

OBTENCIÓN RECOMBINANTE DE ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO Y PROFILAXIS DE MASTITIS BOVINA

Autor: Grazziotto Noelia

Estudiante de Lic. Biotecnología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Pasante I+D, E.E.A. Rafaela INTA, Santa Fe, Argentina; noe15_88@hotmail.com

Área temática: Ciencias Biológicas

Sub-área: Biotecnología

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que mayores pérdidas económicas causa al productor y a la industria procesadora. *Staphylococcus aureus* es el organismo más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina (Calvinho & Tirante, 2005), como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi et al., 2006). Los programas actuales de control de mastitis están basados principalmente en la higiene durante el ordeño, la terapia antibiótica para el tratamiento de las mastitis clínicas durante la lactancia y al inicio del período seco y el descarte de animales infectados en forma crónica (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), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario. 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 mencionada 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.

Las bacteriocinas se definen generalmente como 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 (Driener, 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.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo se obtuvo la bacteriocina recombinante epidermicina NI01 de *S. epidermidis* (Grazziotto, EJI 2014). Resultados preliminares obtenidos a partir de pruebas *in vitro* mostraron una baja actividad de la misma frente a cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina en nuestro país. Sobre la base de estos resultados se buscaron otras moléculas antimicrobianas alternativas. Se han descrito una serie de enterocinas producidas por diferentes especies del género *Enterococcus*, que han mostrado ser estables en amplio rango de temperaturas y resistentes a la liofilización y almacenamiento por largos períodos de tiempo. Entre ellas, las enterocinas A y P producidas por cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* demostraron tener actividad antimicrobiana frente a aislados de *S. aureus* tanto clínicos como de alimentos (Cintas et al., 1997, Jaouani et al., 2014). Estos péptidos de aproximadamente 6 y 8,5 kDa, respectivamente, son bacteriocinas de clase II y han logrado obtenerse de forma recombinante mediante la expresión en cepas de *E. coli*, manteniendo su funcionalidad *in vitro* (Gutierrez et al., 2005; M Ingham et al., 2005; Klocke et al., 2005)

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue obtener bacteriocinas recombinantes de Enterocinas A y P mediante el clonado y la expresión heteróloga en cepas de *E. coli*, para posteriormente evaluar su acción frente a *S. aureus* aislados de casos de mastitis bovina en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la secuencia codificante de Enterocina A y Enterocina P

Las secuencias codificantes de los genes de Enterocina A (EntA) (Nº Acceso Genbank AB292463), y Enterocina P (EntP) (AF005726) de *Enterococcus* se obtuvieron mediante síntesis comercial (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA Technologies).

Para el caso de EntP, se sintetizó el gen de la pre-enterocina conteniendo el péptido señal, mientras que para EntA, se sintetizó el gen de la enterocina madura (sin secuencia líder). Estos fragmentos se utilizaron como molde en reacciones de PCR utilizando cebadores específicos que permiten el agregado de sitios reconocidos por enzimas de restricción, con objeto de facilitar su posterior clonado. Para el caso de EntP, se diseñaron *primers* específicos que permiten amplificar tanto el gen completo de la pre-enterocina (EntP1) como la enterocina madura (EntP2). La reacción de PCR se desarrolló en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), por duplicado, en un volumen final de 50µl. 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 52°C y 30 segundos a 72°C; 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C; y una extensión final de 1 minuto a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, Inc) y clonados en el vector pGEM®-T Easy (Promega). Con la ligación obtenida se transformaron células de *E. coli* DH5α electrocompetentes, según instrucciones del fabricante (Gene PulserXcell, Bio-Rad). Se identificaron los clones positivos mediante secuenciación automática (ABI3130xl DNA sequencer, Applied Biosystems) de preparaciones plasmídicas de clones seleccionados al azar.

Clonado de las secuencias de EntA y EntP1 en los vectores de expresión seleccionados

Para el clonado de las enterocinas se seleccionaron dos sistemas de expresión diferentes; uno, en donde la proteína de interés se obtiene como proteína de fusión (pET32a), y un segundo sistema en el cual la proteína se obtiene sin proteína de fusión (pET28a). Minipreparaciones plasmídicas de las construcciones de EntA-pGEM TEasy y EntP-pGEM TEasy identificadas como positivas, y de los vectores de expresión pET32a y pET28a, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, según instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Se purificaron los fragmentos de interés, EntA, EntP1, pET28a y pET32a; luego se ligaron estos vectores con las enterocinas 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* BL21.DE3 electrocompetentes. Se identificaron los clones positivos mediante secuenciación automática de preparaciones plasmídicas de clones seleccionados al azar.

Expresión de EntA y EntP1 recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó mediante dos métodos diferentes; utilizando IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) como inductor o empleando un medio de autoinducción.

Para el primer caso, las células de *E. coli* conteniendo la construcción plasmídica de interés se crecieron durante toda la noche (ON) en medio LB suplementado con 0,1mg/ml de ampicilina o kanamicina, según corresponda, a 37°C en agitación. Una alícuota de este cultivo fue diluida 100 veces en el mismo medio y cultivada en iguales condiciones hasta alcanzar una DO₅₅₀=0,5. La expresión de la proteína recombinante se indujo utilizando IPTG e incubando a 37°C durante 3hs u ON.

En el segundo caso se inoculó 1 ml de LB-glucosa 1%, suplementado con 0,1mg/ml de ampicilina o kanamicina, según corresponda, con 1 colonia aislada del clon de interés, y se incubó a 37°C durante 7 horas en agitación. Quince μ l de dicho cultivo se utilizaron para inocular 3 ml de medio de auto-inducción suplementado con los mismos antibióticos, y se incubó a 37°C ON en agitación.

En ambos casos, luego de finalizadas las incubaciones, las células se recuperaron mediante centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos. Los resultados se observaron por SDS-PAGE en geles de Tris-Tricina (Schägger, 2006) y se compararon con un extracto de células sin inducir.

El pellet celular de cada enterocina recuperado luego de la inducción de la expresión se resuspendió en el buffer correspondiente para ser sonificado. El proceso de sonificado fue llevado a cabo realizando 6 pulsos de 10 segundos cada uno. El pellet y el sobrenadante se separaron mediante centrifugación por 10 min a 12000 rpm y ambas fracciones se corrieron en SDS-PAGE.

RESULTADOS

Los fragmentos codificantes para las bacteriocinas EntA y EntP de *Enterococcus* se obtuvieron mediante síntesis comercial para ser utilizados como moldes en reacciones de PCR con *primers* específicos. Para el caso de EntP, se diseñaron *primers* específicos que permiten amplificar tanto el gen completo de la pre-enterocina (EntP1) como la enterocina madura (EntP2). Se obtuvieron fragmentos de 141pb, 200pb y 136pb para EntA, EntP1 y EntP2, respectivamente, con los sitios reconocidos por las enzimas de restricción correspondientes, insertados en los extremos 5' y 3' del amplificado.

Para confirmar la identidad de las secuencias amplificadas, y a su vez facilitar el posterior clonado en el vector de expresión seleccionado, los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM Teasy, y con dichas construcciones se transformaron células de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias transformantes para evaluar la presencia de los fragmentos de interés mediante PCR. Cinco de las colonias que resultaron positivas en las reacciones de amplificación para cada fragmento, fueron evaluadas por secuenciación automática. Todos los clones evaluados fueron confirmados como positivos para el fragmento de interés. Se seleccionó un clon para cada gen para continuar trabajando, teniendo en cuenta el porcentaje de identidad con respecto a la secuencia reportada.

Hasta el momento, los fragmentos codificantes para EntA y EntP1 contenidos en los clones seleccionados se subclonaron en los vectores de expresión pET32a y pET28a mediante cortes de restricción con las enzimas correspondientes, y se transformaron células de *E. coli* BL21.DE3. Cuatro colonias transformantes para cada enterocina se

seleccionaron para ser evaluadas por secuenciación automática. Se escogieron 2 clones de cada proteína en cada uno de los vectores de expresión para continuar trabajando.

Para la obtención de la EntA y EntP1 recombinante se realizó una puesta a punto de la inducción de la expresión bajo diferentes condiciones. Se utilizaron los clones previamente seleccionados. Para los clones pET32a-EntA y pET28a-EntP1 se observaron los mayores niveles de sobreexpresión en los pesos moleculares esperados (27 y 8,5 KDa, respectivamente) bajo las condiciones de autoinducción. Para pET32a-EntP1, las mayores bandas de sobreexpresión en el peso molecular esperado (30KDa) se observaron realizando la inducción con IPTG durante 3hs. En todos los casos, luego de sonicar, las proteínas de interés se visualizaron en la fracción soluble. En ninguna de las condiciones evaluadas se obtuvieron niveles de expresión significativos de los clones de pET28a-EntA.

CONCLUSIONES

Se lograron clonar y expresar las secuencias codificantes para las bacteriocinas enterocina A y enterocina P1 en los vectores de expresión pET32a y pET28a. Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo mostraron que las mismas pueden ser producidas de forma soluble en células de *E. coli* bajo condiciones específicas de inducción de la expresión. Trabajos futuros permitirán caracterizar su actividad bactericida frente a cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas. Se espera que el producto final de este desarrollo tenga un fuerte impacto en el tratamiento de IIM por *S. aureus*, ya sea complementando la actividad de los antibióticos actualmente disponibles en el mercado argentino o como un producto para uso individual.

BIBLIOGRAFIA

- 1- **Booth JM. 1975. Mastitis control in the field: some results of two large field trials. pp. 19-31, In: Proc. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA.**
- 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- **Drider D, Fimland 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., Camussone C., Diez C. 2014. Obtención de una bacteriocina recombinante para su incorporación en un compuesto antimicrobiano destinado al tratamiento y profilaxis de mastitis bovina. EJI 2014, Universidad Nacional del Litoral.**
- 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- **Jaouani I, Mohamed Salah A, Alessandria V, Bouraoui J, Ben Salem R, Kilani H, Mansouri R, Messadi L, Cocolin L. 2014. High inhibition of Paenibacillus larvae and Listeria monocytogenes by Enterococcus isolated from different sources in Tunisia and identification of their bacteriocin genes. Lett Appl Microbiol. doi: 10.1111/lam.12239. Epub ahead of print.**
- 8- **Nes, Sung-Sik Yoon, Dzong 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.**