



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

TESIS

“Efecto de la eliminación de los genes *thnP* y *thnT* del clúster pThur sobre la producción de Thurincina H en una cepa heteróloga de *Bacillus thuringiensis*”

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

AXEL PIÑA FLORES

Directora de tesis:

D.C. Luz Edith Casados Vázquez

Asesora interna:

M. C. Patricia Guadalupe Suárez Albores

Puebla, Pue.

Diciembre 2020

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LUZ EDITH CASADOS
VÁZQUEZ EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS
DE LA VIDA, DEL CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA, DE LA
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO.**

Podemos juzgar el progreso por la valentía de las preguntas y la profundidad de las respuestas; por la osadía de encontrar la verdad más que en regocijarnos en lo que nos hace sentir bien

-Carl Sagan

DEDICATORIAS

A mis padres:

Rolando Piña Hernández
María Florida Flores Bravo

A mis hermanos:

Rolando Piña Flores
Alan Josué Piña Flores

Por último, pero no menos importante a mi novia:

Gabriela Medina Sacal

Quienes siempre me han brindado su amor incondicional, gracias por siempre creer en mí y nunca dejarme solo, con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis amigos y colegas con quienes tuve la oportunidad de vivir experiencias inolvidables y compartir conocimiento no solo acerca de nuestra hermosa carrera sino también de la vida.

A la Dra. Luz Edith Casados Vázquez, quien me abrió las puertas de su laboratorio y me dejó ser partícipe de su gran trabajo, desde el primer momento me brindó todo su apoyo, amistad y conocimiento.

A la Maestra Patricia Suárez Albores, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida universitaria, gracias por ser además de una gran docente una gran amiga.

A mi comité de tesis, quienes sin importar las circunstancias que se han vivido debido a la pandemia siempre han estado pendientes de mi trabajo, complementando con críticas constructivas y brindándome su apoyo incondicional a lo largo de este proceso, gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Bacteriocinas	2
2.2. Generalidades de las Bacteriocinas	2
2.3. Clasificación de las bacteriocinas	3
2.3.1 Clase I	4
2.3.2. Clase II	4
2.3.3. Clase III	4
2.4. Mecanismo de acción	5
2.5. <i>Bacillus</i>	6
2.6. <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.7. <i>Bacillus cereus</i>	8
2.8. Thurincina H	8
2.9. Actividad antimicrobiana	9
2.10. Estructura y características generales	9
2.11. Clúster genético	10
2.12. Vector pHT3101	11
3. MARCO DE REFERENCIA	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
5. JUSTIFICACIÓN	14
6. OBJETIVOS	15
6.1. Objetivo general	15
6.2. Objetivos específicos	15
7. HIPÓTESIS	15
8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	16
8.1. Tipo de estudio	16
8.2. Universo del estudio	16
8.3. Tamaño de muestra	16
8.4. Sede y lugar de estudio	16
8.5. Criterios de selección	16

8.6. Recursos humanos	17
8.7. Recursos. financieros.....	17
8.8 Diseño estadístico.....	17
9. METODOLOGÍA	18
9.1 Diagrama general de trabajo	18
9.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	19
9.3. Eliminación de los genes <i>thnP</i> y <i>thnT</i> del clúster pThur	19
9.4. Extracción de ADN plasmídico	21
9.5. Preparación de células electrocompetentes y transformación de <i>E. coli</i> TOP10 y ET12567	23
9.6. Preparación de células electrocompetentes y transformación de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i> LBIT404 y <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Cry-B.....	25
9.7. Producción de Thurincina H.....	27
9.8. Actividad antimicrobiana.....	28
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
10.1. Amplificación de ΔP y ΔT	29
10.2. Generación de las construcciones $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$	30
10.3. Estrategia de ensamble del plásmido $\Delta PC7$	31
10.4. Estrategia de ensamble del plásmido $\Delta TC8P$	32
10.5. Corroboración de sentido	34
10.6. Transformación de $\Delta PC7$ Y $\Delta TC8P$ en <i>B. thuringiensis</i>	37
10.6.1. Selección de cepas <i>B. thuringiensis</i> para la síntesis heteróloga de la Thurincina H.....	37
10.6.2. Expresión de las deleciones $\Delta PC7$ Y $\Delta TC8P$	38
11. Discusión.....	41
12. CONCLUSIONES.....	42
13. BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
I.	Clasificación propuesta de bacteriocinas de especies de <i>Bacillus</i> y comparación con LAB.	5
II.	Bacteriocinas sintetizadas por diferentes cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
III.	Cepas utilizadas y su justificación	19
IV.	Oligonucleótidos usados para la amplificación de ΔP y ΔT	21
V.	Oligonucleótidos usados para determinar el sentido de ligación	21
VI.	Tabla de abreviaturas.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estructura de la Thurincina H	9
2	Representación gráfica del clúster genético de la Thurincina H.	11
3	Vector pHT3101	12
4	Ciclo de amplificación	20
5	Diagrama general extracción de ADN plasmidico mediante CTAB	22
6	Diagrama general “Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> TOP10 y ET12567”	24
7	Diagrama general “Transformación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> TOP10 y ET12567”	24
8	Diagrama general “Preparación de células electrocompetentes <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i> LBIT404 y <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Cry-B	26

9	Diagrama general “Transformación de células electrocompetentes <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i> LBIT404 y <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Cry-B	26
10	Diagrama general “Producción de Thurincina H”	27
11	Diagrama general “Actividad antimicrobiana mediante el método de pozos”.	28
12	Clúster de la Thurincina H, clonado en el vector pHT3101	29
13	DNA de columna del clúster genético de la Thurincina H y amplificación de ΔP y ΔT	30
14	Estrategia de ensamble para obtener la clona delecional $\Delta TC8P$	31
15	Estrategia de ensamble para obtener la clona delecional $\Delta PC7$	32
16	Vectores C7 y C8P e insertos ΔP y ΔT para reacción de ligación de las deleciones $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$	33
17	Monitoreo de las clonas delecionales $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$	34
18	Esquema de las variantes de clonación $\Delta PC7$: sentido y antisentido	35
19	Esquema de las variantes de clonación $\Delta TC8P$: sentido y antisentido	36
20	Confirmación de sentido de la clonación $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$ mediante PCR	37
21	Producción de Thurincina H en cepas recombinantes y WT de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kenya</i> LBIT 404 a diferentes horas	39
22	Producción de Thurincina H en cepas recombinantes y WT de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kenya</i> Cry-B a diferentes horas	40

1.INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de proteínas con actividad antimicrobiana, sintetizadas en los ribosomas tanto por bacterias grampositivas como gramnegativas. Las bacteriocinas varían en cuanto a su espectro de actividad, masa molecular, mecanismo de acción y características bioquímicas, actualmente son objeto de estudio por su potencial para ser usadas como bioconservadores en alimentos, coadyuvante en terapias anticancerígenas y en diferentes tratamientos médico, por tal motivo es importante conocer y caracterizar cada uno de los genes implicados en la síntesis de estas proteínas, para poder optimizar y garantizar su uso. En 2009 Lee y colaboradores, descubrieron una nueva bacteriocina, la Thurincina H, obtenida de una de cepa de *Bacillus thuringiensis*, aislada de miel de girasol silvestre estadounidense. A partir de este descubrimiento se han realizado varios trabajos para caracterizar el clúster de 10 genes que conforma la maquinaria de síntesis de dicha bacteriocina. En el Laboratorio de biotecnología y microbiología molecular de la Universidad de Guanajuato, se caracterizó a la Thurincina H, observando que presentaba actividad contra amplio rango de patógenos, resistencia a temperaturas elevadas y estabilidad a pH ácidos y alcalinos. En el Laboratorio, se cuenta con el clúster biosintético de la Thurincina H, incluido en un vector que se expresa en cepas de *B. thuringiensis*, dicho clúster biosintético está compuesto de tres genes que codifican para el pre-péptido, en tándem de tres copias idénticas denominadas *thnA1*, *thnA2* y *thnA3*, además del gen *thnP* que codifica para una serin-proteasa de la familia S8 encargada del corte del péptido señal; , el gen *thnB* que codifica la enzima radical SAM, enzima que lleva a cabo las modificaciones post-traduccionales, el gen *thnD* que codifica para una proteína de unión a ATP, el gen *thnE* que codifica para proteína de membrana y el gen *thnT* que codifica para una proteína de secreción, estas tres últimas son parte del sistema de transporte del tipo ABC; . El gen *thnR* codifica para un regulador transcripcional de la familia GntR y cuya función se desconoce. El objetivo del presente trabajo de tesis fue generar mutantes en las que se hayan eliminado los genes *thnP* y *thnT* del clúster pThur y observar el efecto sobre la síntesis de Thurincina H en una cepa heteróloga, así como también compararlo con el clúster completo midiendo la actividad antimicrobiana haciendo uso del ensayo en pozo contra *Bacillus cereus* 163 que sirve como bacteria indicadora por ser sensible a Thurincina H.

Mediante la técnica de mutagénesis dirigida se generaron las mutantes delecionales Δ PC7 (sin *thnP* que codifica para una serin proteasa de la familia 8) y Δ TC8P (sin *thnT* que codifica para un transportador del tipo ABC). La carencia de estos genes llevó a la pérdida de actividad de las cepas transformadas. *B.thuringiensis* LBIT 404 no tuvo una pérdida de actividad total, esto se justificaría por: la producción de sus propias bacteriocinas o debido a que las proteínas de transporte y procesamiento de la cepa nativa LBIT 404 podrían procesar pequeñas cantidades de thurincina H, mientras que la cepa Cry-B no fue capaz de sintetizar thurincina H cuando se probaron las mutantes carentes de los genes *thnP* y *thnT*. Con esto se concluye que los genes *thnP* y *thnT* son indispensables para el procesamiento del péptido y sin ellos no se obtiene thurincina H activa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de proteínas con actividad antimicrobiana sintetizadas ribosomalmente tanto por bacterias grampositivas como gramnegativas, pueden variar en cuanto a su espectro de actividad, peso molecular, mecanismo de acción y características bioquímicas, hoy en día son objeto de estudio para su uso como bioconservadores en alimentos, como sustituto de los conservadores químicos, artificialmente sintetizados que pueden poner en riesgo la salud humana (Tjakko., 1995).

Su uso como agente antimicrobiano se atribuye a las siguientes características: inhibe numerosos microorganismos patógenos, son termoestables, y son activos en amplios rangos de pH. Estos péptidos surgieron como un mecanismo de adaptación que les permitió a las bacterias competir por nutrientes inhibiendo el crecimiento de miembros de la misma especie e incluso de diferentes géneros bacterianos (Mondragón., 2013).

2.2. Generalidades de las Bacteriocinas

Se han reportado una gran cantidad y diversidad de bacteriocinas sintetizadas por la mayoría de las especies bacterianas, se cree que el 99 % de las bacterias podrían producir al menos

una bacteriocina; sin embargo, distintos tipos de bacteriocinas podrían producirse dentro de una misma especie bacteriana. Una gran cantidad de energía es invertida por los microorganismos para la elaboración de mecanismos antimicrobianos, y aún no se conoce con exactitud la función de dichos péptidos antimicrobianos en las comunidades microbianas. (Del Carmen Monrroy., 2009)

La primera vez que se describieron actividades con relación a las bacteriocinas fue en 1925 por André Gratia quien observó un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*, a estas sustancias secretadas por bacterias se les conoció en un principio como colicinas, a partir de aquí se ha invertido mucho trabajo de investigación por conocer nuevas sustancias antagónicas y sus mecanismos de acción (Dusterhus., 2003). Las bacteriocinas que han sido más estudiadas son las producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL), ya que son bacterias generalmente reconocidas como seguras o GRAS (Generally Recognised As Safe). Las BAL, participan en la fermentación de alimentos y se ha demostrado que inhiben la microbiota competitiva incluyendo microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otras, por lo que las llamadas bacteriocinas han despertado un gran interés (Tjakko., 1995). Tal inhibición se atribuye a la producción de bacteriocinas. La nisina, una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuenta con el historial más amplio de uso seguro en alimentos ya que ha sido bastante estudiada. La OMS aprobó su uso en alimentos en 1969 para posteriormente en 1983 ser incluida en la lista de aditivos de la Unión Europea, por su parte la FDA (Food and Drug Administration) la aprobó en 1988 (Del Carmen Monrroy., 2009). Su nula toxicidad para células eucariotas supone una gran ventaja al hacer uso de éstas no solo como bioconservador de alimentos, sino también en cosméticos y en tratamientos biomédicos contra infecciones en medicina humana y veterinarias (Tjakko., 1995).

2.3. Clasificación de las bacteriocinas

La clasificación ha ido cambiando conforme se han descrito las propiedades y características de nuevas bacteriocinas y de las ya existentes. La primera clasificación surgió conforme a las

características de colicinas; sin embargo, los estudios recientes afirman que algunas bacteriocinas no cumplen con dichas características. Fue hasta 1993 cuando Klaenhammer propuso una clasificación conformada por cuatro grupos principales conforme a las bacteriocinas producidas por las BAL; éstas son de acuerdo con su estructura, propiedades fisicoquímicas y moleculares.

En los últimos años diversos investigadores han realizado reclasificaciones; Abriouel y colaboradores propusieron en el 2010 una clasificación que considera las clases I, II y III (Abriouel., 2010) (Tabla I).

2.3.1 Clase I: Péptidos que se someten a modificaciones postraduccionales. Subdividida en cuatro subclases. Las subclases de I.1 a I.3 incluyen péptidos con modificaciones típicas de antibióticos, la subclase I.4 incluye otras modificaciones únicas.

2.3.2. Clase II: Péptidos lineales no modificados (0.77 a 10 kDa). Estables al calor y pH. Esta clase se puede subdividir en:

Subclase II.1 Péptidos similares a la pediocina. Dentro de esta clasificación, se encuentra la coagulina, quien presenta características como la estabilidad al calor y sensibilidad a las proteasas (LeMarrec., 2000).

Subclase II.2. Péptidos similares a la thurincina. Caracterizadas por una secuencia consenso N- terminal (DWTXWSXL), además se incluyen en esta subclase varios péptidos provenientes de *B. thuringiensis* (Abriouel., 2010).

Subclase II.3. Otros péptidos lineales. Dentro de esta subclase, se encuentran la cereína 7 A y la cereína 7 B, producidas por *Bacillus cereus* tratándose de bacteriocinas no sinérgicas, además muestran actividad contra bacterias gram positivas, pero no contra especies gram negativas (Oscáriz ., 1999).

2.3.3. Clase III: Son bacteriocinas antimicrobianas de gran peso molecular y termolábiles, generalmente compuestas de diferentes dominios; además, son no líticas ya que exhiben su

modo bactericida sin causar la lisis celular concomitante. Dentro de esta clase se incluye la enterolisina A y la helveticina J, entre otras.

Tabla I. Clasificación propuesta de bacteriocinas de especies de *Bacillus* y comparación con LAB.

Clasificación de bacteriocinas producidas por especies de <i>Bacillus</i>	Ejemplos	Bacteriocinas LAB (Nes, et al., 2017)
Clase I Péptidos modificados post-traduccionalmente		Clase I. Lantibióticos
Subclase I.1 Peptidos individuales, lantibióticos alargados.	Subtilina, ericina S, ericina A	
Subclase I.2 Otros péptidos lantibióticos de un solo péptido.	Sublancina 168, mersacidina, paenibacilina	
Subclase I.3 Lantibióticos de 2 péptidos.	Haloduracina, lichenicidina	
Subclase I.4 Otros péptidos modificados después de la traducción.	Subtilisina A	
Clase II. Péptidos no modificados.		
Subclase II.1 Péptidos similares a la pediocina	Coagulina, SRCAM 602, SRCAM 1580.	Clase II. No lantibióticos
Subclase II.2 Péptidos similares a la Thurincina	Thurincina H, S y 17, Bacthurincina F4.	Clase IIa
Subclase II.3 Otros péptidos lineales.		
Clase III. Proteínas grandes.	Cereínas 7A y 7B, lichenina, Megacinas A-216 y A-19213	Clase III. Termolábiles.

Tomado de Abriouel, et al., 2010 con modificaciones.

Para todos aquellos polipéptidos antimicrobianos de tamaño intermedio (10-30kDa) y otras proteínas microbianas producidas por bacilos que no se incluyen en este esquema de clasificación se consideran dentro de la categoría BLIS, término referente a aquellas sustancias inhibitorias de origen bacteriano descritas que no han sido suficientemente caracterizadas para cumplir con cualquier clasificación (Abriouel., 2010)

2.4. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las bacteriocinas ha sido estudiado en algunos lantibióticos, que son una clase de bacteriocinas modificadas post-traduccionalmente que contienen aminoácidos inusuales como lantionina o metil lantionina.(Guzman., 2016) Se sabe que el

daño causado por las bacteriocinas ocurre en la membrana citoplasmática, esto sucede al permeabilizar las membranas de las células sensibles, a través de la formación de poros que causan un desbalance iónico. La unión de la bacteriocina a la membrana bacteriana se realiza en primera instancia debido a la atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la bacteriocina cargada positivamente. Esta carga positiva puede variar dependiendo de la bacteriocina, algunas como la nisina poseen esta carga en sus extremos C terminal, a diferencia de la pediocina cuya carga neta se encuentra en el extremo N-terminal. Debido a la formación de los poros una disipación de la fuerza motriz protónica (FMP) se lleva a cabo, esta fuerza está relacionada directamente con la producción de ATP, síntesis y rotación de flagelos, así como de las proteínas de transporte. El ATP es hidrolizado y la reserva de aminoácidos son liberados por la célula a través del poro formado, por lo tanto, a partir de este suceso se genera la lisis celular. La información experimental que se tiene hasta la fecha estima que la formación de poros tiene lugar en milisegundos (Guzmán, 2016). Las cepas que producen bacteriocinas cuentan con proteínas de inmunidad que les brindan autoprotección contra la acción de estos péptidos, tales proteínas son específicas para sus propias bacteriocinas (Salazar-Marroquin, 2016). En el caso de la bacteriocina nisina, estas proteínas de inmunidad son transportadores del tipo ABC llamada Nis FEG, que alejan a la nisina de la membrana (Zainab., 2014).

2.5. *Bacillus*

El género *Bacillus* incluye muchas especies de bacilos grampositivos aerobios o facultativos generadores de esporas. Con la excepción de una sola especie, *B. anthracis*, son saprófitos de baja virulencia difundidos en el aire, tierra, agua, polvo y productos animales. El género se compone de microorganismos en forma de bastón que pueden variar de cocobacilares a filamentos encadenados relativamente largos. Las cepas móviles tienen flagelos peritricos. Forman esporas redondas u ovaladas, el desarrollo se obtiene con medios normales incubados a 28 °C. Las colonias se caracterizan por una superficie rugosa e irregular con múltiples extensiones de bordes rizados que se asemejan a una “cabeza de Medusa” (Kanneth., 2011).

2.6. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria grampositiva esporogénica con propiedades insecticidas debido a la síntesis de proteínas cristalinas y citotóxicas que acumula durante la esporulación. De igual manera produce pequeños péptidos con actividad bacteriostática y bactericida contra patógenos de importancia clínica llamados bacteriocinas (Cherif., 2001)

B. thuringiensis SF361 aislada de miel de girasol fue seleccionada para caracterizar la naturaleza de la actividad antimicrobiana que mostró un alto nivel de actividad antagónica contra patógenos gram positivos que pueden estar presentes en los alimentos. (Lee, 2009).

B. thuringiensis también produce bacteriocinas al final de la fase exponencial y en la estacionaria. Estas bacteriocinas posiblemente podrían proporcionar alternativas viables al uso de la nisina y otros antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria (De la Fuente-Salcido., 2013) con el fin de aumentar el espectro de actividad frente a microorganismos patógenos.

Las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* tienen masas moleculares que varían de 3 a 12 kDa, son estables en condiciones ácidas y alcalinas (pH 3-10), y también son termorresistentes, incluso a 121 °C (Ahern, 2003). Se han descrito actividades antibióticas, antifúngicas y anticancerosas para bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* (Cherif., 2003).

Hasta la fecha, han sido reportadas 18 bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis* (De la Fuente-Salcido.,2013): thuricina Bn1, bacthuricina F103, bacthuricina F4, entomocina 9, entomocina 110, entomocina 420, morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, tolworthicina 524, tochicina, thuricina, thuricina CD, thurincina H, thuricina S, thuricina 17, thuricina 439 y thuricina 7, han sido reportados de varias subespecies, incluyendo *morrisoni*, *kurstaki*, *kenyae*, *entomocidus*, *tolworthi*, *tochigiensis* y *thuringiensis* (Tabla II).

TABLA II. Bacteriocinas sintetizadas por diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*

	Bacteriocin	Molecular mass (kDa)	Producer strain (subsp.)
AI	Thuricin	0.950	HD2 (<i>thuringiensis</i>)
	Thuricin S	3.137	HD198 (<i>entomocidus</i>) 9 (<i>entomocidus</i>) HD110 (<i>entomocidus</i>) HD125 (<i>tolworthy</i>)
	Thuricin Bn1	3.139	Bn1 (<i>kurstaki</i>)
	Thurincin H	3.140	SF361
	Bacthuricin F4	3.160	BUPM4 (<i>kurstaki</i>)
	Thuricin 17	3.172	Bt non- <i>Bradyrhizobium</i>
	Entomocin 110	4.800	HD110 (<i>entomocidus</i>)
AII	Thuricin CD	Tm- α 2.760 Tm- β 2.860	DPC 6431
	Thuricin 439	(A) 2.919 (B) 2.803	B439
BI	Morricin 269	~10.000	LBIT269 (<i>morrisoni</i>)
	Kurstacin 287	~10.000	LBIT287 (<i>kurstaki</i>)
	Kenyacin 404	~10.000	LBIT404 (<i>kenyae</i>)
	Entomocin 420	~10.000	LBIT420(<i>entomocidus</i>)
	Tolworthcin 524	~10.000	LBIT524 (<i>tolworthi</i>)
	Tochicin	10.500	HD868 (<i>tochigiensis</i>)
	BacthuricinF103	~11.000	BUMPT03
	Thuricin 7	11.600	BMG1.7
Entomocin 9	12.400	HD9 (<i>entomocidus</i>)	

Tomado de De la Fuente-Salcido., 2013.

2.7. *Bacillus cereus*

Dentro del genero *Bacillus*, esta especie tiene las mayores probabilidades de ocasionar una infección oportunista. *Bacillus cereus* también puede ocasionar intoxicaciones alimentarias por medio de enterotoxinas, una de éstas actúa mediante la estimulación de adenilato ciclasa y la excreción de líquidos de igual manera que *Escherichia coli* toxígena y *Vibrio cholerae*. *Bacillus cereus* produce toxina piogénica y enterotoxina (Kanneth., 2011).

2.8. Thurincina H

La thurincina H es un péptido antimicrobiano de 31 residuos de aminoácidos sintetizado ribosomalmente, con una masa molecular de aproximadamente 3139.51 Da producido por *B. thuringiensis* SF361, una cepa aislada de la miel de girasol doméstica estadounidense (Lee., 2009).

2.9. Actividad antimicrobiana

Esta bacteriocina tiene actividad inhibidora frente a una amplia gama de bacterias gram positivas, que incluyen diferentes patógenos transmitidos por los alimentos y bacterias de deterioro, como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus* spp., *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 8095, *S. aureus* ATCC 9144, *Carnobacterium maltaromaticum* (Hyungjae., 2009). Adicionalmente se ha reportado que *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, también sintetiza la Thurincina H (Casados-Vázquez., 2016), tiene actividad contra bacterias grampositivas (*Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus* y *Streptococcus pyogenes*) y gramnegativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* spp.) (De la Fuente-Salcido., 2008).

2.10. Estructura y características generales

La Thurincina H tiene en su estructura cuatro puentes tioéter azufre- α -carbono únicos (Figura 1), que es un tipo de enlace diferente al de las estructuras del grupo ampliamente estudiado de lantibióticos de clase I, ya que la estructura de lantibióticos se mantiene por puentes de azufre- β -carbono (Wang., 2014). Los 31 aminoácidos maduros de la Thurincina H presentan un esqueleto helicoidal que se pliega a una estructura en horquilla manteniendo unidos a los átomos de azufre de las cuatro cisteínas (Cys4, Cys7, Cys10 y Cys13) con los carbonos de una asparagina (Asn19), dos treoninas (Thr22 y Thr25) y una serina (Ser28) (Sit., 2011)

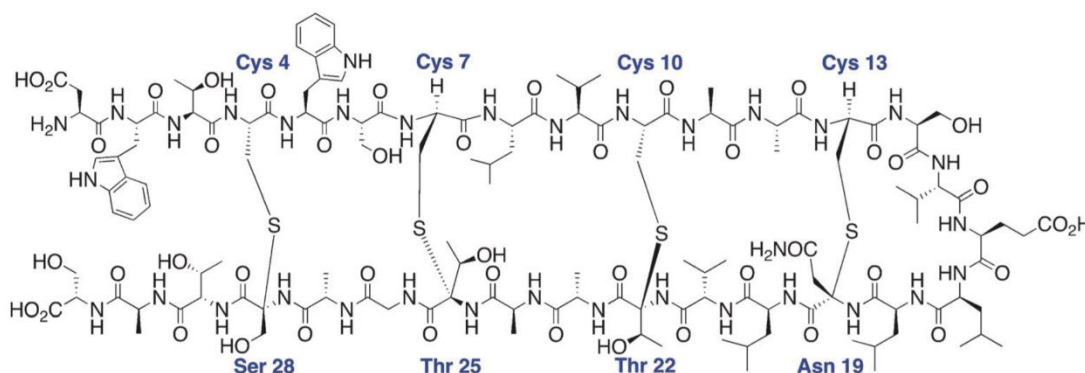


Figura 1. Estructura de la Thurincina H tomado de Sit ., 2011.

2.11. Clúster genético

La Thurincina H al igual que otras bacteriocinas requiere de ciertos genes que le ayuden al plegado, procesamiento e inmunidad. Estos genes se codifican dentro de operones o clústeres, Thurincina H esta codificada dentro de un clúster compuesto por 10 genes (Fig. 2). La predicción de la función de estos genes inicialmente se hizo mediante homología de proteínas. (Lee., 2009). Por homología se determinó que *thnB* codifica una enzima altamente homologa a AlbA, la cual es la enzima que ayuda a madurar a subtilosina A y pertenece a la familia radical SAM (S-adenosilmetionina), enzima que cataliza la formación de 4 enlaces tioéter en el péptido precursor (Qi Zhang., 2012). Posteriormente *thnB* se clonó y expresó en una cepa de *E. coli* para después ser purificado por cromatografía de afinidad iónica, para explorar el papel de *thnB* en la maduración de la thurincina H, se encontró que la enzima radical SAM cataliza la formación del enlace tioéter en el precursor *thnA* (Wieckowski., 2015).

Para estudiar la función del gen *thnR* en el cassette genético, se generaron varias construcciones con o sin *thnR* para la expresión en *Bacillus thuringiensis* subsp *morrisoni*. Todos los transformantes que albergan *thnR* en plásmidos recombinantes mostraron una disminución de 15 a 90% en la actividad inhibitoria contra la cepa objetivo, *Bacillus cereus* 183, lo que sugiere que *thnR*, de hecho, funciona como un regulador negativo de la transcripción del clúster de thurincina H. Según la homología de secuencia, *thnR* se clasificó como un miembro de la subfamilia YtrA de la superfamilia GntR de reguladores transcripcionales (Casados-Vázquez., 2017).

Para identificar los genes responsables de la inmunidad, se generaron construcciones que se utilizaron para transformar una cepa natural de *B. thuringiensis* sensible a la thurincina H (es decir, Btk 404). Se evaluó la susceptibilidad o resistencia a la bacteriocina en los recombinantes resultantes. Cuando Btk 404 / pHT3101ThnARDEP y Btk 404 / pHT3101-ThnABTI se expusieron a thurincina H, la inmunidad se demostró en la primera, lo que indica el gen *thnI* por sí solo no juega un papel en la resistencia a la bacteriocina como se propuso anteriormente. Se demostró por primera vez que el pequeño operón compuesto de *thnR*, *thnD* y *thnE* es necesario para la inmunidad de *B. thuringiensis* a la thurincin H, y *thnI* no es necesario para esta respuesta (Casados-Vázquez., 2018)

Por análisis *in silico* se le ha atribuido al gen *thnP* que codifica para una serin-proteasa de la familia S8 encargada del corte del péptido señal y al gen *thnT* se le atribuye codificar para una proteína de secreción, aunque esto es solo por homología con proteínas presentes en otros clústeres genéticos (Lee., 2009).

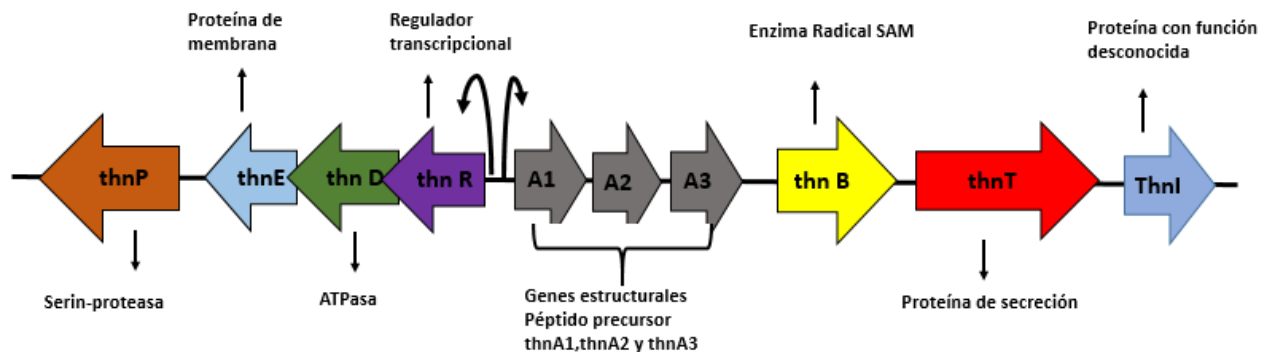


Figura 2. Representación gráfica del clúster genético de la Thurincina H. Modificada de Casados-Vázquez., 2016.

2.12. Vector pHT3101

La clave en la manipulación genética de *Bacillus thuringiensis* ha sido el desarrollo de vectores de clonación estables, especialmente los vectores lanzadera, los cuales contienen orígenes de replicación derivados de plásmidos residentes de *Bacillus thuringiensis*. Los vectores lanzadera son vectores de clonación que se replican en células de más de un organismo, por lo que tienen los orígenes de replicación de varios hospederos, por ejemplo *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis* (Ochoa & López, 2012).

La construcción del vector lanzadera pHT3101 de *Bacillus thuringiensis* se realizó a partir del plásmido pHT1030 (Lereclus., 1989). El vector pHT3101 (Fig. 3) permite la selección de bacterias transformantes de *Escherichia coli* resistentes a ampicilina y transformantes de

Bacillus thuringiensis con eritromicina. Es uno de los vectores más utilizados para la construcción de cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* (Ochoa & López, 2012). Se ha usado el vector pHT3101 en el Laboratorio de biotecnología y microbiología molecular de la Universidad de Guanajuato en distintas investigaciones para aclarar el papel de los genes de inmunidad, así como otros genes, el uso de este vector ha sido tan efectivo que incluso se ha clonado y expresado el clúster completo de la Thurincina H en dicho vector y el rendimiento de expresión ha sido alto. Esto se debe a que este plásmido tiene un número bajo de copias, 4 por cromosoma, en lugar de pHT315(vector usado en investigaciones referentes a la thurincina H en otros laboratorios), estimado en 15 copias por cromosoma, ya que se ha observado previamente que un aumento en el número de copias de un gen objetivo podría afectar la síntesis de una proteína nativa en *B. thuringiensis* (Oros-Flores., 2018).

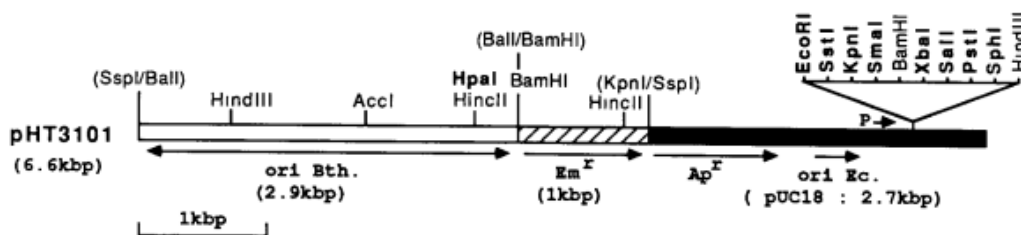


Figura3. Vector pHT3101. Tomado de Lereclus, 1989.

3. MARCO DE REFERENCIA

Se han reportado diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* con altos niveles de actividad antibacteriana contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (De la Fuente-Salcido., 2013). En el 2008, Lee y colaboradores aislaron bacterias de diferentes variedades de miel y encontraron que el 92.5 % de las bacterias producían compuestos antimicrobianos; posteriormente en 2009 el mismo grupo de investigadores seleccionó un aislado de miel de girasol donde fue encontrada a *B. thuringiensis* SF361, esta cepa fue estudiada para determinar la naturaleza de su actividad antimicrobiana. Lograron purificar y secuenciar el

amino terminal de la bacteriocina que denominaron Thurincina H, a partir de esto dedujeron los genes estructurales y siete genes más que probablemente estaban implicados en la biosíntesis (Lee., 2009).

El clúster de la Thurincina H está compuesto por 10 genes, tres de estos genes codifican para el pre-péptido, se encuentran en tándem de tres copias idénticas y fueron denominados *thnA1*, *thnA2* y *thnA3*; además de éstos, cuenta con el gen *thnP* que codifica para una proteína con homología a una serin-proteasa de la familia S8 que puede ser la encargada del corte del péptido señal; *thnB* que codifica la enzima radical SAM, que es la encargada de llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales (Wieckowski., 2015); *thnD* proteína de unión a ATP responsable de la hidrólisis de éste, *thnE* para una proteínas transmembranal y *thnT* para una proteína de secreción, los tres genes forman parte del sistema de transporte del tipo ABC, cabe mencionar que *thnE* y *thnD* están implicados en el mecanismo de inmunidad de la bacteriocina (Casados-Vazquez., 2018) mientras que, *thnT* se ha sugerido que puede actuar en el mecanismo de secreción de la Thurincina H; *thnR* codifica para un regulador transcripcional de la familia GntR y *thnI* codifica para una proteína de la que no se conoce su función (Lee., 2009)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque son muchas las bacterias ácido-lácticas que producen bacteriocinas, sólo una de ellas, la nisina, sintetizada por *L.lactis*(Generalmente Reconocida Como Segura) es comercializada de manera semipurificada, sin embargo, su uso es limitado ya que no es efectiva frente a bacterias gramnegativas. y su actividad se ve afectada en pH alcalinos. Por este motivo ha surgido la necesidad de buscar nuevas bacteriocinas con actividad contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y que además sean estables a diferentes pH y temperaturas. En este contexto se han descubierto nuevas bacteriocinas, entre ellas las sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* (Bt). En el Laboratorio se ha caracterizado a la Thurincina H, activa contra amplio rango de patógenos y estable en valores de pH ácido y alcalino; además de ser resistente a temperaturas elevadas. La Thurincina H esta codificada

en un clúster integrado por diez genes (*thnP*, *thnE*, *thnD*, *thnR*, *thnA1*, *A2*, *A3*, *thnB*, *thnT* y *thnI*) de los cuales ocho de ellos ya han sido analizados e identificado su actividad. Se desconoce si *thnP* y *thnT* son genes indispensables para que se lleve a cabo la síntesis de la thurincina, por lo que, en este trabajo nos planteamos realizar mutantes deleciones que nos permitan ver si estos dos genes son esenciales para llevar a cabo la síntesis.

5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años los problemas de salud en México han orientado a la investigación hacia el desarrollo de alternativas al uso de aditivos artificiales utilizados en la industria alimentaria como conservadores para prevenir la contaminación por agentes microbianos y las enfermedades causadas por ellos, sustituyéndolos por conservadores naturales e inoos que proporcionen una eficacia similar o incluso superior a la de los artificiales. Debido a lo anterior, las bacteriocinas se han postulado como un sustituto natural a los conservadores químicos, para ello es necesario caracterizar cada uno de los genes que componen a dichas bacteriocinas. En el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular de la Universidad de Guanajuato se ha caracterizado a la Thurincina H, activa contra un amplio rango de patógenos y estable a pH ácido y alcalino; además de ser resistente a temperaturas elevadas, sin embargo, se desconoce si los genes *thnP* y *thnT* juegan un papel crucial para la síntesis y funcionamiento de la bacteriocina. Conocer si estos genes son esenciales en la biosíntesis de la Thurincina H nos generará conocimiento para continuar con la caracterización del clúster para posteriormente realizar modificaciones y mejorar su rendimiento y obtención en cepas reconocidas como seguras.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Generar mutantes en las que se hayan eliminado los genes *thnP* y *thnT* del clúster pThur y medir el efecto sobre la síntesis de Thurincina H en una cepa heteróloga de *Bacillus thuringiensis*.

6.2. Objetivos específicos

1. Eliminar los genes *thnP* y *thnT* que están presentes en el clúster pThur mediante mutagénesis dirigida.
2. Probar el efecto de las mutantes carentes de los genes *thnP* y *thnT* y comparar con el clúster completo en una cepa heteróloga de *Bacillus thuringiensis*.

7. HIPÓTESIS

Las proteínas codificadas por los genes *thnP* y *thnT* son esenciales para la obtención de la bacteriocina Thurincina H activa. Al estar ausente el gen *thnP* que codifica para una serin-proteasa de la familia S8 encargada del corte del péptido señal la bacteriocina no continúa su maduración por lo que esta proteína deja de ser funcional. Mientras que en ausencia del gen *thnT* el cual codifica para una proteína de secreción que forma parte del sistema de transporte del tipo ABC, la bacteriocina no puede ser liberada al medio.

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

8.1. Tipo de estudio

- Cuantitativo
- Cualitativo

8.2. Universo del estudio

- Cepa de *Escherichia coli* TOP 10
- Cepa de *Escherichia coli* ET12567
- Cepa de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* Cry-B
- Cepa de *Bacillus thuringiensis subsp. kenya*e LBIT404
- Muestra de extracto crudo Thurincina H

8.3. Tamaño de muestra

- 1 colonia de cepa *E. coli* TOP10
- 1 colonia de cepa *E.coli* ET12567
- 1 colonia de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* Cry-B
- 1 colonia de *Bacillus thuringiensis subsp. kenya*e LBIT404
- 105 muestras de 25 mL de *B. thuringiensis subsp. kurstaki* Cry-B (diferentes construcciones, duplicado)
- 105 muestras de 25 mL de *B. thuringiensis subsp. kenya*e LBIT404(diferentes construcciones, duplicado)
- 105 muestras de 90 µl de extracto crudo Thurincina H obtenidos de *B. thuringiensis subsp. kurstaki* Cry-B (diferentes construcciones, duplicado)
- 105 muestras de 90 µl de extracro crudo Thurincina H obtenidos de *B. thuringiensis subsp. kenya*e LBIT404(diferentes construcciones, duplicado)

8.4. Sede y lugar de estudio

- Laboratorio de Biotecnología y microbiología molecular de la División de Ciencias de la Vida, del Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato

8.5. Criterios de selección

- Fenotipos observables

8.6. Recursos humanos

D.C. LUZ EDITH CASADOS
VÁZQUEZ

Docente Investigador de la División de Ciencias de la Vida, del Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato

M.C. PATRICIA GUADALUPE
SUÁREZ ALBORES

Docente de la Facultad de Ciencias Químicas - BUAP

AXEL PIÑA FLORES

Estudiante de la Facultad de Ciencias Químicas - BUAP

8.7. Recursos. financieros

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la D.C. Luz Edith Casados Vázquez en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular de la División de Ciencias de la Vida, del Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato. El estudiante contó con beca para estudiante nivel 1 proveniente del proyecto con número 3664 de la convocatoria Atención a Problemas Nacionales 2016.

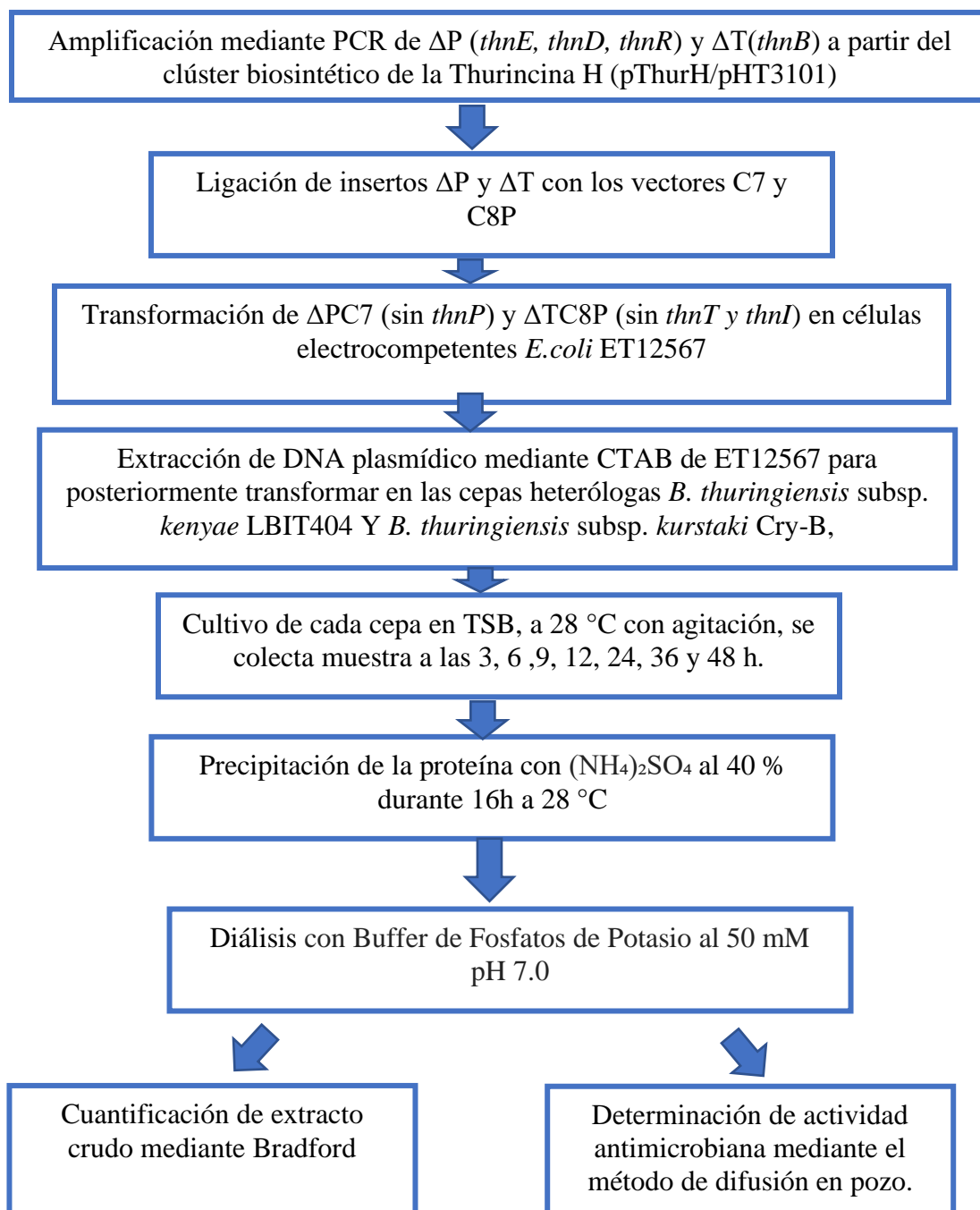
8.8 Diseño estadístico

Determinación de los siguientes parámetros:

- Sensibilidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

9. METODOLOGÍA

9.1 Diagrama general de trabajo



9.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Escherichia coli TOP10 fue usada para propagar los plásmidos, *E. coli* ET12567 se utilizó para obtener DNA no metilado necesario para la transformación en *B. thuringiensis*; ambas cepas se crecieron a 37 °C y 200 rpm de agitación en caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry^B, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 (Btk 04) y *Bacillus cereus* fueron crecidas a 28 °C con 200 rpm de agitación en caldo soya tripticaseína (TSB) o agar de soya tripticaseína (TSA)(Becton-Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México).

Tabla III. Cepas utilizadas y su justificación.

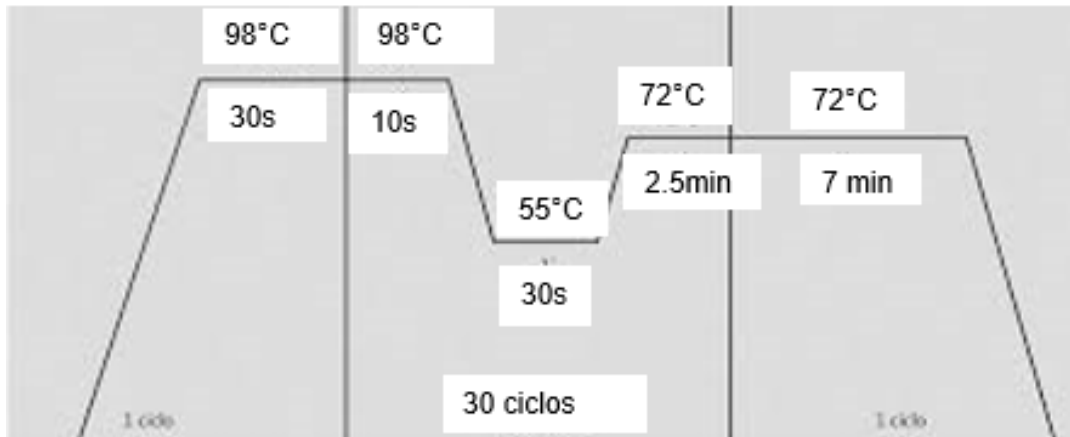
Cepas utilizadas	Justificación
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Propagación de plásmidos
<i>Escherichia coli</i> ET12567	Obtención de ADN no metilado
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i> LBIT404 (Btk 04)	Cepa heteróloga para medir expresión de las construcciones
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Cry ^B	Cepa heteróloga para medir la expresión de las construcciones
<i>Bacillus cereus</i>	Cepa indicadora para medir la actividad antimicrobiana

9.3. Eliminación de los genes *thnP* y *thnT* del clúster pThur

Para realizar la eliminación de los genes de interés partimos de dos construcciones que contenían los siguientes elementos: C8P con los genes *thnP*, *thnE*, *thnD*, *thnR* y los tres genes estructurales *thnA1*, *A2*, *A3* y C7 inicia con el promotor pThur, los tres genes estructurales y los genes *thnB*, *thnT* y *thnI*. Para eliminar el gen *thnP* (construcción nombrada Δ PC7 ver tabla VI) se utilizaró la construcción C7 como base y a partir de la clona C8P se amplificaron los genes *thnE*, *thnD*, *thnR*. No fue necesario amplificar los estructurales porque esos ya están dentro de la construcción base C7. La amplificación se hizo con oligonucleótidos específicos (Tabla IV) que contenían el sitio de restricción para EcoRI. Los reactivos utilizados fueron

las siguientes: ~ 50 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer de Taq DNA polimerasa, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 μM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP's, y 1 U de Taq DNA Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 98 °C durante 30 s, seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 55 °C (Figura 4), el tiempo de amplificación de 2.5 min a 72 °C con una extensión final de 72 °C durante 7 min (Casados-Vázquez., 2017).

Figura 4. Condiciones de amplificación, tomado y modificado de Casados-Vázquez., 2017.



Para la eliminación de *thnT* (construcción llamada ΔTC8P tabla VI) se realizó la misma estrategia, pero se usó como base la construcción C8P y se amplificó el gen *thnB* con oligonucleótidos específicos (Tabla IV) con sitio PstI. La construcción C7 y el fragmento *thnEDR* fueron digeridos con EcoRI y purificados, la construcción C8P y el fragmento *thnB* fueron digeridos con PstI, cabe mencionar que los vectores fueron desfosforilados antes de la purificación

Una vez obtenidos los fragmentos digeridos y purificados se procedió a realizar la ligación utilizando 50 ng del vector y 65 ng del inserto. Para la ligación se utilizó T4 DNA ligasa (NEB) conforme a las especificaciones. La reacción de ligación se incubó 16 h a 16°C y posteriormente se dializó y transformó en células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes. Se monitorearon algunas colonias por ensayo de restricción con la enzima adecuada: EcoRI para ΔPC7 y PstI para ΔTC8P. Dado que la ligación de cada inserto se realizó con una sola enzima de restricción las colonias positivas fueron analizadas para determinar el sentido de la clonación. El análisis se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos de la tabla V.

Tabla IV. Oligonucleótidos usados para la amplificación de ΔP y ΔT .

Nombre	Secuencia	
ThnPTermFw/EcoRI	5'CCGGAATTCAAAAACACCTCTTGATATTTATGTATAATCC 3'	ΔP
½PromRRv/EcoRI	5'CCGGAATTCTTTTTATAATTTATAATGTTAACTGTGTATG 3'	
½UpstSAMFw/PstI	5'CAAACTGCAGAATTAGGACTTATTCTAATGACAAAC 3'	ΔT
TermSAMRv/PstI New	5'CAAACTGCAGCCTCTTTCTCCTCTTTGTCTATTTAT 3'	

Tabla V. Oligonucleótidos usados para determinar el sentido de ligación.

Nombre	Secuencia
Upstream SAM-Rv/PstI	5'CAAACTGCAGCGTTTTTCGATAAAATTTATAAATTTATAGG3'
ThnR-Fw/EcoRI	5'CCGGAATTCTCATTTTTTCATTCTCCTCCTC 3'
ThnR-Rv/EcoRI	5'CCGGAATTCATGAAAATAGTCTTAAGTAATGTATC 3'
Prom Thur Fw/SphI	5'ACATGCATGCGCAGTTTAACAAGATATACTGCG3'
ThnTUpsRv/EcoRI	5'CCGGAATTCCTTTCTCCTCCTTTGTCTATTTATTATATTAATTTACG 3'
ThnB-New-Fw	5'ACATATTGTGATTGCGCCTGATGG 3'

9.4. Extracción de ADN plasmídico

En tubos de 1.5 mL se concentraron 3 mL de células a 12 000 rpm por 1 minuto, posteriormente se agregaron 200 μ L de STET y se resuspendió el botón celular con vórtex. Posteriormente 4 μ L de lisozima a 50 mg/mL se agregaron y se incubaron las muestras a 37 °C durante 5 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, los tubos fueron hervidos durante 1 minuto y posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm. Se elimino el botón formado al fondo del tubo con un palillo y se agregaron 8 μ L de CTAB al 5 %, se centrifugaron los tubos a 13 000 rpm por 5 minutos. Se descarto el sobrenadante y se resuspendió el botón con 300 μ L de NaCl 1.2 M y 750 μ L de etanol absoluto. Se centrifugo durante 10 minutos a 13 000 rpm y se tiró el sobrenadante. Se agregaron 700 μ L de etanol al 70 % y se agito mediante vortex, se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 13 000 rpm y se decantó. Finalmente, se resuspendió el DNA en 30 mL de agua destilada. El DNA se almaceno a -20 °C para posteriores usos.

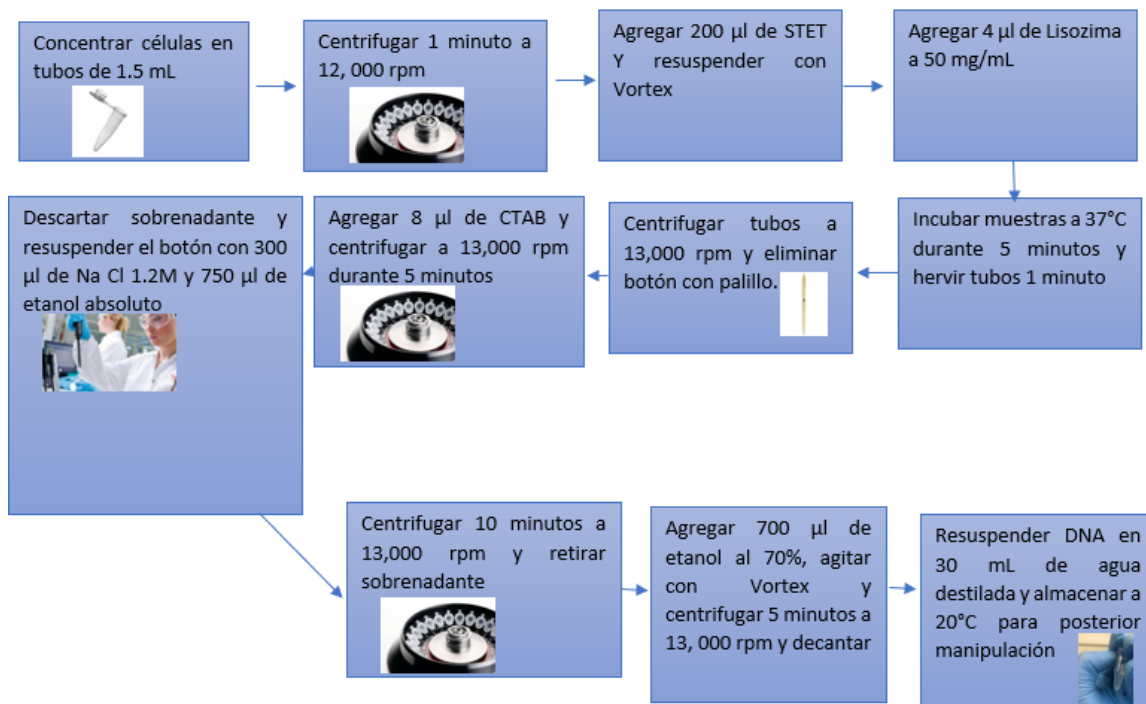


Figura 5. Diagrama general extracción de ADN plasmidico mediante CTAB.

Tabla VI. Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Descripción
C2 ó pThur H	pHT3101/ <i>thnP, thnE, thnD, thnR, thnA1, thnA2, thnA3, thnB, thnT, thnI</i>
C8P	pHT3101/ <i>thnP, thnE, thnD, thnR, thnA1, thnA2, thnA3</i>
C7	pHT3101/ <i>thnA1, thnA2, thnA3, thnB, thnT, thnI</i>
ΔP	<i>thnE, thnD, thnR</i>
ΔT	<i>ThnB</i>
ΔPC7	pHT3101/ <i>then, thnD, thnR, thna1, thna2, thna3, thnB, thnT, thnI</i>
ΔTC8P	pHT3101/ <i>thnP, thnE, thnD, thnR, thnA1, thnA2, thnA3, thnB</i>

9.5. Preparación de células electrocompetentes y transformación de *E. coli* TOP10 y ET12567

Escherichia coli TOP 10 se cultivó en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C, 200 rpm por 16 horas. Se tomó 1 mL de precultivo y se inoculó en 100 mL de medio 2XYT (Tripton 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L y cloruro de sodio 5 g/L, se ajusta el pH a 6.8). El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una D.O. (Abs 600nm) de 0.5. Inmediatamente el matraz se colocó en un baño de hielo por 15 minutos y después se centrifugó en frío a 4000 rpm por 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 40 mL de glicerol frío al 10 % y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. Los lavados con glicerol frío al 10 % se repitieron utilizando volúmenes de 30 mL, 20 mL y 3 mL respectivamente. Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen final de 300 mL de glicerol al 10 %, se hicieron alícuotas de 50 µL en tubos de 1.5 mL y se congelaron a -80 °C. Para la transformación se descongeló una alícuota de 50 µL y se le colocó el DNA a transformar, en caso de ser DNA de ligación éste se deberá dializar por 20 min en agua bidestilada. Una vez mezclado el DNA y las células se colocaron en celdas de electroporación y se les dió un pulso eléctrico a 2 kV. Después del pulso se les agregó 1 mL de LB sin antibióticos, se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se incubó por 1 h a 37 °C con 200 rpm de agitación. Una vez terminado el periodo de incubación se plaquearon 100 µL y el resto de la transformación en cajas con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37 °C durante una noche (Figura 6).

El procedimiento es el mismo para realizar las electrocompetentes de *E. coli* ET12567, solo que en lugar de utilizar LB sin antibióticos se trabajó con LB con kanamicina y cloranfenicol ambos a 25 µg/mL. La transformación fue espatulada en cajas con estos antibióticos y ampicilina a 100 µg/mL (Figura 7) (Cordero., 2011).

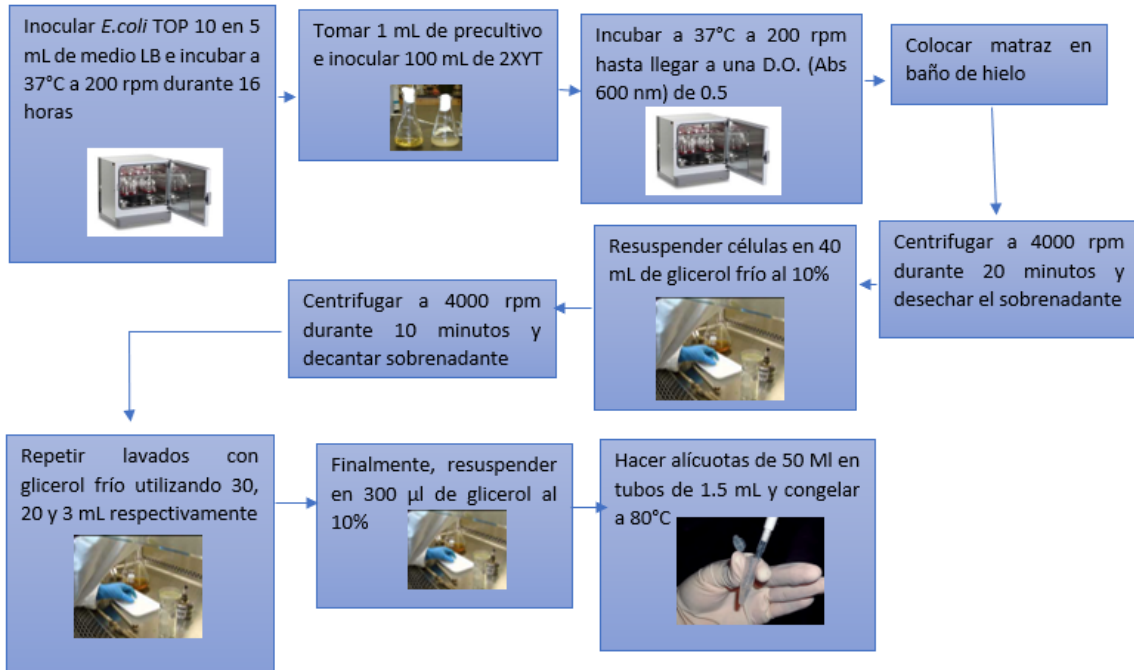


Figura 6. Diagrama general “Preparación de células electrocompetentes *E. coli* TOP10 y ET12567”

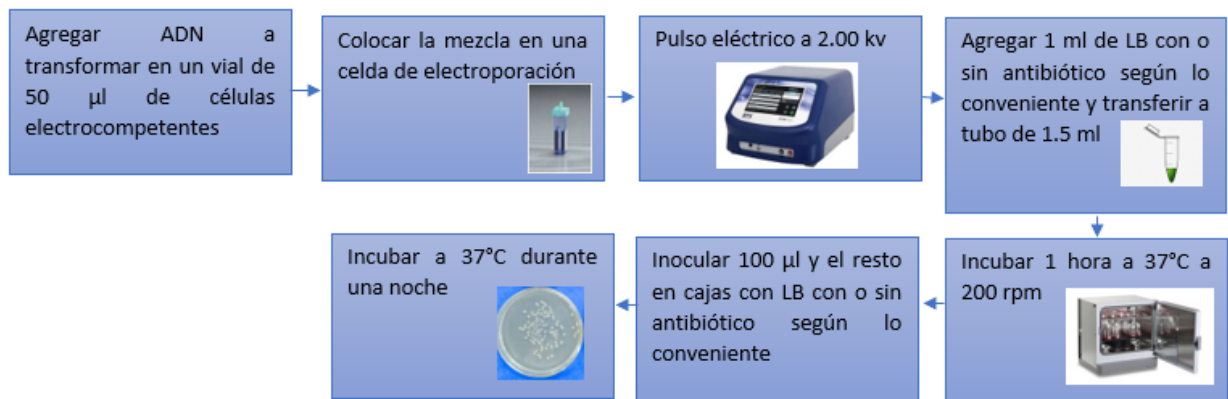


Figura 7. Diagrama general “Transformación de células electrocompetentes *E. coli* TOP10 y ET12567”

9.6. Preparación de células electrocompetentes y transformación de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B

Se prepararon células electrocompetentes como describe Cordero., (2011) con algunas modificaciones menores. Se cultivo *B. thuringiensis* en 3 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB) se incubará 16 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm. Se tomaron 2 mL del cultivo y se pasaron a 200 mL de TSB, se incubaron a 37 °C a 200 rpm hasta alcanzar una D.O. (600 nm) entre 0.2 y 0.4. Se dividió el cultivo en tubos de 50 mL y se centrifugaron a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C, se descargó el sobrenadante y se añadieron 10 mL de Buffer de electroporación frío (sacarosa 250 mM, $MgCl_2$ 1 mm, Hepes 1 mM, glicerol 10 %, esterilizado en autoclave), se resuspendieron las células y se centrifugaron los tubos a 3900 x g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado 4 veces más. Después del último lavado se resuspendieron las células en 1.3 mL de buffer de electroporación y se hicieron alícuotas de 100 µL (Figura VIII). Para transformar se mezclaron aproximadamente 300 ng de DNA plasmídico no metilado (producido en *E. coli* ET12567) con 100 µL de células electrocompetentes de Btk 404 o Bt Cry-B, la electroporación se llevó acabo usando un electroporador BTX ECM630 (San Diego CA, EE. UU.) Establecido en 2.0 kv, 300 Ω y 25 µF y un tiempo de exposición entre 4.5 y 6 ms. Después del pulso se añadió 1ml de medio BHI y se incubaron a 37 °C a 200 rpm durante 2 horas. Las células transformadas se seleccionaron haciéndolas crecer en TSA suplementado con eritromicina (25 µg/mL) a 37 °C durante toda la noche.

Se transformaron las construcciones ΔPC7, ΔTCP8, pThur y el vector pHT3101 en células de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT 404 y *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B (Figura 9).



Figura 8. Diagrama general “Preparación de células electrocompetentes *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B

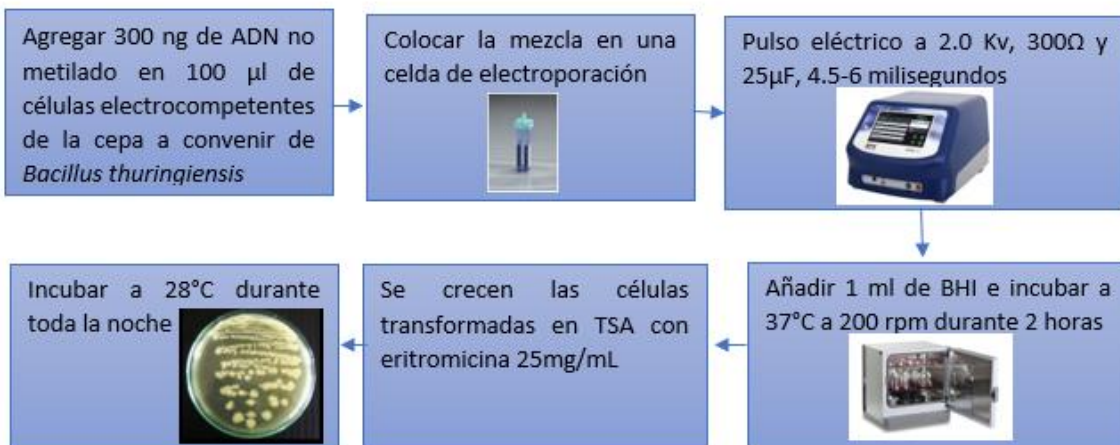


Figura 9. Diagrama general “Transformación de células electrocompetentes *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B

9.7. Producción de Thurincina H

Una colonia de cada una de las transformantes de Btk 404 y Cry^B y de las cepas silvestres se cultivaron en 5 mL de TSB durante la noche a 28 °C y 200 rpm, se usó 1 mL (D.O₆₀₀ de 6) de cada precultivo para inocular 200 mL de TSB con o sin eritromicina (25 µg/mL) según corresponda. Los cultivos se incubaron a 28 °C, 200 rpm, y se tomaron 25 mL de muestra de cada uno a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, y 48 h, cada muestra se centrifugo a 5000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se colectaron y las proteínas se precipitaron mediante la adición de sulfato de amonio al 40 % de saturación durante 16 h a 28 °C. Las muestras se centrifugaron a 8000 x g durante 20 min a 4 °C, y las proteínas precipitadas se resuspendieron en 250 µL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0) y se dializaron 16 h a 4 °C en el mismo buffer. Los extractos crudos dializados se cuantificaron mediante Bradford (BioRad, Hercules CA, EE. UU.) La actividad de la bacteriocina se midió utilizando el método de difusión en pozos (Figura 10).

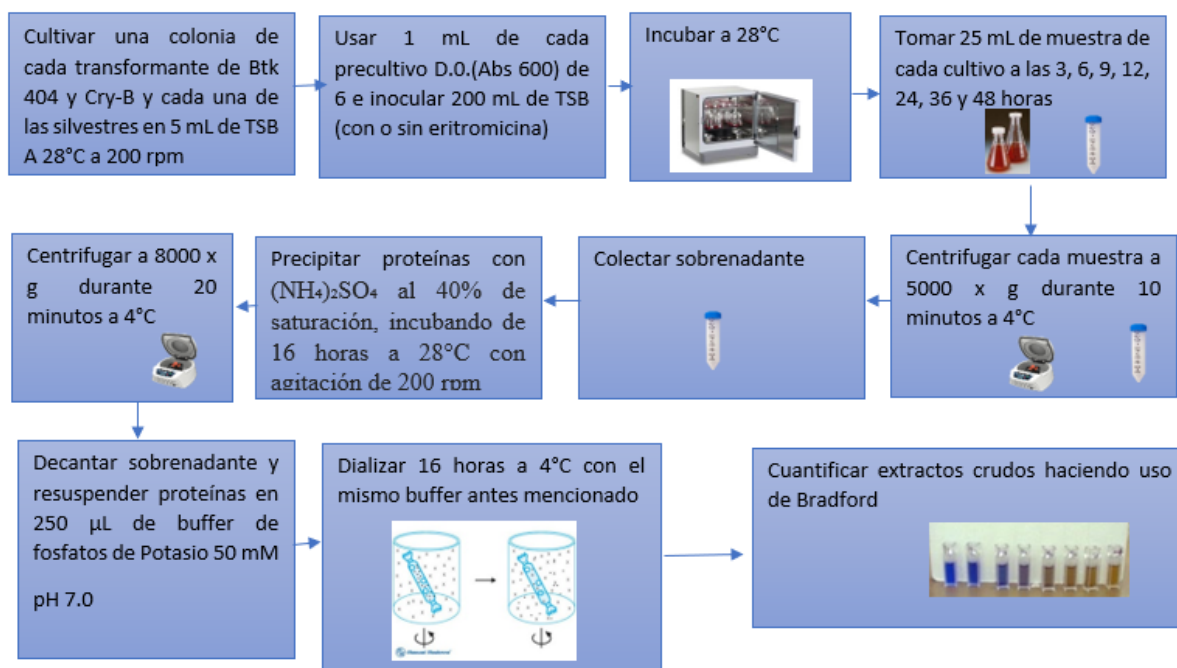


Figura 10. Diagrama general “Producción de Thurincina H”

9.8. Actividad antimicrobiana

Para medir la actividad antimicrobiana, los extractos proteicos obtenidos anteriormente se probaron por el método de difusión en pozos. Para esto se mezclaron 20 mL de agar de pozos (1.4 g/L de TSB y 12 g/L de agar bacteriológico) con 140 μL ($\sim 1 \times 10^9$ células/mL) de *Bacillus cereus* 163 que sirvió como bacteria indicadora por ser sensible a Thurincina H. La mezcla se vertió en cajas Petri y se dejó solidificar. Una vez gelificadas se horadaron pozos de 8 mm de diámetro en el agar y luego se añadieron a cada pozo 90 μL de los diferentes extractos crudos. Las cajas Petri se incubaron durante 16 h a 4 °C para permitir la difusión de las muestras. Finalmente, los cultivos se incubaron a 28 °C durante 1 día y después se midieron los diámetros de las zonas de inhibición y se calculó la actividad específica (Figura 11)

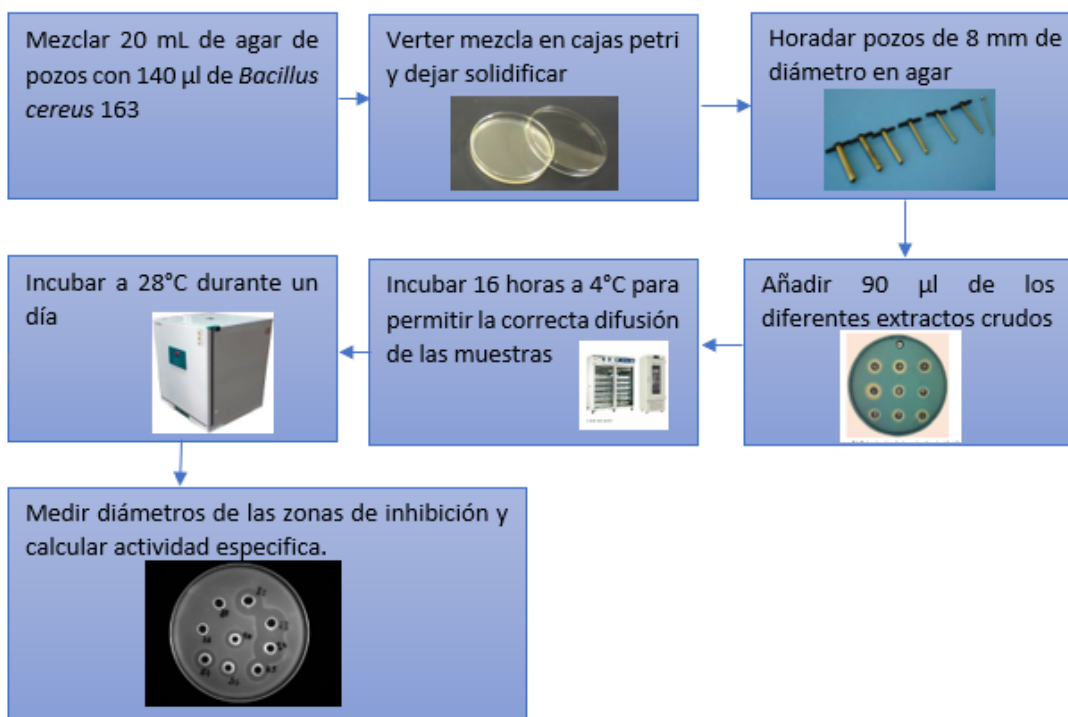


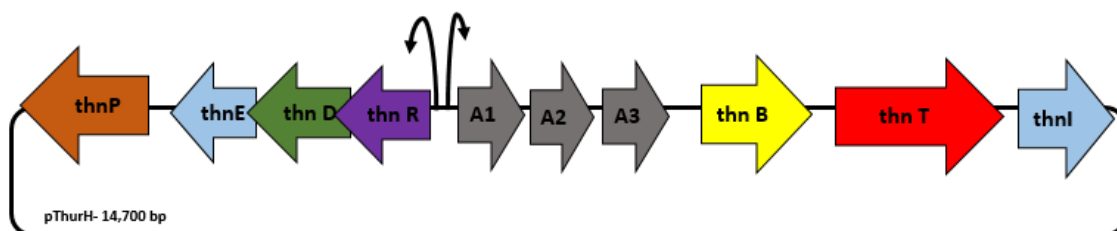
Figura 11. Diagrama general “Actividad antimicrobiana mediante el método de pozos”.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Amplificación de ΔP y ΔT

En la figura 12 se muestra el diagrama representativo del clúster genético de la Thurincina H, clonado en el vector lanzadera pHT3101 el cual consta de 10 genes implicados en la síntesis, procesamiento, maduración e inmunidad del péptido antimicrobiano maduro y activo. Contiene tres genes estructurales en tándem que codifican para la Thurincina H (*thnA1*, *thnA2* y *thnA3*), el *thnP* codifica para una putativa serin-proteasa de la familia S8, *thnB* codifica para la enzima radical SAM, encargada de llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales; *thnD*, *thnE* codifican para una proteína de unión a ATP y una proteína de transmembrana, respectivamente, ambas pertenecientes al sistema de transporte ABC e implicadas en el mecanismo de inmunidad y *thnT*, codifican para una proteína de transporte de tipo ABC que podría estar implicada en la secreción de la bacteriocina; *thnR* codifica para un regulador transcripcional de la familia GntR y *thnI* codifica una proteína de la cual hasta el momento no se conoce su función (Sit., 2011).

Figura 12. Clúster de la Thurincina H, clonado en el vector pHT3101. Modificada de Casados-Vázquez, 2016.



Se denominó ΔP al fragmento que contiene los genes *thnE*, *thnD* y *thnR*, el fragmento ΔT contiene el gen *thnB* únicamente. Estos fragmentos se clonaron dentro de dos construcciones que contenían el resto de los genes necesarios para completar el clúster excluyendo los genes de interés. Para ΔP se utilizó la construcción C7 y para ΔT la construcción C8P (Figuras 14 y 15). Para amplificar ΔP y ΔT se utilizó DNA plasmídico de la construcción pThur (pHT3101 con el clúster completo de thurincina H). Primero se extrajo DNA de columna de

la construcción pThur (Figura 13A). Se obtuvo un amplicón de ~2100 bp correspondiente al tamaño de ΔP y otro amplicón ~1500 bp correspondiente a ΔT (Figura 13B).

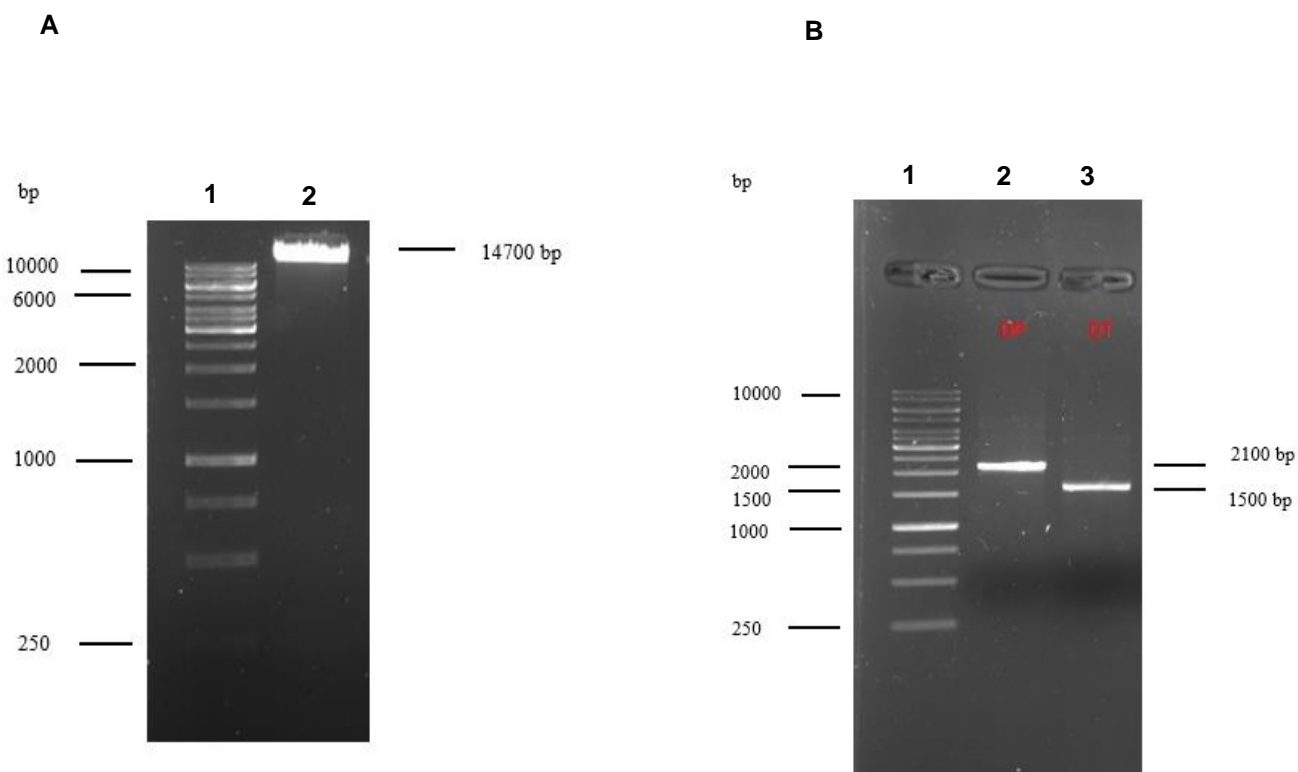


Figura 13. DNA de columna del clúster genético de la thurincina H y amplificación de ΔP y ΔT . **A.** Carril 1: GeneRuler 1kb, Carril 2: DNA de columna del clúster genético de la Thurincina H **B.** Carril 1: GeneRuler 1kb, Carril 2: Amplicón de ΔP correspondiente a 2100 Bp, Carril 3: Amplicón de ΔT correspondiente a 1500 bp.

10.2. Generación de las construcciones $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$

Para generar los plásmidos correspondientes, se utilizaron dos construcciones previamente reportadas, cada una con la mitad del clúster genético responsable de producir la Thurincina H madura y activa (C8P y C7) (Casados-Vázquez., 2016). Los plásmidos C8P y C7 contenían, respectivamente, los genes río arriba (*thnARDEP*) y río abajo (*thnABTI*) clonados en el vector pHT3101, el cual es funcional para *E. coli* y *B. thuringiensis*. En las figuras 14 y 15 se esquematiza la estrategia general de ensamble para obtener dichos plásmidos.

10.3. Estrategia de ensamble del plásmido $\Delta PC7$

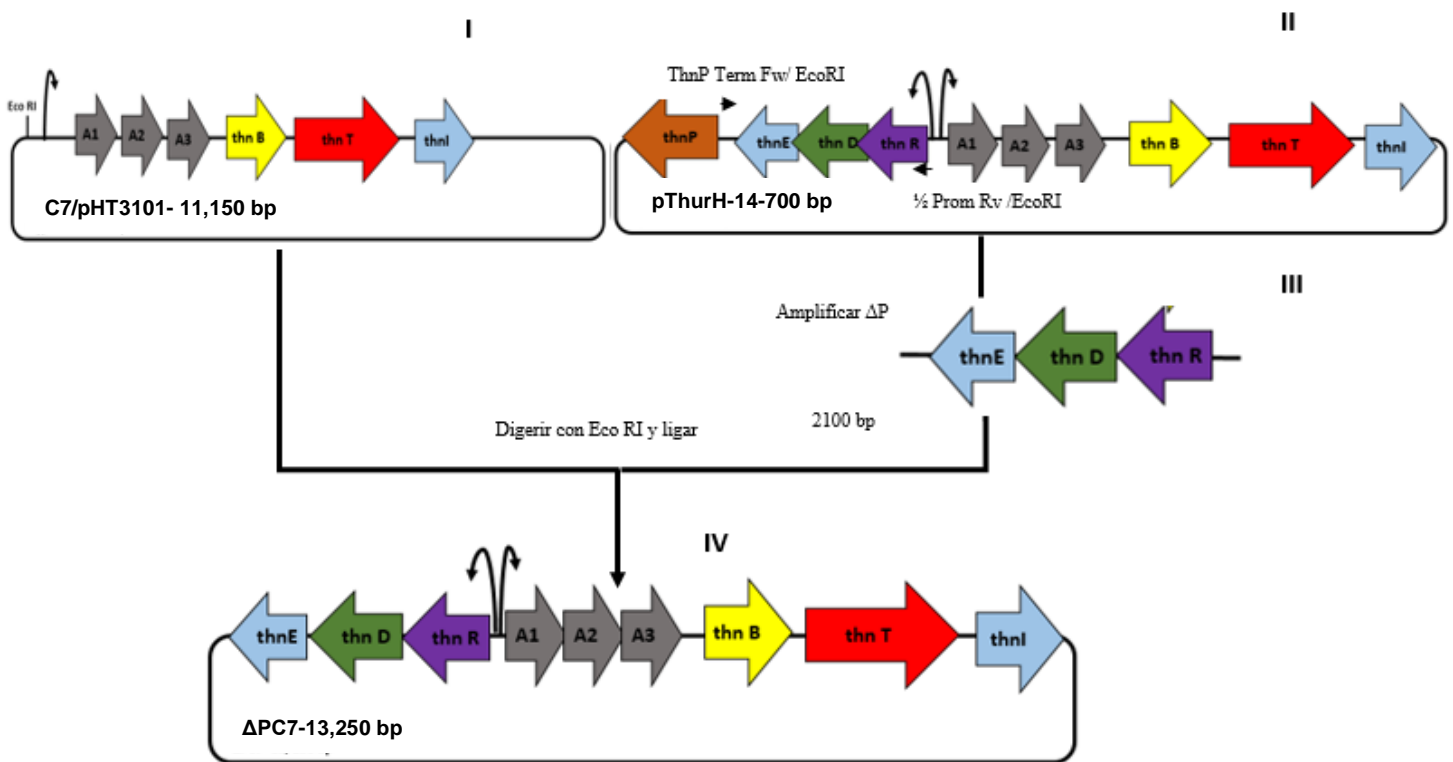


Figura 14. Estrategia de ensamble para obtener la clona deletional $\Delta PC7$. La construcción se obtuvo utilizando el cassette genético C7 (Casados-Vázquez *et al.*, 2016). (I) La construcción C7 abrió con EcoRI. (II, III) A partir de la construcción pThur se amplificaron los genes de *thnEDR* (ΔP), este amplicón se digirió con EcoRI. (IV) Se ligó la construcción C7 linealizada y el amplicón ΔP y se generó el plásmido $\Delta PC7$, que contiene los genes *thnEDRA(1,2,3),B,T,I* de la thurincina H en pHT3101.

La construcción $\Delta PC7$ tiene un tamaño de 13,250 bp (11,150 bp de C7 y 2100 bp de ΔP). Esta construcción contiene los genes que codifican para, un transportador ABC (*thnE* y *thnD*), un regulador transcripcional (*thnR*), así como los tres genes estructurales en tándem (*thnA1*, *thnA2* y *thnA3*) que codifican para la thurincina H; además, contiene el promotor silvestre, el gen que codifica para la proteína radical SAM (*thnB*), el sistema de transporte (*thnT*) y un gen del que hasta el momento se desconoce su función (*thnI*).

En esta estrategia de ensamblaje, se amplifica por PCR el fragmento *thnE-thnR* (ΔP) con oligonucleótidos específicos y un único sitio de restricción para la clonación del fragmento *thnEDR* detrás de los genes estructurales en la construcción C7 linealizada mediante digestión con EcoRI. En la figura 16 Se muestra la construcción C7 (11,100 bp) clonada en

el vector pHT3101 linealizada con EcoRI, se muestra la amplificación de *thnEDR* (ΔP) partiendo de la construcción pThur utilizando los oligonucleótidos ThnP Term Fw/ EcoRI – ½ Prom Rv /EcoRI (2,100 bp) (Tabla IV) listos para la ligación, para la reacción se usó una relación vector-inserto 1:5. La ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* Top10. Se monitorearon colonias mediante extracción de DNA, digestión con EcoRI por 1h y se corrió en un gel de agarosa al 1%.

10.4. Estrategia de ensamble del plásmido $\Delta TC8P$

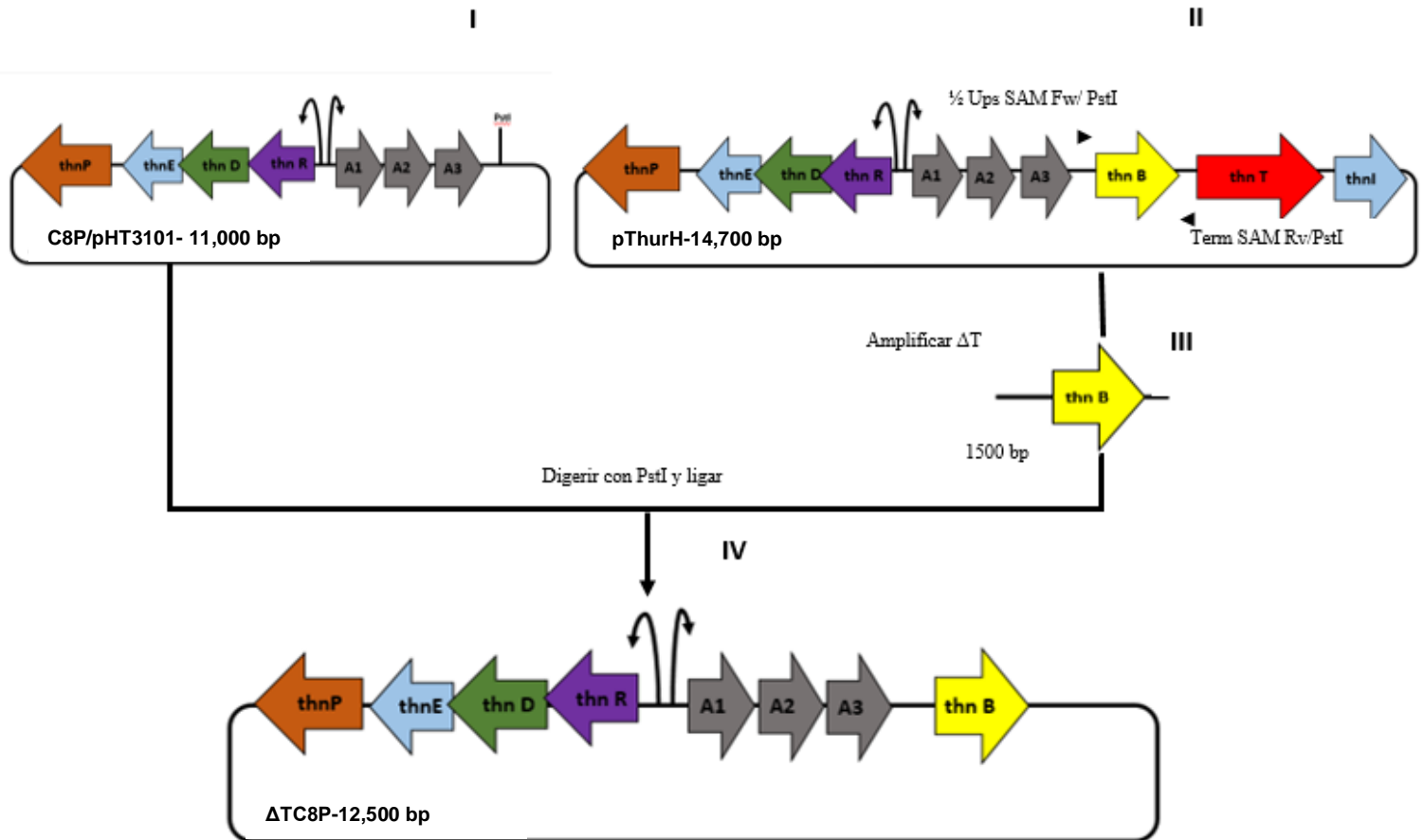


Figura 15. Estrategia de ensamble para obtener la clona deletional $\Delta TC8P$. La construcción se obtuvo utilizando el caset genético C8P (Casados-Vázquez *et al.*, 2016). (I) La construcción C8P se abrió con *Pst* I. (II, III) A partir de la construcción C2 se amplificó el gen *thnB*(ΔT), este amplicón se digirió con *Pst* I. (IV) Se ligo la construcción C8P linealizado con el amplicón ΔT y se generó el plásmido $\Delta TC8P$, que contiene los genes *thnPEDRA*(1,2,3),*B* de la thurincina H en pHT3101.

La construcción Δ TC8P tiene un tamaño de 12,600 bp (11,100 bp de C7 y 1500 bp de Δ P). Esta construcción contiene los genes que codifican para una peptidasa de la familia S8 (*thnP*), un transportador ABC (*thnE* y *thnD*), un regulador transcripcional (*thnR*), así como los tres genes estructurales en tándem (*thnA1*, *thnA2* y *thnA3*) que codifican para la thurincina H, esta construcción contiene el promotor silvestre, el gen que codifica para la proteína radical SAM (*thnB*). En esta estrategia de ensamblaje, se amplifica por PCR el fragmento *thnB*, con oligonucleótidos específicos y un único sitio de restricción para la clonación del fragmento *thnB* delante de los genes estructurales en la construcción C8P linealizada mediante digestión con PstI. En la figura 16, se muestra la amplificación de *thnB*(Δ T) partiendo de la construcción C2 utilizando los oligonucleótidos ½ Ups SAM Fw/ PstI – Term SAM Rv/PstI (1500 bp) (Tabla IV). En la figura 16 se muestra la construcción C8P (11,100 bp) clonada en el vector pHT3101 linealizada con PstI. El amplicón de *thnB* (Δ T) y la construcción C8P listos para la ligación se utilizó una relación vector-inserto 1:5. La ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* Top10. Se monitorearon colonias mediante extracción de DNA, digestión con PstI por 1h y se corrió en un gel de agarosa al 1%.

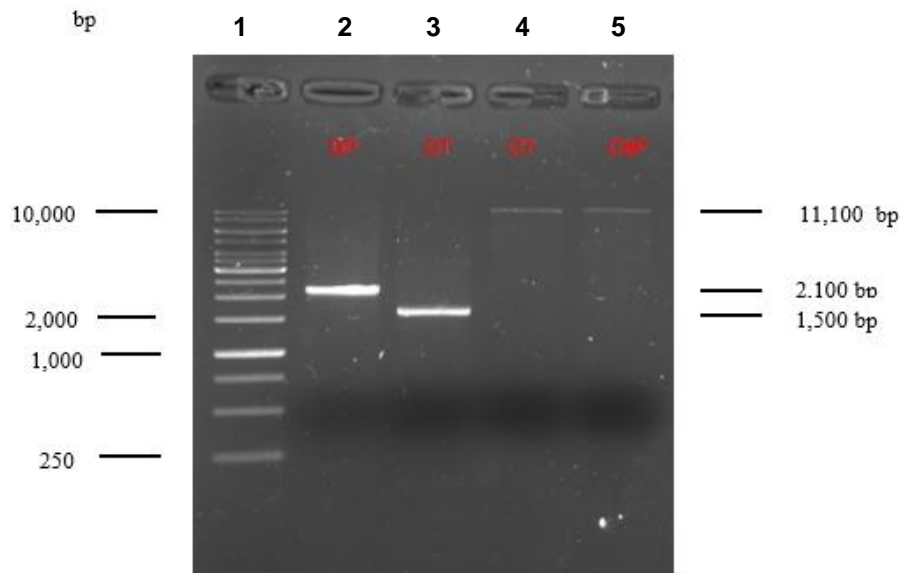


Figura 16. Vectores C7 Y C8P e insertos Δ P y Δ T para reacción de ligación de las deleciones Δ PC7 y Δ TC8P. Carril 1: GeneRuler 1kb Plus DNA ladder, Carril 2: Fragmento Δ P. Carril 3: Fragmento Δ T. Carril 4: Construcción C7 linealizada mediante digestión con EcoRI. Carril 5: Construcción C8P linealizada mediante digestión con PstI.

Las construcciones se confirmaron mediante análisis de restricción con EcoRI y PstI, que produjo fragmentos de 11,150 bp y 2100 bp correspondientes al casete linealizado de C7 y *thnEDR* (Fig. 17A) y de 11,000 y 1500 bp correspondientes a C8P y *thnB* (Fig. 17B).

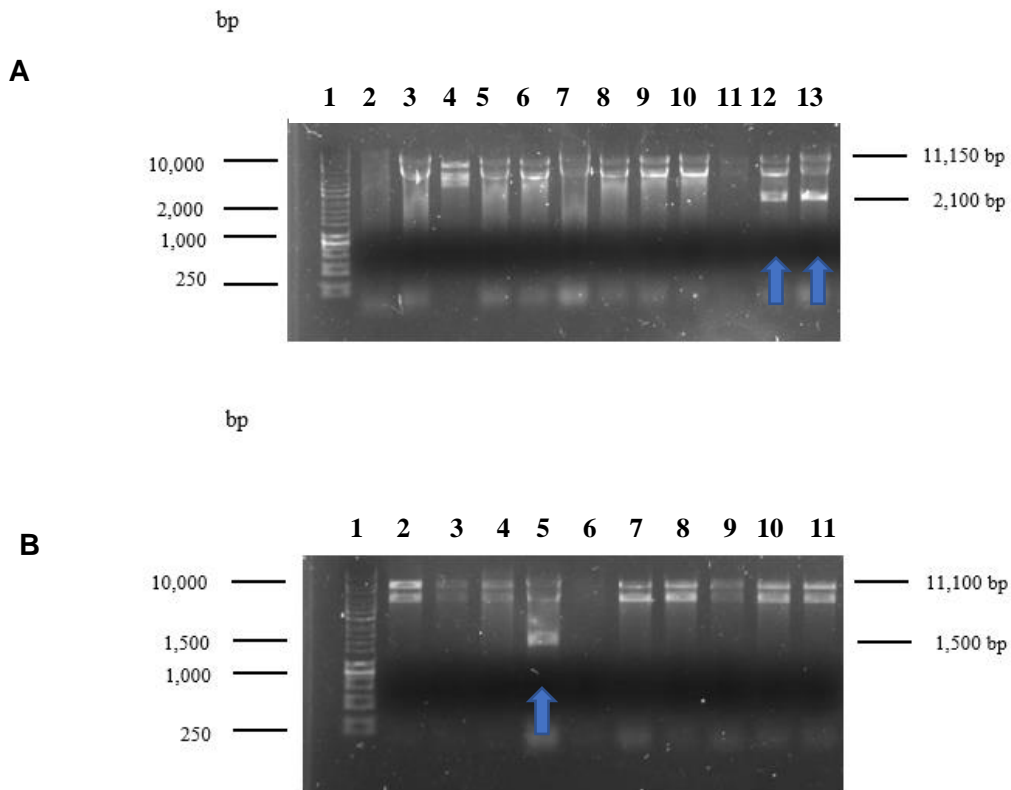


Figura 17. Monitoreo de las clonas deletoriales $\Delta PC7$ y $\Delta TC8P$ **A.** Digestión con EcoRI y PstI de diferentes colonias monitoreadas de la ligación $\Delta PC7$. Carril 1: GeneRuler 1kb Plus DNA ladder, Carril 2 -13: Digestión de doce colonias de la clonación $\Delta PC7$ monitoreadas con EcoRI por 1h. **B.** Digestión con PstI de diferentes colonias monitoreadas de la ligación $\Delta TC8P$. Carril 1: GeneRuler 1kb Plus DNA ladder, Carril 2 -11: Digestión de diez colonias de la clonación $\Delta TC8P$ monitoreadas con PstI por 1h. Las flechas en azules indican los carriles en los cuáles se obtienen colonias con el patrón de digestión positivo para la clonación.

10.5. Corroboración de sentido

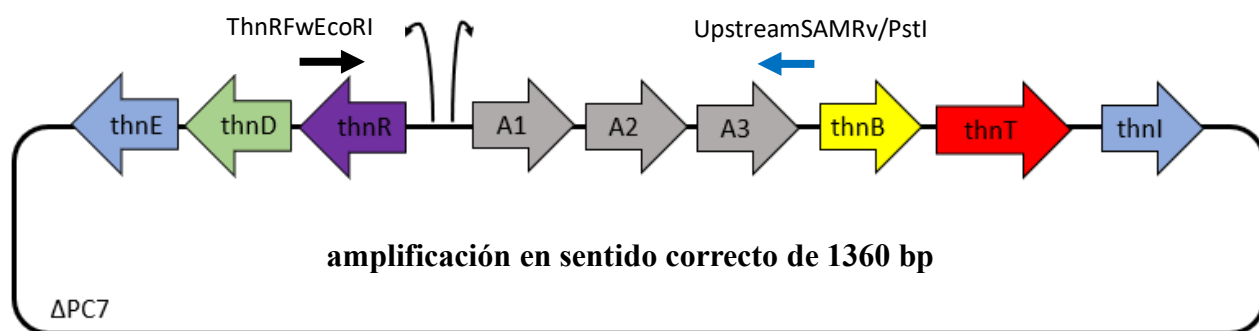
Debido a que esta estrategia de clonación se llevó a cabo con un solo sitio de restricción EcoRI en el caso de la construcción $\Delta PC7$ y PstI en el caso de la construcción $\Delta TC8P$, se les corroboró el sentido de la clonación mediante PCR. Las clonas monitoreadas fueron la 12 y 13 para $\Delta PC7$ y clona 5 para $\Delta TC8P$.

Se realizaron dos ampliaciones para verificar que el fragmento clonado se encontrara en el sentido transcripcional correcto con los oligonucleótidos de la tabla IV.

Para determinar el sentido de la clona $\Delta PC7$ se utilizaron los oligonucleótidos UpstreamSAMRv/PstI con ThnRFwEcoRI y ThnRRvEcoRI, las clonas en sentido amplificaron un fragmento de 1360 bp con los oligonucleótidos UpstreamSAMRv/PstI y ThnRFvEcoRI y no amplificaron con el par UpstreamSAMRv/PstI y ThnRRwEcoRI (Fig. 20). En el caso de la construcción $\Delta TC8P$ se utilizaron los oligonucleótidos PromThurFw/SphI con ThnTUpsRv/EcoRI y ThnBNewFw, las clonas en sentido amplificaron un fragmento de 2539 bp con el par PromThurFw/SphI y ThnTUpsRv/EcoRI, mientras que el par PromThurFw/SphI y ThnBNewFw no amplificó (Fig. 20).

En los esquemas 18 y 19 se puede apreciar mejor la estrategia para corroborar el sentido de la ligación.

A



B

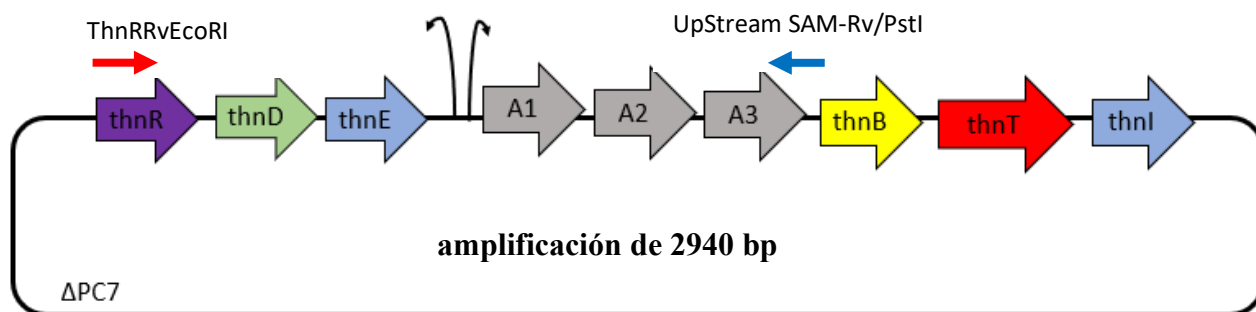


Figura 18. Esquema de las variantes de clonación $\Delta PC7$: sentido y antisentido. **A.** Oligonucleótidos usados para confirmar el sentido de la ligación $\Delta PC7$ **B.** Oligonucleótidos usados para confirmar que la ligación estuviera en sentido incorrecto.

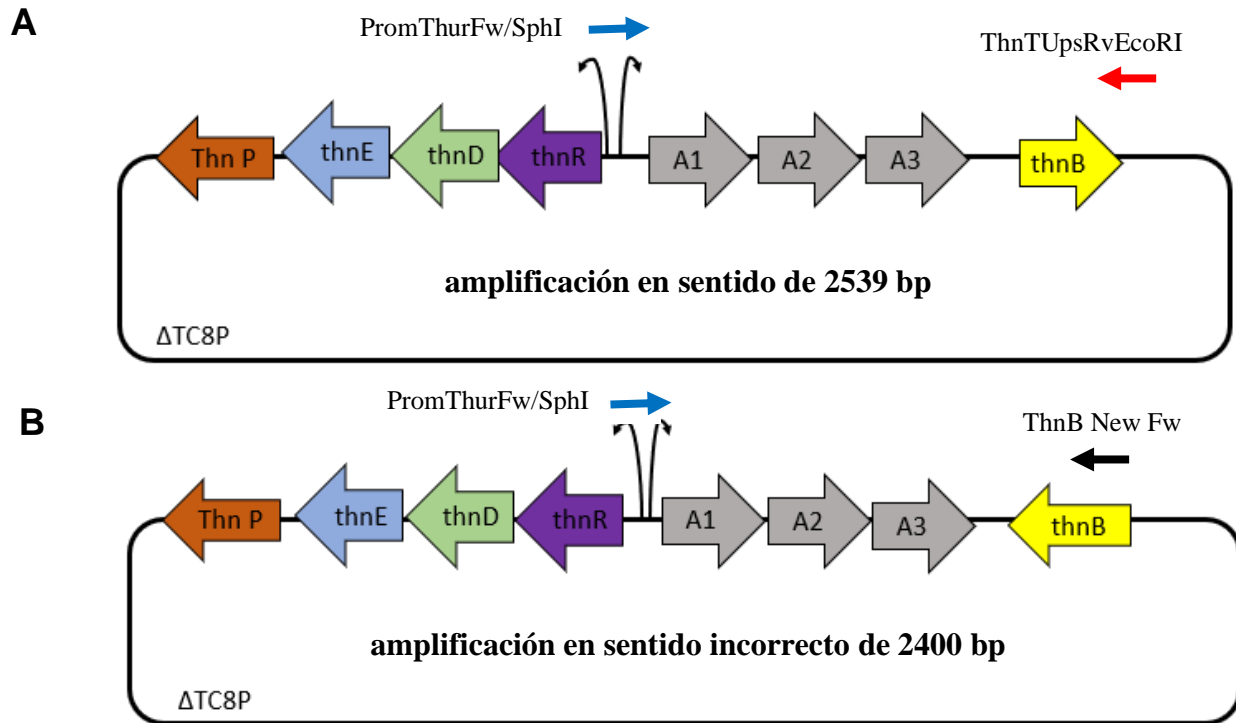


Figura 19. Esquema de las variantes de clonación Δ TC8P: sentido y antisentido. **A.** Oligonucleótidos usados para confirmar el sentido de la ligación Δ TC8P **B.** Oligonucleótidos usados para confirmar que la ligación en sentido incorrecto.

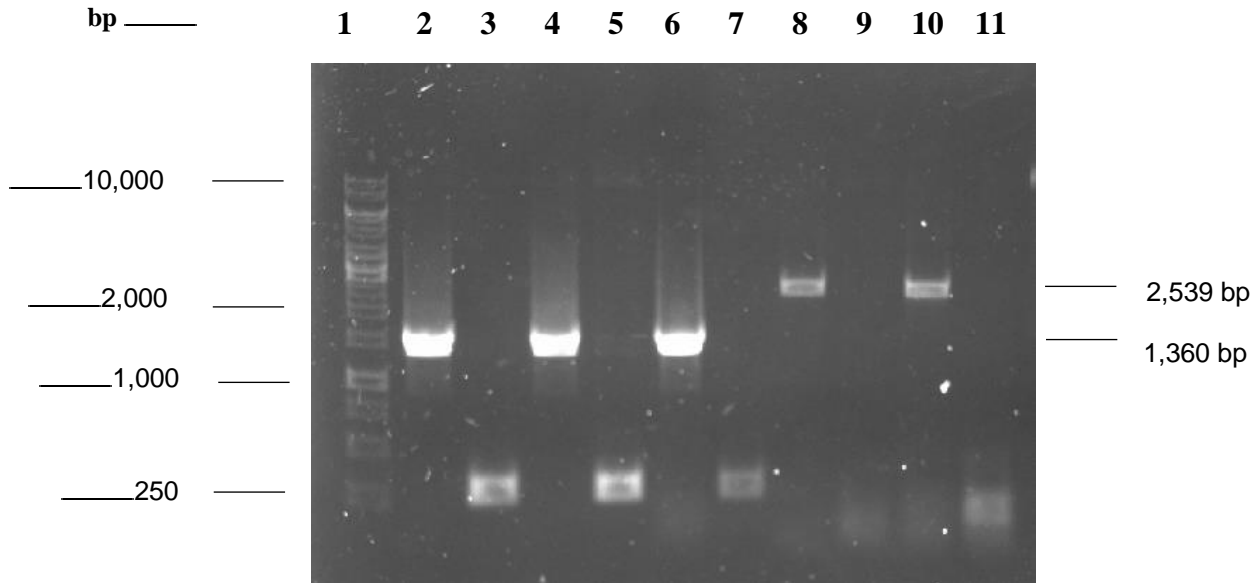


Figura 20. Confirmación de sentido de la clonación Δ PC7 y Δ TC8P mediante PCR. **A.** Carril 1, GeneRuler 1 kb. Carriles 2 y 4, amplificación de las clonas 12 y 13 con los oligonucleotidos UpstreamSAMRv/PstI y ThnRFw/EcoRI. Carriles 3 y 5 amplificaicón de las clonas 12 y 13 con los oligonucleótidos - UpstreamSAMRv/PstI y ThnRRv/EcoRI. Carril 6, control positivo, amplificación con los oligonucleotidos UpstreamSAMRv/PstI y ThnRFw/EcoRI sobre DNA de pThur. Carril 7, control negativo. Carril 8 amplificación de la clona 5 con los oligoculcleotidos PromThurFwSphI y ThnTUpsRvEcoRI. Carril 9 amplificaicón de la clona 5 con los oligonucleótidos - PromThurFwSphI y ThnB-New-Fw. Carril 10, control positivo, amplificación con los oligonucleotoidos PromThurFwSphI y ThnTUpsRvEcoRI sobre DNA de pThur. Carril 11, control negativo.

10.6. Transformación de Δ PC7 Y Δ TC8P en *B. thuringiensis*.

10.6.1. Selección de cepas *B. thuringiensis* para la síntesis heteróloga de la Thurincina H

Para determinar la funcionalidad de los plásmidos Δ PC7 Y Δ TC8P, estos se transformaron en la cepa *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT 404 Y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B. Se eligieron estas cepas debido a que de manera natural son sensibles y no producen

Thurincina H (Barboza-Corona., 2007) y al ser cepas de *Bacillus thuringiensis*, son compatibles con el plásmido que alberga el clúster (pThurH–pHT3101). *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 produce otras bacteriocinas mientras que *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B no.

10.6.2. Expresión de las deleciones Δ PC7 Y Δ T8P

Utilizando las dos cepas de *B. thuringiensis* antes mencionadas (*B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT 404 Y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B) se realizaron los cultivos siguientes: Bt/pThurH, (control positivo) Bt WT (control negativo), Bt / Δ PC7, Bt / Δ TC8P Y Bt/pHT3101. Se colectaron muestras a partir de las 3 h hasta las 48 h, para determinar el efecto en la expresión de las cepas con las deleciones en el clúster de la Thurincina H.

Las muestras se precipitaron con sulfato de amonio al 40%, se dializaron y se evaluó la actividad antibacteriana contra *B. cereus* 183, mediante el método de difusión en pozos. Se midieron las zonas de inhibición y se determinó la actividad específica de cada extracto crudo a los diferentes tiempos de las 5 diferentes cepas contra la cepa antes mencionada (Figura 21 y 22.)

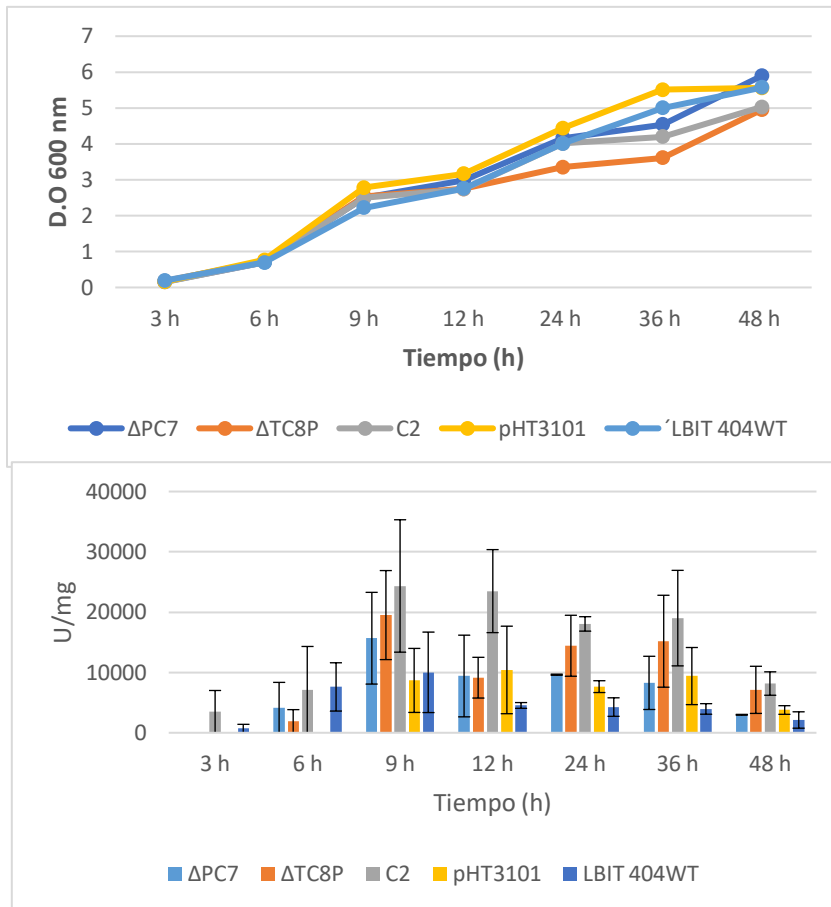
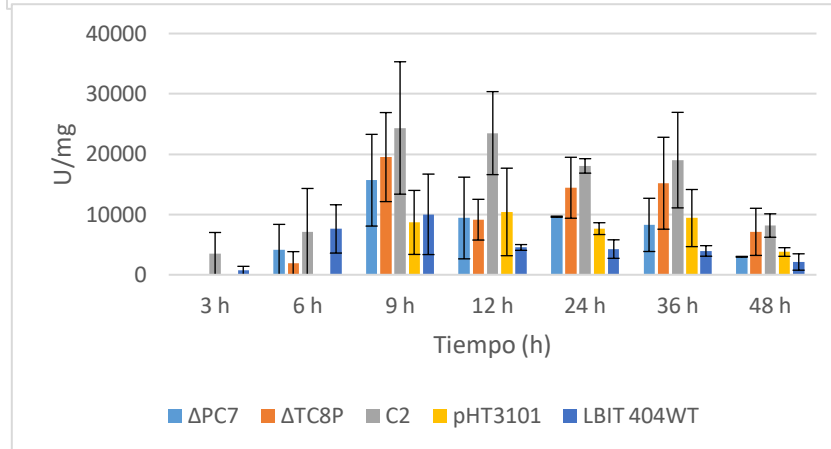
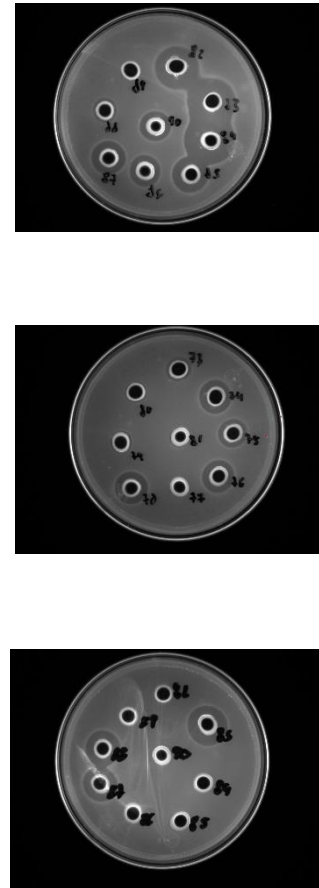
A**B****C**

Figura 21. Producción de Thurincina H en cepas recombinantes y WT de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404. a diferentes horas **A.** Curva de crecimiento de las 5 cepas transformadas con las deleciones correspondientes, el clúster completo de la thurincina H, el vector pHT3101 vacío y la cepa silvestre sin transformar. **B.** Actividad específica de cada cepa recombinante y WT a diferentes horas, una unidad (U) se definió como 1 mm² de la zona de inhibición que se determina por el ensayo de difusión en pozos que se puede observar a la derecha **C.** Panel superior corresponde a la actividad observada a las 36 horas en la cepa LBIT404/C2 (Pozos 82,83,84) panel de en medio con actividad a las 36 horas de cepas LBIT404/ΔPC7 Y ΔTC8P panel inferior con actividad a las 24 horas de cepa LBIT404/C2

El mismo experimento se realizó en una cepa que no contiene plásmidos y que además no produce ninguna bacteriocina. Es interesante que en este contexto ninguna de las construcciones donde se eliminaron los genes *thnT* y *thnP* tuvieron actividad (figura 22, panel B). Solo se observó actividad en la cepa Cry-B transformada con el clúster completo.

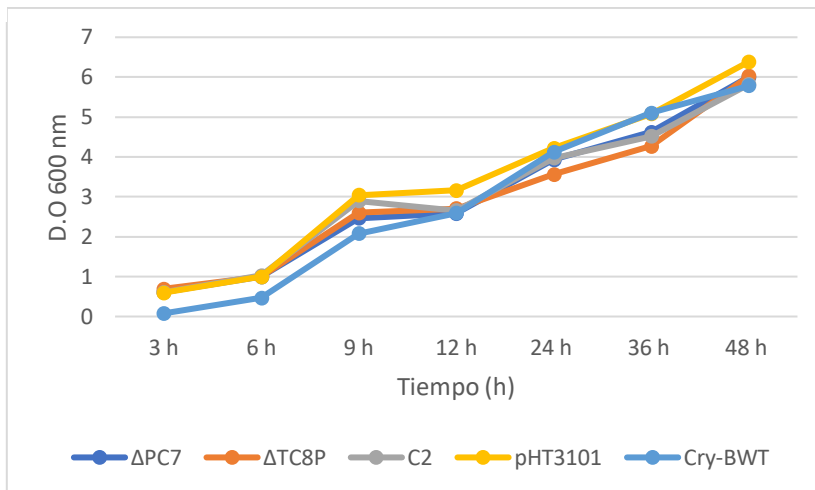
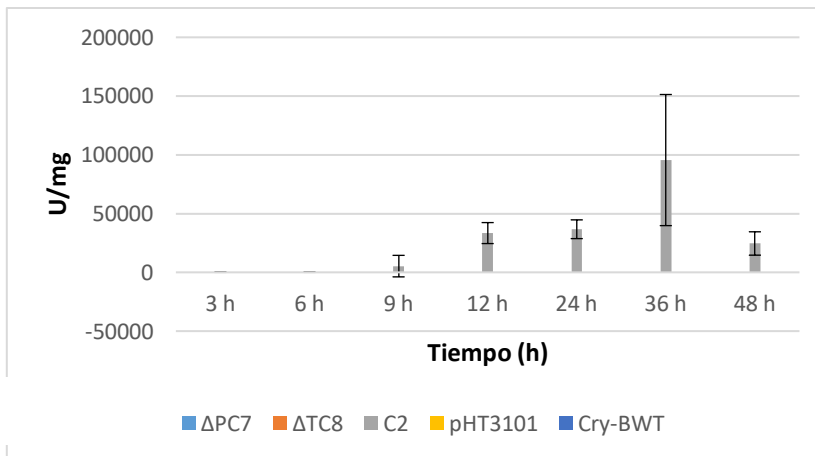
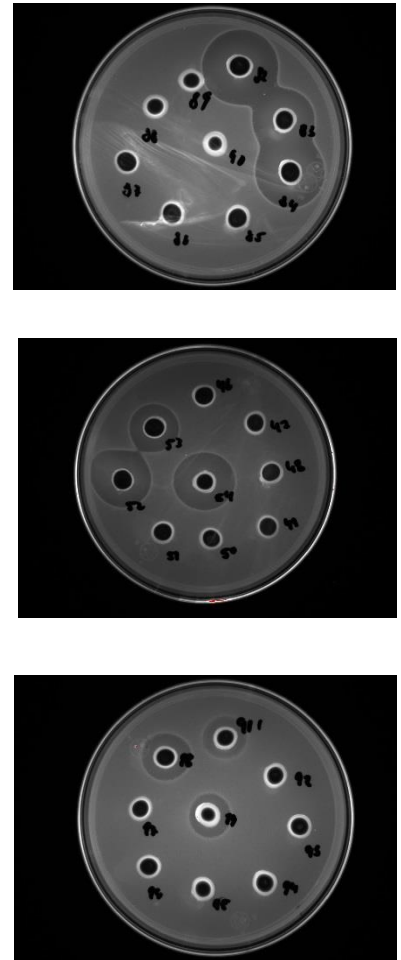
A**B****C**

Figura 22. Producción de Thurincina H de cepas recombinantes y WT de *B. thuringiensis* subsp. *Kenya* Cry-B. a diferentes horas **A.** Curva de crecimiento de las 5 cepas transformadas con las deleciones correspondientes, el clúster completo de la thurincina H, el vector pHT3101 vacío y la cepa silvestre sin transformar. **B.** Se muestra la actividad específica de cada bacteria a diferentes horas, una unidad (U) se definió como 1 mm² de la zona de inhibición que se determina por el ensayo de difusión en pozos que se puede observar a la derecha **C.** Panel superior corresponde a la actividad observada a las 36 horas en la cepa Cry-B/C2 (Pozos 82,83,84) panel de en medio con actividad a las 12 horas de la cepa Cry-B/C2 (Pozos 52,53,54) panel inferior con actividad a las 48 horas de cepa Cry-B/C2 (Pozos 91,98,99)

11. Discusión

Se trabajó con dos cepas heterólogas las cuales son *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B, a pesar de que en las deleciones se esperaba una ausencia total de actividad bactericida contra *B. cereus* 183 en las cepas transformadas de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404, así como en la WT se observó actividad, esto podría ser debido a que a pesar de que *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 no produce originalmente la Thurincina H, pero si produce otras bacteriocinas como la Kenyacina 404; Esta cepa fue seleccionada por ese hecho, lo que sugiere que contiene la maquinaria necesaria para su síntesis, incluyendo genes para transporte y procesamiento. Eso nos hizo pensar que estos genes pudieran servir como complementos en el caso donde se transformaron las construcciones con eliminación de *thnP* y *thnT*. En el caso de *B. thuringiensis* subsp. *Kenyae* Cry-B hay una ausencia total de la actividad específica contra *B. cereus* 183 en las cepas transformadas con las deleciones ($\Delta PC7$ Y $\Delta TC8P$) así como en aquellas cepas transformadas con el vector vacío y las cepas silvestre sin transformar. En cuanto a las cepas transformadas con el clúster completo de la Thurincina H hay una clara actividad específica.

La ausencia de la actividad antimicrobiana en la mutante sin el gen *thnP* ($\Delta PC7$) se debe a que el gen *thnP* codifica para una probable serin-proteasa de la familia S8 encargada del corte del péptido señal, al eliminar este gen se impide la producción de la serin proteasa evitando como consecuencia que el péptido señal sea cortado y por tanto la Thurincina H no termina su maduración lo que genera una proteína inactiva.

En el caso de la mutante que no contiene el gen *thnT* ($\Delta TC8P$) también se pierde completamente la actividad, esto puede deberse a que la Thurincina H una vez sintetizada dentro de la célula no puede ser secretada al medio. Esta reportado que transportadores del tipo ABC son indispensables para el transporte de los péptidos antimicrobianos. En el caso de nisina tiene los genes *nisF*, *E*, *G*, la Thurincina CD y en el caso de Thurincina H se requiere de *thnT*.

12. CONCLUSIONES

- Se eliminaron los genes *thnP* y *thnT* que están presentes en el clúster pThur que codifica a la Thurincina H.
- Se generaron las mutantes delecionales $\Delta PC7$ (sin *thnP* que codifica para una serin proteasa de la familia 8) y $\Delta TC8P$ (sin *thnT* que codifica para un transportador del tipo ABC).
- Se observo el efecto de las mutantes delecionales sobre la síntesis de Thurincina H en las cepas heterólogas *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT404 y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B haciendo uso del ensayo en pozo contra *Bacillus cereus* 163 que sirve como bacteria indicadora comparándolo con el clúster completo de la Thurincina H
- *B.thuringiensis* LBIT 404 no tuvo una pérdida de actividad total ya que por ser productora de otras bacteriocinas podría procesar pequeñas cantidades de Thurincina H, la cepa Cry-B la cual no es productora de bacteriocinas no fue capaz de sintetizar Thurincina H cuando se probaron las mutantes carentes de los genes *thnP* y *thnT*.
- La carencia de estos genes lleva a la pérdida de actividad de las cepas transformadas contra una cepa objetivo (*Bacillus cereus* SF 163).
- Se cumplió con la finalidad de este trabajo, el cual era conocer si los genes *thnP* Y *thnT* son esenciales para el procesamiento de la Thurincina H.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2010). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 201-232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- Casados Vázquez, L., Bideshi, D. K., & Barboza Corona, J. (2018). Regulator ThnR and the ThnDE ABC transporter proteins confer autoimmunity to thurincin H in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*. doi:doi.org/10.1007/s10482-018-1124-7
- Casados Vázquez, L., Bideshi, D., & Barboza Corona, J. (2017). The thnR gene is a negative transcription regulator of the thurincin H genetic cassette in *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *Arch Microbiol*, 385-390.
- Casados-Vázquez, L., Bideshi, D. y Barboza-Corona, J. (2016). The *thnR* gene is a negative transcription regulator of the thurincin H genetic cassette in *Bacillus thuringiensis* subsp. *Morrisoni*. *Arch Microbiol*. DOI 10.1007/s00203-016-1298-1.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., K, B. S., Hassen, A., . . . Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol* , 243-247.
- Cordeiro, J. X., Laia, M.L., Goncalves, J.F., Bergamasco, V.B., y Lemos, M. (2011). *Bacillus thuringiensis* mutant increase activity against *Spodoptera frugiperda* larvae. *Aust J Basic Appl Sci* 5:521–531
- De la Fuente-Salcido, N., Casados-Vázquez, L. y Barboza-Corona, J. (2013). Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can. J. Microbiol.* 59: 515–522 dx.doi.org/10.3-0284
- Del Carmen Monroy Dosta., C. B. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73 , 63-72.
- Dusterhus, S., Karas, M., & Entian, K. D. (2003). Activation of subtilin precursors by *Bacillus subtilis* extracellular serine proteases subtilisin (AprE), WprA, and Vpr. *Biochem. Biophys.*, 48-54.
- Guzmán, A. (2016). Tesis de Maestría; Estabilidad fisicoquímica de una bacteriocina obtenida de *Lactobacillus graminis* con potencial control de bacterias patógenas y fitopatógenas. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.*, 16-17.
- Kanneth J. Ryan., C. G. (2011). *Sherris Microbiología Médica 5ta edición*. Mac Graw Hill 370-372.

- Lee, H., J. J. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology letters*, 299: 205-213.
- Lereclus, D. O.-M. (1989). Transformation and expression of a cloned d-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology*, 211-218.
- Mathur, H., C Rea, M., D Cotter, P., Hill, C., & Paul Ross, R. (2015). The sacitibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Current Protein and Peptide Science*, 16(6), 549-558.
- Mondragón Preciado., E. M. (2013). Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia, de la Universidad Autónoma de Aguas Calientes*, 64-70.
- Ochoa Zarzosa, A., & López Meza, J. E. (2012). Shuttle Vectors of *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (págs. 175-184). Springer Science Business Media. doi:10.1007/978-94-007-3021-2_9
- Oros-Flores., C.-V. ...-H.-C. (2018). Co-synthesis of kenycin 404 and heterologous thurincin H enhances the antibacterial activity of *Bacillus thuringiensis*. *Springer Nature*, 1531-1540.
- Oscáriz, J., Cintas, L., Holo, H., Lasa, I., Nes, I., & Pisabarro, A. (2006). Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiol*, 108-115.
- Qi Zhang., Y. Y. (2012). Thioether Crosslinkages Created by a Radical SAM Enzyme. *ChemBiochem Highlights*, 1097-1099.
- Salazar-Marroquin. (2016). Tesis de Doctorado; Detección y Caracterización de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* y su potencial como agentes antibacterianos. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas, 12-16.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sit, C., Van-Belkum, M., McKay, R., Worobo, R. Y Vederas, J. (2011). The 3D Solution Structure of Thurincin H, a Bacteriocin with Four Sulfur to α -Carbon Crosslinks. *Angew. Chem. Int.* 50, 8718 –8721. DOI: 10.1002/anie.201102527
- Tjakko Abee., L. K. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of food microbiology*, 169-185

Wang, G., Manns, D., Churey, J. y Worobo, R. (2014). Development of a Homologous Expression System for and Systematic Site-Directed Mutagenesis Analysis of Thurincin H, a Bacteriocin Produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Appl Environ Microbiol* 80(12): 3576-3584.

Wieckowski, B., Hegemann, J., Mielcarek, A., Boss, L., Burghaus, O y Marahiel, M. (2015). The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation *FEBS Lett.* 1802-1806.

Zainab AlKhatiba., M. L. (2014). To gain immunity against nisin, the producing strain is expressing an ABC transporter called NisFEG, which expels nisin from the membrane. *Institute of Biochemistry, Heinrich Heine University Duesseldorf*, 752-763.