

# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOTECNOLOGÍA

**Análisis funcional de promotores de *Lactococcus lactis* que responden al daño de la pared celular**

**Anzu Castro Marcos**

**DairySafe/IPLA-CSIC**

**Junio/2024**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## RESUMEN

La producción exitosa de alimentos fermentados depende de la presencia y metabolismo de microorganismos, los cuales otorgan las cualidades organolépticas deseadas. Es por esta razón que los microorganismos utilizados para la iniciación de la fermentación son determinantes en el resultado del producto final. Durante la fermentación, muchos factores pueden afectar la viabilidad de las cepas, haciendo que las resistencias a estos factores sean cruciales al seleccionar los cultivos iniciadores. *Lactococcus lactis* es una bacteria acidoláctica comúnmente utilizada en la industria alimentaria en la que se han descrito mutaciones en rutas de señalización que otorgan resistencia a algunos factores de estrés. En este trabajo se utilizaron cepas resistentes a la lactococina 972 y que presentan, entre otras, mutaciones en el promotor del operón *dltXABCD*, el cual regula los niveles de D-alanización en los ácidos teicoicos que determinan la carga neta de la pared celular, o en el regulador transcripcional LlrG que participa en la cadena de señales de respuesta en el módulo de detección de tipo Bce, regulando genes involucrados en la respuesta al estrés y el operón *dlt*. En este trabajo se ha determinado que la mutación de la cepa IPLA1064\_E11 ( $\Delta T_{-105}$ ), la cual se encuentra en el fragmento espaciador entre las regiones -10 y -35, provoca un aumento de la actividad del promotor *dlt* mientras que la de IPLA517\_B5 (A<sub>-82</sub>C), que se encuentra anterior al comienzo de transcripción, causa la disminución de la actividad de este promotor. A pesar de no haber conseguido resultados concluyentes sobre la afinidad del regulador por los diferentes promotores, se puede inferir que esta afinidad no se ve afectada por las mutaciones y que los cambios de la actividad promotora están regulados por los procesos del comienzo de la transcripción.

## ABSTRACT

Successful production of fermented foods depends on the presence and metabolism of microorganisms, which impart the desired organoleptic qualities. This is why the microorganisms used to initiate fermentation are crucial to the final product outcome. During fermentation, many factors can affect the viability of strains, making resistance to these factors critical when selecting starter cultures. *Lactococcus lactis* is a lactic acid bacteria commonly used in the food industry, where mutations in signaling pathways that confer resistance to certain stress factors have been described. In this study, strains resistant to lactococin 972 were used, presenting, among others, mutations in the promoter of the *dltXABCD* operon, which regulates D-alanylation levels in teichoic acids determining the net charge of the cell wall, or in the transcriptional regulator LlrG, which is part of the signal transduction chain in the Bce-type detection module, regulating genes involved in stress response and the *dlt* operon. In this work, it was determined that the mutation in strain IPLA1064\_E11 ( $\Delta T_{-105}$ ), located in the spacer fragment between the -10 and -35 regions, causes an increase in the activity of the *dlt* promoter. In contrast, the mutation in IPLA517\_B5 (A<sub>-82</sub>C), located in the fragment upstream of the transcription start site, causes a decrease in the activity of this promoter. Although no conclusive results were obtained regarding the regulator's affinity for the different promoters, it can be inferred that this affinity is not affected by the mutations and that changes in promoter activity are regulated by the transcription initiation processes.

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Don Anzu Castro Marcos, estudiante del grado en Biotecnología en la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo, declara que el Trabajo Fin de Grado con título “Análisis funcional de promotores de *Lactococcus lactis* que responden al daño de la pared celular” es de mi autoría, es original y las fuentes bibliográficas utilizadas han sido debidamente citadas.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antecedentes y objetivos .....	1
1.2. Consideraciones teóricas .....	2
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
2.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	6
2.2. Extracción ADN total y plasmídico .....	8
2.3. Construcción de los plásmidos reporteros.....	8
2.4. Construcción de los plásmidos de expresión .....	9
2.5. Transformación de <i>E. coli</i> .....	10
2.6. Transformación de <i>L. lactis</i> IL1403.....	10
2.7. Ensayos de la actividad del promotor $P_{dlt}$ .....	11
2.8. Inducción de la expresión de <i>llrG</i> en pET-21a.....	12
2.9. Purificación de LlrG .....	12
2.10. Ensayo de retardo en gel.....	13
2.11. Tratamiento de datos y análisis estadístico .....	14
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
3.1. Actividad del promotor $P_{dlt}$ en estado estacionario VS exponencial .....	14
3.2. Actividad del promotor $P_{dlt}$ tras inducción con bacitracina.....	16
3.3. Actividad del promotor $P_{dlt}$ tras inducción con Lcn972 .....	17
3.4. Inducción de la síntesis y purificación de LlrG.....	18
3.5. Ensayo de retardo en gel.....	20
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>23</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>24</b>

## AGRADECIMIENTOS

Antes de todo, quiero agradecer a todas las integrantes del grupo de laboratorio AR del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) por la acogida y el trato recibido durante todo este periodo de trabajo, especialmente a mi tutora, Beatriz Martínez, y a Ana Belén Campelo por su apoyo y paciencia en el laboratorio, su disponibilidad para resolver cualquier duda y su confianza en mí.

Por último, agradecer más que a nadie a mi familia y a Carla por su apoyo incondicional y motivación constante durante estos cuatro años de grado.

Este trabajo no habría sido posible sin su ayuda y dedicación, por las que estoy profundamente agradecido.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes y objetivos

La producción exitosa de los productos fermentados depende de la presencia y metabolismo de microorganismos. A pesar de esto, es posible elaborar productos similares no fermentados con la adición de acidulantes. Sin embargo, estos productos no fermentados no poseen las propiedades organolépticas deseadas, y esperadas por los consumidores, de los productos fermentados gracias a los metabolitos de los microorganismos presentes (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Existen 3 métodos para iniciar la fermentación en los alimentos. El primero de todos, y el más antiguo, depende exclusivamente de los microorganismos endógenos del material de partida. Sin embargo, con este método no se puede asegurar que se obtenga una producción exitosa o que ni siquiera sea apto para el consumo. Si esta fermentación resulta exitosa, es posible reutilizar una porción de ese producto para iniciar una nueva fermentación. Este método se conoce como fermentación acelerada (*backslopping*) y permite seleccionar microorganismos bien adaptados y con las propiedades necesarias para nuestra fermentación (Buckenhüskes, 1993).

Las demostraciones de Pasteur de que la fermentación estaba causada por microorganismos, llevo a los microbiólogos a aislar estos microorganismos responsables. De este modo, un microorganismo aislado de un producto fermentado podría reintroducirse en la siguiente fermentación provocando los mismos resultados. Estas observaciones dieron lugar a los cultivos iniciadores (Buckenhüskes, 1993). El grupo más importante de bacterias usadas en cultivos iniciadores son las bacterias acidolácticas (BAL) y, a pesar de existir un amplio número de géneros, solo algunos son utilizados en los cultivos iniciadores, siendo estos *Lactococcus*, *Leuconostoc* y la especie *Streptococcus thermophilus* los más habituales. (Cogan & Accolas, 1996).

*Lactococcus lactis* es una BAL utilizada ampliamente en la industria alimentaria, especialmente en productos lácteos fermentados como los quesos (Wessels et al., 2004). Durante la fermentación, la acumulación de ácido láctico puede disminuir la viabilidad de las cepas, afectando a su crecimiento y la producción de metabolitos importantes (Papadimitriou et al., 2016). Por otro lado, como probióticos, las BAL pueden favorecer al funcionamiento de la barrera intestinal y evitar infecciones e inflamaciones (Evvie, 2013). Es



por esta razón que es crucial mantener una alta supervivencia en los caldos de fermentación y utilizar cepas resistentes y robustas frente a todo tipo de estrés.

En *L. lactis* se han descrito sistemas que participan en las resistencias a estrés y se han desarrollado mutantes resistentes al péptido antimicrobiano lactococina 972 (Lcn972), mediante la exposición a concentraciones crecientes a esta bacteriocina, que presentan mutaciones en rutas de señalización que modulan dichos sistemas (Campelo et al., 2020; López-González et al., 2018). Es de nuestro interés determinar el papel de dichas mutaciones en estas resistencias y para ello, se trabajó con cepas resistentes a Lcn972 que presentan, en entre otras, mutaciones en la región promotora del operón *dlt* que determina los niveles de D-alanización en los ácidos lipoteicoicos, o en reguladores transcripcionales que participan en la cadena de señales de respuesta a estímulos externos.

Con este propósito, se establecieron los siguientes objetivos con el fin de completar el proyecto formativo:

- Determinar el impacto de las mutaciones sobre la actividad del promotor del operón *dlt*.
- Estudiar la unión del regulador transcripcional LlrG silvestre y mutado a las regiones promotoras *dlt* silvestres y mutadas.

## 1.2. Consideraciones teóricas

### 1.2.1. Pared celular

*L. lactis*, como célula Gram-positiva, está envuelta por una pared celular (PC) que se distingue por una gruesa capa de peptidoglicano. Esta capa actúa como andamiaje para la unión de otros elementos de la PC como ácidos teicoicos, proteínas y polisacáridos (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). Como la macroestructura más externa, la PC desempeña un papel crucial en la supervivencia bacteriana, actuando como la principal interfaz sensorial entre la célula y el entorno. La detección de daños en la PC genera respuestas que normalmente implican cambios en su estructura para neutralizar dicho daño y adaptarse a las nuevas condiciones (Martínez et al., 2020).

La PC también juega un papel fundamental en las características biológicas y probióticas de las BAL, incluyendo la resistencia a bacteriófagos, la textura y maduración del queso, tolerancia al estrés, capacidad de adhesión y comunicación cruzada con el hospedador (Forde & Fitzgerald, 1999; Hill, 2012; Lebeer et al., 2010; Lortal & Chapot-Chartier, 2005).



#### 1.2.1.1. Ácidos Teicoicos

Aunque a la PC de Gram-positivas se le pueda atribuir una composición general, los glicopolímeros que la conforman presentan una diversidad estructural considerable entre diferentes especies e incluso cepas bacterianas, especialmente en el caso de los ácidos teicoicos (TA) y polisacáridos, la cual suele modular la resistencia o susceptibilidad a antimicrobianos (Martínez et al., 2020).

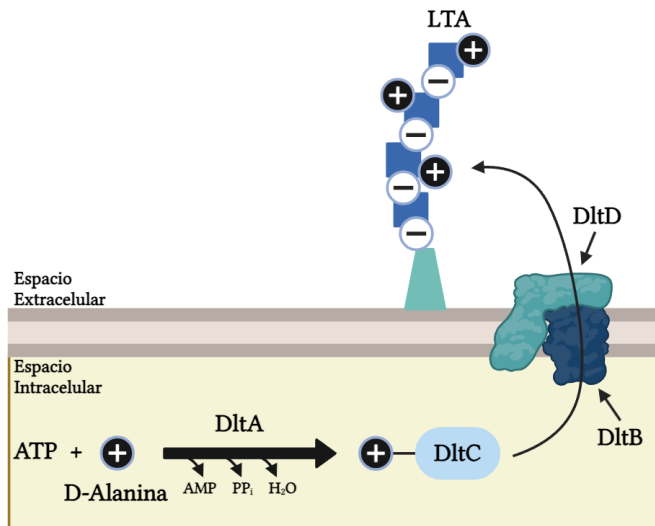
Los TAs son polímeros aniónicos formados por unidades repetidas de alditol-fosfato. Estos se pueden dividir en dos grupos: ácidos teicoicos de pared (WTA), que se unen de forma covalente a las moléculas de peptidoglicano, y ácidos lipoteicoicos (LTA), los cuales están unidos a la membrana citoplasmática con un glicolípido (Weidenmaier & Peschel, 2008).

Las estructuras más comunes de los WTAs son poliglicerofosfato [**poli(Gro-P)**] o polirribitolfosfato [**poli(Rbo-P)**], mientras que en el caso de los LTAs consiste en una cadena de poli(Gro-P). Los hidroxilos libres de las unidades Gro-/Rbo-alditol están parcialmente decorados con D-Ala o monosacáridos como Glc, Gal, GlcNAc (N-acetilglucosamina) (Martínez et al., 2020). Tanto la longitud de estas cadenas como el nivel de sustitución pueden variar en función de la especie o cepa bacteriana. En la mayoría de las bacterias Gram-positivas, coexisten ambos tipos de TAs, pero en algunas especies bacterianas como *L. lactis*, solo se encuentran LTAs con sustituyentes de D-Ala y Gal (Kramer et al., 2006).

Los TAs desempeñan un papel importante en la funcionalidad de la pared celular. Las funciones atribuidas a los TAs están asociadas con su naturaleza aniónica y su distribución en la PC. Además, el nivel de sustitución de D-Ala, también influye significativamente en su funcionalidad, alterando la carga global y local de los TAs (Neuhaus & Baddiley, 2003).

En general, los TAs sirven como reserva de iones en la PC, lo cual puede ser vital para el correcto funcionamiento de enzimas. Dada su naturaleza aniónica, tienen la capacidad de unir tanto cationes como protones, lo que genera un gradiente de pH a través de la pared celular (Neuhaus & Baddiley, 2003). Además, desempeñan múltiples funciones, entre las que se incluyen el control de autolisinas, mantenimiento de la morfología celular, reconocimiento de bacteriófagos, interacción con el sistema inmune del huésped y la participación en la colonización del mismo. En el caso de *L. lactis*, los niveles de D-Ala en los LTAs también afecta a la eficacia de secreción de proteínas, resistencia al estrés UV y resistencia al antimicrobiano nisina (Duwat et al., 1997; Kramer et al., 2006; Nouaille et al., 2004).





**Figura 1.** Esquema del proceso de la D-alanización de LTAs por las proteínas del operón *dlt* (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, los grupos hidroxilo libres de las cadenas de alditol-fosfato pueden ser sustituidas por azúcares o D-Ala. La D-alanización es el proceso mejor caracterizado que consiste en la esterificación con D-Ala de los grupos alditol de los TAs, en la que se involucran enzimas codificadas por el operón *dltXABCD* (Neuhaus & Baddiley, 2003). Los 4 genes

dentro del operón *dlt* (*dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD*) codifican las proteínas que catalizan la incorporación de D-alanina en los LTAs (Figura 1). Este proceso modula la densidad de carga negativa en la pared celular, lo que desempeña un papel importante en la regulación de la tolerancia al ácido y péptidos antimicrobianos (Boyd et al., 2000; Hao et al., 2017; Perego et al., 1995).

### 1.2.2. Sistemas de dos componentes implicados en la respuesta al daño celular

El procesamiento celular de estímulos externos se lleva a cabo por sistemas que permiten responder de manera coordinada para elaborar respuestas específicas. Las bacterias elaboran respuestas a señales externas mayoritariamente por sistemas de dos componentes (TCS). Estos dos componentes son una histidín-quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR), siendo este último el que se une a las regiones promotoras de determinados genes, activando o reprimiendo la transcripción (Álvarez & Georgellis, 2016; Jordan et al., 2008; Stock et al., 2000). Estos TCSs están implicados en la respuesta a estrés en muchas especies bacterianas y se ha llegado a demostrar que la presencia de la bacteriocina Lcn972 activa las respuestas dependientes de estos sistemas e incluso afecta a la expresión de genes implicados en las resistencias a antimicrobianos (Martínez et al., 2007).

### 1.2.3. Módulo de detección y respuesta tipo Lia y tipo Bce

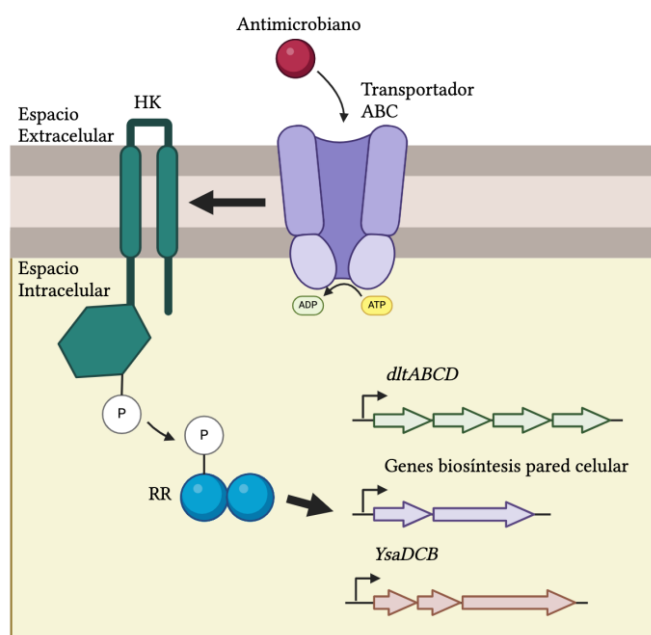
La integridad de la pared celular es crucial para la supervivencia, es por esta razón que las células están equipadas con estos sistemas sensoriales que permiten a las células activar

mecanismos de defensa que suelen involucrar cambios en la envuelta celular. Estos procesos se conocen como respuesta al estrés de la envuelta celular (CES) y ya han sido descritos en bacterias modelo como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Mitchell & Silhavy, 2019). La respuesta CES en *L. lactis* está orquestada por dos TCSs: CesSR y TCS-G junto con sus rutas de transducción de señales: tipo Lia y tipo Bce, nombrados así por los sistemas homólogos en *B. subtilis*.

### 1.2.3.1. Módulo de detección y respuesta tipo Lia

El módulo de detección de tipo Lia está compuesto por la HK CesS y el RR CesR, y las proteínas PSP (Phage-shock Proteins) YthABC. Estas proteínas mantienen el sistema apagado hasta que la célula sufra estrés (p. ej., presencia de Lcn972), entonces, estas interacciones se rompen y se activa la ruta de señalización (Khan et al., 2019). Entre los genes regulados por esta ruta se encuentra *spxB*, que codifica un factor transcripcional que conduce a la O-acetilación del peptidoglicano lo cual compromete la actividad microbiana de la lisozima y Lcn972 (Veiga et al., 2007).

### 1.2.3.2. Módulo de detección y respuesta tipo Bce



**Figura 2.** Representación esquemática del modelo de acción del módulo de detección y respuesta tipo Bce en *L. Lactis* (Revilla-Guarinos et al., 2014).

El módulo de detección de tipo Bce de *L. lactis* está constituido por la HK KinG y el RR LlrG, y el transportador YsaDCB (Campelo et al., 2020). Este es un sistema de detoxificación de antimicrobianos en el que el transportador ABC puede cumplir una doble función: participar en la resistencia y en la detección de antimicrobianos. Sin embargo, en algunos casos, este transportador puede actuar únicamente como un sensor de antimicrobianos, transmitiendo la

señal a la HK, pero sin llegar a otorgar resistencia. En *B. subtilis*, este tipo de módulo solo regula la expresión de los genes del transportador ABC mientras que en otras especies, como *L. lactis*, controlan un regulón extendido que incluye los transportadores ABC, genes



involucrados en la modificación de la pared celular como el operón *dltXABCD* y genes para la biosíntesis de la pared celular (Figura 2) (Revilla-Guarinos et al., 2014).

En el estudio de Wu et al. (2022) se observó que la sobreexpresión del gen *dltD* aumentaba significativamente la tolerancia al ácido en la cepa F44 de *L. lactis*. Para profundizar en el mecanismo de regulación, se realizó un ensayo de retardo del ADN y se identificó que el regulador transcripcional del TCS-G, LlrG, se une a la región *upstream* del operón *dlt*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas *L. lactis* utilizadas en este trabajo (Tabla 1) fueron cultivadas a 30 °C en medio M17 (Formedium | M17 Broth) suplementado con glucosa al 0,5% (**GM17**) al que se le añadió cloranfenicol (**Cm**) a una concentración final de 5 µg/mL en las cepas transformadas con los plásmidos derivados de pRCR. Se añadió agar al 2% en el caso de los medios sólidos.

Los cultivos de *E. coli* utilizados para la clonación se crecieron a 37 °C con agitación (220 rpm) en medio LB (Caldo LB (Lennox) | Sigma-Aldrich) al que se le añadió Cm a una concentración final de 5 µg/mL en los casos de las cepas transformadas con los plásmidos derivados de pRCR o ampicilina (**Amp**) 100 µg/mL en los casos de las cepas transformadas con los plásmidos derivados de pET-21a. Se añadió agar al 2% en el caso de los medios sólidos.

Para todos los ensayos se utilizaron cultivos de las cepas de 16-18 horas a 30/37 °C preparados a partir de colonias individuales de cultivos en medio sólido obtenidos a partir de stocks conservados -80 °C.

**Tabla 1. Microorganismos y plásmidos utilizados en este trabajo.** Las coordenadas de las mutaciones en IPLA1064\_E11 e IPLA517\_B5 se muestran respecto al inicio de la traducción del primer gen del operón *dltXABCD*.

MICROORGANISMOS		
<i>L. lactis</i> IL1403	Cepa silvestre.	(Bolotin et al., 2001)
<i>L. lactis</i> IPLA1064_WT	Cepa mutante sin mutaciones en el promotor del operón <i>dlt</i> .	(López-González et al., 2018)
<i>L. lactis</i> IPLA1064_E11	Cepa mutante resistente a Lcn972 con mutación en el promotor del operón <i>dlt</i> ( $\Delta T_{-105}$ ).	(López-González et al., 2018)
<i>L. lactis</i> IPLA517_B5	Cepa mutante resistente a Lcn972 con mutación en el promotor del operón <i>dlt</i> (A <sub>-82</sub> C).	(López-González et al., 2018)
<i>L. lactis</i> IPLA641_D8	Cepa mutante resistente a Lcn972 con mutación en el regulador transcripcional LlrG (A <sub>189</sub> E).	(López-González et al., 2018)
<i>E. coli</i> DH10B	Cepa competente utilizada para clonación.	(Durfee et al., 2008)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Cepa competente utilizada para clonación.	( <i>XL-1 Blue - EcoliWiki</i> , s. f.)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cepa competente utilizada para la producción heteróloga de LlrG.	(Studier & Moffatt, 1986)
PLÁSMIDOS		
pRCR	Plásmido reportero utilizado para estudiar la actividad de los promotores <i>dlt</i> por fluorescencia.	(Mohedano et al., 2015)
pET-21a	Plásmido utilizado para la clonación y síntesis del regulador transcripcional LlrG.	( <i>pET-21a(+)</i> DNA - Novagen   <i>Sigma-Aldrich</i> , s. f.)
pRCR::P <sub><i>dlt</i>_WT</sub>	Plásmido utilizado para estudiar la actividad del promotor <i>dlt</i> _WT por fluorescencia.	Este trabajo
pRCR::P <sub><i>dlt</i>_B5</sub>	Plásmido utilizado para estudiar la actividad del promotor <i>dlt</i> _B5 por fluorescencia.	Este trabajo
pRCR::P <sub><i>dlt</i>_E11</sub>	Plásmido utilizado para estudiar la actividad del promotor <i>dlt</i> _E11 por fluorescencia.	Este trabajo
pET-21a::LlrG_WT	Plásmido utilizado para la síntesis del regulador transcripcional LlrG_WT.	Este trabajo
pET-21a::LlrG_D8	Plásmido utilizado para la síntesis del regulador transcripcional LlrG_D8.	Este trabajo



## 2.2. Extracción ADN total y plasmídico

### 2.2.1. ADN genómico

A partir de 2 mL de cultivos líquidos de las cepas de *L. lactis* se realizó la extracción del ADN genómico, para la amplificación por PCR del fragmento de interés, de acuerdo con las instrucciones del kit “GenElute” (Sigma-Aldrich) para la extracción del ADN genómico en bacterias Gram-positivas.

### 2.2.2. Extracto celular

Asimismo, para la confirmación de los clones transformados de *E. coli*, 100 µL de cultivos líquidos de las colonias se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto, desechando el sobrenadante, se añadieron 20 µL de una solución de lisis (0,25% SDS, 50 mM NaOH) y se incubaron durante 10 minutos a 100 °C. Posteriormente se añadieron 180 µL de agua, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se traspasó el sobrenadante a tubos nuevos que se almacenaron a -20 °C.

### 2.2.3. ADN plasmídico

El ADN plasmídico se extrajo siguiendo las instrucciones del kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) para posteriormente cuantificar el ADN (Implen NanoPhotometer®) y comprobar la correcta clonación mediante ensayos de restricción y secuenciación.

## 2.3. Construcción de los plásmidos reporteros

Con el ADN genómico extraído (2.2.1) de las cepas de *L. lactis* (IPLA1064\_WT, IPLA1064\_E11, IPLA517\_B5) se amplificó por PCR el promotor del operón *dlt* usando la polimerasa “Phusion” (Thermo Scientific) (0,02 U/µL) con los cebadores (0,5 µM) *dlt*BglII\_F1 (5'-TCAGATCTGGGTGGAGTTGCGTAAT-3') *dlt*XbaI\_R1 (5'-GCTCTAGAATTCTTTTTTCTTGTTCCA-3'), dNTPs (0,2 mM), Buffer 5x y con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 98 °C 30”; 35 ciclos de 3 etapas: desnaturalización 98 °C 10”, hibridación 50 °C 30”, elongación 72 °C 30”; elongación final 72 °C 10'; obteniendo el amplicón esperado de 310 pb.

El amplicón obtenido se purificó con el kit “GFX PCR DNA and gel band purification kit” (Cytiva). Posteriormente, el promotor del operón *dlt* y el plásmido pPCR se digirieron con las enzimas de restricción BglII y XbaI (0,3 U/mL) de EURx durante 2,5 h a 37 °C,



recuperando el ADN en 24  $\mu\text{L}$  de agua tras la purificación del ADN posterior a la última digestión.

La ligación del plásmido pRCR con el promotor se realizó a 16  $^{\circ}\text{C}$  en termobloque durante 16-18 h [ligasa T4 (Invitrogen) (0,5 mg/mL), Buffer 5x, pRCR (87 ng/ $\mu\text{L}$ ),  $P_{dlt}$  5% (v/v)] para posteriormente dializar la ligación sobre agua miliQ durante 30 minutos sobre una membrana de diálisis “VSWP04700” (Merk Millipore).

La confirmación de los clones transformados de *E. coli* DH10B (2.5) con los plásmidos derivados de pRCR (Tabla 1), se realizó mediante una PCR con “Taq DNA Polymerase Master Mix RED” (Ampliqon), y el extracto celular para comprobar qué colonias contenían el inserto correcto de un tamaño esperado de 310 pb (Anexo 1). La PCR se realizó con Taq M-mix [50%(v/v)], dltBglII\_F1 (0,2  $\mu\text{M}$ ), dltXbaI\_R1 (0,2  $\mu\text{M}$ ), agua [38% (v/v)] y extracto celular [8% (v/v)] y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95  $^{\circ}\text{C}$  3'; 35 ciclos de 3 etapas: desnaturalización 95  $^{\circ}\text{C}$  10", hibridación 50  $^{\circ}\text{C}$  30", elongación 72  $^{\circ}\text{C}$  30"; elongación final 72  $^{\circ}\text{C}$  5'.

#### 2.4. Construcción de los plásmidos de expresión

Con el ADN genómico extraído (2.2.1) de las cepas de *L. lactis* (IL\_1403, IPLA641\_D8) se amplificó por PCR el gen *lrrG* usando la polimerasa “Phusion” (Thermo Scientific) (0,02 U/ $\mu\text{L}$ ) con los cebadores (0,5  $\mu\text{M}$ ) LrrG-F (5'-CCCCCATATGACTAAAATATTTATTGTAG-3') y LrrG-R (5'-CCCCCTCGAGAACCAGAGCATAACCACTTCCTC-3'), dNTPs (0,2 mM), Buffer 5x y con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 98  $^{\circ}\text{C}$  30"; 35 ciclos de 3 etapas: desnaturalización 98  $^{\circ}\text{C}$  10", hibridación 50  $^{\circ}\text{C}$  30", elongación 72  $^{\circ}\text{C}$  30"; elongación final 72  $^{\circ}\text{C}$  10'; obteniendo el amplicón esperado de 688 pb.

La purificación y ligación del fragmento obtenido con el plásmido pET-21a se realizó siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente (2.3) digiriendo con las enzimas de restricción NdeI y XhoI y con una concentración final del plásmido pET-21a de 83 ng/ $\mu\text{L}$  en la ligación.

La confirmación de los clones transformados de *E. coli* XL-1 Blue (2.5) con los plásmidos derivados de pET-21a (Tabla 1) se realizó mediante PCR, descrita anteriormente (2.3), usando los oligos LrrG-F y LrrG-R para comprobar qué colonias contenían el inserto correcto de un tamaño esperado de 688 pb (Anexo 2).



## 2.5. Transformación de *E. coli*

Para transformar *E. coli* por electroporación, se utilizaron 15  $\mu\text{L}$  de las ligaciones dializadas que se añadieron a 50  $\mu\text{L}$  de bacterias electrocompetentes de *E. coli* DH10B (pRCR::P<sub>dlt</sub>\_WT, pRCR::P<sub>dlt</sub>\_E11 o pRCR::P<sub>dlt</sub>\_B5) o *E. coli* XL-1 Blue (pET-21a::LlrG\_WT o pET-21a::LlrG\_D8) obtenidas del stock a -80 °C. Las células junto con la ligación se sometieron a un pulso eléctrico en el electroporador (Electroporador ECM® 830 de BTX) con los parámetros establecidos para *E. coli*: 2500 V, 200  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$ . Inmediatamente tras la electroporación, se añadió 1 mL de medio de expresión LB a la cubeta de electroporación, se mantuvo en hielo hasta poder pasar el contenido de la cubeta a un tubo de ensayo de plástico y se dejó crecer durante 1 h a 37 °C a 220 rpm. Pasada esta hora, el contenido de los tubos se repartió en placas de medio LB agar 2% con Cm 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las transformaciones con pRCR y Amp 100  $\text{g}/\text{mL}$  en las transformaciones con pET-21a y se cultivaron a 37 °C durante 16-18 horas.

En cuanto a los huéspedes para la expresión de *lrrG*, se transformó *E. coli* BL21(DE3) añadiendo 170 ng de plásmido (pET-21a::LlrG\_WT o pET-21a::LlrG\_D8) a 300  $\mu\text{L}$  de estas bacterias quimiocompetentes. Las células junto con el vector se sometieron a un shock térmico manteniéndolas 30 minutos en hielo, 45 segundos a 42 °C y 2 minutos más en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio LB y las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación. Pasada esta hora, el contenido de los tubos se repartió en placas de medio LB agar 2% Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se dejaron crecer durante 16-18 horas a 37 °C.

## 2.6. Transformación de *L. lactis* IL1403

Las bacterias se transformaron añadiendo 640 ng de los plásmidos (pRCR::P<sub>dlt</sub>\_WT, pRCR::P<sub>dlt</sub>\_E11 o pRCR::P<sub>dlt</sub>\_B5) a 50  $\mu\text{L}$  de bacterias electrocompetentes de IL1403. Las células junto con el vector se sometieron a un pulso eléctrico en el electroporador (Electroporador ECM® 830 de BTX) con los parámetros establecidos para *L. lactis*: 2000 V, 200  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$ . Inmediatamente tras la electroporación, se añadió 1 mL de medio de expresión SGM17 (GM17 + 0,5% sacarosa) a la cubeta de electroporación, esta cubeta se incubó durante 1 h a 30 °C. Pasada esta hora, el contenido de la cubeta de electroporación se repartió en placas de medio GM17 agar 2% Cm 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se dejaron crecer durante 16-18 horas a 30 °C.



## 2.7. Ensayos de la actividad del promotor $P_{dt}$

El punto de partida para los ensayos de actividad promotora fueron cultivos de 16-18 horas a 30 °C en GM17 Cm 5 µg/mL de las cepas reporteras. En estos ensayos se usaron dos replicados biológicos y dos réplicas de inducción por cada cepa.

### 2.7.1. Estacionario VS exponencial

El protocolo para la comparación de la actividad promotora de  $P_{dt}$  en estado estacionario y exponencial fue el mismo al mencionado a continuación (2.7.2) excepto por el proceso de inducción, que no se realizó en este ensayo.

### 2.7.2. Inducciones

A partir de los cultivos de 16-18 horas se inoculó al 2% medio GM17 Cm 5 µg/mL y se dejó crecer hasta una  $OD_{600} = 0,3$  (2 - 2,5 h) para que las bacterias se encuentren en fase exponencial a la hora de comenzar los ensayos. Una vez los cultivos llegaron a la densidad óptica deseada, se indujeron 900 µL de estos cultivos con los antimicrobianos en sus concentraciones finales correspondientes [Bacitracina: 5, 1 y 0 (µg/mL); Lcn972: 80, 40, 10, 0 (AU/mL)]. Para ello, se prepararon anteriormente las soluciones de los antimicrobianos a una concentración 10x para después añadir 100 µL de estas a los cultivos.

La inducción tuvo lugar a 30 °C durante 30 minutos para permitir la expresión del gen que codifica la proteína mCherry ocasionada por la activación del TCS ante la presencia de antimicrobianos. Una vez finalizado el tiempo de inducción se procedió a retirar el medio de crecimiento con dos lavados sucesivos con PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM,  $Na_2HPO_4$  8 mM,  $KH_2PO_4$  1,5 mM) en los que se centrifugó 5 min a 16.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 500 µL de PBS.

Posteriormente, estas suspensiones se incubaron a 30 °C durante 3 h en oscuridad para una correcta maduración de la proteína mCherry (Garay-Novillo et al., 2019). Tras el periodo de incubación, se tomaron 200 µL de las suspensiones celulares y se depositaron en los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos y se determinó la densidad óptica a 600 nm con agitación suave de 10 segundos previa a la lectura en el espectrofotómetro de microplacas "Benchmark Plus Microplate Reader" (Bio-Rad).

A partir de cada muestra depositada en la placa microtiter, se traspasaron 4 alícuotas de 20 µL a una placa de 96 pocillos para qPCR. Para medir la fluorescencia producida por la proteína mCherry, se utilizó el sistema para qPCR a tiempo real "7500 Real-Time PCR





System” (Applied Biosystems), utilizando el protocolo de presencia/ausencia para detectar ROX, un fluoróforo con excitación (580 nm) y emisión (605 nm) similar a los de la proteína mCherry (Excitación: 587 nm; Emisión: 612 nm). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron mediante la división de estos resultados obtenidos del sistema de qPCR entre la densidad óptica a 600 nm leída en el espectrofotómetro ( $F/OD_{600}$ ).

## 2.8. Inducción de la expresión de *lrrG* en pET-21a

A partir de colonias de transformantes de *E. coli* BL21(DE3) se inocularon 50 mL de medio LB con Amp 100 µg/mL en una botella de 250 mL, para tener mejor aireación, y se incubó a 37 °C con agitación (220 rpm) hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0,6 (2,5 – 3 h). Al cultivo se le añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se dividió en dos tubos para comprobar diferentes protocolos de inducción.

Uno de estos tubos se incubó a 37 °C durante 2,5 horas y posteriormente se introdujo en hielo durante 5 minutos para después centrifugar a 5000 g a 4 °C por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,25 volúmenes de Tris-HCl pH 8, se volvió a centrifugar a 5000 g a 4 °C por 5 minutos desechando el sobrenadante y las células se almacenaron a -20 °C. Por otro lado, el otro tubo se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 16-18 horas y al día siguiente se siguió el mismo proceso de lavado. Previamente y tras la inducción con IPTG se tomaron y lavaron alícuotas de 1 mL de cada proceso de inducción para compararlos posteriormente.

Las alícuotas de 1 mL tomadas anteriormente se resuspendieron en 75 µL de agua y se hirvieron a 100 °C durante 10 minutos junto con el tampón de carga 4x para provocar la lisis de las células. Para comprobar si la inducción fue positiva se realizó un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes con estas muestras.

## 2.9. Purificación de LrrG

Las células inducidas se resuspendieron en 4 mL de tampón de lisis (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8) y se realizaron tres ciclos de congelación a -80 °C y descongelación a temperatura ambiente. A continuación, se sonicó (Vibra cell, Sonics & Materials) con tres ciclos de 15 segundos y 30 segundos de descanso en hielo con una amplitud del 40% seguidos de otros tres ciclos de la misma duración con amplitud del 30%. El contenido se repartió en eppendorfs de 2 mL, se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante, al que se le añadió 200 µL de resina



“Ni-NTA Superflow” (Quiagen) y se mantuvo a 4 °C durante 16-18 horas con agitación suave en un agitador de tipo noria “SB2 Rotator” (Stuart).

Pasado este tiempo se prepararon las columnas “Poly-Prep Chromatography Column” (Bio-Rad) con 6 mL del tampón de lisis y se añadió la muestra una vez todo el tampón había eluido. A continuación, se volvieron a añadir 6 mL del tampón de lisis. Después, se añadieron 10 mL de tampón de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8) y finalmente se eluyó la proteína con 2 mL del tampón de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8) tomando 0,5 mL en eppendorfs. Las fracciones resultantes se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes para determinar en cuáles se encontraba nuestra proteína.

### 2.9.1. Cuantificación

La cuantificación de la proteína purificada se realizó mediante el método de Bradford. Para ello, se juntaron las fracciones con mayor cantidad de proteína tras la purificación y se prepararon dos diluciones de 1:2 y 1:5, como patrón para la recta de calibrado se usó BSA en diferentes concentraciones [2; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 (mg/mL)]. En una placa de 96 pocillos se añadieron 5 µL de las muestras y del patrón junto con 250 µL de la solución de Bradford (Bio-Rad) y se midió la absorbancia a 595 nm (Infinite M Nano, TECAN).

### 2.10. Ensayo de retardo en gel

Los fragmentos de ADN de las regiones promotoras se prepararon por PCR usando los cebadores descritos anteriormente (2.3). Los ensayos se realizaron con cinco concentraciones finales de proteínas [0, 2, 4, 6, 8 (µM)] y con 13 ng de ADN. El volumen final de las muestras fue de 10 µL en los que se añadió: tampón EMSA 5x [Tris (12,11 mg/mL), glicerol (25% v/v), pH 7,9], BSA (0,05 mg/mL) y se completó con un tampón de dilución de proteínas [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM), NaCl (120 mM), pH 8]. Esta mezcla se incubó a 25 °C durante 30 minutos para posteriormente introducirlas directamente en hielo. Las muestras se cargaron en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 6% al que se le aplicó 200 V durante 35 minutos en tampón TBE [TBE 10x: Tris (108 mg/mL), ácido bórico (55 mg/mL), EDTA (7,5 mg/mL), pH 8,3] a 4 °C manteniendo la cubeta de electroforesis en hielo. Los geles se tiñeron con “SYBR Green” según el protocolo del kit “Electrophoretic Mobility-Shift Assay (EMSA)” (Invitrogen) para observar las bandas de ADN.

## 2.11. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Las representaciones gráficas de los resultados obtenidos y sus análisis estadísticos se realizaron en el programa Excel [versión 16.42 (20101102)] del paquete de Office 365. Las diferencias se evaluaron mediante la prueba t Student implementada en Excel considerando como diferencias significativas un valor  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Actividad del promotor $P_{dlt}$ en estado estacionario VS exponencial

Con el propósito de comprender las consecuencias de las mutaciones del promotor *dlt*, se construyeron vectores reporteros derivados del plásmido pRCR (Mohedano et al., 2015), el cual incluye el gen reportero *mrfp* codificante de la proteína fluorescente mCherry precedido del MCS (sitio múltiple de clonación) en el que se insertaron los diferentes promotores del operón *dlt*. Previo a los ensayos de inducción con antimicrobianos, y para estudiar estos efectos de estas mutaciones se decidió comprobar la actividad del promotor *dlt* en diferentes estados del crecimiento bacteriano (Figura 3).

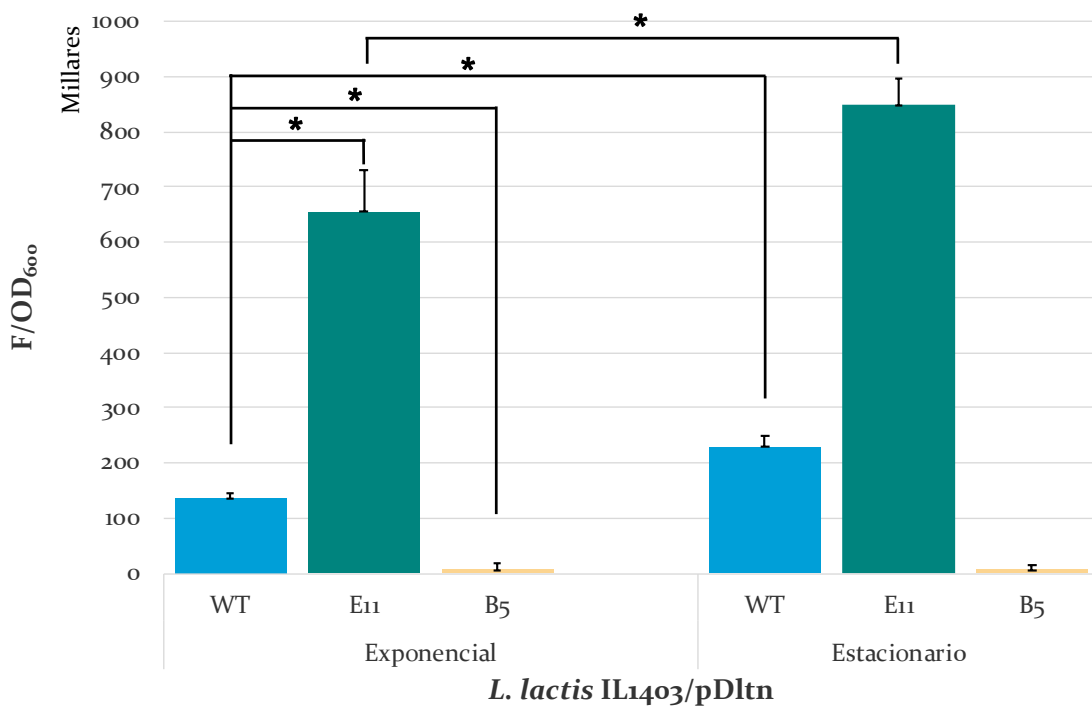


Figura 3. Actividad de los promotores del operón *dlt* de las cepas mutantes (IPLA1064\_WT, IPLA1064\_E11 e IPLA517\_B5). \* ( $p < 0,05$ ).

Analizando la  $F/OD_{600}$  en los diferentes estados, se logró observar un aumento significativo de la actividad del promotor en el caso de los promotores WT y E11 en el estado estacionario respecto al exponencial, lo que podría sugerir que las bacterias se encuentren bajo estrés al llegar a esta fase. En cuanto a la comparación de las mutaciones, el promotor E11 tiene una actividad significativamente mayor, dando un factor de inducción de 4,8 respecto al promotor silvestre, lo que puede significar una mayor afinidad del regulador transcripcional por este promotor o que la mutación provoque un aumento de la expresión basal del operón *dltXABCD*. Sin embargo, esta actividad en B5 es significativamente menor (factor de inducción de 0,05 respecto al promotor WT), por lo que el regulador podría tener más complicaciones a la hora de unirse a esta región. En este caso, la sobreexpresión de los genes *dlt* en E11 podría ser una de las principales consecuencias a la resistencia Lcn972 de esta cepa, aunque puede haber más razones. Respecto a B5, esta resistencia se debe a otros sistemas de la cepa ya que su promotor *dlt* se encuentra prácticamente inutilizado y no sufriría la D-alanización que cambie la carga neta de su pared celular.

```

-140                               -35                               -10                               -81
atataaatta aacttacaca aatgtaagtt tttttTcttt aataaatggtt ataatacagAg
                               MutE11                               MutB5
                               (ΔT-105)                               (A-82C)
-80
tcataaatga tatgagatta actgattatt ctaaaaacct cttattactt tatatttaa
-10                               -1                               +1                               -11
aggagttcca atg...
                               →dltX
  
```

**Figura 4. Secuencia del promotor  $P_{dlt}$  de *L. lactis* IL1403 y las mutaciones detectadas (azul) en los mutantes Lcn972R *L. lactis* IPLA517-B5 y *L. lactis* IPLA1064-E11.** Las regiones -35 y -10 se indican en rojo y la secuencia reconocida por LrG (ANCTTACA-N<sub>4</sub>-TGTAAGNT) doble subrayado. Las coordenadas se muestran respecto al inicio de la traducción del primer gen del operón *dltXABCD*.

Considerando estos resultados (Figura 3) junto con las mutaciones detectadas (Figura 4), podemos observar que la delección en el promotor del mutante E11 causa un acortamiento en la región espaciadora, entre las regiones -35 y -10, provocando que pase de 18 pb a 17 pb y, en este caso, que el promotor tenga una actividad muy superior respecto al promotor silvestre. El espaciado entre las regiones -10 y -35 es un factor crítico en la actividad de un promotor. La distancia más conservada entre estas regiones suele ser de 17 pb aunque puede variar según el promotor (Mulligan et al., 1985). Se ha demostrado que inserciones o delecciones en esta región pueden variar la actividad del promotor, comúnmente siendo menos activos los promotores que se alejan del espaciado más conservado. Por estas razones, la delección en la región espaciadora del mutante IPLA1064\_E11 aproxima este



espaciado a uno más afín para la ARN polimerasa, haciendo que su unión sea más óptima y causando ese aumento de la actividad (Hawley & McClure, 1983).

Por otro lado, la mutación en IPLA<sub>517\_B5</sub> (A->C) se encuentra fuera de la región espaciadora, entre la región -10 y el inicio de la transcripción, también conocida como secuencia discriminadora. Algunos artículos describen una región del factor  $\sigma$  de la ARN polimerasa (región 1.2) la cual interacciona con las zonas próximas a la región -10 una vez se ha abierto la doble hélice de ADN. Estas interacciones estabilizan la unión polimerasa-promotor permitiendo que la cadena molde entre al centro activo de la proteína (Hook-Barnard & Hinton, 2009). También se ha demostrado que el contenido de G+C de esta región es esencial para la apertura de la doble hebra del promotor y la relajación de la hélice de ADN, y se han descrito mutaciones de esta misma sustitución (A->C) causan un descenso de la vida media del complejo ADN-proteína incluso más de 10 veces inferior a los genotipos silvestres (Forquet et al., 2021; Haugen et al., 2006). Es muy probable que la mutación encontrada en la secuencia discriminadora de IPLA<sub>517\_B5</sub> dificulte la apertura de la doble hebra de ADN, disminuyendo la vida media del complejo polimerasa-ADN de tal manera que la transcripción desde este promotor es mínima.

### 3.2. Actividad del promotor $P_{dlt}$ tras inducción con bacitracina

La bacitracina es un antimicrobiano que interfiere con la biosíntesis de la pared celular uniéndose al transportador de lípidos undecaprenil-fosfato, un intermediario crítico en este proceso, interrumpiendo el flujo de precursores de peptidoglicano hacia el sitio de síntesis, debilitando la pared celular hasta la muerte de la bacteria (Economou et al., 2013). La ruta de tipo Bce del TCS-G recibe este nombre del módulo de resistencia a bacitracina BceRSAB de *B. subtilis*. Además, se ha demostrado que la bacitracina extracelular activa los sensores de este TCS transmitiendo la señal a la HK y consecuentemente al correspondiente RR (Ohki et al., 2003).

Para comprender mejor este sistema en *L. lactis* y las consecuencias sobre los mutantes resistentes a Lcn972, se estudió la actividad del promotor del operón *dlt* tras la inducción con bacitracina.

En los resultados de este ensayo (Figura 5), se pueden observar un aumento significativo de la actividad del promotor WT y del mutante B<sub>5</sub>, lo que concuerda con el sistema de funcionamiento del TCS-G (Ohki et al., 2003), y que, además, aumenta con las concentraciones superiores ensayadas de bacitracina. En el caso del promotor mutante E<sub>11</sub>

no se logró apreciar ningún cambio significativo, lo que significa que el operón *dlt* de este mutante se expresa de forma constitutiva en condiciones fisiológicas y no se ve afectado por más señales del TCS-G. En cuanto al aumento de la actividad del promotor mutante B5 se pudo observar un factor de inducción de 10,75 con la inducción de 5  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracina, por lo que, a pesar de la mutación, el promotor mutante B5 sigue respondiendo a las señales del TCS-G, aunque sigue demostrando una actividad inferior.

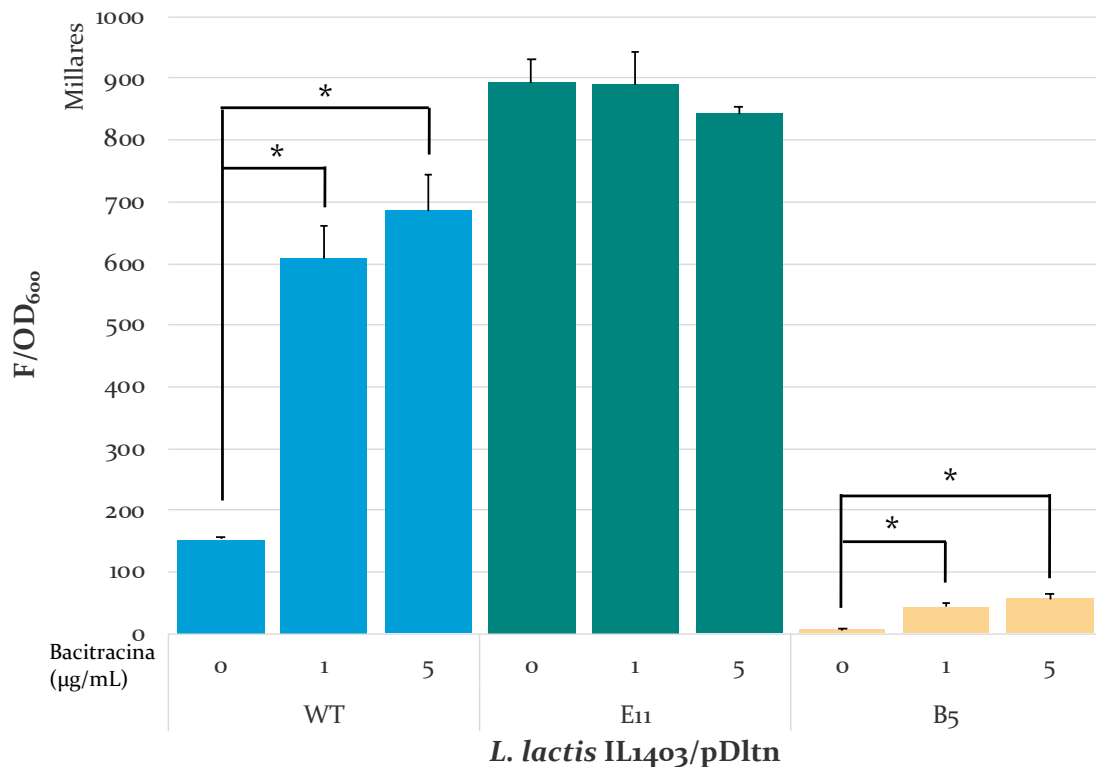
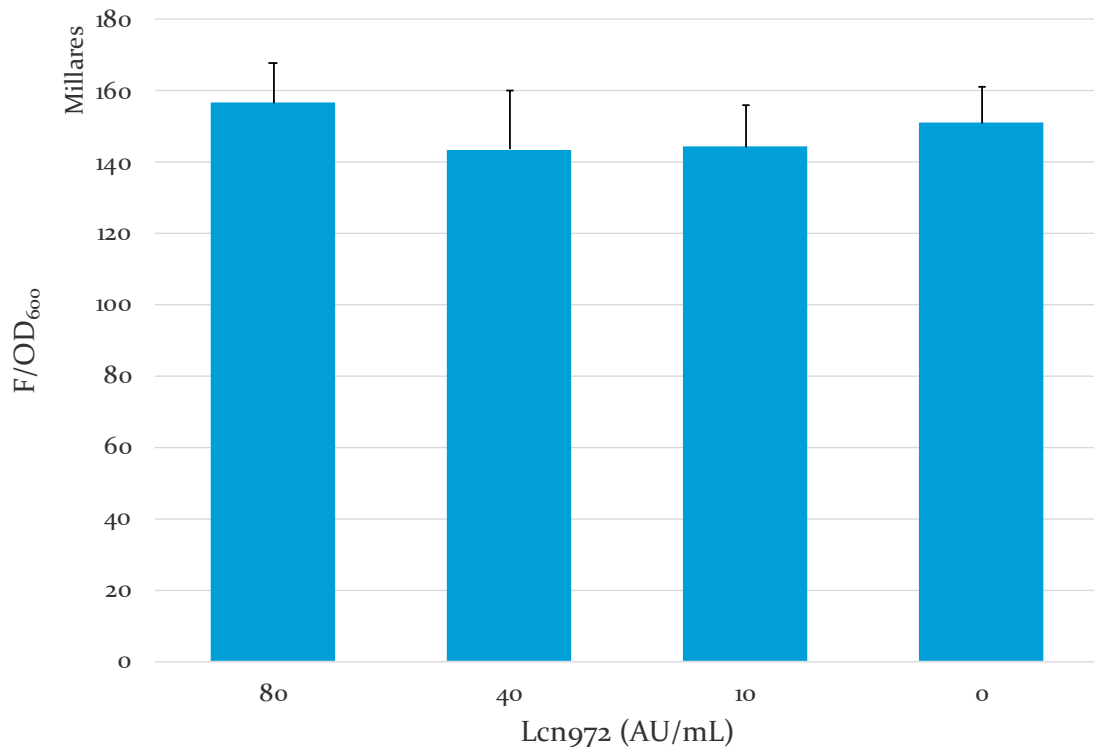


Figura 5. Actividad de los promotores del operón *dlt* de las cepas resistentes a Lcn972 (IPLA1064\_WT, IPLA1064\_E11 e IPLA517\_B5) tras la inducción con concentraciones crecientes de bacitracina. \* ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Actividad del promotor $P_{dlt}$ tras inducción con Lcn972

Con el fin de demostrar si los aumentos de la actividad en el promotor mutante B5 se pueden deber a la participación de otro tipo de regulador transcripcional, se indujo la cepa reportera transformada con el promotor WT con la bacteriocina Lcn972. Esta bacteriocina inhibe la síntesis de peptidoglicano e induce la señalización del sistema CesSR tipo Lia de *L. lactis* (Martínez et al., 2007). Este sistema es un TCS de tipo Lia, similar al sistema LiaSR descrito en *B. subtilis* y que se ha demostrado que el regulador transcripcional de este sistema en *Enterococcus faecalis* también regula el operón *dltXABCD* (Morris et al., 2024).



**Figura 6. Actividad de los promotores del operón *dlt* de la cepa IPLA1064\_WT en la cepa silvestre IL1403 tras la inducción con concentraciones crecientes de Lcn972. \* ( $p < 0,05$ ).**

En este caso (Figura 6) no se logró observar ningún cambio significativo en la actividad del promotor en las inducciones con diferentes concentraciones de Lcn972, por lo que no se ha demostrado que el sistema CesSR afecte a la regulación del operón *dlt* en *L. lactis*. Por lo tanto, los resultados anteriores (Figura 5) podrían deberse a que al exponer *L. lactis* a bacitracina, se provoca una mayor síntesis del regulador transcripcional LlrG, el cual colabora en la unión de más ARN-polimerasa en este promotor, haciendo que sus niveles de transcripción sean superiores, pero sin poder alcanzar los niveles del promotor silvestre.

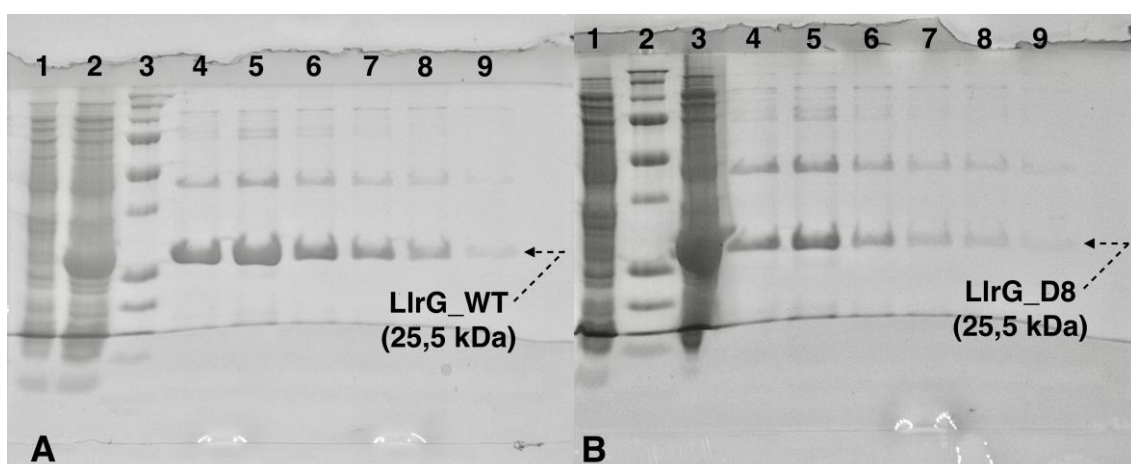
### 3.4. Inducción de la síntesis y purificación de LlrG

Para determinar si la afinidad del regulador transcripcional LlrG y su versión con la mutación A<sub>89</sub>E por el promotor *dlt* se ve afectada por las mutaciones detectadas en el promotor *dlt* de las cepas 517\_B5 y 1064\_E11, se construyeron vectores derivados del plásmido pET-21<sup>a</sup> para la producción heteróloga de LlrG. En este vector, la expresión del gen *llrG* está controlada por T7lac, un promotor del fago T7 seguido del operador *lac*. Para activar la expresión del gen, el huésped debe poseer el promotor *lacUV5* y el gen para la T7 ARN polimerasa. Este promotor se inducirá con IPTG, lo que provocará la síntesis de la

ARN polimerasa que comenzará la transcripción desde el promotor del fago T7 de nuestro vector (Studier & Moffatt, 1986).

Como se observa en el anexo 3, la inducción con IPTG fue positiva ya que se puede apreciar un aumento en la intensidad de las bandas ligeramente superiores a los 25 kDa en todos los cultivos inducidos, lo que corresponde con nuestra proteína de interés (25,5 kDa). Además, estas bandas parecen ser ligeramente más intensas en los casos de los cultivos con inducción de 16-18 horas a temperatura ambiente. Aun así, como ambas inducciones fueron positivas, se juntaron las células procedentes de los diferentes métodos de inducción para continuar con la purificación de la proteína.

La cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC) se utilizó por primera vez para purificar proteínas utilizando el ligando quelante ácido iminodiacético (IDA) cargado con iones metálicos como  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  o  $Ni^{2+}$ , y luego utilizados para purificar una variedad de proteínas y péptidos diferentes (Porath et al., 1975). En nuestro caso se usó ácido nitrilotriacético (NTA) el cual ocupa cuatro de los seis sitios de unión en la esfera de coordinación del ion níquel, a diferencia de los tres del IDA, dejando dos sitios libres para interactuar con la cola de seis histidinas (6xHis) que se agregó al extremo N-terminal de la secuencia de nuestra proteína con el plásmido pET-21a. Esto provoca una mayor estabilidad para retener iones metálicos lo que permite realizar lavados de columna con condiciones más estrictas y por lo tanto obtener un mayor rendimiento de purificación (Crowe et al., 1995).



**Figura 7. Geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12,5% de la purificación de LlrG.** (A) Purificación de LlrG\_WT en *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_WT [1] Extracto sin inducción. [2] Extracto con inducción con 0,5 mM IPTG. [3] Marcador. [4] Fracción eluida 0. [5] Fracción eluida 1. [6] Fracción eluida 2. [7] Fracción eluida 3. [8] Fracción eluida 4. [9] Fracción eluida 5. (B) Purificación de LlrG\_D8 en *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_WD8 [1] Extracto sin inducción. [2] Marcador. [3] Extracto de con inducción con 0,5 mM IPTG. [4] Fracción eluida 0. [5] Fracción eluida 1. [6] Fracción eluida 2. [7] Fracción eluida 3. [8] Fracción eluida 4. [9] Fracción eluida 5.



La purificación tanto de LlrG\_WT como su versión mutada LlrG\_D8 fue efectiva. Como se puede ver en la figura 7, la mayor cantidad de la proteína se obtuvo en las dos primeras fracciones de elución. Además de la proteína de interés, también se pudo apreciar otra proteína copurificada de mayor tamaño, cercana a los 50 kDa, en todas las fracciones de elución que podría deberse a la dimerización de LlrG. Se juntaron las fracciones con mayor cantidad de proteína (LlrG\_WT: o+1+2; LlrG\_D8: o+1) y se continuó con la cuantificación de la proteína para posteriormente realizar el ensayo de retardo en gel.

### 3.5. Ensayo de retardo en gel

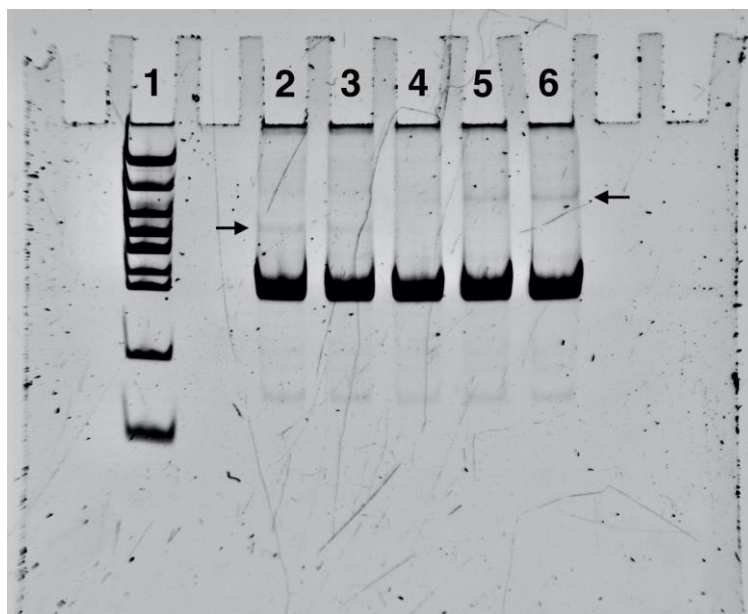
Para determinar si la afinidad del regulador transcripcional LlrG por el promotor *dlt* se ve afectada por las mutaciones de estas cepas, se realizaron ensayos de retardo en gel, el cual es un método rápido y sensible para detectar interacciones proteína-ácido nucleico y que se basa en la observación de que la movilidad electroforética de un complejo proteína-ácido nucleico es típicamente menor que la del ácido nucleico libre.

Los primeros geles realizados se utilizaron para determinar las condiciones del ensayo y que se podía observar la unión de la proteína al ADN, para ello se siguieron los protocolos descritos por Wu et al. (2022) y el manual de *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Kit*. En estos primeros geles se usó como control negativo el promotor P<sub>llmg2447</sub> de *L. lactis*, el cual no posee ningún motivo de unión para la proteína LlrG.

A pesar de seguir los protocolos descritos anteriormente, no se pudo apreciar el retardo del ADN en el control positivo, el promotor del operón *dlt*, por lo que se decidió seguir trabajando únicamente con LlrG\_WT hasta encontrar las condiciones óptimas de reacción. Además, todas las muestras tenían un barrido que recorría toda la calle y dificultaba la visión de posibles bandas retardadas (Anexo 4). Por estas razones, se decidió retirar el ADN de esperma de salmón, recomendado como un competidor no específico en las reacciones, y posible causante del barrido, aunque podría disminuir la inespecificidad de la reacción. También, las proteínas se dializaron sobre el tampón de elución sin imidazol en membranas de diálisis “VWSPo4700” (Merk Millipore) para intentar reducir el imidazol del tampón de elución en el que se encuentran las proteínas. No se ha logrado encontrar una evidencia clara de que el imidazol pueda afectar a la unión de proteína-ácido nucleico, pero sí se han encontrado trabajos que dializan las proteínas antes del ensayo o que sí expresan que el imidazol perjudica esta unión pero no se concreta ninguna concentración (Bessonova et al., 2019; Fuellgrabe et al., 2011; Martínez et al., 2007). Además, también se decidió diluir la concentración de sales en las muestras usando

un tampón similar al de elución que se llamó tampón de dilución de proteínas [NaCl (120 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM), pH 8]. Otro paso en la optimización del proceso fue la adición de acetilfosfato de litio y potasio a concentración final 50 mM, el cual participa en la fosforilación necesaria del regulador transcripcional para su unión con el ADN.

Con estos nuevos cambios en el protocolo, se logró observar unas bandas mucho más limpias e incluso se logró apreciar bandas con menos movilidad (Figura 8). Aun así, estas bandas eran poco claras ya que también se podían ver en el control sin proteína. Sin embargo, en las calles con mayores concentraciones de proteína, esta banda se encontraba más retrasada que en el resto.



**Figura 8. Gel no desnaturizante de poliacrilamida al 6% de ensayo de retardo en gel para la determinación de las condiciones de ensayo de la unión de LlrG a Pdl.** (1) Marcador. Concentración de proteína: (2) 0 μM. (3) 2 μM. (4) 4 μM. (5) 6 μM. (6) 8 μM de LlrG.

Como cambio final en los últimos geles se decidió aumentar la relación proteína/ADN usando 1,3 ng de ADN y 20 μM de proteína para intentar apreciar mejor las bandas con menos movilidad. A estos geles se les aplicó 100 V durante 1 hora para reducir al mínimo el calentamiento de los geles a pesar de estar refrigerados durante todo el proceso.

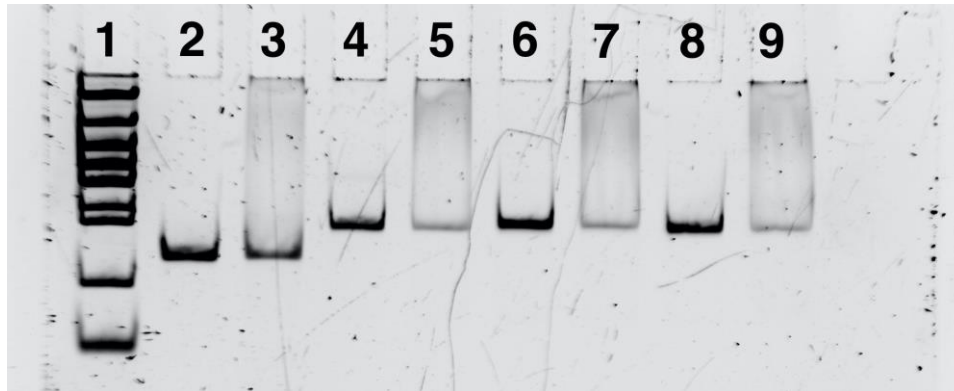


Figura 9. Gel no desnaturizante de poliacrilamida al 6% de ensayo de retardo en gel con promotores *dlt* WT, E11 y B5. (1) Marcador. (2,3) Control negativo: 0 y 20  $\mu$ M de LlrG. (4,5) *dlt*\_WT: 0 y 20  $\mu$ M. (6,7) *dlt*\_E11: 0 y 20  $\mu$ M. (8,9) *dlt*\_B5: 0 y 20  $\mu$ M.

En el gel de la figura 9 se logró observar que en las calles que contenían proteína, la banda de ADN más adelantada disminuía su intensidad, menos en el caso del control negativo. Eso puede significar que sí se obtuvo unión del regulador, impidiendo la movilidad del ADN. Sin embargo, las bandas más lentas no se lograron apreciar con claridad, aunque parece poder distinguirse una banda en los comienzos de las calles por lo que la duración de la electroforesis no fue la adecuada. Aun así, a pesar de haber seguido los protocolos descritos por otros investigadores y haber intentado adaptarlos a nuestro trabajo, no se logró obtener resultados claros que nos den una conclusión definitiva.

Tomando este último gel como un resultado positivo y comparando con los resultados anteriores, aunque no sea posible cuantificarlo, es probable que la afinidad del regulador LlrG no se vea afectada por estas mutaciones, ya que todos los fragmentos de los promotores han sufrido retardo de ADN, incluso el promotor mutado B5 que tenía una actividad casi nula. Esto quiere decir que las diferentes actividades de estos promotores están reguladas por los mecanismos del proceso de transcripción como las interacciones de la ARN polimerasa con las regiones -10 y -35 del promotor, haciendo que se facilite su unión, y la apertura de la doble hebra de ADN, lo cual va a determinar la estabilidad y vida media del complejo ADN-proteína.



## 4. CONCLUSIONES

Con todos los resultados obtenidos durante este proyecto formativo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- La delección dentro del fragmento espaciador entre las regiones -10 y -35 en el promotor *dlt* de la cepa IPLA1064\_E11, aproximando su tamaño a uno más consenso, provoca un aumento en su actividad y la expresión constitutiva de este operón, siendo esto uno de sus mecanismos de resistencia a Lcn972.
- La sustitución dentro de la secuencia discriminadora en el promotor *dlt* de la cepa IPLA517\_B5, aumentando los pares de G+C, provoca un descenso en su actividad, haciendo que la transcripción del operón *dlt* no sea uno de los mecanismos que los otorga la resistencia a Lcn972.
- La inducción de las cepas reporteras con bacitracina activa el sistema de detección de tipo Bce y provoca un aumento de la actividad del promotor *dlt*. Concentraciones crecientes de bacitracina aumentan esta actividad salvo en el promotor mutante E11, en el cual ya se expresa de forma constitutiva.
- La inducción de las cepas reporteras con Lcn972 no activa el sistema de detección de tipo Bce. El sistema de detección y respuesta de tipo Lia, que sí responde a Lcn972, no afecta a la actividad del promotor *dlt*.
- La afinidad del regulador transcripcional LlrG no parece verse afectada por las mutaciones en los promotores. Las diferencias en la actividad promotora están provocadas por los cambios en los procesos del comienzo de la transcripción, como la unión de la ARN polimerasa a las regiones -10 y -35 y la apertura de la doble hebra de ADN.

Como perspectivas futuras para este trabajo, sería de utilidad completar la optimización de los ensayos de retardo en gel y confirmar si la afinidad de LlrG se ve afectada por las mutaciones, así como determinar el impacto de la mutación A<sub>189</sub>E en la actividad de dicho regulador. También, el plásmido reportero pRCR::P<sub>dlt</sub>\_WT generado en este trabajo puede ser de utilidad para estimar los niveles de expresión de los genes *dlt* en otras cepas o en diferentes condiciones de crecimiento y frente a diferentes antimicrobianos.



## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, A. F., & Georgellis, D. (2016). Características y funcionamiento de los Sistemas de Dos Componentes de organismos procariotas y eucariotas. *Química Viva*, 15(3), 11-27. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86348856003>
- Bessonova, T. A., Lekontseva, N. V., Shvyreva, U. S., Nikulin, A. D., Tutukina, M. N., & Ozoline, O. N. (2019). Overproduction and purification of the Escherichia coli transcription factors «toxic» to a bacterial cell. *Protein Expression and Purification*, 161, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.05.001>
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2001). The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Research*, 11(5), 731-753. <https://doi.org/10.1101/gr.169701>
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Neuhaus, F. C., & Hamilton, I. R. (2000). Defects in d-Alanyl-Lipoteichoic Acid Synthesis in *Streptococcus mutans* Results in Acid Sensitivity. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6055-6065. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94739/>
- Buckenhüskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1), 253-271. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90067-J](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90067-J)
- Caldo LB (Lennox) Highly-referenced microbial growth powder medium, low salt, suitable for salt-sensitive *E.coli* culture. | Sigma-Aldrich. (s. f.). Recuperado 7 de mayo de 2024, de <http://www.sigmaaldrich.com/>
- Campelo, A. B., López-González, M. J., Escobedo, S., Janzen, T., Neves, A. R., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2020). Mutations Selected After Exposure to Bacteriocin Lcn972 Activate a Bce-Like Bacitracin Resistance Module in *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01805>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1), 131-149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)



- Chapot-Chartier, M.-P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(1), S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Cogan, T. M., & Accolas, J.-P. (1996). *Dairy Starter Cultures*. VCH. <https://www.wiley.com/en-es/Dairy+Starter+Cultures-p-9780471185840>
- Crowe, J., Masone, B. S., & Ribbe, J. (1995). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Molecular Biotechnology*, 4(3), 247-258. <https://doi.org/10.1007/BF02779018>
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgő, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597-2606. <https://doi.org/10.1128/jb.01695-07>
- Duwat, P., Cochu, A., Ehrlich, S. D., & Gruss, A. (1997). Characterization of Lactococcus lactis UV-sensitive mutants obtained by ISS1 transposition. *Journal of Bacteriology*, 179(14), 4473-4479. <https://doi.org/10.1128/jb.179.14.4473-4479.1997>
- Economou, N. J., Cocklin, S., & Loll, P. J. (2013). High-resolution crystal structure reveals molecular details of target recognition by bacitracin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14207-14212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308268110>
- Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Kit.* (s. f.). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/en/E33075>
- Evivie, S. (2013). Preliminary studies on pharmaceutical microencapsulation for synbiotic application. *Journal of Applied and Natural Science*, 5, 488-496. <https://doi.org/10.31018/jans.v5i2.358>
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. (1999). Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 89-113.
- Formedium | M17 Broth.* (s. f.). Formedium Powdered Media & Liquids | UK Research & Microbiology. Recuperado 28 de abril de 2024, de <https://formedium.com/product/m17-broth/>



- Forquet, R., Pineau, M., Nasser, W., Reverchon, S., & Meyer, S. (2021). Role of the Discriminator Sequence in the Supercoiling Sensitivity of Bacterial Promoters. *mSystems*, 6(4), e0097821. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00978-21>
- Fuellgrabe, M. W., Boonrod, K., Jamous, R., Moser, M., Shibolet, Y., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2011). Expression, purification and functional characterization of recombinant Zucchini yellow mosaic virus HC-Pro. *Protein Expression and Purification*, 75(1), 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.07.008>
- Garay-Novillo, J. N., García-Morena, D., Ruiz-Masó, J. Á., Barra, J. L., & Del Solar, G. (2019). Combining Modules for Versatile and Optimal Labeling of Lactic Acid Bacteria: Two pMV158-Family Promiscuous Replicons, a Pneumococcal System for Constitutive or Inducible Gene Expression, and Two Fluorescent Proteins. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01431>
- Hao, P., Liang, D., Cao, L., Qiao, B., Wu, H., Caiyin, Q., Zhu, H., & Qiao, J. (2017). Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 6137-6153. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8365-7>
- Haugen, S. P., Berkmen, M. B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., & Gourse, R. L. (2006). rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: An additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, 125(6), 1069-1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.034>
- Hawley, D. K., & McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 11(8), 2237-2255. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC325881/>
- Hill, C. (2012). Virulence or Niche Factors: What's in a Name? *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5725-5727. <https://doi.org/10.1128/JB.00980-12>
- Hook-Barnard, I. G., & Hinton, D. M. (2009). The promoter spacer influences transcription initiation via sigma70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 737-742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808133106>
- Jordan, S., Hutchings, M. I., & Mascher, T. (2008). Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 107-146. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00091.x>



- Khan, A., Davlieva, M., Panesso, D., Rincon, S., Miller, W. R., Diaz, L., Reyes, J., Cruz, M. R., Pemberton, O., Nguyen, A. H., Siegel, S. D., Planet, P. J., Narechania, A., Latorre, M., Rios, R., Singh, K. V., Ton-That, H., Garsin, D. A., Tran, T. T., ... Arias, C. A. (2019). Antimicrobial sensing coupled with cell membrane remodeling mediates antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(52), 26925-26932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916037116>
- Kramer, N. E., van Hijum, S. A. F. T., Knol, J., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2006). Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(5), 1753-1761. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1753-1761.2006>
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(3), 171-184. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>
- López-González, M. J., Escobedo, S., Rodríguez, A., Neves, A. R., Janzen, T., & Martínez, B. (2018). Adaptive Evolution of Industrial *Lactococcus lactis* Under Cell Envelope Stress Provides Phenotypic Diversity. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02654>
- Lortal, S., & Chapot-Chartier, M.-P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal - INT DAIRY J*, *15*, 857-871. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.024>
- Martínez, B., Rodríguez, A., Kulakauskas, S., & Chapot-Chartier, M.-P. (2020). Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: Threats and defences. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(5), 538-564. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa021>
- Martínez, B., Zomer, A. L., Rodríguez, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2007). Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR. *Molecular Microbiology*, *64*(2), 473-486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05668.x>
- Mitchell, A. M., & Silhavy, T. J. (2019). Envelope stress responses: Balancing damage repair and toxicity. *Nature Reviews. Microbiology*, *17*(7), 417-428. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0199-0>





- Mohedano, M. L., García-Cayuela, T., Pérez-Ramos, A., Gaiser, R. A., Requena, T., & López, P. (2015). Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(2), 247-253. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1567-4>
- Morris, S. M., Wiens, L., Rose, O., Fritz, G., Rogers, T., & Gebhard, S. (2024). Regulatory interactions between daptomycin- and bacitracin-responsive pathways coordinate the cell envelope antibiotic resistance response of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.15264>
- Mulligan, M. E., Brosius, J., & McClure, W. R. (1985). Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the TAC promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3529-3538.
- Neuhaus, F. C., & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 67(4), 686-723. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003>
- Nouaille, S., Commissaire, J., Gratadoux, J. J., Ravn, P., Bolotin, A., Gruss, A., Le Loir, Y., & Langella, P. (2004). Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1600-1607. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1600-1607.2004>
- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., & Ogasawara, N. (2003). The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(4), 1135-1144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03653.x>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(3), 837-890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>



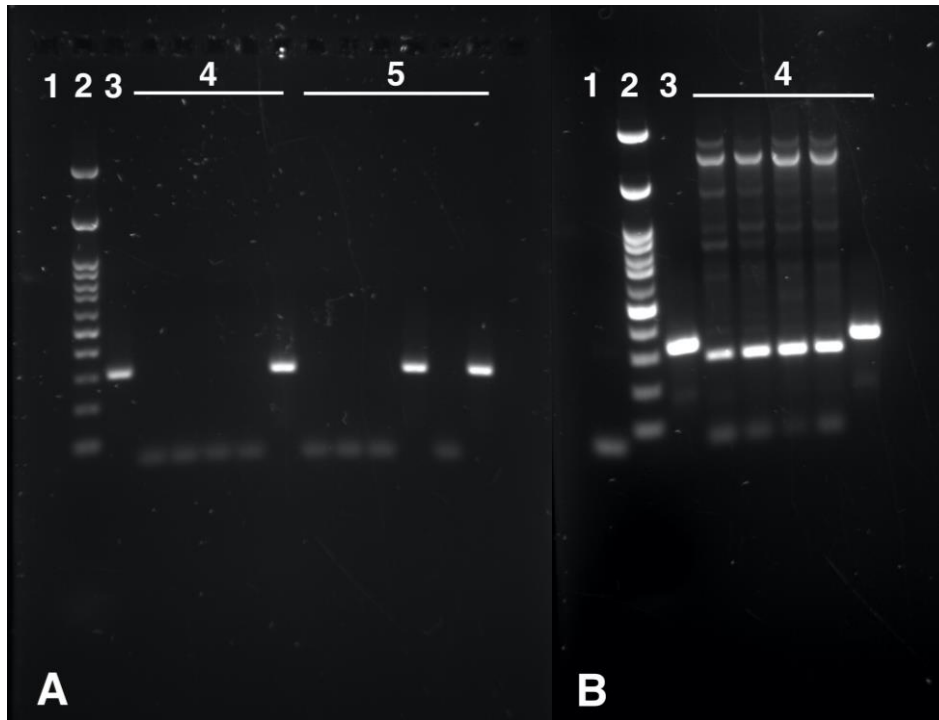
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M. A., Leopold, K., & Fischer, W. (1995). Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(26), 15598-15606. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15598>
- pET-21a(+)* DNA - Novagen Novagen's *pET-21a-d(+)* vectors carry an N-terminal T7-Tag sequence plus an optional C-terminal His-Tag sequence. | Sigma-Aldrich. (s. f.). Recuperado 28 de abril de 2024, de <http://www.sigmaaldrich.com/>
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598-599. <https://doi.org/10.1038/258598a0>
- Revilla-Guarinos, A., Gebhard, S., Mascher, T., & Zúñiga, M. (2014). Defence against antimicrobial peptides: Different strategies in Firmicutes. *Environmental Microbiology*, 16(5), 1225-1237. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12400>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183-215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Veiga, P., Bulbarela-Sampieri, C., Furlan, S., Maisons, A., Chapot-Chartier, M.-P., Erkelenz, M., Mervelet, P., Noirot, P., Frees, D., Kuipers, O. P., Kok, J., Gruss, A., Buist, G., & Kulakauskas, S. (2007). SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19342-19354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611308200>
- Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(4), 276-287. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1861>
- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., & von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>



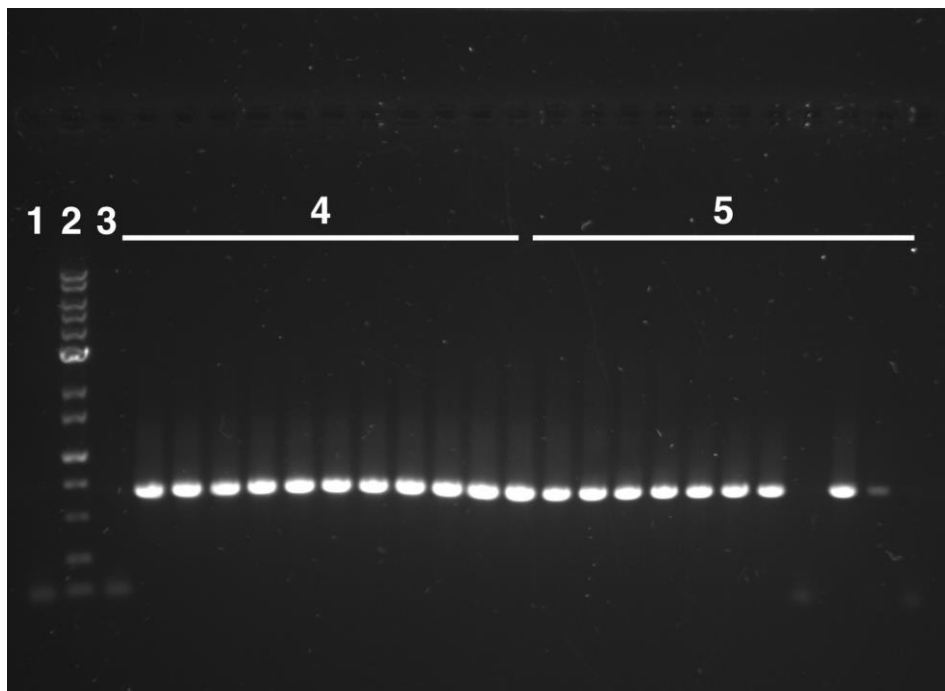
Wu, H., Zhang, Y., Li, L., Li, Y., Yuan, L., E, Y., & Qiao, J. (2022). Positive regulation of the DLT operon by TCSR7 enhances acid tolerance of *Lactococcus lactis* F44. *Journal of Dairy Science*, 105(10), 7940-7950. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21898>

XL-1 Blue—EcoliWiki. (s. f.). Recuperado 28 de abril de 2024, de [https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/XL-1\\_Blue](https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/XL-1_Blue)

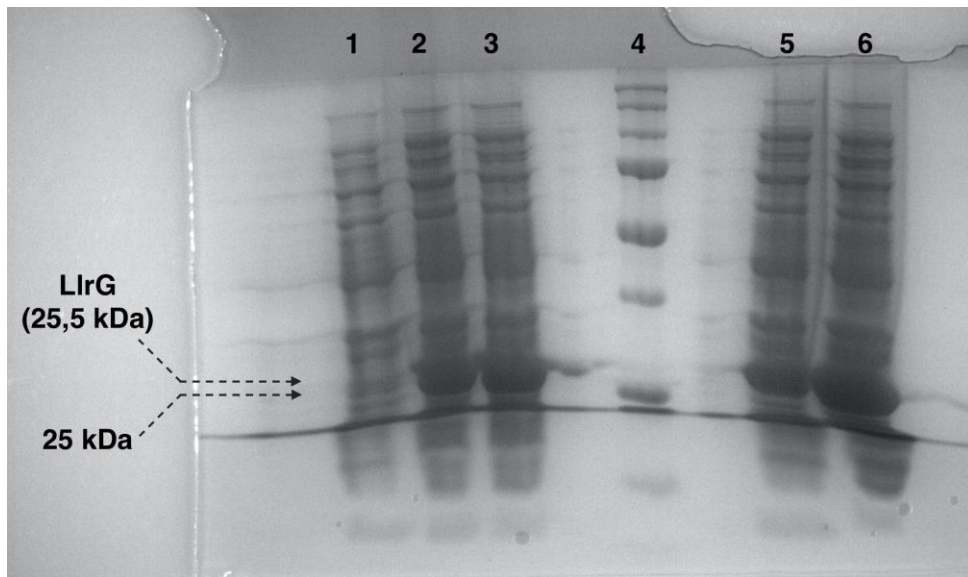
## ANEXOS



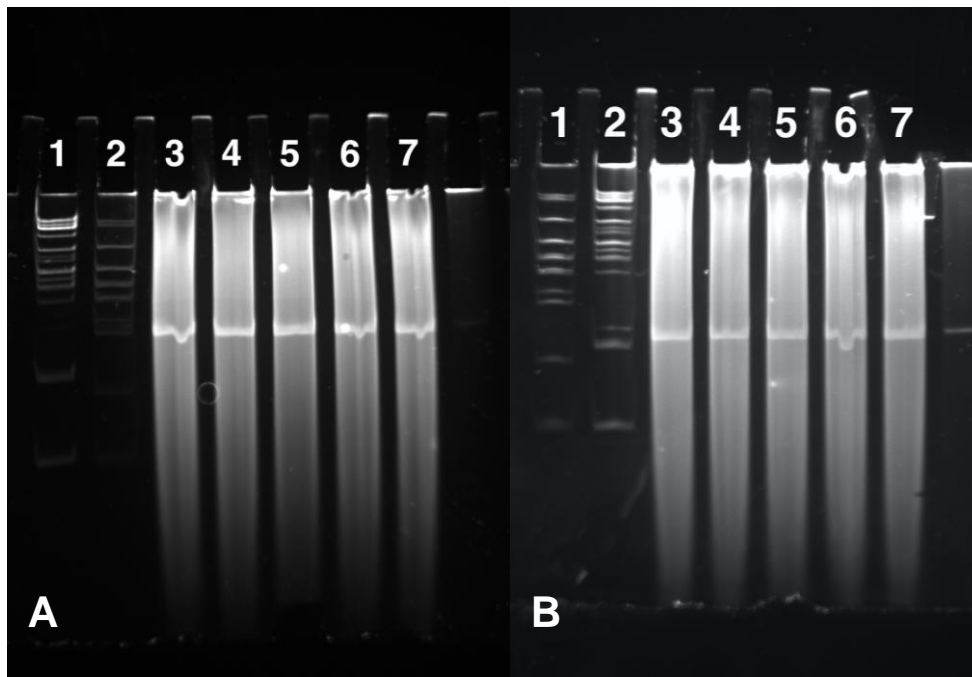
**Anexo 1. Geles agarosa (2%) de la comprobación de los clones transformados de *E. coli* DH10B con los plásmidos derivados de pRCR. (A) [1] Control negativo PCR. [2] Marcador. [3] Control positivo PCR con extracto de IL1403. [4] Clones transformados con pRCR::P<sub>dlt</sub>\_WT. [5] Clones transformados con pRCR::P<sub>dlt</sub>\_E11. (B) [1] Control negativo PCR. [2] Marcador. [3] Control positivo PCR con extracto de IL1403. [4] Clones transformados con pRCR::P<sub>dlt</sub>\_B5.**



**Anexo 2. Geles agarosa (2%) de la comprobación de los clones transformados de *E. coli* XL-1 Blue con los plásmidos derivados de pET-21a. (1) Control negativo PCR. (2) Marcador. (3) Control negativo ADN con plásmido pET-21a. (4) Clones transformados con pET-21a::LlrG\_WT. (5) Clones transformados con pET-21a::LlrG\_D8.**



**Anexo 3. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% de los extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG.** (1) Extracto *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_WT sin inducción. (2) Extracto *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_WT con inducción durante 3 horas a 37 °C. (3) Extracto *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_WT durante 16-18 horas a temperatura ambiente. (4) Marcador. (5) Extracto *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_D8 con inducción durante 3 horas a 37 °C. (6) Extracto *E. coli* BL21(DE3)/pET-21a::LlrG\_D8 durante 16-18 horas a temperatura ambiente



**Anexo 4. Gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de los primeros ensayos de retardo en gel con LlrG\_WT con las condiciones descritas por Wu et al. (2022).** (A) Control positivo con  $P_{dlt\_WT}$ . [1,2] Marcador. Concentraciones de LlrG\_WT: [3] 0  $\mu$ M. [4] 2  $\mu$ M. [5] 4  $\mu$ M. [6] 6  $\mu$ M. [7] 8  $\mu$ M. (B) Control negativo con  $P_{lm92447}$ . [1,2] Marcador. Concentraciones de LlrG\_WT: [3] 0  $\mu$ M. [4] 2  $\mu$ M. [5] 4  $\mu$ M. [6] 6  $\mu$ M. [7] 8  $\mu$ M.