	99
3080..3301	<i>sppa</i>	Sakacina P	43	100
3372..3668	<i>spia</i>	Proteína de inmunidad	98	99
4019..5182	<i>sppt</i>	Tranportador ABC	387	100
5340..6194	<i>is</i>	Secuencia de Inserción	284	0
6244..7059	<i>sppt</i>	Tranportador ABC	271	99
7071..7235	<i>sppt</i>	Tranportador ABC	54	
7250..8626	<i>sppa</i>	Proteína Accesoría	458	99
8790..9228	<i>sppq</i> <i>spiq</i>	Sakacina Q Inmunidad SakQ	67 60	100
9324..9686	<i>enta</i>	Proteína de inmunidad	120	67
9787..9984	<i>spia</i>	Proteína de inmunidad	65	67

Resultados

Tabla 6. Bases mutadas presentes en el fragmento CRL705p/q respecto a su secuencia homóloga del fragmento Lb674 p/Q

Posición	Base	Región	Aminoácido
		Lb674p/q →CRL705p/q	Lb674p/q →CRL705p/q
658	C → A	RI	
659	G → T	RI	
665	A → T	RI	
666	A → G	RI	
667	C → A	RI	
678	A → T	RI	
691	A → T	RI	
693	C → A	RI	
694	C → A	RI	
695	G → T	RI	
751	A → C	sspIP	Neutro (I)
758	A → G	sspIP	K → E
1570	G → C	sspK	L → F
2089	G → C	sspK	Neutro (T)
3633	T → C	spiA	F → S
4101	T → C	sppT	Neutro (A)
4701	A → T	sppT	Neutro (S)
5194	IS	sppT	
6570	T → C	sppT	Y → H
7067	- → A	Frameshift	
7068	- → G	GAP	
7206	A → T	sppT	
7303	T → C	sppE	F → L
8519	T → C		I → T
8653	G → T	RI	
8791	C → T	RI	
9015	G → A	sppQ	G → P
9096	A → G	sppQ	Neutro (L)
10080	- → A	Frameshift	

Resultados

En síntesis, las principales diferencias observadas entre los sistemas de sakacinas P y Q de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus* CRL705 son: la presencia en el sistema CRL705 de una proteína extra de inmunidad, ubicada en el extremo 5' y un sistema de procesamiento y transporte no funcional, debido a la presencia de una secuencia IS en el gen *sppT* que inactiva a la proteína de transporte ABC. Así, ambas bacteriocinas, sakacina P y sakacina Q, son candidatos viables de la actividad antilisteria detectada en la cepa *Lb. curvatus* CRL705, a condición que el procesamiento y secreción de las mismas sea complementado por un transportador ABC funcional presente en el plásmido pRC18.

Resultados

proteína

GCAATCTACCAATATCTAACAGT *entA*,

r..g..i..D..L..L. inmunidad (parcial)

GCATTGATTATCCGGATGCGCCATTAGACTGTTGTAAAGTGTATGGATGTTTTCTTTTGAATGATA
A N S K D P H A M L S N Y L T H I N E K T I S
AACCTGTCAATTAACCCCTCCGTATTACAATAATTCACACTAGTTATAGTTCCCTTTTAGTTATTGTG
L S T M
AATGATGCAAATAAGCGCTATGACGATTAACGTTTAAATTTAAACGTTAATCTTTTTTTGAATATTGAT
CGAATCTTGGTCCATAATAAAGTTTGTGAGACTTAGTTGGCCAATTAAGTACTGAGAATATTGTGA
TTAGAGGATGTCATTTAGCTTATTACTGAATCAATTTTCAAGATATCAAAAGATCTTTCTTTGGTAA Proteína Imm1
M S L L L N Q F Q N Y Q K I L S L V M
TGTC AAT TAT CATT ATT GT CGCT GTCT ATCT GAAC GACT CACA ACCGGT TTTAGCAGT TTTAATTGTTTT
S I I I I V A V Y L N D S Q P V L A V L I V L
AGGCATTGCTAGTTTAGGGGAACACTTCTTACTTTATTCATCGAATATTGAAAGTAAATGGGCAGGAAAA
G I A S L G E H F L L Y S S N I E S N W A G K
GTGGACCTAATGTTTAAAGTAGCTTGTCTTATATATGTTGTGATAAATTTTCAAGATTAGTTAAATATTC
V D L M F K I A C L L Y V L Y K F S D stop
CTAATAAAAAGGTTGGCATAAAATCATTTTATGCCAACCTTTTATTTTTTATAAACCGTAATTAACGTT
at 645

AATCATAAAAATGATAACGTTAATTTTAAAAATAAGTTAATCTTGTGAATTATGTATAATTTGATTAGA
CTAAGAATAGGAGAAAGTATGATGATCTTTAAAGAACTTTTCAAGAAAAGAATTGCAAAAAATAAACGGT *sppIP*,
Péptido
M M F K E L S E K E L Q K I N G inductor
GGTATGGCAGGAAATAGTTCTAATTTTATTCATAAGATTAACAATTTTACCCTCGTTAAGATAGGT
G M A G N S S N F I H K I K Q I F T H R stop
TGTTGGTGAGCATGTTATATACGGATGTATCGGTTTCCCTTAATGCAAAATTTTGTGCTATCTTATTAAT *sppK*
M L Y T D V S V S L M Q N F V A I L L I Histidina

quinasa
TTTTCTATTATATAGATATATTCAAAGAAAGATAACATTTAAACGGATCATATTAGATATTTAATAGCC
F L L Y R Y I Q R K I T F K R I I L D I L I A
ATTATTTTTCAATATTATCTGTTTATTTTCAGATGCGTCATTACTTGTAAATGGTATTAATGCGATTAG
I I F S I L Y L F I S D A S L L V M V L M R L G
GGTGGCATTTTCATCAACAAAAAGAAAATAAGATAAAAAACGACTGATACAGCTAATTTAATCTAATAT
W H F H Q Q K E N K I K T T D T A N L I L I I
CGTGATCCAGTTATGTTAGTTGCGGTTGGGACTATTATTAGTCAGTTTACCATATCGATTATCAAAAGT
V I Q L L V L V A V G T I I S Q F T I S I I K S
GATTTCAAGCAAAATATATTGAACAAATAGTGAACAGATATAACTTTATTAGGTATTTCTTTGCTGTTT
D F S Q N I L N N S A T D I T L L G I F F A V L
TATTTGACGGCTTGTCTTTATATTATGAAGAATAAGCGGACTGAATTACAACATTTAATCAAGAAAT
F D G L F D F I L K N K R T E L Q H L N Q E I
CATTGAATTTTCGTTAGAAAAACAATTTTATATTATTTATTTTATTATAGTAATAGAAATATT
I E F S L E K Q Y F I F I F I L F I V I E I I
TTAGCAGTTGGGAATCTTCAAGGAGTAACAGCCACGATATATTAAACCATATCATTTTTTTGTGTC
L A V G N L A G V T A T I L L T I I I I F C V L
TTATCGGGATGACTTTTGGCAAGTGATGCTTTTTTTGAAGGCTTATTCGATTCCGCAAGAACCAATGA
I G M T F W Q V M L F L K A Y S I R Q E A N D
CCAATTCTGCGGAATCAACAACCTCAAGATTATCTAGTCAATATCGAACAGCAGTACACCGAATTACGG
Q V R N Q Q L Q D Y L V N I E Q Q Y T E L R
CGATTTAAGCATGATTATCAAAACATCTTATTATCGTTGGAGAGTTTGGCGAAAAGGGCGATCAGCAAC
R F K H D Y Q N I L L S L E S F A E K G D Q Q Q
AGTTTAAGGCGTATTACCAAGAATTATTAGCACACGGCCAATTCAAAGTGAATCAAGGGGCAGTCAT
F K A Y Y Q E L L A Q R P I Q S E I Q G A V I
TGCACAACCTGACTACTTGAATAATGATCCTTATTCGAGGATTAGTCATTCAAAGTTTTTGGCAGCCAAA
A Q L D Y L K N D P I R G L V I Q K F L A A K
CAGGCTGGTGTACTTTAAATTCGAAATGACCGAACCAATCGAATTAGCAACCGCTAATCTATTAACGG
Q A G V T L K F E M T E P I E L A T A N L L T V
TTATTCGGATTATCGGATTTTATTAGACAATGCGATTGAACAAGCCGTTCAAGAAACCGATCAATTGGT
I R I I G I L L D N A I E Q A V Q E T D Q L V
GAGTTGTGCTTTCTTACAATCTGATGGTTTAAATCGAAATACGATTGAAAATACGGCCAGTCAAGTTAAG
S C A F L Q S D G L I E I T I E N T A S Q V K
AATCTCAAGCATTTTCAAGATTAGGCTATTCAACCAAGGCGCTGGTCGGGGGACTGGTTTAGCTAATG
N L Q A F S E L G Y S K G A G R G T G L A N V
TGCAGGATTTGATTGCAAAACAAACCAATTTATTTAGAAACACAGATTGAAAATGAAAAGTTACGACA
Q D L I A K Q T N L F L E T Q I E N R K L R Q
GACATTGATGATTACGGAGGAACTTAATTTGTATCCCGTTTATTATTAGAGGATGATTTACAGCAACA
T L M I T E E T stop
M Y P V Y L L E D D L Q Q Q
AGCGATTTATCAGCAAAATATCGCGAATACGATTATGATTAACGAATTTGCAATGACTTTAACATGCGCT *sppR*

Resultados

A I Y Q Q I I A N T I M I N E F A M T L T C A Regulador

de

GCCAGTGACTGAGACATTGTTGGCGCAATTAAGGATCAGCAACGAGGTTTATTCTTTTGGATATGG respuesta

A S D T E T L L A A I K D Q Q R G L F F L D M E

AAATTGAGGATAACCGCAAGCCGGTTTAGAAGTGGCAACTAAGATTTCGGCAGATGATGCCGTTTGGCGA

I E D N R Q A G L E V A T K I R Q M M P F A Q

AATTGTCTTACATTACAACCCACGAGGAAGTACATTATTAACGTTAGAACGAAAAATAGCGCCTTTAGAT

I V F I T T H E E L T L L T L E R K I A P L D

TACATTCTCAAGGACCAACAATGGCTGAAATCAAAGGCAATTGATTGATGATCTATTGTTAGCTGAGA

Y I L K D Q T M A E I K R Q L I D D L L L A E K

AGCAAAACGAGGCGGCGATACCCGAGAAAATTTATTTAGTTATAAAATAGGTCCTCGCTTTTCTC

Q N E A A A Y H R E N L F S Y K I G P R F F S

ATTACCATTAAAGGAAGTTGTTTATTTATATACTGAAAAAGAAAATCCGGGTCATATTAATTTGTTAGCC

L P L K E V V Y L E T E K E N P G H I N L L A

GTTACCAGAAAGGTTACTTTTCCAGGAAATTTAAATGCGCTGGAAGCCCAATATCCAATGCTCTTTCCGGT

V T R K V T F P G N L N A L E A Q Y P M L F R C

GTGATAAAAGTTACTTAGTTAACCTATCTAATATTGCCAATTATGACAGTAAAACACGGAGTTTAAATTT

D K S Y L V N L S N I A N Y D S K T R S L K F

TGTAGATGGCAGTGAGGCAAAAGTCTCGTTCGGGAAATCACGGGAACTAGTGGCCAAATTAACCAAAATG

V D G S E A K V S F R K S R E L V A K L K Q M

ATGTAGCGCATATTAACGTTAACCGATAAAGTTGAACGTTAATATTTTTTTGCGCAGAAATGGTAAAT

M stop

TGAAGCATAATAGTCTTGTAAAGTATTTAGCTGGCTGGCGTAAAGTATGCTTTATAAAATAATATATAGG

AGTATGATTCTAATGAAAAAGTTTATTGAATTATCTTTAAAGAAGTAAACAGCAATTACAGTGGAAAAAT sppA

M E K F I E L S L K E V T A I T G G K Y Sakacina P

ATTATGGTAAACGGTGTACACTGTGGAAAAACATTCATGTACCGTAGACTGGGGAACAGCTATGGAATAT

Y G N G V H C G K H S C T V D W G T A I G N I

CGGAAATAATGCAGCTGCAAACTGGGCCACAGGCGGAAACGCTGGCTGGAATAAAATAAAGCAAAACTT

G N N A A A N W A T T G G N A G W N K stop

AATTTAGATTTAAGGACTCTCTATCATTTGATGGGATTTTGTAGCTTATAGTAACAGAATAAAATAAGA

GGTGTACAGATTATGAAAATATTGAAGTGGTATTCAGTGGTAAGGATCGCGGAGAACGGGCAATGATAT spiA

M K I L K W Y S G G K D R G E R A N D I Inmunidad

TATAGGCCAATTTGTTGCTAGATCTGAACCATGATCCAAAAATGAACATTTAGAAGCAATATTAATAAAT

I G Q L L L D L N H D P K N E H L E A I L I N

TATCAGAATGAAATTAAGGAAAGAAAGTTCGGTGCCATTTATTTTGTAGTCGGATGAATATATCAATAG

Y Q N E I K R K E S S V P F I L S R M N I S I A

CCAATACAATCAGAAGAGATAGGCTCATTTAACCGATTCTCAAGAAGATAAATTGAAATTTGTTAACTGC

N T I R R D R L I L T D S Q E D K L K L L T A

GTTGTCTAATATAAGATATGGCTATTAGCAGCTTAATCTGTAGCACACTATTCTAAGAATACGCTAGAA

L S N I R Y G Y stop

CTGTTATATGGAATTTCAATATTAATTTGTTGATAGTGAACCTGATGAGATATTCATTATTATAATGT

GTCATATAGTACGATTCGTTATTGCTGGTTATGAATACATTTGTAATGAAAAGATTAACTTTAATCTATA

CAATTATACGTTAGCTTTTATTATAAGGAATAGCCATAATATAACAGCTTAGATTTTAAATGCAGC

ATTAACGTTAATTTTGATAAACGTAACGTTAATGGATAATCATCTGTTTACAAATAGTGTATGACATAA

TTAAGTAATTAACCTACGGAGGCTCTTATGATAGATCGTAAAATTTATATACCACAAGTAGATGAAATG sppT

M I D R K I Y I P Q V D E M Transportador

ABC

GATTGTGGCGTAGCAGCCTTAGCGATGATTCTTAAACATTATGGTTCTTCAGCTTCGCTGGCTTATTTAC

D C G V A L L A M I L K H Y G S S A S L A Y L R

GTAATGAGGCTAAAACCTGATTTAGAAGGAACAACGGCGCTTGACTAGTGAAGACAGCTGAGAATTTAGG

N E A K T D L E G T T A L G L V K T A E N L G

TTTTGAAACGAAGGCGATTAAGCTGATATGAGTTTGTGTTGAAGTCGCAGATTTACCATTTCTTTTATT

F E T K A I Q A D M S L F E V A D L P F P F I

GCACATGTTCTAAAAATGGCGAGCTATTACATTATTATGTTGTACTAGGGATAAAAAAAGATGCCATTA

A H V L K N G E L L H Y Y V V L G I K K D A I I

TAATCGCCGATCCTGATCCAACAGTGGGCATCGCTAAGATGACGCAATCACAGTTTAAATCGGAATGGAC

I A D P D P T V G I A K M T Q S Q F K S E W T

GGGCGTTGCATTATTTATTGCTCCAAAACCGAGCTATCAACCAGTTAAGCAGCAAAACAAAAGCGAGTTTA

G V A L F I A P K P S Y Q P V K Q Q T K A S L

TTTTCATTTGTTCCAACCTTTGATGCAGCAAAAGCGATTGGTAATTAATATTACTTTGGCGGCGCTACTCA

F S F V P T L M Q Q K R L V I N I T L A A L L I

TAACCATTATTAGTATTCTAGGATCTTATTCTTACAGACTGTCATTGATACCTATATCCCAATAACAT

T I I S I L G S Y F L Q T V I D T Y I P N N M

GCAGAGCACGCTGGCGATTGTTGCAATGGTTTAAATTATCTTTTATGGCTTCCAGTCTATCTTTACATAT

Q S T L A I V A I G L I I F Y G F Q S I F T Y

GCTCAAAATTTTTATGGCGGTTTTTAGGACAGCGTTATCAATTGAGATTATTTTAAAGTTACTTAAGAC

A Q N F L L A V L G Q R L S I E I I L S Y L R H

ATGTTTTTGAATTACCAATGCTTTTTTTTGAACAGTAAACAGGTTGAAATAATTTACAGATTTAATGA

Resultados

V F E L P M S F F A T R K T G E I I S R F N D
CGCGAATAAAATTATGATGCGCTAGCAAGCGCAATTATTCAATTTTTTTAGATATTACAGTCGTTGTT
.A N K I I D A L A S A I I S I F L D I T V V V
ATTATGGGGATTATCTGATCATTCAAAATACAACCTTTATCTGGTTAACCTTAGCAGTGAATCCAATCT
I M G I I L I I Q N T T L F W L T L A V I P I Y
ATATGCCCCTGATTACTTTTATTGCAAAACCTTTTGAAAAATTAATCAAAAGGAAATGGAAAGTAATGC
I A V I T L F A K P F E K L N Q K E M E S N A
AGTATTGAATTCGGCGATCATTGAAGATTTACATGGCATTGAAACGATTAAGCGTTAACTAGTGAAGT
V L N S A I I E D L H G I E T I K A L T S E S
GAACGATATCAAAAATAGATACAGCATTGTGTGATTATCTGAAGAAGAGTTTTGACTATGCGCAGATTGT
E R Y Q K I D T A F V D Y L K K S F D Y r r l stop
AAAAATTAAGTTGAACATTTAAGTGACAGAAAAACCCATCAAGGCTTTTAAATGGTGTACCACACAATC
CATTGAAAGAAGGACCTTGTATGAGCACCCTATTTTATCATTCCAGAACCGTGTGTGATTGAAACGCT IS30
Transposasa

M S T T I L S F Q N R V V I E T L (284 aa)
TCATAATGAAGGACGTTCCCTGCGATACATCGCTAACTACTTAGGCTTTAGTAAGACCACCATCTTTAAC
H N E G R S L R Y I A N Y L G F S K T T I F N
GAACGATATCAAAAATAGATACAGCATTGTGTGATTATCTGAAGAAGAGTTTTGACTATGCGCAGATTGT
E L H R L N S E Y Q A G L A Q T D F E R K V S Q
AACGGGGGGGGAAGTCTTCGCTCATAAAACCTTAAACACTTGATCGAGGAAAAGATTCAAGTCCAGAA
R G R K S S L T K N L K H L I E E K I Q V Q K
GTGGTCCCCTGAACAAGTTGCCATGTGGTGGGGATTGCCTACAAGACGGTCTATAACTGGATTGATCAA
W S P E Q V A H V V G I A Y K T V Y N W I D Q
GGATGGCTTGATATACAGTTGCCCGATTTGCCCTGATCATGGAATTCGTCTCATCGTCTAAAGAAAAGC
G W L D I Q L P D L P D H G I R R H R A K E K R
GTGGTACGTTCAATCACGGCCCGCTCCATTGAGGAGCGGCCCTATAAAGTCGAAACTCGCCAGGAATCGG
G T F N H G R S I E E R P H K V E T R Q E F G
CCACTTTGAAGCTGATACCGTACTTTCTGGTAAACGTAAGGTCAGCTGTGGCTACTTTTGTGGAGCGT
H F E A D T V L S G K R K G Q A V A T F V E R
AAGAGTCGCTGACAAATGTTAAACGGCTCCATGGTTCGCGACAGTCAGTCCATGACTCAAGCCGTAAGT
K S R L T I V K R L H G R D S Q S M T Q A V L E
AACTAGCTAGTCAACTTCAAGACAAGCTCAAGACGCTTACCGTAGATCATGGTAAAGAGTTCGCTAACTA
L A S Q L Q D K L K T L T V D H G K E F A N Y
TCAGACAATTGAACGCGCAAGTTACAGGTTTATTTTCCCATGCCTATTACCCGCAATGAAAGAGGC
Q T I E R R T G T Q V Y F A H A Y S P H E R G
AGTATGAGAACCGTAACCGAGTTTTGCGGCGCTTTATTTCCAAAGGCCAAGCCATTGAAGAACAAGT
S N E N R N R V L R R F I P K G Q A I E E L S D
ATCACCATTGGTTCAAATTTGGTATTGTAATTCACGGCCACTAAATGCTCTAATTGGCATAACACC
H Q L V Q I N W Y L N S R P L K C L N W H T P
AATCGAGATCTTCTGCTTAATTTACGTCAATTAATTCGTTCAAGTATTCTTGAATCTGCCCTATG
I E I F L L N L R H stop

TAAAAGCTG ΔspT
V K A D
ATACATTGCAACAAGCAATTAAGTTGTTTGTCCAATTAGGGCTGAATGTCTTTGTGCTGTGGGTAGGCGC
T L Q Q A I K L F V Q L G L N V F V L W V G A
TATTTTAGTCACGCATAACGAGTTATCAATTGGGCAATTGATGACCTACAATGCCTTGTGGCGTATTTT
.I L V T H N E L S I G Q L M T Y N A L L A Y F
GTAATCCGTTACAGAATATCATCAATTTACAGACTAAGTTACAGAGCGGAGGGTAGCCAATAATCGGT
V N P L Q N I I N L Q T K L Q S A R V A N N R L
TGAATGAAGTTTATCTGGTTGATTCTGAGTTCAAGACAGAACGACCAATTAATCCGAGTCACAGTTGGT
N E V Y L V D S E F K T E R P I K S E S Q L V
AGGCCAATTGAGTTACAAAATGTGAGTACCAATATGGTTATGGGCAGAGAGTGCCTGAATCGATTAGT
G P I E L Q N V S Q Y G Y G Q R V L E S I S
TTAAAGATTGAGCCGAATGAAAAATTAACAATTTGGGCATGAGCGGTTCCGGGAAATCAACATTGGTTA
L K I E P N E K L T I V G M S G S G K S T L V K
AGTTACTCGTTAATTTTTTTGAACCAACGGAGGGAAAGGTTCTTTTAAATCAACAAGATACACAGACAAT
L L V N F F E P T E G K V L F N Q Q D T Q T I
TGATAAAAAGACATTGCGGCAGTTGTAACTATATTGCACAGACACCGTACATTTCTCAGGAAGTATT
D K K T L R Q F V N Y I A Q T P Y I F S G S I
TGGGATAATCTTAAGTTAGTAAATCGCCAGGAATCACACAAGCGGACATCATGCATGCGTGTGAGCTAG
W D N L K L G N R P G I T Q A A D I M H A C E L A
CAGAGATAAAGAATGATATTGAAAAATGCCGCTCCAATTTGAAACATTATTGGATGAAGATGGAACAC
E I K N D I E K M P L Q F E T L L D E D G N T
ATTGTCAGGTGGTCAAAAACAGCGATTAACAATTCGCGGAGCACTATTATCACCAGCTCGGGTACTAATT
L S G G Q K Q R L T I A R A L L S P A R V L I
TTTGATGAGTCTACTAGTGGTTAGATACGATAACAGAGAGGGGCTATTAGTTGATCATCTAATGGCGTTAG
F D E S T S G L D T I T E G L L V D H L M A L E
AAGAAAGAACAATCATTTTCATAGCGCATCGTTTACGATTGCTAAGAAAACGAACAATATCTTGTGTTT
E R T I I F I A H R L A I A K K T N N I L V L

Resultados

AGAAAATGGTAGTGTGTTGAAACTGGGACACTTGTATGCGTTGGTGGATACACAAGGGCGATATTACCAA
E N G S V V E T G T D A L V D T Q G R Y Y Q
TTGCTCAATCATTAGTGGGGGATTAAGTATGGATAAAGAGTTTCTGGAGAGCAGTGAGCTTTATAGTGC *sppE*
Proteína
L L N H stop M D K E F L E S S E I Y S A *Accesoria*
GCGGTTTAAAAATTTTCAACACTATTAATTTATGCCAATTGCAGTTCTACTTTGTCTCGTATGCATCTTT 5910..7286
.R F K N F S T L L I M P I A V L L C L V C I F
TCTTTTTTTGGTAAACGAGAAATTACGATTGAAGGTCAAGGTGATTTAACGACGAATAAACAGATTCCAA
S F F G K R E I T I E G Q G D L T T N K Q I P I
TATTACAAGCCTCTACTAATAGTGTATTAAGCAAATTTTAAAAAGAAAGTTTGTCAAGAAAGG
L Q A S T N S V L K Q N Y L K E G K F V K K G
GCAGACTTTGCTTGTGTATCAAATACTAAAAATCAGAATCAGAAACGGCTATTAGAAAAACAACAGGAT
Q T L L V Y Q N T K N Q N Q K R L L E K Q Q D
AATCTGAGTTATCAGATTACGAGTTTGGAAACATTGAAAGCTAGCATTTCGAGTAATCAAGACCAATTTG
N L S Y F I T S L E T L K A S I R S N Q D Q F E
AGAATAATGATCAGTTTGGTTACAGAGATTATTACGAGGTTATCTTGACCAAAGACAAGTTTATTGAT
N N D Q F G Y R D L L R G Y L D Q R Q V Y L I
TGAAAATCAGATGGTGACAGATAAAGCAGCGACAAGTACAACAAACAGACATTGACAGCGATTATG
E N Q M V T D K A A T S T T K Q Q T L T A I M
GATAAGACAATTCACAGAGATCAAAACAAATCTTGACGCGTATCAAGCTTTATATCAGTCAATCAAAACTA
D K T I Q R D Q T N L D A Y Q A L Y Q S I K T N
ACAAGGTATATCAAGTACTGGTAAATATAATTTCTTTACGAGAATCAAAACGAAAGTAAAAGCGAT
K V Y S T N S V L E N Y L Y E N Y Q T K V K A M
GTCTGATAAAAATGAACAAAGTGGTTTAAAAGCAGATATTTAGCAACGACGCAACAAACAAATGATAGT
S D K N E Q S G L K A D I L A T T Q Q Q I D S
TTACAAGGTAGTATAGCGAATGCCGAAAATCAAAAAGTTTCCATAAAAAGAAATTTGACGATAGCCGGTTA
L Q G S I A N A E N Q K V S I K E F D D S R F N
ATACGAATACTAATAATGAAAAGTTAGCATTATTAGAAGCACAGCAAAACCAATCAGCAAATGAACAGCT
T N T N N E K L A L L E A Q Q T Q S A N E Q L
TGTAAGAGTAAACAATCACTTGTGCAAAATACAAACAACCTTAAAACAATAACGAGTGATTCTAAGGAA
V K A K Q S T L V E I Q T T L K Q I T S D S K E
TACGTGGTTAAAGCACCTAAAGACGGAGTTCTACATGTTGATGATCACTATCAAGGGATTAGTATACGA
Y V V K A P K D G V L H V D D H Y Q G I K Y T S
GTGCTGTACCAGTATGGCGCGGATTTATCCGGTATTAGCTGATCAGAAGAGATTAAAAATAGAAGCGCT
A G T S I M A N A E N Q V L A D Q K R L K I E A L
TATTCCAGTTGATGATATTTTCATCAGTTAAAATTTGACAAAGACTACGTTTGAATAATACGCGGAATGTT
I P V D D I S S V K I G Q R L R L K I T R N V
CCAAGACCAATTAATTAAGGAAAGATCAATCAAAATAGTGTTCGCCTACTGTTATTAACCAGGGGA
P R P I I I E G K I N Q I S V S P T V I N Q G S
GTTACTACTATTA CAGTCTGGCAACTTTCTAATAATAATAGGAAATTACTGCATTATGGAATGAC
Y Y T I G L A T I S N N N R K L L H Y G M T
CGGTAATAATAGCAATTAATCACTGGTAAGACAACATTTCTCAACTATTACAAGATAAGTTGTTGAATAGA
G K I A I I T G K T T F F N Y Y K D K L L N R
AATTAGGTGTTGATTACCATATAAATTATGAGAGTTTCTTGGTTTTAAAATTAATTTGAAAATTTGATATT
N stop
AGCGTTTAAACAGTTAAATTAACGTTAATAATTTTTTTTGTCTTTAAATAGGGATTGAAGCATAATGGT
GTTATAGCGTACTTAGCTGGCCA T CATATATGTATTCTATAAAAATCTATTACAAGGAGATTTAGATAT *sppQ*
Sakacina Q
M
GCAAAAATACAAAAGAACTAAGCGTAGTAGAATTACAACAAATCTTGGAGGAAAACGTGCTAGCTTTGGT
Q N T K E L S V V E L Q Q I L G G K R A S F G
AAATGTGTAGTTGGTGTCTGGGGAGCTGGTGCAGCTGGTTTAGGAGCCGGAGTCAGTGGTGGTCTCTGGG
K C V V G A W G A G A A G L G A G V S G G L W G
GAATGGCTGCTGGTGGTATCG A CCGGAGAATTAGCTTACATGGGGGCTAACGGGTGTCTCTAAACAAGCGT *spiQ*
Inmunidad
M A A G G I D G E L A Y M G A N G C L stop *Sakacina Q*
V S L N K R
GTTGCTTATTGGCTAACCCAACTACGAATTTGTTATTGATAACCATATTATTGCTACCCGCTATTCTGT
V A Y W L T Q T T N L L I T I L L L P A I L D
ATCAAGAAATCATGCAATTTCTATCTTTAATTTTAGTAGCAATTTAATAACGTTGTCGTTATATT
Q E Y H A I F Y L L I L V A I I N N V V V I F
CTTTTTAAGGCGTCAACTTAAATAGGCATTATTAATATTGACTAACAGAATAGAAGTTGTTATCTAAGC
F L R R Q L K stop
CATGGCGATTGAATATTGACGTTTCATCGAAAAGTGAACGTTAATATTTTTTTGGCTTAAATTTAG
GTTTTGCGTCATAATGGCTGTGTAAGGAGTTGGGGATA TTGACAGAGAGTGAACAAACATTATTCGATT *superfamilia*
M T E S E Q T L F D L *enta*
Inmunidad

Resultados

```

TAATTGATAAAGCCTACAATGAGGATTTAACGAATCAACCACAACCGTACAAAATAATTTATTGAAAGC
I D K A Y N E D L T N Q P Q P Y K T N L L K A
TGCTCAGCAGTTGGTTGATGGGACGGACGAATCAACCTTTGTTTAGGGATCTATAACAGTTACCATGAA
A Q Q L V D G T D E F N V C L G I Y N S Y H E
AACTATATCGTCCCCTGACATTTGCCGAGGAAAAATCGTAATCTATACGGCTATATCCATCAGAAATTA
N Y I V P L T L P Q E N R N L Y G Y I H Q K L I
TAAAACCTTGATCGAAAAAGACTGCGCGATTTTAATTTGGGCTACGGTTTAATTGCTAGCTCGATAACCTT
K L D R K R L R D F N L G Y G L I A S S I T F
TGGTGGTTTTTCATTAATGGGGAGTGAGCAAATATGAAGTGGTATGCAGGTGGACAGGAACGGGGGAAT
G G F H stop M K W Y A G G Q E R G N
CAAGCAATTACGATAATCAGTACGTTATTAAGTACTGAAACAAGATGACCAACGGTACCATTGCAGT
spiA
Q A I T I I S T L L T D L K Q D D Q T V P L Q S
AACAGCTATCAAGCTGAACCTGAAGCACAAACAACAGCCGTGCCATTCATTTTAAGCCGGATGAACATTG
top
CAATTGCGAATGTGGTTCAAAAAGAAGGCTTGCAGCTATCAGCCAGTCAACAAGCTAAGTTAAAAGAAAT
GACGGCGTTGTCGACGATTAGATATGGTTATTAGTGAAAAAGAGCGTAACGTTTATATAGCGTTACGCTC
TTTTTTGAGCTAAGCCGATAGTTTCGCTAAAAAGTTTACCCTGCTTTTGTGCGACAGGGTTGATAACGCTA
CGCATCGAGTTGATAAATCCGGTTTGAGTCAAAATTACTTTGATTAAATTTGGTGTGAAGACCATTTTT

```

Figura 20. Región homóloga entre las secuencias de los sistemas CRL705p/q y Lb674p/q. Las bases diferentes entre ambos sistemas se indican en rojo. Los aminoácidos en verde representan las mutaciones neutras y en celeste a los cambios en aminoácidos. En el extremo 5', la región en gris indica las secuencias identificadas solo en CRL705 p/q. La secuencia de aminoácidos de las proteínas comunes entre ambos sistemas se resaltan en amarillo y el nombre de la proteína se indica a la derecha de la figura. En fucsia, la región duplicada debido a la inserción de la IS. Las bases subrayadas indican regiones terminadoras de la transcripción y "XX", en rojo, bases extras que generan un *frameshift*

Sistemas sakacinas T/X y enterocina_NKR_5_3D

El segundo sistema de bacteriocinas detectado en el genoma de la cepa CRL705 fue el sistema de las sakacinas X y T. La secuencia primaria de la enterocina_NKR_5_3D es idéntica al factor IP-TX, o péptido inductor de las sakacinas T y X, por lo que se lo incluye en el presente análisis. Sakacina T y sakacina X son bacteriocinas de la clase IIb (bacteriocina de dos componentes) y IIa, respectivamente. Estas fueron identificadas y caracterizadas originalmente en la cepa *Lb. sakei* 5. Los genes estructurales y de regulación descritos para estas bacteriocinas forman parte del *locus* sakacina TX el cual consiste en dos operones adyacentes pero orientados de manera divergente (Figura 21). El primer operón está compuesto por los genes *stxP*, *stxR*, *stxK* y *stxT*, los cuales codifican para un péptido inductor (IP-TX), y proteínas involucradas en la regulación (StxK y StxR) y en la secreción (StxT) de estas bacteriocinas. El segundo operón está compuesto por los genes estructurales y de inmunidad para la sakacina T (SakT_α/SakT_β y SakI_T, respectivamente) y para la sakacina X (SakX y SakI_X, respectivamente). La producción de ambas sakacinas es inducida simultáneamente por IP-TX (StxP; también descrito como

Resultados

enterocina_NKR_5_3D con actividad antilisteria). Sin embargo, no identificamos una secuencia que codificara para una proteína accesoria del sistema transportador StxT en el *locus* sakacina TX; posiblemente esta proteína no se requiere para el procesamiento y transporte de estas sakacinas (Vaughan y col; 2003, 2004).



Figura 21. Estructura del *locus* sakacina TX de la cepa *Lb. sakei* 5. Esquema de la organización del fragmento Lb5t/x que contiene los operones de las sakacinas SakT y SakX en *Lb. sakei* 5. Se indica la posición de los promotores *PstxT* y *Psak*. Las flechas indican el sentido de la expresión de los genes

La secuencia (17.234 nt) de los determinantes genéticos del *locus* sakacina TX de *Lb. sakei* 5 fue incorporada en el GenBank con el número de acceso AY206863. Para facilitar nuestros estudios comparativos, procedimos a eliminar de la misma 2.737 nt de su extremo 5' y 6.533 nt de su extremo 3', por ser secuencias nucleotídicas extras que no se corresponden con los genes del sistema sakacina TX, generando así el fragmento Ls5t/x de 8.071 nt. Para identificar los *contigs* de *Lb. curvatus* CRL705 que contienen al sistema TX, procedimos a comparar con el programa Blastn2Seq la secuencia Ls5t/x con el genoma de CRL705. Como se muestra en la Figura 22, los *contigs* identificados fueron cinco: 47, 101, 123, 88rc, y 23, los cuales se mencionan de acuerdo a la localización encontrada por homología. Es importante resaltar que en el *contig*00088rc se detectó una secuencia IS ausente en Ls5x/t.

Resultados

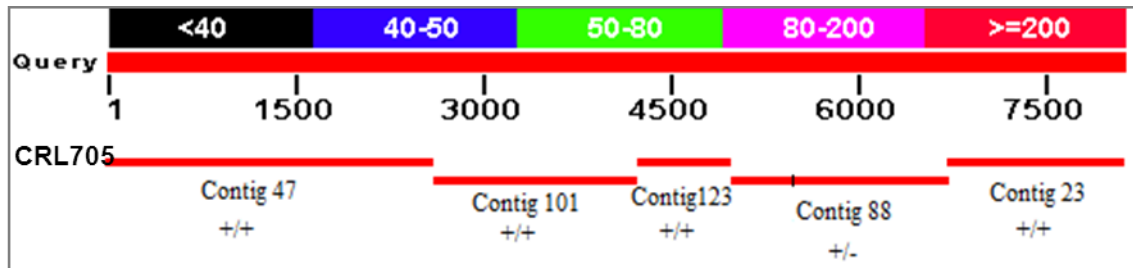


Figura 22. Contigs de la cepa *Lb. curvatus* CRL705 homólogos a la secuencia Ls5t/x (marcada como *Query*) generados mediante el programa Blastn2Seq. +/- indica que la secuencia del *contig* en la cepa CRL705 es complementaria reversa de la secuencia presente en Ls5t/x. ++, indica que la secuencia del *contig* en la cepa CRL705 es idéntica a la secuencia presente en Ls5t/x

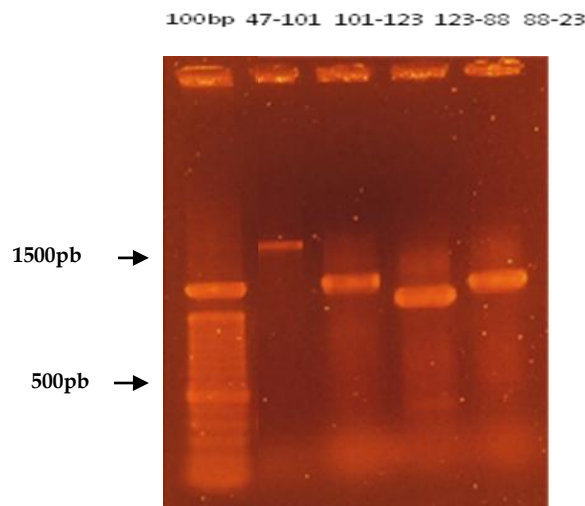


Figura 23. Productos de amplificación obtenidos (“tamaño observado” en Tabla 7) con los cebadores 47f-101r, 101f-123r, y 123f-88r 88f-23r (Tabla 22)

Tabla 7. Tamaño de los amplicones esperados y observados

Nombre fragmento	Tamaño esperado	Tamaño observado
TXContig47-101	951 pb	>1500 pb
TXContig101-123	781 pb	1500 pb
TXContig123-88	491 pb	1000 pb
TXContig88-23	881 pb	1500 pb

Resultados

Para confirmar que los cinco contigs fueran contiguos en la secuencia del genoma de CRL705, se realizaron reacciones de PCR usando cebadores específicos a los fragmentos mencionados. Como se muestra en la Figura 23 y en la Tabla 7, ninguno de los 4 fragmentos amplificados mediante PCR fue del tamaño esperado, sino 600-700 bp mayores, lo que sugiere que 4 fragmentos extra de ADN se encuentran entre los mismos (la secuencia nucleotídica de los fragmentos extra de ADN no fue determinada).

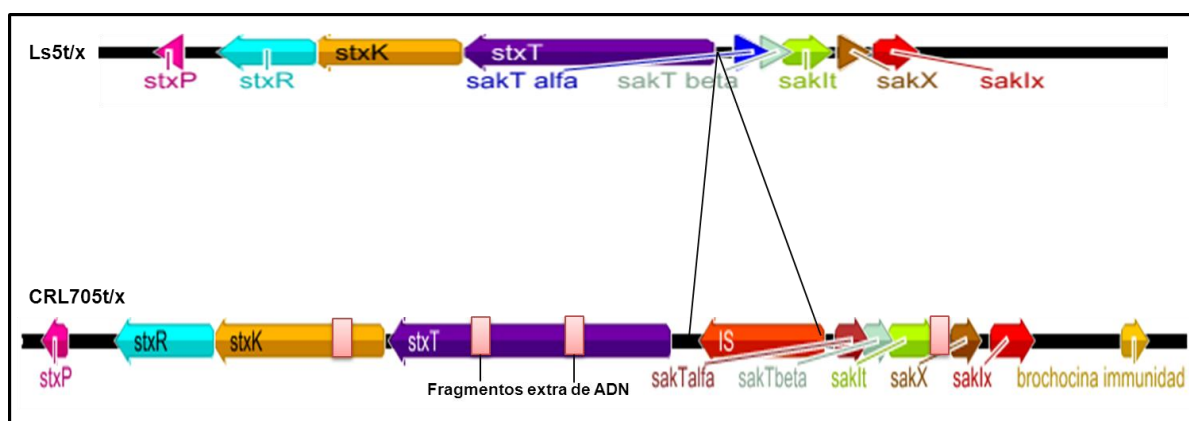


Figura 24. Esquema comparativo de los operones sakacinas X/T entre las cepas CRL705 y *Lb. sakei* 5. La principal diferencia entre ambos sistemas es la presencia de una secuencia *IS*, inserta entre los promotores divergentes de los genes *sakT* y *sakT alfa*, y de cuatro fragmentos extras de ADN no identificados (rosa)

Posteriormente, procedimos a unir las secuencias de los 5 contigs: 47-101-123-88rc-23, lo que dio lugar al fragmento CRL705t/x de 43.747 bp. Así, observamos que en una región de 9.170 nt de dicho fragmento (Figuras 24 y 25; bases 11.061 a 20.230), se localizaron los operones de las sakacinas SakX y SakT (y enterocina_NKR_5_3D) de la cepa CRL705. Como muestra la Tabla 8 y Figura 24, el orden de los genes del sistema de sakacina XT en *Lb. curvatus* CRL705 es *stxIP*, *stxR*, *stxK*, *sakT alfa*, *sakT beta*, *sakIt*, *sakX*, *sakIx* y *bcrI-like*, similar a lo descrito en la cepa *Lb. sakei* 5.

Las secuencias de ambos sistemas comparten una identidad mayor al 99% (Tabla 8); las principales diferencias observadas en esta región son:

- i) 6 cambios de bases localizados en una región de 6.295 nt: 2 de ellos en la región intergénica entre *sakIx* y el gen *bcrI-like Imm*, y 4 en los genes *stxR* (2), *stxK*, y *stxT*; estos cambios aparentemente no afectarían la función de las proteínas StxR, StxK, y StxT (Tabla 9; Figura 25)

Resultados

- ii) tres fragmentos extra de ADN detectados en el sistema sakacina XT de *Lb. curvatus* CRL705 presentes en la región interna de los genes *stxK* (1 fragmento) y *stxT* (2 fragmentos), lo que sugiere que las proteínas histidina quinasa (StxK) y el transportador ABC (StxT) serían inactivos en este sistema (Figuras 24 y 25). El cuarto fragmento extra de ADN fue localizado en la región intergénica *sakX* y *sakIx*, lo que sugiere que la proteína de inmunidad SakIx no se expresaría, ya que su transcripción y traducción está ligada a la transcripción y traducción de la proteína SakX (Figuras 24 y 25)

- iii) por último, una secuencia IS localizada en la región de promotores divergentes *PstxT* y *Psak*, promotores que controlan la expresión del gen *stxT* y de los genes del operón *sakTalfa/sakTbeta/sakIt/sakX/sakIx*, respectivamente (Figuras 24 y 25). Aparentemente, la expresión de StxT no estaría afectada por la inserción IS ya que las regiones de unión al regulador de respuesta StxR activo (StxR fosforilado), que induce la expresión de estos promotores, están intactas en el promotor *PstxT* (AATATACTTGTAT; TGTCCTGAAAT y TATCCTAAAGT) (Figura 25). Sin embargo, la IS sí afectaría la actividad del promotor *Psak*, ya que las secuencias de unión al regulador StxR fosforilado, ATTCAGTACA y ATCTTGAGACA, quedan ubicadas hacia la región 5' de la secuencia IS (Figura 25). Esto sugiere que los genes que codifican las proteínas SakTalfa, SakTbeta, SakIT, SakX, y SakIx serían inactivos y las mencionadas proteínas no se sintetizarían

En síntesis, como en el sistema PQ, se observa que el gen *stxT* (proteína de transporte ABC) es aparentemente no funcional. Los datos sugieren además que, debido a la inserción de IS en la región de promotores divergentes *PstxT* y *Psak*, los genes estructurales y de inmunidad de las sakacinas T y X no se expresarían; a menos que su expresión no esté ya controlada por el péptido inductor IP-TX sino que sean controlados por secuencias promotoras constitutivas aportadas por la IS, como se muestra en la Figura 25. En este caso, si no hubiera expresión de la sakacina X, el único candidato viable con actividad antilisteria del sistema sakacina T/X presente en *Lb. curvatus* CRL705 sería el péptido inductor IP-TX, conocido como enterocina_NKR_5_3D.

Resultados

Tabla 8. Identidad entre los componentes de los sistemas de sakacinas SakX y SakT y enterocina_NKR_5_3D de *Lb. curvatus* CRL705 y *Lb. sakei* 5

MLA (Marco de lectura abierto)	Gen	Proteína	Tamaño (aa)	Identidad con sistema T/X <i>Lb. sakei</i> (%) - Observaciones
11174..11311	<i>stxP</i>	Péptido inductor	45	100
11742..12422	<i>stxR</i>	regulador de respuesta	226	99
12502..13815	<i>stxK</i>	proteína histidín quinasa	437	100
13908-16079	<i>stxT</i>	Transportador ABC	723	99
16366..17289	<i>IS</i>	Secuencia de inserción	307	0
17420..17629	<i>sakT alpha</i>	SakT alpha	69	100
17643..17834	<i>sakT beta</i>	SakT beta	63	100
17856..18194	<i>sakTIM</i>	proteína de inmunidad SakT	112	100
18342..18527	<i>sakX</i>	sakacina X	61	100
18658..18951	<i>sakXIM</i>	Proteína de inmunidad SakacinaX	97	100

Tabla 9. Bases mutadas presentes en una región de 6.295 nt del fragmento CRL705t/x respecto a su secuencia homóloga del fragmento Ls5t/x

Posición	Base	Región	
		Ls5t/x → CRL705t/x	Aminoácido
			Ls5t/x → CRL705t/x
1012	C → T	<i>stxR</i>	V167I
1195	T → C	<i>stxR</i>	T106A
1818	A → G	<i>stxK</i>	sin cambio
3357	T → G	<i>stxT</i>	N577T
8205	G → A	IG* <i>sakIx-bcrI-like Imm</i>	
8396	T → C	IG <i>sakIx-bcrI-like Imm</i>	

*IG = region intergénica

Resultados

GACTATTCTCATCCGCATAGGAATTTTGGCGAGCAATGACAGCCCAATTGTAATTGAAAAATAATAATAC
TATTAGGGGTAAAAATTTTTCTTCTATTCTCTCTCCACTTCTATTTAAAAAAGTCCTTTATTGCATT
inductor

Péptido

TAATACATCCTGGGCGCATGAGGACCCGAGAAATGATATCAAATCCTCCAGGAGTTCCTCCTTTGATT
3D)

IP-TX (NKR-5-

TTTTCAATCTTCTTTTGGTAATGTTTTTCGATTGTCATCTGAACCCTCTCCTTCTATTGATGACA
TTAGTATATTGTTATCTTTGACTATTTAGTGACTTATATCCGAAATCAACAATTTATGCTTTGAAATGA
ATCCCTATTTGAGTTCAAAAAGGTGCTATTTTTATGATTTTTCTCAAAAAGATGATCCGCAATAGAAA
AAACTCAAGAGCGCAGGTTCTTGTAGTTTTTCTATCTATTACATTTAATGTTAAATCACAATTAGTTAT
TCAAATTTGAGAATATCTAAAGACACAAATAGATATTTGGATAATGTTCTAATTAAGGGACTTGGAAAT
AAACTCATGATAAAAAATACAAGAATAAATTTCAAGCCGCACTAAATTTGTTGCGGCATCATTTAGCTAA
ATTTGATGAGTATTCTGTCTATTGTTCTTCAATCGTTATATCATAGTACCTATTTACGAATTGAGCTT
TCAGTGCTATCTAAGGTTTTTCTTAAGATTTGTTTTTGGCAATGGGAACCTACAAGAATACTCTTCTG
GAAAGAAATCATTCTACTCTTATAATCTACAGAAATTAATTTTGGATTGATTAAAAACGACTTATG
CACACGAAGTAATTCAGGATATTCTTTTTCTAAATCATTCATCTTCCATAAAAATTCATACATCATGTTT
TCGCGGTATAATAAATTTTATGAGGCGTAA **H**CGACGTTTCTAAGAAATAAATCGAAGTAATATCCACTC
TAAAATTCCTTGACCAATCATAAAGGATAGATGACGTTTCTATTATCTACAAAATGTTAACTT
GTGGCGTCATCTAATACTATTCTATTTTCTCTTTTCTACTTTTGTCTCTTAAACAATAATAATCTAAC
GGTG **H**TATTTGTCGTTTCAACGTCCTCATTTGCCAATCTTGTATGAGAAGTGATAAAGACGATTTGAGCGA
ACTCGTTATCAGTTCTAATACGTTGTGCGACATCAATCCATCTAATATGTTTCCAAAGATCGATATCCAA
AAAGTATAAATCTTTGTTACCTGTTTTTGTATAAATACAAGAAATATCTCCCGGATCAGTCGTTGCT
AAAACCAATTCATATCATAAATCATTTGATCATGACCAAAATTCGATAAATGCTTGTAAATGAGACATCA
ATATTATGTCATCTTCGAGAGAATAAATGGTAATGTCATATTATTCCTCTTCTTATAGTTAGTGTAG
AAAACAAATCTCCTTGATTTGAATAATGTGCCAGATCAGCTTGTCTAGTTGACGTAAGGATATCCTGTGC
ATTGGATAAGCCTAGTCCCTGTTCTTTCCCTTTTTGCTAAACCCTACTTTTTTCATCTCTGATAAAGAA
Quinasa

sxtR
Regulador de
respuesta (RR)

GGCAGCTTACCAAGGAAAGAATTTCAATTGAAATCTCAATCGAATCGGTGGAATCAATGAACAATGTGT
TTATCTTTTTCTTCTGATCAATTTGCTGCTTCCACCGCATTTGTCGATTAAATATACCTAAGATTCC **H**AC
AAGTTTGATTTTCAATCCTGTTGATGTTTGTCTATTGGAATAAGACATTTCAAAAATTTACCTCAATGCCAGAT
TGTCTGCAATGGAATTAACCTTGTCTACCATCAAGGATTTTACGGAGTCTACTTTTAAAGTTGCTTAGTCTCTG
AAAAACGCATCACACTGTTATCTATCATCTGATGAGAATAATCGATCATCTTATTTAAATACCCTTCATC
GATCGCAGATTCATTTTGCAATGCTTGTGAGACCTAGTAGCATATTTTATAGTCATGGCGGAATTTACGC
AGTTCTGATAGTTTCTCTCAATGTCCGAGTATAGACTCGCATCATTTCCATCTGTTCTTTAAGGTTGC
TCAATTCAGTTTTTCTGATTTCTTTTTCAAAGTAAGATAAGATAAATACATCGTAACCGAGAATTTGAGT
AACTAAAAAATGATCATTTACGATTTGAAAAATGCCTAGTATTGTCATCTTCTTAACTTCTCCAAAC
AAATAGACAAACGTCAAAAATACTCCTAGTTGCATACAATACACTTTTTCTTCTCGGAAGGAAATGTAC
GTTTCACTAACCTTTGATTTTATTTGCAACGTAATGATGATTGACAGAATCCAATCAAATCCAATCAAAT
AACTACTAACCAAGGTTCTTCTGTTCAATACGTTAATTTGATTCGAG **H**TTAAAGATTCTAGATATAATGATA
GATGAAAAGAGTGGTACTATGCTATAAATCGTTAAGGAAAGCAAAGACCAATAAATCCTCGGTAATTTGA
101

stxK

Histidina

ADN extra
contigs 47-

CTTCTGTTCCCTTTTCGCCAAGACTTAAATCTTAGTATTACAATTAAGAGATCAGTGGCATTCCAGTCAA
AAGCGCATCTGTTACTGAAAGTAATGTGAGTGGAAAAAGGAATATAAGTAGAGCAAATAGAAATGATTTT
TTTTGAATATTTGTTAGTAGCCCAATCATGAATAGAAACAGCAACAGATCAAATAATCTTTAAAAAAAT
ACGAGAAAGAAATCTACAAAAACCATATAAACACTTCCCTATTATTATAGATATCTAATTAACAAGAAT
CAATAAAAAATAGGAGAATGTTTATAGTGCTTTATATTGTTCTTTTTTTAAGCGATTGCCATCATTTCCC
AAAGTTCTTCAATAGTCCCATGTTAGTCTTTAATTTGGGATGAGTTCCAGATTGACAAAGCTGCCCTTT
ATCTAAGACAAAATACCTGATCACAACTTTTTGCAATGGATAAGTGTGTTGGCGATGAACAGAAATGTTTTA
TTCTTAAGTTTCAATTTTGAATATTGATGCTGATCGAGTATCTAAACGCTAGTTATTTCAT
CGAGGATGAGAATTTCTGAGTTCTTAAACAACGCTCTCGCCAGAGCTAAACGCTGTTTCTGACCCTGA
AAGATTGCTGGCACCTTCTTCAATAGGAGACTTGAATTTAAGGGGAGTCTTCAATGATTTCTTTTATC
TGAGCCATTTACATGCCCCAAGAATCTGTTCTCCGTTGGTTGATAGTCTATACAAAAATTAAG **H**TTT
CAAAGATGCTGCCACTAAAAAAGAAGGTTTCTTGTGATACATACCAATCTTATTTCTCAAATCAATTTCT
TGGAAATATCTTGAATAGATTTTCTTGAATTTCTATTTTCACTTTTTGAGCAGTATAGAAGTTCCAGAAC
AATTTAGCTAAAGTCTGATTTTCTGATCCACTATTCCAACGATTTGCTACTTTCTGATTTGATTTAATG
AAAAGAAAGATCATTTAGAACGTTTTTCTGCGAATCCATATGCAAAAGATAAGTGCTTTACTTTCGATTAA
TGGCTTTTTTCGTAACAATCAACATTATCCATTTGTTGACTGGTTGGTTGCCCATCAATTTCTCGATCC
AGAAAGAAAATTTCAATTTAGTTCGATCGTTAGCTACTTTAGCCGTTTGAATCTTTACTGAAAGATTAAATGA
TATTTGCAAAGGTTGTGAAGAAAGACATCAGGGCATTATAAGTAATCAATTTGTTCAATAGACAAGCT
CCCTTTCGATTACTAAGTACGTACCTACCCACAATAACGTAGTAGAACCTAATACTTTGAAAGTCCGTTTTT
AGGTTTCGATTGACGTTTATCAAGATTCGCATTTTTGAATGACTTATCCATCATCTCTTTGAATTGACTCT
GAACCTTCTCAAAATCTTGTCTGTGCGATTAAGGACTTTATTGCTCTATCCCTTTCAAACCTTTCAAT
AATCTGAGAATTGACTACAGCAGTATCCATTTGCTCTTCAATTTGTTGATCAAAT **H**GGTTTCATAAAT
AGAAAGACGATTAAGCCGTAATTTGGAAGTGTACTGAAACTAATTTAAAAACAAAAGACGATTTTGTAAAA
123

stxT
Transportador
ABC

ADN extra
contigs 101-

ACAAAGAAGTTCCAATAAATAAACCATTTGACACATCTAAAAATAAGGATAGTGTGGCATTCCGCAAGGC
ATCGATAAATTTATTTGGCATCTAAAAATCTTGGACAATCTCCCTGATTTTCTTGTGAAAAGAAGTTC
AATGGTAAATTTCAAACATCTTGAATACCTCAGCATAATCTGAAGAACTCAGCTGTTGCTTAACTTAACTTA
TTAAAGATACTGTTTAAAAATTTGGAATAGTGTGTTGATCACATACATTGATAAAGACCAATTTGAGAT
TATTTCTAATAAGTTCAAGATCTTGGGGAACAATTCGATCAATTATCACTTGAATAATAAAGAACCT

Resultados



Figura 25. Región homóloga entre las secuencias de los sistemas CRL705x/t y Ls5x/t. Las bases diferentes entre ambos sistemas se indican en rojo. Las secuencias de

Resultados

(Figura 25 cont. leyenda) nucleótidos subrayados indican los MLA de las proteínas comunes, indicadas en el margen derecho (Figura 25 continuación) de la figura. En fucsia, la región duplicada debido a la inserción de la IS. Se indican en gris+celeste las regiones donde se ubican los fragmentos extra de ADN. Las secuencias en negritas identifican las regiones, en los promotores *PstxT* y *Psak*, reconocidas por regulador de respuesta StxR; y en amarillo, la secuencia promotora de la IS

Análisis comparativo de las proteínas de transporte ABC de los sistemas de sakacinas P/Q y T/X de Lb. curvatus CRL705 y Lb. sakei Lb674, y del sistema lactocina Lac705 del plásmido pRC18

Las bacteriocinas y los factores de inducción producidos por las BAL se sintetizan, en general, como prepéptidos con una secuencia amino terminal líder que es reconocida y procesada por un sistema dedicado al transporte y secreción de las bacteriocinas y los factores de inducción activos al medio de cultivo. Estos sistemas, formados por una proteína de transporte ABC y su proteína accesoria, utilizan la unión e hidrólisis de ATP para activar la translocación de una amplia variedad de sustratos a través de la membrana celular, sustratos que van desde moléculas simples hasta macromoléculas.

Un transportador ABC está organizado en varios dominios: un dominio amino terminal, el cual reconoce, une e hidroliza el péptido líder de la bacteriocina; dominios transmembrana (TMDs), que proporcionan un paso para el sustrato; y dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBDs), los cuales unen e hidrolizan moléculas de ATP liberando la energía necesaria para la translocación del sustrato. En los NBDs, el sitio de unión a ATP está formado por dos secuencias conservadas, los motivos Walker A (o P-loop, que une los fosfatos de ATP y ADP) y Walker B (sitio de unión al ion Mg^{2+}); y tres motivos: un loop de histidina (postulado para polarizar la molécula de agua necesaria para la hidrólisis), un motivo conservado LSGGQ (específico de los transportes ABC) y un motivo Q que interactúa con grupos fosfatos a través de un enlace de agua (<http://pfam.xfam.org/family/PF00005>). Por otra parte, la función específica y dominios presentes en la proteína accesoria no han sido aún definidos.

Resultados

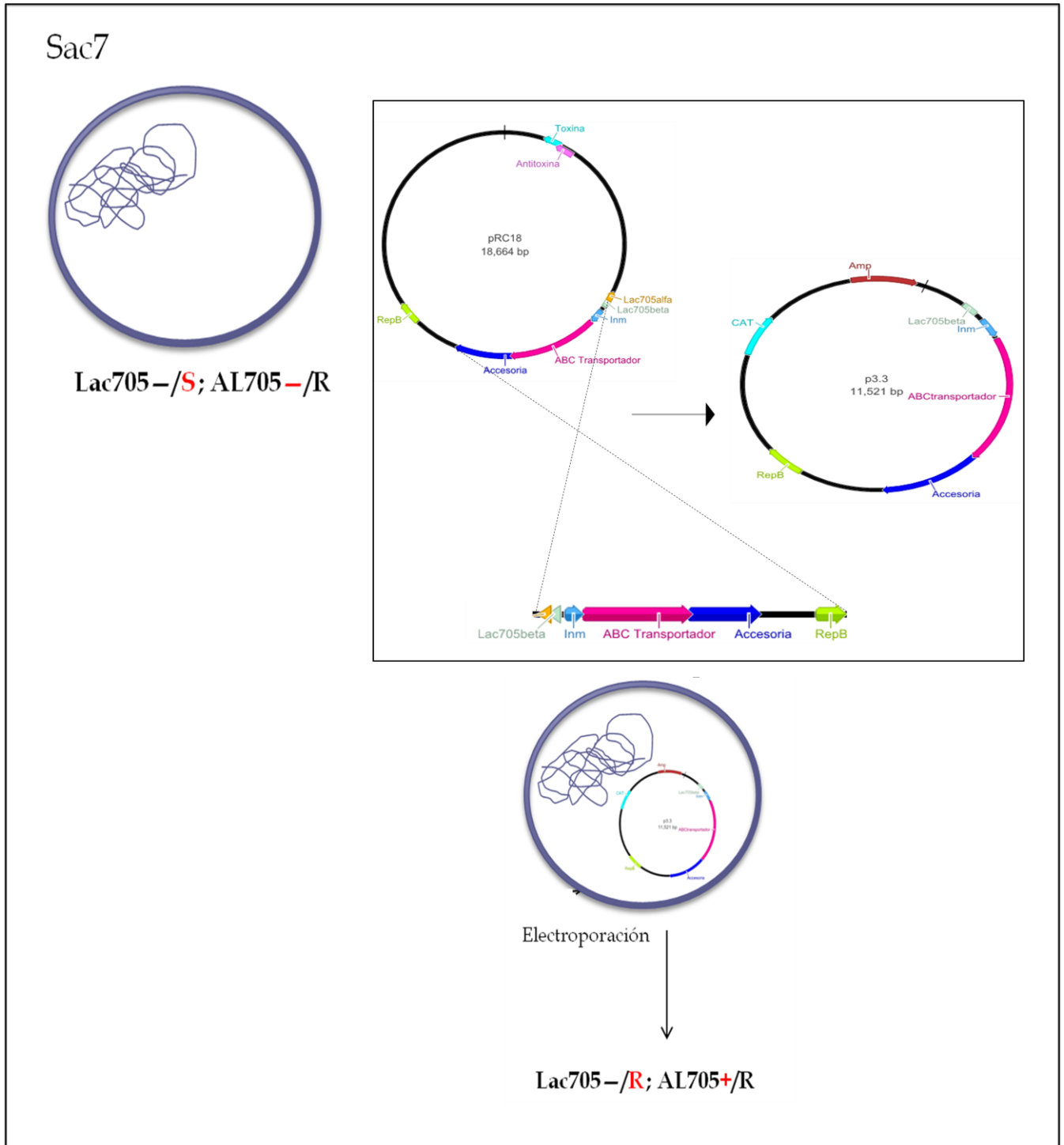


Figura 26. Construcción del plásmido p3.3 y transformación de la cepa Sac7 no productora y sensible a Lac705; y no productora y resistente a AL705. La cepa transformada recupera el fenotipo productor AL705

Resultados

Durante su trabajo de Tesis Doctoral, Cuozzo (2002) demostró que la proteína de transporte ABC del sistema lactocina Lac705 complementa la actividad antilisteria en *Lb. curvatus* CRL705. Así se demostró que la cepa Sac7, no productora de AL705, recupera su fenotipo productor cuando es transformada con el plásmido p3.3 que porta el gen *abc* del sistema Lac705 (Figura 26). A su vez, el análisis del grupo de genes de las sakacinas P/Q y T/X presentado previamente sugiere que los transportadores ABC de estos sistemas son inactivos en *Lb. curvatus* CRL705, debido a la presencia de una secuencia de inserción y de dos fragmentos extra no identificados de ADN, respectivamente.

A continuación presentamos los resultados de un estudio comparativo de las proteínas ABC de los sistemas de lactocina Lac705 y de las sakacinas P/Q y X/T de *Lb. sakei*. Este estudio fue realizado con el propósito de definir las características comunes de estas proteínas que nos permitan anticipar cuál es el sistema AL705 de *Lb. curvatus* CRL705 que se complementa con la proteína ABC de pRC18.

En la Figura 27, se muestra el análisis comparativo entre las proteínas ABC de las sakacinas P/Q de *Lb. sakei* Lb674 y la del sistema Lac705 presente en pRC18. Las secuencias primarias de las proteínas fueron alineadas mediante el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los resultados indican que ambas proteínas, de 718 aa cada una, poseen una identidad del 78% (562/718 aa), porcentaje que se eleva a un 89% cuando se consideran las sustituciones conservadas (645/718). Debido a la inserción de la secuencia IS, la proteína de transporte ABC del sistema sakacina P/Q de CRL705 es una proteína troncada de 387 aa. Los 384 aa de esta región amino terminal son 100% idénticos a las proteínas ABC de las cepas CRL705 y Lb674, mientras que con la proteína ABC del plásmido pRC18 alcanza el 82% de identidad (314/384; positivos 352/384 = 91%). Como se observa en la Figura 28, la proteína ABC de la cepa CRL705 carece del dominio *ABC_ATPase superfamily*: el NBD necesario para la unión e hidrólisis de ATP está ausente, por lo que este sistema no sería funcional.

Resultados

pRC18	MFQMKNYIAQVDEMDCGVAALAMILKHYGSTYSLAYLRQQARTNLEGTALGLLKTAE TL 60
Lb674	MIDPKIYIPQVDEMDCGVAALAMILKHYGSSASLAYLRNEARTDLEGTALGLVKTAE NL 60
	*: : * **_*****: *****: *****: *****: *****: *
pRC18	DFETKALQADMSLFDIKDLPLPFIAHVVKPGGILHYYVVLAVKKGCIIIADPPDPTVKITK 120
Lb674	GFETKAIQADMSLFEVADLPFPFIAHVLKNGCELLHYYVVLGIKKDALLIADPPDPTVGI AK 120
	. *****: *****: *****: *****: * * : *****: *****: *****: *****: *
pRC18	MNWNQFSEWESGVALFIAPKTNYPVNEANSASLWSFVPTLMKQQRIVINITIAALLITI 180
Lb674	MTQSQFKSEWTCGVALFIAPKPSYQPVKQQTKASLFSFVPTLMQKRLVINITLAALLITI 180
	*. _** : ** : *****: * : * : _** : *****: * : * : *****: *****
pRC18	ISILGSYFLQTVIDTYIPNMNQSTLTIVALGLLVFVYLFQAIPTYAQNFLLMVLGQRLSIE 240
Lb674	ISILGSYFLQTVIDTYIPNMNQSTLAIVAIGLIIFYGFQSIPTYAQNFLLAFLGQRLSIE 240
	*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****
pRC18	IILSYLRHVFELPMSFFATRKTGEIISRFDANKIIDALASSIISIFLDVITVVMGIVL 300
Lb674	IILSYLRHVFELPMSFFATRKTGEIISRFDANKIIDALASAIISIFLDITVVMIGIIL 300
	*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****
pRC18	IIQNKLLFWITLLVIPIYIVVITLFWKPFERLQKEMQSNALLNSAIIEDLHGIETIKAL 360
Lb674	IIQNTTLFWLTLAVIPIYIAVITLFAKPFERLQKEMESNAVLNSAIIEDLHGIETIKAL 360
	_ ** : ** **_ *****_ *****: *****: *****: *****
pRC18	TSENERYQKIDSAFVDYLRKNFNYPVKADTLQQAIRLFIQLSLNLVVLVWGAILVTHNQLS 420
Lb674	TSENERYQKIDTAFVDYLRKSFYVVKADTLQQAIRLFLVQLGLNVFVLVWGAILVTHNELS 420
	_ **: *****_ * : *****: *****: **_ ** : _*****: *****: **
pRC18	IGQLMTYNALLAYFVNPLQNIINLQTKLQSAKRVANNRLNEVYLVDSFELTKRPIKMYDQL 480
Lb674	IGQLMTYNALLAYFVNPLQNIINLQTKLQSAKRVANNRLNEVYLVDSFELTKRPIKSES QL 480
	*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****
pRC18	LGPLKISDVSRYCYGQNVLDQINLVINPGENLTIVGMSGSGKSTLVKLLVDFFPITGE 540
Lb674	VGPILQNVSYQYCYGQVLESISLKIENPNERLTIVGMSGSGKSTLVKLLVDFFPITGEK 540
	: ** : : : ** : *****_ ** : * _ * : * : * : *****: *****: *****: *****
pRC18	ITLNQHNLNNDKKVLRHYINYIPQEPYIFSGTILENLKLGNRADVTEEMIVAACEIAEI 600
Lb674	VLFNQDQTIDKKTLRQFVNYIAQTPYIFSGSIWDNLKLGNRPGITQADIMHACELAEI 600
	: : *****: : : *****_ ** : : ** : * *****: * : *****: : : * : *****: **
pRC18	KQDIDKMPLQFETLLDENGNTLSGGQKQRITIAALLSPAHLIFDESTSGLDTITTEGRL 660
Lb674	KNDIEKMPLQFETLLDEDGNTLSGGQKQRITIAALLSPARVLIFFDESTSGLDTITTEGLL 660
	* : ** : *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****
pRC18	VDHLLTLKDKTIIFIAHRLAIARKTNVIVMENGHIIEACSHAELIARKCTYYQLINW 718
Lb674	VDHLMALERTIIIFIAHRLAIARKTNILVLENGSVVETGTHDALVDTQGRYYQLLNH 718
	*****: : : : *****: *****: : : ** : : : * : * : : * : *****: *

Figura 27. Comparación de las secuencias de aminoácidos correspondiente al transportador ABC del sistema sakacina P/Q de la cepa *Lb. sakei* Lb674 con la proteína ABC presente en el plásmido pRC18. Los aminoácidos idénticos están indicados por asteriscos. Los cambios conservados están indicados por dos puntos; un sólo punto indica sustituciones menos conservadas

Resultados

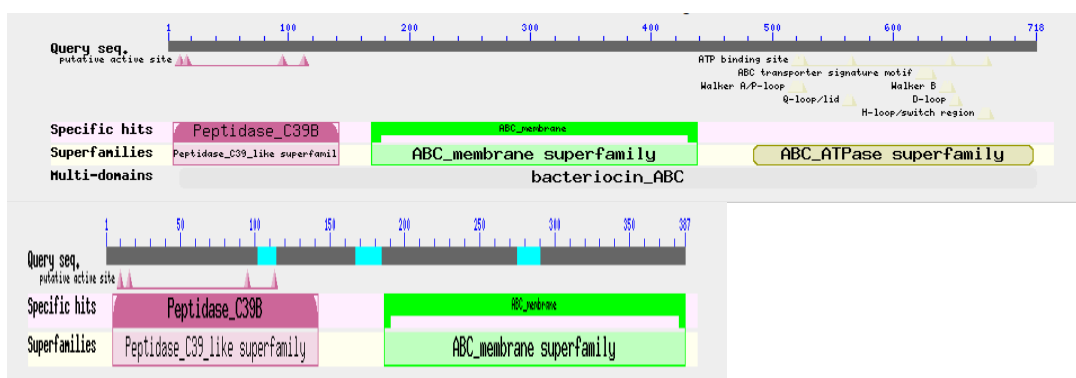


Figura 28. Comparación de los dominios presentes en los sistemas ABC de la cepas Lb674 y del plásmido pRC18 (posición superior) y de la cepa CRL705 (posición inferior), según el programa BLAST (blastp)

Un estudio comparativo similar realizado con el programa ClustalW2 (datos no mostrados) entre las proteínas ABC de las sakacinas X/T de *Lb. sakei* 5 y la proteína ABC del sistema Lac705 presente en pRC18 indica que estas proteínas tienen una identidad del 44% (314/713 aa), porcentaje que se eleva a un 67% cuando se consideran las sustituciones conservadas (478/713). No fue posible realizar este estudio con la proteína ABC del sistema sakacina X/T de CRL705 debido a la presencia de dos fragmentos extra de ADN en su secuencia; sin embargo, cuando ignoramos estos fragmentos, se observó una identidad del 99% entre las secuencias compartidas de los sistemas ABC de las sakacinas X/T de CRL705 y *Lb. sakei* 5.

Las proteínas ABC de los sistemas sakacina PQ y sakacinaTX poseen, como todo sistema ABC, los dominios “Peptidase_39”, “ABC_membrane superfamily” y “ABC_ATPase superfamily” (Figura 29). El dominio peptidasa, ubicado en el extremo amino terminal de estas proteínas (los primeros 150 aa de la proteína ABC), es el responsable del reconocimiento y procesamiento de los prepéptidos de las bacteriocinas y factores de inducción que portan una secuencia líder del tipo “doble glicina”. La Figura 30 muestra el alineamiento del dominio peptidasa de las proteínas ABC de los sistemas lactocina Lac705 (pRC18), sakacina PQ (SppT) y sakacina TX (StxT). Para facilitar nuestro análisis, incluimos también el dominio peptidasa del factor de competencia ComA de *St. mutants*, que ha sido cristalizada y su estructura tridimensional ha sido determinada recientemente para los residuos 5-141 (esta peptidasa tiene como sustrato la secuencia líder del factor de competencia ComC; (Ishii y col. 2010). En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos, donde los índices de alineamiento generados por el programa ClustalW indican que la mayor identidad (índices >57.33) se encuentran entre las peptidasas Lac705, sakacina PQ y ComA,

Resultados

siendo el valor de mayor identidad el de los dominios peptidasa de Lac705 y SakP/Q (SppT).

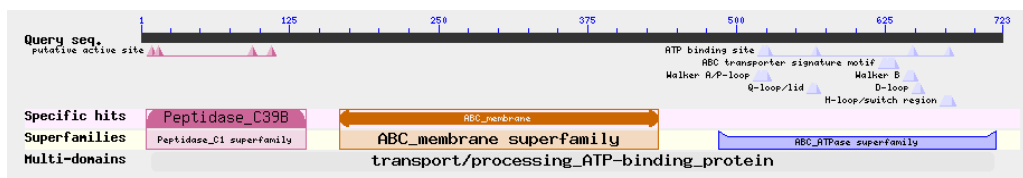


Figura 29. Esquema de los dominios presentes en los sistemas ABC

pRC18	-MFQNKNYIAQVDEMDCGVAALAMILKHYGSTYSLAYLRQQAKTNLEGTSALGLLKTAET	59
SppT	-MIDRKIYIPOVDEMDCGVAALAMILKHYGSSASLAYLRNEAKTDLEGGTALGLVKTAEN	59
ComA	MKFGKRHYRPVDQMDCGVASLAMVFGYGSYYFLAHLRELAKTTMDGTTALGLVQVAEE	60
StxT	--MRKIKLVKQHDEKDCGVAACLSMILNFYDTSVPISKRLRLMSGTNSQGTSAEGLVQALND	58
	: . * *: *****.*:***: .*. : : * * : * :***:* : . . .	
pRC18	LDFETKALQADMSLFDIKDLPLFFIAHVVKPGGILHYVVLAVKKGDI I IADPDPTVKIT	119
SppT	LGFETKAIQADMSLFEVADLPPFFIAHVLKNGELLHYVVLGIKKDAI I IADPDPTVGIA	119
ComA	IGFETRAIKADMTLFDLPDLTFPFVAHVLKEGKLLHYVVTGQDKDSIHIAADPDPGVKLT	120
StxT	FQFQTQVFQTDESIWKEEEVYPLIAHVIIIDGAFHYVVVYGMKNGKLLADP-AKGKIE	117
	: **: . . . : * : . . . : * : * * * * . . . : * * * . . .	
pRC18	KMNWNQFESEWSGVALFIAPKTNYPVNEAN	150
SppT	KMTQSQFKSEWTGVALFIAPKPSYQPVKQQT	150
ComA	KLPRERFEEEWITVTLFMAPSPDYKPKHEQ-	150
StxT	RTP-KEFASIWTGILLTAPTENYHPTQDKS	147
	: . . * . * : * * * * * . * * . * * : . . .	

Figura 30. Alineamiento de los dominios peptidasa de las proteínas ABC de los sistemas lactocina Lac705 (pRC18), sakacina PQ (SppT), y sakacina TX (StxT) de *Lb. curvatus* CRL705 y de ComA de *St. mutans*. En amarillo, se resaltan los aminoácidos del sitio activo; en celeste y fucsia, los aminoácidos de la superficie cóncava adyacente al sitio activo. Los aminoácidos idénticos están indicados por asteriscos. Los cambios conservados están indicados por dos puntos, mientras que un sólo punto indica sustituciones menos conservadas

Tabla 10. Índices de alineamiento de los dominios peptidasa*

Secuencia	Nombre	Longitud	Secuencia	Nombre	Longitud	Puntaje
1	ComA	150	2	pRC18	150	57.33
1	ComA	150	3	SppT	150	60.67
1	ComA	150	4	StxT	147	31.29
2	pRC18	150	3	SppT	150	73.33
2	pRC18	150	4	StxT	147	35.37
3	SppT	150	4	StxT	147	37.41

*Indicados en Figura 30

Resultados

En este estudio demostramos que las cuatro peptidasas pertenecen a la familia tipo de la papaína. Éstas son cisteín proteasas cuyo sitio catalítico está formado por la diada Cys e His (C y H; marcados en amarillo en Figura 30); donde dos aminoácidos más, Gln (Q) y Asp (o Asn; D o N; Figuras 30 y 31), completan el sitio activo. Estos cuatro aminoácidos están presentes en todas las peptidasas analizadas. Se propone que la Gln, que precede al sitio catalítico Cys, contribuye en la formación del hueco oxyanión, un centro electrofílico que estabiliza un intermediario tetrahédrico; mientras el Asp (o Asn) ayuda a estabilizar la orientación espacial del anillo imidazol y la forma protonada del sitio catalítico His (Figura 31). En la clasificación de peptidasas y sus inhibidores, tomada del banco MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?mid=C39.UPW>), las peptidasas de los sistemas Lac705 y sakacina PQ se clasifican como miembros de la familia C39.001, o peptidasas que procesan bacteriocinas; mientras que la peptidasa del sistema sakacina TX se incluye en el grupo de peptidasas no asignadas de la familia C39.

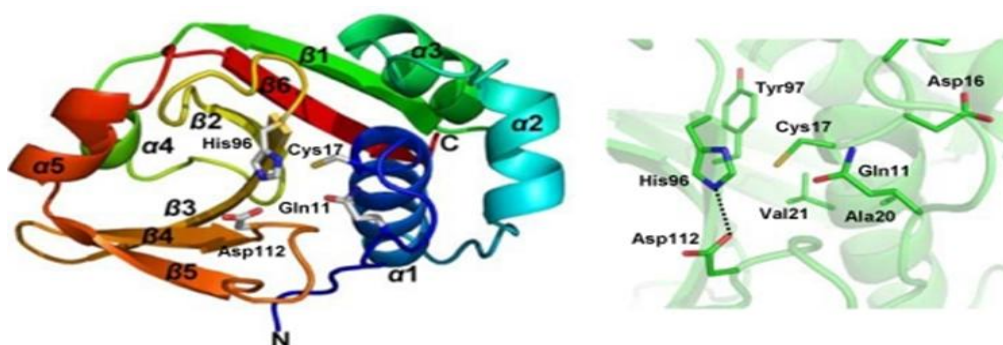


Figura 31. Estructura tridimensional del dominio peptidasa (residuos 5-141) del factor de competencia ComA de *St. mutants* (tomado de Ishii y col. 2010)

En el sistema ComA-ComC de *S. mutants*, se determinó que la estructura de la peptidasa ComA consiste en 6 cadenas antiparalelas de láminas β , alrededor de las cuales se empaquetan 5 hélices α formando dos subdominios: un subdominio amino, formado por tres hélices α (residuos aa 5-62) y un subdominio carboxilo, formado por las 6 cadenas β y dos hélices α (residuos aa 63-141) (Figura 31). En la interfase de estos dos subdominios se ubica el sitio activo Gln-11, Cis-17, His-96 y Asp-112, y adyacente al mismo, en una superficie cóncava no muy profunda. Ésta corresponde al sitio de unión a la secuencia líder del péptido ComC, el cual está formado por los residuos hidrofóbicos Ala-51, Leu-52, Val-55, Leu-94 y Val-134. En la región N-terminal de ComC, hay cuatro residuos hidrofóbicos conservados que se extienden desde la región -15/-4 [Phe(-15), Ile(-12), Leu(-7), y Ile(-4)], y dos Gly, ubicadas en las posiciones -2/-1, los cuales son críticos para la interacción con la peptidasa ComA. Durante la

Resultados

unión, la estructura de la región líder pasa de una estructura desordenada (región líder libre) a una estructura α anfifílica (región líder unida). El modelo propone que la unión del péptido líder ComC a la peptidasa ComA ocurre a través de una interacción de la región extendida -15/-4 del prepéptido con la región hidrofóbica ubicada en la interfase entre los dos subdominios de la peptidasa; esto ubica a las dos Gly (-2/-1) del péptido líder en el sitio activo, donde se produce el clivaje en el extremo C de la Gly -1. Es decir, la enzima hidroliza el péptido a una distancia de 15 aa del sitio de reconocimiento. Esta extendida región de reconocimiento explicaría la estricta especificidad de sustrato de las peptidasas que hidrolizan solo los prepéptidos de las bacteriocinas.

Como muestra la Figura 30, todas las peptidasas aquí estudiadas tienen aminoácidos conservados (hidrofóbicos) en la región de reconocimiento y unión al péptido líder, lo que sugiere que más allá de diferencias significativas en sus secuencias, poseen una estructura común que se corresponde con el de las cisteín proteasas. Las peptidasas específicas de Lac705 y SakP/Q (SppT) poseen los aminoácidos o sustituciones conservadas correspondientes a las posiciones Ala-51-Leu-52- Ala-51, Leu-52, Val-55, Leu-94, y Val-134 descritas en la péptidasa ComA; en cambio, en la peptidasa del sistema SakX/T (StxT) se observa que una fenilalanina (F) sustituye una leucina (L) en las posiciones 52 y 94 (se ignora el efecto que produce este cambio).

Resultados

A

```

IP-TX      -----MTNRKTLPKHEELKKIKGG 18
sacTalfa  -----MKNVQSLSKHEELVLVVG 18
sacQ       -----MQNTKELSVVELQQILGG 18
comC       MKNTVKLECFVALKEKDLQKIKGG 24
Lac705beta ME-SNKLEKTFANISNKDLNKITGG 23
sakP       -----MEKTFIELSLKEVTAITGG 18
Lac705alfa MD---NLNKFKKLSDNKLQATI 21
sacTbeta   ----MKTANIKLLTNQEMIEIFGG 20
sacX       ----MEA--IKKLDLQAMRGIVGG 18
           :      :      **
  
```

B

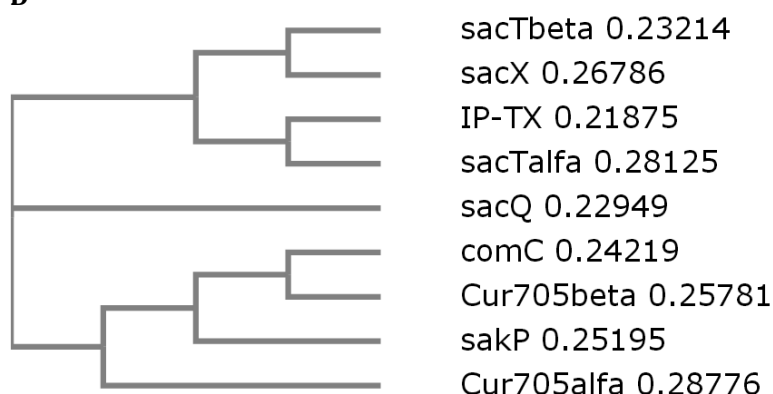


Figura 32. A. Alineamiento de secuencias líderes de los prepéptidos estudiados; B. Valores de identidad entre las secuencias líderes. En colores, se resaltan los residuos hidrofóbicos conservados descritos en ComC

Cuando analizamos la relación de identidad que existe entre las secuencias líderes de los prepéptidos estudiados, observamos tres grupos (Figura 32A y 32B): uno formado por los péptidos líderes del sistema de sakacina TX; otro formado por los péptidos líderes de los sistemas Lac705, sakacinas P y ComC; y un tercero formado por sakacina Q. Se destaca que sólo los sistemas de sakacina P y lactocina Lac705 (tanto el péptido α como el péptido β), poseen una fenilalanina (F) en la región -15 (Figura 32A), considerada esencial en los estudios realizados con el sistema ComC.

En base a los análisis comparativos realizados podemos concluir que, debido la mayor identidad observada entre los sistemas ABC, peptidasa y secuencias líderes de los prepéptidos de los sistemas de lactocina Lac705 y sakacina PQ, el transportador ABC de Lac705 complementaria, en *Lb. curvatus* CRL705, a las sakacinas P y Q, dos bacteriocinas con actividad antilisteria.

Aislamiento y caracterización de variantes de *Lb. curvatus* CRL705 curadas de plásmidos

Introducción

Los plásmidos son entidades auto-replicativas de ADN extra-cromosómico que, a través de la expresión de los genes que codifican ayudan a sus células hospedadoras a enfrentarse a retos ambientales o a adaptarse a nichos específicos. Los plásmidos también contribuyen a la evolución microbiana al facilitar la difusión horizontal de los genes que portan, con frecuencia a través de las especies (Millones-Weaver y Camps, 2014). Algunos plásmidos son inestables y pueden, luego del proceso de segregación a cada célula hija durante la división celular, ser eliminados espontáneamente. Sin embargo, la mayoría son extremadamente estables y es necesario el uso de agentes de curado, tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, SDS, o el uso de temperaturas de crecimiento elevadas, para aumentar la frecuencia de su pérdida (Trevors, 1986).

Tabla 11. Frecuencia de mutantes Lac705⁻ y protocolos utilizados

Tratamientos	Espontánea	NA	pVE6087	pTV1-OK	NG
Nº de colonias estudiadas	30	2300	5000	100	5000
% de mutantes	1	1,7	0,3	9	0,2
Mutantes seleccionadas	-	V1000, Sac7	1Bac-	G	28B

NA: Naranja de acridina; NG: nitrosoguanidina; pVE6087 y pTV1-OK, plásmidos que portan secuencias *IS* y *Tn*, respectivamente (Cuozzo 2002). Se indica el número de cepas analizadas luego de cada tratamiento, la frecuencia de mutantes Lac705⁻ aisladas y la variante representativa que fue posteriormente estudiada. Lac705⁻ indica cepa no productora de Lactocina Lac705

La capacidad de fermentar sacarosa y la de producir las bacteriocinas Lac705 y AL705, fenotipos de gran importancia tecnológica, están asociados en *Lb. curvatus* CRL705 a la presencia de los plásmidos: pRC12 (12,5 kb) y pRC18 (18,6 kb), respectivamente. En estudios previos, los cultivos de *Lb. curvatus* CRL705 fueron sometidos a diferentes tratamientos con el objetivo de aislar variantes curadas de plásmidos y negativas en la producción de Lac705 (Cuozzo 2002). Las distintas estrategias aplicadas fueron principalmente: a) aislamiento de mutantes espontáneas; b) uso del agente curante naranja de acridina; y c) mutagénesis (mediante el uso de nitrosoguanidina o de vectores de integración). Como se observa en la Tabla 11, varias

mutantes Lac705^{-S} fueron aisladas. Sin embargo, ninguna de ellas había perdido el plásmido pRC18, resultados que sugieren que el plásmido pRC18 es muy estable. Por ejemplo, la mutante Sac7, la cual posee los fenotipos Lac705^{-S} AL705^{-R}, es decir no productor de ambas bacteriocinas y de sensibilidad a la acción antimicrobiana de Lac705, no presenta los plásmidos pRC12 y pRC18 en los ensayos de electroforesis en geles de agarosa (Figura 33A). Sin embargo, la presencia del plásmido pRC18 en Sac7 pudo ser detectada mediante ensayos de PCR (Figura 33B), indicando que pRC18 podría estar presente como plásmido con un número de copia muy bajo y por lo tanto indetectable en los geles de agarosa, o bien integrado en el cromosoma de Sac7.

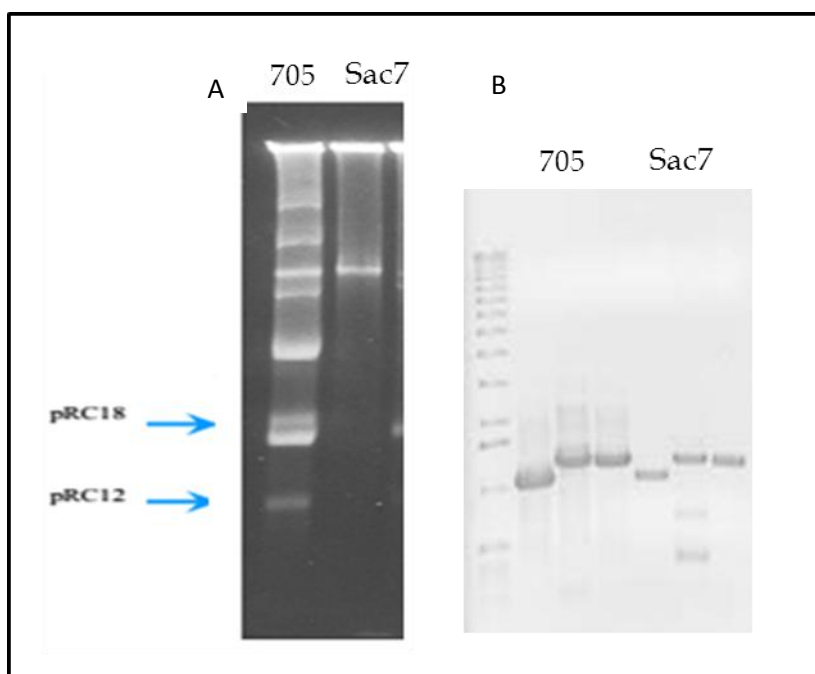


Figura 33. Electroforesis en geles de agarosa de: A) ADN plasmídico de *Lb. curvatus* CRL705 (calle 1) y de la mutante SAC7 (calle 2) (Cuozzo 2002); y B) Amplicones obtenidos con cebadores específicos al plásmido pRC18 (Olaya 2007)

Curado de los fenotipos Lac705⁺ y AL705⁺ en CRL 705 a 39°C

Para aislar las variantes de *Lb. curvatus* CRL705 libres de plásmidos y negativas en la producción de las bacteriocinas Lac705 y AL705 se tomaron en cuenta dos parámetros: altas temperaturas de incubación y diluciones seriadas del cultivo.

El uso de temperaturas de incubación elevadas (5-10°C por encima de la temperatura óptima de crecimiento) es un método usual de curado de plásmido. Esta

aproximación experimental ha sido utilizada con éxito para curar varias cepas de bacterias lácticas y demostrar que múltiples fenotipos de importancia industrial están asociadas a elementos extracromosómicos (*i.e.*, en *L. lactis*, el metabolismo de lactosa, la producción de bacteriocinas, la actividad proteínasa, y los mecanismos de resistencia al ataque de bacteriófagos, entre otros, están asociados a la presencia de plásmidos; (McKay, 1983). En el caso de *Lb. curvatus* CRL705, la alta estabilidad de pRC18 podría explicarse por el efecto tóxico de la lactocina Lac705, presente en el medio de cultivo, sobre las células libres del plásmido: las células que pierdan al mismo, luego del período de segregación (post-segregación), serían sensibles a Lac705 y eliminadas del cultivo al haber perdido las funciones de inmunidad codificadas en el plásmido pRC18 (en esas condiciones, las células se mostrarían adictas al plásmido). Como se describió previamente, no se detectó lactocina Lac705 en los sobrenadantes de células crecidas a 39°C, por lo que la incubación del cultivo a esta temperatura podría ser adecuada para proteger a las células curadas de pRC18 de la acción tóxica de la bacteriocina.

Por otro lado, se ha observado que es posible aislar variantes de *Lb. sakei* y *Lb. plantarum* CII no productoras de bacteriocinas luego de realizar nuevos inóculos muy diluidos del cultivo productor (diluciones mayores a 1000 veces; Diep y col. 1995). Esto se observa en aquellos sistemas de bacteriocinas que dependen de una respuesta del tipo *quorum sensing*; la dilución marcada del cultivo productor diluye también la concentración del péptido inductor el cual es necesario para activar al sistema. Si bien en el sistema de la lactocina Lac705 no se han detectado genes asociados a una respuesta *quorum sensing* (histidina quinasa y regulador de respuesta), decidimos evaluar el curado de pRC18 usando cultivos iniciales muy diluidos de *Lb. curvatus* CRL705 ante la posibilidad que algún mecanismo similar críptico sea activo en el sistema Lac705. Una segunda razón para usar un inóculo inicial diluido se refiere al **número de generaciones necesario para saturar el cultivo** (será mayor el número de generaciones cuanto menor sea el número inicial de células). Así, si una célula curada se produce en los primeros estadios de división celular, habrá un mayor número de generaciones de la misma y, por lo tanto, mayor será el número de sus células en la población final, lo que facilitará su aislamiento.

En base a las consideraciones expuestas, se realizaron diluciones seriadas (hasta 10⁻⁹) en medio MRS caldo a partir de un cultivo de 16 h de *Lb. curvatus* CRL705, las que se incubaron a 39°C por aproximadamente 48 h (>20 generaciones). Luego, diluciones seriadas, a partir del tubo de mayor dilución que mostró crecimiento, se incubaron en medio agarizado a 30°C y colonias aisladas fueron evaluadas por la pérdida de los fenotipos productores de Lac705 y AL705, y por la sensibilidad a Lac705. Variantes con los fenotipos buscados fueron aisladas con una frecuencia del 3-5%. La ausencia del plásmido pRC18 en tres variantes aisladas de manera independiente una de otra, y

designadas como *Lb. curvatus* AR3, AR49 y AR54, se puso en evidencia mediante reacciones PCR (Figura 34A).

La caracterización de las mutantes AR3, AR49 y AR54 indicó que sus fenotipos Lac705^{-S} AL705^{-R} fueron estables durante las sucesivas generaciones de crecimiento. La ausencia de contaminación en las mismas se puso de manifiesto mediante ensayos de RAPD [con los cebadores M13 y (GTG)₅] y geles en SDS-PAGE de proteínas totales. Los perfiles observados entre la cepa *Lb. curvatus* CRL705 y las mutantes AR3, AR49 y AR54 fueron idénticos (Figura 34B-D). Estos resultados confirman que las células *Lb. curvatus* AR3, AR49 y AR54 son células curadas del plásmido pRC18. *Así, por primera vez, y luego de una intensa búsqueda que llevó varios años de trabajo en nuestro laboratorio, se han definido las condiciones adecuadas para realizar un curado sistemático de los plásmidos naturalmente presentes en Lb. curvatus CRL705.*

Estudios comparativos entre las cepas Lb. curvatus CRL705 y AR3

A fin de evaluar el impacto del plásmido pRC18 en la fisiología de la cepa en estudio, se comparó el crecimiento de *Lb. curvatus* CRL705 y una de sus variantes curadas, la cepa AR3, en diferentes medios de cultivo. Los medios utilizados en una primera instancia fueron: MRS, BHI+TW80, LB+Gluc+TW80, M9, TS+TW80. A las 24 h y a 30°C, se observó un comportamiento similar para ambas cepas en los distintos medios, siendo el óptimo el medio MRS (datos no mostrados). En los medios MRS modificados se observó que ambas cepas crecen mejor en medios MRS libres de acetato, PO₄⁼ o citrato. La ausencia de las sales de Mg y Mn afectó principalmente el crecimiento de la cepa AR3 (datos no mostrados). Por último, se evaluó el crecimiento de ambas cepas en un medio MRS “base”, compuesto por Mg/Mn (0,0038%), acetato (0,3%), Tween80 (0,1%), glucosa (2%), y extracto de levadura (0,3%), al cual se le adicionó al 0,1%, ya sea peptona, extracto de carne, o Casa-aminoácidos. La densidad final de los cultivos, a las 24 h, fue aproximadamente un 50% del alcanzado en el medio original MRS (datos no mostrados).

Sistema cárneo modelo

Uno de los objetivos planteados en nuestros estudios fue evaluar el comportamiento de *Lb. curvatus* CRL705 y AR3 en un sistema cárneo modelo. Para ello, utilizamos un medio carne, descrito por López (2013). Si bien el crecimiento y cinéticas de acidificación de ambas cepas, a 22°C, fueron idénticas, no se obtuvieron resultados reproducibles en la producción de Lac705 y AL705, a pesar de numerosos intentos.

Resultados

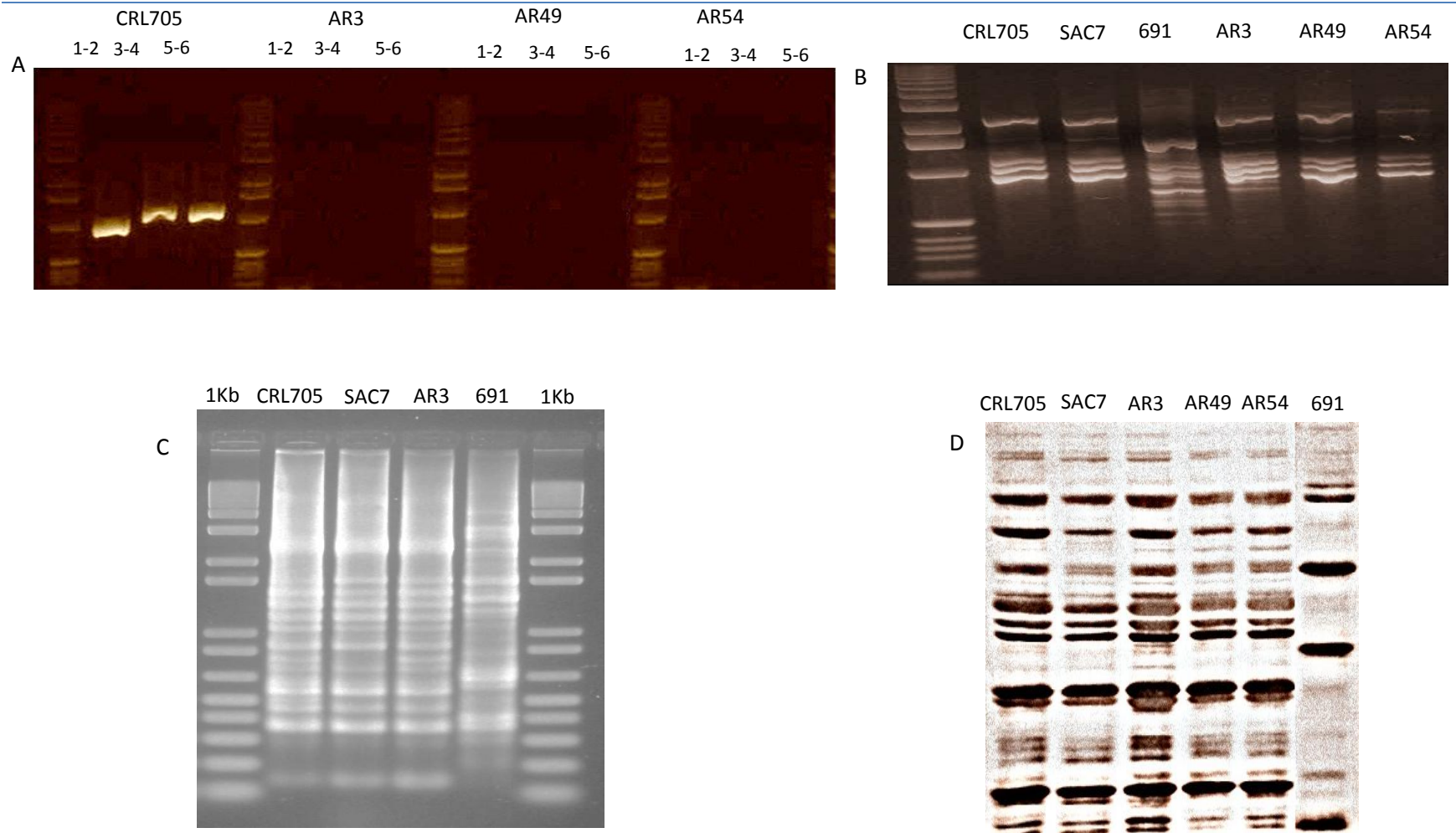


Figura 34. A. Productos de PCR realizadas con cebadores específicos al plásmido pRC18 (cebadores 1-2, 3-4 y 5-6) con ADN de las cepas CRL705 y las variantes AR3, AR49 y AR54; B. Amplificación polimórfica del ADN con el cebador M13 (“RAPD”); C. Amplificación polimórfica del ADN con el cebador (GTG)₅ D. Análisis de proteínas totales mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Idénticos resultados fueron observados para las variantes AR49 y AR54. En C y D se incluye la muestra de *Lb. plantarum* CRL691 como control de contaminación

Estudios comparativos entre Sac7 y AR3, variantes Lac705 ^{-/s} de *Lb. curvatus* CRL705. Diferencia en la sensibilidad a lactocina Lac705

Las cepas Sac7 y AR3 fueron aisladas como variantes negativas en la producción de lactocina Lac705 y antilisteria AL705. En la Tabla 12 se muestra el fenotipo de cada una donde se observa que estas cepas no fermentan la sacarosa. Sus velocidades de crecimiento (μ) a 30°C en medio MRS fueron similares a las de la cepa control, CRL705. Las curvas de crecimiento muestran una fase exponencial a partir de las 4 h del cultivo, alcanzando la fase estacionaria a las 7 h; la fase lag para la cepa Sac7 fue algo más extendida con respecto a las cepas CRL705 y AR3 (Figura 35). Un valor de pH final de 4,5 fue observado en el medio de cultivo de todas las cepas.

Tabla 12. Fenotipos de las cepas *Lb. curvatus* CRL705, Sac7 y AR3

Cepas →	CRL705	Sac7	AR3
↓ Fenotipos			
Lac705 Producción	+	-	-
AL705 Producción	+	-	-
Sensibilidad a Lac705	R	S	S
Sensibilidad a AL705	R	R	R
Fermentación de sacarosa	+	-	-
μ (h ⁻¹)	0,73 ±0,01	0,68 ±0,04	0,70 ±0,11
Final DO ₆₀₀₌ (MRS)	2,51	2,17	2,5
Cepa indicadora de Lac705 (UA/ml)	0	6400	1600

R= Resistente; S= Sensible; += productor de bacteriocina/fermentador de sacarosa; -= no productor de bacteriocina/no fermentador de sacarosa. Las cepas AR49 y AR54 presentaron el mismo fenotipo que la cepa AR3

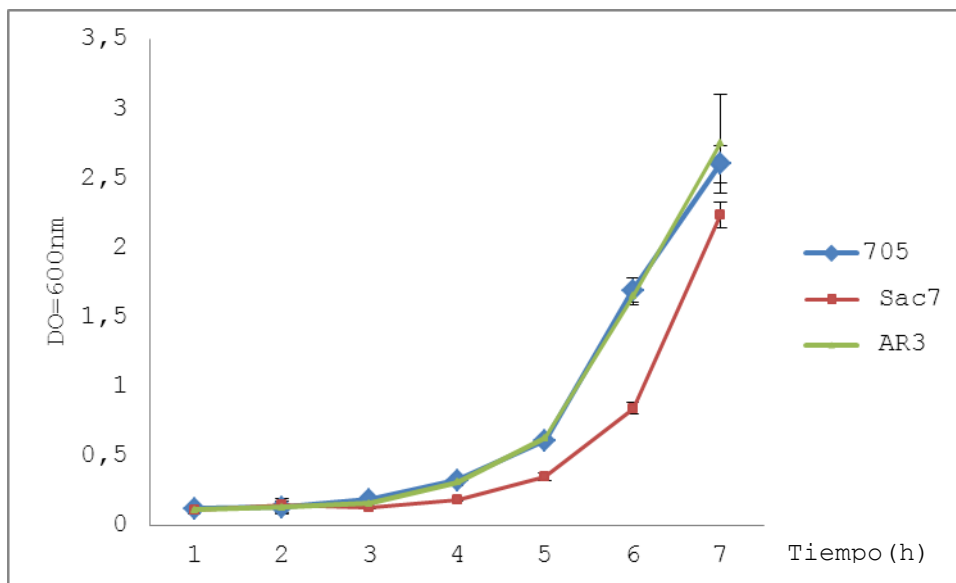


Figura 35. Curvas de crecimiento de las cepas CRL705, Sac7 y AR3 en medio MRS a 30°C

Las cepas AR3 y Sac7 fueron resistentes a la acción antimicrobiana de la bacteriocina AL705 y sensibles a Lac705. Es en este fenotipo donde se observa una de las principales diferencias entre ambas cepas: Sac7 fue mucho más sensible como célula indicadora de los niveles de la lactocina Lac705. En las condiciones ensayadas, en Tabla 12, el título de sensibilidad a lactocina Lac705 fue de 6.400 UA/ml en la cepa Sac7 y de 1.600 UA/ml en la cepa AR3. Estos resultados fueron confirmados mediante CIM en medio líquido: en la Figura 36 se observa que, en un caldo MRS suplementado con una concentración diluida (1/16; 400 UA/ml) de Lac705, la cepa Sac7 no crece, mientras el crecimiento de la cepa AR3 fue ligeramente inhibido. La menor sensibilidad a lactocina CRL705 fue observada también en las variantes AR49 y AR54 (resultados no mostrados).

Es importante aclarar que en la cepa AR3 fue posible reproducir la complementación del fenotipo AL705⁺ cuando estas células fueron transformadas con el plásmido p3.3; observaciones realizadas originalmente por Cuozzo (2002) con la cepa Sac7. Sin embargo, las frecuencias de transformación de la variante curada AR3 con plásmidos portadores de la función RepB de pRC18 no mejoraron; las frecuencias observadas fueron similares a las de la cepa Sac7 (10²-10³ transformantes/μg de ADN).

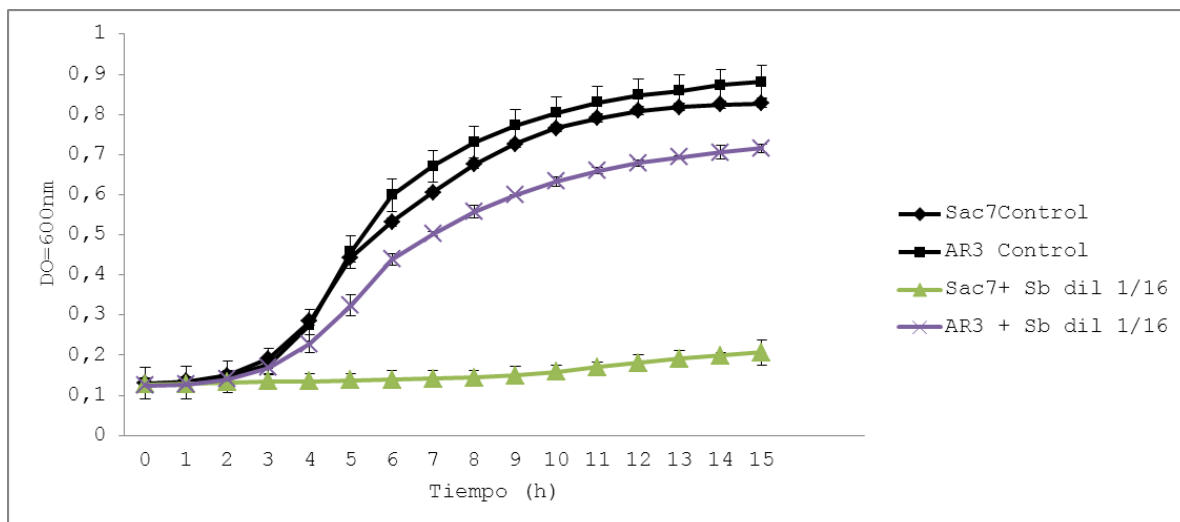


Figura 36. Sensibilidad de las cepas AR3 y Sac7 a lactocina Lac705 (400 UA/ml) en medio MRS a 30°C. Sb = sobrenadante. Los experimentos fueron realizados por triplicado

Las variantes AR3, AR49 y AR54 fueron menos sensibles a Lac705 que la variante Sac7. La principal diferencia entre ellas es que las tres primeras son libres de pRC18 mientras Sac7 aún posee este plásmido (Figura 37). Esto plantea la pregunta de si es el plásmido pRC18 responsable de la mayor sensibilidad de Sac7 a la bacteriocina Lac705; y si ese fuera el caso, qué gen/genes presentes en el mismo podrían estar jugando un papel en el fenotipo observado.



Figura 37. Representación esquemática de la principal diferencia entre la cepa Sa7 y AR3: pRC18 está presente solo en Sac7 aunque su estructura no ha sido determinada

La secuencia nucleotídica del plásmido pRC18 ha sido determinada y depositada en el GenBank con el número de acceso AF200347. Este plásmido consiste en una molécula de ADN de doble cadena de 18.664 pb con un porcentaje de G + C de 34,5%. Como resultado del análisis de su secuencia se identificaron 25 marcos de lectura abierta (MLA; Cuzzo 2002). En un estudio reciente, Bleckwedel (Tesina, 2011) determinó que los MLA anotados como *orf2* y *orf3* se corresponden a un sistema de toxina-antitoxina (TA) de tipo II (es decir, ambos componentes del sistema son de naturaleza proteica). Los sistemas TA, identificados originalmente como sistemas estabilizadores de plásmidos de bajo número de copia y presentes en los cromosomas de muchas bacterias (Shahar Amitai y col. 2004), se activan bajo diferentes condiciones de estrés, tales como privación de aminoácidos o de timina, daños en el ADN, presencia de antibióticos, infección de fagos, entre otros (Buts y col. 2005). Una controversial hipótesis les atribuye el rol de asesinos altruistas: cuando los sistemas se activan bajo condiciones de estrés, una parte de la población bacteriana muere para permitir la supervivencia del resto de la población como un todo. Por lo tanto, para estudiar el potencial papel del módulo TA de pRC18 en el fenotipo de mayor sensibilidad a Lac705, observado en la cepa Sac7, expresamos el sistema TA en la cepa AR3 y evaluamos su fenotipo. Previamente, realizamos una caracterización del sistema TA, lo que se presenta a continuación.

Sistema de toxina (RelE) y antitoxina (YefM/Phd) del plásmido pRC18

El análisis del sistema TA del pRC18 indica que el mismo es del tipo II y está organizado en un operón que produce una antitoxina de 92 aminoácidos (ORF3), miembro de la superfamilia YefM/Phd, y una toxina de 118 aminoácidos (ORF2), de la superfamilia RelE.

La transcripción del operón se lleva a cabo en contracorriente con respecto a los demás genes del plásmido. La antitoxina (ORF3) se extiende desde el nucleótido número 1689 hasta el número 1411, con 279 nt de longitud; la toxina (ORF2) se extiende desde el nucleótido 1411 hasta el 1055, con 357 nt, observándose que el codón stop de la antitoxina se superpone al codón de inicio de la toxina. Por otro lado, se encontraron dos posibles promotores, a 45 y 64 nt corriente arriba del inicio de la secuencia que codifica para la antitoxina; y una secuencia Shine-Dalgarno ubicada a 6 nt del codón de inicio. Finalmente, se observaron dos secuencias invertidas que podrían formar una estructura de tallo-bucle (*stem-loop*) responsables de la terminación de la transcripción de los genes de dicho operón (Figuras 38 A y B).

Resultados

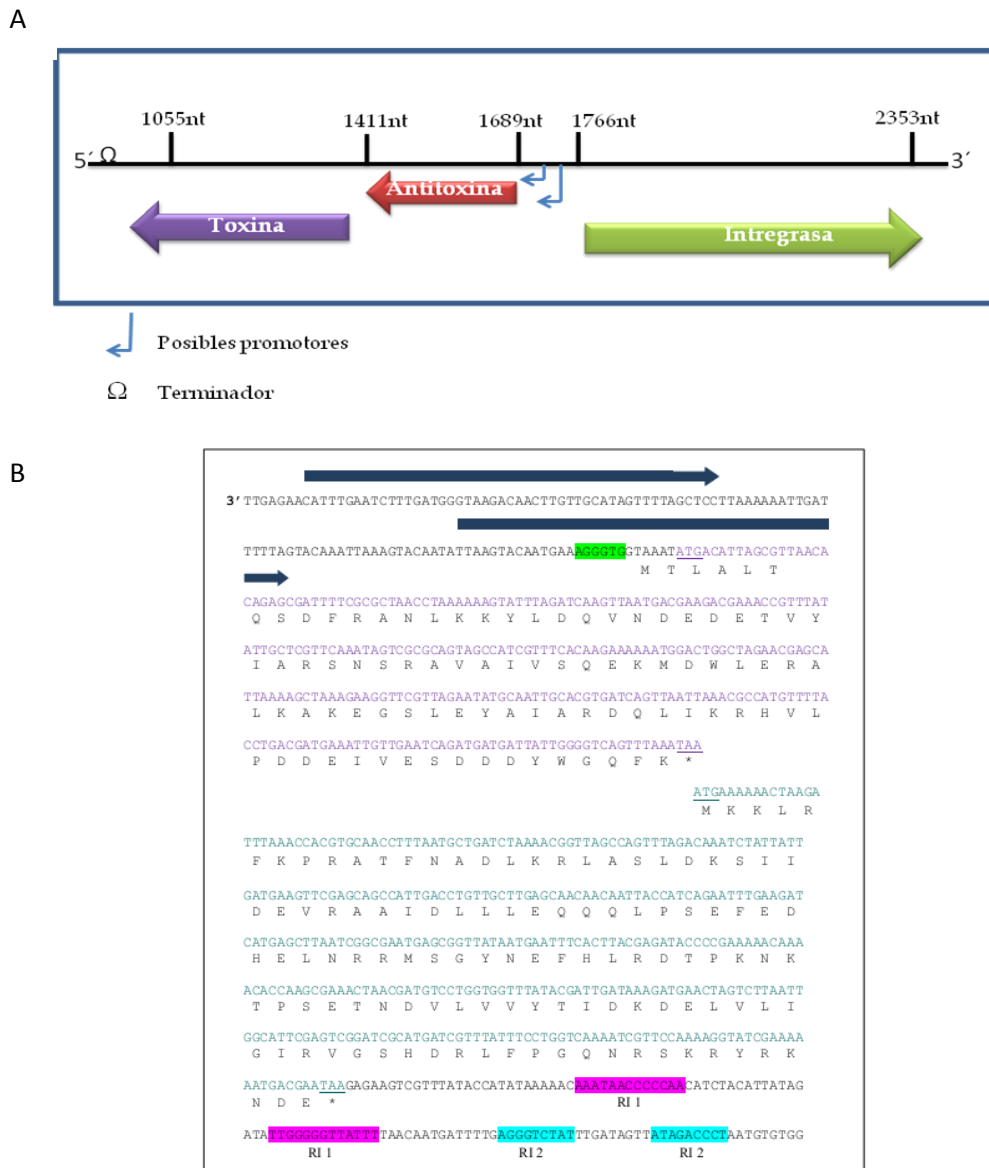


Figura 38. A. Esquema del operón TA presente en el plásmido pRC18. Los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia anotada del plásmido (AF200347). Se indican la posición de promotores y terminador. B. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del sistema TA de pRC18. Flechas azules: indican los posibles promotores; resaltado en verde: posible sitio de unión a ribosoma (Shine-Dalgarno); violeta: Antitoxina; verde: Toxina; subrayado: codones de inicio (ATG) y terminación (TAA); resaltado en fucsia (RI 1): repetición invertida 1 (posible terminador); resaltado en turquesa (RI 2): repetición invertida 2 (posible terminador)

Comparación con otros sistemas y familias TA

Realizamos una comparación de las proteínas RelE y YefM/Phd del sistema pRC18 con otros sistemas TA utilizando la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En ambos casos estos sistemas han sido descritos tanto en plásmidos como en cromosomas. Se observó que la secuencia de la proteína de la antitoxina muestra un 97% de identidad con la antitoxina presente en un plásmido de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 y un 76% de identidad con la antitoxina presente en el cromosoma de *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 (Tabla 13): estas antitoxinas poseen un dominio tipo PHD (superfamilia YefM/Phd “prevent host dead”) y se caracterizan por ser multifuncionales ya que se unen tanto a la toxina, para neutralizarla, como al promotor del sistema para reprimir la transcripción del operón (McKinley y Magnuson 2005). También se caracterizan por ser proteínas que se encuentran predominantemente desplegadas en condiciones fisiológicas (Cherny y col. 2005). En cuanto a la estructura secundaria, en el extremo C-terminal predominarían α -hélices, y en el extremo N-terminal segmentos de α -hélices y hojas β (McKinley y Magnuson 2005). La antitoxina YefM/Phd tiene también una identidad mayor al 70% con antitoxinas presentes en bacterias del género *Lactobacillus* y *Weissella*.

Resultados

Tabla 13. Análisis Clustal W entre secuencias correspondientes a la antitoxina del plásmido pRC18

Origen	Secuencia
Hipotética antitoxina de pRC18 <i>Lactobacillus curvatus</i> CRL 705	MTLALTQSDFRANLKKYLDQVNDEDETVYI ARSNSRAVAIVSQEKMDWLERALKAKEGSLEYAIARDQLIKRHVLPDDEIVESDDDYWGQFK-
Antitoxina de <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	MTLALTQSDFRANLKKYLDQVNDEDETVYI ARSNSRAVAIVSQEKMDWLERALKAKEGSLEYAIARDQLIKRHVLPDDEIVESDDDYWGQFKQ
Antitoxina de <i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290	MTLALTQSDFRANLKKYLDQVNDEDETVYI ARSNSRAVAIVSQEKMDWLERALKAKEGSLEYAIARDQLIKRHVLPDDEIVESDDDYWGQFK-
Antitoxina de <i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	...MTLALTQSDFRANLKEYLDKVNSEETVYI ARSNQRAVAIVSQEKMEWLERALKAKEGSLEYAVARDQLIQRHVLPDDDIVESNDEYWNQFKA
Antitoxina familia PHD de <i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075	...MTVALTQSDFRAHIKKYLDQVNDDDETVYVARSNSRSVAIVSQEKMYWMEKAIQAKEDSLAVARDQLIRRNVLPLDDPIVESDDDYWEKFK-

- * - única, residuo totalmente conservado
- : - conservación de un grupo fuerte
- . - conservación de grupos débiles
- no conservado

Tabla 14. Análisis Clustal W entre secuencias correspondientes a la toxina del plásmido pRC18

Origen	Secuencia
Hipotética toxina de pRC18 de <i>Lactobacillus curvatus</i> CRL 705	...EDHELNRMSGYNEPHLRDTPKNKTPSETNDVLVVYITDKDELVLIGIRVGSHDR-LFPGQNRSKRYRKNDE
Toxina, familia RelE de <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	...EDHELNRMSGYNEPHLRDTPKNKTPSETNDVLVVYITDKDELVLIGIRVGSHER-LFPGQNRASKRYRKNDEK
Sistema toxina-antitoxina, familia RelE de <i>Lactobacillus helveticus</i> H10	...RDHPLKRRLAGYREFHVRDTPKGEQPNNDINVLVIWYIEHNNLVVGVVGVVGSQRLLFPGLNKSRRKFRK
Sistema toxina-antitoxina, familia RelE de <i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075	...RDHPLKRRLAGYREFHVRDTPKGEQPNNDINVLVIWYIEHNNLVVGVVGVVGSQR-LFPGLNKSRRKFRK
Toxina, familia RelE de <i>Listeria seeligeri</i> FSL N1-06	MPSFITY--EDTPKNKTPSETNDVLVVYITDKDELVLIGIRVGSHDR-LFPGQNRSKRYR
Sistema toxina-antitoxina, familia RelE de <i>Lactobacillus antri</i> DSM 16041	...HDHELEGNYTGYREFHVRDTPKGGQPTETTDIVVIYKVNNQDLVAVNIGSHKK-LFHGRYHKKR
Toxina, familia RelE/StbE de <i>Lactobacillus oris</i> PB013-T2-3	...HDHELEGNYTGYREFHVRDTPKGGQPTETTNDIVVIYKVNNQDLVAVNIGSHKK-LFHGRYHKKR
Toxina, familia RelE/StbE de <i>Mobiluncus mulieris</i> ATCC 35243	...RDHALKGNWQGYREIHVEA-----DWLVYRIERDELLVLSRTGSYDD-LF
Toxina, familia RelE/StbE <i>Mobiluncus mulieris</i> ATCC 35239	...RDHALKGNWQGYREIHVEA-----DWLVYRIERDELLVLSRTGSHDD-LF

- * - única, residuo totalmente conservado
- : - conservación de un grupo fuerte
- . - conservación de grupos débiles
- no conservado

Respecto a la toxina RelE, hemos observado mediante análisis por homología que posee una identidad mayor al 50% con toxinas presentes en bacterias del género *Lactobacillus* y *Mobiluncus* (Tabla 14). Un identidad de 94% se encontró con la toxina presente en un plásmido de *Lactobacillus brevis* ATCC 367, y de 61% con la toxina presente en el cromosoma de *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Se ha descrito que la toxina RelE inhibe la síntesis de proteínas al hidrolizar ARNm en secuencias específicas, con preferencia las de codón stop UAG, cuando están en el sitio A del ribosoma (Pedersen y col. 2003). La superfamilia RelE está caracterizada por poseer una estructura formada por cinco cadenas de hojas β con cuatro cadenas antiparalelas, mientras que la primera y la última cadena son paralelas. La hoja β está flanqueada, de un lado, por dos hélices α N-terminal ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y, del otro lado, por una α hélice C-terminal ($\alpha 3$) que junto con el *loop* de conexión $\beta 2$ y $\beta 3$ forman una hendidura profunda que abarca el sitio de actividad ARNasa (Barbosa y col. 2010).

El sistema TA del plásmido pRC18 contribuye al fenotipo de una mayor sensibilidad a la lactocina Lac705

Con el fin de evaluar la participación del sistema TA del plásmido pRC18 en la sensibilidad a Lac705, procedimos a construir el plásmido pRA1TA; si el sistema TA es responsable de la mayor sensibilidad de la cepa Sac7 a la bacteriocina Lac705, entonces la cepa AR3 transformada con el plásmido pRA1TA debería ser más sensible a Lac705. Para ello, los genes del sistema TA fueron amplificados mediante PCR usando los cebadores específicos RRTA-f y RRTA-rev (Tabla22). El amplicón de 983 bp generado fue luego tratado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* y clonado en los sitios *EcoRI* y *EcoRV* del plásmido p3B1, obteniendo así el plásmido pRA1TA (Figura 39). La estructura correcta del plásmido fue confirmada mediante estudios físicos con enzimas de restricción y secuenciación.

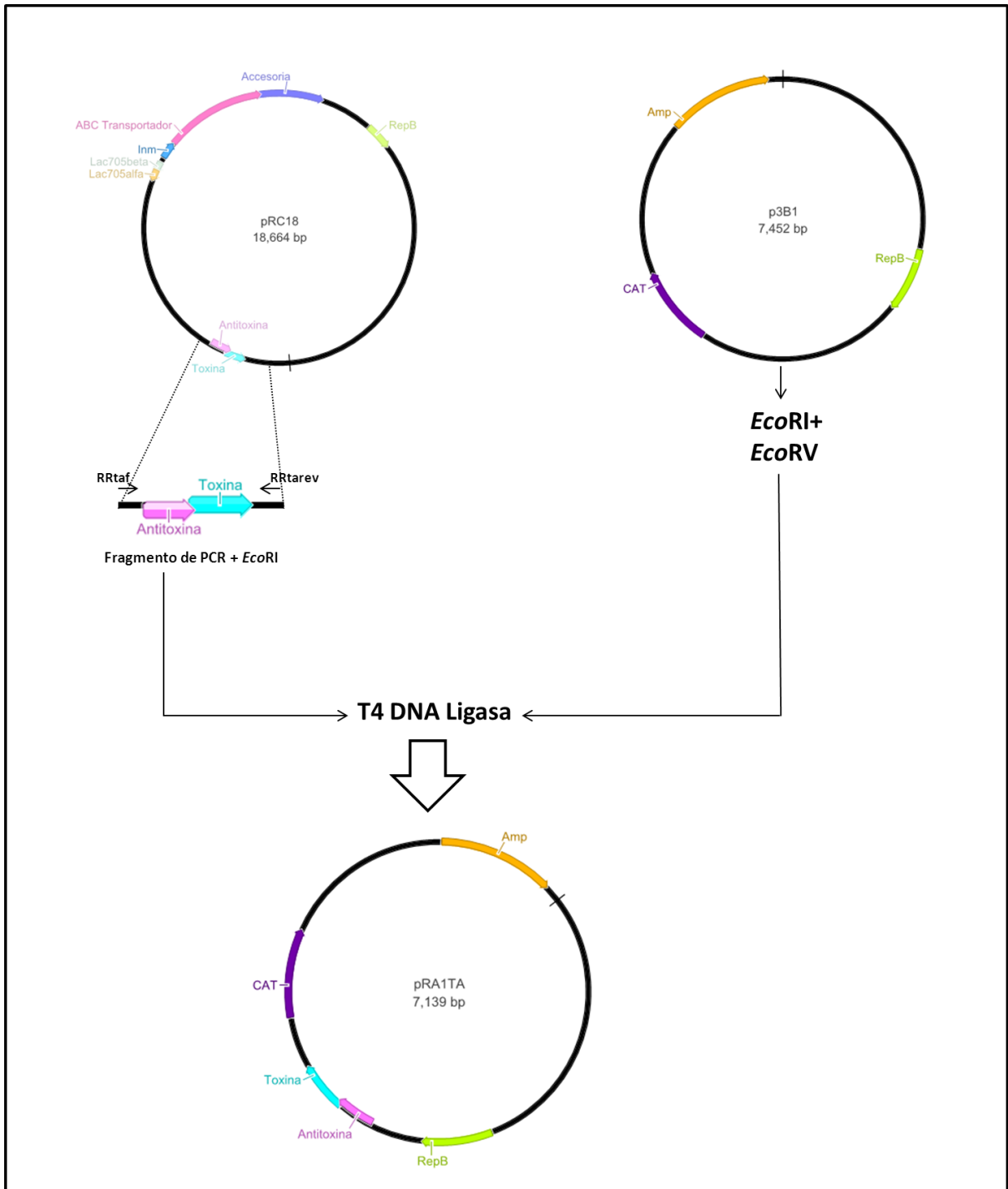


Figura 39. Esquema de la construcción del plásmido pRA1TA. El amplicón de 983 pb fue tratado con una enzima de restricción *EcoRI* y clonado en los sitios *EcoRI/EcoRV* del plásmido p3B1

Luego de transformar células electro-competentes de AR3 con los plásmidos pRA1TA y p3B1 (plásmido vacío), se determinaron los niveles de sensibilidad a Lac705 en las cepas Sac7, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA) en medio sólido (datos no mostrados) y un medio líquido (caldo MRS). En la Figura 40 se muestra la respuesta de las células Sac7 y de AR3 transformadas con los plásmidos p3B1 y pRA1TA a la acción inhibitoria de la lactocina Lac705, donde observamos que los transformantes AR3(pRA1TA) fueron más sensibles que la cepa AR3(p3B1) a Lac705 (400 UA/mL). Sin embargo, los transformantes AR3(pRA1TA) no mostraron la misma sensibilidad a Lac705 que la observada con la cepa Sac7. Estos datos sugieren que el módulo de TA de pRC18 contribuye a la mayor sensibilidad a Lac705 en células sensibles pero no explicaría el fenotipo de la cepa Sac7, indicando que otro factor/es distinto/s a TA serían los responsables del fenotipo de sensibilidad a Lac705 en esta cepa.

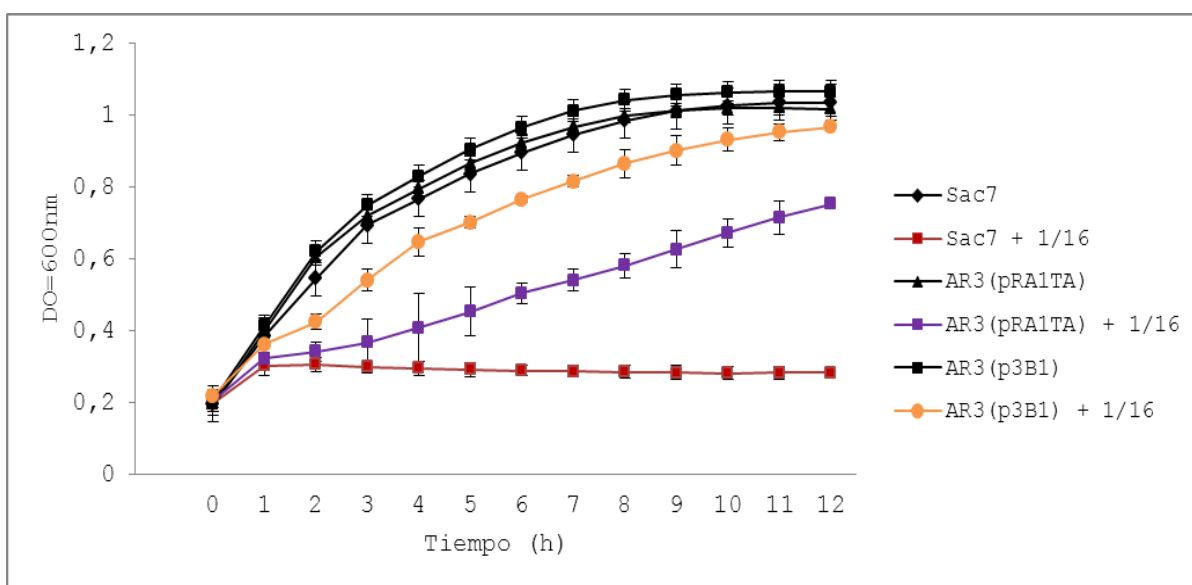


Figura 40. Sensibilidad de Sac7, AR3(p3B1), y AR3(pRA1TA) a lactocina Lac705 (dilución 1/16 corresponde a 400 UA/mL) en medio MRS a 30°C. Los experimentos fueron realizados por triplicado

Inducción de la función RelE por Bacitracina

Similares experimentos al descrito en la Figura 40 se realizaron también con otros factores de estrés. Entre los diferentes factores de estrés ensayados, como concentraciones sub-inhedoras de eritromicina, H₂O₂ y la bacteriocina 1434, la cepa AR3(pRA1TA) sólo mostró una mayor sensibilidad a la bacteriocina 1434 (datos no

Resultados

mostrados). Estos resultados sugieren que la envoltura celular estaría mediando la función tóxica de la toxina RelE inducida por factores de estrés, ya que el blanco de la acción de las bacteriocinas de BAL es la membrana celular. Esto nos llevó a evaluar si bacitracina, un antibiótico cuyo blanco de acción es el undecaprenil-pirofostato, un componente ubicado en la membrana celular e intermediario esencial en la biosíntesis de pared celular, podría inducir un efecto de estrés similar al observado con las bacteriocinas Lac705 y 14324. Los resultados presentados en la Tabla 15 y en las Figuras 41 y 42 indican que la cepa AR3(pRA1TA) fue notablemente más sensible [su concentración mínima inhibitoria (CIM) fue 1/8 respecto a las de las cepas CRL705 y AR3] que la cepa AR3 transformada con el plásmido p3B1 vacío. Sin embargo, la cepa Sac7 fue la más resistente a la acción de este antibiótico (Figuras 41 y 42; Tabla 15). Estos datos sugieren nuevamente que el sistema TA no sería activo en esta cepa.

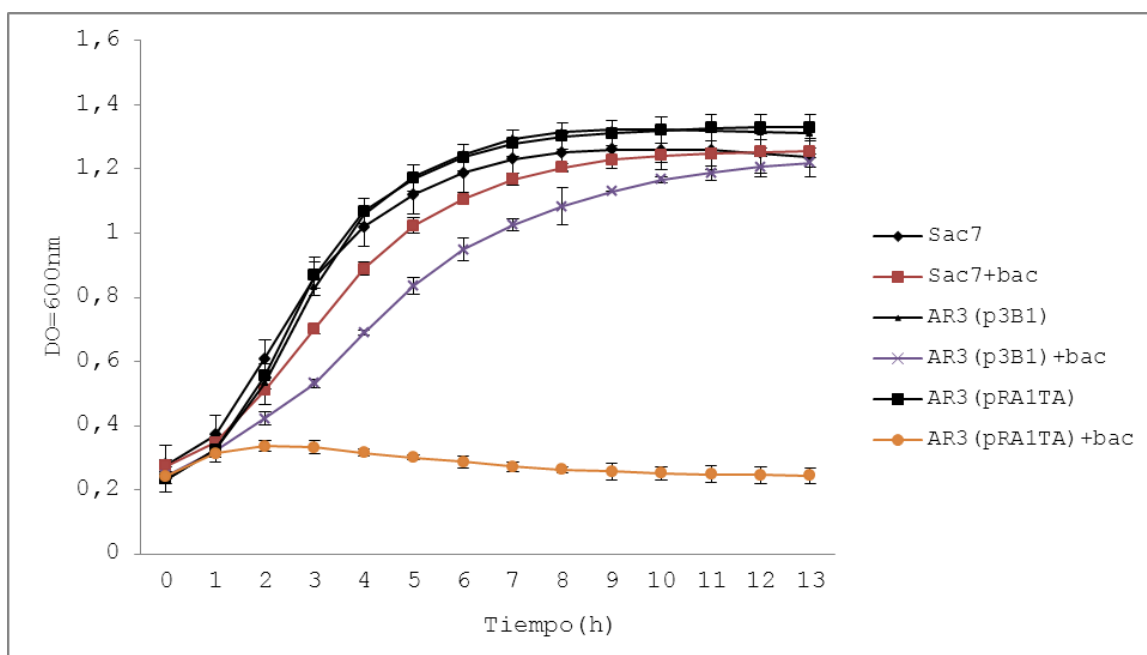


Figura 41. Sensibilidad de las cepas Sac7, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA) al antibiótico bacitracina (0.5 µg/ml) en medio MRS a 30°C. Los experimentos fueron realizados por triplicado

Resultados

Tabla 15. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de las cepas CRL705, Sac7, AR3, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA) a bacitracina

Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
	MH+MRS	MRS
705	32	128
SAC7	128	512
AR3	32	128
AR3-pR1TA	8	16

MH+MRS = medio Muller-Hinton con MRS

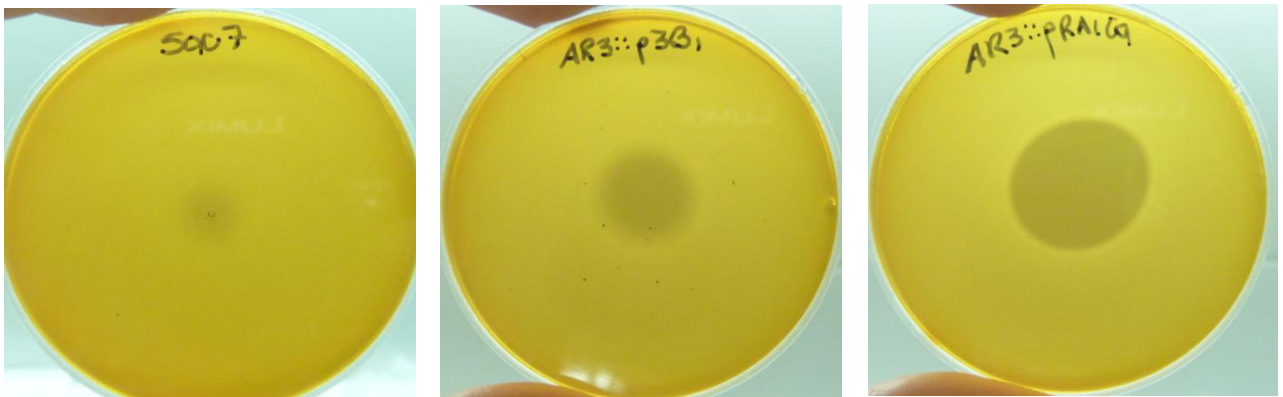


Figura 42. Sensibilidad de las cepas Sac7, AR3(p3B1) y AR3(pRA1TA) a bacitracina (5 $\mu\text{g/ml}$) en medio MRS agar a 30°C. Los experimentos fueron realizados por triplicado

Discusión

En el presente trabajo de Tesis se estudia por primera vez al sistema antilisteria AL705 presente en *Lb. curvatus* CRL705. Se puso en evidencia que los niveles de las bacteriocinas producidas por esta cepa, lactocina Lac705 y antilisteria AL705, varían durante las fases de crecimiento del microorganismo: a 30°C. Así, mientras que los niveles de AL705 se detectan a partir de estadios tempranos y se incrementan conforme avanza el crecimiento exponencial, los niveles de Lac705 son detectables principalmente al final de la fase exponencial y comienzos de la fase estacionaria. Además demostramos que la producción de Lac705 está fuertemente asociada con el crecimiento celular, aun cuando en su estructura genética no se ha detectado la presencia de un sistema transductor de señales de tipo *quorum-sensing* (HK+RR). Por otro lado, la detección de ambas bacteriocinas está también modulada por la temperatura a nivel post-transcripcional, ya que a 39°C no se observó una inhibición de la actividad de los promotores divergentes del sistema Lac705, pero sí de la liberación de las bacteriocinas al medio de cultivo. Este fenotipo fue reversible a 30°C. También demostramos que el medio MRS y la temperatura de 30°C fueron las condiciones óptimas tanto para el crecimiento de la cepa como para la producción de ambas bacteriocinas.

Los estudios bioinformáticos realizados permitieron identificar la presencia de dos operones de bacteriocinas conocidos (*sakp/q* y *sakt/x*), aunque no funcionales, en el genoma de *Lb. curvatus* CRL705. El análisis indicó que en ambos los sistemas de transporte ABC serían inactivos. Así, en el operón *sakp/q*, la presencia de una secuencia *IS* de la familia *IS30* produciría una proteína ABC trunca de 387 aa, que carece del dominio carboxilo ATPasa; mientras que en el operón *sakt/x* la proteína ABC resulta no funcional por la presencia de una secuencia *IS* y de dos fragmentos extra de ADN no caracterizados. Por otro lado, de las cinco bacteriocinas posibles encontradas (SakP, SakQ, SaxT, SacX y el factor IP-TX o enterocina_NKR_5_3D), solo para SakT no se ha descrito una actividad antilisteria. De las otras cuatro bacteriocinas con actividad antilisteria, los análisis realizados sugieren que SakX no se expresaría, debido a la presencia de una *IS* en su región promotora. A su vez, la potencia de la actividad antilisteria de SakQ y enterocina_NKR_5_3D es mínima (Rivas y col. 2014, Ishibashi y col. 2012), comparable con la descrita para SakP y a la observada en nuestros estudios. Esto sugiere que la actividad antilisteria AL705 sería atribuible a SakP. A su vez, la mayor identidad observada entre los sistemas ABC, peptidasas y secuencias líderes de los prepéptidos de los sistemas de lactocina Lac705 y sakacina PQ sugieren que el transportador ABC de Lac705 (presente en pRC18) complementa, en *Lb. curvatus* CRL705, con el de sakacina SakP, bacteriocina con potente actividad antilisteria.

La producción de sakacina SakP ha sido descrita en *Lb. sakei* LTH673 (Tichaczek y col. 1994), *Lb. sakei* Lb764, *Lb. sakei* 27 (Holck y col. 1994), *Lb. sakei* VB286A, *Lb. sakei* CCUG 42687 (Møretrø y col. 2000), *Lb. sakei* I151 (Urso y col. 2006), y *Lb. sakei* subsp. *sakei* 2A (de Carvalho y col. 2010), como así también en cepas de *Lb. curvatus*:

CWBI-B28 (Dortu y col. 2008) y L442 (Cocolin y Rantsiou 2007). Sin embargo, es común detectar la presencia de operones de sakacinas no funcionales en el genoma de cepas de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*. Hühne y col. (1996) reportaron la presencia de análogos de genes *sppR* y *spiA* en el cromosoma de *Lb. sakei* Lb706X y Lb790, dos cepas no productoras de sakacina SakP, e indicaron la presencia de grupos de genes *spp* incompletos. Similares observaciones fueron reportadas por Møretrø y col. (2005) quienes encontraron en todas las cepas estudiadas la región correspondiente a los genes *sppKR*, que codifican los elementos de regulación; y sólo algunas tenían homólogos de *sppE* y *sppT*, responsables del transporte, como así también el gen estructural *sppA* y el de inmunidad *spiA*. En la cepa no productora *Lb. sakei* Lb790 se encontraron los genes homólogos a *sppK*, *sppR*, *sppT* y *sppE*, mientras en la cepa tipo *Lb. sakei* 23K solo los genes homólogos a *sppK* fueron identificados, aunque éste podría no ser funcional ya que se encontraron mutaciones y/o una IS, y a *sppR*. Cocolin y Rantsiou (2007), mediante PCR demostraron la presencia de los genes de las sakacinas P y Q en el cromosoma de *Lb. curvatus* L442 y LTH1174, cepas aisladas de productos cárnicos fermentados. Estudios comparativos entre los genes *sppA* de estas cepas mostraron que éstos están bastante conservados; sin embargo, el gen *sppQ* mostró una delección de 15 nucleótidos cuando fue alineado con otras secuencias sakacina SakQ, a pesar de ello la ausencia de 5 aminoácidos no afectó la actividad de la bacteriocina. Estudios de expresión mostraron que la sakacina SakP se expresaba en *Lb. curvatus* L442 pero no en *Lb. curvatus* LTH1174. La expresión del gen *sppA* fue detectada en un megaplásmido presente en esta cepa. Rivas y col. (2014) detectaron la presencia de genes para la sakacina SakQ en la cepa *Lb. curvatus* ACU-1 aislada de salame artesanal en la provincia del Chaco; los genes estructurales de la sakacina SakP no fueron amplificados sugiriendo que el grupo de genes de esta bacteriocina no estarían presentes. Por último, los genes de las sakacinas SakT, SakX y SakP fueron reportados por Vaughan y col. (2004) en *Lb. sakei* 5, mientras la presencia de los genes estructurales de las sakacinas SakT y SakP fueron descritos por Héquet y col. (2007) en la cepa *Lb. curvatus* 2711, la cual solo produce sakacina SakX. En síntesis, es común encontrar operones no funcionales de estas cuatro bacteriocinas en los genomas de *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*. En general, la organización de los genes encontrados sugiere una estructura de mosaico resultante de reordenamientos sucesivos. A pesar de la variada reorganización en la estructura de los mismos, la alta identidad entre ellos (>97%) indica que todos tienen un origen común y que se diseminan permanentemente. En el caso particular de la cepa *Lb. curvatus* CRL705, la presencia del sistema ABC/Acc de lactocina Lac705 presente en pRC18, reduciría la presión selectiva sobre el sistema ABC de los operones presentes en el genoma y ello explicaría los reordenamientos genéticos y la pérdida de función observada en los mismos.

Un aporte muy importante de este trabajo de Tesis es haber definido las condiciones experimentales para el curado de los plásmidos naturalmente presentes en *Lb. curvatus* CRL705. Si bien las condiciones son simples (uso de altas temperaturas de incubación y un inóculo de células inicial muy diluido), el protocolo permite el aislamiento sistemático de variantes curadas. Este plásmido posee un mecanismo de

replicación *theta*. Se han descrito diversos sistemas, presentes en plásmidos, que controlan la segregación, y por lo tanto la estabilidad, de los mismos. Entre ellos, se mencionan: i) los iterones, secuencias directas repetidas, ubicadas generalmente corriente arriba del gen estructural *repB*, que juegan un papel crucial durante el inicio de la replicación del ADN; controlan la expresión de la proteína Rep y el número de copias del plásmido (Konieczny, 2014); ii) un sistema ParA/ParB (ATPasa y proteína de unión a ADN, respectivamente). Estos genes, presentes en plásmidos de bajo número de copia y también en cromosomas bacterianos, reconocen uno o más sitios que actúan en *cis*, denominados secuencias “tipo-centrómeros”, que aseguran una mejor partición de las moléculas de ADN (Bignell y Thomas, 2001); iii) un sistema toxina-antitoxina que, como se describió en detalle en la Introducción, son sistemas genéticos que cuando se encuentran en plásmidos de bacterias y arqueas, generan una adicción por éstas moléculas extra-cromosómicas y evitan así la propagación de células curadas; iv) la expresión de pequeñas moléculas reguladoras de ARN antisentido que pueden controlar la estabilidad de ARN mensajeros o regular la expresión de genes esenciales de replicación (Brantl 2014); y, por último, v) genes de bacteriocinas: la presencia del antimicrobiano en el medio ejercerá una presión selectiva sobre las cepas que han perdido el plásmido y por lo tanto el sistema de inmunidad a la bacteriocina. En el caso particular de pRC18, no se observaron iterones o un sistema Para/ParB (la expresión de ARN antisentido fue difícil de predecir), por lo que su gran estabilidad podría atribuirse a la presencia de los operones Lac705 y TA. Si bien, la frecuencia de pérdida de pRC18 fue del 3-5% a 39°C, dicha pérdida alcanzó valores superiores al 40% cuando se realizaron experimentos de curado con los plásmidos p3.3, p3B1 y pRA1TA (datos no mostrados), todos ellos plásmidos que portan la función RepB de pRC18. Esto indica que el mecanismo que controla la estabilidad de pRC18 no se encuentra a nivel de la RepB ni del sistema TA presente en pRA1TA (con este plásmido se observaron valores similares de pérdida, >40%, a las temperaturas de 30 y 39°C). En otras palabras, el sistema TA no aporta un fenotipo *pas*. Sin embargo, el sistema TA si contribuye a una mayor sensibilidad a Lac705 en células susceptibles, lo que sugiere un nexo entre el receptor de Lac705 y el complejo toxina-antitoxina: la interacción entre Lac705 y su receptor genera una situación de estrés el cual media la degradación de la antitoxina quedando de esta manera la toxina libre, la cual ejercerá su efecto tóxico a nivel intracelular (Figura 43).

El análisis del sistema TA presente en pRC18 indica que éste está organizado en un operón que produce una antitoxina de 92 aminoácidos (*orf3*), miembro de la superfamilia YefM/Phd, y una toxina de 118 aminoácidos (*orf2*), de la superfamilia RelE. Una situación similar de sistema TA “híbrido” ha sido descrita para el sistema TasA-TasB en *Bacillus thuringiensis* (Fico y Mahillon. 2006), donde la toxina TasB pertenece a la superfamilia Doc y la antitoxina TasA a la superfamilia AbrB.

Recientemente, Kjos y col. (2014) observaron que la proteína de membrana UppP, la cual defosforila el undecaprenil-pirofosfato (Upp) a undecaprenilfosfato (Up) (Bickford y Nick, 2013), actuaría como receptor de las bacteriocinas de dos

componentes (clase IIb) lactococina G, enterocina 1071 (Kjos y col. 2014) y lactococina Q (Zendo y col. 2006). El gen *uppp*, conocido como *bacA* (por “*bacitracin resistance BacA family protein*”), ha sido asociado al fenotipo de resistencia al antibiótico bacitracina. En el genoma de *Lb. curvatus* CRL705 hemos identificado a este gen (gi|354514474|gb|EHE86445.1); la proteína UppP presenta 9 dominios transmembrana (datos no mostrados). Si bien el receptor celular de Lac705 no ha sido identificado aún, proponemos que, siendo Lac705 una bacteriocina de dos componentes y en base a los resultados observados de sensibilidad aumentada a Lac705 y a bacitracina en las células AR3 portadoras del sistema TA, el receptor de Lac705 es también la fosfatasa UppP (Figura 43). Es importante recordar que el UppP y la bacitracina compiten por el mismo sustrato, el Upp. Este compuesto es un lípido que actúa como vehículo en la translocación de precursores de la envoltura celular desde el citosol a la superficie extracelular de la membrana citoplasmática. Mientras que la acción de la fosfatasa es generar Up, el cual es requerido para cargar nuevamente, a nivel citosólico, a las subunidades de biosíntesis (NAcGlc-NAcMur-pentapéptido) del péptido-glicano, la unión del antibiótico a Upp inhibe eficazmente la biosíntesis de péptido-glicano lo que conduce a la lisis celular (Stone y Strominger, 1971). Las bacterias Gram-positivas han desarrollado varios mecanismos de resistencia a bacitracina (Caín y col. 1993; Bernard y col. 2005). Entre estos, la sobreexpresión de UppP confiere resistencia a bacitracina (Caín y col. 1993). Otro mecanismo muy importante está mediado por el sistema de dos componentes/ABC permeasa (TCS/ABC), conocido como transportador BceAB/BceSR de *B. subtilis* (Ohki y col. 2003). Un sistema similar está también presente en el genoma de *Lb. curvatus* CRL705 (datos no mostrados), el cual es homólogo al sistema TCS/ABC SA2417/SA2418 descrito en *St. aureus* (Hiron, 2011).

Nuestro modelo por lo tanto propone que la fosfatasa UppP actuaría como nexo entre el estrés, generado por la unión de Lac705 a la misma, y el sistema TA (Figura 43). En este modelo tanto la cepa CRL 705 como la cepa AR3 muestran la misma sensibilidad a la bacitracina. En las células CRL705, la presencia de la proteína de inmunidad Inm705 impediría la interacción entre Lac705 y UppP, lo que explica su fenotipo de resistencia a Lac705, aún cuando en estas células se exprese el sistema TA. En cambio, la ausencia de Imm705 en las células AR3, explica la sensibilidad a Lac705, sensibilidad que se potencia cuando el sistema TA se expresa en AR3. Esto explicaría la gran estabilidad observada en el plásmido pRC18: la pérdida del mismo (principalmente de los genes *imm705* y *ta*) no sólo haría a las células sensibles a Lac705, sino que tal sensibilidad sería amplificada por la presencia en el citoplasma de la toxina estable y libre. Con respecto a la cepa Sac7, nuestros experimentos sugieren que en la misma los genes del plásmido pRC18 están silenciados (Lac705^{-/s}; incluso el operón TA). Los fenotipos observados en esta cepa, respecto a su sensibilidad a Lac705 y a bacitracina, solo pueden ser explicados si en dicha cepa los niveles de UppP están aumentados: mayores niveles de UppP significa mayores niveles de receptor, y por lo tanto mayor sensibilidad a Lac705. A su vez, mayores niveles de UppP compiten más eficientemente con el sustrato común de bacitracina, Upp, y por lo tanto mayor

resistencia al antibiótico. Estos resultados sugieren las proyecciones del presente trabajo, entre otros, confirmar si UppP es el receptor de Lac705 y, a su vez, si éste actúa como mediador del estrés entre Lac705 y el sistema TA.

Discusión

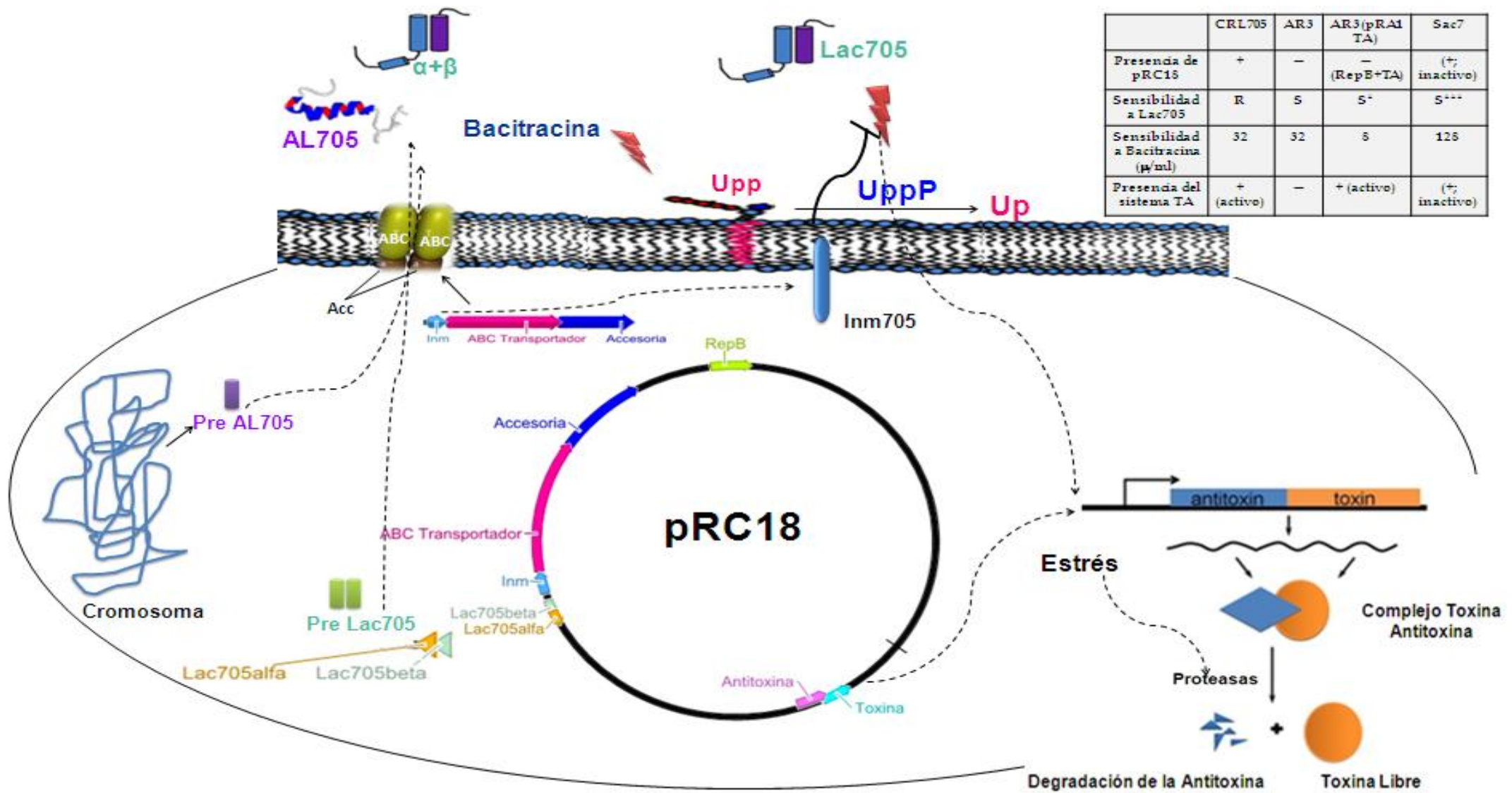


Figura 43: Modelo de interacción entre los blancos de acción de lactocina Lac705 y de bacitracina con el sistema toxina-antitoxina (TA) en *Lb. curvatus* CRL 705. Se propone que la fosfatasa UppP actúa como blanco de Lac705 y que la proteína de inmunidad, Inm705, bloquea la interacción entre UppP y Lac 705. Esto explica el fenotipo de resistencia(R) /sensibilidad (S) a Lac705 (ver Tabla inserta en la Figura): la cepa CRL705, al poseer el plásmido pRC18, expresa la función Inm705 y por lo tanto es resistente a Lac705, mientras que la cepa AR3 carece de pRC18 y de la función Inm705, por lo que es sensible a la acción de la bacteriocina. Los resultados de esta Tesis sugieren que el sistema TA potencia la acción de Lac705: la unión de Lac705 a UppP genera un estrés, el cual activa la degradación proteolítica de la antitoxina, liberando la toxina del complejo TA. Esto explicaría la mayor sensibilidad (fenotipo S+) de las células AR3(pRA1TA). Con respecto a la acción de bacitracina (Bac), su blanco de acción es la molécula Upp (undecaprenil pirofosfato): la interacción de Bac con Upp bloquea la biosíntesis del péptido glicano produciendo la muerte celular. Se propone que el estrés producido por la unión de Bac a Upp también induce, como en el sistema Lac705 la inactivación de la antitoxina; esto explicaría la mayor sensibilidad de las células AR3(pRA1TA) a Bac (CIM=8µg/ml). Si bien en la cepa CRL705 el sistema TA está activo, la presencia de Inm705 inhibiría la transferencia del estrés generado a nivel de la membrana celular al sistema TA, evitando la inactivación de la antitoxina (CIM=32 µg/ml=CIM de la cepa AR3, libre de TA). Respecto a la cepa Sac7, niveles aumentados de UppP podrían explicar su fenotipo de resistencia a Bac (CIM=128 µg/ml) como se ha descrito en otros sistemas bacterianos (Caín y col. 1993): la mayor actividad de UppP sobre Upp, reduciría el blanco de acción a Bac. Si bien en Sac7 el plásmido pRC18 está presente, todos sus genes (i.e., inm705, lac705, ta) están silenciados. Los mayores niveles de UppP (mayor nivel de receptores para Lac705) también explicarían el fenotipo de mayor sensibilidad (S+++) a Lac705 observado en Sac7. Se indica también que el procesamiento y transporte de la lactocina Lac705 y de la antilisteria AL705 se realizan a través de la proteína de transporte ABC y su proteína accesoria cuyos genes se encuentran codificados en el plásmido pRC18

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Tabla 16. Microorganismos empleados

Género y especie	Cepa	Características	Referencia/Origen
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacu169</i> [ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15] <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gy A96</i> <i>thl-1relA1</i>	Sambrook et al. 1989
<i>Lactobacillus curvatus</i>	CRL 705 SAC7 AR3 AR49 AR54	Lac ^{+/R} AL ^{+/R} ; cepa salvaje, productora de las bacteriocinas Lac705 y AL705 Lac ^{-/S} AL ^{-/R} Cepa libre de plásmido Cepa libre de plásmido Cepa libre de plásmido	Vignolo et al. 1993 Cuozzo 2002 Este estudio Este estudio Este estudio
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CRL 691	Cepa sensible a Lac 705	Vignolo et al. 1993
<i>Listeria innocua</i>	7	Cepa sensible a AL705	INRA

INRA: Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, France.

Tabla 17. Plásmidos empleados

Plásmido	Características	Origen/Referencias
pBluescript SKII + (pBS)	Amp ^R	Stratagene ¹
pRC18	Lac705 ^{+/R} ; 18,6 Kb	Cuozzo 2002
pRC12	Sac ⁺ ; 12,5 Kb	Cuozzo 2002
p3B1	pBS:: <i>HindIII-HpaI</i> pRC18; Cm ^R , Amp ^R , RepB; 7.5 kb	Cuozzo 2002
p3.3	pBS:: <i>HindIII-EcoI</i> pRC18; Cm ^R , Amp ^R , Imm ⁷⁰⁵ RepB; 11,5 kb	Cuozzo 2002
pRA1TA	p3B1:: <i>TApRC18</i> ; 7,13kb	Este estudio

Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Sac, sacarosa

¹Stratagene Cloning Systems. 11099 North Torrey Pines Road. La Jolla, CA 92037, USA.

Condiciones para el cultivo de microorganismos.

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C con agitación (200 rpm/min). En el caso de *Lactobacillus* se utilizó MRS y para *Listeria* TSB, ambas sin agitación y a 30°C. Cuando fue necesario, se agregó al medio de cultivo ampicilina (100 µg/ml) o cloranfenicol (5 µg/ml).

Medios de cultivos.

Medio_MRS (Man et al, 1960): en g/l: proteasa peptona, 10; extracto de carne, 10; extracto de levadura, 5; glucosa, 20; citrato de amonio, 2; acetato de sodio, 5; MgSO₄, 0,2; MnSO₄, 0,05; K₂HPO₄, 2; Tween 80, 1. pH = 6,5.

Medio LB (Sambrook et al, 1989): en g/l: cloruro de sodio, 10; tripteína, 10; extracto de levadura, 5.

Medio TSB Medio triptona-soja para *Listeria* (Biokar Diagnostics, Zac de Ther - Allonne - RP10245-F60002 Beauvais CEDEX - FRANCE).

Medio Carne Realizado según según lo descrito en López (2013).

Cuando fue necesario, los medios de cultivos fueron solidificados con agar: 1,2% (“agar duro”) o 0,6% (“agar blando”). La esterilización se realizó en autoclave (121°C, 20 min, 1 atmósfera de sobrepresión).

Determinación de la actividad de la bacteriocina Lac705 (modificado de Cuozzo 2002).

Sobre una caja de Petri con 10 ml de MRS agar duro, se distribuyeron 10 ml de agar blando conteniendo 70 µl de un cultivo *o/n* de la cepa indicadora *L. plantarum* CRL 691. Se dejó solidificar. Se sembraron 5 µl del sobrenadante de la cepa productora de bacteriocina (por ejemplo, CRL705). Luego de incubar a 30°C durante 24 h, se observó la presencia (Lac705+) o ausencia (Lac705-) de un halo de inhibición alrededor del pocillo. El título de Lac705 fue expresado en unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml=1/vol siembra×factor dilución).

Determinación de la actividad de la bacteriocina AL705 (modificado de Cuozzo 2002).

Sobre una caja de Petri con 10 ml de TSA agar duro, se distribuyeron 10 ml de agar blando conteniendo 70 µl de un cultivo *o/n* de la cepa indicadora *L. innocua* 7. Se dejó solidificar. Se sembraron 5 µl del sobrenadante de la cepa productora de bacteriocina (por ejemplo, CRL705) y se incubó a 30°C durante 24 h. Se observó la presencia (AL+) o ausencia (AL-) de un halo de inhibición alrededor del pocillo. El título de AL705 fue expresado en unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml=1/vol siembra×factor dilución).

Método diferido de determinación de la actividad de bacteriocina en placa (Cuozzo 2002).

Se colocó una primera capa de 10 ml de MRS agar 1,2 %. Luego se agregó una segunda capa de 10 ml de MRS agar 1,2 % con la dilución correspondiente de la cepa en estudio (para obtener aproximadamente 150 colonias por placa). Se añadió una tercera capa de 10 ml de MRS agar 1,2 %, y se incubó *o/n*. Luego, se colocaron 10 ml de MRS agar 0,6 % con la cepa indicadora y se incubó por 24 h a 30°C. Se observó la

formación de un halo de inhibición alrededor de las colonias productoras del agente antimicrobiano.

Preparación de células competentes de E. coli por "Shock Térmico" (Ausbel et al. 1999)

A partir de un cultivo (3 ml) crecido durante 16 h, se transfirió una alícuota (400 a 500 μ l) a 100 ml de LB caldo. Se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0,5. Se detuvo el crecimiento enfriando inmediatamente el cultivo en hielo por 20 min. (A partir de esta etapa es importante mantener el cultivo en frío). Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min en centrifuga refrigerada (4 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de una solución de $CaCl_2$ 10 mM frío y estéril. Se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante nuevamente. El sedimento se resuspendió en 10 ml de $CaCl_2$ 10 mM frío y estéril e incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 4.000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 2 ml de $CaCl_2$ 10 mM frío y estéril y se fraccionó de a 50 μ l en microtubos de 1,5 ml. Las células competentes se conservaron en freezer a -70 °C.

Transformación

Se mezclaron 50 μ l de células competentes con 10 μ l de ADN , (0.1-2 μ g de ADN), e incubó en hielo 15-30 min. Luego se colocó durante 2 min a 42°C (shock térmico). Se agregó 0,8 ml de LB tibio e incubó a 37°C durante 45 min con agitación (300 rpm) antes de plaquear en el medio selectivo apropiado. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB agar con ampicilina.

Preparación de células competentes de bacterias lácticas por electroporación (Berthier et al. 1996).

Se activaron las cepas y realizaron tres repiques. El cuarto repique fue realizado en un medio MRS conteniendo NaCl 0,9 M e incubado a 30°C por 16 h. Luego se inoculó 500 μ l de las células en 50 ml de MRS-NaCl 0,9 M y se incubó a 30 °C sin agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4-0,6. Las células se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min a 4 °C y fueron lavadas con H_2O miliQ estéril 4 veces y centrifugadas a 4000 rpm 10 min a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante, las células fueron lavadas con solución sacarosa-glicerol (0,5 M/ 10 % g/v); se centrifugó nuevamente a 4000 rpm 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente las células fueron resuspendidas en 100 o 200 μ l de solución sacarosa:glicerol y fraccionadas (50 μ l) en microtubos de 1,5 ml. Las células competentes fueron conservadas en freezer a -70 °C.

Electroporación (Berthier et al. 1996).

En una cubeta de electroporación fría se mezcló 50 µl de células competentes con 100 ng del plásmido a transformar. Las condiciones de electroporación fueron: 600 Ω, 25 µF y 1,8 Kv. Luego se agregó 700 µl de MRS en la cubeta lo más rápido posible e incubó a 30 °C durante 2:30 h. Por último se sembró 100 µL de forma directa y una dilución 10⁻¹ en el medio selectivo con cloranfenicol y se incubó a 30 °C durante 48 h.

Ensayos de Curado y Estabilidad de Plásmidos

Curado de plásmido

Diluciones seriadas de las células de *Lb. curvatus* CRL705 fueron incubadas durante 15 generaciones a 39°C. A partir del tubo con la mayor dilución que presentó crecimiento, se plaquearon las diluciones correspondientes, para obtener aproximadamente 150 colonias por placa, e incubaron a 30°C por 48 h. Se aislaron colonias al azar para evaluar la producción de ambas bacteriocinas.

Estabilidad de Plásmidos

Se evaluó el efecto de la temperatura (30 y 39 °C) sobre la estabilidad de los plásmidos pRC18, p3Bl, p3.3 y pRA1ta. Para ello, a partir de un cultivo o/n de las células de *Lb. curvatus* crecidas en medio MRS en presencia de cloranfenicol (5 µg/ml), se hicieron crecer por 20 generaciones en medio MRS fresco en ausencia del antibiótico a 30°C y 39°C. Luego, adecuadas diluciones de los cultivos fueron sembradas por duplicado en medio MRS agar con y sin antibiótico. Las placas fueron incubadas a 30 °C y se determinaron las UFC/ml. El porcentaje de células que perdieron el plásmido se determinó mediante la relación UFC/ml en el medio MRS sin antibiótico/ UFC/ml en el medio MRS con antibiótico.

Caracterización de variantes libres de plásmido.

Todas las variantes libres de plásmido fueron sometidas a los siguientes análisis:

* *Reacción RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

Tabla 18. Reacción de PCR

Buffer 5×	5 μl
Cebador 10 μM	2,5 μl
dNTPs 2,5 mM	1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μl
Taq Polimerasa 2,5 U/100 μL	0,25 μl
templado (ADN) 0,5μg/μl	2 μl
H ₂ O	csp 25 μl
Volumen final	25μl

Ciclo de Amplificaciones con el cebador M13 (Huey et al. 1989)

94°C 10'

94°C 1' 45°C 20'' 72°C 2'	}	40 ciclos
---------------------------------	---	-----------

72°C 10'

Ciclo de Amplificación con el cebador GTG×5 (Gevers et al, 2001)

94°C 5'

94°C 1' 40°C 1' 65°C 8'	}	30 ciclos
-------------------------------	---	-----------

65°C 10'

Condiciones de electroforesis en geles de agarosa (1,5%): 80V 105 min. Las bandas de los amplicones se detectaron mediante el uso del colorante fluorescente GelRed™ (Biotium Inc.; Hayward, CA, Estados Unidos) (dilución 1/10.000).

* ***Perfil proteico en geles en condiciones desnaturalizantes (PAGE_SDS)***

El análisis del contenido de proteínas totales se realizó en geles de poliacrilamida-SDS, según lo descrito en Laemmli, 1970 (Cuozzo 2002).

* ***Detección de actividad/resistencia a Lac705 y AL705*** (ver protocolos de determinación de la actividad de las bacteriocinas Lac705 y AL705, descritos previamente).

* ***Velocidad de crecimiento***

La velocidad de crecimiento se determinó a partir de la pendiente de la curva en fase exponencial de crecimiento, según:

$$\mu = \ln X_2 - \ln X_1 / t_2 - t_1$$

donde X_2 = número de colonias en el tiempo t_2

X_1 = número de colonias en el tiempo t_1

t = tiempo [h]

y el tiempo de generación (g) mediante :

$$g = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$$

* ***Fermentación de sacarosa***

Se preparó el medio MRS caldo con sacarosa (2%) en lugar de glucosa y se le añadió el colorante indicador púrpura de bromocresol, que vira su coloración a amarillo ante la disminución del pH por la utilización de este azúcar. El medio inoculado se incubó en estufa a 30°C entre 24-48 h.

Construcción del plásmido pRA1TA

El plásmido recombinante pRA1TA, de 7139 pb, fue construido a partir del plásmido p3B1, al cual se le insertó un fragmento de 983 pb (fragmento TA) que contiene la secuencia del sistema toxina-antitoxina del plásmido pRC18. El fragmento TA fue generado por PCR a partir del ADN cromosómico de la cepa CRL 705, usando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Promega) y los cebadores RRta-f y RRta-r (Tabla 22).

El plásmido p3B1 fue tratado con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV* y el fragmento TA con la enzima *EcoRI*. Se ligó ambos fragmentos con la enzima T4 DNA ligasa. Luego, 20 µl del ligado fueron utilizados para transformar células *E. coli* DH5α competentes. Los plásmidos recombinantes fueron recuperados en medio LB agar 1,2 % (con ampicilina 100 µg/ml), incubados a 37 °C durante 16 h.

Métodos de extracción de ADN.

Extracción de ADN cromosómico de bacterias lácticas (Pospiech y Neumann modificada. 1995)

Las células de un cultivo (5 ml) crecido durante 16 h a 30°C fueron centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm, lavadas con 500 µl de *buffer* Tris-EDTA (TE) y; resuspendidas en 850 µl de solución de lisozima (10 mg/ml *buffer* SET). Luego de incubarlas 2 h a 37 °C, se les adicionó 85 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó nuevamente por 2 h a 55 °C (mezclando periódicamente por inversión). Luego se agregó 335 µl de NaCl 5 M y 1,3 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, mezclando el tubo frecuentemente por inversión. Se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm y la fase acuosa (fase superior) se transfirió a otro tubo de centrifuga. Se precipitó el ADN con 1 volumen de alcohol isopropílico y se lo recuperó por centrifugación durante 3 min a 12.000 rpm. Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó 3 min a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El alcohol residual se dejó evaporar y se resuspendió el ADN en un volumen de 100-500 µl de *buffer* TE o H₂O mili-Q esterilizada.

Protocolo de extracción de ADN plasmídico para E. coli (Birnboim y Doly. 1979).

Las células a partir de 3 ml de un cultivo crecido durante 16 h a 37°C, con agitación vigorosa, fueron cosechadas y resuspendidas en 100 µl de solución Tris-EDTA-glucosa (TEG). Se agregó 200 µl de la solución de lisis, mezclando por inversión el tubo cinco veces. Luego se anadió 150 µl de acetato de potasio 3 M, pH 4,8 y se mantuvo en hielo durante 3- 5 min. Luego de centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente durante 10 min a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70%, se secó a temperatura

Materiales y Métodos

ambiente invirtiendo el tubo y se resuspendió en 50 µl de *buffer* TE. Se trató la mezcla con 3 µl de la solución de RNAsa durante 30 min a 37°C.

Extracción de ADN plasmídico a partir de lactobacilos por el método de Muriana y Klaenhammer (modificado. 1991).

Las células, cosechadas a partir de un cultivo de 5 ml de MRS caldo crecido durante 16 h a 30°C, fueron resuspendidas en 1 ml de solución solución A (sacarosa 8%, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se agregó 100 µl de solución de lisozima (10 mg/ml en solución A) y se incubó en hielo 1 h. Se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas con 500 µl de solución de lisis (SDS 3 %, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8. Ajustar su pH a 12,25 mediante el agregado de aproximadamente 150 µl de una solución de NaOH 5 N en el momento de ser empleada.) e incubadas a 65 °C durante 1 h. Luego de enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 min, se agregó 50 µl de Tris-HCl 2M, pH 7 y se mezcló por inversión. Se agregó 150 µl de NaCl 5 M y se mezcló por inversión (si no se observa precipitado, se agregan otros 75 µl de NaCl 5 M). Se añadió 500 µl de fenol saturado con NaCl 3%, mezclando muy bien por inversión, y 300 µl de cloroformo. Luego de homogeneizar, se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm y se transfirió la fase acuosa superior (aproximadamente 600 µl) a un nuevo tubo Eppendorf. Luego de agregar 600 µl de cloroformo-isoamílico 24:1, se centrifugó durante durante 5 min y se transfirió la fase acuosa superior (aproximadamente 600 µl) a un nuevo Eppendorf. Se precipitó el ADN con 2,5-3 volúmenes de etanol absoluto, y se centrifugó nuevamente durante 10 min a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% y secó a temperatura ambiente. Se resuspendió en 50 µl de *buffer* TE y trató con 3 µl de la solución de RNAsa durante 30 min a 37°C.

Soluciones:

***Buffer* TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8.

Solución de lisozima: 10 mg/ml de lisozima resuspendida en *buffer* SET.

***Buffer* SET:** NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.

TEG: Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH 8.

Solución de lisis: NaOH 0,2 N, SDS 1 %.

Acetato de potasio 3 M, pH 4,8.

Materiales y Métodos

RNAsa libre de DNAsas (10 mg/ml de agua destilada).

TES: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 6,7 %.

Solución 1: EDTA 250 mM pH 8 - Tris-HCl 50 mM pH 8.

Solución de lisis: SDS 20 %, Tris-HCl 50 mM pH 8 - EDTA 20 mM pH 8.

Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción y reacción de ligado de fragmentos de ADN (Sambrook y col., 1989).

Digestión con Enzimas de Restricción

Los cortes con las enzimas de restricción se realizaron utilizando la mezcla de trabajo descrita en la Tabla 19 .

Tabla 19. Mezcla de trabajo para digestión con enzimas de restricción

Mezcla de Trabajo	Cantidad	Concentración Final
Agua destilada	c.s.p. 20 μ l	
Buffer de la enzima (10 X)	2 μ l	1 X
ADN	c.s.p. 2 μ g	0.2 μ g/ μ l
Albúmina sérica bovina (BSA)*	2 μ l	1 X
Enzima de restricción (10 U**/ μ L)	0,5-1 μ l	0,5-1 U**/ μ l

*cuando sea necesario. Vf= 20 μ l

**U (unidad): se define como la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μ g de ADN λ en 1 h a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 μ l.

Incubar a la temperatura correspondiente a la enzima durante 2 h.

Reacción de Ligado

En la Tabla 20, se describe la mezcla de trabajo utilizada en la reacción de ligado.

Tabla 20. Mezcla de trabajo para la reacción de ligado

Mezcla de Trabajo	Cantidad	Concentración Final
Agua destilada	c.s.p. 20 μ l	
Buffer 10 X	2 μ l	1 X
Vector		200 ng
Inserto		40 ng
T4 DNA Ligasa		0,2-2 U

Vf: 20 μ l

Incubar a 14 °C durante 16 h.

Materiales y Métodos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

La mezcla de reacción para realizar las reacciones de PCR fue la siguiente:

Tabla 21. Mezcla de trabajo para una reacción PCR

Mezcla de Trabajo	Cantidad	Concentración final
H ₂ O	13,8 µl	
dNTPs (2,5 mM)	1 µl	0,1 mM c/u
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl	1,5 mM
ADN	1 µl	1-10 ng/µl
Cebador 1 (10 µM)	2,5 µl	1 µM
Cebador 2 (10 µM)	2,5 µl	1 µM
Buffer (10 X)	2,5 µl	1 X
Taq (o Pfu) DNA Polimerasa	0,2 µl	2,5 U/100 µl

Vf = 25 µL

Ciclos y condiciones de la reacción:

94°C 5 min

94°C 1 min

64°C 1 min

72°C 1 min 30 seg

72°C 5 min

} 28 ciclos

Materiales y Métodos

Tabla 22. Secuencias nucleotídicas y Tm de los cebadores utilizados en este trabajo y tamaño de los amplicones esperados

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Tamaño del fragmento (pb)
#1-f	AGGAAAGAAGGGCTAGTAGTGGCA	66,9	900
#2-r	AGATTGTAACCTTGGCAGGTGGGT	69,2	
#3-f	AGGCCTTATAACGTTGAACCCACG	69,3	1200
#4-r	CAATGCAGCTACGCCACAATCCAT	72,4	
#5-f	ATTGAAGGGCTTGAGCGAAAGCGA	72	1200
#6-r	GGGCGAGGTGCCAAGCTAAATTAT	70,2	
Tx-47-101-f	GCATTGCCTTGAGACCTAGT	60,9	951
Tx-47-101-r	GTCGAATCTGGAACCTACATCCC	63,5	
Tx-101-123-f	TGCAAAGGTGTTGTGAAGAAAG	64,0	781
Tx-101-123-r	CTGGGTTTGGCATCATAGGT	63,6	
Tx-123-88-f	CCTATGATGCCAAACCCAGTTA	64,6	491
Tx-123-88-r	GGTGTTCCTGTCTTTCTATGA	63,0	
Tx-88-23-f	CCAAGGTAGATGGTCGTTGAATA	63,7	881
Tx-88-23-r	TCTCGGAGAATCGCAAATAAA	64,7	
Pq-118-84-f	CGGTGGTATGGCAGGAAATA	64,5	385
Pq-118-84-r	CCCAACCGCAACTAACAATAAC	64,0	
Pq-84-111-f	CGATTCGTTATTGCTGGTTATG	63,0	434
Pq-84-111-r	AGCTTGAATCGCCTTCGTT	63,8	
Pq-111-53-f	TCGGCGATCATTGAAGATTT	64,4	420
Pq-111-53-r	AATTGGGCCTACCAACTGTG	63,6	
RRta-f	GGGGAATTCTCCCCACACATTAGGGTCT	76,5	983
RRta-r	GGGAGATCTCGCAGCAGTGTGCGCTTTGCC	81,7	
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	45	
GTG×5	GTGGTGGTGGTGGTG	57,2	
α/β-f	CCACCACCAATTGTTGCCTGTAA	69,5	152
α/β-r	TGCTGCATATGGTCATGCACAAGC	72,9	
Inm-f	TGCCATCCTAGGTTTGAAAGCCC	63,1	151
Inm-r	TGAAATCTGAAGTCACTAACTATCCTGT	70,7	
GyrB-f	GGAGCATCCCTAACACTTCTTG	63,7	105
GyrB-r	CGAAGCGGGTTACGTGTATATC	64,2	

Aislamiento y cuantificación de ARN total

Extracción de ARN con macaloide

A partir de 35 ml de cultivo (se pesaron los pellets en balanza analítica), se cosecharon las células y se resuspendieron en 500 µl de *buffer* TE frío. Luego se agregó: 0,6 g de perlas de vidrio 170 µl de macaloide, 500 µl de fenol:cloroformo, y 25 µl de SDS al 20%. Las células se rompieron con disruptor con 10 ciclos de 1 min con intervalos de 1 min en hielo. Se centrifugó por 15 min, 12.000 rpm, a 4°C. Se observaron las tres capas (de arriba hacia abajo): fase acuosa conteniendo ARN, macaloide, ADN y proteínas; fase fenólica con proteínas; y las perlas de vidrio. Se trató la fase acuosa dos veces con igual volumen de fenol:cloroformo y dos veces con igual volumen de cloroformo:isoamílico, centrifugando las muestras durante 15 min, a 13000rpm para separar las fases. Finalmente se agregó a la fase acuosa 0,1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5) y 3 volúmenes de etanol 70% frío. Se mantuvo a -20°C toda la noche. Se centrifugó 15 min a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El ADN se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 20 µl de agua miliQ. El ARN total fue cuantificado empleando el fluorómetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen, USA) y el kit comercial de cuantificación de ARN Qubit™ RNA Assay Kit (Cat. N° Q32852 Invitrogen, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La síntesis de ADN complementario (ADNc) de cadena simple se realizó mediante transcripción reversa en un termociclador *My Cycler™ Thermal Cycler System with Gradient Option* (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, Estados Unidos), utilizando ~0,5 µg totales de ARN purificado y el kit *SuperScript®III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen TM, Life Technologies Co.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se confirmó por PCR convencional. El ADNc obtenido se cuantificó con un fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen™, Life Technologies Co.) utilizando el kit Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen™, Life Technologies Co.) y se conservó en alícuotas a -70 °C hasta su uso.

La transcripción de los genes estructurales de la lactocina 705, del gen de inmunidad, y del gen *gyrB* se evaluó en todas las fases de crecimiento y a 30 y 39°C utilizando la técnica RT-PCR con cebadores específicamente diseñados para este ensayo (Tabla 22).

PCR en tiempo real

Los niveles de transcripción de los genes de inmunidad y estructurales de la lactocina Lac705 se analizaron mediante RTq-PCR a partir de muestras tomadas a las 6 h de crecimiento, a 30°C y 39°C. Para ello se diseñaron los cebadores específicos para dichos genes y para un gen normalmente utilizado como gen normalizador *gyrB*. Los cebadores se diseñaron (Sigma-Aldrich Co.) en base a la secuencia del genoma de la cepa *Lb. curvatus* CRL 705 disponible en la base de datos (GeneBank®, National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health de Estados Unidos), utilizando la herramienta PrimerQuest (Integrate DNA Tchnologies Inc.) disponible *online*. Todos los pares de cebadores fueron diseñados para obtener fragmentos de entre 100 y 200 pb y con temperaturas de *melting* (T_m) entre 60 y 72 °C. En la tabla 22 se muestra la secuencia y la T_m de cada par de cebador y el tamaño de los fragmentos que generan. La especificidad de cada par de cebadores se verificó mediante PCR convencional y visualización mediante electroforesis en gel de agarosa.

PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa (RT-qPCR) para la cuantificación relativa de la expresión de los genes estructurales y de inmunidad del sistema Lac705

Los ensayos de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador iQTM5 Multicolor RealTime PCR Detection System iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) utilizando como moldes las muestras de ADNc obtenidas previamente. Los productos de amplificación se detectaron utilizando el fluoróforo SYBR Green (contenido en el kit iQTMSYBR®Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.). Este fluoróforo se une específicamente al surco menor del ADN de doble cadena y emite fluorescencia. Cada reacción se realizó por duplicado en un volumen final de 20 µl conteniendo: 10 µl 1X iQTM SYBR® Green Supermix, 200 nM (conc. final) de cada cebador y ~30 ng totales de ADNc. Las condiciones utilizadas fueron: 3 min a 95 °C y 40 ciclos de: 10 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C, seguidos de una curva de *melting* (81 ciclos de 10 seg a 55 °C). La curva de *melting* de los productos obtenidos permite monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar si la fluorescencia emitida se origina exclusivamente a partir de los fragmentos deseados o si proviene, además, de dímeros de cebadores, en cuyo caso se debe disminuir la concentración de los mismos. Se realizaron controles positivos con ADN cromosómico, y controles negativos sin ADNc (NTC, del inglés No Template Control). Para la interpretación de los resultados de expresión relativa de los genes α/β y de Inm en las diferentes condiciones con respecto al gen normalizador se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak. 2008).

Electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y col. 1989)

Se pesó y fundió la concentración requerida de agarosa (0.6-1 %) y volcó sobre el soporte de la cuba de electroforesis para luego dejar solidificar. Las muestras fueron depositadas en los pocillos y se aplicó el voltaje correspondiente (50-90 voltios). Se emplearon cubas de electroforesis de BioRad (BioRad, Richmond, California, USA) y la fuente de poder de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). La tinción de los geles se realizó con una solución del fluorescente GelRed™ (Biotium Inc.; Hayward, CA, Estados Unidos) (dilución 1/10.000). Para visualizar el ADN se utilizó un transiluminador de luz UV (320 nm).

Colorante de frente de corrida electroforética

Buffer TAE 10X

Azul de bromofenol 0.25 %

Xilenocianol 0.25 %

Ficoll (tipo 400) 25 %

Mantener a temperatura ambiente

Soluciones:

Buffer TAE 1 X: Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM, pH = 8,0.

Buffer de Siembra: 0,25% Azul de bromofenol, 15% Ficoll (type 400 Pharmacia) en H₂O.

Análisis Bioinformáticos

En el servidor de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se utilizaron los programas BLASTx y BLASTp, para comparar nuestras secuencias con la base de datos del GenBank; y Blastn2Seq, para realizar el análisis comparativo entre dos secuencias. La búsqueda de los genes asociados a bacteriocinas se realizó con el programa Bagel3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/bagel3>). Para el alineamiento de secuencias de

proteínas se utilizó el programa CLUSTALW. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Para graficar los plásmidos, operones, y para la transcripción de las secuencias de ADN a proteínas se utilizó el programa Geneious. Los cebadores utilizados para amplificar los genes fueron diseñados utilizando el Programa Primer Quest (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) (ISO 2008 modificado)

Se realizó la determinación de la CIM de las cepas de *Lb. curvatus* a bacitracina en microplaca (600 nm). Se ensayaron dos variantes como medios de cultivo: 1- Mueller-Hinton (MH, 90%) + MRS (10%); se prepararon y autoclavaron cada uno de los medios por separado. En el momento del ensayo, se mezclaron los medios en la proporción 90% y 10%, respectivamente; y 2-MRS.

Preparación del Inóculo

Se realizó un pre-cultivo de la cepa en estudio. Se estrió en MRS agar y se incubó a 30°C durante 48 h en anaerobiosis (jarra c/ Anaerogen, Oxoid). Se picaron las colonias y se resuspendió en tubo con 5 ml de solución fisiológica estéril hasta turbidez equivalente al 1 por McFarland ($DO_{625nm}=0.16-0.2 = 3 \times 10^8$ UFC/ml). Se realizó dilución 1/500 en medio de cultivo (MH+MRS o MRS = "Inóculo de trabajo") (Debe ser empleada dentro de los 30 min de preparada).

Preparación del Antibiótico (ATB)

Bacitracina (Fluka-11704). Potencia 70%. Se disuelve en HCl 0.05 N. Se probó la escala comprendida entre 512-1 µg/ml. Se preparó una Solución Stock de 10240 µg/ml. A partir de la cual se preparó la Solución de Trabajo (ST) de 1024 µg/ml. Se prepararon las diferentes concentraciones de ATB.

Ensayo de determinación de CIM

Se cargaron en cada pocillo de microplaca: 50 µl de cada concentración de ATB + 50 µl del "inóculo de trabajo". Control Positivo (CP): 50 µl medio+ 50 µl inóculo de trabajo (Control de crecimiento). Control Negativo (CN): 100 µl medio (Control de

Materiales y Métodos

medio). La microplaca fue incubada en anaerobiosis (jarra c/Anaerogen) a 30°C durante 48 h. La CIM fue determinada con lecturas a $DO_{600\text{ nm}}$.

Referencias

- Aasen, IM., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., and Storrø, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 159–166.
- Ahmed, KD. (2005). Curing of some antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates by the action of sodium dodecyl sulphate and elevated temperature. *Raf. Jour. Sci.* 16, 34-39.
- Alegre, T., Rodríguez, MC., and Mesas, JM. (2009). Characterization of pRS5: a theta-type plasmid found in a strain of *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine that can be used to generate cloning vectors for lactic acid bacteria. *Plasmid* 61, 130-134.
- Allison, GE., Fremaux, C., and Klaenhammer, TR. (1994). Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176, 2235–2241.
- Alpert, CA., Crutz-Le Coq, AM., Malleret, C., and Zagorec, M. (2003). Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5574–5584.
- Amitai, S., Yassin, Y., and Engelberg-Kulka, H. (2004). MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *J. Bacteriol.* 186, 8295–8300.
- Appukuttan, S., and Kadirvelu, J. (2014). Optimization of nutritional and non-nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. *Braz. J. Microbiol.* 45, 81–88.
- Asaduzzaman, SM., Nagao, J., Iida, H., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2009). Nukacin ISK-1, a bacteriostatic lantibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3595-3598.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (editors) 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*. 4^o Ed.
- Barbosa, LC., Garrido, SS., Garcia, A., Delfino, DB., and Marchetto, R. (2010). Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE Toxin. *Bioinformatics* 4, 438-440.
- Belfiore, C., Raya, RR., and Vignolo, GM. (2013). Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). *Springer Plus* 2, 257.
- Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreulx, D., Chippaux, M., and Denizot, F. (2005). BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J. Biol. Chem.* 280, 28852-28857.
- Berthier, F., and Ehrlich, SD. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 997–1007.

- Berthier, F., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Ehrlich, SD., and Morel-Deville, F. (1996). Efficient transformation of *Lactobacillus sakei* by electroporation. *Microbiology* 142, 1273-1279.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, MK., and Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* 580, 1023-1035.
- Bierbaum, GF., Gotz, A., Peschel, T., Kupke, M., van de Kamp, and Sahl, HG. (1996). The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 119-127.
- Bickford, JS., and Nick, HS. (2013). Conservation of the PTEN catalytic motif in the bacterial undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, BacA/UppP. *Microbiology* 159, 2444-2455.
- Bignell, C., and Thomas, CM. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* 91, 1-34.
- Birnboim, HC., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Biswas, S., and Biswas, I. (2014). A conserved streptococcal membrane protein, LsrS, exhibits a receptor-like function for lantibiotics. *J. Bacteriol.* 196, 1578-1587.
- Bleckwedel, J. (2011). Estudio del sistema toxina-antitoxina en la estabilidad del plásmido pRC18. Tesis de Grado. UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- Brantl, S. (2014). Plasmid replication control by antisense RNAs. *Microbiol. Spectr.* 2: PLAS-0001-2013.
- Breukink, EI., Wiedemann, C., van Kraaij, OP., Kuipers, Sahl, H., and de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361-2364.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, PE., and Sahl, HG. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 154-160.
- Brotz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbaum, G., and Sahl, HG. (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30, 317-327.
- Brurberg, MB., Nes, IF., and Eijsink, VG. (1997). Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26, 347-360.
- Brzozowska, I., and Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70, 33-41.
- Bukowski, M., Rojowska, A., and Wladyka, B. (2011). Prokaryotic toxin-antitoxin systems the role in bacterial physiology and application in molecular biology. *Acta Biochim. Pol.* 58, 1-9.

- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, MH., Wyns, L., and Loris, R. (2005). Toxin–antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem. Sci.* 30, 672–679.
- Cain, BD., Norton, PJ., Eubanks, W., Nick, HS., and Allen, CM. (1993). Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 3784–3789.
- Castellano, P., Raya, R., and Vignolo, G. (2003). Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 35–43.
- Castro, MP., Palavecino, NZ., Herman, C., Garro, OA., and Campos, CA. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci.* 87, 321–329.
- Cataudella, I., Sneppen, K., Gerdes, K., and Mitarai, N. (2013). Conditional cooperativity of toxin-antitoxin regulation can mediate bistability between growth and dormancy. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003174.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, SJ., Phansalkar, MS., Rupp, RH., Ganguli, BN., Fehlhaber, HW., Kogler, H. (1992). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiot.* 45, 832–838.
- Chen, H., Tian, F., Li, S., Xie, Y., Zhang, H., and Chen, W. (2012). Cloning and heterologous expression of a bactericin sakacin P from *Lactobacillus sakei* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94, 1061–1068.
- Cherny, I., Rockah, L., and Gazit, E. (2005). The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin. *J. Biol. Chem.* 280, 30063–30072.
- Chikindas, ML., Garcia-Garcera, MJ., Driessen, AJ., Ledebøer, AM., Nissen-Meyer, J., Nes, IF., Abee, T., Konings, WN., and Venema, G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3577–3584.
- Christensen, SK., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14328–14333.
- Christensen, SK., Pedersen, K., Hansen, FG., and Gerdes, K. (2003). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* 332, 809–819.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, MG., and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* 75, 333–348.
- Cintas, LM., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, PE., Nes, IF., and Havarstein, LS. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus*

- faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 180, 1988-1994.
- Cocolin, L., and Rantsiou, K. (2007). Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 1403-1411.
 - Collins, BN., Curtis, PD., Cotter, C., Hill, and Ross, RP. (2010). The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 4416-4423.
 - Cotter, PD., Ross, RP., and Hill, C. (2013). Bacteriocins -a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. 11, 95-105.
 - Cotter, PD., Hill, C., and Ross, RP. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3, 777-788.
 - Crandall, AD., and Montville, TJ. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Appl. Environ. Microbiol. 64, 231-237.
 - Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., and Cui, H. (2012). Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. Int. J. Mol. Sci. 13, 16668-16707.
 - Cuozzo, SA., Castellano, P., Sesma, FJM., Vignolo, GM., and Raya, RR. (2003). Differential roles of the two-component peptides of lactocin 705 in antimicrobial activity. Curr. Microbiol. 46, 180-183.
 - Cuozzo, SA. (2002). Estudio Genético de lactocina 705, una bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* CRL 705. Tesis Doctoral. UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
 - Cuozzo, SA., Sesma, F., Palacios, JM., de Ruíz Holgado, AP., and Raya, RR. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. FEMS Microbiol. Lett. 185, 157-161.
 - Davidson, AL., and Chen, J. (2004). ATP-Binding cassette transporters in bacteria. Annu. Rev. Biochem. 73, 241-268.
 - Davidson, AL., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 317-364.
 - de Carvalho, KG., Bambirra, FH., Kruger, MF., Barbosa, MS., Oliveira, JS., Santos, AM., Nicoli, JR., Bemquerer, MP., de Miranda, A., Salvucci, EJ., Sesma, FJ., and Franco, BD. (2010). Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37, 381-90.
 - De la Cruz, MA., Zhao, W., Farenc, C., Gimenez, G., Raoult, D., Cambillau, C., Gorvel, JP., and Méresse, S. (2013). A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. PLoS Pathog. 9, e1003827.

- De Lorenzo, V., and Pugsley, AP. (1985). Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 666–669.
- Diep, DB., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, IF. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2384-2389.
- Diep, DB., Axelsson, L., Grefslí, C., and Nes, IF. (2000). The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146, 2155–2160.
- Diep, DB., Håvarstein, LS., and Nes, IF., (1995). A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18, 631–639.
- Dortu, C., Huch, M., Holzapfel, WH., Franz, CM., and Thonart, P. (2008). Antilisterial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 581-586.
- Draper, LA., Grainger, KL., Deegan, HP., Cotter, DC., Hill, and Ross, RP. (2009). Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. *Mol. Microbiol.* 71, 1043-1054.
- Draper, LA., Ross, RP., Hill, C., and Cotter, PD. (2008). Lantibiotic immunity. *Curr. Prot. Peptide Sci.* 9, 39-49.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, LM., and Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 564–582.
- Durand, S., Jahn, N., Condon, C., and Brantl, S. (2012). Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol.* 9, 1491–1497.
- Eijsink, VG., Brurberg, MB., Middelhoven, PH., and Nes, IF. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sakei* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178, 2232–2237.
- Engelberg-Kulka, H. (2005). MazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J. Cell Sci.* 118, 4327–4332.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., and Hazan, R. (2006). Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.* 2, e135.
- Erental, A., Sharon, I., and Engelberg-Kulka, H. (2012). Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway. *PLoS Biol.* 10, e1001281.
- Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, MC., Oliver, G., and Toldrá, F. (2001). Effect of curing conditions and *Lactobacillus casei* CRL705 on the hydrolysis of meat proteins. *J. Appl. Microbiol.* 91, 478–487.
- Fadda, S. (1999). Enzimología del curado de productos cárneos. Tesis Doctoral. UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.

- Fang, F., Flynn, S., Li, Y., Claesson, MJ., van Pijkeren, JP., Collins, JK., van Sinderen, D., and O'Toole, PW. (2008). Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3216–3228.
- Fath, MJ., and Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995–1017.
- Fico, S., and Mahillon, J. (2006). TasA-tasB, a new putative toxin-antitoxin (TA) system from *Bacillus thuringiensis* pGI1 plasmid is a widely distributed composite mazE-doc TA system. *BMC Genomics* 7, 259.
- Field, D., Begley, M., O'Connor, PM., Daly, KM., Hugenholtz, F., Cotter, PD., Hill, C., and Ross, RP. (2012). Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both gram positive and gram negative pathogens. *PLoS ONE* 7:e46884.
- Field, D., Hill, C., Cotter, PD., and Ross, RP. (2010). The dawning of a “golden era” in lantibiotic bioengineering: lantibiotic engineering. *Mol. Microbiol.* 78, 1077–1087.
- Fimland, GL., Johnsen, L., Axelsson, MB., Brurberg, IF., Nes, VG., Eijsink, and Nissen-Meyer, J. (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182, 2643–2648.
- Flaherty, RA., Freed, SD., and Lee, SW. (2014). The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS Pathog.* 10, e1004221.
- Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, GM., Holo, H., Nes, IF., and Collins, JK. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology* 148, 973–984.
- Fremaux, C., Ahn, C., and Klaenhammer, TR. (1993). Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3906–3915.
- Gabrielsen, CD., Brede, A., Nes, IF., and Diep, DB. (2014). Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6854–6862.
- Gabrielsen, CD., Brede, A., Hernández, PE., Nes, IF., and Diep, DB. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 56, 2908–2915.
- Gasson, MJ. (1993). Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 3–20.
- Gautam, N., and Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.* 49, 204–211.
- Gerdes, K., Christensen, SK., and Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 371–382.
- Gevers, D., Huys, G., and Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 31–36.

- Ghafourian, S., Raftari, M., Sadeghifard, N., and Sekawi, Z. (2014). Toxin-antitoxin systems: classification, biological function and application in biotechnology. *Curr. Iss. Mol. Biol.* 16, 9–14.
- Ghosh, S., Mahapatra, NR., Ramamurthy, T., and Banerjee, PC. (2000). Plasmid curing from an acidophilic bacterium of the genus *Acidocella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 271–274.
- Gillor, O., Etzion, A., and Riley, MA. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 591–606.
- Goeders, N., and Van Melderen, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins* 6, 304–324.
- Gong, X., Martin-Visscher, LA., Nahirney, D., Vederas, JC., and Duszyk, M. (2009). The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1797–1803.
- Gotfredsen, M., and Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin–antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* 29, 1065–1076.
- Gratia A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 93, 1040–1041.
- Gravesen, AA., Jydegaard Axelsen, M., Mendes da Silva, J., Hansen TB., and Knochel, S. (2002). Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 756–764.
- Gursky, LJ., Martin, NI., Derksen, DJ., van Belkum, MJ., Kaur, K., Vederas, JC., Stiles, ME., and McMullen, LM. (2006). Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch. Microbiol.* 186, 317–325.
- Hasper, HE., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2004). Assembly and stability of nisin-Lipid II pores. *Biochemistry* 43, 11567–11575.
- Havarstein, LS., Diep, DB., and Nes, IF. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229–240.
- Havarstein, LS., Holo, H., and Nes, IF. (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140, 2383–2389.
- Hayes, CS., and Sauer, RT. (2003). Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? *Cell* 112, 2–4.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496–1499.
- Hayes, F., and Van Melderen, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 386–408.
- Hazan, R., Sat, B., and Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol.* 186, 3663–3669.

- Hebert, EM., Saavedra, L., Taranto, MP., Mozzi, F., Magni, C., Nader, MEF., Font de Valdez, G., Sesma, F., Vignolo, G., and Raya, RR. (2012). Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705. *J. Bacteriol.* 194, 538–539.
- Henderson, JT., Chopko, AL., and van Wassenaar, PD. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5–12.
- Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fremaux, C., and Berjeaud, JM. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 67–74.
- Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Débarbouillé, M., and Msadek, T. (2011). Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol. Microbiol.* 81, 602–622.
- Holo, HO., Nilssen, and Nes, IF. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173, 3879–3887.
- Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, SE., Aukrust, T., and Blom, H. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2715–2720.
- Holck, AL., Axelsson, L., Hühne, K., and Kröckel, L. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 143–149.
- Hollenstein, K., Dawson, RJ., and Locher, KP. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 412–418.
- Holzapfel, WH., Geisen, R., and Schillinger, U. (1995). Ecological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343–362.
- Hsu, STD., Breukink, E., Tischenko, EMA., Lutters, GB., de Kruijff, R., Kaptein, AM., Bonvin JJ., and van Nuland, NAJ. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 963–967.
- Hu, M., Zhang, X., Li, E., and Feng, YJ. (2010). Recent advancements in toxin and antitoxin systems involved in bacterial programmed cell death. *Int. J. Microbiol.* 2010, 1–10.
- Huey, B., and Hall, J. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171, 2528–2532.
- Hühne, K., Axelsson, L., Holck, A., and Kröckel, L. (1996). Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sakei* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sakei* strains. *Microbiology* 142, 1437–1448.
- Inglis, RF., Bayramoglu, B., Gillor, O., and Ackermann, M. (2013). The role of bacteriocins as selfish genetic elements. *Biol. Lett.* 9, 20121173.

- Ishibashi, N., Himeno, K., Fujita, K., Masuda, Y., Perez, RH., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2012). Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 947-953.
- Ishii, S., Yano, T., Ebihara, A., Okamoto, A., Manzoku, M., and Hayashi, H. (2010). Crystal structure of the peptidase domain of *Streptococcus* ComA, a bifunctional ATP-binding cassette transporter involved in the quorum-sensing pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 10777-10785.
- Jack, RW., Tagg, JR., and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* 47, 33-48.
- Joerger, MC., and Klaenhammer, TR. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167, 439-446.
- Jones, PM., and George, AM. (2002). Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12639-12644.
- Jorgensen, MG., Pandey, DP., Jaskolska, M., and Gerdes, K. (2009). HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 191, 1191-1199.
- Karpiński, TM., and Szkaradkiewicz, AK. (2013). Characteristic of bacteriocins and their application. *Pol. J. Microbiol.* 62, 223-235.
- Kastin, AJ. (2006). *Handbook of biologically active peptides*. Amsterdam; Boston, Academic Press.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J., and Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4431-4437.
- Kawano, M. (2012). Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: *hok / sok*, *ldr / rdl*, *symE / symR*. *RNA Biol.* 9, 1520-1527.
- Kawulka, KE., Sprules, T., Diaper, CM., Whittal, RM., McKay, RT., Mercier, P., Zuber, P., and Vederas, JC. (2004). Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry* 43, 3385-3395.
- Kemperman, R., Jonker, M., Nauta, A., Kuipers, OP., and Kok, J. (2003). Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5839-5848.
- Khouiti, Z., and Simon, JP. (2004). Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated

- by temperature, pH and medium composition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 5–10.
- Kjos, MC., Oppegard, DB., Diep, IF., Nes, JW., Veening, J., Nissen-Meyer, and Kristensen, T. (2014). Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol. Microbiol.* 92, 1177-1187.
 - Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, DJ., Holo, H., Cintas, LM., Snipen, L., Hernandez, PE., Nes, IF., and Diep, DB. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157, 3256–3267.
 - Kjos, M., Nes, IF., and Diep, DB. (2011). Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3335-3342.
 - Kjos, M., Nes, IF., and Diep, DB. (2009). Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology* 155, 2949-2961.
 - Klaenhammer, TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–86.
 - Klaenhammer, TR. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337–349.
 - Kleerebezem, M., and Quadri, LE. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* 22, 1579–1596.
 - Klimina, KM., Kjasova, DK., Poluektova, EU., Krügel, H., Leuschner, Y., Saluz, HP., and Danilenko, VN. (2013). Identification and characterization of toxin-antitoxin systems in strains of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from humans. *Anaerobes* 22, 82–89.
 - Kolodkin-Gal, I., and Engelberg-Kulka, H. (2006). Induction of *Escherichia coli* chromosomal *mazEF* by stressful conditions causes an irreversible loss of viability. *J. Bacteriol.* 188, 3420–3423.
 - Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., and Engelberg-Kulka, H. (2007). A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* 318, 652–655.
 - Konieczny, I., Bury, K., Wawrzycka, A., and Wegrzyn, K. (2014). Iteron plasmids. *Microbiol. Spectr.* 2. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0026-2014
 - Koort, J. (2004). *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1621–1626.
 - Kraaij, C., Breukink, E., Rollema, HS., Siezen, RJ., Demel, RA., Kruijff, B., and Kuipers, OP. (1997). Influence of charge differences in the C-terminal part of nisin on antimicrobial activity and signaling capacity. *Eur. J. Biochem.* 247, 114–120.

- Kuipers, OP., Beerthuyzen, MM., de Ruyter, PG., Luesink, EJ., and de Vos, WM. (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270, 27299–27304.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Leães, FL., Velho, RV., Caldas, DGG., Pinto, JV., Tsai, SM., and Brandelli, A. (2013). Influence of pH and temperature on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* sp. P11. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 149–154.
- Leroy, F., and de Vuyst, L. (1999). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 974–981.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (1999). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5350–5356.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2001). Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4407–4413.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., and Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotechnol.* 93, 27–34.
- Li, H., and O’Sullivan, DJ. (2006). Identification of a *nisI* promoter within the *nisABCTIP* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J. Bacteriol.* 188, 8496–8503.
- Li, X., Alvarez, V., Harper, WJ., and Wang, HH. (2011). Persistent, toxin-antitoxin system-independent, tetracycline resistance-encoding plasmid from a dairy *Enterococcus faecium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7096–7103.
- Liyoy, VS., Machon, C., Tabone, M., Gonzalez-Pastor, JE., Daugelavicius, R., Ayora, S., and Alonso, JC. (2012). The ζ toxin induces a set of protective responses and dormancy. *PLoS One.* 2012;7(1):e30282.
- Liu, X., Vederas, JC., Whittall, RM., Zheng, J., Stiles, ME., Carlson, D., Franz, CM., McMullen, LM., and van Belkum, MJ. (2011). Identification of an N-terminal formylated, two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 710C. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5602–5608.
- Loh, JMS., and Proft, T. (2013). Toxin-antitoxin-stabilized reporter plasmids for biophotonic imaging of Group A *streptococcus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9737–9745.
- López, C. (2013). Optimización de la calidad global de embutidos fermentados argentinos mediante el uso de microorganismos seleccionados. Estudios bioquímicos y proteómicos. Tesis Doctoral. UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.

- Lozano, JCN., Meyer, JN., Sletten, K., Peláz, C., and Nes, IF. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Gen. Microbiol. 138, 1985-1990.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., and Gruss, A. (1992). New thermosensitive plasmid for Gram-positive bacteria. J. Bacteriol. 174, 5633-5638.
- Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., and Gillor, O. (2013). The weak shall inherit: bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. PLoS ONE 8, e63837.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, DM., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, JH., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., and Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 15611-15616.
- Makarova, KS., Wolf, YI., and Koonin, EV. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. Biol. Direct 4, 19.
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, JL., and Jimenez-Diaz, R. (2004). Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of Gram-positive bacteria. Arch. Microbiol. 181, 8-16.
- Man, J., Rogosa, M., and Sharpe, M. (1960) A medium for the cultivation of *lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135.
- Marki, F., Hanni, E., Fredenhagen, A., and van Oostrum, J. (1991). Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2. Biochem. Pharmacol. 42, 2027-2035.
- Markovski, M., and Wickner, S. (2013). Preventing bacterial suicide: a novel toxin-antitoxin strategy. Mol. Cell 52, 611-612.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, LM., and Hernández, PE. (2007). Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 667-675.
- Martin-Visscher, LA., Gong, X., Duszyk, M., and Vederas, JC. (2009). The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. J. Biol. Chem. 284, 28674-28681.
- Martin-Visscher, LA., van Belkum, MJ., Tsodikova, SG., Whittall, RM., Zheng, J., McMullen, LM., and Vederas, JC. (2008). Isolation and characterization of Carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. Appl. Environ. Microbiol. 74, 4756-4763.

- Martinez, B., Bottiger, T., Schneider, T., Rodriguez, A., Sahl, HG., and Wiedemann, I. (2008). Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4666-4670.
- Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., and Valdivia, E. (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 176, 6334-6339.
- Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L., and Eijsink, VGH. (2005). Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3565-3574.
- McKay, LL. (1983). Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 259-274.
- McKinley, JE., and Magnuson, RD. (2005). Characterization of the Phd repressor-antitoxin boundary. *J. Bacteriol.* 187, 765-770.
- Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, GM., and Süßmuth, RD. (2010). Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49, 1151-1154.
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., and De Vuyst, L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 41-52.
- Miller, P., and McMullen, LM. (2014). Mechanism for temperature-dependent production of piscicolin 126. *Microbiology* 160, 1670-1678.
- Million-Weaver, S., and Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* 75, 27-36.
- Moll, GN., Konings, WN., and Driessen, AJ. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 185-198.
- Møretrø, T., Naterstad, K., Wang, E., Aasen, IM., Chaillou, S., Zagorec, M., and Axelsson, L. (2005). Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156, 949-960.
- Møretrø, T., Aasen, IM., Storrø, I., and Axelsson, L. (2000). Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88, 536-545.
- Mruk, I., and Kobayashi, I. (2014). To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res.* 42, 70-86.
- Mulders, JW., Boerrigter, IJ., Rollema, HS., Siezen, RJ., and de Vos, WM. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201, 581-584.

- Müller, E., and Radler, F. (1993). Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiol. (Praha)* 38, 441-446.
- Muriana, PM., and Klaenhammer, TR. (1991). Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* 173, 1779-1788.
- Nes, IF., Brede, DA., and Holo, H. (2006). The non-lantibiotic heat-stable bacteriocins in Gram positive bacteria. *Handbook of Biological Active Peptides*. A. J. Kastin. San Diego, Ca, USA, Academic Press.
- Nes, IF., Diep, DB., Havarstein, LS., Brurberg, MB., Eijsink, V., and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 113-128.
- Nes, IF., and Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50-61.
- Netz, DJ., Sahl, HG., Marcelino, RJ., dos Santos Nascimento, SS., de Oliveira, M., Soares, B., and do Carmo de Freire Bastos, M. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311, 939-949.
- Nieto, C., Sadowy, E., de la Campa, AG., Hryniewicz, W., and Espinosa, M. (2010). The *relBE2Spn* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae*: role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates. *PLoS ONE* 5, e11289.
- Nilsen, T., Nes, IF., and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975-2984.
- Nishie, M., Nagao, JI., and Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17, 1-16.
- Nissen-Meyer, J., Oppedgård, C., Rogne, P., Haugen, HS., and Kristiansen, PE. (2010). Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2, 52-60.
- Nyström, T. (1998). To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 283-290.
- Olaya, MJ. (2007). Construcción de una variante de *Lactobacillus curvatus* productora de Lactocina lac705. Estudios complementarios del plásmido pRC18. Tesis de Grado. UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- O'Connor, EM., and Shand, RF., (2002). Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 23-31.
- Ogunbanwo, ST., Sanni, AI., and Onilude, AA. (2003). Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 179-184.
- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003). The BceRS two-component regulatory system induces

- expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49, 1135-1144.
- Oswald, C., Holland, IB., and Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters: What can structures tell us? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372, 385-399.
 - Ovchinnikov, KV., Kristiansen, PE., Uzelac, G., Topisirovic, L., Kojic, M., Nissen-Meyer, J., . Nes, IF., and Diep, DB. (2014). Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* 289, 23838-23845.
 - Palacios, J., Vignolo, G., Farías, ME., de Ruiz Holgado, AP., Oliver, G., and Sesma, F. (1999). Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Microbiol. Res.* 154, 199-204.
 - Pandey, DP. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33, 966-976.
 - Pedersen, K., Zavialov, AV., Pavlov, MY., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 112, 131-40.
 - Pedersen, K., Christensen, SK., and Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 45, 501-510.
 - Perdigón, G., Fuller, R., and Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2, 27-42.
 - Perez, RH., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Factories* 13, S3.
 - Pospiech, A., Neumann, B., and Ciba-Geigy, AG. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *TIG* 11, 217-218.
 - Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., and Hastings, JW. (2000). Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3098-3101.
 - Rea, MC., Sit, CS., Clayton, E., O'Connor, PM., Whittal, RM., Zheng, J., Vederas, JC., Ross, RP., and Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 107, 9352-9357.
 - Rees, DC., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 218-227.
 - Rheinberg, A., Swierzy, IJ., Nguyen, TD., Horz, HP., and Conrads, G. (2013). Cryptic *Streptococcus mutans* 5.6-kb plasmids encode a toxin-antitoxin system for plasmid stabilization. *J. Oral Microbiol.* 5.

- Riley, MA., and Wertz, JE. (2002a). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137.
- Riley, MA., and Wertz, JE. (2002b). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84, 357–364.
- Rivas, FP., Castro, MP., Vallejo, M., Marguet, E., and Campos, CA. (2014). Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. *Meat Sci.* 97, 475–479.
- Roces, C., Courtin, Kulakauskas, P S., Rodriguez, A., Chapot-Chartier, MP., and Martinez, B. (2012). Isolation of *Lactococcus lactis* mutants simultaneously resistant to the cell wall-active bacteriocin Lcn972, lysozyme, nisin, and bacteriophage c2. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4157–4163.
- Roos, U., Harkness, RE., and Braun, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol. Microbiol.* 3, 891–902.
- Ross, KF., Ronson, CW., and Tagg JR. (1993). Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2014–2021.
- Sambrook, J., Fritisch, EF., and Maniatis, T. (editors) 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2° Ed. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Samson, JE., Bélanger, M., and Moineau, S. (2013). Effect of the abortive infection mechanism and type III toxin/antitoxin system AbiQ on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages. *J. Bacteriol.* 195, 3947–3956.
- Sandiford, S., and Upton, M. (2012). Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1539–1547.
- Saraniya, A., and Jeevaratnam, K. (2014). Optimization of nutritional and non-nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. *Braz. J. Microbiol.* 45, 81–88.
- Sahl, HG., and Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 52, 41–79.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001). Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger *mazEF* lethality. *J. Bacteriol.* 183, 2041–2045.
- Schaufler, K., Wieler, LH., Semmler, T., Ewers, C., and Guenther, S. (2013). ESBL-plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be “cured” of wild-type *Escherichia coli* using a heat technique. *Gut Pathog.* 5, 34.
- Schmittgen, TD., and Livak, KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.

- Shelburne CE., An, FY., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, DE., and Lantz, MS. (2007). The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 297-300.
- Sorvig, E. (2005). Plasmid p256 from *Lactobacillus plantarum* represents a new type of replicon in lactic acid bacteria, and contains a toxin-antitoxin-like plasmid maintenance system. *Microbiology* 151, 421-431.
- Spengler, G., Molnár, A., Schelz, Z., Amaral, L., Sharples, D., and Molnár, J. (2006). The mechanism of plasmid curing in bacteria. *Curr. Drug Targets* 7, 823-841.
- Stone, KJ., and Strominger, JL. (1971). Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 68, 3223-3227.
- Sun, Z., Zhong, J., Liang, X., Liu, J., Chen, X., and Huan, L. (2009). Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1964-1973.
- Syed, MA., and Lévesque, CM. (2012). Chromosomal bacterial type II toxin-antitoxin systems. *Can. J. Microbiol.* 58, 553-562.
- Tagg, JR., Dajani, AS., and Wannamaker, LW. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
- Tashiro, Y., Kawata, K., Taniuchi, A., Kakinuma, K., May, T., and Okabe, S. (2012). RelE-mediated dormancy is enhanced at high cell density in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194, 1169-1176.
- Alegre, T., Rodríguez, MC., and Mesas, JM. (2009). Characterization of pRS5: a theta-type plasmid found in a strain of *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine that can be used to generate cloning vectors for lactic acid bacteria. *Plasmid* 61, 130-134.
- Tessema, GT., Møretrø, T., Snipen, L., Axelsson, L., and Naterstad, K. (2011). Global transcriptional analysis of spontaneous sakacin P resistant mutant strains of *Listeria monocytogenes* during growth on different sugars. *PLoS ONE* 6, e16192.
- Tian, QB., Ohnishi, M., Tabuchi, A., and Terawaki, Y. (1996). A new plasmid-encoded proteic killer gene system: cloning, sequencing, and analyzing *hig* locus of plasmid Rts1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 280-284.
- Tichaczek, PS., Vogel, RF., and Hammes, WP. (1994). Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LTH 673. *Microbiology* 140, 361-367.
- Todorov, SD., and Dicks, LMT. (2004). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.* 44, 305-316.
- Todorov, SD., and Dicks, LMT. (2005). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Ann. Microbiol.* 55, 283-289.

- Todorov, SD., and Dicks, LMT. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiol. Res.* 161, 102–108.
- Todorov, S., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B., and Ivanova, I. (2000). Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 14, 50–55.
- Tomás, J., Bru, E., Wiese, B., de Ruiz Holgado, AAP., and Nader-Macías, ME. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J. Appl. Microbiol.* 93, 714–724.
- Trevors, JT. (1986). Plasmid curing in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 32, 149–157.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., and Van Melderen, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J. Bacteriol.* 189, 6101–6108.
- Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (1988). Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J. Bacteriol.* 170, 1461–1466.
- Tulini, FL., Lohans, CT., Bordon, KC., Zheng, J., Arantes, EC., Vederas, JC., and De Martinis, EC. (2014). Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 81–88.
- Unterholzner, SJ., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mob. Genet. Elem.* 3, e26219.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., and Cocolin, L. (2006a). Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 232–239.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., and Cocolin, L. (2006b). Sequencing and expression analysis of the sakacin P bacteriocin produced by a *Lactobacillus sakei* strain isolated from naturally fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 480–485.
- Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Hechard, YR., Chauhan-Haubrock, J., Hastings, W., and Rautenbach M. (2004). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 3025–3033.
- Vadyvaloo, V., Hastings, JW., van der Merwe, MJ., and Rautenbach, M. (2002). Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5223–5230.
- van Belkum, MJ., Martin-Visscher, LA., and Vederas, JC. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* 19, 411–418.
- Van Melderen, L., and De Bast, MS. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 5, e1000437.

- Vaughan, A. (2004). Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 377–384.
- Vaughan, A., Eijsink, VGH., and Van Sinderen, D. (2003). Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7194–7203.
- Vaughan, A., Eijsink, VGH., O’Sullivan, TF., O’Hanlon, K., and Van Sinderen, D. (2001). An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91, 131–138.
- Verluyten, J., Leroy, F., and de Vuyst, L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolate *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5081–5088.
- Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, MN., de Ruiz Holgado, AA., and Oliver, G. (1996). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by “Lactocin 705”, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 397–402.
- Vignolo, GM., de Kairuz, MN., de Ruiz Holgado, AAP., and Oliver, G. (1995). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 5–10.
- Vignolo, GM., Suriani, F., Ruiz Holgado, AAP., and Oliver, G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 344–349.
- Wang, X., and Wood, TK. (2011). Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5577–5583.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, SH., Ma, Q., Brown, BL., Pu, M., Tarone, AM., Benedik, MJ., Peti, W., Page, R., and Wood, TK. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat. Chem. Biol.* 7, 359–366.
- Wang, X., Lord, DM., Cheng, HY., Osbourne, DO., Hong, SH., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, MJ., Page, R., and Wood, TK. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* 8, 855–861.
- Wan, X., Saris, PE., and Takala, TM. (2015). Genetic characterization and expression of leucocin B, a class IId bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. *Res. Microbiol.* 166, 494–503.
- Wescombe, PA., Upton, M., Dierksen, KP., Ragland, NL., Sivabalan, S., Wirawan, RE., Inglis, MA., Moore, CJ., Walker, GV., Chilcott, CN., Jenkinson, HF., and Tagg, JR. (2006). Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral *Streptococci* and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1459–1466.
- Wiedemann, I., Bottiger, T., Bonelli, RR., Schneider, TH., Sahl, G., and Martinez, B. (2006). Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2809–2814.

- Wiedemann, I., Bottiger, T., Bonelli, RR., Wiese, A., Hagge, SO., Gutschmann, T., Seydel, U., Deegan, L., Hill, C., Ross, P., and Sahl, HG. (2006). The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* 61, 285-296.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, OP., Bierbaum, G., de Kruijff, B., and Sahl, HG. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276, 1772-1779.
- Wirawan, RE., Klesse, NA., Jack, RW., and Tagg, JR. (2006). Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1148-1156.
- Wu, X., Wang, X., Drlica, K., and Zhao, X. (2011). A toxin-antitoxin module in *Bacillus subtilis* can both mitigate and amplify effects of lethal stress. *PLoS ONE* 6, e23909.
- Yamaguchi, Y., Park, JH., and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Genet.* 45, 61-79.
- Yang, SC., Lin, CH., Sung, CT., and Fang, JY. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* 5.
- Yarmolinsky, MB. (1995). Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267, 836-837.
- Yuan, J., Zhang, ZZ., Chen, XZ., Yang, W., and Huan, LD. (2004). Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 806-815.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006). Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU4. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3383-3389.
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., and Hamida, JB. (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein J.* 29, 432-439.