



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Expresión heteróloga de la proteína IFN-I del sistema inmune de *Salmo salar* en *Bacillus megaterium***

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO**

**RODRIGO ALONSO LEYTON ROSSI**

**Director de Memoria**  
**Dr. Mario Tello Reyes**

**Laboratorio de Metagenómica  
Bacteriana**  
**Centro de Biotecnología Acuícola  
(CBA)**  
**Facultad de Química y Biología**  
**Universidad de Santiago**

**Profesor Patrocinante**  
**Dr. Sergio Lobos Camus**

**Depto. de Bioquímica y Biología  
Molecular**  
**Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas**  
**Universidad de Chile**

**Diciembre**  
**2017**

**Esta memoria fue desarrollada en:**

Laboratorio de Metagenómica Bacteriana  
Centro de Biotecnología Acuícola (CBA)  
Universidad de Santiago

**Esta memoria fue financiada por:**

Proyecto FIA PYT-2012-0056

“Puedes ir hacia atrás todo lo que quieras. Yo propongo ir 185 millones de generaciones atrás; te darás cuenta de que tu ancestro de 185 millones de generaciones fue un pez”

Richard Dawkins.

## Agradecimientos

Quienes más me conocen sabrán que esta memoria fue corta en ejecución y extensa en entrega. Entremedio muchas cosas acontecieron, entorpeciendo el natural proceso de desarrollo como investigador joven, sacándome del flujo de egresar, aprender, proponer, investigar, formar temple y carácter, y finalizar para golpear la puerta de entrada a la Academia o triunfar en el mundo profesional. Gran parte de este proceso se vio truncado, como una proteína con un codón de término anticipado, pero cuyo resultado finalmente resulta sorprendentemente funcional. Parte de esto y de mis últimos años se los debo a mis más cercanos colaboradores, socios, amigos y compañeros en las armas del I+D. Leonardo y Francisco. Sin ellos, mi historia de vida no sería la misma. Dedico la entrega de esta memoria a ellos y a todo lo que han significado.

Agradezco también a mi familia. A mi padre Renato, quien me motivó a ser quien soy actualmente. A mi madre Eleonora, quien me inspira profundamente por su labor social. A mis hermanas, Aurora y Emma, quienes siempre me motivan a ser mejor persona, pues sé que soy para ellas un ejemplo del que necesitan sentirse orgullosas. Reconozco también el cariño familiar e incondicional de mis abuelos, Hugo y Elsa, así como la historia de vida que me ha servido de inspiración de mi abuelo Renato, ex trabajador de la NASA, y el cariño y apoyo de mi abuela Yolanda. No puedo tampoco dejar de sentirme agradecido de la cercanía y afecto de mis primos Alejandro, Mauricio y Muriel, ni dejar de mencionar el amor que me ha dado mi actual pareja, Celeste, quien ha sido mi luz y compañía en las buenas, en las malas, en la riqueza y en la pobreza.

Por otro lado, durante todo proceso uno encuentra amigos que siguen tu progreso, tu historia y te consuelan durante tus dificultades. Por ello agradezco a Claudia y a Mauricio, quienes además me ayudaron en innumerables asignaturas, o a Coral, a Gabriela, a Arantza y a Macarena, por estar ahí, por brindarme su amistad, su preocupación, y permitirme compartir esta etapa con ellas. Agradezco también a Niki, quien se enfrenta a una Cataluña turbulenta, y a Dennis, quien se vio envuelto por mi causa en una de mis aficiones más extrañas, los insectos en la dieta. Con ellos poseo más que un vínculo profesional y me han apoyado de una u otra manera en la escritura de esta memoria.

Por supuesto, debo agradecer también la paciencia, la guía y la sabiduría zen de quien fuera el tutor de esta memoria, Mario. Mario me ayudó a formar mi carácter, me enseñó a trabajar bajo presión y a exigir más de mí mismo. Gracias a él logré comprender que el conocimiento por sí mismo no sirve si no se aplica, y que la aplicación por sí misma no significa experiencia, que la experiencia se forja, principalmente sobre errores y corrección de los mismos. Lo que más destaco de mi paso por su laboratorio fue mi crecimiento personal y la formación de carácter que me legó, tanto más que el aprendizaje técnico

que también aprendí. Así también, debo agradecer a mis compañeros de laboratorio, Carlos, Caro, Josué y Natalia.

Debo nombrar también a quienes han sido mis colegas por los últimos tres o cuatro años. Nacho Brescia, Ricardo Doberti, Rodrigo Daddy, Erick Armingol, Edu Zavala, ROP y todos los que formaron parte de la aventura Labspace, actualmente R2B. Agradecer también a Diego, Amanda y a los Daeki, a Cinthia, a Javier, a Paula Cuevas y a Noni. Así como a mis queridos Ronald, Javiera y Tábata, siendo estos tres quienes han formado parte de una espléndida familia corporativa en Novalact.

A modo de cortesía, debo agradecer además a aquellas instituciones que me han permitido llegar hasta aquí. En primer lugar, a la Universidad de Chile, por aceptarme, por formarme, por entregarme las herramientas para no solo ver más allá, sino que avanzar más allá. En segundo lugar, a la Universidad de Santiago, quien me acogió con los brazos abiertos para llevar a cabo esta investigación y me permitió conocer personas de gran calidad humana. También debo agradecer a mis sponsors, al Banco Santander, quien me permitió pagar mis estudios a una tasa preferente, aunque actualmente drene mis arcas personales; a la Fundación para la Innovación Agraria, FIA, quien financió gran parte de la investigación contenida en esta memoria; y a la Corporación de Fomento, CORFO, que confió en mis demás proyectos sin cuestionamientos.

Finalmente agradecer al componente mitológico que me impulsa, a mis dioses, con quienes pacté una alianza para el solsticio de verano de 2010, y cuya promesa han mantenido. Me han sostenido, guiado y me seguirán guiando por el camino del progreso, del bien y del conocimiento. Que el poder sea con todos, Baal Haddad, Baalat Ashtart y Kothar wa Khasis, y que, más temprano que tarde, nos inspiren para que la luz de la Ciencia se imponga y podamos vivir más allá de la realidad creada, en una realidad que aún debemos crear nosotros a través de esta.

# Índice general

## Índice general

### Índice de figuras y tablas

#### Abreviaturas

#### Resumen

#### Abstract

<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Hipótesis</b>	8
<b>3. Objetivos</b>	8
3.1 Objetivo general	8
3.2 Objetivos específicos	8
<b>4. Materiales y metodología</b>	9
4.1 Cepas bacterianas y plasmidios	9
4.2 Reactivos químicos	9
4.3 Enzimas y anticuerpos	12
4.4 Fungibles y sistemas comerciales	13
4.5 Soluciones y amortiguadores	14
4.6 Equipos de laboratorio	16
4.7 Software usado	17
4.8 Procedimientos de Biología Molecular	17
4.9 Procedimientos de Microbiología	20
4.10 Procedimientos de detección de proteínas	23
<b>5. Resultados</b>	25
5.1 Construcción del vector	25
5.2 Transformación de <i>B. megaterium</i>	30
5.3 Secuenciación de la construcción	32
5.4 Expresión de IFN-I	35
<b>6. Discusión</b>	37
6.1 Protocolo de electroporación de <i>B. megaterium</i>	37
6.2 Mutaciones en la construcción de pSSBm110:IFN-I	38
6.3 Expresión y detección de IFN-I	39
<b>7. Proyecciones</b>	42
<b>8. Conclusiones</b>	44
<b>9. Bibliografía y referencias</b>	45

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Plasmidio recombinante pSSBm110:IFN-I	26
<b>Figura 2.</b> Temperatura óptima de amplificación de IFN-I	27
<b>Figura 3.</b> Clones de <i>E. coli</i> transformados positivos para IFN-I	28
<b>Figura 4.</b> Comprobación de la inserción mediante digestión con EcoRI	29
<b>Figura 5.</b> Comprobación de inserto en <i>B. megaterium</i> transformantes	31
<b>Figura 6.1</b> Detección de mutación puntual de tipo sustitución	33
<b>Figura 6.2</b> Comparación entre secuencia modelo traducida y secuencia clonada en vector pSSBm110:IFN-I	34
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de secuencias promotoras de SPLipA	35
<b>Figura 9.</b> Detección de IFN-I en lisados de <i>B. megaterium</i>	36
<hr/>	
<b>Tabla I.</b> Lista de partidores	25
<b>Tabla II.</b> Condiciones de electroporación	30

## **Abreviaturas**

°C: Grados Celsius

A: Ampere

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

bp: Pares de bases

cfu: Unidades formadoras de colonias

dNTP: Desoxirribonucleótidos

g: Gramo

GFP: Proteína fluorescente verde

HRP: Peroxidasa de rábano

IL: Interleucina

IFN: Interferón

IPN: Necrosis Pancreática Infecciosa

IPNv: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

kb: Mil pares de bases

kDa: Kilodalton

kV: Kilovoltio

L: Litro

M: Molar

m: Metro

mA: Miliampere

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mm: Milímetro

ng: Nanogramo



nm: Nanómetro

OD: Densidad óptica

P.A.: Para análisis, grado analítico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

p/v: Peso / volumen

rpm: Revoluciones por minuto

SRS: Síndrome Rickettsial Salmonídeo

UV: Ultravioleta

V: Voltio

v/v: Volumen / volumen

x g: Aceleración de gravedad terrestre

µg: Microgramo

µL: Microlitro

## **Resumen**

### **Expresión heteróloga de la proteína IFN-I del sistema inmune de *Salmo salar* en *Bacillus megaterium***

La industria acuícola de salmónidos, como la del salmón del Atlántico o de la trucha arcoíris, constituye una de las principales actividades económicas de Chile. Sin embargo, en su puesta en marcha enfrenta desafíos técnicos y ambientales, incluyendo la aparición de enfermedades que se transmiten rápidamente dentro de las poblaciones de cultivo. La segunda causa de pérdidas por patología infecciosa es la Necrosis Pancreática Infecciosa, causada por el virus IPNV. Se ha descrito que la citoquina IFN-I induce una potente actividad antiviral contra IPNV.

Para este trabajo de investigación, se propuso clonar IFN-I de la especie *Salmo salar* en *Bacillus megaterium*, una bacteria inocua capaz de producir grandes cantidades de proteína y que ha sido utilizada exitosamente en la industria biotecnológica. Para lo anterior, se diseñó un método de clonación clásico y se logró exitosamente la transformación de *Escherichia coli* con el vector de *B. megaterium* pSSBm110 con el gen de IFN-I como inserto (pSSBm110:IFN-I). Se probaron luego dos métodos de transformación para *B. megaterium*, uno de electroporación que no dio resultados cuantificables y otro de creación de protoplastos libres de pared capaces de absorber ADN exógeno. Sin embargo, a pesar de lograr la transformación y la clonación exitosa del vector pSSBm110:IFN-I en *B. megaterium*, no se logró la detección de la expresión de IFN-I recombinante, por lo cual serán necesarios nuevos intentos para lograr su uso como sistema de expresión para esta citoquina.

## **Abstract**

### **Heterologous expression of the *Salmo salar* immunological protein IFN-I in *Bacillus megaterium***

The salmonid aquaculture industry, such as the Atlantic salmon or the rainbow trout aquaculture, is one of the Chile's main economic activities. However, this industry faces technical and environmental challenges, including the emergence of diseases which spread quickly through the fish populations. The infectious pancreatic necrosis, which is caused by the IPNV virus, is the second cause of fish losses related to an infectious disease. It has been described that the cytokine IFN-I induces a powerful antiviral response against IPNV.

In this research, we proposed the cloning of IFN-I from *Salmo salar* in the harmless bacterium *Bacillus megaterium*, a species of high-yielding protein production, successfully used in the biotechnology industry. For this, a classic cloning method was used, obtaining transformed *Escherichia coli* cells with the *B. megaterium* pSSBm110 vector, and the IFN-I insert (pSSBm110:IFN-I). Then, two *B. megaterium* transformation methods were tested. The first one, an electroporation method, which did not offer quantifiable results. The second one, a method based on protoplast cells generation where foreign DNA was absorbed. Even though the transformation and cloning in *B. megaterium* were both successful, and verified through sequencing, the expression of the recombinant peptide was not detectable. Thus, new attempts will be necessary to use this expression system for this cytokine.

## 1. Introducción

La industria de los salmónidos es una de las principales actividades económicas de Chile, alcanzando en 2016 una estimación de cosecha acumulada cercana a las 675,6 mil toneladas, entre salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón del Pacífico o coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), desarrollándose principalmente entre las regiones de La Araucanía y Los Lagos (Bravo, Silva y Monti, 2012; Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2017). La producción se divide en tres etapas: piscicultura, engorda y procesamiento. La primera ocurre en agua dulce y es donde se produce la fertilización externa y la incubación de las ovas. Luego, los peces juveniles, o alevines, pasan a agua de mar para el proceso de engorda, en donde se ubican en piscinas o granjas de profundidades de hasta 50 metros (Bravo, Silva y Monti, 2012), para finalmente ser cosechados y procesados.

El crecimiento de especies salmónidas en granjas permite obtener una gran cantidad de producto, pero a la vez, presenta el riesgo de generar pérdidas millonarias en caso de infección o enfermedad, entre otros riesgos asociados a la engorda en agua de mar, como ictiotoxicidad por agentes tóxicos o irritantes, hipoxia o daño mecánico a las agallas causados por afloramientos de microalgas, como *Pseudochattonella* spp., *Chattonella* spp. o *Alexandrium* spp. (Dorantes-Aranda y cols., 2015; Eckford-Soper y Daugbjerg, 2016). En el caso de enfermedades infecciosas, dentro de los posibles contagios que afectan a estos peces se encuentra el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), el cual es la segunda causa de pérdidas por patología infecciosa después del Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS) causado por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (Guy y cols., 2009; Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013).

El IPNV ataca principalmente a salmónidos jóvenes, en etapas de alto estrés donde el sistema inmune se encuentra comprometido, tales como la primera alimentación en agua fresca o la transferencia de éstos a las granjas

en el mar (Rønneseth, Teien y Wergeland, 2013; Mweemba, Mutoloki y Evensen, 2014). Además, el IPNV presenta una virulencia variable dependiente del serotipo, el grado de infección, la edad del pez, y la temperatura del agua (Damsgard, Mortensen y Someer, 1998). Los peces que sobreviven a la enfermedad, y los infectados después de los 6 meses de vida, se convierten en portadores asintomáticos, lo cual representa un gran riesgo para la salmonicultura debido a que las heces y orina de estos salmones contienen altas cantidades del virus, generando un entorno infeccioso (Ortega y Enríquez, 2007; Mweemba, Mutoloki y Evensen, 2014), además que el virus puede ser traspasado de una generación a otra (Cuesta y cols., 2010).

Por lo tanto, el IPNV es capaz de generar una infección persistente en los peces sobrevivientes, en la cual el patógeno permanece presente sin causar un cuadro clínico. Este efecto parece estar asociado a la modulación de la expresión de las citoquinas antiinflamatorias del hospedero, las cuales pueden ayudar a establecer una infección crónica (Reyes y cols., 2012).

Estructuralmente, IPNV es un birnavirus acuático sin envoltura, de cápside icosaédrica de aproximadamente 60 nm de diámetro, con dos segmentos de ARN de doble cadena (Damsgard, Mortensen y Someer, 1998). El segmento más largo, denominado A, codifica una poliproteína conformada por las proteínas VP2 (cápside), VP3 y VP4 (proteasa), y para una proteína no estructural, VP5. El otro segmento, denominado B, codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN denominada VP1 (Munang'andu y cols., 2012; Mweemba, Mutoloki y Evensen, 2014). La cápside icosaédrica se compone de 260 trímeros de VP2. A su vez, VP3 forma un complejo ribonucleoproteico con el ARN genómico. VP5, por otro lado, se expresa en un marco de lectura abierto alternativo (Hulo y cols., 2011).

La patogenicidad y virulencia se relacionan con la capacidad del IPNV de afectar la señalización celular, activando o inhibiendo vías y genes que favorecen la replicación o afectan los mecanismos de defensa. Se ha determinado que la proteína VP2 es la determinante de la virulencia y se asocia con la secuencia de determinados residuos en su dominio variable central (Collet, 2014). Además, se ha descrito que, en el caso de sobrevivientes, el IPNV puede ser aislado de macrófagos recogidos de salmones infectados; en este caso, la inhibición de la apoptosis es mediada por la expresión de VP5, lo que permite que el virus resida en el macrófago como parte de su estrategia de evasión y propagación (Ortega y Enríquez, 2007).

El tratamiento actual contra el IPNV ha demostrado altos niveles de supervivencia en pruebas experimentales y de campo; sin embargo, bajo condiciones de crianza este virus sigue causando una mortalidad considerable (Renneseth, Teien y Wergeland, 2013). Este tratamiento consiste en la aplicación de vacunas con partículas virales completas inactivadas o subunidades recombinantes (Munang'andu, y cols. 2012; Renneseth, Teien y Wergeland, 2013), las cuales inducen una pobre respuesta de células T (Renneseth, Teien y Wergeland 2013).

En el sistema inmune, las células inmunológicas se comunican a través de un conjunto de proteínas llamadas citoquinas, las cuales tienen como objetivo la señalización de las funciones del tejido inmune, como el crecimiento, diferenciación y activación; la regulación de los distintos procesos inmunes, como la respuesta innata; y la producción de anticuerpos (Reyes-Cerpa y cols., 2012). Los interferones (IFN) son citoquinas inducidas en respuesta a infecciones virales. En mamíferos, los interferones están involucrados en la mediación de la resistencia celular contra virus patógenos y modulan sistemas de respuesta innata y adaptativa (Ellis, 2001). Se ha clasificado a los interferones en dos grupos principales, tipo I y tipo II (Savan y Sakai, 2006). Los del tipo I incluyen a IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , inducidos por virus en la mayoría de las células. Los de tipo II corresponden a IFN $\gamma$  y son expresados en

células NK y linfocitos T en respuesta a IL-2, IL-18, mitógenos y antígenos (Samuel, 2001).

Si bien aún no se han descrito todos los componentes del sistema inmune de los peces, genes clave de mamíferos tienen sus homólogos en diversas especies de peces teleósteos, sugiriendo que el sistema inmune de estos comparte características con el de los vertebrados superiores en lo que a estos componentes se refiere (Robertsen y cols., 2003; Reyes-Cerpa y cols., 2012). Entre las citoquinas identificadas en peces y que son homólogas a las presentes en mamíferos cabe mencionar a TNA $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN (Whyte, 2007; Secombes, Wang y Bird, 2011; Wang y cols., 2011). En trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se han descrito al menos tres interferones de tipo I (Zou y cols., 2007), mientras que en salmón atlántico (*Salmo salar*) se han descrito dos, IFN $\alpha$ 1 y IFN $\alpha$ 2, incluyendo secuencias, estructuras de los genes, promotores y actividad antiviral (Robertsen y cols., 2003; Bergan y cols., 2006; Kileng, Brundtland y Robertsen, 2007; Rokenes, Larsen y Robertsen, 2007). Ambas proteínas, IFN $\alpha$ 1 y IFN $\alpha$ 2, expresan un precursor de IFN-I de 195 aminoácidos, compartiendo 95% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica.

Se ha descrito que el IFN-I proveniente de la especie *Salmo salar* puede inducir una potente respuesta inmune antiviral contra el IPNV *in vitro* (Robertsen y cols., 2003), por lo que se ha propuesto el uso de la bacteria *Bacillus megaterium* para su expresión y producción. Este organismo corresponde a una bacteria Gram-positivo aeróbica formadora de esporas; ampliamente distribuida y que se ha aislado desde distintos hábitats: suelo, agua de mar, sedimento, granos de arroz, miel, pescado y comida deshidratada (Vary, Biendendieck y cols., 2007). Su nombre significa "gran bestia" debido a su tamaño (de 4  $\mu$ m de largo por 1,5  $\mu$ m de diámetro), lo que la hace una de las bacterias más grandes descritas (Bunk, Schulz y cols., 2010). Ha sido un organismo modelo para el estudio de la biosíntesis de pared celular, la formación de membrana citoplasmática y el proceso de esporulación, entre otros (Vary, 1992).

*Bacillus megaterium* sintetiza una gran cantidad de proteínas, lo cual ha llamado la atención de la industria biotecnológica (Bunk, Biedendieck y cols., 2009). Además de su tamaño y capacidad de crecimiento en sustratos de bajo costo, se debe mencionar que no es patógena y por ser Gram-positivo carece de endotoxinas (Vary, 1994). Se ha usado exitosamente en la producción de proteínas de interés para la industria farmacéutica, clínica y agroquímica (Vary, 1992; Vary, 1994; Bunk, Biedendieck y cols., 2009), entre las que se puede mencionar amilasas (Metz y cols., 1988; Takasaki, 1989; Vihinen y Mantsala, 1989; Hebeda, Styrlun y Teague, 1998), penicilina amidasa (Suga y cols., 1990; Martin y cols., 1995; Yang y cols., 2006) y vitamina B12 (Wolf y Brey, 1986; Raux y cols., 1998; Biedendieck, Malten y cols., 2010; Moore y cols., 2014). A pesar de sus características, su uso en inmunología es reciente, con la expresión, escalamiento y producción de fragmentos de anticuerpos recombinantes (Jordan, Hust y cols., 2007; Jordan, Al-Halabi y cols., 2009; David, Westphal y cols., 2010; David, Steinwand y cols., 2011). Los fragmentos producidos por *Bacillus megaterium* mostraron una mayor actividad específica comparada con los producidos en *Escherichia coli* (Jordan, Hust y cols., 2007). Sin embargo, a pesar de su éxito como sistema de expresión de proteínas del sistema inmune, hasta la fecha no se han expresado en esta bacteria citoquinas recombinantes.

Para una expresión controlada de proteínas heterólogas, se pueden usar inductores. En 1991, se identificó un promotor inducido por xilosa en el genoma de *Bacillus megaterium* (Biedendieck, Gamer y cols., 2007). Este sistema consiste en un promotor fuerte que es controlado por la proteína represora XylR (Rygus y Hillen, 1991; Rygus, Scheler y cols., 1991). En ausencia de xilosa, los genes que son controlados por este promotor están reprimidos por XylR, mientras que en presencia de este azúcar el represor XylR pierde afinidad por el promotor, incrementado la expresión (Rygus, Scheler y cols., 1991). El uso de este sistema promotor localizado en plasmidios de replicación libre para la expresión de genes recombinantes en *B. megaterium* han logrado una expresión de hasta 350 veces los niveles de expresión basales cuando se adiciona xilosa al medio. A partir de este momento, este sistema se



utilizó para la producción intra y extracelular de diversas proteínas heterólogas, tanto procariotas como eucariotas (Biedendieck, Gamer y cols., 2007; Biedendieck, Yang y cols., 2007). Este mismo procedimiento de inducción por xilosa se pretende utilizar en esta investigación para la expresión de la citoquina IFN-I.

Complementando la inducción por xilosa, se han construido vectores con diversos péptidos líderes. Como parte del sistema de expresión a usar, en este trabajo se utilizará la señal de exportación SPLipA, un péptido señal de 28 aminoácidos perteneciente a la lipasa extracelular de *Bacillus megaterium* codificada en el gen *lipA* (Ruiz y cols., 2002). Esta señal de exportación se ha usado para la creación de plasmidios de expresión con promotor inducible por xilosa, dando lugar a proteínas de fusión capaces de secretarse al medio donde crece *Bacillus megaterium* en concentraciones de hasta 1 mg/L (Malten y cols., 2006). El sistema de inducción por xilosa y la señal del péptido SPLipA se encuentran contenidos en los vectores de expresión pSSBm110 y pSSBm101, éste último utilizado exitosamente en la expresión de una hidrolasa de 28,2 kDa de la bacteria *Thermobifida fusca* (Yang y cols., 2007).

En estudios previos a esta investigación, se ha utilizado la bacteria *Lactococcus lactis* para expresar la proteína IFN. El uso de este microorganismo se relaciona con su amplia distribución debido a su domesticación y uso en la industria láctea (Cavanagh, Fitzgerald y McAuliffe, 2015). La bacteria *Lactococcus lactis* es un organismo Gram-positivo, que no esporula y es principalmente anaeróbico. Se ha utilizado por miles de años en la producción de lácteos fermentados, contribuyendo al sabor, calidad, textura y seguridad de los alimentos, utilizando la formación de ácido láctico como subproducto de la fermentación de azúcares como vía principal para la inhibición de otras bacterias (Cavanagh, Fitzgerald y McAuliffe, 2015).

Además del uso en la industria alimentaria anteriormente mencionado, las bacterias lácticas pueden ser utilizadas para la producción de vacunas y proteínas virales y eucarióticas. La propiedad de las bacterias lácticas de secretar proteínas recombinantes al medio de cultivo incrementa el valor de

estos microorganismos. Esto permite un desarrollo extenso de herramientas moleculares (Thakib y cols., 2014). De hecho, a la fecha se han construido varios vectores plasmidiales para *Lactococcus lactis* (Thakib y cols., 2014). Un ejemplo de estos usos es la inducción de interferones (IFN) e interleucina 1 (IL-1) generada en macrófagos murinos por un fosfopolisacárido producido por *Lactococcus lactis* (Kitazawa y cols., 1996).

En esta memoria, se adaptaron partidores para amplificar la secuencia del plasmidio de *Lactococcus lactis* pNZ8148:IFN $\Delta$ P1 previamente diseñado en nuestro laboratorio. En el diseño de partidores se consideraron extremos que incluían sitios de restricción para enzimas *Bam*HI y *Sph*I. Utilizando estos partidores, se ha propuesto amplificar y purificar el gen de IFN-I con extremos que incluyan los sitios de restricción, para su posterior digestión con estas enzimas. Con esta información, se pretende producir IFN-I de *Salmo salar* recombinante utilizando como sistema productor la bacteria *Bacillus megaterium* y el vector pSSBm110 para *Bacillus megaterium*. De esta manera, la utilización en veterinaria piscícola de *Bacillus megaterium* para la producción de IFN-I, ya sea para la purificación a gran escala o para su administración directa a *Salmo salar*, podría servir para incrementar la respuesta contra virus, como IPNV.

## **2. Hipótesis**

"*Bacillus megaterium* DSM319 es un buen modelo de expresión heteróloga de la proteína IFN-I de *Salmo salar*"

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar a *Bacillus megaterium* DSM319 como sistema de expresión heteróloga de IFN-I de *Salmo salar*.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Clonar IFN-I de *Salmo salar* en el vector pSSBm110 para su expresión en *Bacillus megaterium* DSM319.
2. Expresar en forma heteróloga la proteína IFN-I usando *Bacillus megaterium* DSM319.

## **4. Materiales y metodología**

### **4.1 Cepas bacterianas y plasmidios**

Desarrollado para esta memoria:

Plasmidio pSSBm110:IFN-I

Disponible previamente en laboratorio:

Cepa bacteriana *Escherichia coli* MC1061

Plasmidio pNZ8148:IFN $\Delta$ P1, desarrollado desde vector comercial pNZ8148 (MoBiTec GmbH, Goettingen, Alemania)

Donación de Dra. Rebekka Biedendieck, Universidad Técnica de Braunschweig, Braunschweig, Alemania:

Cepa bacteriana *Bacillus megaterium* DSM319

Plasmidio pSSBm85 para expresión de GFP en *B. megaterium*

Plasmidio pSSBm101 para expresión de hidrolasa de *Thermofida fusca* en *B. megaterium*

Plasmidio pSSBm110, vector de expresión en *B. megaterium*

### **4.2 Reactivos químicos**

Becton, Dickinson and Company, NJ, Estados Unidos:

Agar Bacto™

Extracto de levadura Bacto™

Peptona Bacto™

Bioline, Londres, Reino Unido:

Amortiguador Accuzyme 10x (Accubuffer 10x)

Marcador de peso molecular de ADN de 1 kb, II HyperLadder™ 1 kb

Lonza Inc, Allendale, NJ, Estados Unidos:

Agarosa SeaKem® LE

New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos:

Marcador de peso molecular de proteína: Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)

Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, Estados Unidos:

Medio antibiótico N°3 DIFCO (AB3)

Polietilenglicol PM 6000 (PEG6000)

Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, Estados Unidos:

Amortiguador Taq 10x con KCl

Cloruro de magnesio en solución 20 mM

Marcador de peso molecular para Western blot: Life Technologies BenchMark™ His-tagged Protein Standard

Sustratos de quimioluminiscencia: SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate

United States Biological, MA, Estados Unidos:

Sal de sodio de ampicilina

Hidrocloruro de tetraciclina

Winkler Ltda, Santiago, Chile:

Ácido acético glacial

Ácido clorhídrico 37%

Ácido maleico P.A.

Acrilamida 30%, solución 29:1 Acrilamida:Bis-Acrilamida

Albúmina de suero bovino (BSA)

Amortiguador de carga de ADN 6x

Bromuro de etidio

Casaminoácidos Bacto™ DIFCO

Cloruro de calcio dihidratado P.A.,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Cloruro de magnesio hexahidratado P.A.,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Cloruro de potasio P.A., KCl

Cloruro de sodio P.A., NaCl

dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, cada uno 100 mM

Dodecil sulfato de sodio (SDS)

D-xilosa

Etanol P.A.

Etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA) 0,5 M P.A.

Fosfato de potasio monobásico P.A.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Fosfato trisódico P.A.,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$

Glicerol P.A.

Glucosa grado Biología Molecular

L-prolina

Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp (Ladder 100 bp)

Marcador de peso molecular de ADN de 1000 bp (Ladder 1 kb)

Metanol P.A.

MOPS 10x, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, pH 7,0

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina P.A. (TEMED)

PBS 10x, amortiguador fosfato salino

Persulfato de amonio P.A.

Reactivo de Bradford

Sacarosa grado Biología Molecular

Sulfato de magnesio P.A.,  $MgSO_4$

Sulfato de potasio P.A.,  $K_2SO_4$

TAE 50x, amortiguador Tris, ácido acético y EDTA. Concentración final Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3

Tricina P.A.

Tris base grado Biología Molecular

Tween 20 grado Biología Molecular

### **4.3 Enzimas y anticuerpos**

Abcam PLC, MA, Estados Unidos:

Anticuerpo primario: Rabbit Polyclonal Anti -6X His tag® antibody-ChIP Grade

Bioline, Londres, Reino Unido:

ADN Polimerasa Accuzyme: Accuzyme™ DNA Polymerase

Leinco Technologies, MO, Estados Unidos:

Anticuerpo secundario: Goat Anti-Rabbit Peroxidase Conjugated Antibody

New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos:

Enzima de restricción *Bam*HI

Enzima de restricción *Eco*RI

Enzima de restricción *Sph*I

Ligasa T4: T4 DNA Ligase

Lisozima

Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, Estados Unidos:

ADN Polimerasa Taq

#### **4.4 Fungibles y sistemas comerciales**

Advanced Microdevices Pvt, Ltd., Ambala Cantonment, India:

Membrana de nitrocelulosa de poro de 0,22 nm: Nitrocellulose Membrane Type-SCN

Favorgen Biotech Corp, Taiwán, República de China:

Sistema comercial de extracción de plasmidios: FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit



Sistema comercial de purificación de ADN: FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit

Merck Millipore, MA, Estados Unidos:

Membrana de diálisis: MF-Millipore™ Filter VCWP

#### **4.5 Soluciones y amortiguadores**

Amortiguador ánodo: Tris 0,1 M, HCl 0,022 M, pH 8,9

Amortiguador cátodo: Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,25

Amortiguador concentrador: 0,125 M Tris, SDS 0,1%, pH 6,8

Amortiguador de carga de proteínas 5x: Tris 0,2 M, SDS 12%, azul de bromofenol 0,4%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 20%

Amortiguador de corrida: Tris 0,02 M, glicina 0,2 M, SDS 0,1%, pH 8,3

Amortiguador de gel: Tris 1 M, HCl 0,33 M, SDS 0,1%, pH 8,45

Amortiguador de lisis de pared de *B. megaterium*: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, 5 mg/mL lisozima, 1 mL MgSO<sub>4</sub> 1 M, pH 6.5

Amortiguador de transferencia: Tris 0,02 M, glicina 0,2 M, SDS 0,1%, metanol 20%

Amortiguador separador: Tris 0,374 M, 0,1% SDS, pH 8,8

Ampicilina: Concentración final en medio y placa de 100 µg/mL

CR5-top-agar: solución A: 51,5 g sacarosa, 3,25 g MOPS, 300 mg NaOH, 250 mL; solución B: 2 g agar, 100 mg casaminoácidos, 5 g extracto levadura, 142,5 mL; 8 x CR5-salts: 1,25 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 250 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 g CaCl<sub>2</sub>, volumen final de 625 mL

CR5-top-agar: 1,25 mL solución A, 288  $\mu$ L CR5-salts, 125  $\mu$ L prolina 12%, 125  $\mu$ L glucosa 20%; solución B hervida, 713  $\mu$ L CR5-top-agar

dNTP mix: Mezcla de dNTPs con una concentración final 24 mM cada uno

Glucosa 20%: 5 g glucosa, volumen final de 25 mL

LB Agar: Medio LB con adición de agar a una concentración final de 1,5%

Medio LB: 5 g peptona, 5 g extracto de levadura, 2,5 g cloruro de sodio, disueltos en 500 mL de agua destilada. Esterilizado a 121°C durante 20 minutos

PBS: Dilución de amortiguador 10x en 1:10. Concentraciones finales: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM

PBS-Tween: Concentraciones finales: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, Tween 20 1%

Persulfato de amonio stock: Solución 10% persulfato de amonio

Prolina 12%: 3 g L-prolina, volumen final de 25 mL

Solución de desteñido: Metanol 15%, ácido acético 10%

Solución de geles de agarosa: Solución 1% agarosa en amortiguador TAE 1x

Solución de tinción: Metanol 50%, ácido acético 10%, azul de Coomassie 0,25%

Solución PEG-P: 20 g PEG6000, completar con SMM hasta 50 mL de volumen final

Solución SMM: 1,16 g ácido maleico (40 mM), 800 mg NaOH (80 mM), 2,03 MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (40 mM), 85,58 g sacarosa (1 M), volumen final de 250 mL

Solución SMMP: 2 x AB3, 2 x SMM 1:1

Solución stock de BSA: Concentración final 10 mg/mL en PBS

Solución stock de xilosa 1000x: Concentración final de 10  $\mu$ g/mL en agua nanopura

Tetraciclina: Preparación de stock 10 mg/mL en etanol, esterilizado por filtración a 0,22 µm. Concentración final en medio y en placa de 10 µg/mL

#### **4.6 Equipos de laboratorio**

Agilent Technologies, CA, Estados Unidos:

Termociclador: SureCycler 8800 Thermal Cycler

Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, Estados Unidos:

Cámara de electroforesis para proteínas: Mini-PROTEAN Tetra Cell

Cámara de electrotransferencia: Mini Trans-Blot

Electroporador: MicroPulser™ Electroporator

Fuente de poder: PowerPac Basic Power Supply

BioTek Instruments Inc, VT, Estados Unidos:

Lector de placas: Synergy™ HT

Hettich Lab Technology, MA, Estados Unidos:

Centrífuga de piso: Universal 320R Benchtop Centrifuge

Labnet International, Inc, NJ, Estados Unidos:

Cámara de electroforesis para ADN: ENDURO™ Gel XL Electrophoresis System

Sonics & Materials, Inc, CT, Estados Unidos:

Sonicador: Vibra-Cell VCX130PB

#### **4.7 Software usado**

ApE: A plasmid Editor v.2.0.51, desarrollado por M. Wayne Davis. 2003-2016.  
(Disponible: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

BioLign: BioLign alignment and multiple contig editor v.4.0.6.2, desarrollado por Tom Hall. 2000-2005.

(Disponible: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html/>).

Excel: Microsoft Excel 2007 v.12.0.4518.1014. Microsoft Office.

#### **4.8 Procedimientos de Biología Molecular**

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La reacción de PCR se realizó con el fin de amplificar el inserto deseado (gen IFN-I flanqueado para inserción en vector), utilizando la enzima de alta procesividad Accuzyme DNA Polymerase (Bioline, Reino Unido). La reacción se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un volumen de 50  $\mu$ L, usando 50 ng de ADN templado, 25 pmol/ $\mu$ L de cada partidor y 5 unidades de Accuzyme. El programa térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos y luego 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, apareamiento con los partidores a 59,7°C durante 30 segundos, y elongación a 72°C durante 60 segundos. Al término de la reacción siguió una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

#### Purificación de productos de PCR:

Se utilizó el sistema comercial para purificación de ADN de Favorgen siguiendo las instrucciones del fabricante, con elución en paso final con 50 µL con agua libre de nucleasas en lugar de amortiguador de elución.

#### Electroforesis de ADN:

Todas las electroforesis para visualización de ADN se realizaron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE a 100 V durante 40 minutos utilizando marcadores de 100 bp y 1 kb.

#### Visualización de plasmidios en una etapa:

Desde cultivo en placa, se resuspendieron colonias en 25 µL de EDTA 10 mM. Posteriormente se añadieron 25 µL de una solución de lisis constituida por NaOH 0,2 M, SDS 0,5% y sacarosa 18,2%. Luego de agitar mediante vórtex durante 20 segundos, cada tubo se incubó a 75°C durante 5 minutos, dejando luego enfriar a temperatura ambiente. Luego se añadieron a cada tubo 3 µL de amortiguador constituido por KCl 4 M y amortiguador de carga de electroforesis de ADN 6X, en una relación 1:1. Se agitó nuevamente en vórtex durante 30 segundos y cada tubo se dejó enfriar 5 minutos en hielo; luego se centrifugaron en microfuga a 14000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante luego pudo ser cargado en un gel de agarosa para su análisis por electroforesis de ADN, después de lo cual se pudieron distinguir presencia y peso molecular de los plasmidios.

#### Extracción de plasmidios a pequeña escala:

Para la extracción de plasmidios se utilizó el sistema comercial Favorgen según instrucciones del fabricante (Plasmid DNA Extraction Mini Kit, © Favorgen Biotech Corp).

### Extracción de plasmidios a gran escala:

Para lograr una mayor cantidad de plasmidios a partir de más cultivo, se centrifugaron cultivos saturados en tubos de 50 mL a 7000 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido de cada tubo se resuspendió en 2 mL de amortiguador de lisis, constituido por Tris-HCl pH 8 al 2,5%, EDTA 0,01 M y glucosa 5%, y tratado con con 4 mL de SDS/NaOH en frío, y luego con 3 mL de acetato de amonio 8 M. Se dejó reposar 30 minutos a -20°C y luego se centrifugó durante 30 minutos a 9000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se le agregaron 5,4 mL de isopropanol para la precipitación del ADN, dejando reposar durante 30 minutos más a -20°C y luego centrifugando por 30 minutos a 9000 rpm. El isopropanol se descartó y el precipitado se lavó, sin resuspender, con etanol 70% frío, centrifugando a 9000 rpm durante 30 minutos. Una vez que se evaporó el etanol, se resuspendió el ADN con la solución 1 del sistema comercial Favorgen para extracción de plasmidios y se siguieron las instrucciones del fabricante tal y como en el punto anterior.

### Digestión con enzimas de restricción:

Las digestiones con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sph*I se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, incubando las mezclas de reacción durante una hora a 37°C. Luego, se detuvieron las reacciones calentando las mezclas a 65°C u 80°C, dependiendo de la enzima de restricción utilizada.

### Ligación de los fragmentos de ADN:

La ligación en cada caso se realizó con ligasa T4 siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando una proporción molar 1:1 de ADN de vector digerido y ADN de inserto en un volumen final de 20 µL de reacción con 2000 unidades enzimáticas. La reacción se realizó a 4°C durante toda la noche.

#### Diálisis de ADN plasmidial:

Para cada ligación se dializaron gotas de 10 µL de muestra utilizando membranas de diálisis durante 1 hora sobre 20 mL de agua destilada.

#### Reacción en cadena de la polimerasa de colonias (PCR de colonias):

Para evaluar la presencia del inserto en colonias candidatas, se extrajeron 300 µL de cultivo bacteriano, centrifugado a 14000 rpm en microcentrífuga durante un minuto. El precipitado bacteriano se lavó con 500 µL de PBS y se reprecipitó por centrifugación a 14000 rpm durante un minuto. El pellet se resuspendió en 40 µL de PBS y se incubó a 95°C durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 6000 x g durante 4 minutos. De la fracción soluble se utilizaron 2,5 µL como templado para la reacción de PCR. Para realizar este procedimiento a partir de placa, se tomó una colonia y se resuspendió en 40 µL de PBS, siguiendo el protocolo recién descrito. Para estas reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq polimerasa, siguiendo recomendaciones del fabricante con 5 unidades de enzima en 50 µL totales por reacción. El programa utilizado para cada reacción consistió en la desnaturación inicial a 95°C durante 2 minutos, luego siguió la etapa de extensión con 35 ciclos de desnaturación a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 59,7°C durante 30 segundos y 60 segundos a 72°C en la etapa de elongación. Al término de los ciclos, se siguió una elongación a 72°C durante 5 minutos, para posteriormente mantener la mezcla de reacción a 16°C.

### **4.9 Procedimientos de Microbiología**

#### Condiciones de cultivo bacteriano:

*Bacillus megaterium* se creció en condiciones aeróbicas, con agitación en medio LB líquido y con aireación en placa LB-agar, a 30°C o 37°C. Las cepas

se almacenaron en una solución de medio LB con glicerol al 50% a -80 °C. Las mismas condiciones se utilizaron para *Escherichia coli*.

#### Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli*:

Se prepararon bacterias electrocompetentes de *Escherichia coli* MC1061 de la siguiente manera, se crecieron 5 mL de precultivo de *E. coli* en medio LB durante la noche, a 37°C con agitación. Se utilizó el precultivo para inocular 40 mL de medio LB, el cual fue incubado con agitación a 37°C hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0,5$ , luego de lo cual las células se centrifugaron en frío a 3000 x g a 4°C durante 15 minutos. El precipitado de bacterias se resuspendió en 30 mL de una solución de glicerol 10% y se repitió la centrifugación a 3000 x g a 4°C durante 15 minutos. El proceso contó con dos lavados consecutivos más, donde se resuspendió el precipitado en glicerol 10% y se centrifugó a 3000 x g a 4°C durante 15 minutos cada vez. Finalmente, las células se resuspendieron en glicerol 10% y se almacenaron a -80°C en alícuotas de 500 µL.

#### Transformación por electroporación de *Escherichia coli*:

Para transformar *E. coli* se agregaron 100 ng de ADN plasmidial en las cubetas de electroporación, sobre las cuales se agregaron 40 µL de células electrocompetentes por carga. Estas recibieron una descarga eléctrica de 2,5 kV y luego se recuperaron durante una hora en medio LB a 37°C con agitación. Al finalizar la hora, se sembraron sobre placas LB con antibiótico. Para la mayoría de los casos, se usó ampicilina como antibiótico selector.

#### Preparación de protoplastos competentes de *Bacillus megaterium*:

La obtención de *Bacillus megaterium* competentes para ser transformados requirió la eliminación de su pared celular, produciendo células esféricas sin pared o protoplastos capaces de ingresar ADN exógeno. Para esto, se utilizó el protocolo de Barg y cols. (2005), donde se inoculó 1 mL de



cultivo de *B. megaterium* incubado toda la noche a 37°C en condiciones de agitación en 50 mL de medio LB. Una vez que la densidad óptica alcanzó  $OD_{600}=1$ , se centrifugó a 4500 x g durante 15 minutos. Posteriormente se resuspendió en 5 mL de amortiguador SMMP recientemente preparado y se agregaron 50 µL de 1 mg/mL de lisozima en amortiguador SMMP, dejándose incubar durante 60 minutos a 37°C. Este paso aseguró la remoción de pared celular. Luego se realizó una centrifugación lenta a 1300 x g durante 10 minutos, tras lo cual se resuspendió en 5 mL de amortiguador SMMP, evitando movimientos bruscos debido a que los protoplastos son sensibles al estrés físico. Este paso se repitió nuevamente, desde la centrifugación hasta la resuspensión en SMMP, para utilizar los protoplastos inmediatamente en la transformación. También se resuspendieron en 15% v/v de glicerol frío en amortiguador SMMP para ser almacenados a -80°C para posterior uso.

#### Transformación de *Bacillus megaterium* por absorción de ADN exógeno:

Para la transformación se utilizó el protocolo sugerido en el Manual de MoBiTec "*Bacillus megaterium* Protein Production System" del año 2012 (MoBiTec, 2012). Este protocolo consistió en combinar 500 µL de la suspensión de protoplastos y 3 a 5 µL de ADN plasmidial, en tubos de 15 mL para cada transformación, agregando a la mezcla 1,5 mL de PEG-P y dejando incubar por 2 minutos. Luego, se debieron agregar 5 mL de amortiguador SMMP y mezclar girando los tubos suavemente, para luego centrifugar a 1300 x g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 500 µL de amortiguador SMMP y se incubó durante 90 minutos a 37°C con agitación suave de no más de 100 rpm. Paralelamente, se prepararon 2,5 mL de agar de cobertura CR5 por cada transformación y pasados los 90 minutos se agregaron las células al agar CR5; tras mezclar se vertieron sobre placas LB-agar que contenían antibiótico, en este caso tetraciclina, para dejar incubando durante toda la noche a 37°C. Las colonias crecieron dentro y bajo el agar CR5 y debieron ser pinchadas a través de este para su análisis.

#### Inducción de expresión a través de xilosa:

Las bacterias se cultivaron en medio LB suplementado con 10 mg/L de tetraciclina a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> entre 0,3 y 0,4. Se agregó xilosa al medio hasta una concentración final de 10 ng/mL (0,5% p/v) y se incubó con agitación fuerte durante 2 horas a 37°C hasta lograr una OD<sub>600</sub> de entre 4 y 8.

#### Lisis celular:

Una vez inducida la expresión proteica y alcanzada la OD indicada, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 30 µL de amortiguador de lisis con lisozima. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación y luego se sometieron a agitación por vórtex cada 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C y 13000 rpm para separar la fracción insoluble del sobrenadante (proteínas secretadas). Luego, se resuspendió la fracción insoluble en 500 µL de PBS y se sometió a ruptura por sonicación mediante 4 pulsos de 20 segundos alternando con 30 segundos en hielo. Luego, las muestras se centrifugaron a 20000 x g durante 10 minutos, separando el segundo sobrenadante (fracción citoplasmática) del resto de precipitado celular.

### **4.10 Procedimientos de detección de proteínas**

#### Cuantificación de proteínas:

Las proteínas presentes en los lisados celulares se cuantificaron usando 5 µL de muestra con 200 µL de reactivo de Bradford en una placa de 96 pocillos. Se incubaron durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se preparó con BSA, con diluciones seriadas desde 10 mg/mL hasta 78 µg/mL.

### Electroforesis de proteínas:

Las muestras obtenidas luego de la lisis celular se mezclaron con el amortiguador de carga de proteínas 5x y se incubaron 5 minutos a 95°C. Se centrifugaron a 3000 x g durante 30 segundos y luego se cargaron en geles de acrilamida. El gel resolutivo fue elaborado al 12% p/v de acrilamida y el gel concentrador al 8% p/v de acrilamida. La electroforesis se efectuó con una corriente constante de 100 mA durante 90 minutos.

### Transferencia de proteínas:

La transferencia de proteínas para el Western blot se realizó bajo condiciones de transferencia húmeda durante 120 minutos a 300 mA constantes, refrigerando el sistema de transferencia a 15 °C. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa.

### Western blot:

La membrana de nitrocelulosa se incubó en PBS-BSA 2% por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego, se incubó la membrana con 10 mL de PBS-BSA 2% con 5 µL del primer anticuerpo, en este caso anti-HisTag (dilución 1/2000) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados durante 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0,1%, y luego se incubó la membrana con 10 mL de PBS-BSA 2% con 5 µL del segundo anticuerpo (dilución 1/2000) Goat anti-rabbit conjugado a HRP, por una hora a temperatura ambiente con agitación. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 0,1%, y se reveló por quimioluminiscencia sobre una película fotográfica.

## 5. Resultados

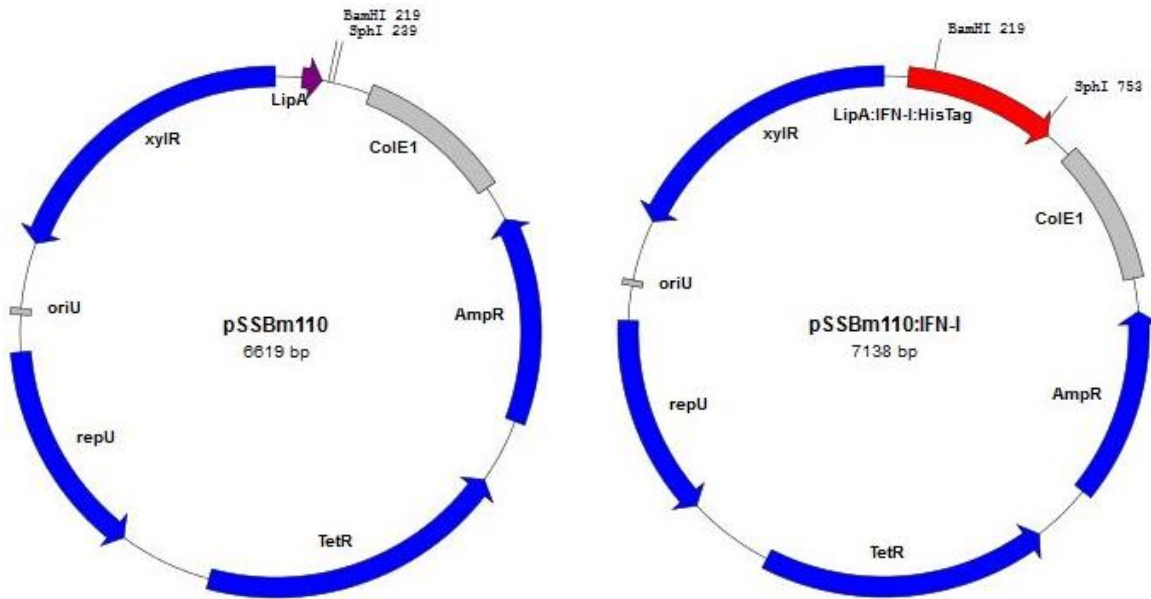
### 5.1 Construcción del vector

El primer objetivo consistió en clonar el gen IFN-I en el vector pSSBm110 de expresión en *Bacillus megaterium*. El vector pSSBm110 corresponde a un vector específico de *B. megaterium*. Para lograr el clonamiento se amplificó el gen de IFN-I a través de PCR a partir de un plasmidio que lo contenía, ya presente en el laboratorio donde se desarrolló esta memoria. Este plasmidio se denomina pNZ8148:IFN $\Delta$ P1 y fue construido para la expresión de IFN-I en modelo bacteriano Gram-positivo de tipo ácido láctico y optimizado codogénicamente para *Lactococcus lactis*. La construcción pNZ8148:IFN $\Delta$ P1 fue purificada desde un clon de *Escherichia coli* usado para mantención. Usando pNZ8148:IFN $\Delta$ P1 como ADN de templado, se amplificó IFN-I utilizando los partidores IFNMegaFV y IFNMegaRV (**Tabla I**). Estos partidores se diseñaron para incluir sitios de restricción para *Bam*HI y *Sph*I en los flancos del amplicón de IFN-I. Paralelamente, se purificó el vector pSSBm110 desde una cepa de *E. coli* previamente transformada (**Figura 1**).

**Tabla I. Lista de partidores.**

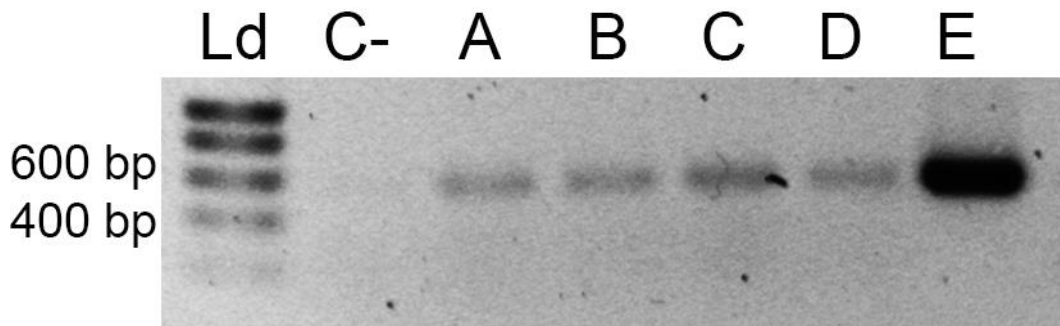
Partidores	Secuencia (5' → 3')
IFNMegaFW	GTC AGG TGT <b>TGG ATC</b> CTT ATG TAT ACA GTT CAA TCT TG
IFNMegaRV	TTA AGA CTT <b>TGC ATG</b> CCC ATA CAT TTG TGC AGC AAG AA
Bm110FW	TCC TTT GTT TAT CCA CCG AAC
Bm110RV	ACC GGT TAG TGA TGG TGA TG

Se listan los partidores utilizados en esta memoria. Los dos primeros corresponden a los utilizados para clonar. Los dos segundos son partidores más externos utilizados para secuenciación. En negrita y cursiva se marcan las secuencias correspondientes a sitios de restricción para *Bam*HI (**GGATCC**) y *Sph*I (**GCATGC**), respectivamente.



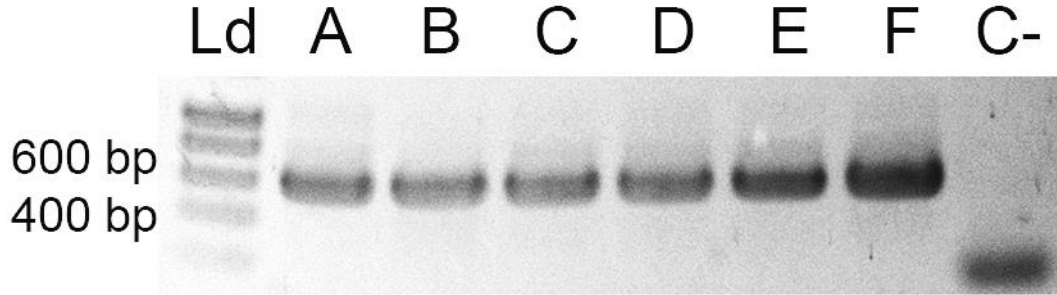
**Figura 1. Plasmidio recombinante pSSBm110:IFN-I.** Mapas del vector pSSBm110 para *B. megaterium* y de la construcción pSSBm110:IFN-I correspondiente al vector pSSBm110 más el inserto que codifica para IFN-I. En los mapas se señalan los sitios de restricción de *Bam*HI y *Sph*I utilizados para clonar el inserto. La resistencia a ampicilina se utilizó como marcador de selección en *E. coli*, mientras que la resistencia a tetraciclina como marcador de selección en *B. megaterium*.

El primer intento de amplificación resultó fallido, por lo cual, usando el mismo ADN de templado se realizó un PCR en gradiente para distintas temperaturas, obteniéndose un óptimo de amplificación cuando el apareamiento de los partidores se hizo a los 59,7°C. Con esta temperatura configurada en un programa térmico, se logró un amplicón de 540 pares de bases (**Figura 2**).



**Figura 2. Temperatura óptima de amplificación de IFN-I.** Evaluación de temperaturas de apareamiento para los partidores IFNMegaFW e IFNMegaRV para la amplificación de IFN-I. Los carriles corresponden a: **Ld)** Marcador de peso molecular de 1 kb. **C-)** Control negativo. **A)** 51,1°C **B)** 53,4°C **C)** 55,4°C **D)** 57,4°C **E)** 59,7°C. Se observa que el amplicón **E** a 59,7°C representa la temperatura óptima de amplificación de IFN-I.

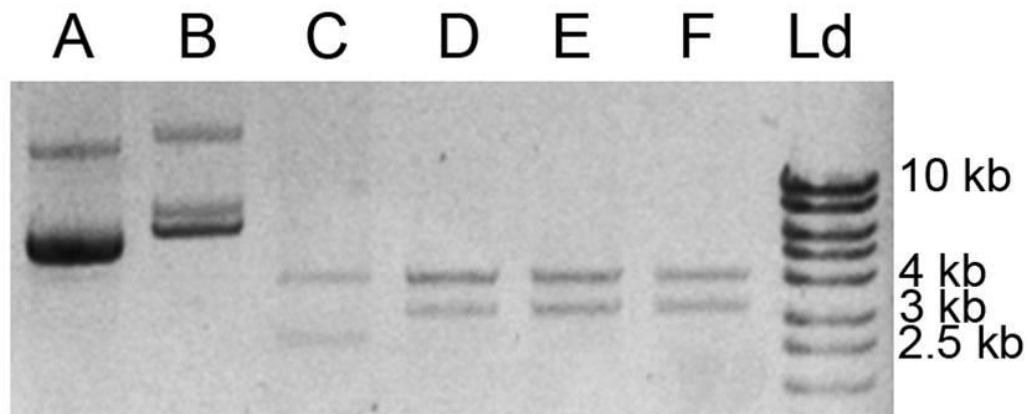
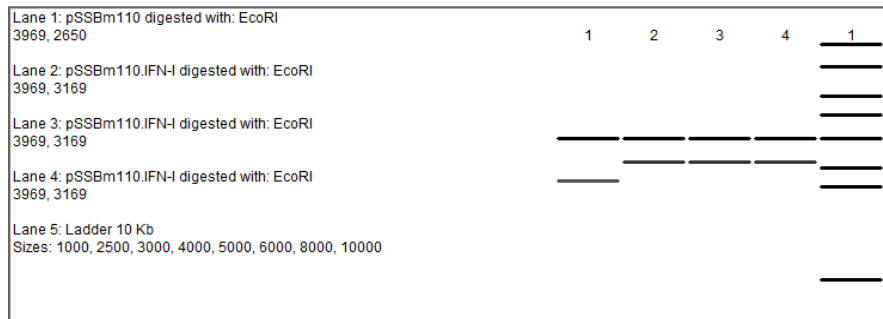
El amplicón se purificó y se trató con las enzimas de restricción señaladas. Paralelamente, se digirió pSSBm110 con las mismas enzimas. Tras ligar y dializar las muestras, se transformó en *E. coli* y luego se comprobó la presencia del inserto mediante PCR de colonias. La presencia del inserto se verificó utilizando los mismos partidores utilizados para amplificar IFN-I (**Tabla I**). Los resultados de PCR muestran que se logró la construcción de pSSBm110:IFN-I en varios clones de *E. coli* (**Figura 3**). Algunos clones positivos de *E. coli* se cultivaron con selección de ampicilina. Se aisló y purificó la construcción contenida en estos.



**Figura 3. Clones de *E. coli* transformados positivos para IFN-I.**

Amplificaciones de 540 pares de bases del inserto IFN-I en distintos clones transformados de *E. coli*. Los carriles mostrados corresponden a los siguientes: **Ld)** Marcador de peso molecular de 1 kb. **A), B), C), D) y E)** Clones 1, 2, 3, 4 y 5 de transformantes de *E. coli* que indican presencia de la construcción pSSBm110:IFN-I. **F)** Clon de *E. coli* que contiene pNZ8148:IFN $\Delta$ P1 usado como control positivo. **C-)** Control negativo.

Con el fin de verificar una correcta inserción de IFN-I en el vector, se realizó una digestión con *EcoRI*. Tanto el vector vacío como la construcción poseen dos sitios de restricción para *EcoRI*. Utilizando una herramienta informática ("Multiple Digestion" del software libre "A plasmid Editor v.2.0.51" desarrollado por M. Wayne Davis) se esperaba observar la aparición dos bandas por plasmidio digerido. La banda de menor tamaño corresponde a una banda de 2650 pb para el vector vacío y de 3169 pb para el vector con inserto. Los tres clones analizados por este método dieron positivos para la inserción (**Figura 4**).



**Figura 4. Comprobación de la inserción mediante digestión con *EcoRI*.**

**Panel superior.** Digestión teórica con *EcoRI* utilizando la herramienta informática "Multiple Digestion" del software libre "ApE" ("A plasmid Editor v.2.0.51" desarrollado por M. Wayne Davis).

**Panel inferior.** Digestión con *EcoRI* de plasmidios purificados de clones 1, 2 y 3 de *E. coli* que poseen la construcción pSSBm110:IFN-I. Los carriles mostrados en el gel corresponden a lo siguiente: **A)** Vector vacío pSSBm110 sin digerir. **B)** Plasmidio aislado desde clon 1 correspondiente a pSSBm110:IFN-I sin digerir. **C)** Digestión del vector pSSBm110 vacío. **D), E) y F)** Digestión de clones 1, 2 y 3 de transformantes de *E. coli* que poseen la construcción. **Ld)** Marcador de peso molecular de 10 kb.



## 5.2 Transformación de *B. megaterium*

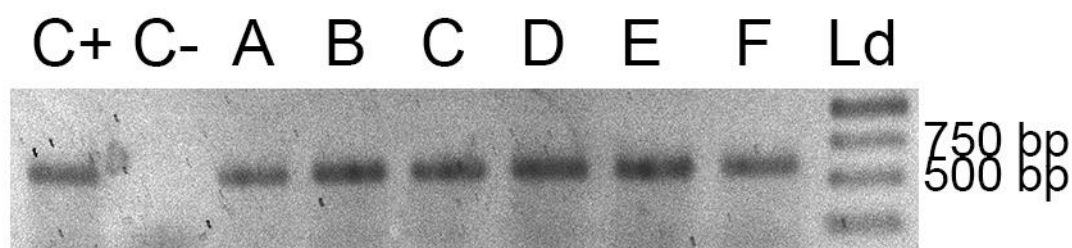
Se probaron dos métodos de transformación para *B. megaterium*. Dado que ya se manejaba adecuadamente la técnica de electroporación, estandarizada y aplicada con regularidad para transformación de *E. coli* y *L. lactis*, se buscó un protocolo de electroporación para *B. megaterium*. Para este protocolo, modificado de Moro, Sánchez y Serguera (1995), se utilizó un amortiguador de PEG6000 25% y sacarosa 0,05 M, y con pulsos de 3,0 kV y 3,5 kV. Sin embargo, no se obtuvieron colonias transformantes ni con el vector vacío pSSBm110, ni con el control positivo de transformación pSSBm85 de expresión de GFP, seleccionadas en placas de LB con tetraciclina 10 µL/mL y en placas de LB con ampicilina 50 µL/mL. Se probó modificación del amortiguador a PEG6000 25% y sacarosa 0,1 M, sin resultados. También se ensayó en presencia de PEG6000 25% y sacarosa 0,05 M y 0,1 M, con obtención previa de protoplastos (Barg y cols., 2005), sin obtenerse colonias (**Tabla II**).

**Tabla II. Condiciones de electroporación.**

Condición	Voltaje del pulso	Colonias obtenidas
Sacarosa 0,05 M	3,0 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,05 M	3,5 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,1 M	3,0 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,1 M	3,5 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,05 y protoplastos	3,0 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,05 y protoplastos	3,5 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,1 y protoplastos	3,0 kV	Sin recuento
Sacarosa 0,1 y protoplastos	3,5 kV	Sin recuento

Se presentan las condiciones de electroporación siguiendo protocolo modificado de Moro, Sánchez y Serguera (1995), utilizando tanto *B. megaterium* como protoplastos libres de pared.

Se buscó un nuevo protocolo y se estandarizó con modificaciones menores el protocolo de transformación de *B. megaterium* por absorción de ADN exógeno sugerido en el Manual de MoBiTec “*Bacillus megaterium* Protein Production System” (MoBiTec, 2012). Una vez estandarizado, se lograron colonias transformantes, tanto del control pSSBm85 que expresa GFP como de pSSBm110:IFN-I. Adicionalmente se obtuvieron transformantes para el vector vacío pSSBm110 y para pSSBm101, el cual es un control positivo de expresión de proteínas. Se realizó inducción de los transformantes de pSSBm85 para comprobar expresión de GFP, en placas LB-agar con tetraciclina 10  $\mu$ L/mL y xilosa 0,5%. Las colonias expresaron GFP tornándose verdes y brillando al UV. Se realizó PCR de colonias a las colonias transformantes para pSSBm110 y para pSSBm110:IFN-I, obteniéndose clones positivos para el inserto (**Figura 5**).



**Figura 5. Comprobación de inserto en *B. megaterium* transformantes.**

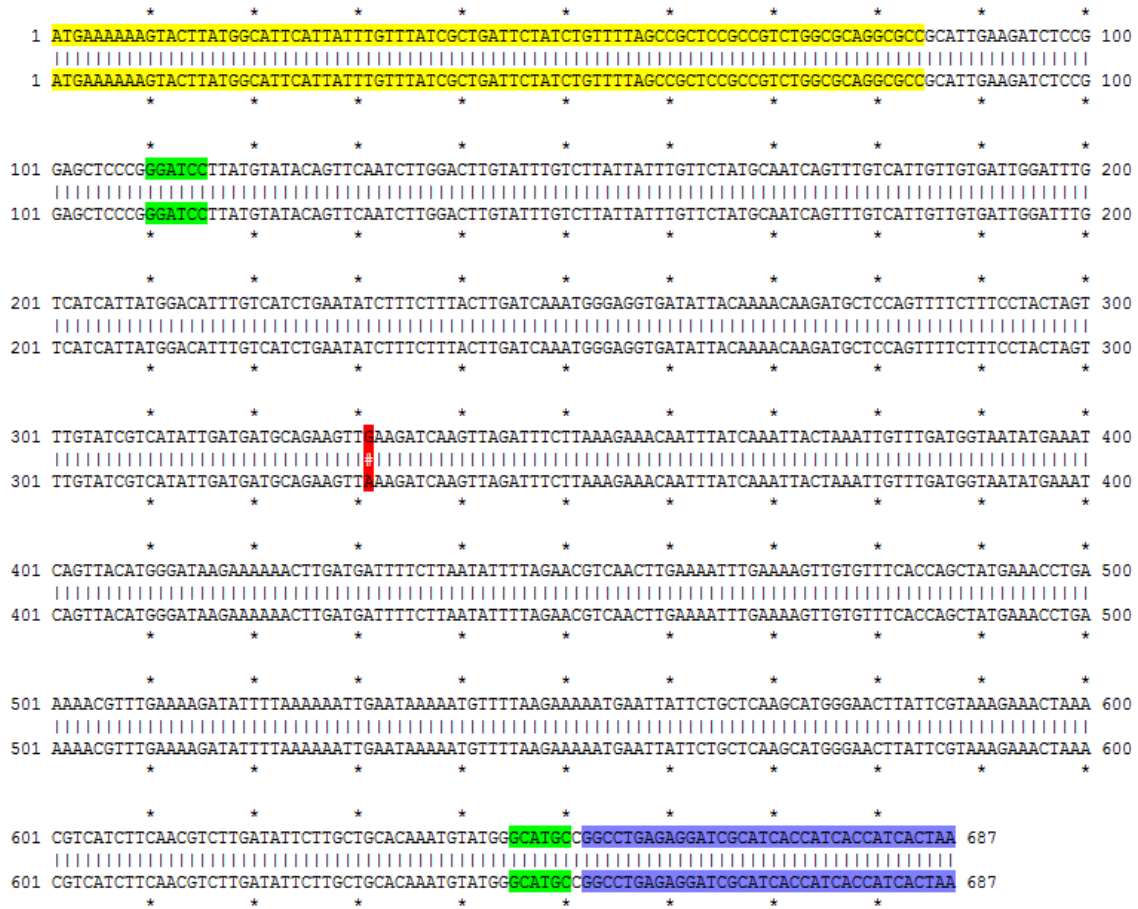
Amplificaciones de 540 pares de bases del inserto IFN-I en distintos clones transformados de *B. megaterium*. Los carriles mostrados corresponden a: **C+**) Control positivo correspondiente a plasmidio aislado de clon 2 de *E. coli*. **C-**) Control negativo. **A), B), C), D), E) y F)** Clones 1, 2, 3, 4 y 5 de transformantes de *B. megaterium* transformados con pSSBm110:IFN-I proveniente de clon 2 de *E. coli*. **Ld)** Marcador de peso molecular de 1 kb (HyperLadder™).

### 5.3 Secuenciación de la construcción

Los clones positivos para el PCR se crecieron y se aisló de cada uno el plasmidio correspondiente a la construcción. Estos se enviaron a secuenciar con los partidores usados para clonar y posteriormente partidores más externos (**Tabla I**), a la empresa Macrogen, Inc., en la República de Corea. Se confirmó la clonación exitosa del inserto de IFN-I en el vector pSSBm110 de tres clones transformados, los cuales, una vez analizados y comparados con la secuencia modelo, presentaron una mutación de sustitución G>A en la posición nucleotídica 331 con respecto a la secuencia modelo de IFN-I (**Figura 6.1**), la cual genera una mutación no sinónima a nivel codogénico de E>K en la posición aminoacídica 111, manteniendo el marco de lectura (**Figura 6.2**).

Para descartar la presencia de mutaciones en la región promotora durante la clonación, se alinearon y compararon las secuencias tanto de la caja -10 o caja Pribnow, como de la secuencia de unión a ribosoma Shine-Delgarno, correspondientes al promotor del péptido SPLipA (**Figura 7**). Para estas secuencias analizadas no se encontraron mutaciones.

Mismatches (#):1  
 Gaps ( ):0  
 Unattempted(.):0



**Figura 6.1 Detección de mutación puntual de tipo sustitución.** Visualización usando software libre “ApE” de secuencia modelo (secuencia superior) y secuencia clonada en el vector pSSBm110:IFN-I (secuencia inferior), donde se destaca la secuencia correspondiente al péptido señal SPLipA (**en amarillo**); la secuencia de “cola de histidina” o His-Tag (**en azul**); las secuencias de enzimas de restricción *Bam*HI y *Sph*I (**en verde**), respectivamente; y un *mismatch* mononucleotídico o mutación puntual de tipo sustitución, correspondiente a 331G>A (**en rojo**).

```

101 Leu Tyr Arg His Ile Asp Asp Ala Glu Val Glu Asp Gln Val Arg Phe Leu Lys Glu Thr
301 TTG TAT CGT CAT ATT GAT GAT GCA GAA GTT GAA GAT CAA GTT AGA TTT CTT AAA GAA ACA

121 Ile Tyr Gln Ile Thr Lys Leu Phe Asp Gly Asn Met Lys Ser Val Thr Trp Asp Lys Lys
361 ATT TAT CAA ATT ACT AAA TTG TTT GAT GGT AAT ATG AAA TCA GTT ACA TGG GAT AAG AAA

141 Lys Leu Asp Asp Phe Leu Asn Ile Leu Glu Arg Gln Leu Glu Asn Leu Lys Ser Cys Val
421 AAA CTT GAT GAT TTT CTT AAT ATT TTA GAA CGT CAA CTT GAA AAT TTG AAA AGT TGT GTT

161 Ser Pro Ala Met Lys Pro Glu Lys Arg Leu Lys Arg Tyr Phe Lys Lys Leu Asn Lys Asn
481 TCA CCA GCT ATG AAA CCT GAA AAA CGT TTG AAA AGA TAT TTT AAA AAA TTG AAT AAA AAT

181 Val Leu Arg Lys Met Asn Tyr Ser Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ile Arg Lys Glu Thr Lys
541 GTT TTA AGA AAA ATG AAT TAT TCT GCT CAA GCA TGG GAA CTT ATT CGT AAA GAA ACT AAA

201 Arg His Leu Gln Arg Leu Asp Ile Leu Ala Ala Gln Met Tyr Gly His Ala Gly Leu Arg
601 CGT CAT CTT CAA CGT CTT GAT ATT CTT GCT GCA CAA ATG TAT GGG CAT GCC GGC CTG AGA

221 Gly Ser His His His His His His End
661 GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA

101 Leu Tyr Arg His Ile Asp Asp Ala Glu Val Lys Asp Gln Val Arg Phe Leu Lys Glu Thr
301 TTG TAT CGT CAT ATT GAT GAT GCA GAA GTT GAA GAT CAA GTT AGA TTT CTT AAA GAA ACA

121 Ile Tyr Gln Ile Thr Lys Leu Phe Asp Gly Asn Met Lys Ser Val Thr Trp Asp Lys Lys
361 ATT TAT CAA ATT ACT AAA TTG TTT GAT GGT AAT ATG AAA TCA GTT ACA TGG GAT AAG AAA

141 Lys Leu Asp Asp Phe Leu Asn Ile Leu Glu Arg Gln Leu Glu Asn Leu Lys Ser Cys Val
421 AAA CTT GAT GAT TTT CTT AAT ATT TTA GAA CGT CAA CTT GAA AAT TTG AAA AGT TGT GTT

161 Ser Pro Ala Met Lys Pro Glu Lys Arg Leu Lys Arg Tyr Phe Lys Lys Leu Asn Lys Asn
481 TCA CCA GCT ATG AAA CCT GAA AAA CGT TTG AAA AGA TAT TTT AAA AAA TTG AAT AAA AAT

181 Val Leu Arg Lys Met Asn Tyr Ser Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ile Arg Lys Glu Thr Lys
541 GTT TTA AGA AAA ATG AAT TAT TCT GCT CAA GCA TGG GAA CTT ATT CGT AAA GAA ACT AAA

201 Arg His Leu Gln Arg Leu Asp Ile Leu Ala Ala Gln Met Tyr Gly His Ala Gly Leu Arg
601 CGT CAT CTT CAA CGT CTT GAT ATT CTT GCT GCA CAA ATG TAT GGG CAT GCC GGC CTG AGA

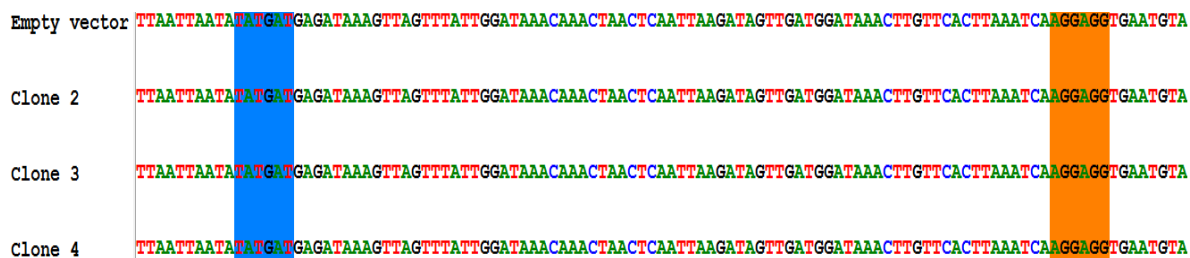
221 Gly Ser His His His His His His End
661 GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA

```

**Figura 6.2 Comparación entre secuencia modelo traducida y secuencia clonada en vector pSSBm110:IFN-I.**

**Panel superior.** Visualización usando software libre “ApE” de secuencia modelo traducida. Se destaca el codón de posición 331 correspondiente a aminoácido 111 ácido glutámico (**en rojo**). Se indican también la marca HisTag (**en azul**) y secuencia correspondiente a *SphI* (**en verde**).

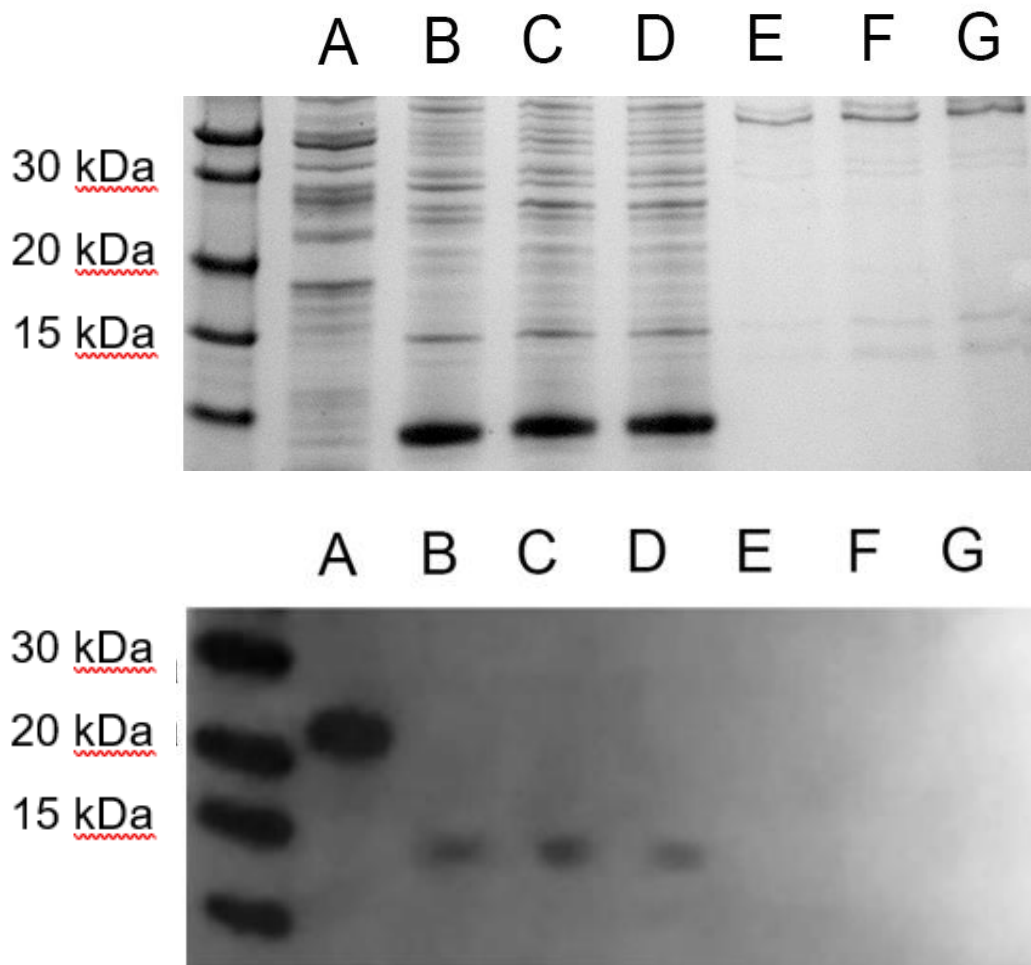
**Panel inferior.** Visualización de secuencia clonada traducida, donde se destaca codón ubicado en posición 331 correspondiente a aminoácido 111 lisina. Se observa luego una mutación no sinónima en 111E>K, con conservación del marco de lectura con respecto a la marca HisTag y codón de término (**en azul**).



**Figura 7. Alineamiento de secuencias promotoras de SPLipA.** Visualización usando el software libre “BioLign” (“BioLign alignment and multiple contig editor v.4.0.6.2” desarrollado por Tom Hall), donde se comparan las secuencias de la región promotora de SPLipA entre el vector pSSBm110 vacío y tres clones secuenciados, positivos para el inserto IFN-I río abajo. Se muestra la secuencia consenso TATGAT correspondiente a la caja Pribnow de *B. megaterium* (**en azul**). Se muestra la secuencia de Shine-Delgarno de unión a ribosoma AGGAGG (**en naranja**).

#### 5.4 Expresión de IFN-I

Para medir la expresión de IFN-I se cultivaron los clones confirmados por secuenciación en matraces de 500 mL y se indujeron con xilosa 0,5% según como se describe en la sección Materiales y Metodología (**Sección 4.6**). Se centrifugó y se separó el sobrenadante, luego se lisaron los cultivos por sonicación y se realizó la centrifugación para recuperar la fracción citoplasmática, de las cuales se realizaron análisis por separado. Se resolvieron mediante SDS-Page en geles de poliacrilamida, los que fueron posteriormente analizados con tinción con azul de Coomassie y con Western blot utilizando un anticuerpo anti-HisTag. No se logró detectar la presencia de la proteína de 26,1 kDa ni con dot blot ni con Western blot, aun cuando la marca de histidina sí fue reconocida por el anticuerpo en los controles positivos (**Figura 8, panel inferior**). Sin embargo, no se debe descartar su expresión, puesto que en el gel teñido con Coomassie se pueden detectar cambios de expresión y bandas tenues que pueden corresponden a IFN-I (**Figura 8, panel superior**).



**Figura 8. Detección de IFN-I en lisados de *B. megaterium*.**

**Panel superior.** Tinción con azul de Coomassie de gel de poliacrilamida con fracciones provenientes de lisis celular de clones de *B. megaterium* transformados con pSSBm110:IFN-I.

**Panel inferior.** Película radiográfica de Western blot revelado por quimioluminiscencia correspondiente a fracciones provenientes de lisis celular de clones de *B. megaterium* transformados con pSSBm110:IFN-I, utilizando anticuerpo anti-HisTag.

**A)** Control de 28,2 kDa expresado desde plasmidio pSSBm101 con marca de histidina. **B)** Fracción citoplasmática de *B. megaterium* transformado con vector vacío pSSBm110. **C) y D)** Fracción citoplasmática de clones 3 y 4 de *B. megaterium* transformados con pSSBm110:IFN-I. **E)** Sobrenadante extracelular de *B. megaterium* transformado con vector vacío pSSBm110. **F) y G)** Sobrenadante extracelular de clones 3 y 4 de *B. megaterium* transformados con pSSBm110:IFN-I.

## 6. Discusión

### 6.1 Protocolo de electroporación de *B. megaterium*

Para la transformación de *Bacillus megaterium* se probó un protocolo de electroporación desarrollado por Moro, Sánchez y Serguera (1995), quienes a su vez, se basaron en un protocolo de electroporación para *Bacillus cereus* (Belliveau y Trevors, 1989). No obstante, con su protocolo lograron obtener un máximo de  $5,8 \times 10^3$  ufc/ $\mu$ g de ADN usando pulsos de hasta 1,5 kV.

Para la transformación de Moro, y cols. se utilizaron células intactas de *B. megaterium*, mientras que para esta memoria se usaron tanto células intactas como protoplastos previamente tratados para perder su pared. Dado que Moro, y cols. lograron obtener células transformantes y para esta memoria esto no se logró (**Tabla II**), y considerando que el protocolo de electroporación de *B. cereus* de Belliveau y Trevors tampoco implicó remoción de pared (Belliveau y Trevors, 1989), se descarta la estructura celular externa de *B. megaterium* como impedimento para lograr una electroporación exitosa. Se podría razonar, además, que los protoplastos libres de pared de *B. megaterium* son más vulnerables ante el estrés del pulso eléctrico de la electroporación y que, a pesar de ser transformados, su sobrevivencia sería casi nula.

Por otro lado, el protocolo usado por Moro, y cols. implicó transformar con el vector pWH1510, de 11,4 kb. El vector con la construcción usado para esta memoria posee 7,1 kb (**Figura 1**). Ambos vectores poseen genes que confieren resistencia a tetraciclina y a ampicilina. Dado que la transformación de Moro, y cols. fue posible usando un vector con estas características, se descarta que haya sido el vector o su tamaño lo que no permitió la obtención de colonias.

Descartadas estas otras variables, la no obtención de células transformadas podría deberse enteramente al voltaje utilizado en el pulso de electroporación aplicado. Para el caso de Moro, y cols. se usaron pulsos de



entre 0,6 kV y 1,5 kV, obteniéndose sobrevividas de entre 92% y 58%, respectivamente (Moro, Sánchez y Serguera, 1995). La sobrevivida de las bacterias fue inversamente proporcional al voltaje aplicado, mientras que la eficiencia en la transformación directamente proporcional. Para el caso de esta memoria, se usaron voltajes de entre 3 kV y 3,5 kV, buscando incrementar la eficiencia de la transformación. Es posible que estos voltajes hayan sido demasiado altos, lo cual podría explicar por qué no se obtuvo bacterias transformantes.

Si bien podría seguir optimizándose el proceso hasta lograr tasas de electroporación exitosas usando este método, dado que se logró montar adecuadamente un protocolo de transformación por absorción de ADN exógeno a través de transformación de protoplastos (MoBiTec, 2012), una puesta a punto del protocolo de Moro, y cols. no se hace estrictamente necesaria. Por su parte, el protocolo de transformación de protoplastos de MoBiTec solo posee la desventaja que los medios de cultivo y agares necesarios, así como las sales específicas que utiliza (**Sección 4.2, 4.5 y 4.9**), son más difíciles de conseguir y de preparar que aquellas usadas en protocolos de transformación por electroporación. Así también, el tiempo de preparación y pasos necesarios para este protocolo son más largos que aquellos de la electroporación. No obstante, la alta eficiencia y sobrevivida que se logra con este protocolo justifican su uso.

## **6.2 Mutaciones en la construcción de pSSBm110:IFN-I**

De los clones transformados y confirmados por PCR, se obtuvo la secuenciación de pSSBm110:IFN-I y se verificó que el inserto estaba presente, aunque con una mutación puntual no sinónima con respecto a la secuencia modelo (**Figura 6.1 y 6.2**). Dado que no se observó corrimiento en el marco de lectura en el análisis de las secuencias de ninguno de los clones secuenciados, una falla en la expresión debería buscarse río arriba del marco de lectura clonado.

Una posibilidad es que hubiese ocurrido una mutación a nivel del promotor de SPLipA, razón por la cual se analizaron las secuencias río arriba de este, en particular la caja Pribnow y la secuencia de unión a ribosoma Shine-Delgarno (**Figura 8**). La caja -35, sin embargo, aparecía en una zona con demasiado ruido como para considerarse en estos análisis y la zona de unión al represor XylR no fue secuenciada. Dado que las secuencias observadas en la secuenciación y las secuencias modelo poseen un 100% de identidad, no es posible afirmar que fuera de la región promotora inmediata la que se vio alterada o que presentase una mutación que evitara la expresión del péptido SPLipA-IFN-I-HisTag, salvo por la caja -35 no analizada aquí. Si bien es probable que ninguna alteración relacionada con la genética o la clonación hayan afectado la expresión de IFN-I recombinante, es posible suponer que mutaciones en regiones no analizadas sí puedan influir en estos resultados, tales como mutaciones en otros sitios del vector, u otras que afectasen la interacción de XylR con el promotor.

### **6.3 Expresión y detección de IFN-I**

Como se muestra en la **Figura 8, panel inferior**, no se logró detectar la presencia de IFN-I recombinante SPLipA-IFN-I-HisTag expresado en *B. megaterium* DSM319 pSSBm110:IFN-I. Esta proteína, compuesta por 228 aminoácidos, posee un peso molecular esperado de 26,1 kDa; mientras, el control utilizado para estas pruebas, una enzima hidrolasa de la bacteria *Thermobifida fusca* (Yang y cols., 2007), posee un peso molecular esperado de 28,2 kDa. Esta última proteína se escogió justamente debido a la cercanía de su peso molecular con el del péptido expresado en la construcción, por lo cual la ausencia de una banda reactiva al anticuerpo anti-HisTag a una altura similar, sugiere que tal vez no hubo expresión suficiente.

Dado que SPLipA es un péptido señal de una lipasa de *B. megaterium* de secreción extracelular (Ruiz y cols., 2002), era además esperable encontrar una marca reactiva contra anti-HisTag en los sobrenadantes extracelulares probados (carriles **F y G, Figura 8, panel inferior**). Para evaluar el caso de

que fallase la exportación de IFN-I recombinante, también se evaluaron las fracciones citoplasmáticas (carriles **C y D**). Para el caso de estas fracciones, sí se encontró un epítipo reactivo para anti-HisTag. Sin embargo, el epítipo al que se unió anti-HisTag aparece también en la fracción citoplasmática de *B. megaterium* transformado con el vector pSSBm110 vacío (carril **B**).

Lo anterior podría deberse a la expresión del péptido de 5,8 kDa SPLipA-HisTag, esperable para el vector vacío. No obstante, los clones de *B. megaterium* usados para cargar los carriles en la **Figura 8** fueron verificados como clones transformados con la construcción pSSBm110:IFN-I, tanto por método de PCR como por secuenciación (**Figura 5 y Figura 6**), y las bandas reveladas en los carriles **B, C y D (Figura 8, panel inferior)** aparecen cerca de los 15 kDa y no a 5,8 kDa como cabría esperarse en el caso de que se tratase de una expresión proveniente del vector vacío.

Por lo anterior, es discutible el hecho de que anti-HisTag pudiera haberse unido inespecíficamente, o probablemente, a algún otro péptido con una secuencia de poli-Histidina expresado constitutivamente por *B. megaterium* en su fracción citoplasmática. Para el caso del control, donde se expresó en gran cantidad la hidrolasa de *T. fusca* (carril **A**), es posible que, debido a la alta expresión inducida de esta proteína, otras proteínas y péptidos constitutivos no esenciales no se expresasen, razón por la que no se observaría la misma banda a la altura de 15 kDa que se observa en los carriles **B, C y D**. Así también, es posible que la mutación detectada de 111E>K (**Figura 6.2**) pueda haber tenido alguna influencia en la unión a anticuerpo, sobre todo considerando que el ácido glutámico es un residuo cargado positivamente y la lisina lo es negativamente.

Por otro lado, una de las razones por las cuales IFN-I recombinante pudo no haberse expresado, aun teniendo el vector de expresión bien construido y las condiciones necesarias para expresarse, pudo ser a causa de una mala manipulación del inductor. La xilosa es un azúcar de tipo aldopentosa que funciona bien en sistemas de expresión basados en *B. megaterium*, un sistema que ha sido demostrado efectivo en innumerables pruebas por distintos grupos

de investigación (Rygus, Scheler y cols., 1991; Malten y cols., 2006; Biedendieck, Gamer y cols., 2007; Biedendieck, Yang y cols., 2007). Se ha probado a distintas concentraciones, tales como 2% (Rygus, Scheler y cols., 1991); o 0,5% (Malten y cols., 2006; Biedendieck, Yang y cols., 2007). Sin embargo, la xilosa 0,5% sí logró expresión de hidrolasa de *T. fusca* en *B. megaterium* transformado con vector pSSBm101. Así también, se logró inducción exitosa de colonias fluorescentes de *B. megaterium* transformado con vector pSSBm85 de expresión de GFP (**Sección 5.2**).

Fuera de razones moleculares como alteraciones en la región promotora o corrimiento en el marco de lectura, mayormente descartadas; o de una mutación improbable en la proteína represora XylR, no queda claro cuáles pueden haber sido las razones para que estos clones de *B. megaterium*, transformados con pSSBm110:IFN-I y confirmados positivos para la construcción, no hayan sido capaces de expresar niveles detectables de IFN-I recombinante. Por otra parte, el Manual de MoBiTec "*Bacillus megaterium* Protein Production System" de 2012 indica que "la producción de proteínas puede variar entre clones debido a razones desconocidas" (MoBiTec, 2012).

Sin embargo cabe defender que, en el gel teñido con azul de Coomassie (**Figura 8, panel superior**), existen diferencias en la expresión proteica entre los controles transformados con el vector vacío (carriles **B y E**) y los clones transformados con la construcción (carriles **C, D, F y G**). Una franja apreciable en el sobrenadante extracelular en **F y G**, pero no en **E**, y a una altura cercana adonde se esperaría encontrar IFN-I, podría ser indicio de que la expresión sí se logró aunque no su detección por anticuerpo. Nuevos experimentos se hacen necesarios para determinar si la expresión es o no exitosa en este modelo.

## 7. Proyecciones

Dado que las construcciones se lograron y verificaron por más de un método, y que se logró montar y estandarizar un protocolo de transformación para *B. megaterium*, no existe razón para no intentar nuevamente la expresión y la detección de IFN-I recombinante. Está descrito en la literatura consultada que es posible lograr una expresión proteica de varios órdenes de magnitud con respecto a la expresión basal de una proteína recombinante en *B. megaterium*, y dado que usa un medio de cultivo simple y barato, el medio LB, proseguir con esta línea de investigación resultaría provechoso.

A nivel experimental, faltaría luego probar otros métodos de detección, por ejemplo, a través de suero con anticuerpos policlonales para IFN-I. En el caso de que aun así no se lograra detectar la presencia de la proteína, habría que encontrar la causa en el fallo de la expresión inducida o de la detección, o transformar nuevamente *B. megaterium* hasta lograr clones con capacidad de expresión detectable de la proteína. Una vez obtenido, restaría comprobar que IFN-I recombinante posee actividad biológica. En otros experimentos realizados por el equipo de investigación del laboratorio donde se desarrolló esta memoria, se verificó cierto grado de efectividad en experimentos *in vivo* de un IFN-I recombinante expresado por *L. lactis*. Otros experimentos sugeridos son pruebas en cultivos celulares de la línea CHSE-214 (Chinook salmon embryo 214) midiendo marcadores moleculares de respuesta antiviral ante IFN-I recombinante proveniente de *B. megaterium*, y pruebas alimentando peces salmónidos con una cepa de *B. megaterium* DSM319 pSSBm110:IFN-I de alta tasa de expresión de IFN-I frente a un desafío con IPNV.

Si se logran estandarizar los métodos anteriores, *B. megaterium* podría convertirse en una estrategia adicional a otras herramientas probióticas y vacunas orales vivas actualmente en desarrollo o desarrolladas para mejorar la salud de cultivos acuícolas y piscícolas, principalmente considerando las dificultades que enfrenta la industria a causa de los cambios ambientales

causados por su propio impacto, la sobrepesca, la eutrofización, el cambio climático, la marea roja, los ciclos del Niño y la Niña, y los ciclos epidemiológicos naturales de enfermedades infecciosas que afectan a especies de cultivo.

## 8. Conclusiones

- Se lograron estandarizar las condiciones de crecimiento para *B. megaterium*.
- Se logró montar y estandarizar un método de transformación para *B. megaterium*.
- La electroporación como método de transformación de *B. megaterium* resultó ser una técnica poco efectiva.
- Se logró clonar la secuencia correspondiente a IFN-I de *Salmo salar* en el vector pSSBm110 para *B. megaterium*.
- Se comprobó que ninguna mutación causó corrimiento en el marco de lectura para SPLipA-IFN-I-HisTag en las secuencias analizadas de pSSBm110:IFN-I.
- No se logró la detección de la proteína usando un método de detección por marcación de HisTag en las células inducidas.
- No se logró determinar una causa para la no detección de la proteína.

## 9. Bibliografía y referencias

- Barg, H, M Malten, M Jahn, y D Jahn. *Protein and vitamin production in Bacillus megaterium* (Edited by Barredo, J.L.) *Microbial processes and products*. Totowa: Humana Press Inc., 2005.
- Belliveau, BH, y JT Trevors. «Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation» *Appl. and Envirom. Microbial.* 55, 1989: 1649 - 1652.
- Bergan, V, S Steinsvik, H Xu, O Kileng, y B Robertsen. «Promoters of Type I Interferon genes from Atlantic salmon contain two main Regulatory Regions.» *FEBS J.* 17, 2006: 3893 - 3906.
- Biedendieck, R, y cols.. «A sucrose-inducible promoter system for the intra-and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*.» *Journal of Biotechnology* 132, 2007: 426 - 430.
- Biedendieck, R, y cols.. «Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B12) production in *Bacillus megaterium*.» *Microb. Biotechnology* 3, 2010: 24 - 37.
- Biedendieck, R, Y Yang, WD Deckwer, M Malten, y D Jahn. «Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*.» *Biotechnol. Bioeng.* 96, 2007: 525 - 537.
- Bradford, MM. «Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.» *Anal. Biochem.* 72, 1976: 248 - 254.
- Bravo, S, M Silva, y G Monti. «Efficacy of emamectin benzoate in the control of *Caligus rogercresseyi* on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006 to 2007.» *Aquaculture* 364-365, 2012: 61 - 66.
- Bunk, B, R Biedendieck, D Jahn, y PS Vary. *Industrial production by Bacillus megaterium and other Bacilli* (Edited by Flickinger, MC). Encyclopedia of Industrial Biotechnology, 2009.
- Bunk, B, y cols.. «A short story about a big magic bug.» *Bioeng. Bugs* 1, 2010: 85 - 91.
- Cavanagh, D, G Fitzgerald, y O McAuliffe. «From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment.» *Food Microbiology*, 2015: 45 - 61.
- Collet, B. «Innate immune responses of salmonid fish to viral infections.» *Developmental and Comparative Immunology* 43, 2014: 160 - 173.
- Cuesta, A, E Chaves-Pozo, A de las Heras, S Rodríguez, S Pérez-Prieto, y C Tafalla. «An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines.» *Vaccine* 28 (Vaccine 28), 2010: 3291 - 3300.
- Damsgard, B, A Mortensen, y A Someer. «Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.» *Aquaculture* 163, 1998: 185 - 193.
- David, F, R Westphal, B Bunk, D Jahn, y E Franco-Lara. «Optimization of antibody fragment production in *Bacillus megaterium*: the role of metal ions on protein secretion.» *Journal of Biotechnology* 150, 2010: 115 - 124.



- David, F, y cols.. «Antibody production in *Bacillus megaterium*: strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors.» *Biotechnol. J.* 6, 2011: 1516 - 1531.
- Dorantes-Aranda, JJ, A Seger, JI Mardones, PD Nichols, y GM Hallegraeff. «Progress in Understanding Algal Bloom-Mediated Fish Kills: The Role of Superoxide Radicals, Phycotoxins and Fatty Acids.» *PLoS One* 10, 2015: e0133549.
- Eckford-Soper, L, y N Daugbjerg. «The ichthyotoxic genus *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae): Distribution, toxicity, enumeration, ecological impact, succession and life history – A review.» *Harmful Algae* 58, 2016: 51–58.
- Ellis, AE. «Innate Host Defense Mechanisms of Fish Against Viruses and Bacteria.» *Dev. Comp. Immunology* 25, 2001: 827 - 839.
- Guy, D, S Bishop, J Woolliams, y S Brotherstone. «Genetic parameters for resistance to infectious pancreatic necrosis in pedigreed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in cohabitation challenge model.» *Aquaculture* 290, 2009: 229 - 235.
- Hebeda, RE, CR Styrlun, y WM Teague. «Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production.» *Starch* 40, 1998: 33 - 36.
- Jordan, E, L Al-Halabi, T Schirrmann, y M Hust. «Antibody production by the gram-positive bacterium *Bacillus megaterium*.» *Methods Mol. Biol.* 525, 2009: 509 - 516.
- Jordan, E, y cols.. «Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*.» *Microb. Cell. Fact.* , 2007: 6 -12.
- Kileng, O, MI Brundtland, y B Robertsen. «Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon.» *Fish & Shellfish Immunology* 23, 2007: 378 - 389.
- Kitazawa, H, T Itoh, Y Tomioka, M Mizugaki, y T Yamaguchi. «Induction of IFN and IL-1 production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. cremoris.» *International Journal of Food Microbiology* 31, 1996: 99 - 106.
- Malten, M, y cols.. «A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium.» *Appl. Environ Microbiol.* 72, 2006: 1677 - 1679.
- Martin, L, MA Prieto, E Cortes, y JL Garcia. «Cloning and sequencing of the pac gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945.» *FEMS Microbiology Lett.* 125, 1995: 287 - 292.
- Martin, SA, y cols.. «Interferon type I and type II responses in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) SHK-1 cell line by the salmon TRAITS/SGP microarray.» *Physiol. Genomics* 32, 2007: 33 - 44.
- Metz, RJ, LN Allen, TM Cao, y NW Zeman. «Nucleotide sequence of an amylase gene from *Bacillus megaterium*.» *Nucleic Acids Res.* 16, 1988: 5203.
- MoBiTec GmbH. *Bacillus megaterium Protein Production System*. Goettingen, Alemania: 2012.

- Moore, SJ, MJ Mayer, R Biedendieck, E Deery, y MJ Warren. «Towards a cell factory for vitamin B12 production in *Bacillus megaterium*: bypassing of the cobalamin riboswitch control elements.» *N. Biotechnology*, 2014.
- Moro, A, JC Sánchez, y C Serguera. «Transformation of *Bacillus megaterium* by electroporation.» *Biotechnology Techniques* 9, 1995: 589 - 590.
- Munang'andu, H, y cols.. «Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in cohabitation challenge model. .» *Vaccine* 30, 2012: 4007 - 4016.
- Mweemba, A, S Mutoloki, y O Evensen. «Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon.» *Development and Comparative Immunology* 43, 2014: 184 - 196.
- Orpetveit, I, T Gjoen, H Sindre, y BH Dannevig. «Binding of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) to membrane proteins from different fish cell lines.» *Arch. Virol.* 153, 2008 : 485 - 493.
- Ortega, C, S Rodriguez, A de las Heras, A Romero, M Monrás, y R Enríquez. «Evaluation of the level of Mx3 protein synthesis induced by infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different infectivity.» *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141, 2011: 190 - 200.
- Ortega, C, y R Enríquez. «Factors associated with cellular infection by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV).» *Arch. Medicina Veterinaria* 39, 2007: 1 - 18.
- Rajanbabu, V, y JY Chen. «Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. .» *Fish & Shellfish Immunology* 30, 2011: 39 - 44.
- Raux, E, A Lanois, MJ Warren, A Rambach, y C Thermes. «Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* *cobI*-operon.» *Biochemistry J.* 335, 1998: 159 - 166.
- Reyes, S, y cols.. «IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence.» *Fish & Shellfish Immunology* 32., 2012: 291 - 300.
- Reyes, S, y cols.. «IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence.» *Fish & Shellfish Immunology* 32., 2012: 291 - 300.
- Reyes-Cerpa, S, K Maisey, F Reyes-López, D Toro-Ascuy, A.m Sandino, y M Imarai. *Fish Cytokines and Immune Responde (Edited by Turker, H.). New Advances and Contributions to Fish Biology.* ISBN: 978-953-51-0909-9, 2012.
- Robertsen, B, V Bergan, T Rokenes, R Larsen, y A Alburquerque. «Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. .» *J. Interferon Cytokine Res.* 10, 2003: 601 - 612.
- Rokenes, TP, R Larsen, y B Robertsen. «Atlantic salmon ISG15: Expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections.» *Mol. Immunology* 44, 2007: 950 -959.

- Rombout, JH, HB Huttenhuis, S Picchietti, y G Scapigliati. «Phylogeny and Ontogeny of Fish Leucocytes.» *Fish & Shellfish Immunology* 19, 2005: 441 - 455.
- Ronneseth, A, G Teien, y H Wergeland. «Flow cytometry detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) within subpopulations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes after vaccination and during the time course of experimental infection.» *Fish & Shellfish Immunology* 34, 2013: 1294 - 1305.
- Ruiz, C, A Blanco, FI Pastor, y P Diaz. «Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase.» *FEMS Microbiology Lett.* 217, 2002: 263 - 267.
- Rygas, T, A Scheler, R Allmansberger, y W Hillen. «Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization.» *Arch. Microbiol.* 155, 1991: 535 - 542.
- Rygas, T, y W Hillen. «Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon.» *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1991: 594 - 599.
- Samuel, CE. «Antiviral Actions of Interferons.» *Clinical Microbiology* 14, 2001: 778 - 809.
- Savan, R, y M Sakai. «Genomics of Fish Cytokines.» *Comp. Biochem. Physiol.* 1, 2006: 89 - 101.
- Secombes, CJ, T Wang, y S Bird. «The interleukins of Fish.» *Dev. Comp. Immunology* 35, 2011: 1336 - 1345.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. *Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos Año 2012*. Santiago, Chile: Unidad de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013.
- Stammen, S, y cols.. «High-yield intra and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*.» *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2010: 4037 - 4046.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. *Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura*. Santiago, Chile: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2017.
- Suga, K, Y Shiba, T Sorai, S Shioya, y F Ishimura. «Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*.» *Ann y Acad. Sci.* 613, 1990: 808 - 815.
- Takasaki, Y. «Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2.» *Agriculture Biol. Chem.* 53, 1989: 341 - 347.
- Thakib, MS, A Song, T Jalilsood, C Sieo, K Yusoff, y RA Rahim. «Construction of a novel inducible expression vector for *Lactococcus lactis* M4 and *Lactobacillus plantarum* Pa21.» *Plasmid* 74, 2014: 32 - 38.
- Vary, PS. «Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*.» *Biotechnology* 22, 1992: 251 - 310.
- Vary, PS. «Prime time for *Bacillus megaterium*.» *Microbiology* 140, 1994: 1001 - 1013.
- Vary, PS, y cols.. «*Bacillus megaterium* - From simple soil bacterium to industrial protein production host.» *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 2007: 957 - 967.

- Vihinen, M, y P Mantsala. «Microbial amyolytic enzymes.» *Crit. Rev Biochem. Mol. Biol.* 24, 1989: 329 - 418.
- Wang, T, B Gorgoglione, T Maehr, JW Holland, JL Vecino, y S Wadsworth. «Fish Supressors of Cytokine Signaling (SOCS): Gene discovery, modulation of expression and function.» *Journal of Signal Transduct*, 2011.
- Whyte, SK. «The innate immune response of finfish - a review of current knowledge.» *Fish & Shellfish Immunology* 6, 2007: 1127 - 1151.
- Wolf, JB, y RN Brey. «Isolation and genetic characterizations of *Bacillus megaterium* cobalamin biosynthesis-deficient mutants.» *Journal of Bacteriology* 166, 1986: 51 - 58.
- Yang, Y, y cols.. «High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*.» *Microb. Cell Fact.* , 2006: 5 - 36.
- Zou, J, C Tafalla, J Truckle, y CJ Secombes. «Identification of a second group of Type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates.» *Journal of Immunology* 179, 2007: 3859 - 3871.