



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

***REGULACIÓN DEL ESTADO DE
FOSFORILACIÓN DEL REGULADOR DE LA
RESPUESTA PrcR DE *Lactobacillus casei*
POR LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR
DE ACETIL-FOSFATO.***

**Trabajo de fin de grado de Ciencia y Tecnología de
los Alimentos**

Autor: José Miguel Peña Carrera

Tutor: Eduardo Bueso Rodenas

Tutor externo: Manuel Zúñiga Cabrera

Curso Académico 2018/2019

Valencia, julio 2019

Título: Regulación del estado de fosforilación del regulador de la respuesta PrcR de *Lactobacillus casei* por la concentración intracelular de acetil-fosfato.

Resumen: Los sistemas de transducción de señal de dos componentes (TCS) están típicamente constituidos por una proteína sensor, normalmente anclada en la membrana celular, y un regulador de la respuesta (RR) citoplásmico que generalmente actúa como regulador transcripcional. La detección de un estímulo específico por parte del sensor activa su autofosforilación y subsiguiente transferencia del grupo fosforilo al RR. El estado de fosforilación de este último modula su actividad reguladora, aumentando o reduciendo su afinidad por sus secuencias diana. Aunque una célula puede contener múltiples TCS, la transferencia entre sensores y reguladores asociados suele ser muy específica. Algunos RR pueden también ser fosforilados por metabolitos como el acetil-fosfato, que son indicadores del estado energético celular. PrcR es un RR de *Lactobacillus casei* que controla la expresión de un gran número de genes en este organismo, especialmente genes implicados en la captación de fuentes de nitrógeno (Alcántara et al. 2016; <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>). En un estudio previo llevado a cabo en el laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos se ha observado que PrcR puede ser fosforilado independientemente de su sensor asociado PrcK. Con el fin de determinar si PrcR es fosforilado por acetil-fosfato, se plantea la alteración de las rutas de síntesis de acetil-fosfato en este organismo con el objeto de determinar su efecto sobre el estado de fosforilación de PrcR. En *Lb. casei* los niveles de acetil-P están controlados por las actividades de piruvato oxidasas, fosfotransacetilasa, acetato quinasa y acilfosfatasa. Se dispone de datos transcriptómicos que permiten estimar la expresión de los genes implicados en las condiciones típicas de cultivo de este organismo.

El trabajo propuesto planteó en primer lugar, a partir de los datos transcriptómicos, obtener cepas mutantes deficientes de acetato quinasa y fosfotransacetilasa por recombinación homóloga. Con este fin fueron usados vectores no replicativos siguiendo métodos habituales en el laboratorio. Los resultados de esta parte del trabajo indicaron que la obtención de mutantes deficientes en fosfotransacetilasa debían ser obtenidos por otras técnicas de transformación genética. En segundo lugar, se determinó el estado de fosforilación de PrcR mediante análisis por electroforesis con el reactivo Phos-tag y detección mediante Western con un suero específico contra PrcR de extractos crudos obtenidos de bajo distintas condiciones de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron una posible relación entre el acetil-fosfato con el estado de fosforilación de PrcR, aunque faltaría más experimentación para poder confirmarlo.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, sistema de dos componentes, regulador de la respuesta, acetil-fosfato.

Title: Regulation of the phosphorylation status of the PrcR response regulator of *Lactobacillus casei* by the intracellular concentration of acetyl-phosphate.

Abstract: Two-component signal transduction systems (TCS) are generally constituted by a protein sensor, normally anchored to the cell membrane, and a cytoplasmic response regulator (RR) that generally functions as a transcriptional regulator. The detection of a specific stimulus by the sensor activates its autophosphorylation and subsequent transfer of the phosphoryl group to the RR. The state of phosphorylation of the latter modulates its regulatory activity, increasing or reducing its affinity for its target sequences. Although a cell can have multiple TCS, the transfer between the sensors and the associated regulators are usually very specific. Some of them can also be phosphorylated by metabolites such as acetyl-phosphate, which are indicators of the cellular energy status. PrcR is a RR of *Lactobacillus casei* that controls the expression of a large number of genes in this organism, especially genes involved in the uptake of nitrogen sources (Alcántara et al., 2016; <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>). In a previous study carried out in the Laboratory of Lactic Acid Bacteria and Probiotics, it has been observed that PrcR can be phosphorylated independently of its associated sensor PrcK. In order to determine if PrcR is phosphorylated by acetyl-phosphate, it was decided to test the alteration of the routes of synthesis of acetyl-phosphate in this organism in order to determine its effect on the state of the phosphorylation of PrcR. In *Lb. casei* the levels of acetyl-P are controlled by the activities of pyruvate oxidases, phosphotransacetylase, acetate kinases and acyl phosphatase. Transcriptional data are available to estimate the expression of the genes involved in the typical culture conditions of this organism. The proposed work first raised, from the transcriptomic data, mutant deficient strains of acetate kinase and phosphotransacetylase by homologous recombination. To this end, non-replicative vectors were used following common laboratory methods, the results of this part of the work indicated that the phosphotransacetylase-deficient mutants should be obtained by other genetic transformation techniques. Secondly, the phosphorylation status of PrcR was determined by electrophoresis analysis with the Phos-tag reagent and Western detection with a specific serum against PrcR of crude extracts obtained under different culture conditions. The results obtained showed a possible relationship between acetyl-phosphate and the phosphorylation state of PrcR, although more experimentation would be necessary to confirm it.

Key words: *Lactobacillus casei*, two-component system, response regulator, acetyl-phosphate.

AGRADECIMIENTO

A mis compañeros que me han acompañado durante estos 4 años sufriendo a mi lado y apoyándonos los unos a los otros.

A mi tutor externo Manuel Zuñiga por guiarme durante todo el proceso del TFG y ayudarme en todo momento que lo necesitara, gracias por aguantarme, y a mi tutor de la UPV que, aunque no hemos hablado demasiado, si se ha preocupado en todo momento de mi y me ha preguntado muchas veces para ver como iba en mi trabajo.

A mi familia por darme esta oportunidad de sacarme una carrera, por criarme todos estos años y ayudarme a seguir adelante pese a las dificultades. En especial a mis abuelos: Desamparados Inés Cervero, Francisca Rubio, Isidro Miguel Carrera y Ramon Peña, también a mi tía Amalia Carrera que siempre tuvo un espacio en su casa para mí y la considero otra abuela. A todos ellos por haberme compartido su experiencia y haber intentado hacer de mí una mejor persona.

“Si algo he aprendido de la vida es que se puede resumir en dos palabras: sigue adelante”.

Anónimo

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	BACTERIAS LÁCTICAS	1
1.1.1	Las bacterias lácticas y su utilización para la producción de alimentos y la salud humana	1
1.1.2	Rutas de degradación de azúcares en BAL	3
1.2	<i>Lactobacillus casei</i>	4
1.3	MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL: SISTEMAS DE DOS COMPONENTES ..	5
2.	OBJETIVOS.....	7
3	MATERIAL Y METODOS	7
2.1	MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO	8
2.2	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN.....	8
2.3	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	9
2.4	CONTRUCCIÓN DE MUTANTES.....	10
2.4.1	CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACK Y PTA EN MEDIO MRS Y MEDIO BASAL SIN ACETATO	12
2.5	DETERMIANCIÓN DEL ESTADO DE REGULACIÓN DEL REGULADOR PRCR	13
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
3.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DIANA Y ESTRATEGIA DE INACTIVACIÓN	15
3.2	TRANSFORMACIÓN DE <i>LB. CASEI</i> BL23 Y AISLAMIENTO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS DEFICIENTES EN ACKA O PTA.	17
3.3	CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACETATO QUINASA Y FOSFOTRANSACETILASA EN MEDIO MRS	19
3.4	CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACETATO QUINASA Y FOSFOTRANSACETILASA EN MEDIO BASAL SIN ACETATO	20
3.5	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACION DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRCR	21
5	CONCLUSIONES.....	24
6	BIBLIOGRAFIA	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo amplio y heterogéneo de microorganismos Gram-positivos, no formadores de esporas, generalmente inmóviles, de morfología variada, carentes de catalasa, y cuya característica definitoria es su metabolismo fermentativo por el cual degradan azúcares principalmente a ácido láctico (Orla-Jensen, 1919). Originalmente dentro de las BAL se incluyeron lactobacilos y bifidobacterias por sus similitudes fenotípicas, especialmente su capacidad de fermentar azúcares a ácido láctico. Los estudios moleculares llevados a cabo en los años 60 sin embargo mostraron que las bifidobacterias eran muy diferentes de las restantes bacterias lácticas (diferente contenido de G+C, la composición de la pared celular, etc.) (Poupard et al. 1973). Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias de ARN ribosómico permitió establecer convincentemente la clasificación de las bifidobacterias como un orden separado dentro de la clase *Actinobacteria* (Schleifer y Ludwig, 1995). Actualmente se considera bacterias lácticas en sentido estricto a aquellas incluidas en el orden *Lactobacillales* que consta actualmente de seis familias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*.

Las BAL son microorganismos nutricionalmente exigentes debido a que poseen una capacidad biosintética limitada, por lo que habitualmente proliferan en medios ricos en nutrientes y disponen de mecanismos especializados de captación de los mismos. Por ejemplo, la concentración de aminoácidos libres en leche es muy limitada, por lo que el crecimiento de BAL depende de la producción de proteinasas, peptidasas y sistemas de transporte de aminoácidos y péptidos específicos (Pescumma, 2008). No obstante, en general poseen una notable diversidad metabólica para utilizar distintos nutrientes, especialmente azúcares. El análisis de los genomas de numerosas BAL ha puesto de manifiesto cómo se concilian estas dos características: por un lado, la evolución de las BAL se ha acompañado de una pérdida de genes durante el proceso de adaptación a hábitats ricos en nutrientes que ha afectado sobre todo a las rutas biosintéticas. Por otra parte, se ha producido una ganancia de genes, fundamentalmente por procesos de transferencia genética horizontal, que les ha permitido diversificar los nutrientes que pueden utilizar (Makarova et al., 2006).

1.1.1 Las bacterias lácticas y su utilización para la producción de alimentos y la salud humana

Las BAL han sido bacterias utilizadas inadvertidamente desde hace miles de años para la transformación de diversos alimentos. La característica principal que aportan es la obtención de derivados más duraderos debido a que su crecimiento está asociado a la acidificación, fundamentalmente por producción de ácido láctico, y la producción de otras sustancias antimicrobianas que inhiben la proliferación de otros microorganismos patógenos o alterantes. Además, el crecimiento de las BAL contribuye al sabor, aroma y textura de los productos fermentados. Así, en función de las diferentes BAL y otros microorganismos que fermenten una misma materia prima, pueden obtenerse productos diferentes. Por ejemplo, a partir de la leche

pueden obtenerse diferentes productos tales como yogures, quesos, kéfir, etc. En la Tabla 1 se enumeran algunos productos fermentados por BAL y las especies más relevantes asociadas.

Tipo de productos fermentados	Bacterias ácido lácticas
Mantequilla	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yogurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Kéfir	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Salchichón	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>
Olivas fermentadas	<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Vino	<i>Oenococcus oeni</i>
Queso curado	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

Tabla 1. Productos fermentados por BAL y especies de las mismas asociadas.

Debido al reiterado uso de las BAL en procesos fermentativos, especialmente por la práctica de la reinoculación, se ha propiciado la adaptación de especies de BAL a diferentes sistemas alimentarios específicos (domesticación) que ha ido acompañada de cambios en sus genomas como se ha señalado anteriormente (Makarova et al., 2006).

Además de ser indispensables para obtener los alimentos antes mencionados también tienen un importante papel en la salud ya que muchas BAL forman parte de la microbiota, especialmente de las mucosas, asociada a animales, incluido el ser humano. En el siglo XX Metchnikoff propuso la idea que el consumo de las bacterias lácticas podría tener una repercusión positiva para la salud del ser humano, debido a que serían capaces de controlar las poblaciones de otras especies de bacterias que pueden ser perjudiciales para la salud mediante los productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como el láctico y el acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo o bacteriocinas. Estos aspectos relacionados con la salud han dado nuevo impulso al estudio de las bacterias lácticas en la Tecnología de Alimentos (Papadimitriou et al. 2016).

1.1.2 Rutas de degradación de azúcares en BAL

Se han descrito dos rutas principales de degradación de hexosas en BAL, la ruta homofermentativa (Embden-Meyerhof) y la ruta heterofermentativa (Figura 1) (Kandler, 1983). La degradación de azúcares por la ruta homofermentativa produce lactato como principal producto final mientras que la ruta heterofermentativa produce una mezcla de lactato, acetato y etanol. Entre las BAL homofermentativas, tradicionalmente se han distinguido dos grupos, las homofermentativas estrictas y las heterofermentativas facultativas. La diferencia entre ambos grupos estriba en que las segundas son capaces de degradar pentosas por la ruta de las pentosas fosfato ya que poseen las enzimas ribulosa-5P epimerasa y fosfocetolasa, mientras que las primeras sólo pueden utilizar las hexosas.

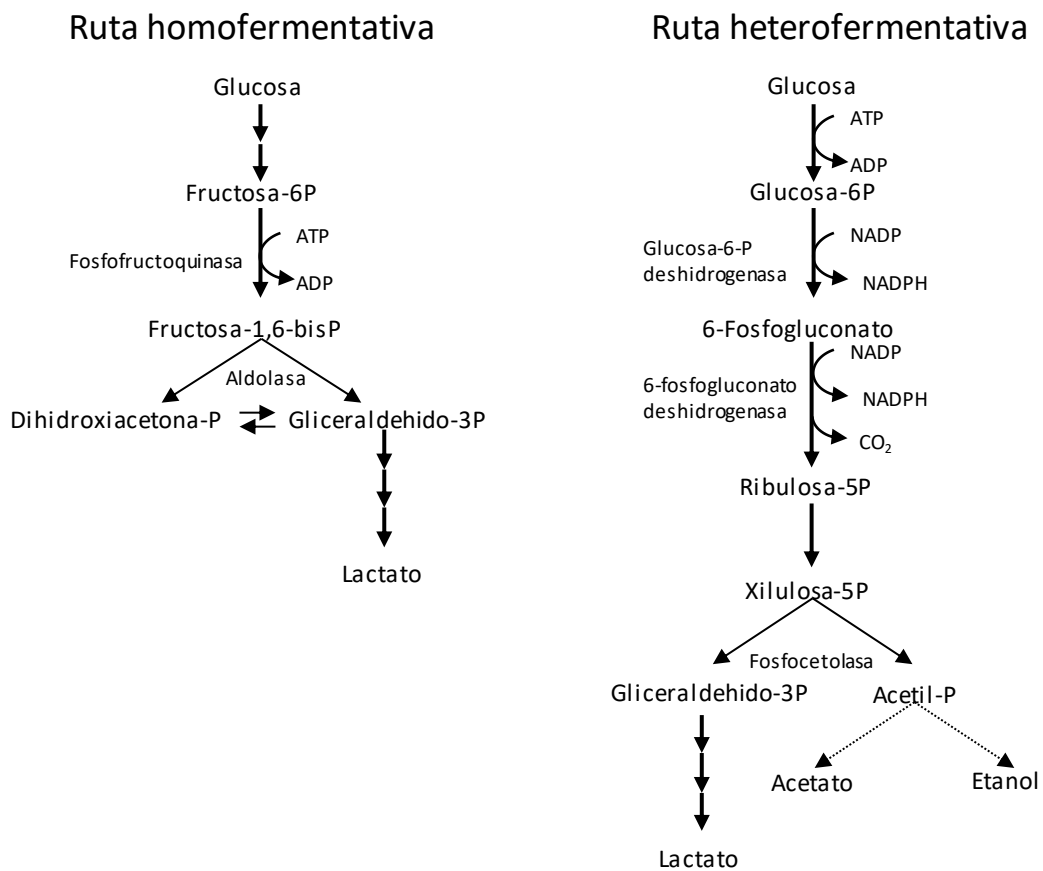


Figura 1. Esquema de las principales rutas de degradación de azúcares presentes en BAL. Los pasos entre el gliceraldehído-3P y el lactato se han omitido.

Aunque la ruta glicolítica principal conduce a la producción de lactato a través de la lactato deshidrogenasa, muchas BAL disponen además de rutas alternativas de degradación del piruvato (Fig 2) que se activan en condiciones ambientales específicas, como pueden ser, limitación de nutrientes disponibles, pH ácido extremo o alta disponibilidad de oxígeno (Kandler, 1983). Por ello, algunas LAB homofermentativas pueden alterar su perfil de productos de degradación de azúcares en función de las condiciones ambientales.

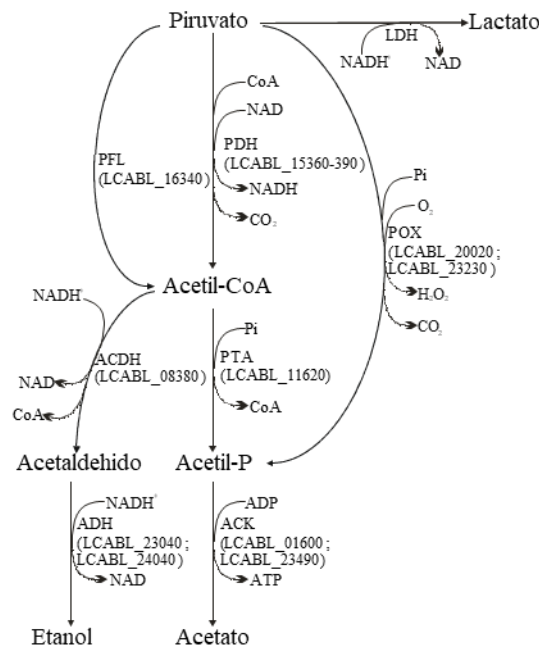


Figura 2. Rutas alternativas seleccionadas de degradación del piruvato presentes en BAL. ACDH: acetaldéhido deshidrogenasa, ACK: acetato quinasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, LDH: lactato deshidrogenasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PFL: piruvato-formiato liasa, POX, piruvato oxidasa, PTA: fosfotransacetilasa, ADP: adenosín difosfato, ATP: adenosín trifosfato, CO₂: dióxido de carbono, CoA: coenzima A, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, NAD y NADH: forma oxidada y reducida del nicotinamida-adenin-dinucleótido, respectivamente, Pi: fosfato inorgánico.

1.2 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa que es muy utilizada en la industria como cultivo iniciador en productos lácteos y maduración de algunos tipos de queso. Algunas cepas de *Lb. casei* son consideradas probióticas (Hill et al. 2018) siendo utilizadas en productos comerciales tales como Actimel® o Yakult®. *Lb. casei* ha mostrado su capacidad para inhibir microorganismos patógenos del intestino, como cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, *Listeria monocitogenes*, *Shigella sunnei* y *Salmonella typhimurium*, tanto en estudios *in vitro* como con animales de experimentación (Jakobsen et al., 1999). Algunos productos que contienen cepas de *Lb. casei* han demostrado que son eficaces frente a infecciones intestinales producidas por rotavirus, y en ratones se demostró que tenían actividad contra algunos tipos de tumores. Sin embargo, no se conoce con certeza qué posibles efectos pueden tener estas cepas sobre el sistema inmunitario. Algunas experiencias apuntan que *L. casei* incrementa la cantidad de IgA circulante mejorando así la respuesta frente a infecciones del tracto digestivo (Matsuzaki et al., 1998).

La efectividad de los probióticos depende de que sean capaces de llegar al intestino en una cantidad suficiente y viables. Por ello deben ser capaces de sobrevivir al estrés al cual son sometidas en el cuerpo desde la deglución hasta su llegada al intestino. Entre los factores de estrés se encuentran los enzimas hidrolíticos segregados al tracto intestinal, acidez en el

estómago, sales biliares en el intestino delgado, péptidos antimicrobianos secretados por el hospedador y la microbiota residente, etc. Para sobrevivir a estos desafíos, las bacterias deben poseer sistemas eficaces de detección de cambios en el ambiente que les permitan adaptar su fisiología o activar mecanismos de resistencia.

1.3 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL: SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

Las BAL disponen de un gran número de mecanismos de detección de las condiciones ambientales (Papadimitriou 2016); entre estos mecanismos se encuentran los sistemas de dos componentes (TCS), que son circuitos de señalización que permiten a los microorganismos detectar estímulos ambientales y responder a estos de una manera adaptativa (Jacob-Dubuisson et al. 2018, Stock et al. 2000). Los TCS típicamente constan de una proteína sensor histidina quinasa (HK), generalmente anclada a la membrana celular y un regulador de respuesta citoplasmático (RR), que actúa como regulador transcripcional (Figura 3). Ambas proteínas tienen una estructura modular. La HK tiene un dominio sensor N-terminal que es el que capta las señales del medio y dos módulos involucrados en la reacción de fosforilación. El primer dominio del HK contiene el aminoácido histidina fosforilable (DHp), mientras que el segundo (CA), es el que contiene el sitio de unión del ATP y cataliza la fosforilación del dominio de DHp. El RR tiene un dominio receptor conservación (REC), donde se encuentra el residuo de aspártico fosforilable y un dominio efecto C-terminal, que normalmente es un dominio de unión al ADN (Monedero et al., 2017). Los dominios sensoriales y de salida de HK y RR son los que diferencian los distintos TCS y les confiere especificidad (Monedero et al., 2017).

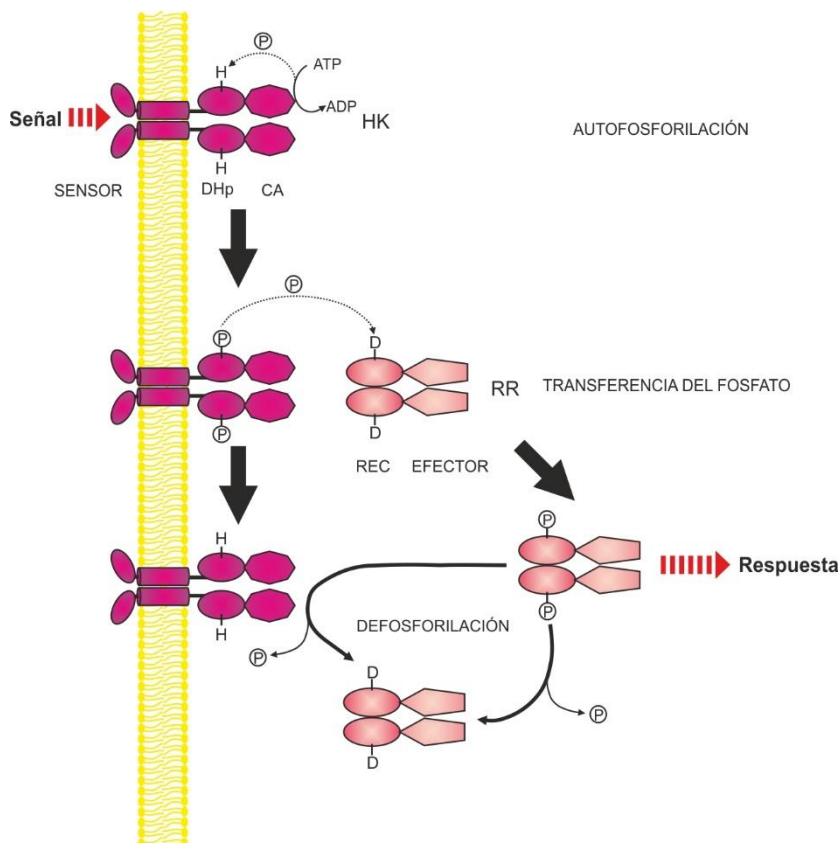


Figura 3. Organización de dominios de un sistema típico de dos componentes y flujo de transducción de señales. Las histidinas quinazas (HK) consisten típicamente en un dominio sensorial, un dominio de dimerización e histidina-fosfotransferencia (DHp) que contiene el residuo de His fosforilable y un dominio ATPasa (CA). Los reguladores de respuesta (RR) están formados por un dominio receptor (REC) que contiene un residuo de aspartato fosforilable conservado y un dominio efector que generalmente es un dominio de unión al ADN. La transducción de señal consta básicamente de tres reacciones: autofosforilación de HK tras la detección de una señal específica por medio de la cual el dominio HATPasa fosforila el residuo de His conservado en el dominio DHp a expensas de ATP, la fosfotransferencia del residuo de fosfato al residuo Asp del dominio REC del cognado RR. La fosforilación del RR induce cambios conformacionales que modulan su actividad. La transducción de señales suele terminar con la desfosforilación espontánea del RR o la actividad fosfatasa de la HK asociada.

Cuando la HK recibe un estímulo específico se autofosforila en su residuo conservado de His en el dominio DhP, y se transfiere a continuación el grupo fosfato al residuo de Asp conservado en el dominio REC de su RR. El estado de fosforilación de este último regula su actividad reguladora, aumentando o reduciendo su afinidad por sus secuencias dianas (Stock, 2000). Las HKs suelen actuar también como fosfatasa sobre sus RR asociados. En otros casos la defosforilación de los RR es llevada a cabo por fosfatasa auxiliares o hidrólisis espontánea (Monedero et al. 2017). Aunque una célula puede contener varios TCS, la transferencia de fosfato entre HKs y RRs suele ser muy específica. Esta característica permite a la célula disponer de múltiples sensores con vías de transducción de señal que activan respuestas específicas adaptadas para responder a cada estímulo. Además de la ruta de fosforilación descrita, existen evidencias de que algunos RR pueden ser fosforilados por metabolitos intracelulares como el acetil-fosfato (AcP) (Lukat et al. 1992). Se ha especulado que esta característica permite adecuar la respuesta al estado metabólico de la célula.

Lb. casei BL23 codifica 17 TCS (Alcántara et al. 2011). Uno de estos sistemas, constituido por la HK PrcK y el RR PrcR controla la expresión de un gran número de genes, especialmente genes que se encargan de la captación de fuentes de nitrógeno (Alcántara et al. 2016). La comprensión de este mecanismo en la *Lb. casei* puede ser crucial para mejorar su rendimiento en los procesos industriales y comprender de mejor manera el funcionamiento de estos sistemas en la bacteria.

Estudios recientes llevados a cabo en el laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos del IATA han mostrado que PrcR es fosforilado independientemente de la actividad de su HK asociada PrcK (resultados no publicados). Este resultado sugiere que PrcR puede ser fosforilado por alguna otra HK presente en *Lb. casei* BL23 o por algún metabolito fosfo-donador como el AcP. Estudios llevados a cabo con TCS homólogos, tales como CovRS de *Streptococcus mutans*, sugieren que el AcP puede fosforilar al RR CovR (Khara et al. 2018). Estos resultados sugieren que PrcR también podría ser fosforilado por AcP.

En *Lb. casei* BL23, AcP puede ser sintetizado por acción de piruvato oxidasas o de la fosfotransacetilasa (Pta) mientras que es degradado por la acetato quinasa (AckA), que transfiere el fosfato desde AcP al ADP generando ATP y acetato como se muestra en la figura 3. Las piruvato oxidasas requieren oxígeno por lo que en las condiciones habituales de crecimiento de *Lb. casei*, con baja concentración de oxígeno, la principal ruta de síntesis es la de la Pta. En

este trabajo se pretende obtener cepas con niveles alterados de AcP mediante la inactivación de la AckA y la Pta y obtener evidencia de si el AcP está implicado en la fosforilación de PrcR.

2. OBJETIVOS

Como ya se ha señalado anteriormente, se postula que el acetil fosfato podría estar fosforilando el regulador PrcR de *Lb.casei*. En este trabajo se pretende obtener evidencia que pueda apoyar o refutar esta hipótesis mediante modificación genética con el fin de alterar las rutas que transforman el acetil-P en acetato dentro de la célula, en concreto, inactivando la acetato quinasa y la fosfotransacetilasa. Después de modificar estas rutas se medirá el estado de fosforilación de PrcR y se comparará con cepas que mantengan el genoma original en extractos crudos obtenidos bajo distintas condiciones de cultivo.

3 MATERIAL Y METODOS

2.1 MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO

Las cepas empleadas en este estudio se enumeran en la Tabla 2. Salvo que se indique lo contrario, *Lb. casei* BL23 y mutantes derivados se cultivaron en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; BD Difco) a 37°C sin agitación. *Escherichia coli* DH10B se cultivó en medio Luria Bertani (LB, BD Difco) a 37°C con agitación. Para cultivos en medio sólido, se suplementó el medio correspondiente con agar bacteriológico europeo (Pronadisa) al 1.8% (p/v). Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Cuando fue necesario, los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y eritromicina (5 µg/ml) se añadieron a los medios previamente esterilizados. Las cepas se conservaron en MRS suplementado con 15% (v/v) de glicerol a -80°C.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Características relevantes o genotipo	Observaciones o fuente
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 endA1 recA1</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ ⁻	Stratagene
<i>Lb. casei</i> BL23	Cepa silvestre	Bruce Chassy, Univ. Illinois
<i>Lb. casei</i> Δ <i>prcK</i>	Mutante carente del gen <i>prcK</i>	Alcántara et al. 2016
<i>Lb. casei</i> A4-3	Mutante insercional <i>pta</i> ; 1 ^a recombinación	Este estudio
<i>Lb. casei</i> A4-8	Mutante insercional <i>pta</i> ; 1 ^a recombinación	Este estudio
<i>Lb. casei</i> P7-1	Mutante insercional <i>ackA</i> ; 1 ^a recombinación	Este estudio
<i>Lb. casei</i> P7-1-1	Δ <i>ackA</i>	Este estudio
<i>Lb. casei</i> P7-1-2	Δ <i>ackA</i>	Este estudio
pRV300	Vector de clonación en <i>E. coli</i> con resistencia seleccionable en <i>Lb. casei</i> , Amp ^r , Ery ^r	Leloup et al. 1997
pRVΔ <i>ackA</i>	pRV300 con fragmentos flanqueantes fusionados para la inactivación de <i>ackA</i>	Este estudio
pRVΔ <i>pta</i>	pRV300 con fragmentos flanqueantes fusionados para la inactivación de <i>pta</i>	Este estudio

2.2 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

La purificación de ADN total de *Lb. casei* BL23 se llevó a cabo utilizando el “DNA isolation kit for cells and tissues” (Roche Applied Science) con modificaciones. Se separaron por centrifugación (5000 x *g*, 15 min., 4°C) las células de un cultivo de 100 ml de *Lb. casei* BL23 a DO₅₉₅ 0.7 y se

resuspendieron en 15 ml de tampón de lisis [polietilén glicol 20000 10% (p/v), Tris:HCl 10 mM (pH 8.0), maleato sódico 5 mM, MgCl₂ 5 mM, lisozima 10 mg/ml, mutanolisina 10 U/ml]. La suspensión celular se incubó durante una hora a 37°C, se separaron las células por centrifugación, se lavaron con un volumen de tampón STE (sacarosa 20%, Tris:HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0), NaCl 50 mM) y finalmente se resuspendieron en 1 ml de tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4). Los siguientes pasos de purificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado se disolvió en agua purificada por ósmosis inversa (milli-Q, Millipore) y se conservó a -20°C. La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el “kit NucleoSpin® Plasmid” (Macherey-Nagel) según las instrucciones del fabricante. La purificación de fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando el “kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de DNA en solución se estimaron mediante espectrofotometría (A₂₆₀) en un equipo Nanodrop.

Los enzimas de restricción utilizados en este estudio (Fermentas) se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la amplificación de fragmentos por PCR se utilizó la polimerasa de alta fidelidad “Kapa HiFi PCR kit” (Kapa Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

E. coli se transformó mediante electroporación con un equipo Gene Pulser (BioRad). Las células competentes se prepararon siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para la electroporación, se añadieron 50 µl de células competentes y 2 µl de ADN en una cubeta de 0.2 cm de ancho de celda y se aplicó un pulso de 2,5 kV con la resistencia en paralelo fijada a 200 Ω y la capacitancia a 25 µF. Tras el pulso, se añadió inmediatamente a las células 1 ml de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron en agitación a 37°C durante 1 hora. Tras la incubación, las células se sembraron en placas de LB suplementadas con ampicilina (50 µg/ml), IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido 1 mM) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido 0.2 mg/ml). En todos los casos, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El plásmido pRV300 tiene incorporado gen *lacZ* (β-galactosidasa) con el sitio de clonación múltiple procedente del plásmido pBlueScript SK+ lo que permite la selección de colonias que contienen plásmidos que han incorporado el inserto. Cuando el inserto se incorpora en el sitio de clonación múltiple, el gen *lacZ* queda inactivado y, por tanto, el X-Gal del medio no es degradado por la colonia y no da la coloración azul característica.

Lb. casei BL23 fue transformado por electroporación siguiendo el protocolo de Posno et al. (1991). Las células se cultivaron en MRS suplementado con glicina (1%) a 37°C hasta llegar a una DO₅₉₅ de 0.5-0.6. A continuación se enfriaron en hielo durante 10-15 min y se recogieron por centrifugación (5000 x *g*, 10 min., 4°C). Las células se lavaron dos veces con un volumen de tampón de electroporación [sacarosa 0.3 M, fosfato sódico 5 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM] centrifugando en las mismas condiciones y manteniendo el frío. Finalmente, las células se resuspendieron en 1/100 del volumen original del cultivo en tampón de electroporación en frío, se repartieron en alícuotas de 50µL en tubos de Eppendorf y se almacenaron a -80°C. Para su electroporación, las células se descongelaron en hielo, se mezclaron con 2 µl del ADN

correspondiente en una cubeta de 0.2 cm, y se sometieron a un pulso de 1.25 kV, 100 Ω y 25 μ F.

Inmediatamente después las células se resuspendieron en 1mL de MRS y se incubaron a 37°C durante 1h. Finalmente se inocularon en placas de MRS con eritromicina e incubaron a 37°C.

2.4 CONTRUCCIÓN DE MUTANTES

Con el fin de inactivar los genes *ackA* (acetato quinasa) y *pta* (fosfotransacetilasa) se diseñó una estrategia de doble recombinación (Figura 4).

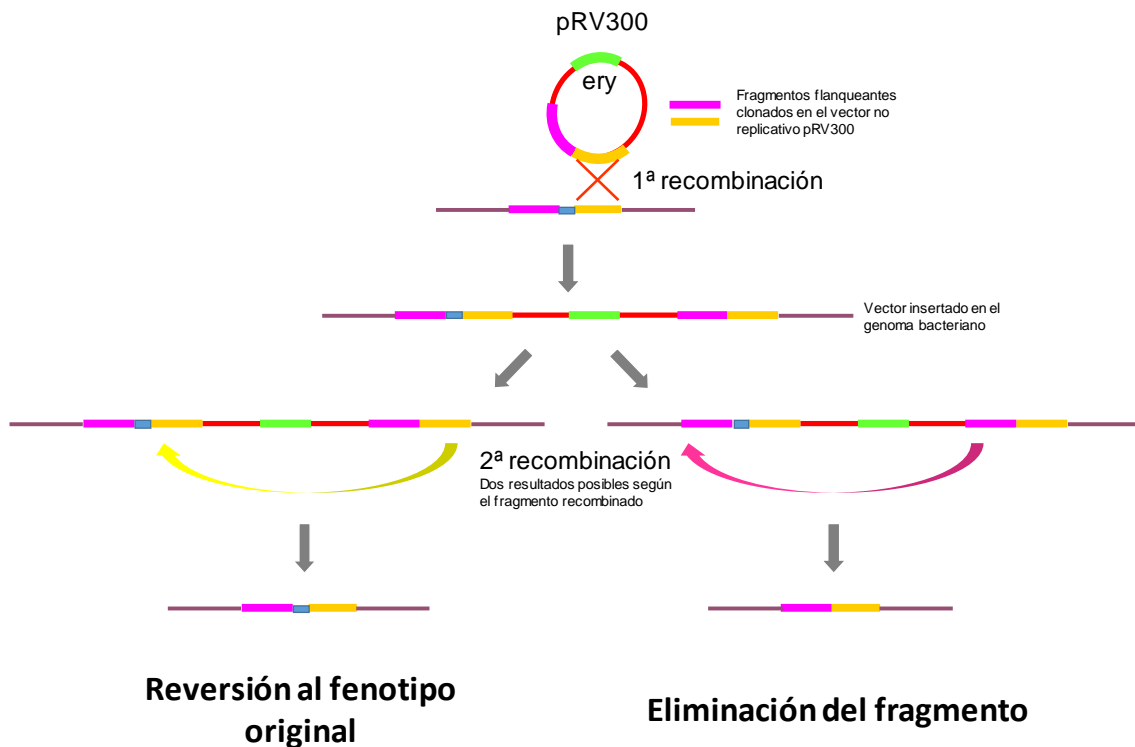


Figura 4. Representación esquemática de la estrategia seguida para obtener mutantes deficientes en *ackA* o *pta*.

Los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos se enumeran en la Tabla 2. Los fragmentos se amplificaron por PCR (1 ciclo a 95°C 3 min. seguido de 30 ciclos a 95°C 30 s, 55°C 30 s y 72°C 2 min. más 1 ciclo final a 72°C 5 min) y se purificaron como se ha indicado antes.

Tabla 3. Cebadores empleados en este estudio

Cebador	Secuencia 5'-3'	Observaciones
AckA-F1	gaattcctgcagcccGATTTTGCTAACGGGGATG ¹	Amplificación del fragmento en 5' de la región eliminada (fragmento Ack1)
AckA-R1	tgaacctcagctCACTTCAGGGTTGAACTGC	
AckA-F2	aacctgaagtGAGCTGAGGTTTCAGCTGGC	Amplificación del fragmento en 3' de
AckA-R2	actagtggatccccCTTCACAACGCGGTTAACG	

0.033 pmoles del fragmento Ack2

Para la construcción del plásmido pRV Δ pta se mezclaron:

0,04 pmoles pRV300 digerido con SmaI

0.031 pmoles Pta1

0.085 pmoles Pta2

Las reacciones de ensamblaje de Gibson se utilizaron directamente para transformar *E.coli* DH10B como se ha indicado anteriormente. Se seleccionaron las colonias blancas obtenidas, se comprobó que contenían los insertos mediante amplificación por PCR con los cebadores PRV-F y PRV-R (1 ciclo a 95°C 3 min. seguido de 30 ciclos a 95°C 30 s, 50°C 30 s y 72°C 2 min. más 1 ciclo final a 72°C 5 min). Se seleccionaron tres clones de cada construcción y se secuenciaron en el Servicio de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (U. Valencia) para verificar que las secuencias de los fragmentos clonados se correspondían con las construcciones diseñadas. Un clon de cada construcción fue seleccionado, se purificaron los plásmidos correspondientes según se ha indicado anteriormente y se utilizaron para transformar *L.casei* BL23 según se ha descrito anteriormente.

Se verificó la integración del vector en los transformantes obtenidos mediante PCR con los cebadores correspondientes a cada vector (PRV-F y AckA-R2 para pRV Δ ackA y PRV-F y Pta-R2 para pRV Δ pta). Para cada integración se seleccionaron dos clones. Con el fin de favorecer la segunda recombinación, los clones se cultivaron en medio MRS en pases diarios sucesivos a medio fresco. Se hicieron entre 6 a 10 pases sin eritromicina. Finalmente, se tomaron muestras de los cultivos, se diluyeron en suero fisiológico (NaCl 0.9%) para obtener una concentración de 30-300 unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por mL. Las suspensiones celulares se utilizaron para sembrar placas Petri de MRS sin eritromicina. Después del crecimiento de las colonias se hicieron réplicas en placas de MRS con eritromicina. Al observar el crecimiento de las dos placas se seleccionaron aquellas colonias que no habían podido multiplicarse en el medio con eritromicina. Para comprobar si las colonias correspondían a revertientes al genotipo silvestre o habían incorporado las mutaciones, se amplificaron por PCR los fragmentos correspondientes (Ack-F1/Ack-R2 y Pta-F1/Pta-R2, respectivamente). Los fragmentos amplificados se digirieron, en el caso del gen *ackA*, con HindIII, y en el caso de *pta*, con BspHI. La mutación introducida en el gen *ackA* elimina un sitio único HindIII, mientras que en *pta* se introduce un sitio BspHI (véase Resultados). En consecuencia, en los clones *ackA* que portaran la mutación el fragmento amplificado no sería cortado por HindIII mientras que los revertientes a fenotipo silvestre sí. En los clones *pta* que portaran la mutación serían cortados por BspHI mientras que los revertientes no. Finalmente, se secuenció la región amplificada de los clones seleccionados para verificar que no se habían introducido mutaciones adicionales.

2.4.1 CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACK Y PTA EN MEDIO MRS Y MEDIO BASAL SIN ACETATO

Con el fin de conocer los efectos que pudieran tener la inactivación de la acetato quinasa o la fosfotransacetilasa en el crecimiento de las cepas, se usaron los mutantes creados en el punto anterior y se compararon con una cepa deficiente en la histidina quinasa-Prck (Δ prck) y la cepa silvestre (BL23). Las células se inocularon a partir de glicerizados de cada cepa en MRS líquido y

se incubaron a 37°C durante 24h. A continuación, se centrifugaron 12000 x *g* durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 1 volumen de suero fisiológico volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendieron en 1mL de suero fisiológico, se midió la densidad óptica a 595 nm de las suspensiones y se ajustaron a una DO₅₉₅ de 1. Estas suspensiones se utilizaron para inocular a DO₅₉₅ 0.05alícuotas de 250µL de medio de cultivo dispensados en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se inocularon 3 réplicas por cepa. El crecimiento se siguió midiendo la DO₅₉₅ en un lector SPECTROstar® Nano (BMG Labtech) cada 30 minutos durante un total de 24 horas a 37°C.

El MRS contiene en su composición 5 g/l de acetato sódico. Con el fin de determinar si la presencia de acetato afectaba al crecimiento de los mutantes, se diseñó un medio basal carente de acetato.

Tabla 4. Composición del medio basal (por litro)

Triptona	10 g
Glucosa	10 g
KH ₂ PO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Cloruro de amonio	3 g
NaCl	2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	10 mg
MnSO ₄ H ₂ O	50 mg
Tween 80	1 ml
Cisteína	0.25 g

El medio se preparó a partir de soluciones concentradas y finalmente se esterilizó mediante filtración (0.22 µm).

2.5 DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE REGULACIÓN DEL REGULADOR PrcR

El estado de fosforilación de PrcR se estimó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con Phos-tag™ y detección por transferencia Western con un anticuerpo específico contra PrcR disponible en el laboratorio. PhosTag™ es un reactivo que se une específicamente a moléculas fosforiladas a pH neutro. Se han desarrollado diferentes derivados para distintas aplicaciones. En este trabajo se ha utilizado un derivado desarrollado para su uso en geles de poliacrilamida-SDS en combinación con iones Mn²⁺ (Acrylamide-pendant Phos-tag™, Wako Laboratory Chemicals). El ligando PhosTag™ se une a los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas presentes en la muestra, haciendo que migren más lentamente. Para este fin, se cultivaron las cepas en medio MRS o medio basal (alícuotas de 10 ml) a 37°C. Los cultivos se dejaron proliferar hasta distintas fases de su crecimiento para obtener muestras representativas de las distintas fases. Las células fueron recogidas por centrifugación (5000 × *g* 10 min. 4°C) y se conservaron congeladas a -80°C hasta el momento de uso. En ensayos anteriores llevados a cabo en el laboratorio se comprobó que la congelación de los sedimentos celulares no afectaba al estado de fosforilación de PrcR mediante comparación entre extractos procedentes de células

congeladas y de células procesadas en fresco. Para obtener los extractos, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos y se suspendieron en 1 ml de tampón Tris 50 mM (pH 8.0) NaCl 150 mM. La suspensión celular se transfirió a un tubo de plástico graduado de 2 ml con tapón de rosca conteniendo 0.5 ml de bolas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. Las células se lisaron mediante disrupción mecánica en un homogeneizador Bead Ruptor 24 (Omni Int.) en tres ciclos sucesivos de 30 s a 5000 r.p.m. con incubación entre ciclos en hielo de 1 minuto. A continuación, los tubos se centrifugaron ($12000 \times g$ 5 min. $4^{\circ}C$), se recuperó el sobrenadante evitando arrastrar bolas de vidrio y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Las concentraciones de proteínas de las muestras se determinaron mediante el método de Bradford con el Bio-Rad Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. La curva patrón se realizó a partir de una solución concentrada de seroalbúmina bovina (1 mg/ml), realizando las diluciones convenientes en el mismo tampón en que se prepararon los extractos. Los extractos se conservaron a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de su uso.

Se emplearon geles de poli(acrilamida) (8%). El gel separador estaba compuesto de acrilamida a una proporción acrilamida:bis-acrilamida 29:1, Tris 0.375 M (pH 8,8), SDS 0.1%, solución Phos-Tag 0.1 mM, $MnCl_2$ 0.2 mM (concentraciones finales). Para la polimerización se añadieron N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED; 0.3%) y persulfato amónico (0.6 mg/ml). El pre-gel se componía de acrilamida (5%) 29:1, Tris 0.25 M (pH 6,8), SDS 0.1% (concentración final). Para la polimerización se añadieron TEMED (0.18%) y persulfato amónico (1 mg/ml). Los geles se montaron en un sistema Mini-Protean (BioRad) utilizando tampón Tris glicina SDS (pH 8.3; Tris 24.8 mM glicina 192 mM SDS 0.01%) como tampón de electroforesis. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100 V. Para los ensayos se cargaron los volúmenes requeridos para obtener 1 μg de proteína total. Las muestras se mezclaron con tampón de carga [Tris 10 mM (pH 6,8), SDS 0.2% (p/p), glicerol 7.8%, azul de bromofenol (0.01% (p/p), ditiotreitól 1.55% (p/v), concentraciones finales] previamente a su deposición en los pocillos.

A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran Premium, GE Healthcare Life Sciences) mediante electrotransferencia Western en una unidad de transferencia semi-seca (Scie Plas Ltd.). El tampón de transferencia utilizado contenía etanol 20% (v/v), Tris 0.5% y glicina 1.44%. La transferencia se realizó a corriente constante de 50 mA durante una hora a temperatura ambiente. La detección de PrcR se realizó utilizando un suero policlonal de conejo disponible en el laboratorio. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo monoclonal anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia y se documentaron los resultados con un equipo de captación de imágenes LAS1000 (Fujifilm). Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del manual del Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare).

El análisis de los geles y cuantificación de las bandas se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía del IATA. Se utilizó el paquete FIJI para identificar las bandas y se cuantificaron con el paquete NIS-E. Se calculó la intensidad total de cada una de las bandas identificadas. Para cada muestra se calculó la relación banda fosforilada frente a no fosforilada y se estimaron estadísticamente las diferencias mediante ANOVA con el paquete GraphPad.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DIANA Y ESTRATEGIA DE INACTIVACIÓN

Como se ha indicado anteriormente, el análisis de las rutas metabólicas presentes en *Lb. casei* BL23 reveló que el nivel intracelular de AcP depende de las actividades de piruvato oxidasas y fosfotransacetilasa (generadoras de AcP) y acetato quinasa (degradadora). Puesto que en las condiciones habituales de cultivo de este organismo las actividades de las piruvato oxidasas son bajas, se planteó como estrategia para alterar el nivel intracelular de AcP inactivar los genes codificantes de fosfotransacetilasa (*pta*) y acetato quinasa (*ackA*).

La inspección del genoma de *Lb. casei* BL23 mostró que este organismo sólo contiene un gen codificante de una fosfotransacetilasa (Nº Acc. CAQ66247) y dos genes codificantes de acetato quinasa (CAQ67416 y CAQ65292). Por datos transcriptómicos disponibles en el laboratorio se sabe que la expresión de CAQ67416 en la cepa BL23 es mínima. Por tanto, se escogió el gen CAQ65292 para su inactivación.

Con el fin de obtener mutaciones con mínimos efectos sobre los genes vecinos, se decidió utilizar una estrategia de doble recombinación para introducir pequeñas interrupciones en la secuencia codificante de los genes diana. En la Fig 6. se muestra las secuencias de la cepa silvestre y las mutaciones introducidas.

```

BL23  ATGGCAAAAATTCGCGAGTCAACGCAGGCAGTTCAACCCTGAAGTGGAAGCTTTTGAATGCCAGCTGAGGTTGAGTGGCAGAAGGT
      M A K I L A V N A G S S T L K W K L F D M P A E V Q L A E G

ΔAckA ATGGCAAAAATTCGCGAGTCAACGCAGGCAGTTCAACCCTGAAGTGAGCTGAGTTGAGTGGCAGAAGGT
      M A K I L A V N A G S S T L K - A E V Q L A E G

BL23  TTGGACCTATTGAAAGTTTAAAAGACAAGATTGATGGCAAAAATTTACGGATTGTATTTCCGGAGGGCGAAGATCCGCGCGTTTTGGGCGCAGCAGTT
      M D L F E S L K D K I D G K N L R I V F P E G E D P R V L G A A V
      CGGCTCGCAGCTGACGGGTTGATACAGGCCATCGTCTAGTAATCCTGATAAGATTCAGACATTGGCAGCTGCTAAAAGCTGGGATCTCAGCAAGTTG
      R L A A D G L I Q A I V L G N P D K I Q T L A A A K S W D L S K L
      ACAGTTCCGATCCAGCCAACGATGACATTACGCTAAAATGGTTGCGGCCTTC
      T V R D P A N D D I H A K M V A A F

ΔPta  TTGGACCTATTGAAAGTTTAAAAGACAAGATTGATGGCAAAAATTTACGGATTGTATTTCCGGAGGGCGAAGATCCGCGCGTTTTGGGCGCAGCAGTT
      M D L F E S L K D K I D G K N L R I V F P E G E D P R V L G A A V
      CGGCTCGCAGCTGACGGGTTGATACAGGCCATCGTCTAGTAATCCTGATAAGATTCATGACAGTTCCGATCCAGCCAACGATGACATTACGCTAA
      R L A A D G L I Q A I V L G N P D K I H D S S R S S Q R - H S R -
      AATGGTTGCGGCCTTC
      N G C G L
  
```

Figura 6. Secuencias parciales de los genes *ackA* y *pta* de *Lb. casei* BL23 y las secuencias resultantes de las mutaciones planeadas. En rojo se señala la secuencia eliminada. Los subrayados indican el sitio HindIII eliminado por la mutación de *ackA* y el sitio BspHI introducido por la mutación de *pta*. Los guiones indican codones de parada.

a. 1 CONSTRUCCION DE LOS PLÁSMIDOS PRV ΔAckA Y PRV ΔPta

La amplificación de los fragmentos y construcción de los vectores se ha indicado anteriormente. En la Figura 7 se muestran los mapas de los dos vectores construidos.

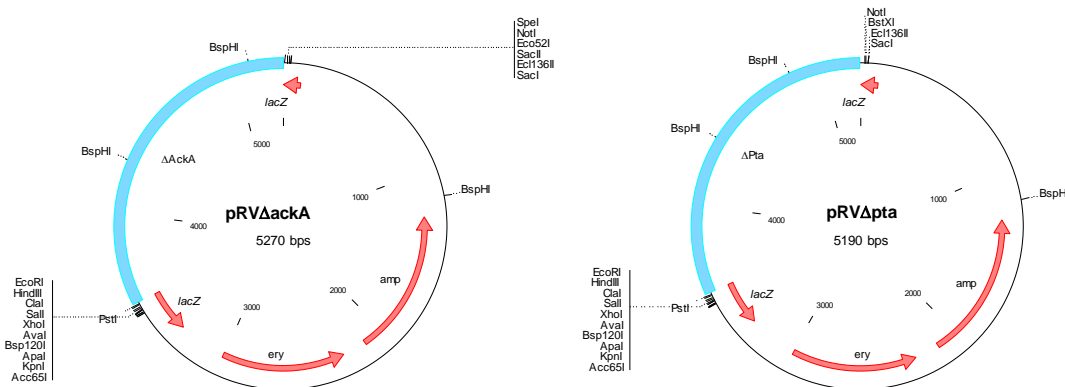


Figura 7. Mapas de los plásmidos construidos para introducir las mutaciones en *Lb. casei* BL23. Se señalan los sitios de restricción del sitio de clonación múltiple del vector y los sitios BspHI utilizados para verificar la estructura de los vectores.

Tras la transformación en *E. coli* DH10B, se verificó la presencia de los insertos en los transformantes mediante PCR con los cebadores PRV-F y PRV-R. Los tamaños esperados de los fragmentos eran de 2.8 kb aproximadamente. En la figura 5 se observa que en la transformación para obtener pRVΔpta sólo se obtuvo un clon con el tamaño de inserto esperado mientras que para pRVΔackA se obtuvieron seis. Los clones fueron nombrados provisionalmente según su orden de pocillo: A-4 para pRVΔpta, y P-1, P-3, P-5, P-7, P-9 y P-10 para pRVΔackA.

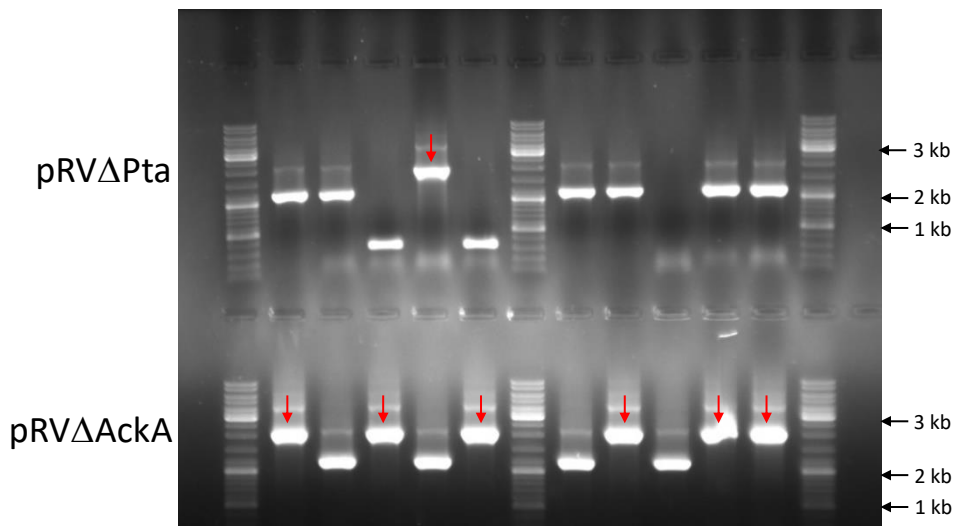


Figura 8. Amplificación de los insertos presentes en los transformantes para la construcción de los vectores pRVΔackA y pRVΔpta. Las flechas rojas marcan los transformantes deseados.

Con el fin de confirmar que los plásmidos tenían la estructura esperada, se sometieron a digestión con BspH I. BspH I es una enzima que corta los plásmidos de pRVΔackA y pRVΔpta en tres fragmentos diferentes (3138, 1333 y 799 pRVΔackA, 3192, 1517 y 481 pRVΔpta) con lo que se pudo diferenciar claramente cada uno de los plásmidos con los que se trabajó. Se analizaron los clones A-4, P-1, P-2, P-7 y se comprobó que en todos los casos se obtuvo el patrón de

digestión esperado (Figura 6). Los insertos amplificados de estos clones fueron secuenciados y se comprobó que las secuencias correspondían a las esperadas. Para los siguientes pasos del trabajo se seleccionaron los clones A-4 y P-7.

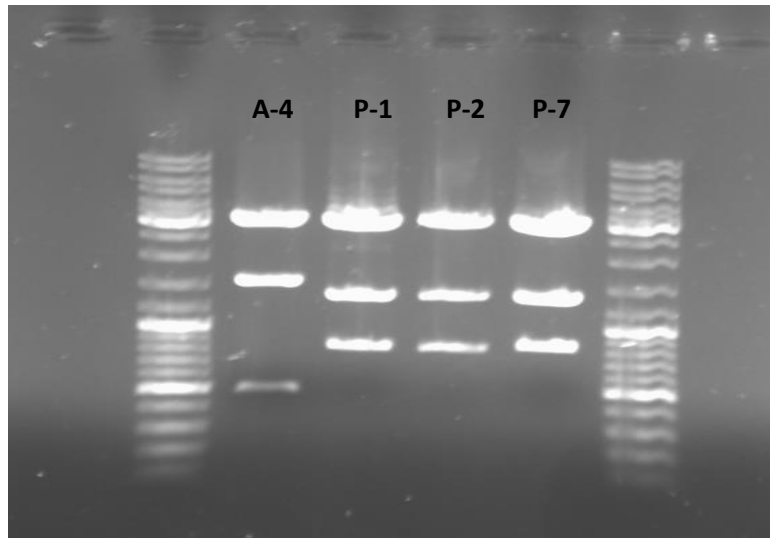


Figura 9. Digestión con BspHI de los clones A-4, P-1, P-2 y P-7.

3.2 TRANSFORMACIÓN DE *LB. CASEI* BL23 Y AISLAMIENTO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS DEFICIENTES EN ACKA O PTA.

Los plásmidos obtenidos fueron transformados en *Lb. casei* BL23. Se comprobó por PCR que las colonias resistentes aisladas contenían el plásmido y se seleccionaron dos clones de cada transformación para recuperar clones portadores de las mutaciones según se ha explicado anteriormente. Las colonias aisladas después de que se hicieran los pases en medio MRS sin eritromicina y que resultaron sensibles a este antibiótico se analizaron de la siguiente forma: se amplificó la región correspondiente a los genes *ackA* o *pta* con los cebadores AckA-F1/AckA-R2 y Pta-F1/Pta-R2, respectivamente (véase Fig. 7), y se realizó una digestión de las bandas amplificadas, con HindIII para *ackA* y BspHI para *pta*, para poder determinar qué colonias habían adquirido incorporado la mutación, y cuales habían revertido a su genotipo silvestre. Como se ha señalado anteriormente, la mutación del gen *ackA* eliminaba un sitio único HindIII en la zona amplificada mientras que la mutación de *pta* introducía un sitio BspHI.

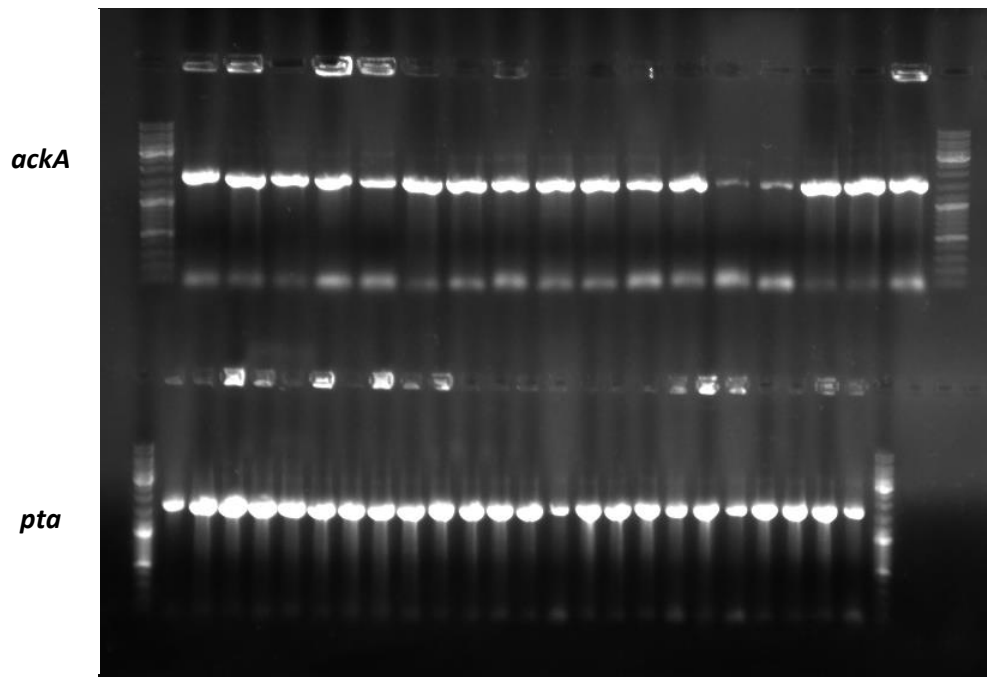


Figura 10. Amplificación por PCR de transformantes sensibles a eritromicina de la región correspondiente a los genes *ackA* y *pta*.

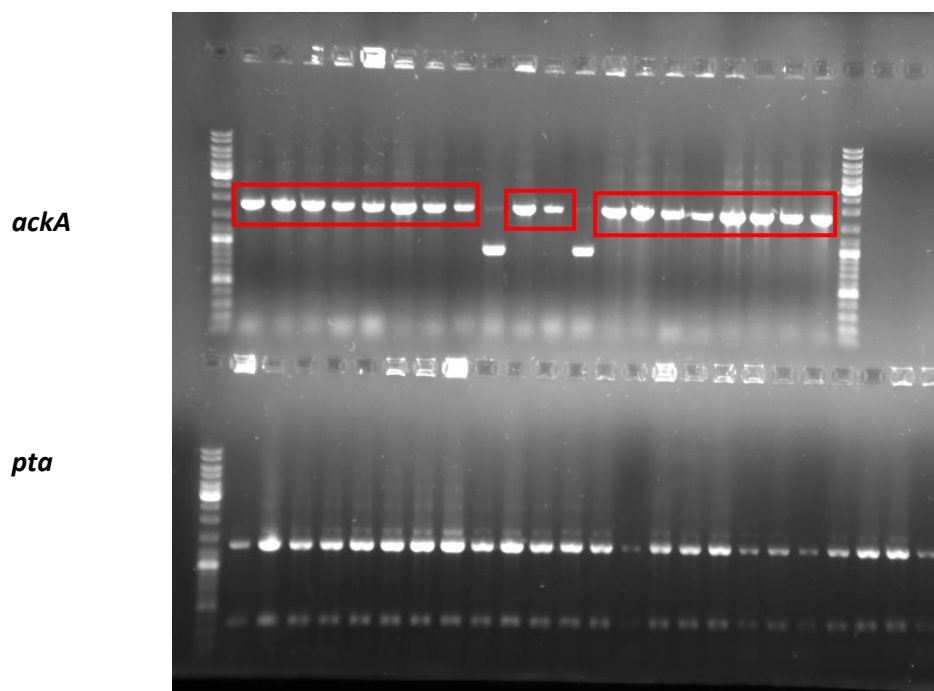


Figura 11. Digestión con Hind III en *ackA* y BspHI en *pta*. Los cuadros rojos marcan aquellas señales que indican que los clones han incorporado la mutación.

Como se muestra en la figura 8 en el caso de los mutantes de la *ackA* solo dos clones fueron digeridos por HindIII con lo que hay un gran número de transformantes que han incorporado la mutación. Dos de estos clones fueron seleccionados y se verificó por secuenciación que poseían

la secuencia esperada. Sin embargo, en el caso de *pta* todos los clones analizados habían revertido al genotipo silvestre.

En otros organismos se ha descrito que los mutantes *pta* son sensibles a pH ácido (Kim et al. 2015). Durante el crecimiento en MRS el pH del medio baja a 3.7 donde se sitúa el límite de crecimiento de esta cepa (Revilla-Guarinos et al. 2014). Debido a ello, se decidió volver a inocular los mutantes de *pta* en un medio MRS tamponado con el fin de crear un medio que mejorara las posibilidades de los mutantes *pta* frente a las cepas silvestres. Se empleó para este ensayo medio MRS suplementado con 0.2 M de fosfato sódico y ajustado a pH 6.5. Además, se realizaron dos pases diarios en lugar de uno para transferir las células a medio fresco antes de que el pH del mismo bajara hasta el límite de crecimiento. Tras los pases, se volvió a analizar los clones sensibles a eritromicina obtenidos como se ha indicado anteriormente.

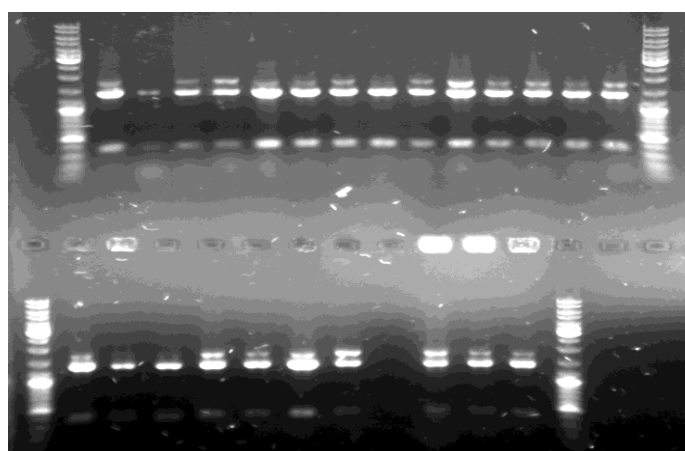


Figura 12. PCR de los clones *pta* sensibles a eritromicina recuperados con medio MRS tamponado.

Pese al cambio de medio que se hizo, no se recuperaron clones portadores de la mutación. Se hizo un ensayo adicional de seguimiento del crecimiento en medio MRS con el clon A-4 (portador de pRVΔ*Pta* insertado en el genoma) que se describe en el apartado siguiente.

3.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACETATO QUINASA Y FOSFOTRANSACETILASA EN MEDIO MRS

Con el fin de caracterizar los mutantes de *Lb. casei* obtenidos, así como explorar si la mutación de *pta* tenía efectos adversos en el crecimiento, se compararon la cepa silvestre, las cepas deficientes en acetato quinasa y dos clones portadores del plásmido pRVΔ*Pta*. El crecimiento de las cepas revela que las diferencias de crecimiento entre los mutantes y la cepa silvestre no son significativas. En el caso de las cepas A4-1 y A4-8, esta observación no es concluyente, ya que la inserción de pRVΔ*Pta* deja una copia intacta del gen *pta* en el genoma (véase Fig. 4) que podría seguir transcribiéndose.

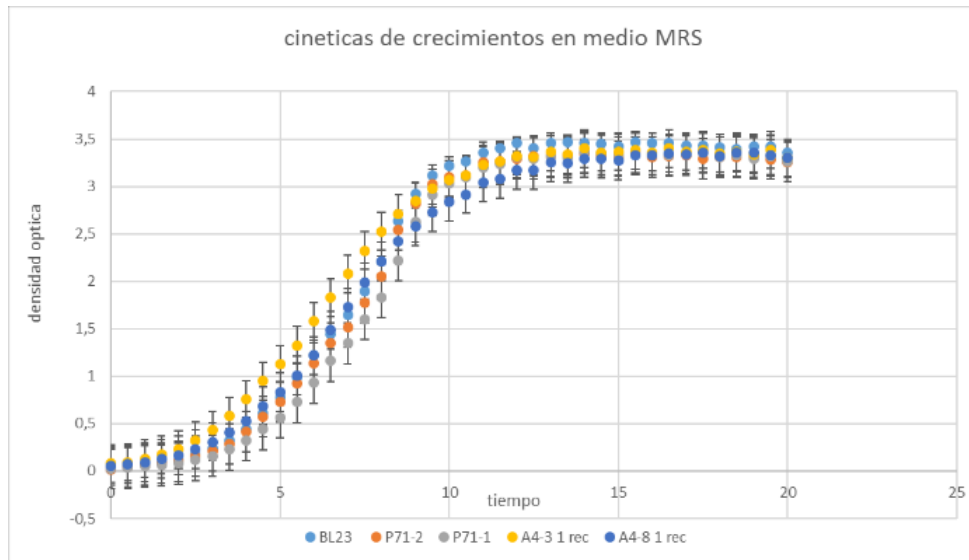


Figura 13. Curvas de crecimiento de la cepa BL23 y los mutantes A4-3 1, A4-8 1, P71-2 y P71-1 en medio MRS.

3.4 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES DEFICIENTES DE ACETATO QUINASA Y FOSFOTRANSACETILASA EN MEDIO BASAL SIN ACETATO

El medio MRS contiene una concentración apreciable de acetato sódico en su formulación (5 g/l) y se desconoce cómo puede afectar a la actividad de AckA. Por ello, como se ha descrito en la parte de materiales y métodos se observó el crecimiento de las cepas BL23, la cepa deficiente en la histidina quinasa PrcK Δ prcK D, y las cepas deficientes en AckA P7-2 1 y P7-2 2 en un medio basal carente de acetato. Se observó que el crecimiento de las cuatro cepas en la fase exponencial era idéntico pero los mutantes deficientes en AckA alcanzaron una DO final superior (Fig. 14). El análisis de la varianza de los datos de DO final mostró que las diferencias eran significativas ($p = 0.0061$). El análisis de los datos con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni mostró que estas diferencias se debían al diferente comportamiento de las cepas BL23 y Δ PrcK por un lado y P7-2-1 y P7-2-2 por otro (Tabla 4).

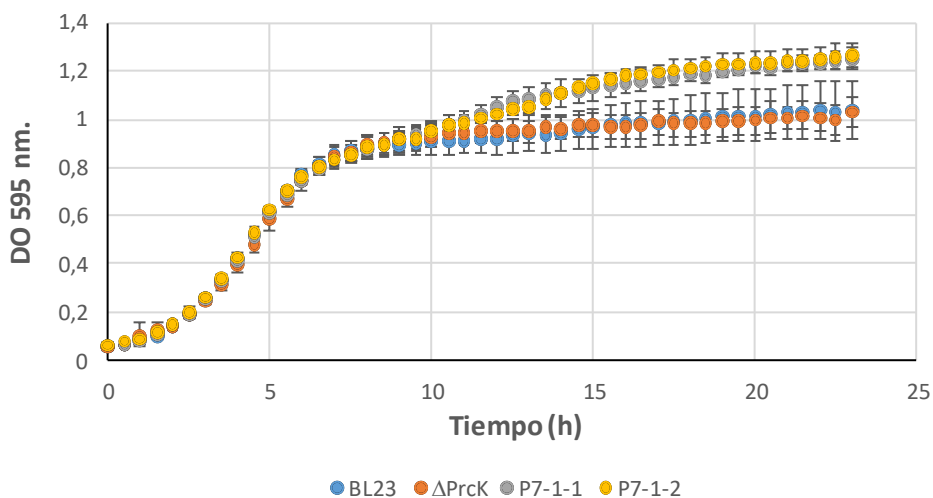


Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas BL23, Δ PrcK, P7-1-1 y P7-1-2.

Comparación	Dif. Medias	Estadístico t	Valor P
BL23 vs Δ prcK	0,01233	0,2018	P > 0.05
BL23 vs P7-1-1	-0,2133	3,491	P < 0.05
BL23 vs P7-1-2	-0,223	3,649	P < 0.05
Δ prcK vs P7-1-1	-0,2257	3,693	P < 0.05
Δ prcK vs P7-1-2	-0,2353	3,851	P < 0.05
P7-1-1 vs P7-1-2	-0,009667	0,1582	P > 0.05

Tabla 5. Test de comparaciones múltiples de Bonferroni de los valores de DO final de las cepas cultivadas en medio basal sin acetato.

3.5 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACION DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRCR

La fosforilación es una modificación covalente fundamental que regula la función, localización y especificidad de unión de proteínas diana. Existen diversos métodos para detectar proteínas fosforiladas. En este trabajo se ha utilizado SDS-PAGE con PhosTag™ en combinación con transferencia Western y un suero policlonal anti-PrcR para determinar el estado de fosforilación de esta proteína en distintas condiciones. El objetivo era determinar el grado de fosforilación de la proteína PrcR en las cepas BL23, PrcK, P7-1-1 y P7-1-2 utilizándose extractos de cada una en diferentes fases de su crecimiento biológico, obteniéndose DO a 595nm. 0.2, 0.5, 1.0 y cepas con 24 horas de crecimiento, todas las cepas fueron cultivadas en medio basal sin acetato.

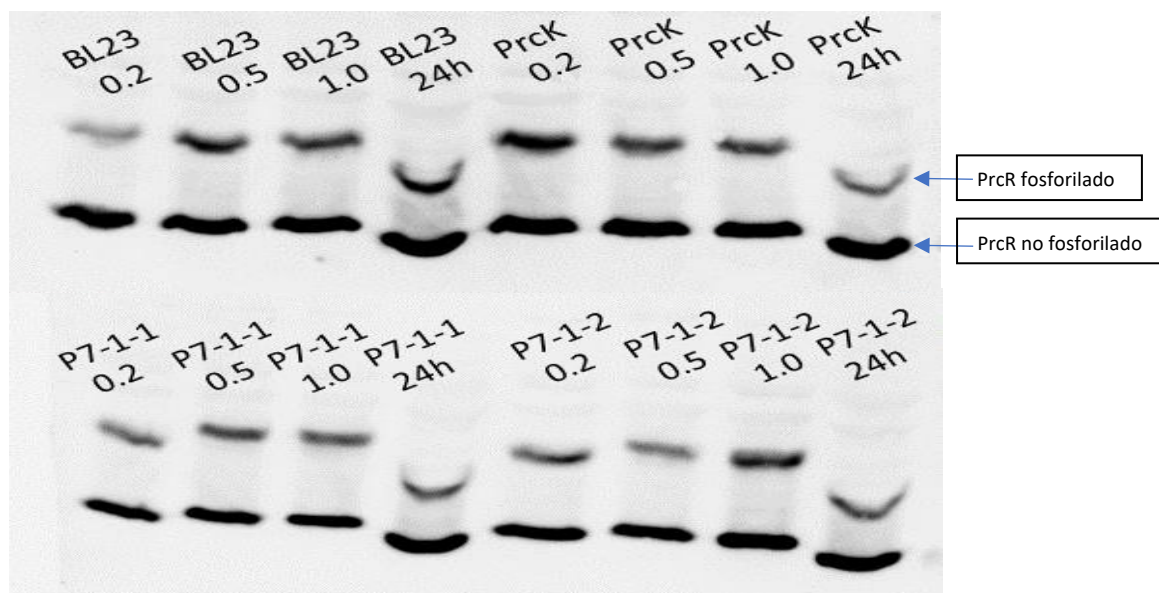


Figura 14. Análisis Western del efecto del estado de crecimiento de la cepa sobre la fosforilación en BL23, PrcK, P7-1-1 y P7-1-2 en medio basal sin acetato.

En la figura 14 se muestra, como ya se había visto en otros trabajos, que PrcR es fosforilada en ausencia de PrcK, dado que aparece la banda de PrcR fosforilado en la cepa carente de PrcK. Se comprobó que al inicio, la fosforilación en el mutante deficiente en PrcK es mayor pero esta va disminuyendo según la DO óptica aumenta. Al contrario la cepa silvestre BL23 aumenta el nivel de fosforilación según aumenta la DO (ver figura 14). La fosforilación inicial en la cepa deficiente de PrcK, sugiere que la PrcK actúa como fosfatasa, mientras que tras 24h la PrcK podría actuar como quinasa. A 0.2 los mutantes AckA no son significativamente diferentes ni a BL23 ni a PrcK sugiere que están en una situación intermedia entre los dos. Las tendencias observadas en la gráfica sugieren un patrón de fosforilación en los mutantes AckA más próximo a PrcK que a BL23. Por tanto, haría falta repetir el experimento con más réplicas para obtener resultados concluyentes.

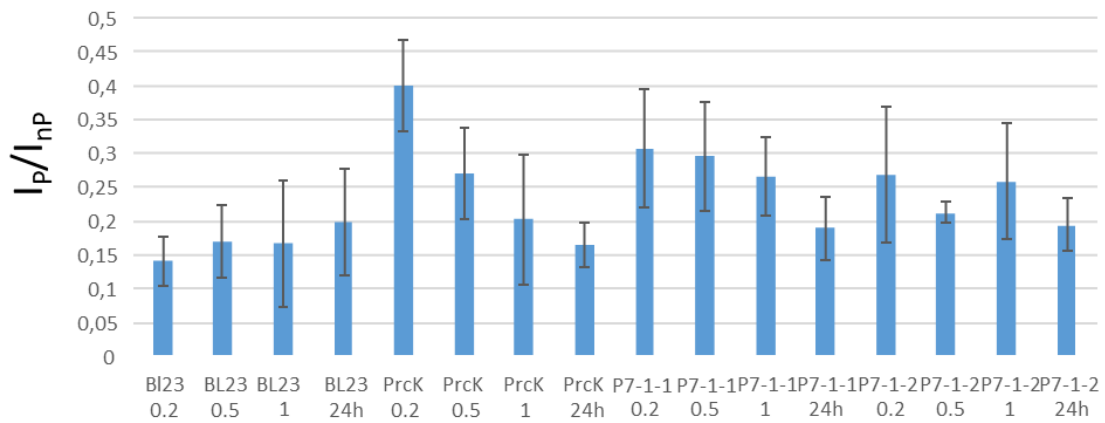


Figura 15. Relación entre la intensidad total de PrcR fosforilado (I_p) frente a PrcR no fosforilado (I_{np}) en extractos de células cultivadas en medio basal sin acetato hasta diferentes DO o durante 24 h. Se representan las medias aritméticas de la cuantificación de bandas en tres geles y la desviación estándar (barras de error).

Comparación	Dif. Medias	Estadístico t	Valor P
BL23 0.2 vs Δ Prck 0.2	-0,2587	4,16	P < 0.05
BL23 0.2 vs P7-1-1 0.2	-0,1672	2,689	P > 0.05
BL23 0.2 vs P7-1-2 0.2	-0,1277	2,053	P > 0.05
Δ Prck 0.2 vs P7-1-1 0.2	0,09151	1,471	P > 0.05
Δ Prck 0.2 vs P7-1-2 0.2	0,131	2,107	P > 0.05
P7-1-1 0.2 vs P7-1-2 0.2	0,03953	0,6355	P > 0.05
BL23 0.5 vs Δ Prck 0.5	-0,09931	2,05	P > 0.05
BL23 0.5 vs P7-1-1 0.5	-0,1254	2,59	P > 0.05
BL23 0.5 vs P7-1-2 0.5	-0,04147	0,8562	P > 0.05
Δ Prck 0.5 vs P7-1-1 0.5	-0,02612	0,5392	P > 0.05
Δ Prck 0.5 vs P7-1-2 0.5	0,05784	1,194	P > 0.05
P7-1-1 0.5 vs P7-1-2 0.5	0,08396	1,733	P > 0.05
BL23 1 vs Δ Prck 1	-0,03658	0,5307	P > 0.05
BL23 1 vs P7-1-1 1	-0,09823	1,425	P > 0.05
BL23 1 vs P7-1-2 1	-0,0924	1,341	P > 0.05
Δ Prck 1 vs P7-1-1 1	-0,06165	0,8946	P > 0.05
Δ Prck 1 vs P7-1-2 1	-0,05582	0,81	P > 0.05
P7-1-1 1 vs P7-1-2 1	0,005832	0,08462	P > 0.05
BL23 24 vs Δ Prck 24	0,002251	0,04781	P > 0.05
BL23 24 vs P7-1-1 24	-0,02374	0,5042	P > 0.05
BL23 24 vs P7-1-2 24	-0,02785	0,5914	P > 0.05
Δ Prck 24 vs P7-1-1 24	-0,026	0,552	P > 0.05
Δ Prck 24 vs P7-1-2 24	-0,0301	0,6392	P > 0.05
P7-1-1 24 vs P7-1-2 24	-0,004107	0,08721	P > 0.05

Tabla 6. Test de comparaciones múltiples de Bonferroni de las relaciones de la intensidad total de Prck fosforilado (I_P) frente a Prck no fosforilado (I_{NP}) de la proteína Prck en las cepas cultivadas en medio basal sin acetato.

5 CONCLUSIONES

Los mutantes de acetato quinasa se obtuvieron con el método desarrollado a lo largo del trabajo demostrando que es un método válido para la obtención de estos mutantes, mientras que los mutantes de fosfotransacetilasa revirtieron al genoma silvestre. Debido a ello fueron descartados para este estudio y se deberá utilizar una metodología diferente en futuros estudios.

El análisis del crecimiento de los mutantes deficientes en AckA en medio basal sin acetato mostró diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre y el mutante Δ PrcK. Sin embargo, se necesitan datos adicionales para interpretar este resultado.

El análisis en geles con PhosTag™ de mostró sólo diferencias significativas con la cepa BL23 y la cepa Δ PrcK a DO_{595} 0.2 aunque las tendencias observadas sugieren un patrón de fosforilación distintos en ambas cepas a lo largo del crecimiento. En los mutantes AckA se observó un comportamiento intermedio entre el de BL23 y el de AckA, sugiriendo que la ausencia de acetato quinasa sí que podría estar afectando al estado de fosforilación de PrcR. No obstante, es necesario refinar la metodología utilizada para reducir la variabilidad entre muestras y obtener resultados consistentes.

6 BIBLIOGRAFIA

- Agurto T., Ramos. J.C. (2008) bacterias ácido lácticas: biorpreservante de los alimentos. *Biotempo*, **8**: 54-64
- Alcántara C, Bäuerl C, Revilla-Guarinos A, Pérez-Martínez G, Monedero V, Zúñiga M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Mol. Microbiol.* **100**: 25-41.
- Alcántara C, Revilla-Guarinos A, Zúñiga M. (2011). Influence of two-component signal transduction systems of *Lactobacillus casei* BL23 on tolerance to stress conditions. *Appl Environ Microbiol.* **77**: 1516-1519.
- Domingo Marquina y Antonio Santos. Probióticos, prebióticos y salud. Facultad de Biología Universidad Complutense. 28040-Madrid.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**: 343-345.
- Kim, J.N., Ahn, S.J. y Burne, R.A. (2015). Genetics and physiology of acetate metabolism by the Pta-Ack pathway of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* **81**: 5015-5025.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C. Ross, R.P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Front. Microbiol.* **9**: 2107.
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M., Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 585-593.
- Jakobsen, C.N., V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford. P.L. Moller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandström. M. Tvede and M. Jajobsen. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro technique and evaluation of the colonization ability of five selected strains in Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4949-4956.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 209-224.
- Khara P, Mohapatra SS, Biswas I. (2018). Role of CovR phosphorylation in gene transcription in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **164**: 704-715.
- Leloup, L., Ehrlich, S.D., Zagorec, M., Morel-Deville, F. (1997). Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacI* genes. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2117– 2123.
- Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB. (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 718-722.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J,

- Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15611–15616.
- Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:133-140.
- Monedero, V., Revilla-Guarinos, A., & Zúñiga, M. (2017). Physiological Role of Two-Component Signal Transduction Systems in Food-Associated Lactic Acid Bacteria. In S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (pp. 1–51).
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*. Copenhagen, Denmark: Fred Host and Son.
- Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, de Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turróni F, van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou E, Kok J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**: 837-890.
- Pescumma, M. Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology.* **25**: 442-451.
- Posno, M., Leer, R.J., van Luijk, N., van Giezen, M.J., Heuvelmans, P.T., Lokman, B.C., et al. (1991) Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1822–1828.
- Poupard, J.A.; Husain, I.; Norris, R.F. (1973). Biology of the bifidobacteria. *Bacteriological Reviews.* **37**, 136-165.
- Revilla-Guarinos, A., Alcántara, C., Rozès, N., Voigt, B. y Zúñiga, M. (2014). Characterization of the response to low pH of *Lactobacillus casei* Δ RR12, a mutant strain with low D-alanylation activity and sensitivity to low
- Schleifer, K.H. y Ludwig; W. (1995) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Eds. Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK. Pp. 7-18.
- Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia.* **47**:125-137.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., & Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, **69**: 183-215.