

OBTENCIÓN RECOMBINANTE DE ENTEROCINA P CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA HACIA *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE MASTITIS BOVINA

Slaboch María

E.E.A Rafaela INTA y Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología Aplicadas FBCB/UNL
Directora: Camussone Cecilia
Codirectora: Diez Cristina

ÁREA: CIENCIAS BIOLÓGICAS

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria que a menudo resulta de infecciones bacterianas. Es una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas ocasiona, ya que impacta en la cantidad y calidad de la leche producida, constituyendo un importante problema sanitario en la ganadería lechera y en la industria láctea mundial (Le Marechal *et al.*, 2011). *S. aureus* es el agente etiológico de mastitis más prevalente tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero pudiendo ser un contaminante tanto de la leche como de sus derivados (Calvinho & Tirante, 2005; Zecconi *et al.*, 2006). Los programas actuales de control de mastitis están basados principalmente en la higiene durante el ordeño y la terapia antibiótica (Booth, 1975). Sin embargo, las particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao & Lacasse, 2008).

En el mercado actual existe una gran diversidad de formulaciones antibióticas para mastitis bovina, con características distintas que hacen que su penetración en las células defensivas o epiteliales de la glándula mamaria que podrían albergar a *S. aureus* sea dispar. Sin embargo, la baja eficacia de la terapia antibiótica frente a *S. aureus* ha llevado a explorar medidas de control complementarias. Uno de estos enfoques es el uso de moléculas naturales con acción antimicrobiana, como las bacteriocinas (Grazziotto N; 2016).

Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias, que matan o inhiben otros microorganismos relacionados o no. Las mismas se clasifican en 3 categorías según sus características genéticas y bioquímicas (Drider, *et al.*, 2006). Entre ellas, las bacteriocinas de clase II incluyen péptidos termoestables de bajo peso molecular (< 10 kDa) que no poseen residuos modificados (Nes *et al.*, 2007), lo cual las coloca en una posición ventajosa para su correcta expresión en organismos heterólogos, garantizando su funcionalidad. Se han descrito una serie de enterocinas producidas por diferentes especies del género *Enterococcus*. Particularmente, la Enterocina P (EntP) es una bacteriocina con un gran espectro antimicrobiano, incluyendo bacterias patogénicas Gram-positivas como *S. aureus*. Además, evidenció otras propiedades que la convierten en un prometedor conservante de alimentos,

tales como resistencia a proteasas, estabilidad térmica, actividad antimicrobiana en un amplio rango de pH y condiciones de almacenamiento (Cintas et al., 1997). Tanto el gen de la pre-enterocina, como la enterocina madura, lograron expresarse de forma recombinante en *Escherichia coli*, manteniendo su funcionalidad, *in vitro* (Gutiérrez et al., 2005).

OBJETIVOS

Obtener la bacteriocina Enterocina P madura de *Enterococcus*, mediante el clonado y la expresión heteróloga en diferentes sistemas, para posteriormente evaluar su acción frente a *S. aureus* aislados de casos de mastitis bovina en Argentina.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE ENTEROCINA P

La secuencia codificante del gen de Enterocina P (EntP) (AF005726) de *Enterococcus* se obtuvo a partir de clones obtenidos previamente en el laboratorio (Grazziotto N; 2016). Se trabajó con células de *E. coli* DH5 α transformadas con el gen de la enterocina madura (sin secuencia señal; EntP2) clonado en el vector pGEM $^{\text{®}}$ -T *Easy* (Promega) (EntP2-pGEM *TEasy*).

CLONADO DE LA SECUENCIA EntP2 EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN SELECCIONADOS.

Para la obtención recombinante de EntP2 se evaluaron diferentes sistemas. Para expresión en *E.coli* se utilizó un vector de expresión citoplásmica, pET24a, y otro de expresión en periplasma, pET22b. Se utilizó también un sistema de expresión en levaduras, *Kluyveromyces lactis*, que utiliza como vector pKlac2.

Clonado en pKlac2 y pET24a: minipreparaciones plasmídicas de ambos vectores y de la construcción EntP2-pGEM *TEasy* se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, según instrucciones del fabricante (Thermo Scientific), y se purificaron los fragmentos de interés.

Clonado en pET22b: mini preparaciones plasmídicas EntP2-pGEM *TEasy*, se utilizaron como molde en reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos que permitan el agregado de sitios reconocidos por enzimas de restricción (BamHI/XhoI). La reacción de PCR se desarrolló en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), en un volumen final de 50 μ l. Se utilizó el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 51°C y 30 segundos a 72°C; 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 30 segundos a 72°C; y una extensión final de 2 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de GelRed (Biotium, Inc) y purificados desde el gel (Wizard $^{\text{®}}$ SV Gel Clean-Up System, Promega). El fragmento obtenido y el vector de expresión pET22b se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, según instrucciones del fabricante (Thermo Scientific) y se purificaron.

Se realizaron ligaciones entre los vectores pKlac2, pET24a y pET22b, y los fragmentos correspondientes de EntP2 cortados y purificados, mediante reacción en presencia de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific), según instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α , por transformación química. Se identificaron clones

positivos mediante secuenciación automática (ABI3130xl DNA sequencer, Applied Biosystems) de preparaciones plasmídicas de clones previamente seleccionados mediante reacciones de PCR.

EXPRESIÓN DE EntP2 RECOMBINANTE EN *E. coli*

Minipreparaciones plasmídicas de las construcciones EntP2-pET22b y EntP2-pET24a se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21.DE3 por la técnica de transformación química. La expresión de las proteínas recombinantes se realizó utilizando un medio de auto-inducción. Una colonia aislada del clon de interés se utilizó para inocular 2 ml de medio mínimo M9 con 1% glucosa, suplementado con 0,1mg/ml de ampicilina o 0,05 mg/ml de kanamicina, según corresponda, y se incubó a 37°C durante 7 horas en agitación. Dicho cultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio de auto-inducción suplementado con los mismos antibióticos, y se incubó a 37°C ON en agitación. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en buffer salino, se sonicó realizando 10 pulsos de 10 segundos cada uno y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. Se recuperó la fracción soluble y se evaluó la presencia de EntP2 en la misma mediante SDS-PAGE en geles de Tris-Tricina (Schägger, 2006) y Western blot, utilizando como control negativo un extracto de células sin inducir. Dicha fracción se conservó en alícuotas a -20°C hasta su utilización.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizaron ensayos de difusión en agar (Jaouani et al., 2014). Brevemente, la cepa de *S. aureus* 29213 utilizada como indicadora se sembró en placas con medio BHI 0,8% agar. Sobre el agar se realizaron pocillos de aprox. 5 mm de diámetro, los cuales se llenaron con los sobrenadantes de la lisis celular conteniendo EntP2. Se evaluó la presencia o ausencia de zonas de inhibición luego de la incubación por 24 hs a 37°C. Se utilizó una bacteriocina comercial (Nisina A, Sigma) (5 mg/ml) como control positivo. Además, se incluyó un control negativo que consistió en un sobrenadante de lisis celular de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo pET24a o pET22b vacíos, según corresponda.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se trabajó en el clonado de los fragmentos de EntP2 obtenidos por corte o PCR en tres sistemas de expresión. Se lograron obtener clones positivos (confirmados mediante secuenciación automática) para todas las construcciones planteadas: EntP2-pKlac2, EntP2-pET22b y EntP2-pET24a.

Las construcciones EntP2-pET22b y EntP2-pET24a se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21.DE3. Cultivos de estos clones se utilizaron para la inducción de la expresión de EntP2 por el método de auto-inducción. Debido al pequeño tamaño esperado para las bacteriocinas evaluadas, lo cual puede dificultar su observación con técnicas de electroforesis, los resultados de inducción se confirmaron mediante la técnica de Western blot. Luego de dicho experimento se pudo confirmar la presencia de EntP2 en sobrenadante de lisis celular, para ambas construcciones.

Los sobrenadantes de lisis celular conteniendo EntP2 se utilizaron para la realización de pruebas de actividad antimicrobiana. Luego de la incubación por 24 hs a 37°C, el pocillo sembrado con EntP2-pET24a mostró un halo de inhibición de crecimiento de 9mm de diámetro

aproximadamente, mientras que la prueba no manifestó presencia de zonas de inhibición en el pocillo sembrado con el sobrenadante de lisis conteniendo EntP2-pET22b. No se observó inhibición de crecimiento en el pocillo con control negativo, mientras que el pocillo sembrado con Nisina A generó zonas de inhibición de 9mm de diámetro, aproximadamente.

En cuanto a la construcción pKlac2-EntP2, el trabajo plantea su clonado en células de *Kluyveromyces lactis*. Hasta el momento se estuvo trabajando en la optimización del crecimiento y transformación de dichas levaduras con construcciones control.

Los resultados preliminares presentados en este trabajo muestran la capacidad antimicrobiana de EntP2 obtenida de forma recombinante mediante clonado en pET24a y expresión heteróloga en *E. coli*. Actualmente se están evaluando otros sistemas de expresión e inducción, así como metodologías de purificación, con el objetivo de obtenerla en mayores concentraciones y con un alto grado de pureza. La actividad de EntP2, junto con otras bacteriocinas en estudio, será evaluada frente a un panel de aislados de *S. aureus* de mastitis bovina para su potencial uso como agente antimicrobiano natural, en sustitución o en forma complementaria al tratamiento antibiótico de esta afección.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. **Booth JM.**, 1975. Mastitis control in the field: some results of two large field trials. Proc. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA, 19-31.
2. **Calvinho L. y Tirante L.**, 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Rev. FAVE Sección Cs. Vet, 4, 29-40.
3. **Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl Environ Microbiol, 63, 4321-4330.
4. **Dridier D, Finland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70, 564-582.
5. **Grazziotto, N, Diez C, Camussone, C.** 2016. Obtención recombinante de antimicrobianos naturales para el tratamiento y profilaxis de mastitis bovina. 2do Encuentro de Intercambio de Experiencias Microbiológicas del Litoral. Santa Fe, Argentina.
6. **Gutiérrez J, Criado R, Citti R, Martín M, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Hernández PE.** 2005. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol, 103, 239-250.
7. **Le Marechal C, Thiery R, Vautor E, Le Loir Y.**, 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-a review. Dairy Sci Technol, 91, 247-282.
8. **Nes, Sung-Sik Yoon, Dzung B. Diep.** 2007. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. Food Sci. Biotechnol, 16, 675-690.
9. **Zecconi A, Calvinho L, Fox L.**, 2006. Staphylococcus aureus intramammary infections. Bulletin of the International Dairy Federation, 408, 1-36.
10. **Zhao X, Lacasse P.**, 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. J Anim Sci., 86, 57-65.