

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL
(ETSIAMN)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Análisis molecular y funcional del gen *chbR* presente en el operón *chb* implicado en el metabolismo de la *N,N'*-diacetilquitobiosa en *Lactobacillus casei*

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autora: Laura Sánchez Salom

Tutora: María Jesús Yebra Yebra

Tutora académica: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Curso Académico: 2018-2019

Valencia, julio del 2019

Reserva de todos los derechos de autor

Análisis molecular y funcional del gen *chbR* presente en el operón *chb* implicado en el metabolismo de la *N,N'*-diacetilquitobiosa en *Lactobacillus casei*

RESUMEN

La leche humana es un fluido biológico complejo que contiene glicanos bien como oligosacáridos libres (OLH) o bien formando parte de glicoproteínas y glicolípidos. Todos ellos atraviesan el tracto gastrointestinal y llegan intactos al colon, donde son utilizados por bacterias beneficiosas para la salud del bebé. Entre estas bacterias, es de especial relevancia el género *Lactobacillus*, que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de los lactantes e incluye varias cepas con propiedades probióticas.

La *N,N'*-diacetilquitobiosa (ChbNAc) es un disacárido que forma parte del núcleo de la *N*-glicosilación de las glicoproteínas presentes en la leche humana y en la mucosa intestinal. Ha sido demostrado con anterioridad que la ChbNAc es utilizada como fuente de carbono por *Lactobacillus casei* cepa BL23 y que el operón *chb* está implicado en su metabolismo. Los genes *chbRCDE* codifican para un hipotético regulador transcripcional, un dominio IIC del sistema de transporte de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) y dos proteínas hipotéticas D y E, respectivamente, mientras que el *cluster* de genes *chbBAF* codifica para los dominios IIB y IIA del PTS, y para una hipotética *N*-acetiltransferasa.

En este trabajo se ha construido un vector para inactivar el gen *chbR* y se ha obtenido una cepa mutante de *L. casei* BL23 deficiente en este gen. Se ha observado que este mutante es capaz de utilizar tanto la ChbNAc como el trisacárido *N,N',N''*-diacetilquitotriosa como fuentes de carbono en el medio de cultivo, sugiriendo que el regulador ChbR es un represor transcripcional.

Palabras clave: regulador transcripcional, *N,N'*-diacetilquitobiosa, glicoproteínas, *N*-glicosilación, leche humana, tracto gastrointestinal, metabolismo, *Lactobacillus casei*

Alumna: Dña. Laura Sánchez Salom

Valencia, julio del 2019

Tutora: Dra. María Jesús Yebra Yebra

Tutora académica: Prof. Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez

Reserva de todos los derechos de autor

Molecular and functional analysis of the *chbR* gene present in *chb* operon involved in the metabolism of *N,N'*-diacetylchitobiose from *Lactobacillus casei*

ABSTRACT

Human milk is a complex biological fluid that contains glycans such as free human milk oligosaccharides (HMO) or forming part of glycoproteins and glycolipids. All of them transit through the gastrointestinal tract and arrive intact to the colon where they are used by beneficial bacteria in order to improve babies' health. Among these bacteria, especial relevance is according to *Lactobacillus* genus, which is commonly found at the gastrointestinal tract of infants and includes various strains with probiotic properties.

The *N,N'*-diacetylchitobiose (ChbNAc) is a disaccharide forming part of the *N*-glycosylation core of the glycoproteins present in human milk and intestinal mucosae. It has been previously shown that the ChbNAc is used as a carbon source by *Lactobacillus casei* BL23 strain and that the *chb* operon is involved in its metabolism. The *chbRCDE* genes encode a hypothetical transcriptional regulator, a IIC domain of the phosphotransferase system (PTS) and two hypothetical proteins, D and E, respectively, whereas the *chbBAF* gene cluster encodes IIB and IIA PTS domains, and a hypothetical *N*-acetyltransferase.

In this work, a vector has been constructed to inactivate the *chbR* gene and a mutant strain of *L. casei* BL23 deficient in this gene has been obtained. It has been observed that this mutant is able to use both ChbNAc and the trisaccharide *N,N',N''*-diacetylchitotriose as carbon sources in the culture medium, suggesting that the *chbR* regulator is a transcriptional repressor.

Keywords: transcriptional regulator, *N,N'*-diacetylchitobiose, glycoproteins, *N*-glycosylation, human milk, gastrointestinal tract, metabolism, *Lactobacillus casei*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, doy las gracias a María Jesús Yebra Yebra, por haberme abierto las puertas de su laboratorio en el IATA y por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de final de grado con ella. Gracias por tu optimismo y por creer que el proyecto saldría adelante aún cuando las cosas no salían a la primera. Gracias por tu tiempo y por tu amabilidad.

En segundo lugar, quiero agradecer a Pepe Coll Marqués todo su apoyo a la hora de llevar a cabo este TFG, sin él no hubiera sido posible. Gracias por tu paciencia, por confiar en mí y por ayudarme en todo momento con tus miles de explicaciones.

En tercer lugar, doy las gracias a Ana Belén Heredia Gutiérrez, por sus consejos y su apoyo a la hora de realizar este TFG.

En cuarto lugar, quiero dar las gracias a mis compañeras de laboratorio, en especial a Marta, María, Irene y Andrea, sin vosotras no hubiera sido lo mismo. Gracias por hacerme sentir a gusto y por dejarme ser yo. Gracias por hacer las mañanas más llevaderas con cada almuerzo en la terraza del IATA.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a mis compañeros de clase y amigos, por animarme cuando las cosas no salían bien, y por creer que, al final, todo saldría adelante. Gracias a mi familia también por haber estado ahí en todo momento.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. LECHE HUMANA | 1 |
| 1.2. GLICANOS DE LA LECHE | 1 |
| 1.2.1. Oligosacáridos de leche humana (OLH) | 1 |
| 1.2.2. Glicoproteínas | 2 |
| 1.3. MICROBIOTA INTESTINAL | 3 |
| 1.4. <i>Lactobacillus</i> | 4 |
| 1.5. OPERÓN DE LA N,N'-DIACETILQUITOBIOSA (<i>chb</i>) | 5 |
| 1.5.1. <i>chb</i> en <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| 1.5.2. <i>chb</i> en <i>Lactobacillus casei</i> | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 3.1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA INACTIVAR EL GEN <i>chbR</i> EN <i>L. casei</i> | 9 |
| 3.1.1. Primera estrategia | 9 |
| 3.1.1.1. Cultivo de <i>E. coli</i> Y463 y aislamiento de ADN plasmídico | 9 |
| 3.1.1.2. Digestión del plásmido con <i>BclI</i> , tratamiento con <i>Klenow</i> y ligación | 10 |
| 3.1.1.3. Transformación de <i>E. coli</i> cepa GM119 | 10 |
| 3.1.1.4. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, comprobación de la digestión con <i>BclI</i> , glicerinado y secuenciación de colonias positivas..... | 11 |
| 3.1.2. Segunda estrategia | 11 |
| 3.1.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i> Y463 y aislamiento de ADN plasmídico | 12 |
| 3.1.2.2. PCR utilizando el plásmido pRV300:: <i>chbR</i> como molde, digestión con <i>EcoRV</i> y ligación..... | 12 |
| 3.1.2.3. Transformación de <i>E. coli</i> cepa DH10B | 12 |
| 3.1.2.4. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, comprobación de la digestión con <i>BclI</i> , glicerinado y secuenciación de colonias positivas..... | 12 |
| 3.2. OBTENCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DE <i>L. casei</i> DEFICIENTE EN <i>chbR</i> | 13 |
| 3.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i> Y498 y aislamiento de ADN plasmídico | 13 |
| 3.2.2. Transformación de <i>L. casei</i> cepa BL23 | 13 |
| 3.2.3. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia y glicerinado de colonias positivas..... | 13 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4. Cultivo de <i>L. casei</i> Y499 durante unas 200 generaciones, siembra en placas MRS sin Eri ⁵ y réplica en placas MRS con Eri ⁵ | 14 |
| 3.2.5. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, glicerinado y secuenciación de colonias positivas | 14 |
| 3.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LA CEPA MUTANTE DE <i>L. casei</i> EN RELACIÓN A SU CAPACIDAD DE METABOLIZAR ChbNAc Y (GlcNAc)₃ | 14 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 16 |
| 4.1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA INACTIVAR EL GEN <i>chbR</i> EN <i>L. casei</i> | 16 |
| 4.1.1. Primera estrategia | 16 |
| 4.1.2. Segunda estrategia | 20 |
| 4.2. OBTENCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DE <i>L. casei</i> DEFICIENTE EN <i>chbR</i> | 23 |
| 4.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LA CEPA MUTANTE DE <i>L. casei</i> EN RELACIÓN A SU CAPACIDAD DE METABOLIZAR ChbNAc Y (GlcNAc)₃ | 26 |
| 5. CONCLUSIONES | 30 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 31 |

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Ejemplo de estructura de un oligosacárido de leche humana (OLH) (A) y de un complejo *N*-glicano (B)3
- Figura 2.** Estructura química de los oligosacáridos utilizados en este estudio: *N,N'*-diacetilquitobiosa (A) y *N,N',N''*-triacetilquitotriosa (B)3
- Figura 3.** Representación esquemática de las rutas catabólicas de galacto-*N*-biosa (GNB), lacto-*N*-biosa (LNB), lacto-*N*-triosa II, *N*-acetilglucosamina (LacNAc) y fucosil- α 1,3-*N*-acetilglucosamina (3FN) en *L. casei*5
- Figura 4.** Representación esquemática del operón de la *N,N'*-diacetilquitobiosa (*chb*) de *L. casei* BL23 WT (*Wild Type*)6
- Figura 5.** Ruta metabólica propuesta para la utilización de *N,N'*-diacetilquitobiosa en *L. casei* BL23.....7

2. MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 6.** Resultado de la digestión de pRV300::*chbR* con *BclI*.....10
- Figura 7.** Diseño de la placa multipocillo.....15

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Figura 8.** Construcción virtual del plásmido pRV300::*chbR* (*Benchling [Biology Software]* (2019))16
- Figura 9.** Construcción virtual del plásmido pRV300::*chbR* (*Benchling [Biology Software]* (2019))17
- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*17
- Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*18
- Figura 12.** Representación de cómo actúa *Klenow* después de la digestión del plásmido pRV300::*chbR* con *BclI*.....18
- Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión con *BclI* de las reacciones de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*.....19
- Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para comprobar la digestión con *BclI* del ADN amplificado de la colonia equivalente al pocillo 5 de la Figura 11 (denominada a continuación colonia 5)20
- Figura 15.** Construcción virtual del plásmido pRV300:: Δ *chbR* (*Benchling [Biology Software]* (2019))21
- Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa DH10B conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*21

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión con <i>BclI</i> de las reacciones de PCR de colonia de los transformantes de <i>E. coli</i> cepa DH10B conteniendo el plásmido pRV300:: <i>chbR</i> | 22 |
| Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína original ChbR con la proteína ChbR mutada | 22 |
| Figura 19. Representación esquemática de la integración del vector pRV300:: Δ <i>chbR</i> en el cromosoma de <i>L. casei</i> BL23..... | 23 |
| Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de <i>L. casei</i> cepa BL23 conteniendo el plásmido pRV300:: Δ <i>chbR</i> | 24 |
| Figura 21. Representación esquemática de la segunda recombinación..... | 24 |
| Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de las colonias de <i>L. casei</i> Y499 que han sufrido la segunda recombinación | 25 |
| Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> BL23 WT en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con GlcNAc (color azul oscuro) y <i>L. casei</i> Y517 en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde claro) y con GlcNAc (color azul claro)..... | 26 |
| Figura 24. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> BL23 WT en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con (GlcNAc) ₂ (color lila oscuro) y <i>L. casei</i> Y517 en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde claro) y con (GlcNAc) ₂ (color lila claro)..... | 27 |
| Figura 25. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> BL23 WT en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con (GlcNAc) ₃ (color rojo oscuro) y <i>L. casei</i> Y517 en medio MRS _f sin azúcar añadido (color verde claro) y con (GlcNAc) ₃ (color rojo claro) | 28 |

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Algunos glicanos presentes en la leche humana.....1

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Plásmidos y cepas utilizados en este estudio. El asterisco indica el plásmido y las cepas construidas en este trabajo9

Tabla 3. *Primers* utilizados en este estudio. Las sustituciones se muestran en color verde y las adiciones en color rojo; subrayado se encuentra el sitio de restricción de *EcoRV*11

ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Abs | Absorbancia |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Amp | Ampicilina |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ChbNAc | <i>N,N'</i> -diacetilquitobiosa |
| CN | Control negativo |
| D.O. | Densidad óptica |
| Eri | Eritromicina |
| Fru | Fructosa |
| Fuc | Fucosa |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | <i>N</i> -acetilgalactosamina |
| Glc | Glucosa |
| GlcN | Glucosamina |
| GlcNAc | <i>N</i> -acetilglucosamina |
| GlcNAc-6P | <i>N</i> -acetilglucosamina-6-fosfato |
| (GlcNAc) ₂ | <i>N,N'</i> -diacetilquitobiosa |
| (GlcNAc) ₃ | <i>N,N',N''</i> -triacetilquitotriosa |
| GNB | Galacto- <i>N</i> -biosa |
| Lac | Lactosa |
| LacNAc | <i>N</i> -acetillactosamina |
| LNB | Lacto- <i>N</i> -biosa |
| MRS _f | MRS de fermentación |
| MUE | Tasa de crecimiento máxima específica |

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| OLH | Oligosacárido de leche humana |
| Operón <i>chb</i> | Operón de la <i>N,N'</i> -diacetilquitobiosa |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PTS | Sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato |
| RT-qPCR | PCR cuantitativa con transcriptasa reversa |
| Tag | Tagatosa |
| UV | Ultravioleta |
| WT | <i>Wild Type</i> (Fenotipo silvestre) |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LECHE HUMANA

La leche humana es un fluido biológico complejo, una fuente rica en nutrientes y energía, mantenida a lo largo de la evolución de los mamíferos para proveer todos los requerimientos nutricionales al recién nacido. Además de los nutrientes básicos como proteínas, grasas, hidratos de carbono y vitaminas, proporciona también una serie de compuestos bioactivos como enzimas, anticuerpos, hormonas, factores de crecimiento, poliaminas, nucleótidos y oligosacáridos (Bidart, 2016). La mayoría de nutrientes de la leche humana tales como lactosa, lípidos y proteínas son fácilmente digeridos por el lactante, mientras que los oligosacáridos de la leche humana (OLH), glicoproteínas y glicolípidos son mínimamente degradados por el intestino delgado y pasan a través del tracto gastrointestinal, desarrollando la microbiota intestinal del bebé (Garrido et al., 2013). La leche materna está asociada con tener un menor riesgo de infecciones y diarrea. Esto es debido a la actividad de las inmunoglobulinas de la leche (Xanthou et al., 1995), agentes antimicrobianos como lactoferrina y lisozima (Haversen et al., 2002; Jollès et al., 1961; Lönnerdal, 2009) y glicoconjugados (Newburg et al., 2005).

1.2. GLICANOS DE LA LECHE

Los glicanos de la leche se pueden encontrar de forma libre como oligosacáridos de leche humana (OLH), o bien conjugados a proteínas o lípidos (glicoproteínas y glicolípidos, respectivamente). Todos ellos tienen influencia en el dominio de microorganismos beneficiosos en la microbiota intestinal del bebé. La **Tabla 1** recoge algunos glicanos presentes en la leche humana.

Tabla 1. Algunos glicanos presentes en la leche humana (Zúñiga et al., 2018).

| Núcleo | Nombre | Abreviatura | Estructura |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|------------------|
| Núcleo de OLH tipo I | Lacto- <i>N</i> -biosa | LNB | Galβ1-3GlcNAc |
| Núcleo de OLH tipo II | <i>N</i> -acetilactosamina | LacNAc | Galβ1-4GlcNAc |
| Núcleo de <i>O</i> -glicosilación en glicoproteínas | Galacto- <i>N</i> -biosa | GNB | Galβ1-3GalNAc |
| Núcleo de <i>N</i> -glicosilación en glicoproteínas | <i>N,N'</i> -diacetilquitobiosa | ChbNAc | GlcNAcβ1-4GlcNAc |

1.2.1. Oligosacáridos de leche humana (OLH)

Los oligosacáridos de leche humana han sido descritos como prebióticos para la microbiota del intestino de los bebés, promoviendo el establecimiento de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*. Un prebiótico se define como un ingrediente alimentario no digerible que beneficia la salud del huésped al estimular selectivamente el crecimiento y actividad de una o más bacterias en el colon (Gibson et al., 1995).

Los OLH constituyen el tercer componente sólido mayoritario después de la lactosa y los lípidos (Kunz et al., 2000; Thurl et al., 2010). Cada oligosacárido está construido a partir de una lactosa, que se expande por la adición de 5 monosacáridos: glucosa (Glc), galactosa (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y ácido siálico, mayoritariamente ácido *N*-

acetilneuramínico (Neu5Ac). La molécula terminal de lactosa puede ser modificada por una fucosa o ácido siálico o bien por repeticiones de bloques de lacto-*N*-biosa (LNB; Gal β 1-3GlcNAc) o *N*-acetillactosamina (LacNAc; Gal β 1-4GlcNAc). Estas repeticiones pueden ser ampliadas por la adición de fucosa o ácido siálico mediante enlaces tipo α (Garrido et al., 2013). En la leche humana se han identificado más de 200 estructuras de oligosacáridos diferentes (Wu et al., 2010, 2011). Cerca del 70% de los OLH están fucosilados, mientras que el 20% están sialilados.

Hasta el momento, existe muy poca información sobre la biosíntesis de los OLH pero, debido a que todos ellos poseen lactosa en su extremo reductor, es probable que sean sintetizados como una extensión de la biosíntesis de la lactosa, la cual ocurre en el aparato de Golgi. La cantidad y complejidad de oligosacáridos varía en gran medida entre distintas especies, por lo que resulta difícil estudiar la regulación y el mecanismo de biosíntesis de los OLH en modelos animales. Tampoco ha sido exitoso el intento de utilizar líneas celulares epiteliales de glándula mamaria, ya que en ninguno de los casos se ha conseguido ni siquiera la síntesis de lactosa (Bode, 2012). Dado que las fórmulas infantiles se basan en leche bovina, la cantidad, proporción y tipo de oligosacáridos es muy diferente a la de la leche humana, donde se observan concentraciones medias entre 20 y 25 g/l, es decir, cantidades de 100 a 1000 veces mayores que la concentración de oligosacáridos presentes en la leche bovina. La fuente natural para obtener los OLH sería la purificación a partir de la leche humana, lo que no es viable a escala industrial (Bidart, 2016).

La composición de los OLH varía entre diferentes mujeres y depende principalmente de factores genéticos relacionados con la expresión o no de ciertas glicosiltransferasas. Las enzimas del tracto gastrointestinal del bebé no son capaces de digerir la diversidad de uniones de los OLH sintetizados por las glicosiltransferasas en la glándula mamaria (Dallas et al., 2012). Los OLH se ven mínimamente afectados por el tránsito a través del estómago y el intestino delgado, alcanzando una alta concentración en las heces del bebé (Chaturvedi et al., 2001; Engfer et al., 2000; Gnoth et al., 2000). Además, pequeñas concentraciones pueden encontrarse en la orina, sugiriendo que estas moléculas pueden ejercer efectos fisiológicos no solo en el tracto intestinal sino sistemáticamente en el organismo (Rudloff et al., 2012). Son capaces de modular la inmunidad del bebé, alterando tanto el epitelio como las respuestas de células inmunitarias del intestino (Newburg et al., 2016). Además, pueden actuar como receptores solubles para bloquear la adhesión de patógenos microbianos a receptores en la superficie de células tanto intestinales como del tracto urinario (Laucirica et al., 2017; Lin et al., 2014).

1.2.2. Glicoproteínas

La glicosilación de proteínas es una modificación post-traduccional en la que un glicano se une covalentemente a un aminoácido determinado en la estructura de una proteína. Existen dos tipos de glicosilación en eucariotas, *N*-glicosilación y *O*-glicosilación. El epitelio del tracto gastrointestinal está recubierto por una capa mucosa protectora, compuesta principalmente por mucinas, proteínas altamente glicosiladas. La *N*-glicosilación en mucinas es menos abundante pero es una modificación común en la mucosa y en proteínas de la leche humana (Zúñiga et al., 2018). La glicosilación incrementa la resistencia de las proteínas a la proteólisis

(Van Berkel et al., 1995), contribuyendo a la excreción de proteínas intactas o parcialmente degradadas en las heces de niños amamantados (Davidson et al., 1987; Prentice et al., 1989). Todos los *N*-glicanos tienen en común un pentasacárido con la estructura $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, donde el disacárido *N,N'*-diacetilquitobiosa (ChbNAc) se une covalentemente a una asparagina (Asn) en la secuencia Asn- X-Ser/Thr mediante un enlace tipo β (**Figuras 1 y 2**).

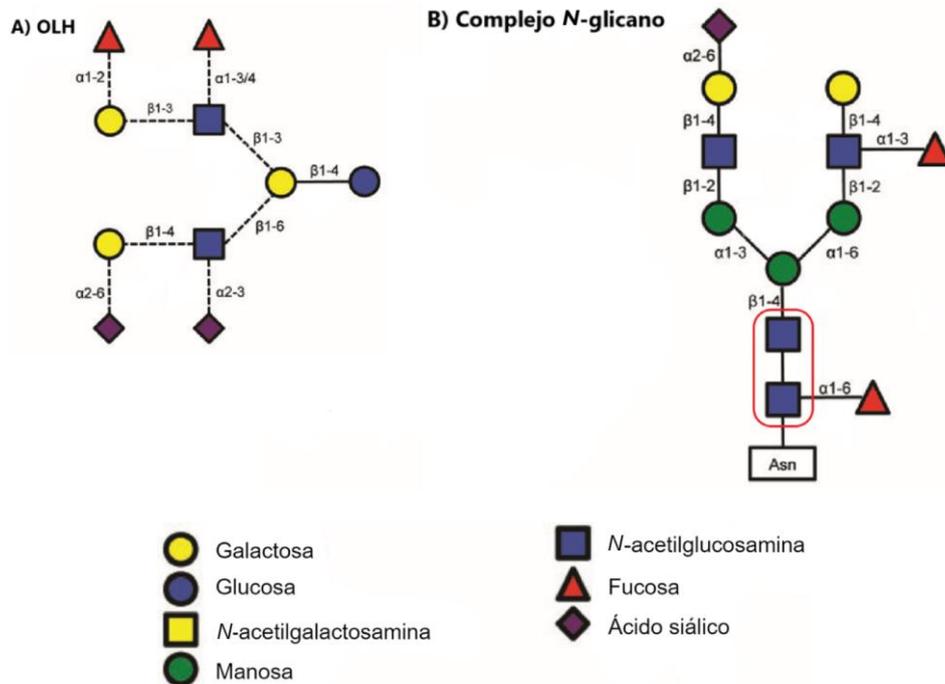


Figura 1. Ejemplo de estructura de un oligosacárido de leche humana (OLH) (A) y de un complejo *N*-glicano (B). La leyenda en la parte inferior indica la composición de monosacáridos. Se muestra rodeado en color rojo el disacárido *N,N'*-diacetilquitobiosa (ChbNAc), formado por dos unidades de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por un enlace β -1,4 (Garrido et al., 2013).

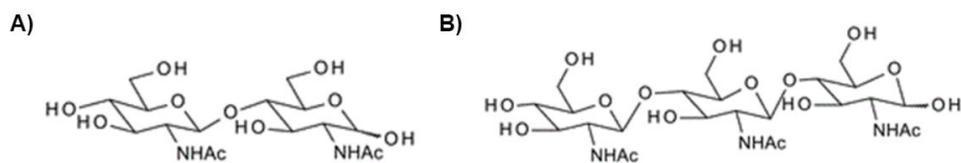


Figura 2. Estructura química de los oligosacáridos utilizados en este estudio: *N,N'*-diacetilquitobiosa (A) y *N,N',N''*-diacetilquitotriosa (B).

1.3. MICROBIOTA INTESTINAL

Los microorganismos colonizan cada superficie del cuerpo donde pueden establecer una relación simbiótica con el hospedador. Alteraciones en la microbiota intestinal se han relacionado con distintas enfermedades como desórdenes metabólicos (Sonnenburg and Backhed, 2016), enfermedades inflamatorias (Blander et al., 2017), diabetes (Membrez et al., 2008; Vaarala et al., 2008) y celiaquía (Collado et al., 2007), entre otras. La barrera intestinal tiene la función de absorber nutrientes y al mismo tiempo prevenir que patógenos indeseados puedan adherirse a la pared del intestino. La barrera microbiana se desarrolla rápidamente después del nacimiento y empieza con la colonización por parte de la microbiota materna. Los

oligosacáridos no digeribles han mostrado proteger la barrera intestinal de la inflamación y el estrés oxidativo asociado a la apertura de las uniones densas. La comunicación entre el lumen y la barrera inmune regula las respuestas inflamatorias con el objetivo de mantener un equilibrio entre defensa inmunológica y tolerancia (Figueroa-Lozano et al., 2018). La madre transfiere bacterias beneficiosas al bebé por medio de la leche materna, las cuales le protegen de diarreas y enfermedades tanto respiratorias como metabólicas (Hunt et al., 2011).

1.4. *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de los lactantes y otras superficies mucosas. Comprende más de 200 especies, aisladas de una gran variedad de hábitats, muchas de las cuales se han considerado como bacterias probióticas (Zúñiga et al., 2018). Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que, administrados en la cantidad suficiente, confieren un beneficio en la salud del hospedador. *Lactobacillus* es un género de bacterias gram positivas, microaerofílicas o anaerobias obligadas fermentativas, que producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de los azúcares. En este estudio se utiliza la cepa *Lactobacillus casei* BL23 ya que posee propiedades probióticas demostradas, se puede manipular genéticamente y se dispone de la secuencia de su genoma.

En *Lactobacillus* no se han caracterizado endo- β -*N*-acetilglucosaminidasas que liberen glicanos de proteínas *N*-glicosiladas, lo cual indica que, probablemente, necesite la acción coordinada de glicosidasas de otros microorganismos comensales para explotar estos recursos. La acción de estos microorganismos daría lugar a sustratos simplificados de *N*-glicanos que sí serían adecuados para el transporte e hidrólisis por parte de *Lactobacillus* (Zúñiga et al., 2018).

Es conocido el metabolismo de galacto-*N*-biosa (GNB), lacto-*N*-biosa (LNB), lacto-*N*-triosa II y *N*-acetillactosamina (LacNAc) en *L. casei* (Figura 3). Varios hechos sugieren que el operón *gnb* está especializado en el metabolismo de GNB: 1) la ausencia de *GnbE* y *GnbF* solo perjudica el crecimiento de *L. casei* sobre GNB y no sobre LNB; 2) los genes *gnb* son altamente inducidos durante el crecimiento sobre GNB y GalNAc, mientras que apenas hay inducción con LNB y GlcNAc y 3) el transportador PTS^{Gnb} es requerido para el crecimiento sobre GalNAc pero no sobre GlcNAc. Por tanto, la similitud en la estructura entre GNB y LNB permite el transporte de LNB a través de PTS^{Gnb}, y su posterior hidrólisis por *GnbG* parece ser la responsable de la utilización de LNB por *L. casei* (Zúñiga et al., 2018). Por otra parte, análisis transcripcionales muestran que el operón *gnb* está regulado por inducción de sustrato específico mediado por el represor transcripcional *GnbR* (Bidart et al., 2014).

Solo tres α -L-fucosidasas (*AlfA*, *AlfB* y *AlfC*) han sido caracterizadas en *Lactobacillus*. Estas enzimas intracelulares dependen del transporte de carbohidratos fucosilados para llevar a cabo su función y actúan sobre disacáridos mejor que sobre oligosacáridos largos. Por ello, se piensa que *L. casei* está especializado en el transporte y metabolismo de oligosacáridos fucosilados cortos, probablemente liberados por la actividad hidrolítica de otros miembros de la microbiota.

La expresión del operón *chb* está reprimida por NagC, y el inductor que desplaza a NagC es GlcNAc-6P. Además, el operón *chb* codifica para su propio regulador, ChbR, necesario para activar la transcripción de los genes *chb*. Una mutación en *chbR* elimina toda inducción por ChbNAc, mientras que una mutación en *nagC* permite la inducción de los genes del operón. Esto muestra que, a pesar de que tanto ChbR como NagC parecen actuar como represores del operón *chb* en ausencia del azúcar inductor ChbNAc, ChbR es necesario para la inducción y por tanto actúa como represor-activador (Plumbridge et al., 2004). Una mutación en *chbB*, dominio IIB del PTS, elimina la inducción por *N,N'*-diacetilquitobiosa, lo cual indica que el transporte y la fosforilación de la *N,N'*-diacetilquitobiosa son necesarios para la generación de una señal intracelular inductora.

1.5.2. *chb* en *Lactobacillus casei*

En el laboratorio donde se ha realizado este TFG, ha sido demostrado previamente que *L. casei* cepa BL23 puede cultivarse en presencia de ChbNAc y *N,N',N''*-diacetilquitotriosa como únicas fuentes de carbono en el medio de cultivo. El operón *chb*, implicado en el metabolismo de estos carbohidratos, está formado por el *cluster* de genes *chbRCDE*, que codifica para *chbR*, un hipotético regulador transcripcional; *chbC*, dominio IIC del PTS; y *chbD* y *chbE*, que codifican para dos proteínas hipotéticas, mientras que el *cluster* de genes *chbBAF* codifica para *chbB* y *chbA*, dominios IIB y IIA, respectivamente, del PTS, y *chbF*, que codifica para una proteína que tiene homología con enzimas *N*-acetiltransferasas. La representación esquemática del operón de la ChbNAc y la ruta metabólica propuesta para la utilización de ChbNAc en *L. casei* BL23 se muestran en las Figuras 4 y 5.

Cabe destacar que el operón *chb* carece de un gen que codifique para una glicosidasa asociada responsable de la hidrólisis de ChbNAc en los dos monosacáridos de GlcNAc, indicando que otras glicosidasas codificadas en el genoma de *L. casei* deben ser las responsables de esta actividad. Aunque se sabe que los genes *chbD* y *chbE* no codifican para proteínas que tengan homología con glicosidasas, no se descarta que pudieran formar parte de una nueva familia de glicosidasas no caracterizadas hasta el momento. Por último, análisis transcripcionales han demostrado que el operón *chb* está inducido en presencia de ChbNAc. En cambio, en un medio con glucosa como fuente de carbono y sin ChbNAc no se expresan los genes del operón *chb* debido a que *L. casei* metaboliza la glucosa y reprime el operón *chb*. También se ha descrito que la inactivación del gen *chbC*, que codifica para el dominio IIC del sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) resulta en una cepa de *L. casei* mutante, la cual no puede cultivarse en presencia de este disacárido como fuente de carbono. Por tanto, el sistema PTS está implicado en el transporte y fosforilación de la ChbNAc.

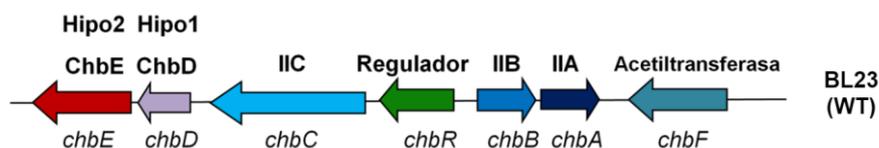


Figura 4. Representación esquemática del operón de la *N,N'*-diacetilquitobiosa (*chb*) de *L. casei* BL23 WT (*Wild Type*). IIA, dominio A; IIB, dominio B; IIC, dominio C. Los tres dominios son componentes del sistema de fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).

2. OBJETIVOS

El presente TFG tiene como objetivo analizar la función del gen *chbR*, un hipotético regulador transcripcional del operón *chb*, implicado en el metabolismo de la *N,N'*-diacetilquitobiosa (ChbNAc) presente en *Lactobacillus casei* cepa BL23, con el fin de estudiar si codifica para un represor o un activador y, en consecuencia, aumentar el conocimiento acerca de la regulación del operón.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Construir un vector en *Escherichia coli* para inactivar el gen *chbR* de *Lactobacillus casei*.
- 2) Obtener una cepa mutante de *Lactobacillus casei* deficiente en *chbR*.
- 3) Analizar el fenotipo de la cepa mutante de *Lactobacillus casei* en relación a su capacidad de metabolizar ChbNAc y (GlcNAc)₃.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA INACTIVAR EL GEN *chbR* EN *L. casei*

Para abordar este objetivo se han seguido dos estrategias; con la primera estrategia no se consiguió obtener el resultado esperado, por lo que se diseñó y aplicó una segunda estrategia; se exponen a continuación ambas estrategias.

3.1.1. Primera estrategia

3.1.1.1. Cultivo de *E. coli* Y463 y aislamiento de ADN plasmídico

Se utiliza medio LB (triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l) y cloruro de sodio (5 g/l)) (CONDA, España) suplementado con Amp¹⁰⁰ (GUINAMA, España) para crecer *E. coli* cepa Y463 (Tabla 2) y se incuba a 37°C y 200 rpm *overnight* en el equipo *INFORS HT Ecotron* (Suiza). El medio LB se suplementa con Amp¹⁰⁰ porque *E. coli* es sensible a este antibiótico y, por tanto, solo las bacterias que tengan el plásmido incorporado crecerán. Para el aislamiento del plásmido pRV300::*chbR* (Tabla 2) de *E. coli* cepa Y463 se emplea un kit de extracción de ADN plasmídico (*NuceloSpin Plasmid*), siguiendo el protocolo de la casa comercial *Macherey-Nagel* (Alemania). Brevemente, la extracción consiste en llevar a cabo una lisis alcalina de las células bacterianas, eliminar el ARN, precipitar el ADN genómico, unir el ADN a la columna de sílice gracias a la sal caotrópica cloruro de guanidina y, por último, eluir el ADN (en este paso se utiliza H₂O a 70°C en lugar del tampón NE descrito en el protocolo). Finalmente, se cuantifica la cantidad de ADN plasmídico extraído en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*ISOGEN LIFE SCIENCE*, Holanda).

Tabla 2. Plásmidos y cepas utilizados en este estudio. El asterisco indica el plásmido y las cepas construidas en este trabajo.

| Plásmidos | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pRV300:: <i>chbR</i> | Plásmido pRV300 con el gen <i>chbR</i> del operón <i>chb</i> de <i>L. casei</i> insertado |
| *pRV300:: <i>ΔchbR</i> | Plásmido pRV300:: <i>chbR</i> con deleción y cambio en la pauta de lectura en el gen <i>chbR</i> |
| Cepas | |
| <i>Escherichia coli</i> | |
| <i>E. coli</i> Y463 | <i>E. coli</i> conteniendo el plásmido pRV300:: <i>chbR</i> |
| <i>E. coli</i> GM119 | Cepa de <i>E. coli</i> (F–supE44, lacY1, galK2, galT22, metB1, dcm-6, dam-3, tsx-78 λ–) utilizada en la transformación de la estrategia 1 |
| <i>E. coli</i> DH10B | Cepa de <i>E. coli</i> (F– endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr) sdRMS-mcrBC) λ–) utilizada en la transformación de la estrategia 2 |
| * <i>E. coli</i> Y498 | <i>E. coli</i> cepa DH10B conteniendo el plásmido pRV300:: <i>ΔchbR</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | |
| <i>L. casei</i> BL23 | Cepa de <i>L. casei</i> utilizada en la transformación para conseguir un mutante de <i>L. casei</i> deficiente en <i>chbR</i> |
| * <i>L. casei</i> Y499 | <i>L. casei</i> BL23 conteniendo el plásmido pRV300:: <i>ΔchbR</i> |
| * <i>L. casei</i> Y517 | <i>L. casei</i> BL23 con mutación limpia en <i>chbR</i> (pierde el plásmido pRV300 y mantiene una copia del gen <i>chbR</i> con deleción y cambio en la pauta de lectura) |

3.1.1.2. Digestión del plásmido con *BclI*, tratamiento con *Klenow* y ligación

El ADN plasmídico se digiere mediante la enzima de restricción *BclI* (*Thermo Scientific*, Estados Unidos), que es activa en el tampón G (10 mM Tris-HCl (pH 7.5 a 37°C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 0.1 mg/mL BSA). La reacción se incuba 1 h y 45 min a 55°C y a continuación 15 min a 80°C para inactivar *BclI*. El gen que se quiere inactivar (*chbR*) presenta dos sitios de restricción de *BclI*, obteniendo así una delección en *chbR* de 48 pb (**Figura 6**).

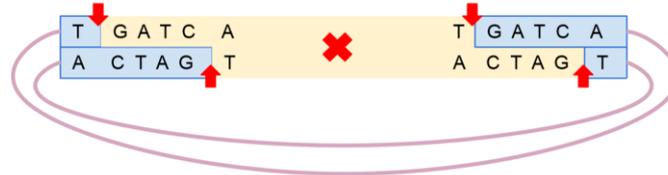


Figura 6. Resultado de la digestión de pRV300::*chbR* con *BclI*. Las flechas rojas indican dónde corta la enzima dentro del sitio de reconocimiento de *BclI*. La delección de 48 pb o fragmento de ADN perdido después de digerir con *BclI* se muestra en color amarillo.

El ADN digerido se trata con la enzima *Klenow* o *Large fragment of DNA Pol I* (*Invitrogen*, Estados Unidos), la reacción incluye dNTPs (0.025 mM) (*Sigma*, Alemania) y se incuba 15 min a 30°C. *Klenow* es una enzima con actividad polimerasa que añade 4 nucleótidos, complementarios a los de la otra hebra, cambiando así la pauta de lectura del gen y en consecuencia la secuencia de aminoácidos de la proteína. El objetivo es inactivar el gen *chbR* para obtener una proteína ChbR no funcional. A continuación, se comprueba el producto obtenido en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se emplea el colorante *Redsafe* (*Roche*, Suiza), que se intercala en el ADN y emite fluorescencia tras ser irradiado con luz UV; la muestra se suplementa con tampón de carga 6X, que contiene sacarosa para darle densidad y viscosidad y azul de bromofenol para facilitar su visualización y formar el frente de la electroforesis. Tras visualizar el gel con luz UV en el equipo Proxima 16 Phi+ (*ISOGEN LIFE SCIENCE*, Holanda), se recorta la banda de interés y se purifica mediante un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*), siguiendo el protocolo de la casa comercial *Macherey-Nagel*. Para la ligación del plásmido se usa la enzima T4 DNA ligasa (*Roche*, Suiza), la reacción se incuba a 16°C *overnight* y se purifica mediante un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*). Con todo, se obtiene el plásmido pRV300::Δ*chbR* (**Tabla 2**).

3.1.1.3. Transformación de *E. coli* cepa GM119

Mediante el método de electroporación y, siguiendo las instrucciones del aparato electroporador (*BIO-RAD Gene Pulser*, Estados Unidos), se lleva a cabo la transformación de *E. coli* cepa GM119. La electroporación provoca poros en la membrana plasmática de las células competentes para que pueda penetrar el ADN plasmídico. La muestra se incuba 1h a 37°C y 200 rpm (*INFORS HT Ecotron*), pues a 37°C se activan los genes de resistencia a antibiótico que porta el plásmido. Se siembran placas con medio LB-agar suplementado con Amp¹⁰⁰ y se incuban 24 h a 37°C. El plásmido pRV300 lleva un gen de resistencia a Amp, por tanto, solo las bacterias que hayan incorporado el plásmido pRV300::*chbR* crecerán. Éste se replica durante el crecimiento de la bacteria dando lugar a la clonación (formación de muchas copias idénticas) del ADN que contiene.

3.1.1.4. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, comprobación de la digestión con *BclI*, glicerinado y secuenciación de colonias positivas

Las colonias obtenidas se analizan por PCR de colonia. Para llevar a cabo esta reacción, se añade: MgCl₂ (2 mM), tampón 10X Reaction, dNTPs (0.4 Mm) (*Sigma*), primers pRV300-FOR y pRV300-REV (0.4 mM) (*Metabion*, Alemania) (**Tabla 3**) y la enzima *Taq DNA Polymerase* (1.2 U/reacción) (*Nzytech*, Portugal), en un volumen total de 25 µl/reacción. El programa utilizado en el termociclador es el siguiente: desnaturalización inicial (5 min a 95°C); 30 ciclos de: 1) desnaturalización (30 s a 95°C), 2) hibridación de los primers (30 s a 50°C) y 3) extensión de la nueva hebra de ADN (1:30 min a 72°C), y extensión final (7 min a 72°C).

Tabla 3. Primers utilizados en este estudio. Las sustituciones se muestran en color verde y las adiciones en color rojo; subrayado se encuentra el sitio de restricción de *EcoRV*.

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| chb2B-FOR | 5' ATGTTAATCACATCAACCGGA 3' |
| chbR2-REV | 5' GCTGACAGCGTCAGATTACGG 3' |
| pRV300-FOR | 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3' |
| pRV300-REV | 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3' |
| chbRvuelta-FORT-ins | 5' GGACCGCTTgAtATCGAtAAGTCG 3' |
| chbRvuelta-REV | 5' GGGCAAAAATGAtATCCAGCGCCT 3' |
| chb2A | 5' GCAGAACTCTTGCGTTG 3' |

El producto de la PCR se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y a continuación se digiere con la enzima de restricción *BclI* junto al tampón G (10 mM Tris-HCl (pH 7.5 a 37°C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 0.1 mg/mL BSA), la reacción se incuba 1 h a 55°C y se comprueba con otra electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La colonia positiva elegida se crece en medio LB líquido y al día siguiente se glicerina. Para ello, se parte del cultivo líquido procedente de la colonia y se conserva en medio LB con glicerol al 20% en un criotubo, almacenándose a -80°C. Por último, se purifica el plásmido pRV300::Δ*chbR* mediante un kit de purificación de ADN plasmídico (*NuceloSpin Plasmid*) y se envía a secuenciar (Servicio de Secuenciación de la UV, SCSIE).

3.1.2. Segunda estrategia

Dado que con la primera estrategia no se consiguió obtener ninguna colonia o clon con el cambio en la pauta de lectura deseado, se procedió al diseño de nuevos primers, chbRvuelta-FORT-ins y chbRvuelta-REV (**Tabla 3**), para utilizarlos en esta segunda estrategia. En el diseño de los primers se tiene en cuenta lo siguiente: 1) se quiere romper la pauta de lectura del gen *chbR*, por lo que se introduce una adición de una T en el primer chbRvuelta-FORT-ins, y 2) se precisa tener un sitio de restricción para poder digerir con una enzima y dejar los extremos del primer 5' fosforilados, necesarios para que la ligasa puede actuar; se elige tener el sitio de restricción de *EcoRV*. Para ello, se hacen dos sustituciones en el primer chbRvuelta-FORT-ins y una en el primer chbRvuelta-REV.

3.1.2.1. Cultivo de *E. coli* Y463 y aislamiento de ADN plasmídico

Se crece *E. coli* cepa Y463 y se aísla el ADN plasmídico de la misma forma que la descrita en el apartado 3.1.1.1 de Materiales y Métodos.

3.1.2.2. PCR utilizando el plásmido pRV300::*chbR* como molde, digestión con *EcoRV* y ligación

La PCR utilizando el plásmido pRV300::*chbR* (Tabla 2) como molde tiene como objetivo amplificar todo el plásmido a excepción de un fragmento de ADN del gen *chbR*, excluido a la hora de diseñar los *primers*, ocasionando así una deleción de aproximadamente 112 pb en el gen *chbR*. Para esta reacción se añade: ADN plasmídico, tampón 5X *Phusion HF* ($MgCl_2$ 1.5 mM en 1X), dNTPs (0.2 mM) (*Sigma*), *primers* *chbR*vuelta-FORt-ins y *chbR*vuelta-REV (0.5 mM) (*Metabion*) y la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (1 U/reacción) (*ThermoFisher*, Estados Unidos), en un volumen total de 50 μ l. La enzima empleada en esta PCR es de alta fidelidad y por ello tiene actividad *proofreading*, es decir, de corrección de errores. El programa utilizado en el termociclador es el siguiente: desnaturalización inicial (30 s a 98°C); 30 ciclos de: 1) desnaturalización (15 s a 98°C), 2) hibridación de los cebadores (30 s a 60°C) y 3) extensión de la nueva hebra de ADN (4:30 min a 72°C), y extensión final (7 min a 72°C).

El producto de la PCR se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Tras visualizar el gel con luz UV en el equipo Proxima 16 Phi+ (*ISOGEN LIFE SCIENCE*), se recorta la banda de interés y se purifica mediante un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*), siguiendo el protocolo de la casa comercial *Macherey-Nagel*. A continuación, se digiere con la enzima de restricción *EcoRV* (*Thermo Scientific*) junto al tampón R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 a 37°C), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl y 0.1 mg/mL BSA) y se incuba 2 h a 37 °C. La digestión se purifica utilizando un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*) y se procede a la ligación del plásmido con la enzima T4 DNA ligasa (*Roche*), la reacción se incuba 1 h a 22 °C y se purifica mediante un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*). Con todo, se obtiene el plásmido pRV300:: Δ *chbR* (Tabla 2).

3.1.2.3. Transformación de *E. coli* cepa DH10B

Se realiza la transformación en *E. coli* cepa DH10B por el método de electroporación (descrito en el apartado 3.1.1.3 de Materiales y Métodos).

3.1.2.4. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, comprobación de la digestión con *BclI*, glicerinado y secuenciación de colonias positivas

Una vez obtenidas las colonias, éstas se analizan por PCR de colonia. Para llevar a cabo esta reacción, se añade: tampón *Taq A 10X* ($MgCl_2$ 1.5 mM en 1X), dNTPs (0.2 mM) (*Sigma*), *primers* pRV300-FOR y pRV300-REV (0.4 mM) (*Metabion*) (Tabla 3) y la enzima *KAPA Taq DNA Polymerase* (0.5 U/reacción) (*KAPA BIOSYSTEMS*, Estados Unidos), en un volumen total de 25 μ l/reacción. El programa utilizado en el termociclador es el mismo que el descrito en el apartado 3.1.1.4 de Materiales y Métodos. El producto de la PCR se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y a continuación se digiere con la enzima de restricción *BclI* (descrito en el apartado 3.1.1.4 de Materiales y Métodos); el producto obtenido se comprueba con otra electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La colonia positiva elegida se

glicerina y secuencia (descrito en el apartado 3.1.1.4 de Materiales y Métodos) y pasa a denominarse *E. coli* Y498 (Tabla 2).

3.2. OBTENCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DE *L. casei* DEFICIENTE EN *chbR*

3.2.1. Cultivo de *E. coli* Y498 y aislamiento de ADN plasmídico

Se crece *E. coli* Y498 y se aísla el ADN plasmídico de la misma forma que la descrita en el apartado 3.1.1.1 de Materiales y Métodos.

3.2.2. Transformación de *L. casei* cepa BL23

Para llevar a cabo la transformación en *L. casei* cepa BL23, se emplea el método de electroporación haciendo uso del aparato electroporador (*BIO-RAD Gene Pulser*), como describe Posno et al., 1991. La muestra se incuba 1h a 37°C y 200 rpm en el equipo *INFORS HT Ecotron*. Se siembran placas con medio MRS-agar (peptona de proteosa (10 g/l), extracto de carne bovina (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), dextrosa (20 g/l), polisorbato 80 (1 g/l), citrato de amonio (2 g/l), acetato de sodio (5 g/l), sulfato de magnesio (0.1 g/l), sulfato de manganeso (0.05 g/l) y fosfato dipotásico (2 g/l)) (*BD*, Estados Unidos) suplementado con Eri⁵ (*GUINAMA*) y se incuban 24-48 h a 37°C. *L. casei* es sensible a eritromicina, por tanto, solo las bacterias que hayan incorporado el plásmido crecerán, al portar un gen de resistencia a Eri.

El plásmido pRV300 no tiene origen de replicación en *Lactobacillus*, por lo que no se replica (como sí ocurría en *E. coli*). Después de la transformación, *L. casei* tendrá una copia del plásmido pRV300:: Δ *chbR* (Tabla 2) que, por recombinación, integrará en su genoma. Se dará una primera recombinación y más tarde una segunda recombinación en la que, *L. casei*, tras muchas divisiones, será capaz de perder el plásmido pRV300 y quedarse solo con una copia del gen *chbR* mutado integrado en su genoma. Resulta esencial que se den dos recombinaciones en lugar de una sola ya que, si solo se diera una recombinación, *L. casei* tendría dos copias del gen *chbR* (*chbR* mutado y *chbR* original) y, en consecuencia, el fenotipo de la cepa mutante no podría ser estudiado de manera eficaz.

3.2.3. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia y glicerinado de colonias positivas

Las colonias obtenidas se analizan mediante PCR de colonia. Para esta reacción se añade: tampón *Taq A 10X* ($MgCl_2$ 1.5 mM en 1X), dNTPs (0.2 mM) (*Sigma*), primers pRV300-FOR o pRV300-REV y *chbA2* (0.4 mM) (*Metabion*) (Tabla 3) y la enzima *KAPA Taq DNA Polymerase* (0.5 U/reacción) (*KAPA BIOSYSTEMS*), en un volumen total de 25 μ l/reacción. Para cada colonia se hacen dos reacciones, una con los primers *chbA2* y pRV300-FOR y otra con los primers *chbA2* y pRV300-REV, para confirmar la orientación en la que se ha integrado el plásmido en el genoma de *L. casei*. El programa utilizado en el termociclador es el siguiente: desnaturalización inicial (7 min a 96°C); 30 ciclos de: 1) desnaturalización (30 s a 95°C), 2) hibridación de los cebadores (30 s a 50°C) y 3) extensión de la nueva hebra de ADN (1:20 min a 72°C), y extensión final (5 min a 72°C). Tanto la temperatura como el tiempo de desnaturalización son mayores en esta PCR debido a que *L. casei* es más resistente a la lisis por calor. El producto de la PCR se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se elige un clon positivo y se denomina *L. casei* Y499 (Tabla 2). Esta cepa mutante con el plásmido integrado se crece en medio MRS líquido y al día siguiente se glicerina. Para ello, se parte del cultivo líquido

procedente de la colonia y se conserva en medio MRS con glicerol al 20% en un criotubo, almacenándose a -80°C.

3.2.4. Cultivo de *L. casei* Y499 durante unas 200 generaciones, siembra en placas MRS sin Eri⁵ y réplica en placas MRS con Eri⁵

L. casei Y499 se incuba durante aproximadamente 200 generaciones en medio MRS sin Eri⁵, a 37°C *overnight*. Sin la presión selectiva del antibiótico se produce una segunda recombinación y se pierde el plásmido integrado. Se hacen diluciones del cultivo, se siembran placas con medio MRS sin antibiótico y se incuban a 37°C durante 24-48h. Las placas se replican empleando telas de terciopelo esterilizadas. Las colonias presentes en las placas con medio MRS quedan marcadas en el terciopelo y se replican en las placas con medio MRS suplementado con Eri⁵, las cuales se incuban a 37°C *overnight*. Esto permite distinguir las colonias que han perdido el plásmido, ya que no estarán presentes en las placas con eritromicina.

3.2.5. Análisis de las colonias mediante PCR de colonia, glicerinado y secuenciación de colonias positivas

Las colonias obtenidas se analizan por PCR de colonia. Para esta reacción se añade: tampón *Taq A 10X* (MgCl₂ 1.5 mM en 1X), dNTPs (0.2 mM) (*Sigma*), *primers* chb2B-FOR (0.4 mM) y chbR2-REV (0.4 mM) (*Metabion*) (**Tabla 3**) y la enzima *KAPA Taq DNA Polymerase* (1 U/reacción) (*KAPA BIOSYSTEMS*), en un volumen total de 25 µl/ reacción. El programa utilizado en el termociclador es el mismo que el descrito en el apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos. El producto de la PCR se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La colonia positiva elegida pasa a denominarse *L. casei* Y517 (**Tabla 2**). Se crece en medio MRS líquido y al día siguiente se glicerina. Para ello, se parte del cultivo líquido procedente de la colonia y se conserva en medio MRS con glicerol al 20% en un criotubo, almacenándose a -80°C. Por último, se purifica el producto de la PCR correspondiente a la colonia positiva mediante un kit de purificación de ADN (*NuceloSpin Gel and PCR Clean-up*) y se envía a secuenciar (Servicio de Secuenciación de la UV, SCSIE).

3.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LA CEPA MUTANTE DE *L. casei* EN RELACIÓN A SU CAPACIDAD DE METABOLIZAR ChbNAc Y (GlcNAc)₃

Con el objetivo de analizar el fenotipo de *L. casei* Y517 (**Tabla 2**), se lleva a cabo un ensayo en el que se estudian dos cepas (*L. casei* BL23 WT y *L. casei* Y517). Ambas cepas se inoculan en medio MRS comercial (peptona de proteosa (10 g/l), extracto de carne bovina (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), dextrosa (20 g/l), polisorbato 80 (1 g/l), citrato de amonio (2 g/l), acetato de sodio (5 g/l), sulfato de magnesio (0.1 g/l), sulfato de manganeso (0.05 g/l) y fosfato dipotásico (2 g/l)) (*BD*) y se incuban a 37°C *overnight*. Se transfieren 100 µl a 10 ml de medio MRS_f (MRS de fermentación) preparado en el laboratorio (peptona (10 g/l), extracto de levadura (4 g/l), tween 80 al 10% (0.1%), acetato sódico al 10% (0.5%), citrato triamonio al 10% (0.2%), sulfato de magnesio al 10% (0.02%) y sulfato de manganeso al 10% (0.005%)) y se incuban a 37°C *overnight*. Al día siguiente, se centrifuga 10 min a 4000 rpm en el equipo *HERMLE Z 383 K* (Letonia), se eliminan 9 ml de sobrenadante y se resuspende el pellet con el ml restante. A continuación, se mide para cada cepa la D.O. a 550 nm en el espectrofotómetro

Spectronic 20D (Milton Roy Company, Estados Unidos) con el fin de calcular el volumen de células a añadir en cada pocillo.

En cada pocillo se añade: 50 μ l de MRS_f, 46 μ l de la cantidad calculada de células (*L. casei* BL23 WT o Y517 a una D.O. inicial de 0.1) y 4 μ l de azúcar (GlcNAc, ChbNAc o (GlcNAc)₃) (*Carbosynth*, UK). Ahora bien, los pocillos que se utilizan como blanco no llevan células ni azúcar añadido (llevan en cambio 50 μ l de H₂O) y los que son control negativo no llevan azúcar añadido (llevan en cambio 4 μ l de H₂O), obteniendo un volumen final de 100 μ l en cada pocillo. El diseño de la placa multipocillo se muestra en la **Figura 7**. Cabe destacar que, si hay glucosa en el medio, la bacteria la metabolizará y reprimirá la expresión de otros operones como puede ser el de interés (*chb*). Por ello, se emplea el medio MRS de fermentación, que no lleva glucosa ni otra fuente de carbohidrato añadida.

El ensayo se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos, que se analiza con el equipo *SPECTROstar Nano* (BMG LABTECH, Alemania). La temperatura de incubación de la placa es de 37°C, por ser la temperatura óptima de crecimiento de *L. casei*. Se realiza una media de Abs a 550 nm cada 30 min durante 24 h y se obtienen las curvas de crecimiento de ambas cepas basadas en la Abs de cada pocillo. La tasa de crecimiento indica el tiempo en el que la bacteria se está duplicando. La MUE o tasa de crecimiento máxima específica ha sido calculada con el modelo *Growth rate Gompertz* utilizando el programa *GraphPad Prism*.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| A | | | | | | | | |
| B | | GlcNAc | GlcNAc | GlcNAc | GlcNAc | GlcNAc | GlcNAc | |
| C | | ChbNAc | ChbNAc | ChbNAc | ChbNAc | ChbNAc | ChbNAc | |
| D | | (GlcNAc) ₃ | |
| E | | Sin azúcar | |
| F | | Sin células / sin azúcar | |
| G | | | | | | | | |

Figura 7. Diseño de la placa multipocillo. Pocillos naranjas, *L. casei* BL23 WT; pocillos lilas, *L. casei* Y517; pocillos rojos, blanco (sin células y sin azúcar añadido). En ambas cepas se estudian los azúcares GlcNAc (*N*-acetilglucosamina), ChbNAc (*N,N'*-diacetilquitobiosa) y (GlcNAc)₃ (*N,N',N''*-triacetilquitotriosa), además de un control negativo (sin azúcar). Cada condición se ensaya por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA INACTIVAR EL GEN *chbR* EN *L. casei*

Como se ha dicho anteriormente, se han seguido dos estrategias para llevar a cabo este objetivo, por lo que se exponen a continuación los resultados obtenidos en cada una de ellas. En primer lugar, se muestra la construcción virtual del plásmido pRV300::*chbR* (Tabla 2), que ha sido utilizado en ambas estrategias (Figura 8).

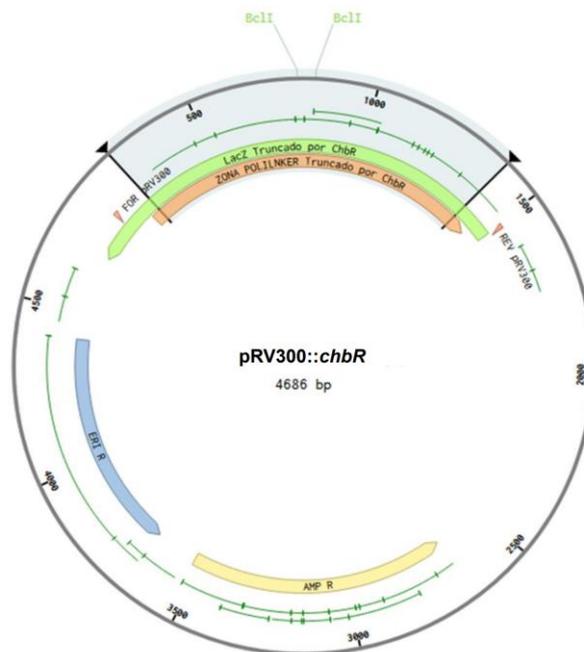


Figura 8. Construcción virtual del plásmido pRV300::*chbR* (Benchling [Biology Software] (2019)). El plásmido pRV300 tiene 3548 pb y el inserto añadido es de 1138 pb (711 pb del gen *chbR*, más las zonas flanqueantes, homólogas a las del genoma de *L. casei*), resultando el plásmido pRV300::*chbR* en 4686 pb. Previamente en el laboratorio, el plásmido pRV300 ha sido digerido con la enzima de restricción *EcoRV* con el fin de insertar el gen de interés. El gen *chbR* se inserta dentro del gen *lacZ* y en la zona del Polilinker. En color azul claro se representa el gen *chbR*; fuera de la selección azul se muestran los primers pRV300-FOR y pRV300-REV, pertenecientes al plásmido pRV300. En color verde se muestran los dos sitios de restricción de *BclI*; en color azul el gen de resistencia a eritromicina (Eri) y en color amarillo el gen de resistencia a ampicilina (Amp).

4.1.1. Primera estrategia

A continuación, se presenta la construcción virtual del plásmido pRV300::*chbR* después de haber sido digerido con *BclI* (Figura 9).

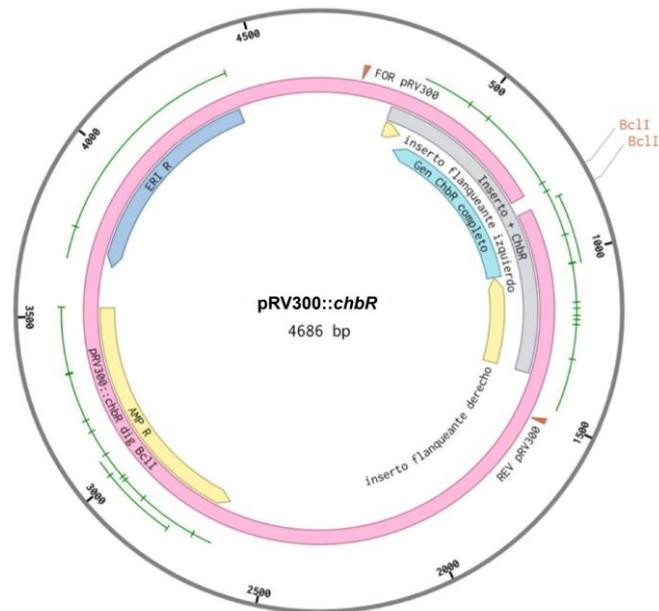


Figura 9. Construcción virtual del plásmido pRV300::chbR (Benchling [Biology Software] (2019)). En color rosa se muestra el resultado del plásmido después de la digestión con *BclI*. Se observa claramente una deleción en el gen *chbR* (blanco) con la que quedan excluidos los dos sitios de restricción de *BclI*.

Después de la transformación de *E. coli* cepa GM119, se han analizado por PCR de colonia un total de 72 colonias, algunas de las cuales se muestran en las **Figuras 10 y 11**.

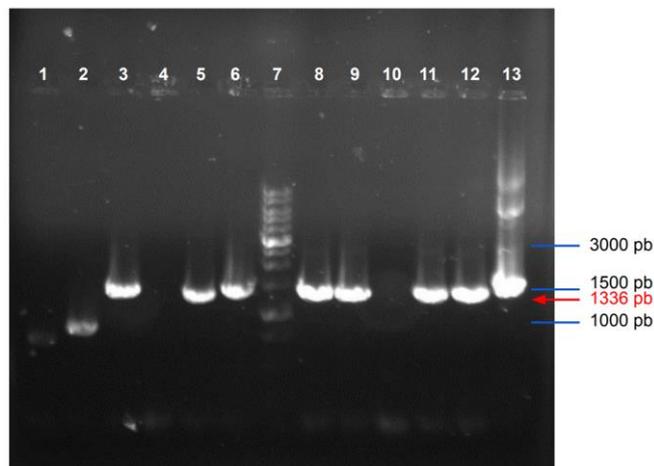


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::chbR. 1-6 y 8-12, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones; 7, marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder BLUE (SIGMA-ALDRICH, Alemania); 13, control positivo (plásmido pRV300::chbR aislado de *E. coli* cepa Y463). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular y en rojo el tamaño de banda esperado.

La banda de ADN de 1336 pb en los pocillos 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 de la **Figura 10** corresponde a la distancia entre los *primers* pRV300-FOR y pRV300-REV, incluyendo el inserto *chbR* con la deleción de 48 pb, y las zonas flanqueantes.

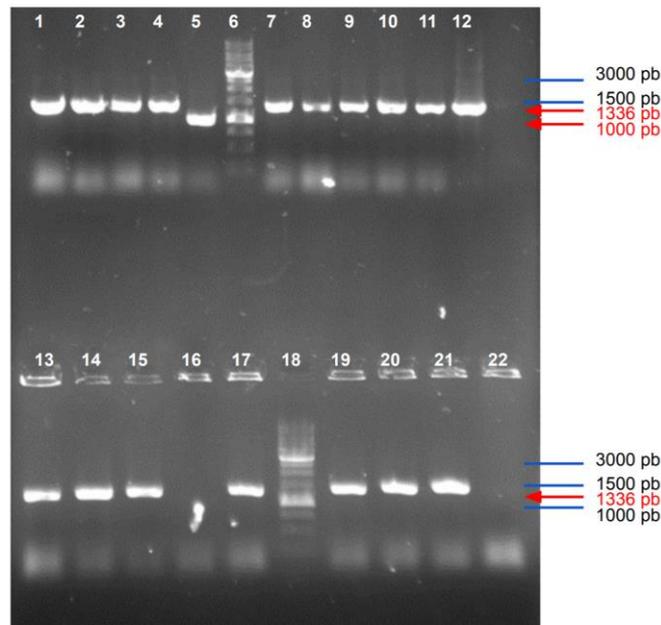


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*. 1-5, 7-11, 13-17 y 19-22, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones; 6 y 18, marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder BLUE (SIGMA-ALDRICH); 12, control positivo (plásmido pRV300::*chbR* aislado de *E. coli* cepa Y463). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular y en rojo los tamaños de banda obtenidos.

En los pocillos 1-4, 7-15, 17 y 19-21 de la **Figura 11** se observa una banda de ADN de 1336 pb, mientras que el pocillo 5 presenta una banda de 1000 pb. Este resultado se discutirá posteriormente en la **Figura 14**. De las 72 colonias analizadas por PCR de colonia, 56 han dado amplificado, es decir, presentan banda de ADN en la electroforesis y, por tanto, son sometidas a una reacción de digestión con *BclI* con el fin de verificar si mantienen los sitios de reconocimiento de *BclI* o si, como se espera, los han perdido (**Figura 12**). En las **Figuras 13 y 14** se muestra el resultado de algunas de las colonias analizadas.

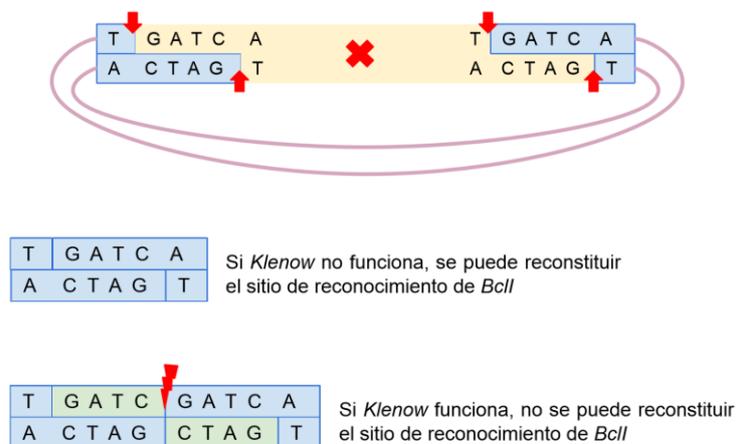


Figura 12. Representación de cómo actúa *Klenow* después de la digestión del plásmido pRV300::*chbR* con *BclI*. La delección de 48 pb después de haber digerido con *BclI* se muestra en color amarillo. Después de la digestión, quedan extremos compatibles entre sí que podrían unirse y reconstituir el sitio de

reconocimiento de *BclI*. *Klenow* es una polimerasa que añade 4 nucleótidos a la hebra de ADN, complementarios a los de la otra hebra, cambiando así la pauta de lectura del gen (al ser 4 un número no múltiplo de 3). Si *Klenow* no funciona, no añade los nucleótidos y puede reconstituirse el sitio de reconocimiento de *BclI*. Por el contrario, si *Klenow* resulta eficaz, no puede reconstituirse dicho sitio de reconocimiento pues le faltan 2 pb (A y T, entre la C y la G (señalado en rojo)).

En este experimento se utiliza la *Klenow* porque, si no, se obtendría una deleción de 48 pb en el gen *chbR* después de digerir con *BclI* pero no se rompería la pauta de lectura, pues 48 es múltiplo de 3, y no podría asegurarse que el gen *chbR* fuera inactivo. Después de la reacción de comprobación de la digestión con *BclI*, una muestra sin digerir da una banda de ADN de 1336 pb, equivalente al fragmento amplificado por PCR de colonia anterior, mientras que una muestra digerida dará dos fragmentos de 670 pb ($1336 \text{ pb}/2$) que, al ser del mismo tamaño, migrarán juntos en el gel y se verá una sola banda.

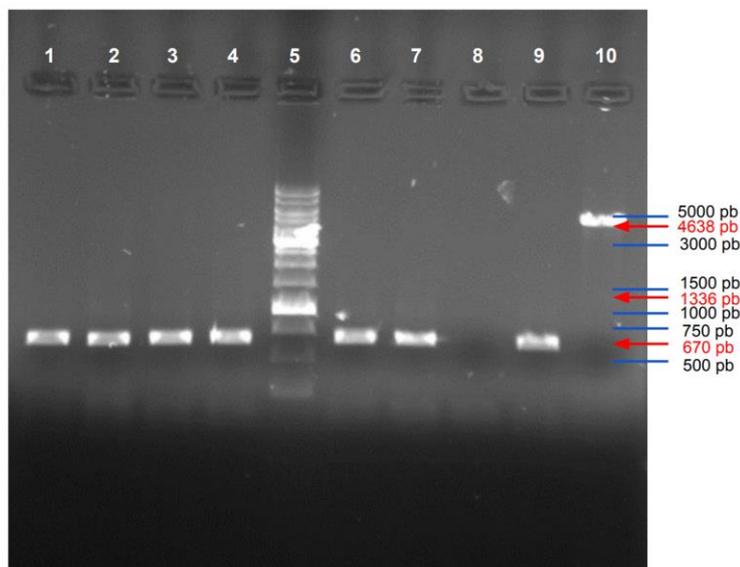


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión con *BclI* de las reacciones de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa GM119 conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*. 1-4, 6, 7 y 9, productos de la reacción de digestión; 5, marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder BLUE (SIGMA-ALDRICH); 10, control positivo (plásmido pRV300::*chbR* aislado de *E. coli* cepa Y463). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular mientras que en rojo se observan los tamaños de banda esperados y obtenidos.

En los pocillos 1-4, 6, 7 y 9 de la **Figura 13** se observa una banda de 670 pb, indicando que *BclI* ha digerido. El pocillo 10 presenta una banda de 4638 pb, señalando que *BclI* ha digerido y ha convertido el plásmido de circular a lineal, perdiéndose 48 pb, correspondientes a las presentes entre los dos sitios de restricción de *BclI*.

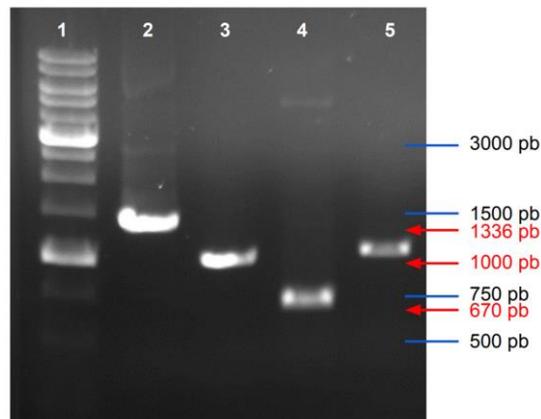


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para comprobar la digestión con *BclI* del ADN amplificado de la colonia equivalente al pocillo 5 de la **Figura 11** (denominada a continuación colonia 5). 1, marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder BLUE (SIGMA-ALDRICH); 2, producto de PCR de colonia de un control positivo (plásmido pRV300::*chbR* aislado de *E. coli* cepa Y463); 3, amplificado por PCR de colonia de la colonia 5; 4, digestión con *BclI* del control positivo; 5, digestión con *BclI* de la colonia 5. En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular mientras que en rojo se observan los tamaños de banda obtenidos.

La **Figura 14** indica que *BclI* ha digerido el control positivo ya que la banda de ADN pasa de tener 1336 pb a tener 670 pb. Sin embargo, no ha digerido la colonia 5 puesto que la banda de ADN se mantiene en 1000 pb, señalando que este clon puede ser positivo, al no presentar los sitios de restricción de *BclI*. De las 56 colonias sometidas a la reacción de digestión con *BclI*, solo una (colonia 5 (**Figura 14**)) no ha sido digerida por *BclI*. Sin embargo, el resultado de la secuenciación muestra que presenta una delección de 376 pb, en lugar de lo esperado, 48 pb, por lo que se descarta este plásmido para llevar a cabo la integración en el gen *chbR* del cromosoma de *L. casei*.

4.1.2. Segunda estrategia

Dado que no se obtuvo ninguna colonia positiva con la delección ni cambio en la pauta de lectura deseado, se aplicó una segunda estrategia. Se muestra, a continuación, la construcción virtual del plásmido pRV300:: Δ *chbR* (**Tabla 2**) después de haber realizado la PCR con los nuevos *primers* diseñados (*chbR*vuelta-FORT-ins y *chbR*vuelta-REV) (**Figura 15**).

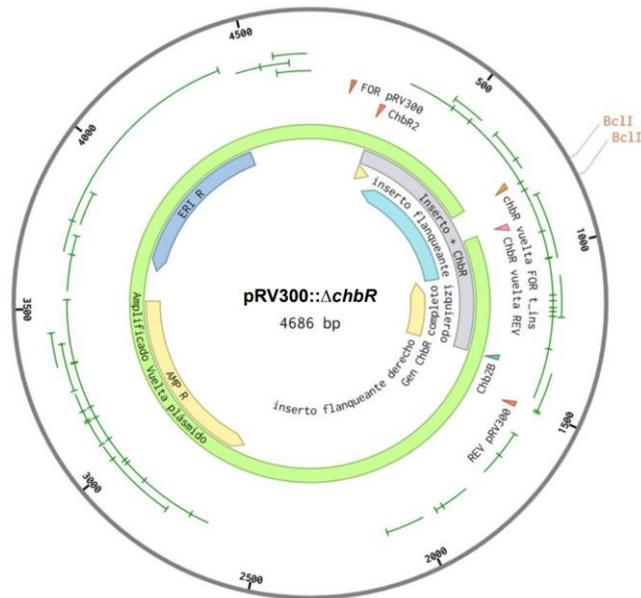


Figura 15. Construcción virtual del plásmido pRV300:: Δ chbR (Benchling [Biology Software] (2019)). Se observa en color verde el fragmento de ADN amplificado resultado de la PCR. Se obtiene una deleción en el gen *chbR* (blanco) en la que quedan excluidos los dos sitios de restricción de *BclI*. Se muestran los *primers* utilizados en esta PCR, chbRvuelta-FORt-ins y chbRvuelta-REV, además de los utilizados en la PCR de colonia de *L. casei*, chb2B-FOR y chb2B-REV, en los extremos del inserto + *chbR*.

Después de la transformación en *E. coli* cepa DH10B, se han analizado por PCR de colonia un total de 10 colonias, algunas de las cuales se muestran en la **Figura 16**.

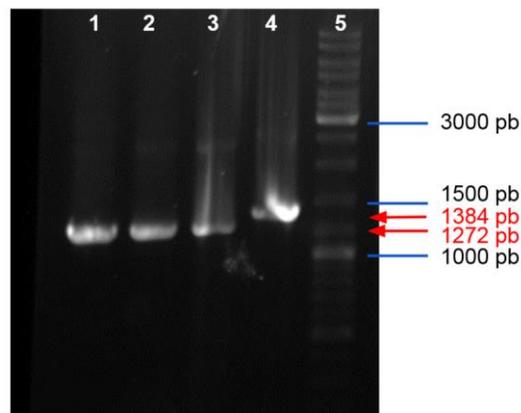


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa DH10B conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*. 1-3, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones; 4, control positivo (plásmido pRV300::*chbR* aislado de *E. coli* cepa Y463); 5, marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific, Estados Unidos). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular y en rojo los tamaños de banda obtenidos.

Los pocillos 1-3 de la **Figura 16** presentan una banda de ADN de 1272 pb, correspondiente a la distancia entre los *primers* pRV300-FOR y pRV300-REV, incluyendo el inserto *chbR* con la deleción de 112 pb, y las zonas flanqueantes, mientras que el pocillo 4 presenta una banda de 1384 pb. Esta diferencia de tamaño sugiere que las colonias correspondientes a los tres

primeros pocillos pueden ser positivas ya que han perdido 112 pb, que era lo esperado al hacer la PCR con los *primers* chbRvuelta-FORt-ins y chbRvuelta-REV. De las 10 colonias analizadas por PCR de colonia, se ha hecho la comprobación de la digestión con *BclI* de 3 colonias (**Figura 17**), correspondientes a los pocillos 1-3 de la **Figura 16**. Si la PCR utilizando el plásmido pRV300::*chbR* como molde y los *primers* chbRvuelta-FORt-ins y chbRvuelta-REV ha funcionado correctamente, el fragmento de ADN amplificado no debería tener los sitios de restricción de *BclI*.

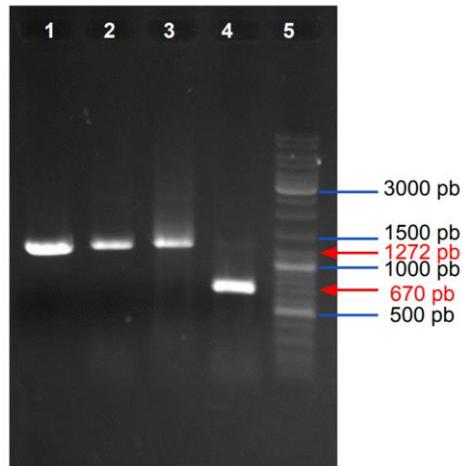


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión con *BclI* de las reacciones de PCR de colonia de los transformantes de *E. coli* cepa DH10B conteniendo el plásmido pRV300::*chbR*. 1-3, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones; 4, control positivo (plásmido pRV300::*chbR* aislado de *E. coli* cepa Y463); 5, marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular mientras que en rojo se observan los tamaños de banda esperados.

En los pocillos 1-3 de la **Figura 17** se observa una banda de ADN de 1272 pb, tamaño equivalente al producto de PCR de colonia anterior, lo cual indica que el ADN plasmídico no ha sido digerido por *BclI*, mientras que el control positivo presenta una banda de 670 pb. Esta diferencia de tamaño indica, claramente, que el control ha sido digerido por *BclI*, mientras que las reacciones de los pocillos 1-3 no. De estas 3 colonias positivas se eligió una, equivalente al pocillo 1 de la **Figura 17** (denominada colonia 1) para secuenciar. El resultado de la secuenciación muestra que, efectivamente, se ha roto la pauta de lectura en el gen *chbR*, llevando, por tanto, la mutación esperada (**Figura 18**). Esta colonia mutante se ha seleccionado y ha pasado a denominarse *E. coli* Y498 (**Tabla 2**).



Figura 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína original ChbR con la proteína ChbR mutada. La secuencia aminoacídica de arriba se corresponde con la proteína ChbR mutada mientras que la de abajo se refiere a la proteína ChbR original. Las barras azules verticales indican que ambas secuencias coinciden, mientras que la ausencia de barras significa que las secuencias dejan de coincidir. La proteína original tiene 236 aminoácidos mientras que la proteína mutada tiene 52.

4.2. OBTENCIÓN DE UNA CEPA MUTANTE DE *L. casei* DEFICIENTE EN *chbR*

Una vez construido en *E. coli* el vector con una copia mutada del gen *chbR*, se lleva a cabo la obtención de una cepa mutante de *L. casei* deficiente en *chbR*. Tras la transformación de *L. casei* cepa BL23 con el vector no replicativo pRV300:: Δ *chbR* (Tabla 2), tiene lugar una primera recombinación en la que este vector se integra en el cromosoma de *L. casei* (Figura 19).

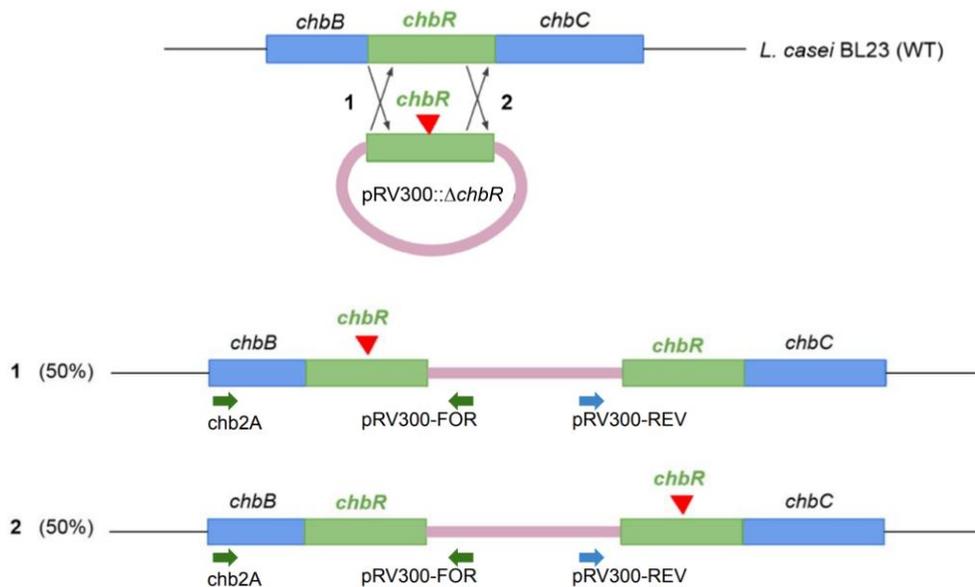


Figura 19. Representación esquemática de la integración del vector pRV300:: Δ *chbR* en el cromosoma de *L. casei* BL23. Después de la transformación de *L. casei* BL23 (WT), la bacteria tiene una copia del plásmido pRV300:: Δ *chbR* que, por recombinación, integrará en su genoma. Dicha recombinación puede darse antes de la mutación en *chbR* (opción 1) o después (opción 2). Se indica con flechas la orientación de los primers *chb2A*, pRV300-FOR y pRV300-REV.

Se han analizado por PCR de colonia un total de 5 transformantes de *L. casei* (Figura 20). En todos ellos se ha integrado el plásmido ya que presentan resistencia a eritromicina pero, para descartar que no se ha dado una integración en otro gen distinto al de interés, se utiliza el primer *chbA2* en las reacciones de PCR de colonia, debido a que hibrida en el gen contiguo al gen *chbR*, y el primer pRV300-FOR/REV (cada uno en una de las dos reacciones para la misma colonia) que forma parte del propio plásmido, con el fin de verificar la correcta integración del plásmido pRV300:: Δ *chbR* en el operón *chb*.

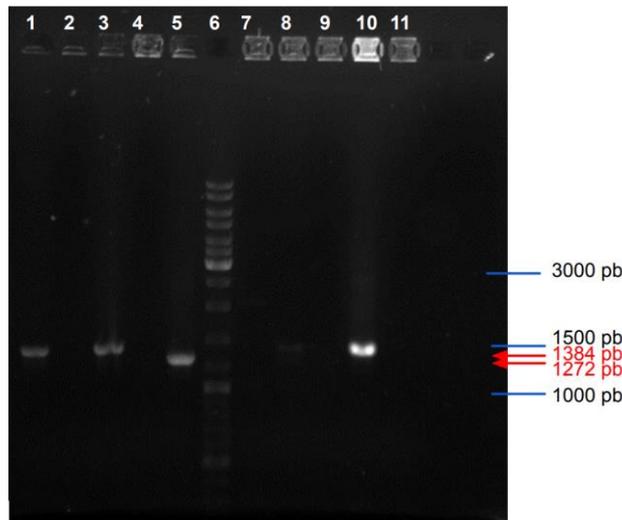


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR de colonia de los transformantes de *L. casei* cepa BL23 conteniendo el plásmido pRV300:: Δ chbR. 1, 3, 5, 8 y 10, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones utilizando los *primers* chb2A y pRV300-FOR; 2, 4, 7, 9 y 11, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones utilizando los *primers* chb2A y pRV300-REV; 6, marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular, mientras que en rojo se señalan los tamaños de banda obtenidos.

En la **Figura 20** se observa una banda de ADN de 1272 pb o 1384 pb en todas las reacciones en las que se han utilizado los *primers* pRV300-FOR y chb2A. Los pocillos 1, 3, 5, 8 y 10 indican que las colonias correspondientes son positivas de integración del plásmido pRV300:: Δ chbR en el operón *chb* de *L. casei*. De estas colonias positivas, se eligió una (la colonia equivalente al pocillo 5 de la **Figura 20**) y se denominó *L. casei* Y499 (**Tabla 2**). *L. casei* Y499 se creció durante aproximadamente 200 generaciones con la finalidad de que se diera una segunda recombinación (**Figura 21**).

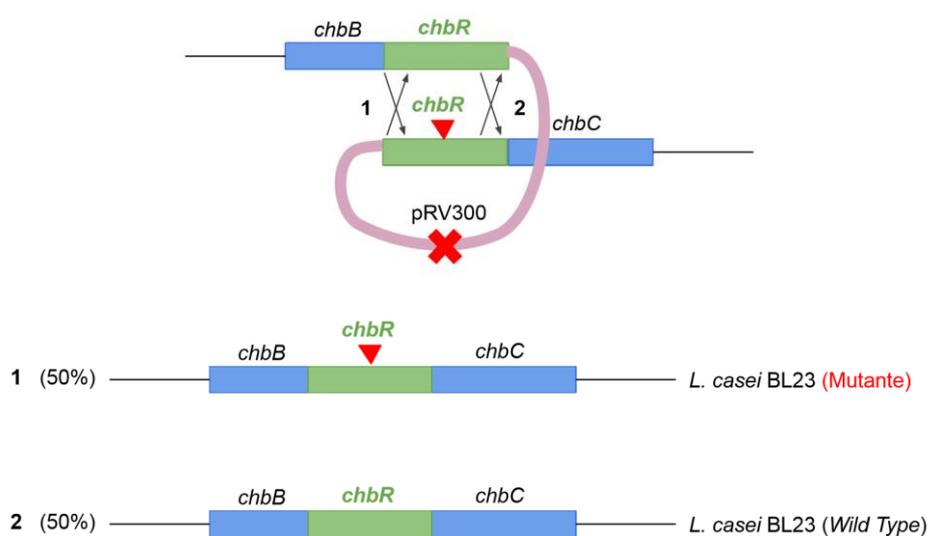


Figura 21. Representación esquemática de la segunda recombinación. *L. casei* se cultiva sin eritromicina y, tras muchas divisiones, es capaz de perder el plásmido (indicado en el esquema con una cruz roja) y

quedarse solo con una copia del gen *chbR* integrado en su genoma. La recombinación puede darse por la opción 1 o por la 2. Por tanto, una parte de las colonias obtenidas tendrán la copia del gen *chbR* mutado y otra parte revertirán a su fenotipo silvestre y tendrán la copia del gen *chbR* original.

Se escogen un total de 23 colonias presentes en las placas de MRS sin Eri⁵ y ausentes en las placas MRS con Eri⁵ (han perdido el plásmido y con ello el gen de resistencia a eritromicina) para ser analizadas por PCR de colonia, algunas de las cuales se muestran en la **Figura 22**.

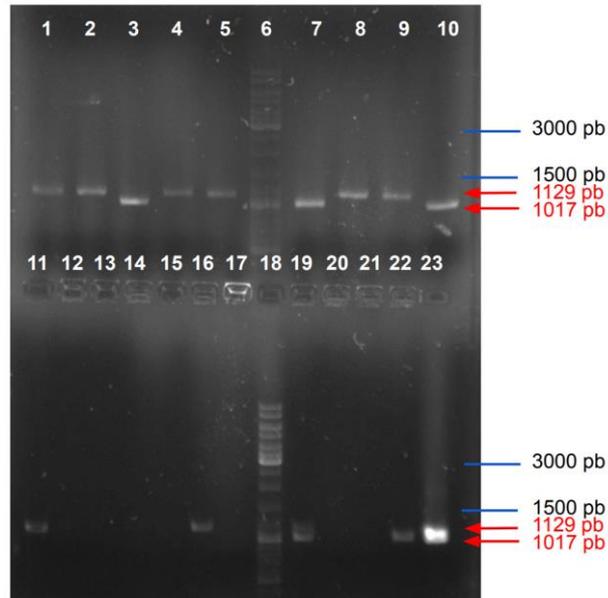


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de las colonias de *L. casei* Y499 que han sufrido la segunda recombinación. 2-5, 7-10, 12-17 y 19-22, ADN amplificado por PCR de colonia para dichas reacciones; 1 y 11, control *L. casei* BL23; 23, control *E. coli* Y498; 6 y 18, marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*). En azul se indican algunas bandas del marcador de peso molecular mientras que en rojo se señalan los tamaños de banda obtenidos.

En la electroforesis de la **Figura 22** se pretende diferenciar las colonias de *L. casei* *Wild Type* de las colonias de *L. casei* mutante, una vez dada la segunda recombinación. Los pocillos 1 y 11 presentan una banda de ADN de 1129 pb, correspondiente a la distancia entre los *primers* *chb2B-FOR* y *chbR2-REV* en el gen *chbR* original, mientras que en el pocillo 23 se observa una banda de ADN de 1017 pb, equivalente a la distancia entre los *primers* *chb2B-FOR* y *chbR2-REV* en el gen *chbR* mutado. Los pocillos 3, 7, 10 y 22 presentan una banda de 1017 pb, al igual que el control de *E. coli* Y498, lo cual sugiere que estas colonias de *L. casei* son mutantes. De estas colonias positivas, se eligió una (la colonia equivalente al pocillo 7 de la **Figura 22**) para secuenciarla. El resultado de la secuenciación muestra que se ha roto la pauta de lectura en el gen *chbR* y esta colonia pasa a denominarse *L. casei* Y517 (**Tabla 2**).

4.3. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LA CEPA MUTANTE DE *L. casei* EN RELACIÓN A SU CAPACIDAD DE METABOLIZAR ChbNAc Y (GlcNAc)₃

Con el objetivo de analizar la utilización de ChbNAc y (GlcNAc)₃ por las cepas de *L. casei* BL23 WT y *L. casei* BL23 mutante (Y517), éstas se cultivaron en presencia de estos carbohidratos en placas multipocillo durante 24 h tal como se describe en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. Las curvas de crecimiento en presencia de GlcNAc (utilizada como cultivo control), ChbNAc y (GlcNAc)₃ pueden observarse en las Figuras 23, 24 y 25, respectivamente.

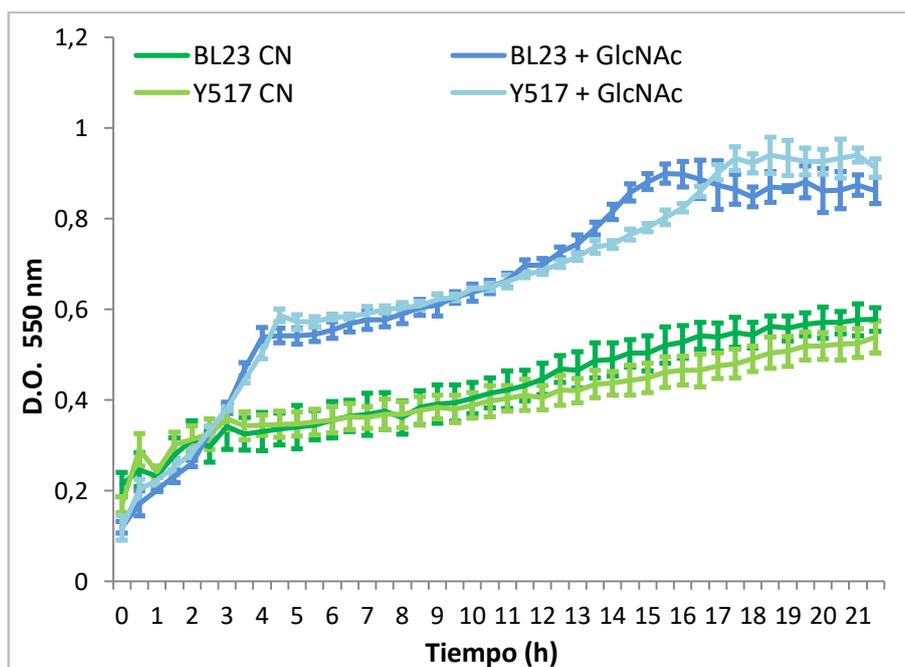


Figura 23. Curvas de crecimiento de *L. casei* BL23 WT en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con GlcNAc (color azul oscuro) y *L. casei* Y517 en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde claro) y con GlcNAc (color azul claro). CN, control negativo; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

El valor de la MUE o tasa de crecimiento máxima específica para *L. casei* BL23 WT control negativo es de 0.01977 y para *L. casei* Y517 control negativo es de 0.01287. Ambos valores son similares pues se trata de un control negativo y, por tanto, el crecimiento de la bacteria no se ve influenciado por ningún azúcar en concreto. Por otro lado, la MUE para *L. casei* BL23 WT + GlcNAc es de 0.09083, mientras que para *L. casei* Y517 + GlcNAc es de 0.1279. Ambas tasas de crecimiento son similares, lo cual sugiere que el gen *chbR* no está implicado en el transporte y posterior metabolismo de la GlcNAc.

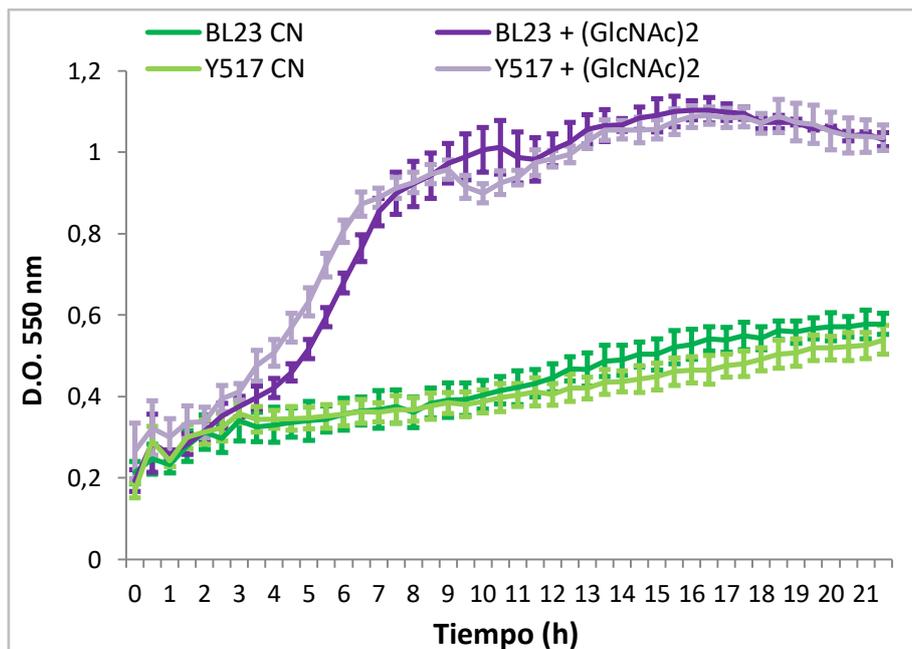


Figura 24. Curvas de crecimiento de *L. casei* BL23 WT en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con (GlcNAc)₂ (color lila oscuro) y *L. casei* Y517 en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde claro) y con (GlcNAc)₂ (color lila claro). CN, control negativo; (GlcNAc)₂, *N,N'*-diacetilquitobiosa. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

La MUE para *L. casei* BL23 WT + (GlcNAc)₂ es de 0.1129, mientras que para *L. casei* Y517 + (GlcNAc)₂ es de 0.09852. Si bien en la gráfica se observa que la fase exponencial de *L. casei* Y517 alcanza un valor mayor de D.O. que la cepa de *L. casei* BL23 WT para un mismo tiempo, esto no se refleja en la tasa de crecimiento. De todas formas, el hecho de que *L. casei* Y517 crezca en presencia de este disacárido ya sugiere que el gen *chbR* codifica para una proteína represora. La ausencia de este represor en la cepa *L. casei* Y517 deficiente en el gen *chbR* permite que el resto de los genes del operón *chb* se expresen de forma constitutiva.

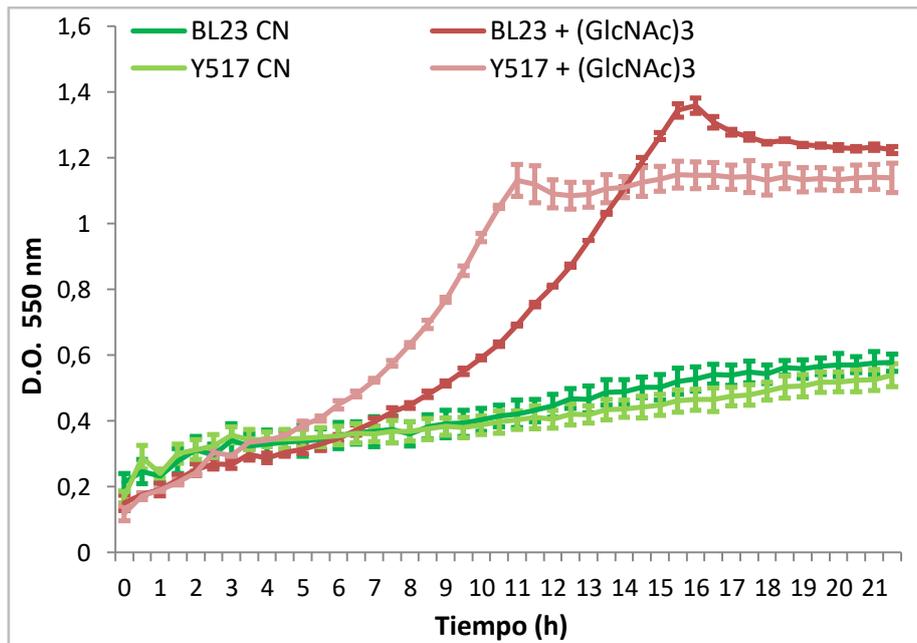


Figura 25. Curvas de crecimiento de *L. casei* BL23 WT en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde oscuro), con (GlcNAc)₃ (color rojo oscuro) y *L. casei* Y517 en medio MRS_f sin azúcar añadido (color verde claro) y con (GlcNAc)₃ (color rojo claro). CN, control negativo; (GlcNAc)₃, *N,N',N''*-diacetilquitotriosa. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

La MUE para *L. casei* BL23 WT + (GlcNAc)₃ es de 0.07855, mientras que para *L. casei* Y517 + (GlcNAc)₃ es de 0.1. En la gráfica se aprecia claramente que la fase exponencial de *L. casei* Y517 alcanza valores más altos de D.O. para un mismo tiempo que la cepa de *L. casei* BL23 WT. El hecho de que *L. casei* Y517 crezca en presencia de este trisacárido y que, además, presente una tasa de crecimiento mayor se correlaciona con el hecho de que *L. casei* Y517 (deficiente en *chbR*) tiene los genes del operón *chb* activados de manera constitutiva y, por ello, es capaz de utilizar la *N,N',N''*-triacetilquitotriosa más eficazmente que la cepa *L. casei* BL23 WT, si bien es cierto que al final de la fase estacionaria ambas curvas llegan a un valor muy similar de D.O.. El resultado descrito apoya el hecho de que el gen *chbR* codifica para una proteína represora.

Hasta el momento, el metabolismo de la ChbNAc únicamente había sido estudiado en *E. coli*. Resultados de trabajos previos demuestran que *E. coli* es capaz de crecer en presencia de ChbNAc como única fuente de carbono y que el operón *chb* está implicado en el metabolismo de este disacárido (Keyhani et al., 1997; Plumbridge et al., 2004). Por otra parte, trabajo previo realizado en el laboratorio donde se ha llevado a cabo este TFG ha demostrado que *L. casei* BL23 puede cultivarse en presencia de ChbNAc y (GlcNAc)₃ como únicas fuentes de carbono en el medio de cultivo y que el operón *chb* está implicado en el metabolismo de estos carbohidratos. Además, cabe destacar que en *L. casei* es conocido el metabolismo de otros glicanos, tales como galacto-*N*-biosa (GNB) y lacto-*N*-biosa (LNB) (Bidart et al., 2014; Bidart et al., 2017); lacto-*N*-triosa (Bidart et al., 2016); *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) (Bidart et al., 2018) y fucosil-oligosacáridos (Becerra et al., 2015).

En el presente TFG, los resultados sugieren que el gen *chbR*, considerado anteriormente como un hipotético regulador transcripcional del operón de la *N,N'*-diacetilquitobiosa (*chb*) presente en *Lactobacillus casei* cepa BL23, probablemente codifica para una proteína represora. Esto es una hipótesis respaldada por los resultados obtenidos. Ahora bien, para terminar de confirmarlo, sería necesario un siguiente paso en el proyecto: realizar aislamiento de ARN y análisis de la transcripción del ARNm mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa con transcriptasa reversa) con el fin de analizar la expresión de todos los genes del operón *chb* en la cepa mutante de *L. casei* en presencia de los azúcares ChbNAc y (GlcNAc)₃.

CONCLUSIONES

- 1) Se ha construido en *Escherichia coli* el vector pRV300:: Δ *chbR*, conteniendo una copia mutada del gen *chbR*, que codifica para un putativo regulador transcripcional del operón *chb* de *Lactobacillus casei*.
- 2) Se ha obtenido una cepa mutante (Y517) derivada de *Lactobacillus casei* BL23 deficiente en el gen *chbR* del operón *chb*.
- 3) La cepa mutante de *L. casei* (Y517) puede cultivarse en un medio con *N,N'*-diacetilquitobiosa (ChbNAc) como única fuente de carbono, sugiriendo que el gen *chbR* codifica para un represor transcripcional.
- 4) La cepa mutante de *L. casei* (Y517) puede cultivarse en un medio con *N,N',N''*-triacetilquitotriosa (GlcNAc)₃ como única fuente de carbono, sugiriendo que el gen *chbR* codifica para un represor transcripcional.

BIBLIOGRAFÍA

- BECERRA, J. E., COLL-MARQUÉS, J. M., RODRÍGUEZ-DÍAZ, J., MONEDERO, V. and YEBRA, M. J. (2015). Preparative scale purification of fucosyl-*N*-acetylglucosamine disaccharides and their evaluation as potential prebiotics and antiadhesins. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7165–7176. doi: 10.1007/s00253-015-6666-2
- BIDART, G. N. (2016). Metabolismo y síntesis de oligosacáridos de la leche humana mediante la utilización de enzimas glicosil hidrolasas de *Lactobacillus casei*. Tesis Doctoral. doi: 10.4995/Thesis/10251/70898
- BIDART, G. N., RODRIGUEZ-DIAZ, J., MONEDERO, V. and YEBRA, M. J. (2014). A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk associated glycans galacto-*N*-biose and lacto-*N*-biose in *Lactobacillus casei*. *Mol. Microbiol.* 93, 521-538. doi: 10.1111/mmi.12678
- BIDART, G. N., RODRIGUEZ-DIAZ, J., PALOMINO-SCHÄTZLEIN, M., MONEDERO, V. and YEBRA, M. J. (2017). Human milk and mucosal lacto- and galacto-*N*-biose synthesis by transgalactosylation and their prebiotic potential in *Lactobacillus* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:205–215. doi: 10.1007/s00253-016-7882-0
- BIDART, G. N., RODRIGUEZ-DIAZ, J., PÉREZ-MARTÍNEZ, G. and YEBRA, M. J. (2018). The lactose operon from *Lactobacillus casei* is involved in the transport and metabolism of the human milk oligosaccharide core-2 *N*-acetylglucosamine. *Sci. Rep.* 8:7152. doi: 10.1038/s41598-018-25660-w
- BIDART, G. N., RODRIGUEZ-DIAZ, J. and YEBRA, M. J. (2016). The extracellular wall-bound β -*N*-acetylglucosaminidase from *Lactobacillus casei* is involved in the metabolism of the human milk oligosaccharide lacto-*N*-Triose. *Appl Environ Microbiol* 82:570–577. doi: 10.1128/AEM.02888-15
- BLANDER, J. M., LONGMAN, R. S., ILIEV, I. D., SONNENBERG, G. F. and ARTIS, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat. Immunol.* 18,851–860. doi: 10.1038/ni.3780
- BODE, L. (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22:1147–1162. doi: 10.1093/glycob /cws074
- CHATURVEDI, P., WARREN, C. D., BUESCHER, C. R., PICKERING, L. K. and NEWBURG, D. S. (2001). Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv Exp Med Biol* 501, 315–323. doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1_39
- COLLADO, M. C., CALABUIG, M. and SANZ, Y. (2007). Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr. Issues In test. Microbiol.* 8,9–14.
- DALLAS, D. C., SELA, D., UNDERWOOD, M. A., GERMAN, J. B. and LEBRILLA, C. B. (2012). Protein-linked glycan degradation in infants fed human milk. *J Glycomics Lipidomics* S1, 002. doi: 10.4172/2153-0637.S1-002

- DAVIDSON, L. A. and LONNERDAL, B. (1987). Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta paediatrica Scandinavica* 76, 733-740.
- ENGFER, M. B., STAHL, B., FINKE, B., SAWATZKI, G. and DANIEL, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 71, 1589–1596. doi: 10.1093/ajcn/71.6.1589
- FIGUEROA-LOZANO, S. and DE VOS, P. (2018). Relationship between oligosaccharides and glycoconjugates content in human milk and the development of the gut barrier. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 18, 2019. doi: 10.1111/1541-4337.12400
- GARRIDO, D., DALLAS, D. C. and MILLS, D. A. (2013). Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology*, 159, 649–664. doi: 10.1099/mic.0.064113-0
- GIBSON, G. R. and ROBERFROID, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125(6):1401-12. Review.
- GNOTH, M. J., KUNZ, C., KINNE-SAFFRAN, E. and RUDLOFF, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr* 130, 3014–3020. doi: 10.1093/jn/130.12.3014
- HAVERSEN, L., OHLSSON, B. G., HAHN-ZORIC, M., HANSON, L. A. and MATTSBY-BALTZER, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. *Cell Immunol* 220, 83–95.
- HUNT, K. M., FOSTER, J. A., FORNEY, L. J., SCHUTTE, U. M. E., BECK, D. L., ABDO, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *Plos One*, 6(6), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0021313
- JOLLÈS, P. and JOLLÈS, J. (1961). Lysozyme from human milk. *Nature* 192, 1187–1188.
- KEYHANI, N. O. and ROSEMAN, S. (1997). Proc Natl Acad Sci U S A. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the *cel* operon. Vol. 94, pp. 14367–14371. doi: 10.1073/pnas.94.26.14367
- KUNZ, C., RUDLOFF, S., BARRIER, W., KLEIN, N. and STROBEL, S. (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20,699–722. doi: 10.1146/annurev.nutr.20.1.699
- LAUCIRICA, D. R., TRIANTIS, V., SCHOEMAKER, R., ESTES, M.K. and RAMANI, S. (2017). Milk oligosaccharides inhibit human rotavirus infectivity in MA104 cells. *J Nutr.* 147:1709–14. doi: 10.3945/jn.116.246090
- LIN, A. E., AUTRAN, C. A., ESPANOLA, S. D., BODE, L., and NIZET, V. (2014). Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion and cytotoxicity. *J Infect Dis.* 209:389–98. doi: 10.1093/infdis/jit464

- LÖNNERDAL, B. (2009). Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 293–297. doi: 10.1097/MCO.0b013e328328d13e
- MAZE, A., BOEL, G., ZÚÑIGA, M., BOURAND, A., LOUX, V., YEBRA, M. J., et al. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192: 2647–2648. doi: 10.1128/JB.00076-10
- MEMBREZ, M., BLANCHER, F., JAQUET, M., BIBILONI, R., CANI, P. D., BURCELIN, R. G., et al. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEBJ.* 22,2416–2426. doi: 10.1096/fj.07-102723
- NEWBURG, D. S., KO, J. S., LEONE, S. and NANTHAKUMAR, N. N. (2016). Human milk oligosaccharides and synthetic galactosyloligosaccharides contain 3′-, 4-, and 6′-galactosyllactose and attenuate inflammation in human T84, NCM-460, and H4 cells and intestinal tissue ex vivo. *J Nutr.* 146:358–67. doi: 10.3945/jn.115.220749
- NEWBURG, D. S., RUIZ-PALACIOS, G. M. and MORROW, A. L. (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* 25, 37–58. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553
- PLUMBRIDGE, J. and PELLEGRINI, O. (2004). Expression of the chitobiose operon of *Escherichia coli* is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP. *Molecular Microbiology.* Vol. 52, 437-449. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.03986.x
- PRENTICE, A., MACCARTHY, A., STIRLING, D. M., VASQUEZ-VELASQUEZ, L. and CEESAY, S. M. (1989). Breast-milk IgA and lactoferrin survival in the gastrointestinal tract--a study in rural Gambian children. *Acta paediatrica Scandinavica* 78, 505-512.
- RUDLOFF, S. and KUNZ, C. (2012). Milk oligosaccharides and metabolism in infants. *Adv Nutr* 3, 398S–405S. doi: 10.3945/an.111.001594
- SONNENBURG, J. L. and BACKHED, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535, 56–64. doi: 10.1038/nature18846
- THURL, S., MUNZERT, M., HENKER, J., BOEHM, G., MULLER-WERNER, B., JELINEK, J., et al. (2010). Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Nat. Commun.* 104, 1261–1271. doi: 10.1017/S0007114510002072
- VAARALA, O., ATKINSON, M. A. and NEU, J. (2008). The “perfect storm” for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes Metab.Res.Rev.* 57,2555–2562. doi: 10.2337/db08-0331
- VAN BERKEL, P. H., GEERTS, M. E., VAN VEEN, H. A., KOOIMAN, P. M., PIEPER, F. R., DE BOER, H. A. and NUIJENS, J. H. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1), 107-114. doi: 10.1042/bj3120107

WU, S., GRIMM, R., GERMAN, J. B. and LEBRILLA, C. B. (2011). Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J Proteome Res* 10, 856–868. doi: 10.1021/pr101006u

WU, S., TAO, N., GERMAN, J. B., GRIMM, R. and LEBRILLA, C. B. (2010). Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J Proteome Res* 9, 4138–4151. doi: 10.1021/pr100362f

XANTHOU, M., BINES, J. and WALKER, W. A. (1995). Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. *Adv Pediatr* 42, 171– 208.

ZÚÑIGA, M., MONEDERO, V. and YEBRA, M. J. (2018). Utilization of Host-Derived Glycans by Intestinal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species. *Front. Microbiol.* 9:1917. doi: 10.3389/fmicb.2018.01917

Páginas web de consulta:

NCBI. *Lactobacillus casei* complete genome, strain BL23. GenBank Accession No. FM177140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FM177140.1?report=fasta&from=2858524&to=29325>
18. Última fecha de consulta: 10/06/2019.