



**Universidad
Andrés Bello**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Ciencias Biológicas

Ingeniería en Biotecnología

**SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL COMPONENTE *nlmA*
DE LA MUTACINA IV DE *Streptococcus mutans* UA159, EN LA CEPA DE
Escherichia coli BL21 (DE3).**

Guillermo Sebastián Wiese Plaza

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Gino Corsini Acuña, en el laboratorio de Bacteriología Molecular, Financiado por Corbio-Q, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Gino Corsini Acuña
Director de Tesis

Dr. Rubén Polanco Oteiza
Comisión de Tesis

Dr. Mauricio Bittner Ortega
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE

Año 2017



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL COMPONENTE *nImA* DE
LA MUTACINA IV DE *Streptococcus mutans* UA159, EN LA CEPA DE
Escherichia coli BL21 (DE3).

Tesis Presentada como parte de los requisitos para optar
al Grado de **Magister en Biotecnología**

Director: Dr. Gino Corsini Acuña
Centro de Investigación Biomédica
Universidad Autónoma de Chile

Guillermo Wiese Plaza

Santiago, Chile

Diciembre, 2016

Agradecimientos

Quiero partir agradeciendo a mi familia por todo el apoyo entregado en esta larga pero linda etapa. Agradezco infinitamente la confianza que, a ojos ciegos, depositaron en mí, especialmente a mi Madre y mi Padre, por cada esfuerzo que hicieron con el fin de entregarme los mejores valores, aptitudes y herramientas que me han ayudado a comprender que, una caída, no es una derrota y que de ello, se debe aprender.

Agradezco a cada docente y ayudante de la Universidad Andrés Bello, en especial a los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, que participaron en mi formación y a la comisión evaluadora de esta tesis, Rubén Polanco, Mauricio Bittner por sus críticas pedagógicas y constructivas.

A mi tutor de Tesis Dr. Gino Corsini, quien me ha transmitido una enormidad de conocimientos y valores, que no solo me han de ayudar como profesional, sino que también como persona con pensamiento crítico y autónomo.

A la empresa Corbio-Q por el apoyo intelectual y financiero que contribuyeron a la realización de cada objetivo.

A las personas que fueron parte del Laboratorio de Bacteriología Molecular: Sebastián, Bárbara, Dra. Patricia, Dr. Patricio, por su apoyo, conversaciones y tips que me ayudaron a completar algún experimento.

Agradezco a mi hermana y mis amigos, pilares importantes en la vida, que han estado siempre en las buenas y en las malas, dando su apoyo y una mano para salir a flote en los periodos de más difíciles.

Índice

	Pág.
Índice.....	i
Índice de Imágenes.....	iii
Índice de Tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introducción	1
1.1. <i>Streptococcus mutans</i>	1
1.2 Péptidos antimicrobianos y bacteriocinas.....	2
1.3. Bacteriocinas de <i>S. mutans</i>.....	3
1.4 Exportadores ABC y sus componentes accesorios	6
1.5. Expresión heteróloga	8
2. Hipótesis.....	10
3. Objetivos	10
3.1 Objetivo General.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. Materiales y Métodos.....	11
4.1 Materiales.....	11
4.1.1 Reactivos.....	11
4.1.2 Cepas Bacterianas y plásmidos	11
4.1.3 Medios de cultivo.....	14
4.2 Métodos.....	14
4.2.1 Purificación de DNA genómico y DNA plasmidial.....	14
4.2.2 Partidores y Amplificación de DNA.....	14
4.2.3 Purificación de DNA amplificado.....	15
4.2.4 Clonamiento de los genes de interés.....	16
4.2.5 Análisis de clones recombinantes	17
4.2.6 Generación del sistema de expresión heteróloga del componente <i>nImA</i> la mutacina IV	18
4.2.7 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α y <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	21

4.2.8 Transformación por electroporación de <i>E. coli</i> DH5 α y <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	21
4.2.9 Expresión del componente NlmA de la mutacina IV recombinante	21
4.2.10 Purificación del componente NlmA recombinante de la mutacina IV.....	22
4.2.11 Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa.	22
4.2.12 Cuantificación de proteínas.....	23
4.2.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	23
4.2.14 Determinación de la actividad y actividad específica del polipéptido antibacteriano NlmA...	24
4.2.15 Ensayo de estabilidad de la bacteriocina a solventes, temperatura y pH.	25
4.2.16 Ensayos de actividad con mutantes específicos de la síntesis del péptidoglicano	25
4.2.17 Ensayo de actividad con mutantes reporteros para la interferencia del ciclo de lipid II.....	26
4.2.18 Análisis de Secuencia de DNA.	27
5. Resultados.....	28
5.1 Construcción del sistema de expresión heterólogo de mutacina IV en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	28
5.1.1 Clonamiento del gen <i>nlmA</i> de la mutacina IV recombinante	28
5.1.2 Clonamiento del sistema transportador de la microcina V	30
5.1.3 Clonamiento de la mutacina recombinante y transportador dedicado en el vector pRSF-Duet.	31
5.1.4. Análisis de la secuencia del sistema de exportación heterólogo de la mutacina IV	33
5.2 Expresión del gen <i>nlmA</i> de la mutacina IV en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	35
5.3 Purificación de la mutacina recombinante	36
5.4 Efecto de temperatura sobre la estabilidad de la mutacina recombinante.....	39
5.5 Efecto de Solventes sobre la estabilidad de la mutacina recombinante	39
5.6 Efecto de pH sobre la estabilidad de la mutacina recombinante.....	40
5.7 Determinación del perfil de actividad de la mutacina recombinante frente a bacterias Gram positivo y Gram negativo.....	41
5.8 Efecto de la mutacina recombinante sobre mutantes en la síntesis de peptidoglicano de <i>S. aureus</i>.	42
5.9 Acción de la mutacina recombinante en cepa reportera de <i>Bacillus subtilis</i> para perturbaciones de lipid II.....	43
6. Discusión.....	44
7. Conclusión y Proyecciones	49
8. Bibliografía.....	50

Índice de Imágenes

Figura 1. Sistema genético mínimo característico de bacteriocinas del tipo microcina..	3
Figura 2. Operon <i>nlm</i> .	5
Figura 3. Alineamiento múltiple entre secuencias de microcinas sin procesar. .	7
Figura 4. Mapa del vector de clonamiento StrataClone™ pSC-A amp/kan.	18
Figura 5. Plásmido RSF-Duet1	19
Figura 6: Generación del sistema de exportación de la mutacina IV recombinante.	20
Figura 7. Sistema reportero LiaRS de la cepa de <i>Bacillus subtilis</i> BFs2470.	26
Figura 8. Análisis de especificidad e integridad de DNA a través de geles de agarosa..	29
Figura 9. Secuenciación del fragmento clonado de la mutacina IV.	29
Figura 10. Análisis de especificidad e integridad de DNA a través de geles de agarosa..	30
Figura 11. Digestión del vector recombinante pGH-5 con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>EcoRV</i> .	31
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1%, de la digestión con <i>EcoRI</i> y linearización del vector recombinante pGW-1.	32
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión del plásmido recombinante pGW-1 con las enzimas <i>NcoI/HindIII</i> .	33
Figura 14. Ensayo de restricción del clónpGWP4.	34
Figura 15. Ensayo de actividad en placa del sobrenadante sin purificar, de la cepa productora pGWP4, sobre la cepa indicadora <i>S. salivarius</i> ATCC 25975.	35
Figura 16. Optimización de la producción de mutacina recombinante	376
Figura 17. Purificación de la mutacina mediante cromatografía en columna hidrofóbica C18.	367
Figura 18. Efecto de pH sobre la actividad antimicrobiana.	418
Figura 19. Efecto de la actividad de la mutacina IV.	431
Figura 20. Ensayo para medir perturbaciones en el ciclo de lipid II a causa de la mutacina recombinante.	443

Índice de Tablas

Tabla 1. Clases de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo.	3
Tabla 2 Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.	11
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 4 Purificación de la mutacina recombinante mediante columna C18.....	38
Tabla 5. Estabilidad de la mutacina recombinante frente a temperaturas distintas.	39
Tabla 6. Estabilidad de la mutacina recombinante a diferentes solventes orgánicos.	40
Tabla 7. Cepas sensibles frente a la acción de la mutacina recombinante.....	42

Abreviaturas

AMP: Ampicilina

ATCC: American type culture collection

BCA: Ácido bicinconíico

D.O.: Densidad óptica

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

KAN: Kanamicina

LB: Luria Bertani

MCS: Sitio de múltiple clonamiento

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Polimerase chain reaction

SDS: Dodecilsulfato de sodio

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnediamina

U.A.: Unidades arbitrarias

U.F.C.: Unidades formadoras de colonias

Resumen.

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positivo que se encuentra en la cavidad oral, siendo uno de los principales patógenos asociados a la cariogénesis. Posee variadas cualidades que le permiten establecerse en la cavidad oral, entre ellas encontramos su gran capacidad de adhesión, formación de biopelícula y síntesis de bacteriocinas, siendo esta última la más atractiva desde el punto de vista biotecnológico. Estas bacteriocinas producidas por *S. mutans* son denominadas mutacinas y han sido clasificadas según su composición aminoacídica en mutacinas lantibióticas y no-lantibióticas. Entre las mutacinas no lantibióticas, encontramos a la mutacina IV, codificada por el operón *nlm*, la cual posee 2 genes estructurales denominados *nlmA* y *nlmB*.

El objetivo de esta tesis es crear un sistema de expresión heteróloga con el fin de producir y caracterizar el producto del componente *nlmA* de la mutacina IV.

Empleando el vector RSF-duet, el cual posee 2 sitios de múltiple clonamiento, hemos clonado de forma independiente, los genes del sistema transportador de la microcina V en el MCS 2 y uno de los genes del sistema mutacina IV (componente *nlmA* antecedido por la secuencia que codifica para el péptido señal de la microcina V), en el MCS 1. De esta manera utilizando la cepa *E. coli* BL21 (DE3), hemos logrado sintetizar y exportar hacia el medio extracelular el producto del componente *nlmA* (NlmA). Se determinó que la óptima producción de NlmA recombinante, se obtiene empleado una concentración de 1 mM del inductor IPTG, alcanzando una concentración de 63,7µg/mL de proteína, luego de ser purificada desde el medio de cultivo. NlmA recombinante presentó termostabilidad en un amplio rango de temperaturas (-80 a 100°C) y su actividad no se vió afectada frente a variados solventes ya sean estos orgánicos o inorgánicos. Por otra parte, NlmA recombinante, posee actividad frente a *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* y bacterias Gram positivo de interés clínico como *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*, sin embargo, no presentó actividad sobre aislados clínicos de *S. mutans*

Estos resultados contribuyen con el diseño de una nueva herramienta para la producción y estudio de polipéptidos pequeños tipo bacteriocina y, por otra parte, permitió la caracterización del producto codificado por el componente *nlmA* de la mutacina IV.

Abstract

Streptococcus mutans is a Gram positive bacteria found in the oral cavity, pathogens associated with cariogenesis. It has varied qualities that allow it to settle down in the oral cavity, within them find their adhesion, biofilm formation and synthesis of bacteriocins, the latter being the most attractive from the point of biotechnologically. These bacteriocins produced by *S. mutans* are termed mutacins and are divide into two groups: lantibiotics mutacins and non-lantibiotic mutacins. Mutacin IV is a dipeptide non-lantibiotic mutacin encoded by operon *nlm* and being *nlmA* and *nlmB* the structural genes.

The aims of study is develop a polypeptide production heterologous system for produce and characterize the *nlmA* component of mutacin IV.

Using the RSF-duet vector, wich has two multiple cloning site, we cloned independently transporter microcin V in MCS 2 and recombinant mutacin (*nlmA* component preceded by the signal microcin V peptide), in MCS 1. Thereby using the strain *E. coli* strain BL21 (DE3), we have successfully synthesized and export into the extracellular medium the *nlmA* component. We found that optimal production of NlmA recombinant, employee 1 mM IPTG inducer, reaching a concentration of 63,7µg / mL of protein, after being purified from the culture medium.

Subsequently characterization showed thermostability in a wide temperature range (-80 to 100°C), retains its activity against various solvents whether they are organic and inorganic.

Regarding, the inhibitory activity of NlmA recombinant component exhibit activity against *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* and other clinical interest Gram positive bacterias as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* However is unsuccessful against clinical isolates of *S. mutans*

These results contribute a new tool for production and study of small peptides like bacteriocin and on the other hand have en elucidated new features *nlmA* component mutacin IV.

1. Introducción

1.1. *Streptococcus mutans*.

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positivo que se encuentra en la cavidad oral y es uno de los principales patógenos asociados a la cariogénesis (Loesche, 1986). Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1924 desde una lesión de caries dentaria, donde observó que a pH neutros tenía la forma de un coco y que a pH ácidos se veían como bacilos, este cambio de forma dependiente del pH llevo a que se nombrara como *Streptococcus mutans* (Clarke, 1924). No fue hasta el año 1960, que *S. mutans* generó interés en los científicos y luego de varios estudios se pudo asociar las lesiones de caries con esta bacteria (Banas, 2004). La caries dental, es una de las infecciones más comunes y crónicas en el mundo y se han postulado 3 hipótesis para explicar su origen. La primera corresponde a la hipótesis de la placa específica que propone que *S. mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las bacterias involucrados en el desarrollo de esta patología. En segundo lugar tenemos la hipótesis de la placa no específica, que postula que la formación de caries es el resultado de la actividad del conjunto de especies bacterianas existentes en la placa o biofilm, y la tercera es la hipótesis de placa ecológica, que sugiere que las caries son el resultado de un cambio en el balance de la microbiota de la placa por cambios de las condiciones locales del entorno (Aas *et al.*, 2008). La placa bacteriana o biopelícula oral es formada inicialmente por *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus gordonii*, estos al estar en mayor número pueden contener a colonizadores secundarios como lo es *S. mutans*, sin embargo una de las cualidades de *S. mutans* es producir compuestos antimicrobianos, proporcionándole la capacidad de cambiar el balance de la biopelícula oral compitiendo con *S. sanguinis* y *S. gordonii* cuando llega a la biopelícula (Kreth *et al.*, 2008). Dentro de sus factores de virulencia, *S. mutans* posee una gran habilidad para adherirse y formar biopelícula en la superficie dental. También posee la capacidad de generar ácidos desde el metabolismo de carbohidratos, tiene capacidad de sobrevivir a pH bajo y sintetiza variados polipéptidos antimicrobianos llamados mutacinas. Estas propiedades le entregan una gran resistencia en la placa dental donde compite en un entorno con más de 700 especies bacterianas distintas (Xie *et al.*, 2010).

En este trabajo nos enfocaremos en las mutacinas producidas por *S. mutans* y la forma de conseguir un sistema para la producción de estos polipéptidos de forma controlada.

Las mutacinas son un grupo de polipéptidos con actividad antibacteriana producida por cepas de *S. mutans*, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias de la misma especie o especies relacionadas (Medina *et al.*, 2008). Este tipo de polipéptidos se agrupan dentro de las proteínas y péptidos antibacterianos llamados bacteriocinas.

1.2 Péptidos antimicrobianos y bacteriocinas

Una de las estrategias más antiguas y que se ha conservado durante la evolución es la producción de péptidos con actividad antimicrobiana. En eucariotas encontramos las defensinas α producidas por neutrófilos del intestino delgado de humanos, las células T y células dendríticas. También encontramos péptidos antimicrobianos en bacterias, las que son llamadas bacteriocinas (Medina *et al.*, 2008). Las bacteriocinas son polipéptidos de síntesis ribosomal, secretados por una gran variedad de bacterias, que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas (Hossain y Biswas, 2011). Estas sustancias antibacterianas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos y han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos. Sin embargo, con el desarrollo comercial exitoso de la bacteriocina Nisina producida por *Lactococcus lactis* y las herramientas existentes en biología molecular e ingeniería genética, el estudio de las bacteriocinas ha tomado gran importancia por sus aplicaciones biotecnológicas en biomedicina y en la bioconservación de los alimentos (Medina *et al.*, 2008).

El criterio de clasificación de las bacteriocinas es variable, pudiendo agruparse según el microorganismo que las produce, su masa molecular, su estructura química o el modo de acción (Cotter *et al.*, 2005; Muñoz-Rojas, 2004). En general podemos clasificar las bacteriocinas en dos grandes grupos: las producidas por bacterias Gram negativo y las producidas por bacterias Gram positivo (Jenssen *et al.*, 2006). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo se clasifican según la masa molecular que éstas poseen, distinguiendo así bacteriocinas que poseen una masa superior a 10 kDa denominadas colicinas y las que poseen una masa inferior a 10 kDa, llamadas microcinas (Jenssen *et al.*, 2006). Este tipo de bacteriocinas ejercen su acción antimicrobiana a través de la disrupción del potencial de membrana (Gillor *et al.*, 2004; Pons *et al.*, 2002; Lagos *et al.*, 2001; Baquero y Moreno, 1984) o a través del bloqueo de la síntesis proteica o de ácido nucleico (Duquesne y Destoumieux-Garzón, 2007)

Toda bacteria productora de estos polipéptidos con actividad antimicrobiana deben poseer los elementos genéticos necesarios para asegurar la funcionalidad de estos. Encontramos que los sistemas para producir bacteriocinas del tipo microcinas están constituidos por el gen estructural, genes del sistema de exportación y un gen de inmunidad para la célula productora. (**Figura 1.**)



Figura 1. Sistema genético mínimo característico de bacteriocinas del tipo microcina. A y B representan los componentes del sistema de exportación, C es el gen estructural de la bacteriocina y D el gen de inmunidad. Para las bacteriocinas con modificaciones posttraduccionales requiere de la acción del producto de otros genes que efectúan el proceso de maduración (gen E).

Por otra parte, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo también están codificadas en clusters génicos, donde el gen estructural de la bacteriocina es acompañado por el gen de la inmunidad. Estas bacteriocinas han sido clasificadas preferentemente por su estructura primaria y sus características bioquímicas, dividiéndose en 4 clases las que se muestran en la Tabla 1(Nicolas y Mota-Meira, 2007).

Tabla 1. Clases de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo.

	Clase I-Lantibióticos	Clase II	Clase III	Clase IV
Definición	polipéptido con modificaciones post-traduccionales conteniendo lantioninas	Polipéptido sin modificaciones post-traduccionales termoestables	Proteínas grandes termolábiles	Polipéptidos cíclicos
Masa molecular	< 5 kDa.	< 10 kDa	>10 kDa	Variable
Ejemplos	Nisina	Pediocina PA1	Lisostafina	Enterocina AS-48

Modificada de Nicolas *et al.*, 2007.

Basándose en esta clasificación, las bacteriocinas producidas por *S. mutans* (mutacinas), más estudiadas pertenecen a la Clase I tales como la mutacina I, II, 1140 (Hossain y Biswas, 2011). Pero existen otras como la mutacina IV y V que pertenecen a la Clase II. (Hossain y Biswas, 2011)

1.3. Bacteriocinas de *S. mutans*.

Las bacteriocinas producidas por *S. mutans* se estudiaron por primera vez en 1969 (Kelstrup y Gibbons, 1969) y el término mutacina fue acuñado por Hamada y Ooshima en 1975 (Nicolas y

Mota-Meira, 2007). Entre las bacteriocinas de *S. mutans* encontramos un variado repertorio de estas en la clase I y clase II, como se mencionó anteriormente.

Las mutacinas de clase I se dividen en 2 tipos, los monopéptidos lantibióticos y los dipéptidos lantibióticos denominadas Ia y Ib respectivamente. Lo mismo ocurre con las mutacinas de clase II, que se dividen en clase IIa que engloba a los monopéptidos no lantibióticos y la clase IIb que contiene a los dipéptidos no lantibióticos (Nicolas *et al.*, 2007).

La mutacina I producida por *S. mutans* CH43 y *S. mutans* UA140, es un péptido de 24 aminoácidos con una masa molecular de 2364 Dalton, perteneciente a la clase Ia. En esta misma clase encontramos a la mutacina II o J-T8 producida por *S. mutans* T8, que es un polipéptido hidrofóbico de 27 amino ácidos con una masa molecular de 3245 Da y a la mutacina H-29B, la cual es idéntica a la mutacina II, pero es sintetizada solamente cuando los nutrientes de medio de cultivo escasean (Nicolas *et al.*, 2007). Siguiendo con las mutacinas de clase Ia, se han descrito a la mutacina III producida por *S. mutans* UA787 y a la mutacina 1140 producida por *S. mutans* JH1140, que poseen secuencias génicas idénticas entre sí. (Nicolas *et al.*, 2007).

Dentro de la clase Ib, encontramos a la mutacina GS-5 producida por *S. mutans* GS-5. Su masa molecular ha sido estimada sobre los 20000 Da y su actividad se ve afectada por tripsina o pronasa E, pero es termoestable (100°C por 10 min) (Nicolas *et al.*, 2007). En el 2005, Yonezawa y Kuramitsu hallaron el operón que codifica a esta mutacina. Este operón, llamado Smb, está compuesto por 7 marcos de lectura abiertos con un total de 9,5 kb de extensión en el DNA cromosómico (Yonezawa y Kuramitsu 2005).

Por otro lado, en las mutacinas de clase IIa, podemos encontrar a la mutacina V, que fue descubierta a través del análisis en una biblioteca de mutantes de la cepa *S. mutans* UA159 (Qi *et al.* 2001), codificada por el locus SMU.1914c (número de acceso Gen Bank NC_004350). En el 2005, el grupo de Hale le dio el nombre de *nImC* a este locus (Hale *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no ha sido purificada y por lo tanto, se desconoce su actividad antimicrobiana. Otra mutacina de este tipo es la mutacina N producida por *S. mutans* N, compuesta por 49 amino ácidos con una masa molecular de 4806 Da. (Nicolas *et al.*, 2007).

La única mutacina perteneciente a la clase IIb descrita hasta el momento es la mutacina IV, producida por las cepas *S. mutans* UA159 y *S. mutans* UA140, codificada por el operón *nlm* que consta de dos genes *nlmA* y *nlmB* (**Figura 2**). Se ha descrito en algunos trabajos que se necesitan ambos genes para producir la inhibición de las bacterias sensibles aspi No obstante, mutantes en el gen *nlmB* mantienen su actividad frente a bacterias sensibles (Hossain y Biswas, 2011). Recientemente ha sido dilucidado que el gen SMU. 152, codifica para la proteína que confiere inmunidad para esta mutacina a la cepa productora, el cual se encuentra rio abajo de los genes estructurales (**Figura 2**), (Hossain y Biswas, 2012).

Un punto a destacar, es el ordenamiento génico de la mutacina IV, ya que su sistema de exportación no se encuentra en el mismo operon *nlm*, sino que se localiza en otra región del cromosoma de *S. mutans* UA159, denominado *nlmTE* (Hale *et al.*, 2005).



Figura 2. Operon *nlm*. Se representan ambos genes que componen a la mutacina IV. Gen *nlmA* y gen *nlmB*, corresponden a los genes estructurales de la mutacina IV. Gen SMU.152, gen de inmunidad. (Nicolas *et al.*, 2007).

En el proceso de exportación de las bacteriocinas de clase II, de bacterias Gram positivo, éstas se sintetizan como precursores, es decir genera una pre-bacteriocina o pre-proteína, que es un mecanismo muy similar a lo que ocurre en las microcinas de bacterias Gram negativo y se procesan de manera parecida eliminando un péptido señal antes de ser exportada y ambas utilizan los transportadores dedicados de tipo ABC, para que la bacteriocina pase al medio extracelular (Duquesne y Destoumieux-Garzón, 2007). El objetivo de sintetizar la bacteriocina como pre-proteína es mantenerla de forma inactiva dentro de la bacteria productora. La pre-bacteriocina posee una secuencia señal o péptido señal que generalmente se localiza en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica y que constituye la señal de reconocimiento para el procesado, transporte y secreción del polipéptido o proteína madura a través de una ruta general de secreción, sistema sec-dependiente u otros más específicos como los sistemas de transporte ABC o sistemas de transporte dedicados (Duquesne y Destoumieux-Garzón, 2007).

1.4 Exportadores ABC y sus componentes accesorios

Los exportadores ABC, por lo general, son proteínas de tamaño intermedio (entre 600 y 750 aminoácidos), que poseen sus dos dominios característicos en una misma cadena polipeptídica. El primero es el dominio transmembrana o TMN, que es el que ancla la proteína a la membrana celular y que está normalmente compuesto por hélices alfa que atraviesan la membrana. El otro dominio funcional es el dominio de unión a nucleótido o NBD, al cual se une el ATP aportando la energía necesaria para el cambio conformacional que, en última instancia, provoca el transporte (Rees *et al.*, 2009). Estos transportadores son capaces de exportar una amplia variedad de sustratos de estructura proteica o peptídica. De esta manera, se han identificado exportadores ABC de enzimas extracelulares y de toxinas, muchas de ellas de acción antibiótica, producidas por bacterias Gram negativo (Fath y Kolter 1993).

Algunas proteínas exportadoras ABC cuyos sustratos son polipeptídicos, presentan un dominio adicional en su extremo N-terminal que tiene actividad proteolítica sobre el sustrato. A su vez, los sustratos de estos exportadores son sintetizados como precursores que contienen un péptido líder en su extremo N-terminal. Este péptido líder presenta una secuencia consenso (**Figura 3**), donde el residuo glicina de la posición 14 está conservado en un 100%, y es procesado luego de los dos últimos residuos glicina (Håvarstein *et al.*, 1995). Denominándose a esta región como “péptido líder doble glicina”.

Las proteínas accesorias constituyen una familia de proteínas extracitoplásmicas, de 300 a 450 aminoácidos, necesarias para el transporte de moléculas hacia el medio extracelular. Se ha propuesto incluir este conjunto de proteínas accesorias en una nueva familia llamada proteínas de fusión de membrana (MFP) que atravesarían el espacio periplásmico contactando sus extremos con ambas membranas, citoplásmica y externa. Los miembros de esta familia son localizados en bacterias Gram negativo (Vassiliadis, 2011).

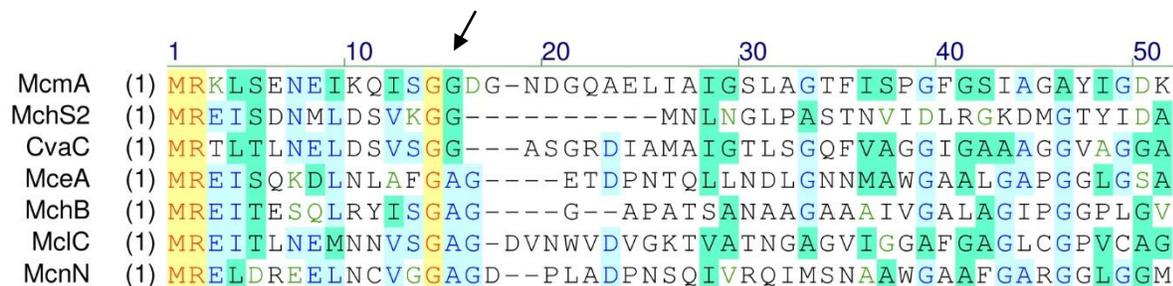


Figura 3. Alineamiento múltiple entre secuencias de microcinas sin procesar. Alineamiento múltiple entre las secuencias amino terminal de las microcinas. McM A corresponde a la microcina M (acceso N° Q83TS1), MchS2 corresponde a la microcina I47 (acceso N° Q712Q0), CvaC corresponde a la microcina V (acceso N° P22522), MceA corresponde a la microcina E492 (acceso N° Q9Z4N4), MchB corresponde a la microcina H47 (acceso N° P62530), MclC corresponde a la microcina L (acceso N° Q841V4) y McnN corresponde a la microcina 24 (acceso N° C3VUZ5). Se destaca además el sitio proteolítico en diferentes microcinas exportadas por el sistema ABC. En amarillo los aminoácidos conservados en un 100%. Los aminoácidos destacados en verde y azul se muestran semi-conservados en este tipo de microcinas. La flecha indica el motivo doble glicina de la pre-bacteriocina.

El tercer componente de los sistemas exportadores ABC en bacterias Gram negativo, es la proteína de membrana externa, que exporta la microcina al espacio extracelular denominado TolC en *E. coli* y es ampliamente conocida por su participación en la expulsión de metales como el Cu^{2+} y Zn^{2+} , proteasas, hemolisinas, antibióticos y detergentes (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002). Así mismo estudios genéticos muestran que TolC participa en la exportación de MccV, MccJ25, MccH47 y MccE492 (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002).

La microcina V, sintetizada por *Escherichia coli* MC4100, está compuesta por 4 genes, el gen estructural (*cvaC*), gen de inmunidad (*cvi*), y dos genes del transportador (*cvaA* y *cvaB*) codificados en el operon ColV. Este transportador pertenece a la familia de los transportadores del tipo ABC, que junto a la proteína TolC permite que la microcina llegue al medio extracelular y cruzar ambas membranas (Zhong *et al.*, 1996). Este transportador es dedicado ya que reconoce el péptido señal de la microcina V conformado por 15 aminoácidos, el cual es procesado para la exportación (Zhong *et al.*, 1996). Aprovechando la capacidad de este sistema dedicado de exportación, se logró realizar con éxito la exportación de otra microcina como la H47 (Azpiroz *et al.*, 2001).

1.5. Expresión heteróloga.

La producción de proteínas de forma heteróloga en modelos bacterianos es una forma atractiva para producir moléculas, péptidos, debido a su rápido crecimiento y costos relativamente bajos (Terpe 2006). Esto gracias a que, mediante ingeniería genética podemos controlar la producción de la molécula de interés a través de promotores inducibles bajo las condiciones deseadas, en fondo genético conocido y manipulable.

Para la realización de expresiones heterólogas, encontramos varios microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, (Terpe, 2006), *Pichia pastoris* (Balamurugan, 2007), *Aspergillus nidulans* (Chiang *et al.*, 2013), entre otros modelos. *Escherichia coli* es uno de los sistemas preferidos debido a que es uno de los organismos más conocidos y los protocolos para su uso están muy bien recabados tanto en laboratorios como en industrias farmacéuticas para la producción de proteínas (Terpe, 2006). Por otro lado *E. coli* posee gran versatilidad en sus herramientas, para realizar ingeniería genética, dentro de ellas encontramos un gran número de plásmidos, promotores, cepas deficientes de proteasas, gran velocidad de crecimiento, alto rendimiento de producción, (Rosano y Ceccarelli., 2014). Una de las desventajas en la producción de proteínas terapéuticas en *E. coli* es la acumulación de lipopolisacárido junto con la proteína heteróloga, que en humanos y otros mamíferos se comporta como un pirógeno (Terpe, 2006). Otra desventaja es la formación de cuerpos de inclusión de la proteína heteróloga, ya sea en el citoplasma como en el periplasma, lo que con lleva a la pérdida de función de la proteína o la inactivación de esta, requiriendo un paso extra que incluye un repliegamiento de la proteína heteróloga (Demain y Vaishnav 2009).

La solución a este problema es emplear un mecanismo de secreción dedicado, con el fin de minimizar estas desventajas, promoviendo la secreción de la proteína heteróloga hacia el medio extracelular a través del uso de transportadores.

En nuestro laboratorio nos ha interesado abordar el estudio de *Streptococcus mutans*, debido a su gran habilidad de producir bacteriocinas. La cepa de *S. mutans* UA159 produce, entre otras bacteriocinas, la denominada mutacina IV. Esta cepa ha sido descrita con la capacidad de inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* y en nuestro laboratorio hemos observado que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de aislados clínicos de *S. mutans*. Siendo de gran interés

caracterizar las distintas mutacinas producidas por *S. mutans* UA159 con el fin de encontrar una nueva herramienta para control de patógenos causantes de la enfermedad de caries dental. Desde esta premisa hemos decidido estudiar la mutacina IV. Sin embargo la producción y purificación a partir de la cepa de *S. mutans* UA159 es difícil de llevar a cabo, debido a que esta cepa produce otras mutacina como la mutacina V y mutacina VI, junto con ello en nuestro laboratorio, hemos observado que la secreción de estas mutacinas es en baja cantidad. Por lo que crear una forma fácil y controlada de producción es necesario para poder emplear biotecnológicamente esta bacteriocina. Una alternativa atractiva es realizar expresión heteróloga para producir únicamente la mutacina IV de forma controlada conociendo el contexto génico involucrado en la producción.

En este trabajo se ha escogido el gen *nlmA* de la mutacina IV para ser producido de forma heteróloga por medio de un sistema de expresión controlado y que a su vez, sea capaz de exportar hacia el medio extracelular dicho componente de la mutacina IV

2. Hipótesis.

La expresión heteróloga del producto codificado por el componente *nImA*, de la mutacina IV, en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3), genera una proteína que posee actividad antibacteriana frente a *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mutans*

3. Objetivos

3.1 Objetivo General.

Construir un sistema de expresión heteróloga, utilizando *Escherichia coli* BL21 (DE3), para la producción recombinante del componente NImA de la mutacina IV, generando un polipéptido funcional que presenta actividad frente a *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mutans*.

3.2 Objetivos Específicos.

- I. Construir un sistema de expresión heterólogo capaz de generar y exportar el producto codificado por el gen *nImA* de la mutacina IV en *E. coli* BL21 (DE3).
- II. Caracterizar el polipéptido NImA recombinante de la mutacina IV, producido *E. coli* BL21 (DE3) y evaluar su actividad frente a *S. salivarius* y *S. mutans*

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales.

4.1.1 Reactivos

De Winkler Ltda, Santiago Chile se obtuvo: glicina, glicerol, acrilamida, bis acrilamida, β -mercaptoetanol, citrato de sodio, TEMED, cloroformo, ampicilina, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, fosfato de sodio, glucosa, DMSO, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, antibióticos y Tris Base.

De TCL, Santiago, Chile se obtuvo: Solventes y reactivos grado técnico (ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico).

De Waters, Milford, MA E.E.U.U. se obtuvo: Cartuchos Sep-Pak C18.

4.1.2 Cepas Bacterianas y plásmidos

Para la realización de esta tesis se emplearon las siguientes cepas bacterianas:

Tabla 2 Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Bacteria	Característica	Fuente
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Productora de mutacina IV	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25975	Sensible a mutacina IV	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 35037		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U20	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U22	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U23	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G07	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G14	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G22	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G26	sin <i>nlnA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA

<i>Streptococcus mutans</i> G29 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G29 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G30 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G30 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G60 3P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G71 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G81 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G81 3S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G82 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G82 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U26 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U26 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G81 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U25 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U26 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U28 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U28 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U28 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U28 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U29 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U29 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U29 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> U29 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G86 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G86 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G90 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G46 1P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G46 2P	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G46 2S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Streptococcus mutans</i> G81 1S	sin <i>nlmA</i>	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Bacillus subtilis</i> BFS2470	Sistema LiaRS	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA

<i>Bacillus subtilis</i> CU1065	Isogénica de BFS2470	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Bacillus subtilis</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	Isogénica de ANG133	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Staphylococcus aureus</i> ANG133	-femAB	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Staphylococcus aureus</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Listeria monocitogenes</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Listeria cruda</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Micrococcus luteus</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Klebsiella oxytoca</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Citrobacter freundii</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Proteus spp</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Shigella flexneri</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Shigella sonnei</i>		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Salmonella</i> sv Enteritidis		
<i>Escherichia coli</i> K12		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Escherichia coli</i> DH5a		Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen.
Plásmidos		
pColV	Operon microcina V(cvaC,cvaI,cvaA,cvaB)	Colección Laboratorio de Bacteriología Molecular UA
pSC-A	Vector Strataclone™	Agilent Technologies
pRSF-Duet	2 sitios de multiple clonamiento, Kan ^R	Novagen
pGW-5	Gen nlmA, Amp ^E	Esta tesis
pST-2	Genes cvaA-cvaB, Amp ^R	Esta tesis
pGWP-4	Gen nlmA, Genes cvaA-cvaB, Km ^R	Esta tesis

4.1.3 Medios de cultivo

Se emplearon los siguientes medios de cultivo: Nutritivo (Nut) pluripeptona 5 gr/L; extracto de carne 3 gr/L, Mueller Hinton (MH) infusión de carne 3 gr/L; peptona ácida de caseína 17,5 gr/L; almidon 1,5 gr/L, Luria Bertani (LB) Triptona 10gr/L; extracto de levadura 5 gr/L; NaCl 10 gr/L Tripticasa de soya (TSB). Agar trpticasa soya (TSA) digerido de caseína 15 gr/L; digerido papaico de harina de soya 5 gr/L; NaCl 5 gr/L; Agar 15gr/L.

4.2 Métodos

4.2.1 Purificación de DNA genómico y DNA plasmidial.

La obtención de DNA genómico se realizó a partir de 3 mL de un cultivo de *S. mutans* UA159 crecido en caldo TSB por 48h bajo condiciones de capnofilia a 37°C, empleando el sistema comercial MasterPure™ Complete DNA Epicentre Biotechnologies, siguiendo las especificaciones del fabricante.

La extracción de DNA plasmidial se llevó acabo empleando el método de lisis alcalina (Bimboim y Doly 1979) mediante el sistema comercial E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II.

Para evaluar la integridad del DNA obtenido se realizó electroforesis en gel de agarosa (Agarosa 1% y TAE 0,5%) durante 60 minutos a 50 Volt. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10mg/L) y se visualizó en un transluminador de luz UV a 254 nm.

4.2.2 Partidores y Amplificación de DNA.

Los partidores usados en este trabajo se detallan en la tabla 3. Se descargaron las secuencias completas de los genes *nImA*, *cvaA* y *cvaB* tomadas de la base de datos NCBI (acc.number NC_004350.2, CAA40743 y CAA40744 respectivamente). Estos partidores han sido especialmente diseñados para amplificar el gen *nImA* antecedido por el péptido señal de la microcina V. También se les adicionó sitios de restricción para facilitar su clonamiento.

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.

Gen	Nombre	Secuencia de Primers (5'-3')	Tamaño Amplicón
<i>nlmA</i>	NDEmutV-F mutIV-R	F:GACCACGTC CATATG AGAACTCTGACTCTAAATGAAATGAAT TAGATTCTGTTTCTGGTGGTA AGGTATCGGGTGGAGAAGCAGT R:TTAATGAGATCGAATGAGTCCCCA	184 pb
<i>cvaA-cvaB</i>	NCOIColv-F HINDColv-R	F: ATCACCATGGGCCACACTGATATATCTTGACTTT R:CTTCACTCAAGCTTGTAATAGAAATAACTCTATCAACAGT	3700 pb

En negrita se muestra el péptido señal de la microcina V. El subrayado marca el sitio de corte de las enzimas de restricción (*Nde*I; CATATG, *Nco*I; CCATGG, *Hind*III; AAGCTT).

Se realizó un master mix para el PCR (5 µL de Buffer 10X, 2 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTPs (10mM c/u), 1 µL Primer F (25 pmol/µL), 1 µL Primer R (25 pmol/µL), 34,5 µL de agua miliQ y 0,5 µL de Taq DNA polimerasa (0,5 U). Para amplificar los transportadores *cvaA* y *cvaB* se utilizó Platinum Taq polimerasa). A cada tubo se agregó 45 µL del master mix y 5 µL de DNA templado (DNA genómico *S. mutans* UA159 y DNA plasmidial pColV).

Las condiciones generales de la PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos; 30 ciclos en los que se repitió la siguiente secuencia: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, apareamiento de los partidores a la temperatura adecuada durante 1 minuto, polimerización a 72 °C durante 1 minuto (3 minutos en el caso de los genes transportadores de la microcina V); y por último la reacción se concluyó con una polimerización a 72 °C durante 10 minutos.

4.2.3 Purificación de DNA amplificado.

Los productos de PCR, así como los fragmentos digeridos se separaron en gel de agarosa 1 % (para los genes *cvaA* y *cvaB*) y 2% (para el gen *nlmA*), durante 2 horas a 60 Volts. El fragmento de gel que contiene el DNA a recuperar se procesó con el kit comercial “Purification gel kit” de

E.Z.N.A, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se resuspendió en un volumen final de 40 μ L en todos los casos.

4.2.4 Clonamiento de los genes de interés.

El producto de amplificación del gen *nImA* y *cvaA* y *cvaB* purificados se ligaron a un vector comercial de clonación pSC-A (StrataClone™ PCR Cloning Kit) (Figura 4), se mezcló 4 μ L del producto de PCR de cada amplificación con 3 μ L de buffer StrataClone® Cloning Buffer y 1 μ L de StrataClone™ Vector Mix amp/kan. Luego, estas soluciones se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente. En este paso se obtuvo la ligación de los productos de PCR a un plásmido (Vector Mix StrataClone™) que posee su sitio de múltiple clonamiento dividido en 2 (MCS), unidos cada uno a una topoisomerasa I que mantiene al plásmido dividido en dos partes, en estos puntos se introducen los productos de PCR y mediante la enzima recombinante *cre* del bacteriofago P1 se logró la unión y formación del plásmido circular que será introducido posteriormente en células competentes para su transformación.

Una vez finalizado el ligamiento se realizó la transformación de células competentes StrataClone™ SoloPack® Competent Cells. En este proceso se mezclaron 8 μ L del producto de ligación con 25 μ L de células competentes StrataClone™ SoloPack® Competent Cells. Luego de preparada la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se incubó 1 minuto a 42°C, lo que provocó un shock térmico, aumentando la permeabilidad de la membrana, permitiendo el ingreso de plásmidos de DNA al protoplasma bacteriano. En este paso las células competentes son transformadas debido a la captación del DNA exógeno. Una vez pasado el minuto, la mezcla se volvió a poner inmediatamente en hielo durante dos minutos, tiempo en el cual se le agregarán 300 μ L del medio caldo LB. Posteriormente esta mezcla se incubó en agitación constante (180 rpm) durante 1 hora a 37°C, para regeneración de las membranas de las células competentes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 300 μ L de esta solución y se sembró en placas de agar LB –ampicilina a las cuales se les agregó previamente 40 μ L de X-gal al 2% y se incubaron las placas durante 24 hrs a 37°C.

4.2.5 Análisis de clones recombinantes

Posteriormente al clonamiento, se obtuvo colonias blancas y azules, ya que el sistema “StrataClone™ PCR Cloning Kit”, permite hacer un “screening” rápido a través del color de las colonias, debido a que el MCS de este sistema se encuentra dentro del gen *lacZ*, el cual codifica para una betagalactosidasa, por lo que las colonias que poseen el inserto se observan de color blanco y las que no integraron el inserto se observan azules, por la degradación del análogo de lactosa, X-gal.

Las colonias blancas se crecieron en 5 mL de medio LB-amp y se analizaron mediante la técnica “One-Step” para realizar un “screening” de plasmidios recombinantes por tamaño (Beuken y cols, 1998), donde 150 µL de cultivo se centrifugaron durante 15-20 s a 11000x g. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionaron 40 µL de colorante de carga (azul de bromofenol 0,1 %, sacarosa 6%) y 14 µL de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1, seguido de cortos periodos de mezcla por vortex (5-10 segundos) para lisar las células. A continuación las muestras se centrifugaron por 3 minutos para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente 10 µL de la fase acuosa (superior) se cargó directamente en un gel de agarosa 1% junto con una muestra del vector como referencia.

A los clones que tenían el producto de interés, se les extrajo DNA plasmidial. Para evaluar la calidad de la extracción se realizó electroforesis en gel de agarosa (Agarosa 1%, TAE 0,5%) durante 60 minutos a voltaje constante de 50 V.

Finalmente el DNA plasmidial extraído se analizó mediante restricción con la enzima *NdeI* y *EcoRV* y PCR utilizando la pareja de partidores M13 forward/M13 reverse o con los partidores NDEmutIV-F /mutIV-R para el gen *nImA* (mutacina IV), restricción con la enzima *NcoI* y *HindIII* y PCR utilizando la pareja de partidores *NcoI*colV-F/*HindCoI*V-R para los genes *cvaA* y *cvaB*(transportador microcina V).

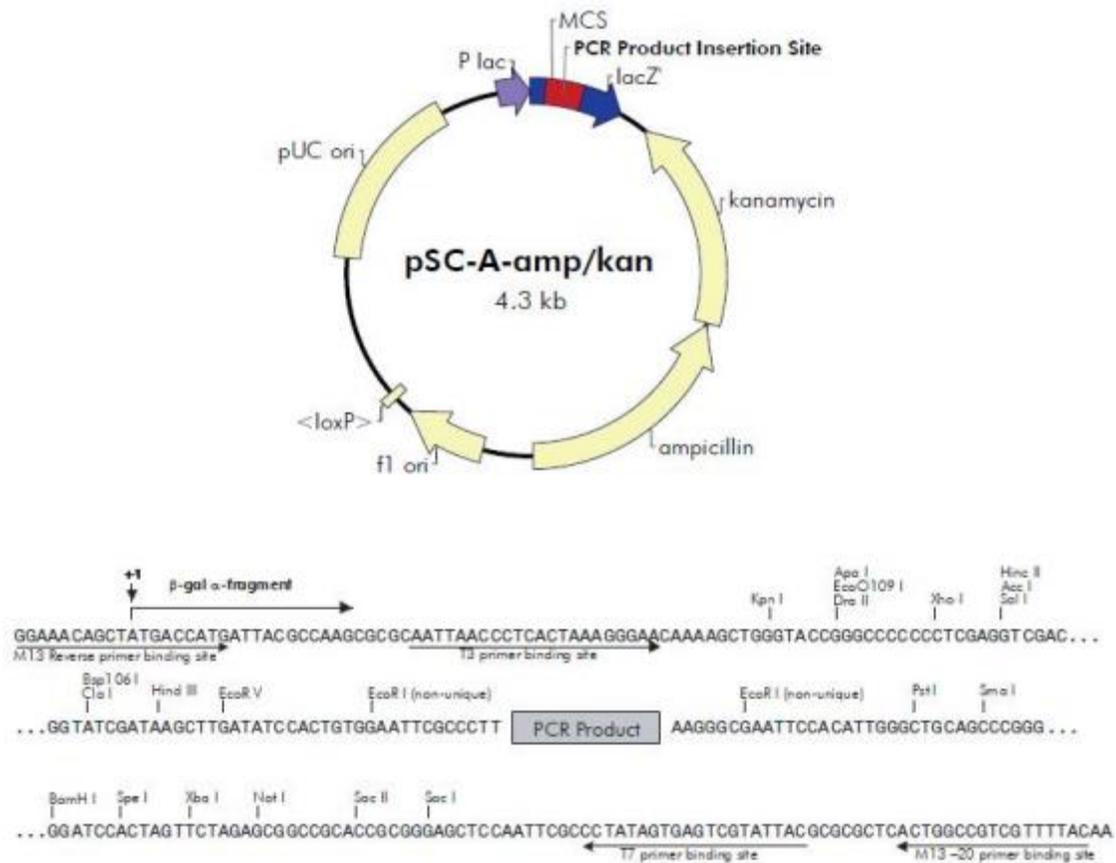


Figura 4. Mapa del vector de clonamiento StrataClone™ pSC-A amp/kan.

4.2.6 Generación del sistema de expresión heteróloga del componente *nlmA* de la mutacina IV

Clonamiento de los genes que codifican para el transportador de microcina V

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó el plásmido pRSF-Duet (Figura 5), que entre sus características posee 2 sitios de múltiple clonamiento (MCS), precedidos por un promotor inducible (T7). El MCS 1 fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII*, utilizando las mismas enzimas se liberó el inserto de los genes *cvA-cvB* desde el plásmido denominado pST-2, utilizando el tampón más eficiente para ambas enzimas siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras la digestión se purificó el vector lineal y el transportador de la microcina V. El resultado de la digestión fue purificado desde un gel de agarosa al 1 % empleando el kit comercial

“Purification kit” de E.Z.N.A siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la reacción de ligación utilizando 100 ng de plásmido, una cantidad equimolar del DNA a ligar, 1 μ L de tampón de ligación (Tris-HCl 200 mM pH 7,6; MgCl₂ 50 mM, DTT 50 mM), 4 μ L de la enzima ligasa T4 (5 U/ μ L; Invitrogen) y agua bidestilada hasta un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a 25 °C durante la noche. Enseguida se realizó la transformación por medio de electroporación en cepa de *E. coli* DH5 α como se menciona en el apartado 4.2.8. De los clones resultantes se seleccionaron 10, los que se cultivaron en medio líquido suplementado con kanamicina 50 μ g /mL con el fin de realizar una extracción plasmidial y posterior identificación por PCR y digestión enzimática. La identidad de la secuencia de DNA de los fragmentos clonados, así como la pauta de lectura se confirmó por secuenciación.

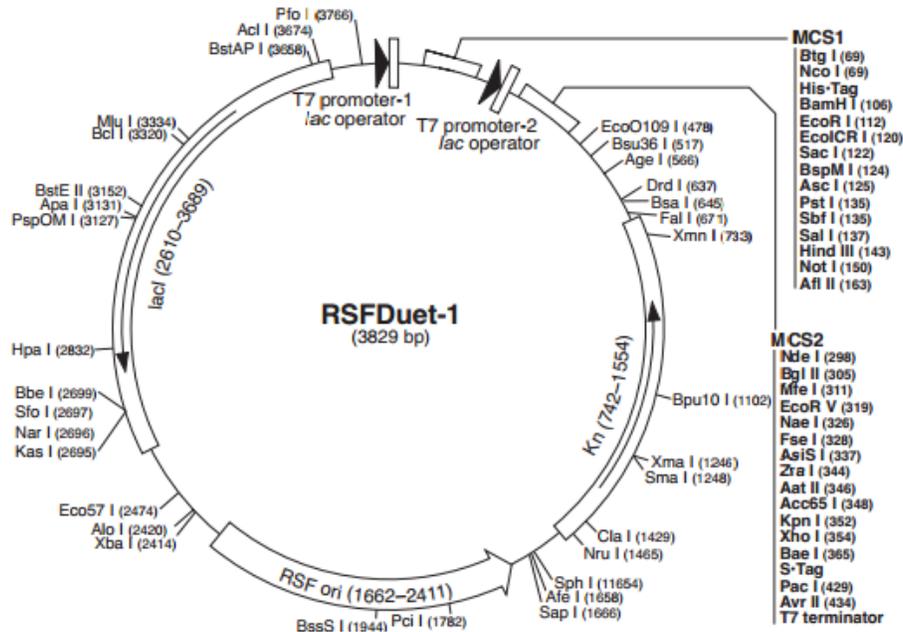


Figura 5. Plásmido RSF-Duet1 que será utilizado para la generación del sistema de exportación heteróloga de la mutacina IV. Se observan los 2 MCS y los sitios de restricción que posee, el cassette de resistencia a kanamicina y el gen *lacI*.

Clonamiento del componente *nlmA* la mutacina IV

Los clones resultantes del paso anterior se seleccionaron para el clonamineto del gen *nlmA* de la mutacina IV recombinante. El MCS 2 del plásmido pRSF-Duet (Figura 5) fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRV*, utilizando las mismas enzimas se liberó el inserto del gen *nlmA* desde el plasmido denominado pGW-5, siguiendo el mismo método del apartado anterior, denominando al vector resultante pGWP-4 (Figura 6), transformándolo en *E.coli* DH5 α para ser almacenada a -80°C y en *E.coli* BL21 (DE3) para expresar la componente NlmA recombinante de la mutacina IV.

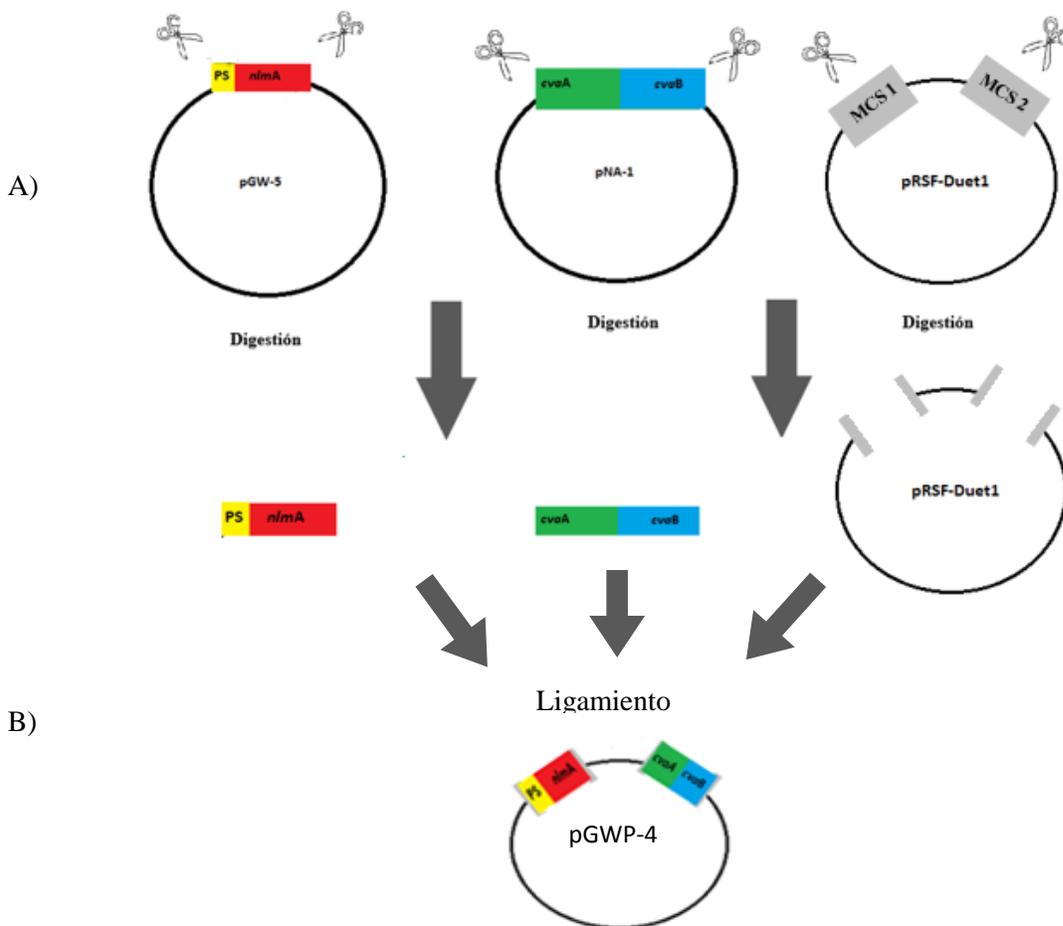


Figura 6: Generación del sistema de exportación del componente NlmA recombinante de la mutacina IV. A) Se observa la digestión en los distintos plásmidos a utilizar. B) Ligamiento del gen *nlmA* y los genes del transportador de microcina V (*cvaA* y *cvaB*) al plásmido RSF-Duet1 dando como resultado el plásmido pGWP-4. PS: péptido señal microcina V.

4.2.7 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (DE3).

A partir de 2 mL de un cultivo bacteriano de *E. coli* DH5 α o *E. coli* BL21 (DE3) crecido durante toda la noche, se inocularon 600 μ L en 5 mL de medio LB fresco y se dejó crecer hasta obtener una OD_{600 nm} de 0,4. Se centrifugó a 6000x g para sedimentar las bacterias. El precipitado se resuspendió en 20 mL de glicerol 10% y se centrifugó nuevamente a 6000x g. Este lavado con glicerol 10% se repitió 2 veces. En el último lavado se dejaron las células resuspendidas con glicerol 10% remanente en el tubo, se alicuotaron 40 μ L en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

4.2.8 Transformación por electroporación de *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (DE3).

Para la transformación se utilizó un equipo Eppendorf modelo Electroporator 2510 acoplado a un controlador de pulso. Se emplearon las siguientes condiciones de electroporación: 2000 V, 200 Ω y 25 μ F de capacitancia. Para la transformación se mezclaron 40 μ L de las células electrocompetentes con 2 μ L del plásmidos o la ligación de interés, en un tubo y la mezcla se electroporó en una cubeta de electroporación de 2 mm de espesor (previamente enfriada a -20°C).

Posteriormente las células electrotransformadas se resuspendieron en 1 mL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB más kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron durante 24 horas a 30°C.

4.2.9 Expresión del componente NImA de la mutacina IV recombinante

A partir de 2 mL de un cultivo bacteriano de la cepa denominada pGWP-4 crecido durante toda la noche, se inocularon 300 μ L de cultivo en 5 mL de medio LB fresco con 5 μ L de kanamicina 50 μ g/ml y se dejó crecer hasta obtener una OD_{600 nm} de 0,3, en este punto se adicionó IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), a una concentración de 1 mM y se recogieron muestras de 200 μ L para periodos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 18 horas.

4.2.10 Purificación del componente NImA recombinante de la mutacina IV.

Utilizando la cepa pGWP-4, la cual posee el sistema de expresión heterólogo denominado pGWP4, se sembró dicha cepa en placas de 20 mL de agar nutritivo con 20 μ L de Kanamicin 50 μ g/mL durante 24 horas a 37°C. Se tomó una o dos colonias y se llevaron a 500 mL de caldo nutritivo más 500 μ L de kanamicina 50 μ g /mL. Luego con el cultivo a una densidad óptica de 0,3 a 600nm, se procede a inducir con IPTG 1mM y se cultivó durante 24 horas a 37°C con agitación 180 rpm.

Para obtener el sobrenadante que contiene la bacteriocina, se centrifugó el cultivo a 13000x g por 10 minutos. Una vez obtenido el sobrenadante libre de células, este se cargó en una columna de interacción hidrofóbica con resina C₁₈, previamente activada. La mutacina IV recombinante se eluyó con una gradiente escalonada de concentraciones crecientes de solución metanol/agua (0-100% metanol). Las fracciones se sometieron al Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa, (4.2.11 de esta sección), para detectar la presencia de componente NImA recombinante de la mutacina IV.

4.2.11 Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa.

Se utilizó *S. salivarius* como especie indicadora de la actividad antimicrobiana de la mutacina IV recombinante. Se agregaron alícuotas de 100 μ L de cultivo de la cepa indicadora crecida a una DO₆₀₀ de 0,4 a 3 mL de TSB con 0,8% p/v de agar previamente fundido y estabilizado a 50°C. Esta mezcla se depositó sobre placas con 20 mL de TSA. La actividad de las bacteriocinas se detectó depositando 5 μ L de cada fracción de eluido a analizar sobre el césped de la cepa indicadora. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La actividad del polipéptido se visualizó por la presencia de una zona inhibición de crecimiento sobre el césped bacteriano. Como control negativo se utilizó el solvente sólo, y como control positivo se utilizó una colonia de la cepa productora de bacteriocina y un disco de kanamicina 50 μ g /mL. Este ensayo se repitió utilizando como cepa indicadora 32 aislados clínicos de *S. mutans* que no poseen el gel *nImA* mencionadas en la tabla 3.

4.2.12 Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteína totales se determinó utilizando el kit comercial BCA “Protein Assay kit de Thermo Scientific”, según las instrucciones del fabricante. Para medir la concentración de las muestras de bacteriocinas, se evaporó el solvente en el que se encontraban las bacteriocinas purificadas y se resuspendieron en el mismo volumen de solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7. Se realizó una curva de calibración con albumina en el rango de 25 a 2000 µg/mL, y el blanco utilizado fue solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7 con igual cantidad de reactivo. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 495 nm. Las diferentes muestras se midieron en triplicado y a dos diluciones diferentes.

4.2.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los geles de poliacrilamida/bisacrilamida se prepararon según el método descrito por Schägger y von Jagow (1987), el cual permite separar proteínas de un rango de masa molecular de 1 a 100 kDa. Se prepararon dos geles separadores de distinto porcentaje de poliacrilamida y un gel concentrador. El primer gel separador se preparó con 20 % de poliacrilamida; Tris-HCl 1 M, pH 8,5; SDS 0,1 % y glicerol al 10 %. El segundo gel separador se preparó con 10 % de poliacrilamida; Tris-HCl 1 M, pH 8,5; SDS 0,1 % y glicerol al 10%. El gel concentrador se preparó con 4 % de poliacrilamida; Tris-HCl 1 M pH, 6,8; SDS 0,1 %. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,01 % de persulfato de amonio y 2,2 mM de Temed. Los geles se sometieron a un campo eléctrico de 50 y 100 V, empleando un amortiguador catódico (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1 %) y un amortiguador anódico (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,9).

Las muestras que se obtuvieron de la semipurificación, se concentraron 10 veces mediante la evaporación del solvente. A los concentrados se les agregó 10 µL de amortiguador de carga que contiene glicerol 40 %, Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10, β-mercaptoetanol 20 % y azul de bromofenol 0.04 % p/v. La mezcla se dejó incubar por 5 minutos a 80°C y los péptidos se separaron mediante SDS-PAGE. Se empleó el estándar de masa molecular Novex SeeBlue Plus 2 Pre-stained que tiene fragmentos con masas moleculares aparentes de: 188, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14, 6 y 3 kDa.

Para visualizar la presencia de proteínas y péptidos, los geles se tiñeron con nitrato de plata, para lo cual se incubaron por 30 minutos en solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético y 0,1 M acetato de amonio), se lavaron con agua nanopura dos veces por 30 minutos, luego se incubaron por 30 minutos en una solución 0,005% tiosulfato de sodio y más tarde se incubaron por la misma cantidad de tiempo en solución 0,1% nitrato de plata. Los geles se lavaron en agua nanopura y se incubaron en la solución reveladora (0,036% formaldehído, 2% carbonato de sodio) por 1 a 2 minutos, luego se incubaron en la solución de detención (50 mM EDTA) por 15 a 60 minutos y finalmente se almacenaron en agua nanopura. Además se realizó un ensayo de actividad en placa del gel para determinar la presencia de la mutacina IV recombinante, para lo cual el gel se cortó en tiras correspondientes a un carril, se lavó con agua destilada 5 a 6 veces durante 5 minutos cada vez, para extraer el SDS presente en el gel y se colocó la tira sobre un césped de una cepa sensible, tal como se explicó en el apartado de Ensayo de detección en placa. Se dejó incubar por 12 horas y se observó la presencia de una zona de inhibición de crecimiento.

4.2.14 Determinación de la actividad y actividad específica del polipéptido antibacteriano NImA.

Para la determinación de la actividad del componente NImA recombinante de la mutacina IV, se empleó el método de dilución crítica descrito por Delgado *et al.*, 2005. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 del componente NImA recombinante de la mutacina IV, en las mismas soluciones en las que se encontraba. Se depositaron 5 μ L de cada una de las diluciones sobre un césped sensible, igual al descrito en la sección Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa. Unidad Arbitraria (UA) de actividad se definió como la máxima dilución realizada, la cual genere inhibición de crecimiento de la bacteria sensible y es expresada en $\frac{UA}{mL}$. Por ejemplo si la última dilución que generó inhibición de crecimiento fue $\frac{1}{64}$, existen 64 UA en 5 μ L de muestra, por lo tanto la actividad de la muestra es de $12.800 \frac{UA}{mL}$. Por otra parte la actividad específica se definió como $\frac{UA}{mg \text{ de proteína}}$. Para ello se corrigió la actividad por el contenido de proteína totales que posee la muestra.

4.2.15 Ensayo de estabilidad de la bacteriocina a solventes, temperatura y pH.

Se tomó una alícuota del polipéptido purificado y se evaporó el solvente hasta sequedad en speed-vac. El polipéptido se disolvió en el mismo volumen de solventes orgánicos como metanol, etanol, butanol, acetonitrilo, PBS 1X y agua destilada y se incubó durante 1 hora a 37°C

Para el tratamiento con temperatura el polipéptido sin solvente se resuspendió en agua nanopura estéril y se sometió a incubación a las siguientes temperaturas -80°C, -20°C, 4°C, 25°C, 50°C, 80°C y 100°C durante 1 hora.

Para el tratamiento con pH, del componente NImA recombinante de la mutacina IV sin solvente se resuspendió en el mismo volumen de amortiguador universal Britton-Robinson a pH en el rango de 3 a 9. Y se incubó 2 horas a 37°C. El amortiguador universal Britton-Robinson se preparó con volúmenes equivalentes de soluciones 40 mM ácido bórico, 40 mM ácido fosfórico, 40 mM ácido acético, a la cual se ajustó el pH con solución 0,2 M hidróxido de sodio a un rango de pH de entre 2 hasta 12.

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de actividad considerando como el 100% de actividad la presentada por la bacteriocina incubada en ausencia de solventes orgánicos, en el caso de los efectos de la temperatura se consideró como el 100% de actividad la presentada por la bacteriocina a 37°C y en el caso del estudio del efecto del pH, se consideró como el 100% de actividad la presentada por la bacteriocina a pH 7.

4.2.16 Ensayos de actividad con mutantes específicos de la síntesis del péptidoglicano

Para determinar si el blanco de acción de la mutacina recombinante está relacionado con la síntesis del peptidoglicano se utilizó un mutante de *S. aureus*, descritos por Olaf Schneewind *et.al.* 2006. La cepa mutante ANG133 presenta una mutación en los factores de resistencia a meticilina (*femAB*), los cuales catalizan la síntesis de factores no-ribosomales de entrecruzamiento de puentes de pentaglicina, afectando directamente la síntesis del peptidoglicano (Grundling *et al.* 2006). Mediante ensayos de actividad en placa usando como césped *S. aureus* ANG133, se determinó si esta mutante es resistente o menos sensible a la acción de la mutacina recombinante, en comparación a la cepa isogénica NEWMAN que es sensible a la mutacina recombinante.

4.2.17 Ensayo de actividad con mutantes reporteros para la interferencia del ciclo de lipid II

Para comprobar o descartar el rol de lipid II como receptor para Mutacina IV, se empleó *B. subtilis* BFs2470 construido por Helman *et al.*, 2004, esta cepa es reportera a la acción de compuestos antimicrobianos que actúan mediante la disrupción del ciclo de lipid II, como Nisina, bacitracina o vancomicina. *B. subtilis* BFs2470 posee un sistema de dos componentes LiaRS que sensa la interacción de sustancias antibióticas con lipid II. Este sistema se basa en la expresión de β -galactosidasa, cuando existen perturbaciones en el ciclo de lipid II, para esto utiliza LiaS como sensor y LiaR como factor de expresión de los genes de síntesis de peptidoglicano (Figura 7); **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Se utilizó el método descrito por Stein *et al.*, 2008 para determinar la interferencia de mutacina IV en el ciclo de lipid II. Este se basa en el crecimiento de la cepa reportera, BFs2470, en placas agar MH suplementado con X-Gal, agregando el compuesto que interfiere con la síntesis de peptidoglicano. Si se produce una zona de coloración azul en el límite externo de la zona de inhibición de crecimiento esto indicaría que el agente antibacteriano interactúa mediante una perturbación en el ciclo de lipid II.

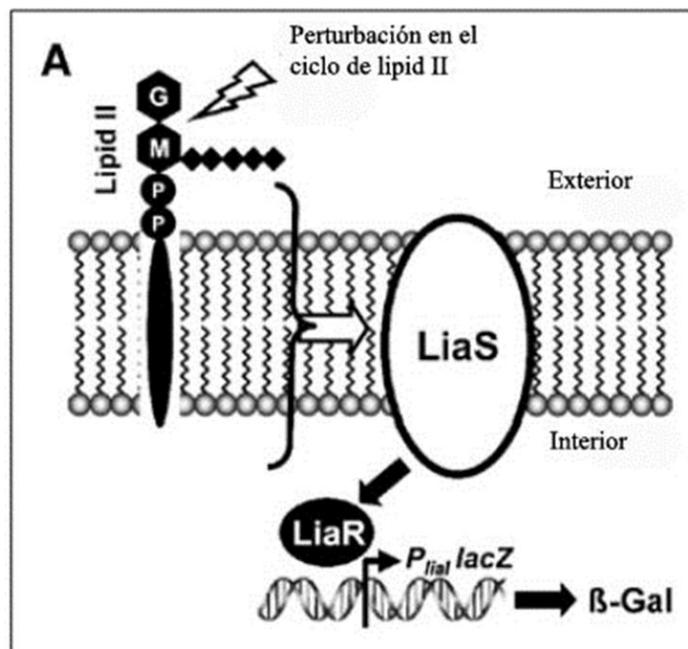


Figura 7. Sistema reportero LiaRS de la cepa de *Bacillus subtilis* BFs2470. (Modificada de (Mascher *et al.*, 2004))

4.2.18 Análisis de Secuencia de DNA.

Las construcciones realizadas se secuenciaron empleando el método de Sanger en la empresa Macrogen Inc. Korea utilizando los oligonucleótidos M13 Forward y M13 Reverse. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta Bioinformática BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Resultados

5.1 Construcción del sistema de expresión heterólogo de mutacina IV en *E. coli* BL21 (DE3).

5.1.1 Clonamiento del gen *nImA* de la mutacina IV recombinante

Se llevó a cabo la obtención de DNA genómico de *S. mutans* UA159, que presenta en su genoma los genes del sistema productor de la mutacina IV, para posteriormente realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *nImA* con partidores específicos detallados en la Tabla 3, Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, obteniendo un amplicón de aproximadamente 180 pb (Figura 8A), lo que concuerda con el tamaño teórico del gen *nImA* (134 pb) más la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de la microcina V (50 pb). La banda con el producto de PCR de interés se extrajo del gel de agarosa y se purificó como se describe en el punto de materiales y métodos. Posteriormente el fragmento de DNA purificado se clonó en el vector pSC-A (Figura 4). Se analizaron 10 clones que presentaron coloración blanca y celeste mediante PCR, con los partidores M13 forward y M13 reverse generando un amplicón de 440 pb correspondiente a los 256 pb del sitio de multiple clonamiento, del plásmido pSC-A más los 184 pb de la mutacina recombinante (Figura 8B). Con este primer resultado, el clón denominado pGH-5 fue seleccionado para su secuenciación (Figura 9). El análisis proporcionó 97% de identidad debido a que nuestra construcción poseen en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de la microcina V.

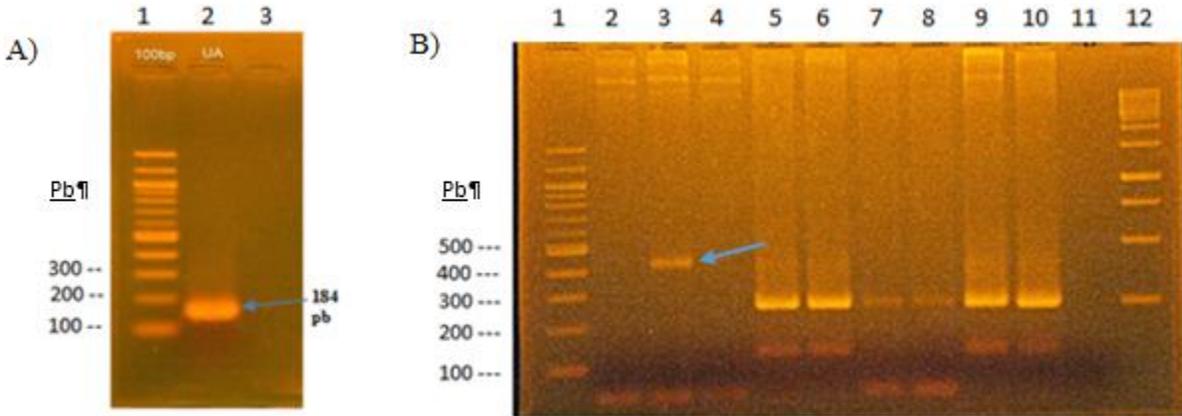


Figura 8. Electroforesis en geles de agarosa. A) Análisis de la amplificación del gen *nImA* de la mutacina IV a partir del DNA genómico de *S. mutans* UA159. El carril 1 corresponde al estándar de peso molecular 100 bp. El carril 2 muestra la amplificación del gen *nImA* B) Análisis del producto de PCR obtenido a partir del DNA plasmidial de los clones resultantes de la transformación. El carril 1 y 12 corresponden a los estándares de peso molecular 100 bp y 1 kb respectivamente, carriles 2 al 11 corresponden al resultado del producto de PCR generado a partir del DNA plasmidial de los clones obtenidos. La flecha señala el resultado esperado de la amplificación correspondiente a 440 pb.

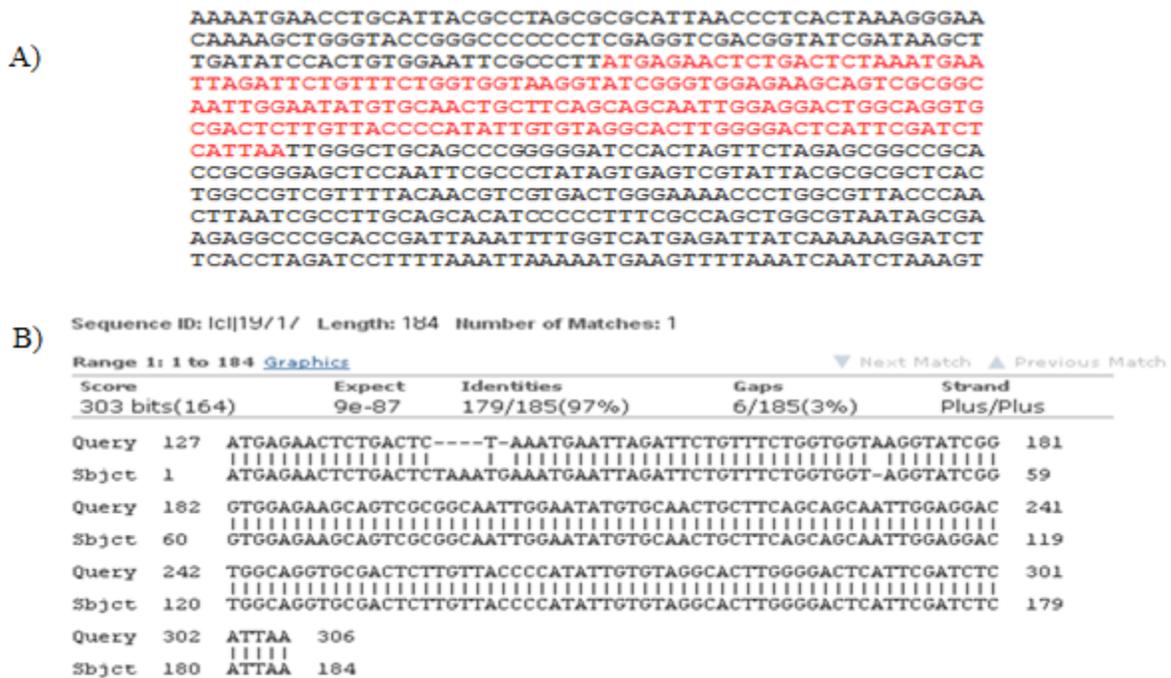


Figura 9. Secuenciación del fragmento clonado de la mutacina IV. A) En rojo se aprecia la secuencia correspondiente a gen *nImA* antecedido por el péptido líder de la microcina V entregada por MacroGen Inc. B) Análisis mediante Blastn a la secuencia del gen *nImA* clonado, el cual posee un 97% de identidad con la secuencia del gen *nImA* de la mutacina IV.

5.1.2 Clonamiento del sistema transportador de la microcina V

Con el fin de secretar la mutacina recombinante hacia el medio extracelular de la bacteria productora. Se decidió emplear el sistema exportador de la microcina V. Para ello extrajo DNA plasmidial de la cepa de *E.coli* MK4100 pColV, cuya característica es presentar un plásmido que posee los genes necesarios para producción de la microcina V. Este DNA se empleó para amplificar los genes *cvaA* y *cvaB*, que codifican para el sistema transportador de la microcina V, mediante los partidores específicos detallados en la Tabla 3. Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, obteniendo un amplicón de 3200 pb. (Figura 10A). La banda con el producto de PCR de interés se extrajo del gel de agarosa y se purificó como se describe en el punto de materiales y métodos. Posteriormente el fragmento de DNA purificado se clonó en el vector pSC-A (Figura 4).

Se analizaron 10 clones que presentaron coloración blanca y celeste por medio de PCR utilizando los partidores NCOIColv-F/HINDColv-R, especificados en la Tabla 3, generando un amplicón de 3200 pb (Figura 10B) El clón denominado pST-2 fue seleccionado para continuar con los experimentos.

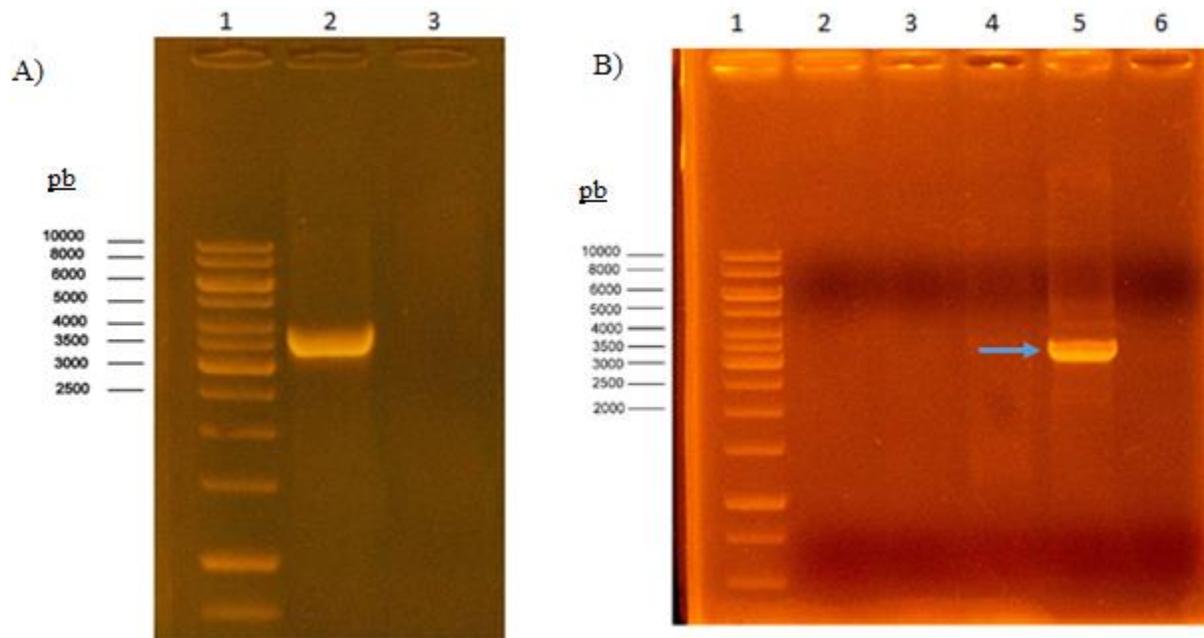


Figura 10. A) Análisis del producto de PCR del transportador de la microcina V. El carril 1 corresponde al estándar de tamaño molecular 1kb. El carril 2 muestra la amplificación del segmento que abarca los genes *cvaA* y *cvaB*. El carril 3 corresponde al control negativo de la reacción B) Análisis del producto de PCR a partir del DNA plasmidial de los clones obtenidos luego de la transformación. El carril 1 muestra el estándar de tamaño molecular 1 kb. Los

carriles 2, 3 y 4 corresponden al producto de la reacción de PCR siendo su resultado negativo para los genes *cvaA* y *cvaB*. En el carril 5 la flecha señala el resultado positivo para la reacción de PCR correspondiente a 3200 pb.

5.1.3 Clonamiento de la mutacina recombinante y transportador dedicado en el vector pRSF-Duet.

A partir del DNA plasmidial, de los clones pGH-5, se llevó a cabo la digestión con las enzimas *NdeI* y *EcoRV* para liberar el inserto correspondiente al gen *nlmA* de la mutacina IV recombinante. Así mismo se realizó la digestión del sitio de múltiple clonamiento 2 del plásmido pRSF-duet con las mismas enzimas de restricción. El resultado de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% para el gen *nlmA* y agarosa 1% para los demás, observando una digestión exitosa (Figura 11). Este ensayo tuvo como resultado facilitar la clonación, linearizando el vector de expresión pRSF-duet y posteriormente ligarlo al gen *nlmA* de la mutacina IV recombinante.

Los segmentos lineales, tanto del vector como del inserto se recuperaron del gel para posteriormente ser ligados. Tras el ligado se transformó el producto en células de *E. coli* DH5 α .

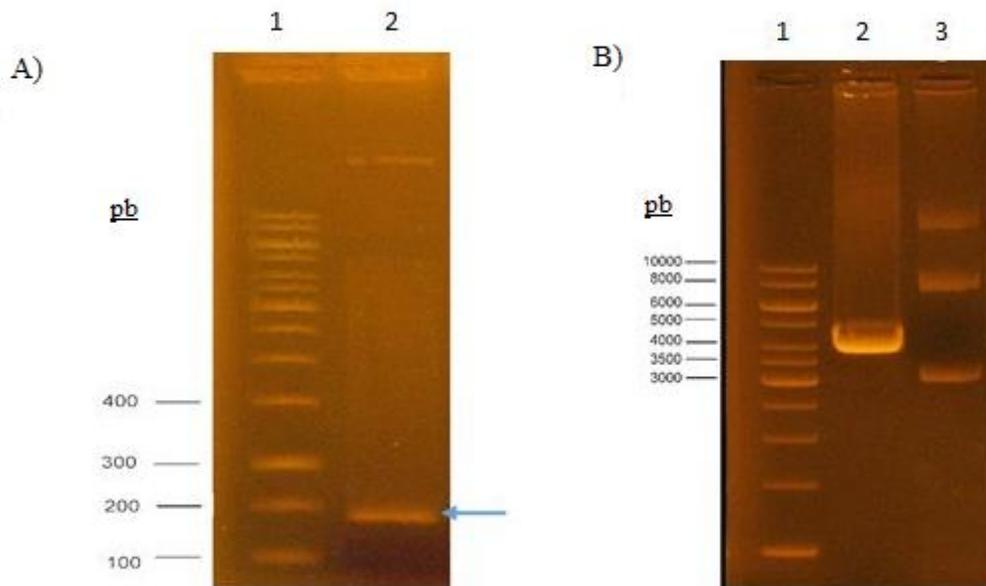


Figura 11. A) Digestión del vector recombinante pGH-5 con las enzimas *NdeI* y *EcoRV*. La flecha indica el inserto liberado del gen *nlmA* de la mutacina IV recombinante, teniendo como referencia el marcador 100 bp. B) Linearización del vector de expresión pRSF-Duet. Se observa en el carril 2 el producto de la digestión con un tamaño aprox. de 3800pb, teniendo como referencia el marcador 1kb de fermentas y en el carril 3 podemos observar el vector de expresión sin someterse a ensayos de restricción como control

Posteriormente a la transformación, se llevó a cabo la extracción de DNA plasmidial de los clones obtenidos. La identidad del plásmido recombinante, fue confirmada por digestión y PCR (Figura 12). Luego, utilizando el DNA plasmidial del clón positivo denominado pGW-1, se procedió a clonar el fragmento de 3200 pb clonado en pST-4 que contiene los genes que codifican para el transportador de la microcina V, en el sitio de múltiple clonamiento 1 del plásmido pRSF-duet, de forma similar al clonamiento del gen *nImA* de la mutacina recombinante, con la salvedad de que en este caso, se utilizaron las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* para liberar el inserto correspondiente al transportador desde el plásmido pST-4 y para linearizar el vector pGW-1 (Figura 13).

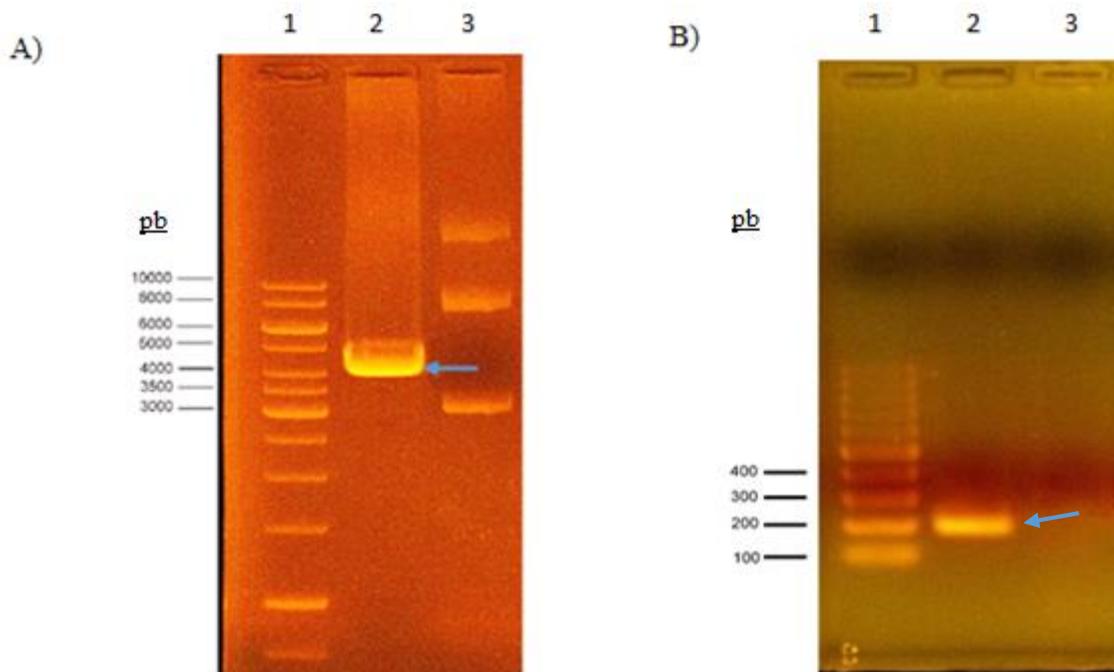


Figura 12. A) Análisis de la linearización del vector recombinante pGW-1 empleando la enzima de restricción *EcoRI*. El carril 1 muestra el estándar 1kb. En el carril 2, la flecha indica el fragmento con un tamaño aprox. de 4000 pb, en el carril 3, se observa el plásmido sin digerir como control de la reacción. B) Producto de PCR del gen *nImA* de la mutacina recombinante. El carril 1 es el estándar 1kb. En el carril 2 la flecha indica el fragmento con un tamaño aprox de 200 pb, en el carril 3, se observa el control de la reacción

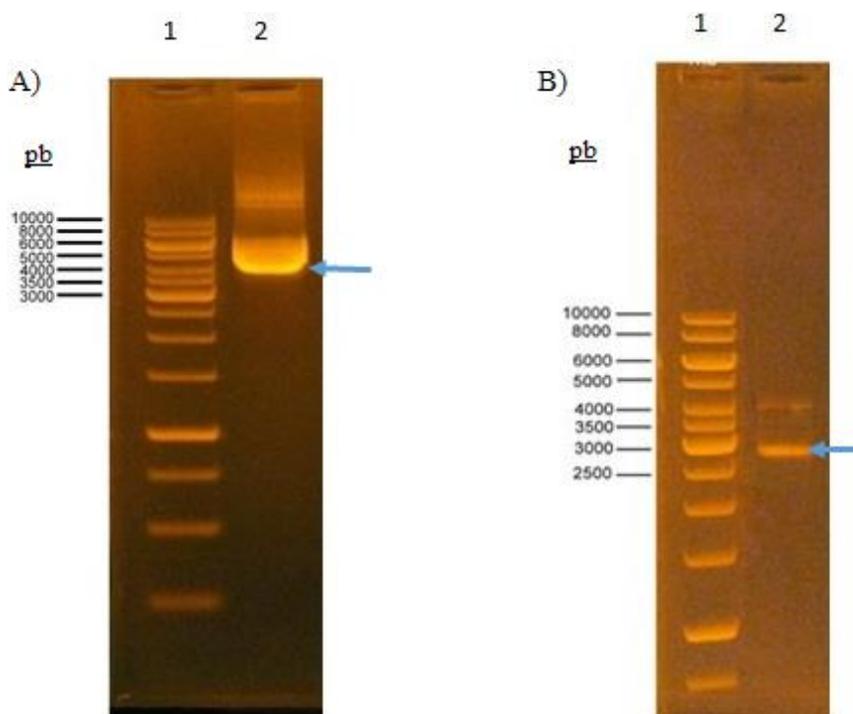


Figura 13. A) Carril 1 estándar de tamaño molecular 1 kb. Carril 2, digestión del plásmido recombinante pGW-1 con las enzimas *NcoI/HindIII*. La flecha muestra el fragmento del vector linealizado con un tamaño aprox de 4000pb B) Carril 1 Estandar de tamaño molecular 1 kb. Carril 2, digestión del plásmido pST,-4 con las enzimas *NcoI/HindIII*. La flecha muestra el inserto liberado correspondiente a los genes del transportador de la microcina V.

Los fragmentos de DNA lineales, tanto del vector como del inserto, se recuperaron y purificaron del gel de agarosa, para posteriormente ser ligados. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α .

5.1.4. Análisis de la secuencia del sistema de exportación heterólogo de la mutacina IV

De los clones obtenidos denominados pGWP, se extrajo DNA plasmidial y se analizó la presencia de los genes del sistema transportador de la microcina V mediante digestión con enzimas de restricción *KpnI* y *PstI*, sitios de restricción internos entre los genes *cvaA* y *cvaB* del sistema transportador heterólogo, junto con esto se realizó la amplificación de ambos genes del sistema transportador mediante PCR, utilizando los primer NCOIColv-F y HINDColv-R detallados en la Tabla 3. Los resultados de la digestión y de la reacción de PCR se analizaron a través de electroforesis en gel de agarosa 1%, donde se observa que la digestión realizada generó un fragmentos de aproximadamente 2600 pb, correspondiendo al tamaño predicho mediante el programa bioinformático de acceso gratuito NEBcutter V2.0, de la empresa New Engand Bio

Labs. El producto de PCR generado, correspondiente a 3200 pb aproximadamente, también corresponde con el tamaño de los genes *cvaA* y *cvaB* del sistema de exportación heterologo (Figura14).

La secuencia de los genes del transportador clonados en el plásmido pRSF-Duet correspondiente a la construcción pGWP-4 se confirmó mediante secuenciación, realizada por la empresa Macrogen Inc Confirmando la identidad tanto del gen *cvaA* como del gen *cvaB*.

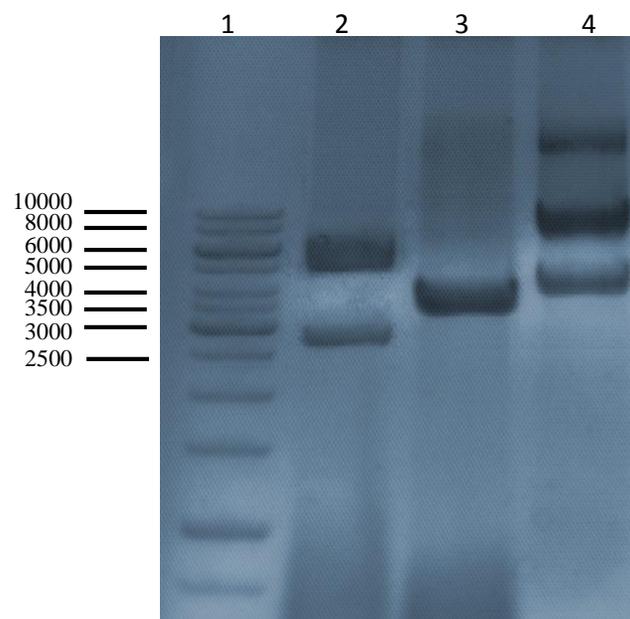


Figura 14. Análisis del clónpGWP4. Carril 1: estándar de tamaño molecular 1kb. Carril 2: DNA de pGWP4 digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI*. Estos 2 sitios de restricción solamente se encuentran dentro de los genes del sistema transportador de la microcina V. Carril 3 Producto de PCR del plásmido pGWP4, que muestra los genes del sistema exportador (3200 pb). Carril 4 DNA plasmidial del ClónpGWP4 sin digerir, (7200 pb).

5.2 Expresión del gen *nImA* de la mutacina IV en *E. coli* BL21 (DE3)

Con el fin de realizar la expresión de la mutacina heteróloga (componente *nImA* de la mutacina IV), se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pGWP4 mediante electroporación siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Posteriormente, se confirmó la presencia del plásmido pGWP4 en los clones obtenidos, mediante extracción de DNA plasmidial como se describió anteriormente en materiales y métodos. Para verificar que el componente NImA recombinante de la mutacina IV es expresado y exportado, se realizó un cultivo el cual se indujo con IPTG 1 mM. Luego de 18 hrs se tomó muestra del cultivo la que fue centrifugada a 13000x g por 5 min, obteniendo un sobrenadante sin células. Este sobrenadante se calentó a 80°C por 15 min para eliminar restos de células bacterianas y posteriormente se realizó el ensayo de actividad en placa como se menciona en materiales y métodos, obteniendo resultados positivos (Figura 15), donde se aprecia una zona de inhibición de crecimiento de la cepa indicadora. Con el fin de determinar la cantidad de mutacina recombinante generada, la inducción se realizó por distintos tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 horas.

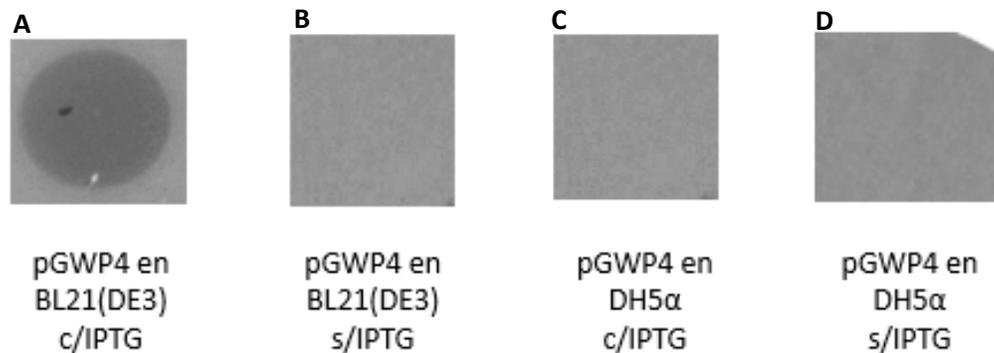


Figura 15. Ensayo de actividad en placa del sobrenadante sin purificar, sobre la cepa indicadora *S. salivarius* ATCC 25975. A) cepa productora pGWP4 en BL21 (DE3) inducida. B) cepa productora pGWP4 BL21 (DE3) sin inducir. C) pGWP4 en DH5α inducida. D) pGWP4 en DH5α sin inducir. La inducción del cultivo se realizó con IPTG 1mM.

Se determinó que la producción de mutacina recombinante alcanza su máxima expresión después de las 18 horas de inducción con IPTG a una concentración de 1 mM, a concentraciones mayores de IPTG no se aprecian mayores cambios en la producción. Por otro lado a concentraciones menores, resulta en un mayor tiempo necesario para la producción. (Figura 16).

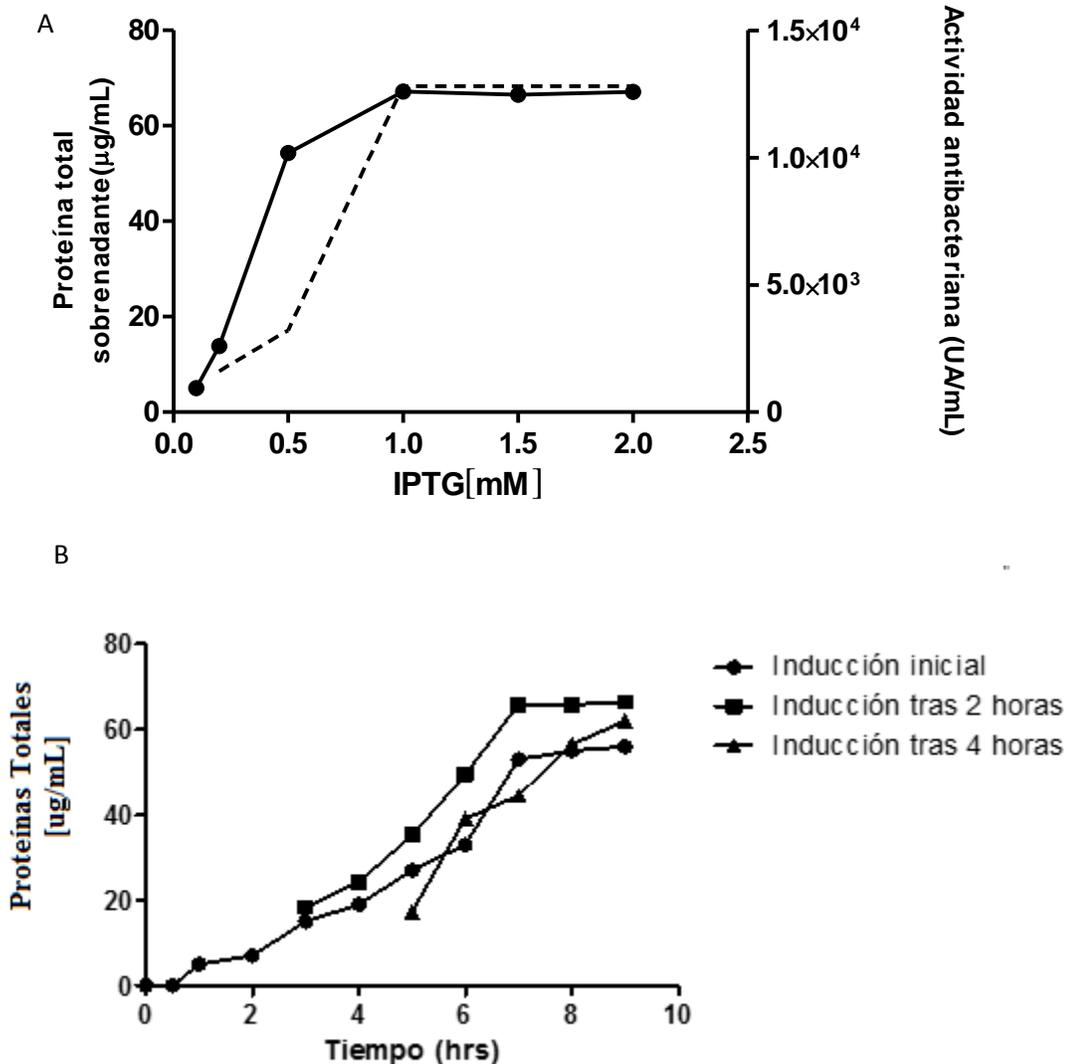


Figura 16. Optimización de la producción de mutacina recombinante. A) En el eje izquierdo se muestra el parámetro cantidad de proteína generada (línea continua) y en el eje derecho se muestra la actividad antimicrobiana (línea segmentada) luego de ser inducido con IPTG a distintas concentraciones. B) Se muestra la cantidad de proteína generada luego de ser inducido con IPTG 1mM a distintos tiempos.

5.3 Purificación de la mutacina recombinante

La mutacina recombinante se purificó a partir del sobrenadante de un cultivo de la cepa productora denominada pGWP4 inducida por 8 horas con una concentración de IPTG 1 mM. Previamente el cultivo fue centrifugado, para posteriormente ser cargado en una columna con resina C₁₈ y se eluyó con una gradiente escalonada y creciente de metanol. Se analizó la actividad de las fracciones obtenidas de la columna, determinando la capacidad de

generar zonas de inhibición de crecimiento sobre un césped de la cepa indicadora *S. salivarius* ATCC 25975 (Figura 17). Además se determinó la concentración de proteína, de las fracciones mediante el método BCA (Tabla 4), según lo descrito en materiales y métodos.

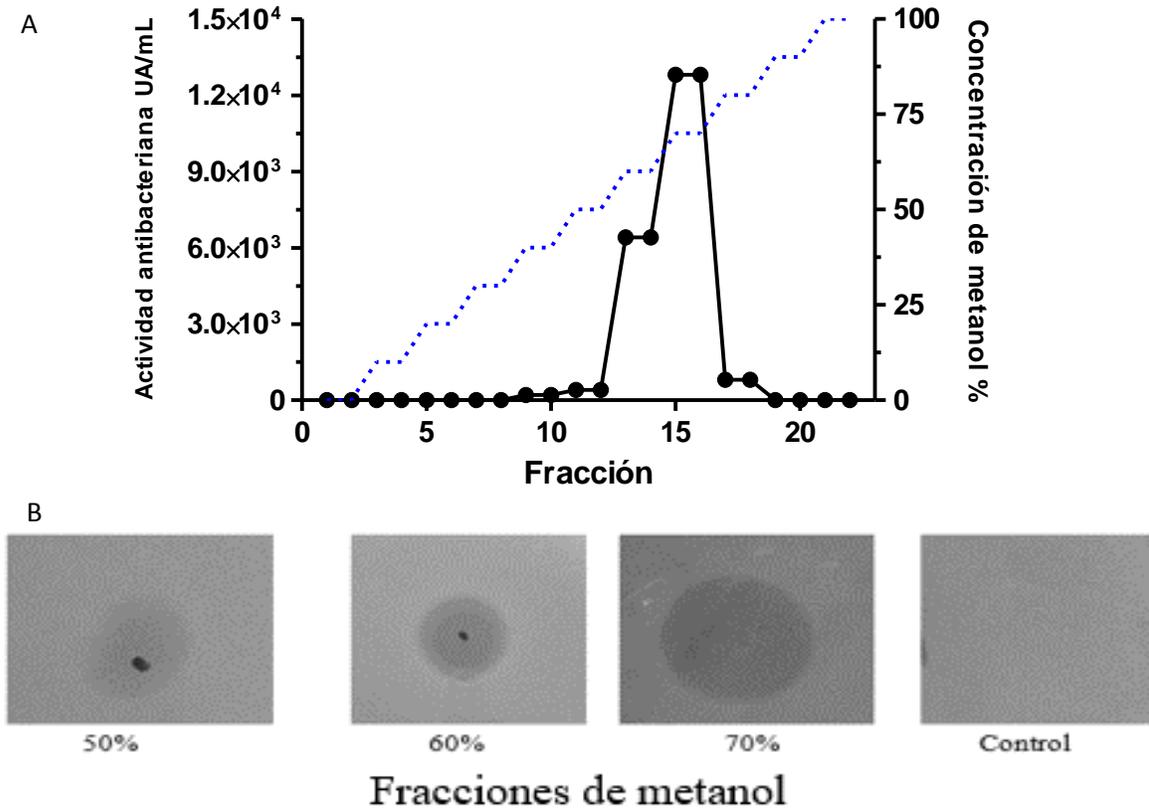


Figura 17 Purificación de la mutacina mediante cromatografía en columna hidrofóbica C18. A) Perfil de elución del sedimento de proteínas que contiene la mutacina recombinante sometido a cromatografía de interacción hidrofóbica con resina C₁₈. En el eje izquierdo se muestra el parámetro de seguimiento, actividad antimicrobiana (línea continua), y en el derecho se muestra la gradiente de concentración de metanol utilizada (línea segmentada). B) Halos de inhibición de crecimiento. Se utilizó 5 μ L de las fracciones eluidas sobre el césped de la cepa indicadora *S. salivarius* ATCC 25975.

Tabla 4 Purificación de la mutacina recombinante mediante columna C18.

Fracciones (% metanol)	Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad (UA/mL)	Actividad específica (UA/ μg)
50	11,1	400	36
60	52,5	6400	122
70	63,7	12800	201

Los resultados de las fracciones muestran que la proteína es medianamente hidrofóbica ya que eluye entre las fracciones que contienen 50% y 70% de metanol donde esta última, es la fracción que posee la mayor actividad específica.

Con la fracción que posee la mayor actividad específica obtenida, se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Con el fin de comprobar la presencia de la proteína. Los resultados de la electroforesis indican que en las fracciones existe un polipéptido de masa molecular superior a 3 kDa (Figura 18B) y que posee actividad al ser incubado sobre un césped de la cepa bacteriana indicadora *S. salivarius* ATCC 25975 (Figura 18C). Previamente lavado con agua bidestilada estéril

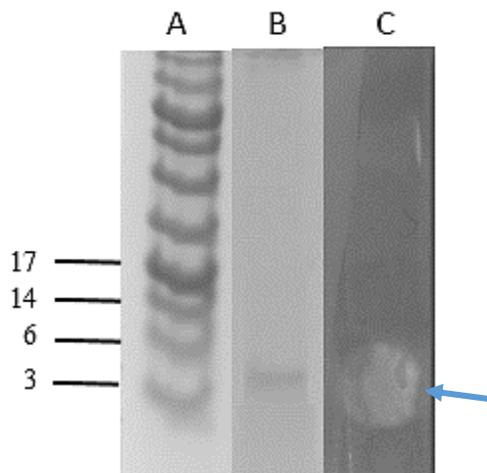


Figura 18. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. A) Estándar de tamaño molecular B) muestra de la fracción 70% recuperada desde la cromatografía en columna hidrofóbica C18. Se observa una banda sobre los 3 kDa C) Ensayo de actividad sobre el césped de la cepa indicadora *S. salivarius* ATCC 25975. Se observa la actividad inhibitoria de la banda sobre los 3 kDa. La flecha indica la zona de inhibición del carril 3, a la misma altura que se observa la banda del carril B.

5.4 Efecto de temperatura sobre la estabilidad de la mutacina recombinante.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la mutacina recombinante se determinó incubando durante 1 hora, 100 μ L de la bacteriocina con actividad 12800 UA/mL, en un rango variado de temperaturas que oscilan entre -80°C y 100°C . Los resultados indican que la mutacina recombinante mantiene su actividad al ser incubada a distintas temperaturas (Tabla 5).

Tabla 5. Estabilidad de la mutacina recombinante frente a temperaturas distintas.

Temperatura	Actividad antibacteriana (UA/mL)
-80°C	12800
-20°C	12800
4°C	12800
25°C	12800
50°C	12800
80°C	12800
100°C	12800

5.5 Efecto de Solventes sobre la estabilidad de la mutacina recombinante

Para determinar si la actividad de mutacina recombinante es afectada por la exposición a distintos solventes con distintos grados de hidrofobicidad, se analizó la actividad antimicrobiana de la bacteriocina, resuspendida en diferentes solventes. Para esto, la mutacina recombinante purificada (12800 UA/mL) se evaporó a 80°C hasta casi sequedad y posteriormente se resuspendió esta bacteriocina en diversos solventes. La actividad de la mutacina recombinante resuspendida en los distintos solventes se determinó mediante el método de dilución crítica. El resultado de este ensayo mostró que la actividad no se ve afectada en ninguno de los solventes utilizados (Tabla 6).

Tabla 6. Estabilidad de la mutacina recombinante a diferentes solventes orgánicos.

Solventes	Actividad Antimicrobiana(*) UA/mL
Acetonitrilo	12800
Butanol	12800
Etanol	12800
Isopropanol	12800
Metanol	12800
Dimetilsulfoxido	12800
PBS	12800
H₂O[#]	12800

Como control se utilizaron los solventes sin mutacina recombinante, los cuales no presentaron actividad antimicrobiana. #: Se empleó agua nanopura estéril

5.6 Efecto de pH sobre la estabilidad de la mutacina recombinante.

El efecto del pH sobre la mutacina recombinante se analizó resuspendiendo la mutacina recombinante en soluciones amortiguadoras e incubando durante 2 horas a 37°C. La actividad de la bacteriocina resuspendida en los distintos amortiguadores se determinó mediante el método de dilución crítica, realizando las diluciones en el mismo tampón que se incubó la bacteriocina. El efecto de diferentes pH sobre la mutacina muestra que la actividad antimicrobiana se ve disminuida a pH superiores a 8 o menores a 6 (Figura 19).

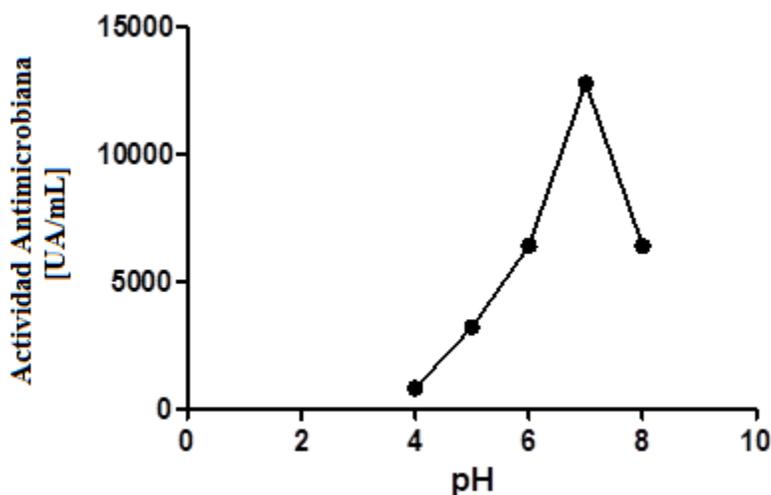


Figura 169. Efecto de pH sobre la actividad antimicrobiana. En el gráfico se muestran los resultados obtenidos para la actividad de la mutacina luego 2 horas de incubación en amortiguador universal Britton-Robinson a diferentes pH. Los ensayos se realizaron en triplicado y se consideró un 100% de actividad presentada por la mutacina incubada a pH 7.

5.7 Determinación del perfil de actividad de la mutacina recombinante frente a bacterias

Gram positivo y Gram negativo

Como se observó con antelación la mutacina recombinante generada, posee actividad frente a *S. salivarius*, al igual que la mutacina IV endógena de *S. mutans* UA159. Con el fin de determinar el espectro de acción la mutacina recombinante, se analizó la actividad a través de ensayo en placa sobre césped utilizando un panel de bacterias Gram negativo y Gram positivo como cepas indicadoras, facilitadas por el cepario del Laboratorio de Bacteriología Molecular de la Universidad Autónoma de Chile, las que se han detallado en la Tabla 2. Los resultados se muestran en la Tabla 5, donde se aprecia que 32 cepas clínicas de *S. mutans* incluyendo la cepa *S. mutans* UA159 y las bacterias Gram negativo arrojaron resultados negativos para la actividad de la mutacina recombinante, sin embargo, variados patógenos Gram positivo son sensibles a la acción antibacteriana de la mutacina recombinante (*Listeria monocitoneges*, *Listeria cruda*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*), lo cual no se había reportado anteriormente (Tabla 7).

Tabla 7. Acción antibacteriana de la mutacina recombinante.

Cepas Indicadoras	N° cepas inhibidas/Total de cepas
<i>Streptococcus mutans</i>	0/33
<i>Streptococcus salivarius</i>	1/1
<i>Streptococcus gordonii</i>	1/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	5/5
<i>Bacillus subtilis</i>	2/2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2/2
<i>Enterococcus faecium</i>	2/2
<i>Listeria monocitogenes</i>	2/2
Bacterias Gram Negativo*	0/10

* Se analizó la actividad frente a: *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Shillega flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *klebsiella oxytoca*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.*

5.8 Efecto de la mutacina recombinante sobre mutantes en la síntesis de peptidoglicano de *S. aureus*.

Para determinar si la acción de la mutacina recombinante actúa mediante una intervención en la síntesis del peptidoglicano, se utilizó una mutante en la síntesis del peptidoglicano. Esta cepa de *S. aureus*, tiene mutado los genes *femAB*, que codifican para las enzimas encargadas de agregar los péptidos de (Gly)₅ a las unidades monoméricas del peptidoglicano, si esto no ocurre, la unidad no presentan el pentapéptido que permite el entrecruzamiento y lipid II no puede soltarse de la unidad monomérica.

Para determinar si esta cepa mutante presenta una sensibilidad a la actividad de la mutacina recombinante, se realizaron experimentos de actividad en placa como se describe en materiales y métodos. Empleando como césped la cepa de *S. aureus* ANG133 que es un mutante para los genes *femAB*, como se mencionó anteriormente.

Los resultados muestran que *S. aureus* ANG133 es sensible a la acción de la mutacina recombinante, al igual que la cepa isogénica Newman (Figura 19), por lo que la sobre exposición de lipid II no sería un determinante en la acción de la mutacina.

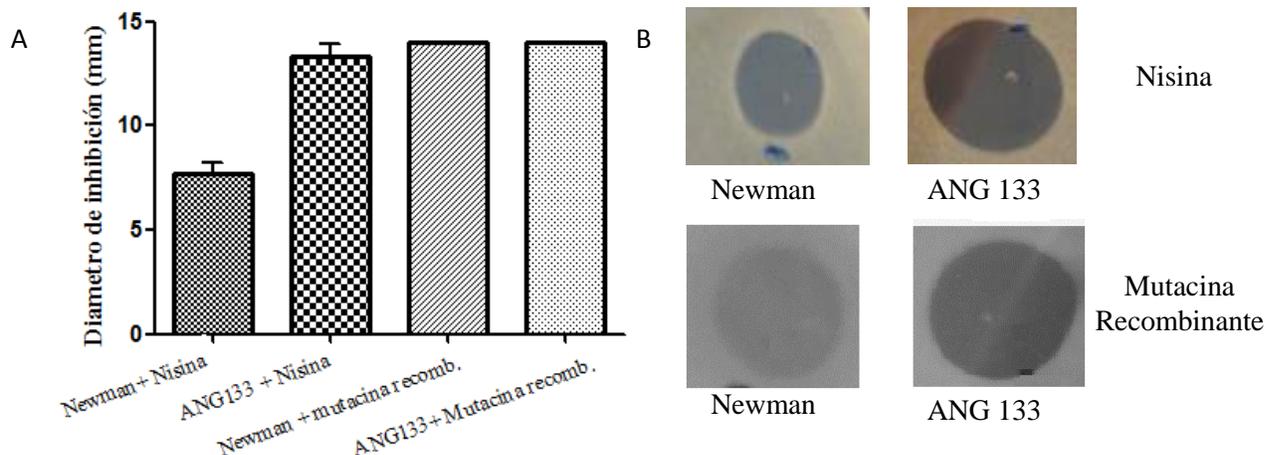


Figura 170. Ensayo de actividad en placa de la cepa mutante *S. aureus* ANG133 y la cepa isogénica *S. aureus* Newman A) Diámetro de la zona de inhibición de crecimiento frente a la acción de la bacteriocina Nisina y de la mutacina recombinante. B) Zona de inhibición de crecimiento en ensayo de actividad en placa utilizando Nisina y mutacina recombinante, sobre cepas de *S. aureus* Newman (isogénica) y *S. aureus* ANG133 (mutante en genes *femA* y *femB*).

5.9 Acción de la mutacina recombinante en cepa reportera de *Bacillus subtilis* para perturbaciones de lipid II

Para determinar si la mutacina recombinante interfiere el ciclo de lipid II se utilizaron cepas reporteras descritas por Helmann y cols (2008). Esta cepa de *B. subtilis* presenta un sistema de dos componentes, donde si hay una interferencia mediado por lipid II, la proteína LiaS se activa, generando una señal que se une al promotor LiaR, el cual está asociado al gen *lac-Z*.

Las cepas se crecieron en agar MH, suplementado con X-gal y se agregaron discos con vancomicina y bacitracina, antibióticos descritos como perturbadores de lipid II. Además se empleó en estos experimentos Nisina, bacteriocina que se une específicamente a lipid II para generar un poro en la membrana. Estos tres compuestos antibacterianos mostraron actividad en la cepa reportera (*B. subtilis* BFs2470), no así en la cepa isogénica (*B. subtilis* CU1065), viéndose una coloración azul en el límite externo de la zona de inhibición de crecimiento (Figura 21), como control se utilizó kanamicina, antibiótico que se une a la subunidad menor del ribosoma y no genera poros en la membrana. Se agregó mutacina recombinante purificada, la cual no muestra zona de coloración azul en la cepa reportera.

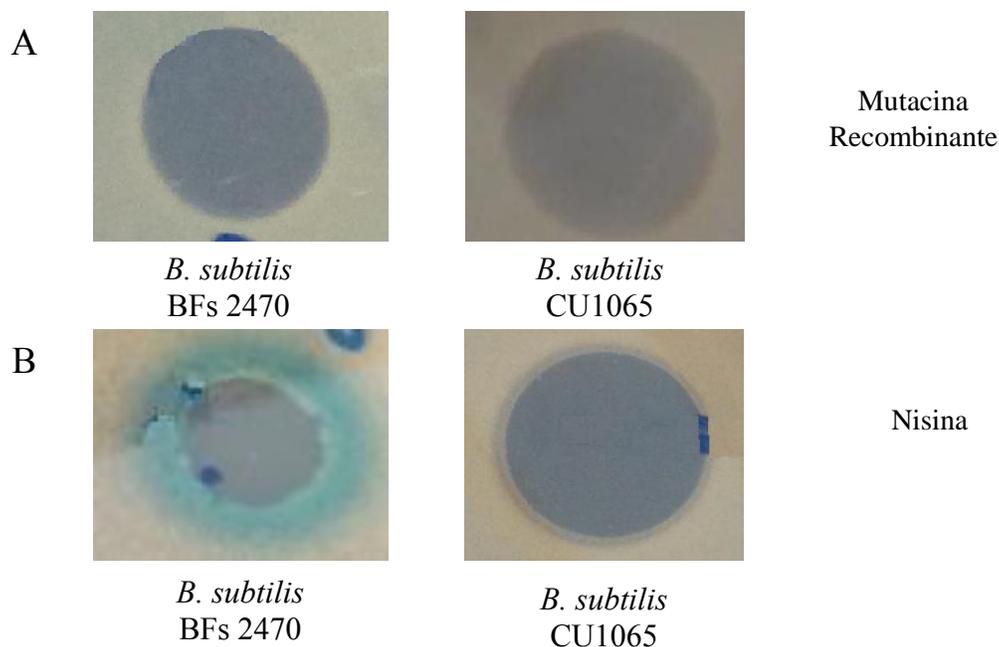


Figura 181. Ensayo para medir perturbaciones en el ciclo de lipid II a causa de la mutacina recombinante. A) Se muestra la cepa reportera *B. subtilis* BFs2470 y la cepa isogénica *B. subtilis* Cu1065, ambas sin coloración. B) Control positivo Nisina donde se observa la coloración azul en la cepa reportera *B. subtilis* BFs2470. Se muestra la cepa isogénica la cual no presenta coloración puesto que no posee el sistema LiaRS

6. Discusión.

El estudio de las bacteriocinas ha tomado gran importancia por sus aplicaciones biotecnológicas en biomedicina y en la bioconservación de los alimentos (Medina *et al.*, 2008). Existen variados microorganismo que pueden generar más de una bacteriocina, entre ellos encontramos la cepa de *Streptococcus mutans* UA159, a la cual se le han detectado 4 bacteriocinas (Hossain y Biswas., 2011), como la mutacina IV comprendida por los componentes *nImA* y *nImB*, la mutacina V *nImC* y la mutacina VI de la cual no existe mayor información (Merritt y Qi., 2012). Una de las estrategias utilizadas para el estudio independiente de las mutacinas ha sido el empleo de mutaciones *know out* de cada gen que producen a cada una de las mutacinas (Hale, *et al.*, 2005), siendo un proceso tedioso, largo y que genera cepas resistentes a antibióticos como eritromicina (Hale, *et al.*, 2005). Estos motivos generan que nuevas formas de estudio y producción de bacteriocinas sean desarrollados, es por esto que se ha propuesto en esta tesis construir un sistema de expresión heteróloga de proteínas tipo bacteriocinas de tamaño pequeño y sin modificaciones

post-traduccionales, el cual permita recuperar el péptido o polipéptido desde el medio de cultivo sin la necesidad de lisar las células que lo producen. Para ello se eligió el vector comercial pRSF-duet de la empresa Novagen, cuya característica principal es la de poseer 2 sitios de múltiple clonamiento, en ellos se clonó de forma independiente el gen *nImA* de la mutacina IV (MCS-2) y los genes *cvaA* y *cvaB* (MCS-1), correspondientes al transportador dedicado de la microcina V, el cual nos permite obtener el componente *nImA* de la mutacina IV, desde el medio de cultivo. Este transportador se obtuvo a partir de la cepa de *E. coli* MC4100 pColV, cepa productora de la microcina V. Se utilizó este transportador debido a que dentro de las bacteriocinas tipo microcina, la microcina V ha sido ampliamente estudiada (Gilson *et al.* 1990; Fath *et al.* 1994; Skvirsky *et al.* 1995; Zhong *et al.* 1996; Boyer y Tai 1998; Wu *et al.* 2012). Otra razón por la que se utilizó este transportador, es que ha sido empleado para secretar con éxito otra bacteriocina, como la microcina H47 (Azpiroz *et al.* 2001). Sin embargo no existen reportes de la utilización del transportador de la microcina V, con bacteriocinas de bacterias Gram positivo, por lo que esta tesis contribuye con las características de plasticidad mencionadas por el trabajo de Azpiroz en el 2001 que posee el transportador de microcina V.

La mutacina IV ha sido descrita como una bacteriocina clase IIb (dipeptido no lantibiotico) y ha sido caracterizada de forma parcial a la cual se le ha atribuido por un lado, un amplio rango de acción (Hale *et al.* 2005), como también espectros más reducidos (Kamiya *et al.* 2008). A la fecha no existen publicaciones que hayan elucidado el espectro de acción de cada gen que compone a la mutacina IV. Sin embargo, se logró generar una secuencia genética quimérica del componente *nImA* de la mutacina IV mediante PCR con primarios específicos (Tabla 3), reemplazando el péptido señal endógeno de la mutacina IV por la secuencia del péptido señal de la microcina V (Figura 9), siendo parte crucial para poder exportar la mutacina recombinante hacia el medio extracelular, y facilitar la recuperación de la mutacina recombinante desde el sobrenadante del medio de cultivo. Esto genera una gran ventaja ya que por un lado se está produciendo la mutacina recombinante, sin generar cuerpos de inclusión o aglomerados en el citoplasma, siendo innecesario la lisis celular, facilitando la recuperación del polipéptido, y por otro lado reduciendo las sustancias contaminantes que pueden reaccionar con proteínas recombinantes que quedan alojadas en el citoplasma de *E. coli*. (Lara 2011).

Gracias al sistema de expresión heteróloga generado, hace de este trabajo uno de los primeros en describir el rango de acción del componente *nlmA* de la mutacina IV, el cual muestra actividad frente a la cepa indicadora *Streptococcus salivarius*, también frente a bacterias Gram positivo como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, patógenos de gran relevancia tanto en el área clínica como en el área de alimentos. Sin embargo arrojó resultados negativos al ensayar la mutacina recombinante sobre aislados de *Streptococcus mutans* los cuales en su genoma no presentaban el componente *nlmA* de la mutacina IV (Tabla 2), premisa a considerar ya que si este componente se encontrase en el genoma, es más probable que también exista el gen de inmunidad. Por tal motivo y como existe en el sistema productor de la mutacina IV un gen de inmunidad, probablemente la actividad contra *S. mutans* puede estar asociada al componente génico *nlmB* de la mutacina IV. Resultados similares se obtuvieron al realizar ensayos en placa frente a bacterias Gram negativo (Tabla 2).

Por otro lado se logró elucidar algunas propiedades fisicoquímicas del componente *nlmA*, dentro de ellas encontramos que su actividad no se ve afectada por temperatura que oscilan entre -80°C y 100°C. Esta propiedad hace del componente *nlmA*, un buen candidato para la generación de un biopreservante de alimentos, debido a la capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocitogenes*, uno de los patógenos más mortales transmitido por alimentos (Schuppler y Loessner 2010) y por otro lado uno de los patógenos más persistentes en las fábricas de procesados de alimentos (Ferreira *et al.* 2014). En literatura las bacteriocinas que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria* poseen un dominio muy conservado en el extremo amino terminal YGNGV (Cui *et al.* 2012), dominio que no posee el componente *nlmA*.

Otra característica es su estabilidad a variaciones de pH, encontrando un rango óptimo entre 5-8 en la escala de pH. Esta característica junto con la capacidad de inhibir el crecimiento tanto de *S. aureus* como de *E. faecalis*, hace del componente *nlmA*, un candidato para posibles infecciones cutáneas (Harrison *et al.*, 1986), causadas por estos patógenos, que podemos encontrar en infecciones de pie diabético (Neves., 2012), patología que en Chile ha llevado a realizar más de 2000 amputaciones anuales, y que con el pasar de los años no ha sufrido disminución alguna, si no que más bien estas cifras van en ascenso.(Seguel, 2013).

Por otro lado se eligió la cepa de *E. coli* BL21(DE3) para realizar la expresión, debido a que es una de las plataformas ampliamente usadas para la producción de proteínas recombinantes, ya que

presenta una serie de ventajas importantes (Demain y Vaishnav 2009): i) su genoma es conocido desde hace varios años, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética, ii) existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo, iii) Existen vectores bien establecidos para la producción de proteínas recombinantes (entre ellos el vector pRSF-duet), iv) puede crecer rápido en medios muy simples, con altos niveles de producción de proteínas recombinantes y cerca del 30 % de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas empleando *E. coli* (Ferrer-Miralles *et al.* 2009).

La masa molecular de la mutacina recombinante es superior a 3kDa e inferior a 6 kDa, resultado que es consistente con el valor teórico predicho a través de herramientas bioinformáticas que corresponden a 4169 Dalton para el componente codificado por el gen *nlmA* y con los valores descritos en literatura (Nicolas, 2007).

Con el fin de seguir recabando información sobre el componente *nlmA* de la mutacina IV, se realizaron 2 experimentos para poder elucidar el modo de acción de este péptido. En la literatura hemos encontrado que solamente se ha comprobado experimentalmente el mecanismo de acción de la mutacina II. (Nicolas y Mota-Meira 2007).

Utilizando los resultados previos sobre el espectro de acción del componente *nlmA* de la mutacina IV se procedió a realizar ensayos de actividad en placa utilizando la cepa *S. aureus* ANG 133 que genera un peptidoglicano truncado ya que se encuentran mutadas las enzimas FemA y FemB (Gründling y Schneewind 2006), las cuales tienen como función agregar el pentapéptido de glicina necesario para el entrecruzamiento del peptidoglicano. Esta mutante al no lograr realizar el entrecruzamiento del peptidoglicano, el monómero no puede soltarse de su translocador, denominado lipid II, esto genera que el translocador lipid II se encuentre sobreexpuesto impidiendo su ingreso nuevamente a la célula. La cepa *S. aureus* ANG 133 resultó ser sensible, a la acción de la mutacina recombinante igualmente que la cepa isogénica no se observaron cambios en la sensibilidad. Caso contrario es lo que ocurre en bacteriocinas que ocupan como blanco de acción el translocador lipid II, Ejemplo de ello, es la Nisina, donde la cepa mutante *S. aureus* ANG133 resulta tener mayor sensibilidad a la acción de Nisina comparada con la cepa isogénica que presentó un menor diámetro de inhibición. Este resultado hace pensar que el posible blanco de acción no sea lipid II ya que al sobreexponer el translocador, no vemos aumento de la actividad, si no que más bien se mantiene el mismo efecto inhibitorio.

Para confirmar esta idea se realizó un experimento utilizando la cepa de *B. subtilis* BFS2470 que posee un sistema reportero que se basa en la expresión de β -galactosidasa, cuando existen perturbaciones en el ciclo de lipid II, generando una zona de coloración azul en ensayos de actividad en placa suplementados con X-gal. Los resultados obtenidos para la mutacina recombinante, muestran un halo de inhibición la cepa de *B. subtilis* BFS2470 sin coloración. Al comparar estos resultados con la bacteriocina Nisina (Figura 20), podemos descartar que el componente *nlmA* de la mutacina IV provoca perturbaciones en el ciclo de lipid II.

Ambos resultado, ya sea los ensayos en la cepa *S. aureus* ANG133, y el uso de la cepa reportera *B. subtilis* BFS2470, confirman que la mutacina recombinante no utiliza el blanco de acción lipid II. Aunque no se logró determinar el blanco de acción del componente *nlmA* de la mutacina IV si se logró descartar uno de los sitios que ocupan otras bacteriocinas, ejemplo de ello es la bacteriocina Nisina.

Estudios *in silico* recientes han sugerido que la mutacina IV (componentes *nlmA* y *nlmB*), utiliza como blanco de acción una proteína de la superficie de *S. aureus* denominada isdB, proteína que ha sido descrita con la capacidad de capturar el grupo hemo de la hemoglobina por *S. aureus* para ser utilizado como fuente de hierro (Jain *et al.* 2014). Sin embargo no existen estudios *in vitro* que avalen este resultado o que realmente aseveren el mecanismo de acción tanto de la mutacina IV como de cada uno de sus componentes.

Por los resultados obtenidos, el componente *nlmA* de la mutacina IV puede ser clasificado como una bacteriocina medianamente hidrofóbica, termoestable cuya actividad es estable en diversos solventes orgánicos e inorgánicos y cuya actividad antimicrobiana se ve disminuida a valores extremos de pH, posee un espectro de acción acotado a algunas bacterias Gram positivo de importancia alimentaria como lo es *Listeria monocytogenes* y de importancia clínica como *Staphylococcus aureus*.

7. Conclusión y Proyecciones

- El sistema de expresión heteróloga generado, denominado pGWP-4 en la cepa productora *E. coli* BL21 (DE3), genera un polipéptido con un tamaño mayor a 3 kDa y presenta actividad antimicrobiana frente a la cepa indicadora *S. salivarius* ATCC 25975 características que presenta el componente *nlmA* de la mutacina IV.
- El componente *nlmA* recombinante carece de actividad sobre cepas de *S. mutans*, lo que sugiere que el componente *nlmB* del sistema de la mutacina IV es el que presenta actividad sobre *S. mutans*.
- La actividad de *nlmA* recombinante, no se ve alterada frente a temperaturas que oscilan entre -80°C – 100°C y se mantiene estable en un rango de pH entre 5 – 8 al igual que al ser incubada en solventes orgánicos e inorgánicos.
- El espectro de acción del componente *nlmA* de la mutacina IV se ve comprendido sólo para bacterias Gram positivo. Dentro de ellas encontramos, a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Dentro de las proyecciones de este trabajo de tesis encontramos un nuevo sistema de expresión heteróloga que facilitará el estudio y producción de polipéptidos o proteínas pequeñas tipo bacteriocinas que debido a múltiples factores como la baja producción o la falta de conocimientos para su purificación, aún no han sido estudiadas y por otro lado hemos generado una gran herramienta para la producción de nuevos polipéptidos con actividad antimicrobiana contribuyendo a la producción de nuevos biopreservantes y a la reducción del uso indiscriminado de antibióticos.

8. Bibliografía.

- Aas, J. a et al., (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1407–1417.
- Azpiroz, M., Rodríguez, E. y Laviña, M., (2001). The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(3), 969–972.
- Balamurugan, V., (2007). *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. *Indian Journal of biotechnology*, 6, 175–186.
- Banas, J., (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience*, 9,.1267–1277.
- Baquero, F. y Moreno, F., (1984). The microcins. *FEMS microbiology letters*, 23, .117–124.
- Bimboim, H. y Doly, J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513–1523.
- Boyer, a E. y Tai, P.C., (1998). Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *Journal of bacteriology*, 180, .1662–1672.
- Chiang, Y.-M. et al., (2013). An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 135, .7720–7731.
- Clarke, J.K., (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *The British Journal of Experimental Pathology*, 5,141–147.
- Cotter, P.D., Ross, R.P. y Hill, C., (2005). Bacteriocins: Developing innate Immunity For Food. *Food Microbiology*, 3,777–788.
- Cui, Y. et al., (2012). Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International journal of molecular sciences*, 13,.16668–16707.
- Demain, A.L. y Vaishnav, P., (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27,.297–306.
- Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J. y Rebuffat, S., (2002). Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, 84, 511–519.
- Duquesne, S. y Destoumieux-Garzón, D., (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural product reports*, 24, .75005.
- Fath, M. y Kolter, R., (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological reviews*, 57, 995–1017.
- Fath, M.J. et al., (1994). Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry*, 33, 6911–6917.
- Ferreira, V. et al., (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77, 150–170.
- Ferrer-Miralles, N. et al., (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial*

cell factories, 8, .17.

- Gillor, O., Kirkup, B.C. y Riley, M.A., (2004). Colicins and microcins: The next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 129–146.
- Gilson, L., Mahanty, H.K. y Kolter, R., (1990). Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *The EMBO journal*, 9, 3875–3884.
- Grundling, A., Missiakas, D.M. y Schneewind, O., (2006). *Staphylococcus aureus* Mutants with Increased Lysostaphin Resistance. *Journal of Bacteriology*, 188, 6286–6297.
- Grundling, A. y Schneewind, O., (2006). Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 188, 2463–2472.
- Hale, J., Heng, N., et al., (2005). Identification of nlmTE, the locus encoding the ABC transport system required for export of nonlantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 187, 5036–5039.
- Hale, J., Ting, Y. y Jack, R., (2005). Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Applied and environmental microbiology*, 71, .7613–7617.
- Harrison, D.K. et al., (1986). pH changes in the dermis during the course of the tuberculin skin test. *Immunology*, 59, .497–501.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B. y Nes, I.F., (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, 16, .229–240.
- Hossain, M. y Biswas, I., (2012). SMU. 152 acts as an immunity protein for mutacin IV. *Journal of bacteriology*, 194, .3486–3494.
- Hossain, M.S. y Biswas, I., (2011). Mutacins from *Streptococcus mutans* UA159 are active against multiple streptococcal species. *Applied and environmental microbiology*, 77,.2428–2434.
- Jain, C.K. et al., (2014). Enhanced interaction of shuffled Mutacin IV, an antimicrobial peptide of bacterial origin, with surface protein ISDB of *staphylococcus aureus*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, .71–76.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W., (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491–511.
- Kamiya, R.U., Höfling, J.F. y Gonçalves, R.B., (2008). Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. *Journal of medical microbiology*, 57, 626–635.
- Kelstrup, J. y Gibbons, R.J., (1969). Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Archives of oral biology*, 14, 251–258.
- Kreth, J., Zhang, Y. y Herzberg, M.C., (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms : *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 190, 4632-4640.
- Lagos, R. et al., (2001). Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Molecular microbiology*, 42, .229–243.

- Lara, A., (2011). Produccion de proteinas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 10, .209–223.
- Loesche, W.J., (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*, 50, .353–380.
- Mascher, T. et al., 2004. Antibiotic-Inducible Promoter Regulated by the Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System LiaRS of *Bacillus subtilis*. 48, .2888–2896.
- Medina, M. et al., (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas : una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista mexicana de ciencias farmaceuticas*. 39. 49-57
- Merritt, J. y Qi, F., (2012). The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Molecular oral microbiology*, 27, .57–69.
- Muñoz-rojas, J., (2004). Bacteriocinas : una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 1, 1–20.
- Neves, J., (2012). Diabetic Foot Infections: Current Diagnosis and Treatment. *Journal of diabetic foot complication*. 4. 26-45
- Nicolas, G., (2007). Molecular genetics, genomics and biochemistry of mutacins. *Genome and genmics*. 1, 193-208.
- Nicolas, G. y Mota-Meira, M., (2007). Mutacins and their potential use in food preservation. *Food*. 1, 161-171.
- Pons, A.M. et al., (2002). New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 84, .531–537.
- Qi, F., Chen, P. y Caufield, P., (2001). The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Applied and environmental microbiology*, 67,15–21.
- Rees, D., Johnson, E. y Lewinson, O., (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews molecular cell biology*, 10,218–227.
- Rosano, G.L. y Ceccarelli, E.A., (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5,1–17.
- Schuppler, M. y Loessner, M.J., (2010). The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International journal of inflammation*, 2010, 1-12.
- Seguel, G., (2013). An update on diabetic foot. *Revista médica de Chile*, 141, 1464–1469.
- Skvirsky, R.C., Reginald, S. y Shen, X., (1995). Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177,6153–6159.
- Terpe, K., (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72,.211–222.
- Vassiliadis, G., (2011). Class II Microcins. *Prokaryotic antimicrobial peptides*. 309-332.
- Wu, K.-H., Hsieh, Y.-H. y Tai, P.C., (2012). Mutational analysis of Cvab, an ABC transporter involved in the secretion of active colicin V. *PloS one*, 7,353-382.

- Xie, Z. et al., (2010). Identification of a novel bacteriocin regulatory system in *Streptococcus mutans*. *Molecular microbiology*, 78, 1431–1447.
- Yonezawa, H. y Kuramitsu, H.K., (2005). Genetic Analysis of a Unique Bacteriocin , Smb , Produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49,.541–548.
- Zhong, X., Kolter, R. y Tai, P.C., (1996). Processing of colicin V-1, a secretable marker protein of a bacterial ATP binding cassette export system, requires membrane integrity, energy, and cytosolic factors. *The Journal of biological chemistry*, 271,.28057–28063.