

UCH-FC
DOC-Microbiología
C352
C.1

**MECANISMO DE EXPORTACIÓN Y PROCESAMIENTO
DE LA MICROCINA E492**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Microbiología



Facultad de Ciencias

por

JOSÉ ANTONIO CASTILLO MORALES

Abril de 2003

Director de Tesis: Dra ROSALBA LAGOS M.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

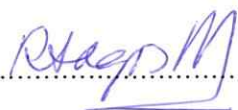
Se informa a la Escuela de Postgrado de la facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

JOSÉ ANTONIO CASTILLO MORALES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de tesis rendido el día 26, de Marzo de 2003.

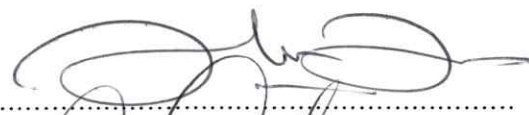
Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos M.

.....


Comisión de Evaluación de la Tesis:

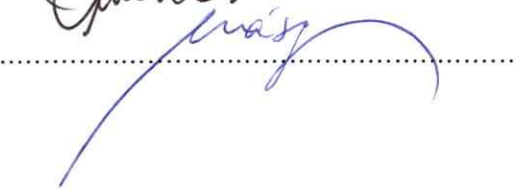
Dr. Carlos Jerez

.....


Dr. Omar Orellana

.....


Dr. Claudio Vasquez

.....




A ti Señor Dios Todopoderoso

Señor, digno eres de recibir la gloria y la honra y el poder; porque tú creaste todas las cosas, y por tu voluntad existen y fueron creadas.

Apoc. 4:11



AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a las siguientes personas por su valiosa ayuda en la realización de esta Tesis:

A la Prof. Rosalba Lagos por haberme aceptado en el laboratorio y por su ayuda en todos las fases del programa de doctorado y después de éste.

Al Prof. Octavio Monasterio, por su asistencia bioquímica, y por las conversaciones amenas.

A los compañeros del laboratorio: Gino Corsini, Erwin Strahsburger, Marcelo Baesa, Mario Tello, Jae Yen Shin, Esteban Nova, José Jaime Arbildúa, Maribel López, Daniel Pérez, por su colaboración, amistad y alegría.

A Roselyn Orellana y Marcela Vargas por su amistad y su indispensable ayuda en el suministro de material básico del laboratorio.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por la beca otorgada para realizar mis estudio.

Y muchas gracias de todo mi corazón a las personas más importantes de mi vida: Dios, mi Señor, a Helen y a mis papás.

A mi amada esposa porque siempre me apoyó y me ayudó en todo, por su valentía, paciencia y nobleza.

A mis papás porque desde la lejanía me respaldaron, por su amor siempre constante.

A mis hermanos por su ayuda permanente.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile bajo la dirección de la Dra. Rosalba Lagos y fue financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (proyectos FONDECYT 2000018, 1991017 y 1020757)

La realización de esta tesis fue apoyada por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) mediante una beca para estudios de doctorado.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	19
MATERIALES.....	19
Reactivos.....	19
Cepas bacterianas.....	21
Plásmidos y vectores.....	21
MÉTODOS.....	25
Medios de cultivo.....	25
Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492 y colicina V.....	26
Detección de actividad intracelular de microcina.....	27
Purificación de la microcina E492 extracelular.....	27
Purificación de la microcina E492 desde extractos celulares.....	28
Purificación de la colicina V extracelular.....	29
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para microcina y/o colicina V.....	29

Marcación y preparación de la microcina y/o colicina V con fluorescamina.....	30
Preparación de anticuerpo policlonal anti-microcina.....	31
Purificación de anticuerpo policlonal anti-microcina.....	31
Western blot.....	32
Inmuno Slot-blot.....	34
Ensayo de ELISA.....	34
Fraccionamiento subcelular.....	35
Secuenciación de DNA.....	37
Aislamiento y purificación de DNA plasmidial bacteriano (miniprep).....	38
Electroforesis en geles de agarosa.....	39
Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	40
Desfosforilación.....	40
Ligación de fragmentos de DNA.....	41
Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.....	41
Aislamiento y purificación de RNA bacteriano.....	42
Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).....	44
Preparación de células electro-competentes.....	45
Transformación por electroporación.....	45
Transformación con genes de microcina y colicina V.....	46

Construcción de plásmidos con mutaciones dobles y triples en los genes transportadores.....	46
Construcción de plásmidos para las proteínas quimeras.....	49
Construcción de plásmidos para microcina sin péptido líder.....	52
RESULTADOS	53
1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPORTADOR DE LA MICROCINA E492	53
Análisis de la secuencia de las proteínas transportadoras de la microcina E492.....	53
Localización del transposón Tn5 en el sistema genético de la microcina E492.....	62
Caracterización de mutantes en genes transportadores.....	67
Expresión transcripcional de los genes <i>mceA</i> , <i>mceG</i> y <i>mceH</i> en la cepa <i>mceF</i> ⁻	70
Proteína de membrana externa.	70
2. PARTICIPACIÓN DE LOS GENES <i>mceFGH</i> EN EL PROCESAMIENTO Y EXPORTACIÓN DE LA MICROCINA E492	74
Desarrollo de un anticuerpo policlonal anti-microcina.....	74
Western blot del medio sobrenadante producido por la mutante <i>mceF</i> ⁻	75
Western blot de lisados provenientes de las mutantes <i>mceF</i> ⁻ , <i>mceG</i> ⁻ , <i>mceH</i> ⁻	77

Western blot de microcina purificada desde extractos celulares provenientes de las mutantes <i>mceF</i> ⁻ , <i>mceG</i> ⁻ , <i>mceH</i> ⁻	79
Fraccionamiento subcelular.....	80
3. SISTEMAS TRANSPORTADORES HETERÓLOGOS.....	81
Exportación de microcina y colicina V a través de ambos sistemas transportadores.....	84
Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes en los genes transportadores ABC.....	87
Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes en los genes de las proteínas accesorias.....	90
Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes simples en los genes de los transportadores y de las proteínas accesorias.....	92
Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: gen <i>mceF</i>	93
Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: dobles mutantes en los genes de exportación.....	97
4. EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMERAS.....	100
5. FUNCIÓN DEL PÉPTIDO LÍDER EN LA EXPORTACIÓN DE LA MICROCINA E492.....	105
DISCUSIÓN.....	109
RECAPITULACIÓN.....	133
REFERENCIAS.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los componentes del sistema transportador ABC en bacterias Gram negativas	7
Figura 2. Esquema de las transformaciones realizadas para combinar los sistemas genéticos de la microcina E492 y la colicina V.....	47
Figura 3. Construcciones realizadas para obtener doble y triple mutantes en los genes transportadores de la microcina E492.....	48
Figura 4. Estrategia empleada para construir las proteínas quimeras.....	50
Figura 5. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos del transportador ABC y de la proteína accesoria de la microcina y de la colicina V.....	54-56
Figura 6. Comparación por diferentes algoritmos de predicción de hélices transmembrana de la proteína MceG y MsbA, y representación de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en las hélices transmembrana de MceG.....	59
Figura 7. Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína MceF, esquema que describe la posible disposición del dominio de MceF y representación de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en las hélices transmembrana que posee MceF.....	61
Figura 8. Localización del transposón Tn5 en el sistema genético de la microcina E492.	64

Figura 9. Electroforesis de muestras purificadas a partir de cultivos de cepas mutantes en los genes <i>mceH</i> <i>mceG</i> y <i>mceF</i>	68
Figura 10. Estudio de la expresión transcripcional del gen <i>mceA</i> y de los genes <i>mceGH</i> mediante RT-PCR en la mutante <i>mceF</i> ⁻	71
Figura 11. Western blot de muestras purificadas a partir de cultivos de cepas <i>tolC</i> ⁻ , <i>tolC</i> ⁻ -pJAM434, <i>tolC</i> ⁻ -pJAM434-pAX629 y <i>tolC</i> ⁺ -pJAM434.....	73
Figura 12. SDS-PAGE y western blot de muestras purificadas a partir de medios sobrenadantes obtenidos de cultivos de una cepa que produce microcina silvestre y una cepa mutante carente del gen <i>mceF</i>	76
Figura 13. Análisis de western blot de extractos celulares totales provenientes de cepas controles y de cepas mutantes en los genes <i>mceF</i> , <i>mceG</i> y <i>mceH</i> ..	78
Figura 14. Localización de la microcina en fracciones subcelulares de cepas mutantes en los genes <i>mceF</i> , <i>mceG</i> y <i>mceH</i>	82
Figura 15. Reconocimiento de la microcina E492 y la colicina V por el anticuerpo no purificado anti-microcina.....	85
Figura 16. Electroforesis de sobrenadantes provenientes de cultivos de células que llevan diferentes plásmidos combinados para estudiar la exportación de la microcina y la colicina V.....	89
Figura 17. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la microcina y de la colicina V.....	101

Figura 18. Actividad bactericida debida a la exportación de las proteínas quimeras microcina-péptido líder de colicina V y colicina V-péptido líder de microcina.....	104
Figura 19. Representación de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en las hélices transmembrana que posee CvaB y CvaB con el cambio de una arginina por una serina en el sitio 174 de la secuencia proteica.....	117
Figura 20. Representación de un modelo del mecanismo de transporte por el aparato transportador ABC.....	123

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en esta tesis.....	22
Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en esta tesis.....	23-24
Tabla 3. Partidores usados en la amplificación de fragmentos de DNA.....	43
Tabla 4. Localización de las mutaciones por transposición en los genes implicados en el transporte de microcina.....	66
Tabla 5. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de ambos transportadores.....	86
Tabla 6. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutantes en los genes transportadores ABC.....	88
Tabla 7. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos en las proteínas accesorias.....	91
Tabla 8. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutaciones simples en los genes de los transportadores y de las proteínas accesorias.....	94
Tabla 9. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutantes y doble copia en gen <i>mceF</i>	96
Tabla 10. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con dobles mutantes en los genes de exportación.	98
Tabla 11. Exportación de proteínas quimeras a través del aparato transportador ABC de la microcina E492 y la colicina V.....	103
Tabla 12. Estudios de exportación realizados con microcina con y sin péptido líder.....	108

ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BSA	Albúmina de suero de bovino
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de bovino
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Mcc	Microcina E492
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico
MFP	Proteína accesoria (de <u>M</u> embrane <u>F</u> usion <u>P</u> rotein)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitro blue tetrazolium
OMP	Proteína de membrana externa (de <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein)
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Péptido líder
PNPP	P-nitrofenilfosfato
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La microcina E492, una bacteriocina formadora de poros, es producida y secretada por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. El sistema genético de la microcina se clonó en *Escherichia coli* obteniéndose una microcina recombinante con las mismas propiedades que la producida por *K. pneumoniae*. Este antibiótico es sintetizado como un precursor, con un péptido líder (PL) N-terminal que es procesado concomitantemente con la exportación hacia el medio extracelular. El PL de la microcina E492 es del tipo doble glicina, lo que indica que la microcina E492 sería exportada a través de un aparato transportador ABC dado que comúnmente este sistema transportador es el encargado de exportar proteínas con esta clase de PL. El objetivo de este trabajo fue estudiar el procesamiento y exportación de la microcina E492.

Mediante la caracterización de mutantes por transposición en el sistema genético de la microcina se estableció que participan tres genes en la exportación de la microcina: *mceG*, que codifica para el transportador ABC, *mceH*, para la proteína accesoria y *mceF*, para un factor adicional nunca antes descrito, por tanto, de función desconocida. Los aparatos transportadores ABC además están normalmente constituidos por una proteína localizada en la membrana externa. Para determinar cual es la proteína de membrana externa que forma parte el aparato transportador ABC de la microcina se utilizó una mutante en el gen *tolC*. La mutante *tolC*⁻ no es capaz de exportar microcina,

función que recupera al ser transformada con un plásmido que lleva el gen *tolC*. Así, TolC es la proteína de membrana externa que forma parte del aparato transportador ABC de la microcina en *E. coli*.

Las proteínas candidatas de procesar el PL de la microcina son MceG y MceF. Proteínas homólogas a MceG poseen un dominio N-terminal encargado de procesar el PL. Por otro lado, la secuencia de MceF sugiere que sería una proteasa de membrana interna y una mutante carente de MceF produce una proteína de un tamaño superior que correspondería a la microcina no procesada. Los estudios de western blot de medios sobrenadantes y de fracciones totales y subcelulares obtenidos de las mutantes *mceG*⁻ y *mceF*⁻ indican que MceG procesa el PL de la microcina conjuntamente con MceF. Aparentemente MceF interviene en el reconocimiento junto con MceG de la microcina precursora y facilitaría que el dominio de líder-peptidasa de MceG encuentre a la microcina precursora para procesarla.

MceG y MceH presentan una identidad cercana al 90% con el transportador ABC de la colicina V (CvaB) y su proteína accesoria (CvaA). En este trabajo se estudió la relación funcional que existe entre el sistema transportador de la microcina E492 y de la colicina V y sus respectivos péptidos líder tratando de establecer el papel que juega MceF en este proceso. Se realizó un análisis funcional combinando los componentes del sistema exportador de la microcina y de la colicina V, cuyo resultado indica que la colicina V puede emplear el

transportador ABC y la proteína accesoria de la microcina E492 para su secreción únicamente cuando está presente la proteína MceF. Por el contrario, la microcina E492 no puede usar el transportador de la colicina V para alcanzar el medio extracelular, y la proteína accesoria CvaA complementa parcialmente la falta de su homólogo MceH en la exportación de la microcina E492. Así, la complementación funcional no es recíproca aún cuando la similitud entre ambos sistemas es muy alta y la exportación vía MceGH de ambas bacteriocinas requiere de MceF.

La secuencia del PL de la microcina presenta en común cinco de los nueve aminoácidos conservados en la secuencia consenso de esta clase de péptidos líder. Los aminoácidos que difieren pueden ser importantes para el procesamiento, como la glicina en la posición -1, ya que los residuos más importantes del PL del tipo doble glicina son las dos glicinas ubicadas en las posiciones -1 y -2. La microcina presenta una alanina en la posición -1, en cambio la colicina V posee la mayoría de los aminoácidos de consenso incluyendo las dos glicinas mencionadas. Se construyeron proteínas quimeras fusionando el PL de la colicina V a la microcina madura y viceversa con el fin de determinar la importancia de los aminoácidos no conservados en el PL de la microcina y la relación que puede haber con MceF. La microcina quimera fue exportada por ambos sistemas exportadores en conjunto, en cambio, la colicina V quimera, a través de su propio aparato transportador.

Comúnmente las señales de exportación que dirigen el tránsito hacia el medio extracelular de las proteínas exportadas por sistemas transportadores ABC están ubicadas en el extremo C-terminal. Sin embargo el PL podría también dirigir la exportación de estas proteínas. Se estudió el rol que tiene el PL en la exportación de la microcina clonando el gen de la microcina sin PL en un vector que permite modular la expresión del gen. Al expresar el gen, no se detectó microcina extracelular, además las células crecieron deficientemente, sobreviviendo solo las que lograron reorganizar su DNA, excluyendo el fragmento perjudicial. En el experimento control con PL, la microcina pudo ser exportada y las células crecieron saludables. Esto indica que el PL dirige la exportación de la microcina y evita el efecto deletéreo de ella sobre la célula.

ABSTRACT

Microcin E492, a channel-forming bacteriocin, is produced and secreted by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. This antibiotic is synthesized as a precursor molecule, with an N-terminal leader peptide that is processed concomitant with the export to the extracellular space. The microcin leader peptide belongs to double-glycine-type leader peptides that are common in colicin V and bacteriocins produced by gram-positive bacteria. This property suggests that microcin E492 would use an ABC-transporter apparatus (Type I secretion) for its secretion. The aim of this work was to study the general features of the microcin E492 export and processing.

Studying a set of mutants obtained through transposition, we found that three genes participate in the microcin export: *mceG*, that encodes for an ABC-transporter, *mceH*, for the accessory protein (also called MFP) and *mceF* for an additional factor not described in the literature, with an unknown function. In addition, the microcin E492 ABC-transporter apparatus is also formed by TolC, a protein localized in the outer membrane.

The cleavage of microcin leader peptide could be achieved by either MceG or MceF. MceG protein homologues have an N-terminal domain that frequently cleaves the leader peptide of its cognate bacteriocin. On the other hand, the sequence analysis of MceF indicates that this protein could be a leader

peptidase localized inside the inner membrane. Microcin prepared from a mutant in *mceF* gene showed a higher molecular weight than that of microcin. Since this protein is recognized by an antibody against microcin most likely corresponds to the microcin precursor. Western blot experiments of supernatants and whole-cell fractions as well as subcellular fractions obtained from mutants in *mceG* and *mceF* genes suggest that the ABC transporter processes the leader peptide of microcin with the assistance of MceF. A possible role of MceF could be the recognition of microcin in order to present it to MceG for processing.

Transporter proteins of microcin (MceG and MceH) have an identity near to 90% with the ABC transporter of colicin V (CvaB) and its accessory protein (CvaA), respectively. In this work we studied the functional relationship that exists between the transporter apparatus of microcin and colicin V. The functional analysis was done through complementation between the transporter genes of microcin and colicin V. The results indicate that colicin V can use the ABC transporter and accessory protein of microcin (MceG and MceH) to be exported only when *mceF* gene is present in the genetic system. On the other hand, microcin cannot use the CvaB transporter, and for microcin secretion CvaA can complement only partially the lack of its homologous MceH. These studies indicate that the functional complementation is not reciprocal, and the exportation of microcin and colicin V via MceGH requires the additional factor MceF.

The leader peptide sequence of microcin shares five amino acids of the nine residues found in consensus sequence of double-glycine leader peptides. The residues that are different could be important for cleavage, as it occurs with the glycine in position -1, since the most important residues of this kind of leader peptides are the two glycines situated in -1 and -2 positions. The microcin leader peptide contains an alanine in position -1 instead of the glycine of consensus. On the other hand, the colicin V leader peptide has almost all residues of the consensus sequence along with the glycines in -1 and -2 positions. To determine the importance of these amino acids of microcin in the leader peptide, we constructed chimeric bacteriocins composed by colicin V leader peptide fused to the mature form of microcin and vice versa. The chimeric microcin was exported by the combination of both colicin V and microcin transporter apparatuses, in contrast with the chimeric colicin V protein, that was exported by its own complex.

Usually the exportation signals that allow proteins that are exported by ABC transporter systems are localized in their C-terminal region of the exported protein. However, in the case of small proteins such as bacteriocins, the leader peptide could also conduct their exportation. In order to study the role of the leader peptide, we cloned the microcin gene without the sequence encoding the leader peptide in a vector that allows a strict control of gene expression. When we expressed the leaderless microcin gene, no microcin was detected in the extracellular space. Cells grew poorly, surviving only the cells that were able to

make a DNA re-arrangement to displace the harmful fragment, while, in the control experiment, cells carrying microcin that contained the leader peptide, grew healthy and exported microcin. This result suggests that the leader peptide is not only necessary for microcin exportation but avoids toxic effect of intracellular microcin.

INTRODUCCIÓN

Una importante proporción de bacterias producen y secretan unos polipéptidos sintetizados en el ribosoma que poseen actividad bacteriostática o bactericida conocidos como bacteriocinas. Las bacteriocinas afectan selectivamente a microorganismos competidores sin causar daño a la célula productora (Baba y Schneewind, 1998) e intervienen en las interacciones a nivel poblacional o intra-especies de las bacterias (Riley y Gordon, 1999). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se han separado en dos grupos de acuerdo a su peso molecular, siendo las colicinas de un peso molecular mayor (de 30.000 a 80.000 Da) que las microcinas (menor de 10.000 Da) (Pugsley, 1985). A su vez, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas se han dividido en cuatro clases de acuerdo a sus propiedades genéticas y bioquímicas. La clase I está compuesta por péptidos pequeños que contienen aminoácidos modificados (lantionina, β -metil-lantionina, deshidroalanina y deshidrobutirina); la clase II abarca bacteriocinas pequeñas, termoresistentes, que no presentan modificaciones por grupos lantionina o sus derivados, en tanto que las clases III y IV incluyen bacteriocinas grandes o complejas modificadas por grupos no-proteicos (Venema *et al.*, 1995).

Las microcinas comprenden un conjunto de péptidos antibióticos producidos por bacterias Gram negativas que ejercen su acción letal sobre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Son resistentes a algunas proteasas y a

condiciones extremas de pH y temperatura, son solubles en metanol, no son inducibles por el sistema S.O.S. y la mayoría son producidas en la fase estacionaria de crecimiento (Baquero y Moreno, 1984; Kolter y Moreno, 1992). Casi todas las microcinas descritas son sintetizadas por *Escherichia coli* a excepción de la microcina E492 (De Lorenzo, 1985).

La microcina E492 es una bacteriocina producida y secretada por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (De Lorenzo, 1984). Este péptido es altamente hidrofóbico, ácido, activo contra varias especies de bacterias Gram negativas incluyendo *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (De Lorenzo, 1984) y también induce apoptosis en algunas líneas celulares humanas (Hetz *et al.*, 2002). Su masa molecular es de 7.886 Da y no presenta modificaciones post-traduccionales (Lagos *et al.*, 2001; Lagos *et al.*, 2003; Pons *et al.*, 2002). El sitio de acción de la microcina E492 es la membrana citoplasmática donde forma canales iónicos, provocando la despolarización de la célula blanco (Lagos *et al.*, 1993). La microcina alcanza la membrana interna a través de las proteínas TonB y ExbBD (De Lorenzo y Pugsley, 1985).

La microcina E492 se produce en fase exponencial de crecimiento a diferencia de las demás microcinas descritas (Wilkins *et al.*, 1997). Al finalizar la fase exponencial de crecimiento se acumula una sustancia antagonista de la actividad de microcina (enteroquelina), que al ser liberada al medio extracelular se uniría con la microcina impidiendo su correcta interacción con el

receptor/translocador (Orellana y Lagos, 1996). Recientemente se ha determinado que los receptores de la membrana externa que emplea la microcina para ejercer su función bactericida son Fiu, Cir y FepA (Strahsburger y Lagos, resultados no publicados)

Los determinantes genéticos requeridos para la producción de la microcina E492 se encuentran codificados en el cromosoma de *K. pneumoniae* en un segmento de tamaño inusualmente grande (13 Kb) comparado con otros sistemas de microcinas (Wilkens *et al.*, 1997). Esta región comprende un grupo de diez genes denominados mce (microcin E) dispuestos en siete unidades transcripcionales que participan en los procesos de síntesis (gen estructural, *mceA*), inmunidad (*mceB*), maduración (*mceC*, *mceI/J*), procesamiento y exportación (*mceF*, *mceGH*) (Lagos *et al.*, 2001). Wilkens *et al.* (1997) clonaron los genes implicados en la producción de microcina activa en *E. coli*, obteniendo una microcina recombinante que cuenta con las mismas propiedades electrofisiológicas y bioquímicas que la microcina producida por la cepa original de *K. pneumoniae*.

La microcina puede presentarse en dos formas: una activa (con actividad bactericida) y otra no activa. La forma inactiva puede ser convertida a forma activa cuando está en contacto con la versión activa, comportamiento encontrado en priones de mamíferos. La diferencia entre ambas formas de microcina radica en la conformación que adoptan; así, la versión activa posee

una mayor cantidad de estructura hoja β , y la forma inactiva una mayor proporción de α -hélices. Un segmento de la microcina es muy parecido en su secuencia aminoacídica a una región conservada de los priones de mamíferos. Se ha propuesto que esta región está implicada en el cambio conformacional que sufren las proteínas prionicas (Lagos *et al.*, 2003).

El gen estructural de la microcina codifica para un precursor cuyo tamaño exacto no se ha establecido y que puede ser de 99 o 103 aminoácidos, dependiendo de la metionina que sea usada como codón de inicio de la traducción. En razón de esto, el tamaño del péptido líder puede ser de 15 o 19 aminoácidos. Uno de estos péptidos (o ambos) corresponden al precursor de la microcina, el cual es procesado proteolíticamente en un motivo del tipo doble glicina, originando un péptido maduro de 84 aminoácidos que es secretado al medio extracelular (Lagos *et al.*, 1999). Las características del péptido líder de la microcina E492 y de su sitio de corte son muy similares a las encontradas en colicina V, en péptidos no-lantibióticos y en algunos lantibióticos (Michiels *et al.*, 2001). Entre las semejanzas se puede destacar que el péptido líder de la microcina es aproximadamente del mismo tamaño que el de dichas bacteriocinas y estaría conformado principalmente por una estructura secundaria de α -hélice seguida por una vuelta β en el sitio de procesamiento (Lagos *et al.*, 1999). A nivel de secuencia, el péptido líder de la microcina presenta aminoácidos en común con la secuencia consenso de esta clase péptido líder (M[R/K]ELXXE[I/L]XX[I/V]XGG \uparrow , donde X es cualquier

aminoácido) (Havarstein *et al.*, 1994; Michiels *et al.*, 2001) Así, de los nueve aminoácidos conservados de los péptidos que son procesados en el motivo de doble glicinas, la microcina comparte cinco (MREXXXXXLXXXXGX↑, en posiciones -2, -7, -13, -14 y -15 relativos al sitio de corte). Los aminoácidos que difieren pueden ser significativos para el procesamiento, como la glicina en la posición -1 (Lagos *et al.*, 1999). Los residuos más importantes del péptido líder del tipo doble glicina son las dos glicinas ubicadas en las posiciones -1 y -2, ya que la sustitución de una de ellas por otro aminoácido impide que el procesamiento se realice (Gilson *et al.*, 1990, Havarstein *et al.*, 1994).

Las vías de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas pueden ser organizadas en seis grupos, cuatro de los cuales representan ramas terminales de la vía general de secreción (sistema Sec o del Tipo II, Blight *et al.*, 1994; Thanassi y Hultgren, 2000). Mientras que la mayoría de las proteínas exportadas usan la vía Sec (revisado por Pugsley, 1993), las bacteriocinas son liberadas al medio extracelular ya sea a través de un sistema de "escape selectivo" en el que participa una proteína de lisis (Pugsley y Schwartz, 1984) o mediante un complejo exportador que emplea ATP denominado transportador del Tipo I (Fath y Kolter, 1993). Así, las bacteriocinas que poseen un péptido líder del tipo doble glicina emplean un aparato transportador dedicado del Tipo I para su secreción, ya que no tienen la secuencia señal característica de la vía de secreción general (Havarstein *et al.*, 1995; Lagos *et al.*, 1999; Michiels *et al.*, 2001).

El aparato transportador Tipo I, conocido también como aparato transportador ABC (de ATP-Binding Cassette) constituye un grupo de sistemas de transporte que hidrolizan ATP para obtener la energía necesaria para translocar los sustratos. Este aparato está presente tanto en organismos procariontes como en eucariontes e incluye sistemas encargados de importar y de exportar una gran diversidad de compuestos tales como azúcares, péptidos, aminoácidos, iones, drogas, etc (Higgins, 1992, Doige y Ames, 1993; Fath y Kolter, 1993; Holland y Blight, 1999). En bacterias Gram negativas, estos compuestos atraviesan ambas membranas bacterianas en un sólo paso, es decir, sin que exista un intermediario periplásmático como ocurre con la secreción por la vía Sec. Las proteínas y péptidos transportados por este sistema no tienen el péptido señal característico de la vía Sec, sino que poseen una señal de exportación usualmente localizada en el extremo C-terminal (Wandersman, 1992; Salmond y Reeves, 1993). La vía de transporte de Tipo I está ejemplificada por la secreción de la α -hemolisina, que ha sido la primera en ser estudiada con detalle en procariontes (Wang *et al.*, 1991; Juranka *et al.*, 1992, Fath y Kolter, 1993; Nikaido, 2000) y la colicina V (Gilson *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1995), ambas producidas por *E. coli*.

El sistema transportador de Tipo I está conformado principalmente por tres clases de proteínas, dos localizadas en la membrana interna y una en la membrana externa (Figura 1; Wandersman, 1992; Fath y Kolter, 1993; Binet *et al.*, 1997; Young y Holland, 1999). Una de las proteínas de membrana interna

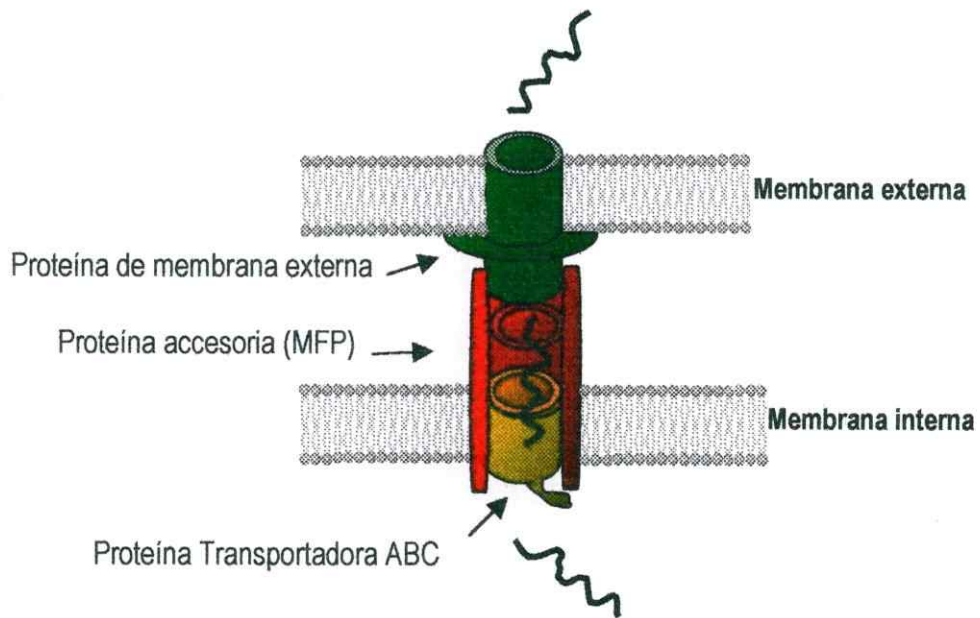


Figura 1. Representación de los componentes del sistema transportador ABC en bacterias gram negativas. La proteína transportadora ABC (de color amarillo) interacciona con la proteína accesoria (rojo) formando un complejo estable que se pone en contacto con la proteína de membrana externa (verde) únicamente cuando el sustrato es exportado, como se indica en la figura. El aparato transportador ABC, en su conformación activa para el transporte, es un canal en forma de túnel que permite el paso del sustrato.

tiene un motivo que une ATP y forma parte de la superfamilia de transportadores ABC (conocidos también como proteínas ABC o ATPAsas de tráfico), proteína de la cual toma nombre este aparato transportador (Doige y Ames, 1993; Saier, 2000). Los transportadores ABC son proteínas conformadas por un dominio hidrofílico C-terminal que une ATP (Bishop *et al.*, 1989; Koronakis *et al.*, 1993) y un segmento central hidrofóbico insertado en la membrana citoplasmática (Young y Holland *et al.*, 1999). Sin embargo las proteínas ABC que exportan ciertas bacteriocinas poseen además un dominio N-terminal con actividad proteolítica (Havarstein *et al.*, 1995, Binet *et al.*, 1997). Estos dominios pueden estar expresados en polipéptidos separados, pero la mayoría de los transportadores ABC tienen ambos dominios en el mismo polipéptido (Fath y Koiter, 1993). La energía necesaria para la translocación de la proteína es provista por la hidrólisis de ATP (Bishop *et al.*, 1989) o, en algunos casos, de GTP (Zhong *et al.*, 1998).

Generalmente los transportadores ABC forman homodímeros en la membrana interna, por tanto los dos dominios transmembrana de ambos monómeros forman un conducto que atraviesa la membrana por medio del cual pasan los sustratos. El reconocimiento específico del sustrato a ser transportado reside en el dominio de transmembrana del transportador ABC (Binet y Wandersman, 1995). Estos dominios están formados por varios segmentos de transmembrana (α -hélices) que usualmente son seis u ocho por monómero (Wang *et al.*, 1991; Holland y Bligh, 1996). Sin embargo algunos transportadores ABC encargados

de importar algunas moléculas pueden llegar a poseer diez segmentos de transmembrana en cada monómero (Locher *et al.*, 2002). La determinación de la organización de las α -hélices en las regiones de transmembrana en las proteínas ABC es frecuentemente difícil ya que posiblemente no respondan a una estructura rígida, sino dinámica (Holland y Bligh, 1996). En los exportadores ABC, las α -hélices están espacialmente dispuestas formando una cámara que, al abrirse por la rotación de dos o tres segmentos de transmembrana, recibe al sustrato desde la cara interna de la membrana citoplasmática. Por el lado que mira a la cara periplasmática la cámara esta cerrada mientras ocurra un cambio conformacional gatillado por la unión e hidrólisis del ATP por parte del dominio C-terminal (Higgins y Linton, 2001; Chang y Roth, 2001). En el caso de MsbA, un transportador ABC de *E. coli* encargado de exportar un sustrato hidrofóbico (Lípido A), el lado citoplasmático de la cámara contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente, lo que contrasta con el ambiente significativamente menos cargado y más hidrofóbico del lado periplasmático de la membrana (Chang y Roth, 2001).

Por su parte el dominio C-terminal es la región más conservada entre los transportadores ABC descritos y constituye su mayor característica. Los motivos más conservados de este dominio incluye las cajas Walker A (GXXGXGKS/T) y Walker B (I/VLI/LLD), una glutamina en el "loop" Q y una histidina aproximadamente 25 residuos después del motivo Walker B (Walker *et al.*, 1982; Holland y Bligh, 1999). Además el cassette ABC posee

invariablemente un "loop" D y una secuencia conservada (LSGGQ) lo que se conoce comúnmente como la "ABC signature" (Holland y Blight, 1999; Locher *et al.*, 2002). La hidrólisis de ATP por los transportadores ABC es altamente cooperativa, pero se desconoce la manera cómo ambos dominios interactúan. Los motivos Walker A y B forman el sitio de unión del nucleótido, sitio que se localiza en la superficie de los dos dominios C-terminal del complejo homodimérico. La estructura que forma la secuencia LSGGQ completaría el sitio de unión del ATP, de manera que dos nucleótidos se ubicarían en un 'bolsillo' formado por la interfase del dímero (Davidson, 2002).

Algunos exportadores ABC encargados de translocar bacteriocinas que poseen un péptido líder del tipo doble glicina tienen un dominio extra ubicado en el extremo N-terminal. Este dominio se ubica en el citoplasma y exhibe una actividad proteolítica útil para cortar el péptido líder del sustrato concomitantemente con su exportación. Así, esta clase de transportadores ABC cumplen una función dual, constituyen una proteasa de maduración y una translocasa. Los dominios N-terminal de varios transportadores ABC comparten dos motivos de secuencias conservadas: $QX_4D/ECX_2AX_3MX_4Y/FGX_4I/I$ y $HY/FYVX_{10}I/LDP$. El reemplazo de la cisteína presente en el primer motivo por un aminoácido apolar resulta en la pérdida completa de la actividad proteolítica, indicando que este residuo es parte del sitio activo, por tanto posiblemente se trate de una "cisteína-proteasa" (Havarstein *et al.*, 1995).

Los aparatos transportadores ABC de bacterias Gram negativas requieren además de las proteínas ABC de algunas proteínas accesorias. El primer grupo de éstas proteínas pertenece a la familia conocida como MFP (membrane fusion protein) y están conformadas por un extremo N-terminal anclado en la membrana interna, un extremo C-terminal y un gran dominio central hidrofílico presumiblemente localizado en el periplasma que interactuaría con el segundo grupo de proteínas accesorias, las proteínas de membrana externa (OMP, outer membrane protein, Fath y Kolter, 1993; Dinh *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1997; Binet *et al.*, 1997, Young y Holland, 1999). Así, el aparato transportador ABC estándar consiste de una proteína transportadora ABC, de una proteína accesorio MFP y de una proteína de membrana externa, componentes que se ensamblan formando un canal a modo de túnel, que permite el paso selectivo del sustrato (Andersen *et al.*, 2000; Buchanan, 2001; Koronakis *et al.*, 2001).

Las proteínas accesorias de la familia MFP se extienden a lo largo del periplasma poniendo en contacto la proteína ABC con la proteína de membrana externa (Pimenta *et al.*, 1996; Lewis, 2000). Son absolutamente esenciales para el transporte de los sustratos y están íntimamente acomplejadas con su respectivo transportador ABC. Dentro del aparato transportador también están presentes como homodímeros formando una estructura elongada que no deja escapar a los sustratos hacia el periplasma. Probablemente todas las proteínas MFP forman α -hélices en su dominio central, las que se ordenan en estructuras "coiled-coil", caracterizadas por la presencia de muchas secuencias repetidas.

Según un modelo propuesto por Johnson y Church (1999) basado en alineamientos múltiples y predicción de estructuras, ambos extremos de una proteína MFP se asociarían para componer un dominio ubicado en o cerca de la membrana citoplasmática, dejando de esta manera la parte central de la proteína formando una 'horquilla' donde se dispondrían las estructuras "coiled-coil". De esta manera, el extremo N-terminal estaría en contacto con la proteína ABC y el extremo C-terminal en la vecindad de ésta. Schlör y colaboradores (1997) comprobaron experimentalmente que existe una interacción física entre el extremo C-terminal de HlyD (una proteína MFP) y el dominio transmembrana de su respectiva proteína ABC (HlyB).

Las putativas regiones "coiled-coil" de las proteínas MFP son suficientemente largas para asociarse con el dominio ecuatorial de las proteínas de membrana externa. Así, ellas podrían formar una estructura tubular que envuelve la porción basal de las proteínas de membrana externa, de tal manera que las estructuras "coiled-coil" de las MFP se ensamblarían con las superficies no polares de las estructuras "coiled-coil" de las proteínas de membrana externa cuando el aparato exportado está activamente translocando los sustratos (Sharff *et al.*, 2001).

En bacterias Gram negativas se requiere una tercera proteína para la translocación a través de la membrana externa de sustratos. La proteína de membrana externa mejor estudiada es TolC, cuya estructura tridimensional se



conoce a una resolución de 2.1 Å. Existen más de 60 proteínas homólogas TolC distribuidas en diferentes especies de bacterias Gram negativas (Sharff *et al.*, 2001). TolC y sus homólogos son el componente de membrana externa de los aparatos exportadores de tipo ABC y de bombas de eflujo dedicadas a eliminar drogas. Así, los miembros de esta familia pueden interactuar con diversas proteínas de la membrana interna para transportar una gran variedad de compuestos. Estructuralmente tres copias de TolC se ensamblan para constituir un homotrímero de forma tubular que se extiende por toda la membrana externa y parte del periplasma. A su vez, TolC está estructurado en tres dominios: un dominio periplasmático de 100 Å formado por α -hélices que se organizan a manera de un túnel (barril α), un dominio de 40 Å anclado en la membrana externa constituido por hojas β (barril β) que forman un canal, y un tercer dominio integrado por una mezcla de estructuras α y β (dominio ecuatorial). Así, TolC se ensambla formando un canal en forma de túnel con un diámetro de 35 Å abierto en su cara exterior y cerrado en su extremo periplasmático. Las α -hélices presentes en el dominio periplásmico forman estructuras "coiled-coil" que giran sobre si mismas a manera de un diafragma, de este modo cerrando o abriendo, el extremo del conducto (Koronakis *et al.*, 2000; Andersen, *et al.*, 2001). El barril de α -hélices comprende dos secciones que son divididas por el dominio ecuatorial: debajo de éste, las hélices se disponen como las estructuras "coiled-coil" convencionales, en cambio, por arriba, las hélices se empaquetan estrechamente formando un cilindro continuo

que no permite la salida lateral de los sustratos (Koronakis *et al.*, 2000; Sharff *et al.*, 2001).

Los estudios estructurales de algunos componentes del aparato transportador ABC han ayudado a dilucidar el mecanismo de transporte a través de los sistemas ABC. El modelo que explica con mayor detalle y solidez el mecanismo de exportación de proteínas surge de las investigaciones realizadas en la exportación de la α -hemolisina (Andersen *et al.*, 2001). El aparato exportador de la α -hemolisina está constituido por la proteína HlyB (ABC), HlyD (MFP) y TolC. A continuación se describe brevemente el mecanismo implicado en su exportación. Thanabalu y colaboradores (1998) confirmaron las sospechas de otros investigadores que sugerían que la proteína HlyD forma en la membrana interna un pre-complejo con HlyD en ausencia del sustrato, la α -hemolisina. Ambas proteínas pueden detectar y unir a la α -hemolisina para empezar el proceso de transporte, sin embargo, en HlyB radica la especificidad en reconocer el sustrato (Binet y Wandersman, 1995). En presencia de la α -hemolisina, el complejo HlyBD reconoce a su sustrato y a continuación recluta al tercer componente del sistema, la proteína TolC para formar un conducto continuo y activo para la exportación. En otras palabras, el reconocimiento del sustrato por parte del complejo HlyBD induce que éste sufra cambios conformacionales que establecen un contacto físico entre HlyBD y TolC (Koronakis *et al.*, 2000). En esta etapa ocurre una asociación entre las regiones "coiled-coil" de HlyD y de TolC provocando un cambio conformacional en TolC

que permite la abertura transiente del conducto. De este modo, el tubo compuesto por el dominio central de la proteína MFP envolvería la porción periplásmica de TolC, formando una asociación de cilindros concéntricos. Aparentemente, el estado 'abierto' del tubo es intrínsecamente inestable ya que las interacciones más favorables entre las α -hélices de TolC han sido removidas y compensadas por contactos complementarios con las α -hélices de la proteínas MFP. Este cambio transiente requiere energía (Sharff *et al.*, 2001). Se une el ATP a los sitios correspondientes de HlyB, y para que ocurra el reclutamiento de TolC por parte de HlyDB, el ATP es hidrolizado proveyendo la energía necesaria para provocar los cambios conformacionales (Jones y George, 2002). El sustrato aparentemente atraviesa el conducto parcialmente desplegado y en ocasiones es asistido por una chaperona que facilita su paso (Delepelaire y Wandersman, 1998). Al terminar la exportación, el complejo HlyBD-TolC es desarmado y los componentes vuelven a estar en estado inactivo (Koronakis *et al.*, 2000; Sharff *et al.*, 2001).

El sustrato que es transportado por aparatos transportadores del Tipo I posee algunas señales que son reconocidas por la proteína ABC. Desde hace varios años se sabía que dichas señales están localizadas en los ~50 últimos aminoácidos de la región C-terminal (Koronakis *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1991; Duong *et al.*, 1996). Sin embargo estudios recientes indican que también el extremo N-terminal de los sustratos son reconocidos específicamente por la proteína ABC para gatillar su exportación (Sapriel *et al.*, 2002).

Los aparatos exportadores ABC de algunas bacteriocinas son altamente conservados entre sí a tal punto que existe complementación funcional entre sistemas cuya similitud en su secuencia aminoacídica es de 50 a 90% (Fath *et al.*, 1991; Binet y Wandersman, 1995). El putativo sistema exportador de la microcina E492 es muy parecido al de la colicina V, y a continuación se detalla brevemente sus características. El exportador ABC de la colicina V, codificado por el gen *cvaB*, posee los dominios característicos de esta familia, el dominio de transmembrana (conformado por seis α -hélices), el dominio de unión de ATP y el dominio N-terminal encargado de procesar proteolíticamente el péptido señal de la colicina V. El producto del gen *cvaA*, de 47Kda, corresponde a la proteína accesoria que comparte el patrón organizacional encontrado en todas las proteínas MFP. Finalmente la proteína de membrana externa está codificada por el gen *tolC* (Gilson *et al.*, 1990). La colicina V, de 88 aminoácidos, tiene un péptido líder de 15 aminoácidos del tipo doble glicina, y comparte la mayoría de los residuos claves para el procesamiento de acuerdo a la secuencia consenso establecida para este tipo de péptidos (Gilson *et al.*, 1990; Michiels *et al.*, 2001).

El péptido líder que poseen algunas bacteriocinas es procesado por enzimas especializadas conocidas como "líder peptidasas" que reconocen las formas precursoras de dichas proteínas. La líder peptidasa puede ser parte del transportador ABC (caso colicina V, Gilson *et al.*, 1990) o puede ser una peptidasa de origen cromosomal, no ligada a los genes responsables de la

producción de la bacteriocina (caso microcina B17, Rodríguez-Sainz *et al.*, 1990).

El procesamiento de la microcina E492 se realizaría concomitante con la exportación. Debido a la alta similitud que existe entre los aparatos exportadores de la colicina V y de la microcina E492, se espera que el exportador ABC, sea el encargado de procesar proteolíticamente al péptido líder. Sin embargo, debido a que el péptido líder de la microcina E492 no posee todos los aminoácidos de consenso de la señal de procesamiento característico del motivo de doble glicina, existe la posibilidad que intervenga un factor adicional codificado por el gen *mceF*, para seccionar el péptido líder. Esta particularidad de la microcina podría ser requerida para dar especificidad al sistema, y el factor adicional MceF estaría encargado de realizar el procesamiento en forma conjunta con el (o separada del) exportador ABC y/o podría intervenir en la exportación de la microcina ayudando a reconocer las señales particulares que posee el precursor de la microcina. La posible participación de un factor adicional en el procesamiento y/o exportación de la microcina E492 constituye un hecho original, no descrito en otros sistemas de exportación de bacteriocinas.

Wilkens y colaboradores (1997) obtuvieron una mutante carente del gen *mceF* (JRS1) que secreta un péptido de mayor tamaño que pudiera corresponder a la forma no procesada de la microcina. En forma adicional, células que poseen

dos copias del gen *mceF*, crecen mejor y producen más microcina activa, sugiriendo que la expresión de este gen sería baja en condiciones silvestres, por tanto, una mayor dosis génica incrementa la cantidad de proteína MceF lo que aumentaría la producción de la microcina y evitaría la acumulación de intermediarios tóxicos.

Bajo la hipótesis que el producto del gen *mceF* interviene en el procesamiento y exportación de la microcina E492 como un factor adicional que interviene en su secreción, esta Tesis tuvo como objetivo general estudiar los aspectos relacionados con el procesamiento y exportación de la microcina. Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la participación de los genes *mceF*, *mceG* y *mceH* en la exportación de la microcina y en el procesamiento de su forma precursora.
2. Conocer la relación funcional que existe entre el aparato transportador ABC de la microcina y de la colicina V.
3. Investigar el papel que juega el péptido líder en la exportación de la microcina y las señales que éste posee para dirigir el procesamiento de la forma precursora de la microcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

Reactivos.

Las enzimas de restricción, Taq DNA polimerasa, Elongasa, desoxinucleótidos, estándar de peso molecular λ HindIII, CIAP, kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System, PCR dsDNA Cycle Sequencing System utilizados en esta Tesis se compraron en Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA.

La T4 DNA ligasa se compró en Fermentas Inc., Hanover, MD, USA.

La ribonucleasa A, fluorescamina, anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, bis-acrilamida, BSA, SDS, azida de sodio, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween-20, tricina, L-aminoácidos se compraron en Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

La DNAsa I se obtuvo en Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania.

La transcriptasa reversa M-MLV se compró en Promega Corporation Madison, WI, USA.

Las membranas de nitrocelulosa para western blot se obtuvieron en Amersham Biotech Ltda UK.

Las membranas de nitrocelulosa para 'desalar' ácidos nucleicos se obtuvieron en Millipore, USA.

La acrilamida, persulfato de amonio, TEMED y cubetas de electroporación se obtuvieron en BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA.

El azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, carbonato ácido de sodio, PNPP, TCA, cloruro de calcio se obtuvieron en Merck, Darmstadt, Alemania.

El cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, dimetilformamida, cloruro de guanidinio, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, BSA, MOPS, DEPC formamida, β -mercaptoetanol, citrato de sodio, marcador de proteína preteñido, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

El cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio se adquirieron en Fluka Chemie AG Messerschmittstr, Suiza.

Los reactivos grado técnico (ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico) se adquirieron en TCL, Santiago, Chile.

La triptona y extracto de levadura se adquirieron en DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

El hidróxido de sodio se obtuvo en J. T. Baker Edo. de Mexico, México.

El BCIP y NBT se compraron en Aplichem Damstadt, Alemania.

La película instantánea 667 se compró en Polaroid.

Los cartuchos Sep-Pak C18 se adquirieron en Waters, USA.

La arabinosa se consiguió en US Biologicals, Swampscott MA, USA.

El cloranfenicol se compró en Flamingo Pharmaceuticals.

La tetraciclina se compró en Laboratorio Benguerel, Ltda, Chile.

La ampicilina se adquirió en Lyka Lab, Limited.

El Tritón X-100 se consiguió en Boehringer Mannheim Corp. Indianapolis, USA.

Cepas bacterianas.

En la Tabla I se detallan las cepas utilizadas en este estudio.

Plásmidos y vectores

En la Tabla 2 se detallan los plásmidos y vectores utilizados en esta Tesis.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> VCS257	DP50, <i>sup</i> F [<i>sup</i> E44, <i>sup</i> F58, <i>hsd</i> 53(<i>r</i> _B <i>m</i> _B), <i>dap</i> D8, <i>lac</i> Y1, <i>gln</i> V44, Δ(<i>gal-uvr</i> B)47, <i>tyr</i> T58, <i>gyr</i> A29, <i>Ton</i> A53Δ(<i>thy</i> A57)]	Stratagene
<i>E. coli</i> MC4100	F- <i>ara</i> D139, Δ <i>lac</i> U169, <i>rps</i> L, <i>rel</i> A, <i>thi</i> A, <i>Mot</i> ⁻	R. Kolter
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>omp</i> T, <i>r</i> _B <i>m</i> _B	Novagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>rec</i> A, <i>end</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> 1, <i>hsd</i> R-17, <i>sup</i> E44, <i>rel</i> A1, <i>lac</i> [F' <i>pro</i> AB, <i>lac</i> ^q ZΔM15, Tn10]	Stratagene
<i>E. coli</i> ZK796	<i>tol</i> C::Tn10	R. Kolter
<i>E. coli</i> X8605	F ⁻ , <i>trp</i> R, Δ(<i>lac</i>)U169, <i>strp</i> A, Δ(<i>ton</i> B <i>lac</i> P)	Guarente y Beckwith, 1978

Tabla 2. Plásmidos y vectores utilizados en esta Tesis. Los números en superíndice se usan para identificar los plásmidos usados en los experimentos de transportadores heterólogos y de proteínas quimeras.

Plasmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pHC79	Cosmidio de propósito general. Amp ^r Tet ^r	Hohn & Collins, 1980
pACYC184	Plásmido de propósito general. Cm ^r Tet ^r	Chang & Cohen, 1978
pSC101	Plásmido de número bajo de copias. Tet ^r	Cohen <i>et al.</i> , 1973
pBAD33	Plásmido derivado de pACYC184 que permite modular la expresión transcripcional de genes. Cm ^r	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pJAM434 ¹	Plásmido que tiene los genes para la producción de microcina activa. Construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> . Amp ^r	Wilkens <i>et al.</i> , 1997
pJAM229 ²	Plásmido derivado de pJAM43. Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido respecto a pJAM434. Produce microcina activa. Amp ^r	Wilkens <i>et al.</i> , 1997
pJRS1 ³	Derivado de pJAM229. Contiene una delección en el gen <i>mceF</i> . Amp ^r	Wilkens <i>et al.</i> , 1997
p4S-12	Derivado de pJAM434. Posee los genes <i>mceABCDEF</i> . Amp ^r	Lagos <i>et al.</i> , 2001
pJEM15 ⁴	Derivado de pJAM229. Posee doble copia del gen <i>mceF</i> . Amp ^r	Wilkens <i>et al.</i> , 1997
p157	Derivado de pT7-7 que lleva el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>NdeI-EcoRI</i> de 0.3 kb Amp ^r	Lagos <i>et al.</i> , 1999
np220 ⁵	pJAM434 <i>mceA::Tn5</i> . Amp ^r Kn ^r	Lagos <i>et al.</i> , 2001
np108 ⁶	pJAM434 <i>mceG::Tn5</i> . Amp ^r Kn ^r	Lagos <i>et al.</i> , 2001
np203 ⁷	pJAM434 <i>mceH::Tn5</i> . Amp ^r Kn ^r	Lagos <i>et al.</i> , 2001
pHK22 ⁸	Derivado de pACYC184. Posee un fragmento <i>Sall-HindIII</i> del plásmido pColV-K30 que codifica los genes de colicina V (<i>cvi</i> , <i>cvaABC</i>) Cm ^r	Gilson <i>et al.</i> , 1987
pHK22-4 ⁹	pHK22 <i>cvaB::Tn5</i> . Cm ^r Kn ^r	Gilson <i>et al.</i> , 1987
pHK22-6 ¹⁰	pHK22 <i>cvaC::Tn5</i> . Cm ^r Kn ^r	Gilson <i>et al.</i> , 1987
pHK22-8 ¹¹	pHK22 <i>cvaA::Tn5</i> . Cm ^r Kn ^r	Gilson <i>et al.</i> , 1987
pLY21 ¹²	Derivado de pACYC184 contiene los genes <i>cvaC</i> y <i>cvi</i> . Cm ^r	Gilson <i>et al.</i> , 1987
pA1 ¹³	Derivado de p4S-12. Lleva los genes <i>mceABCDEFGHIJ</i> . Amp ^r	Este trabajo
pB40 ¹⁴	Derivado de p4S-12. Lleva los genes <i>mceABCDEIJ</i> . Amp ^r	Este trabajo
pC1 ¹⁵	Derivado de p4S-12. Lleva los genes <i>mceABCDEFGHIJ</i> . Amp ^r	Este trabajo

(continúa)

(continuación)

pC1220	Derivado de np220 que contiene un fragmento de 3.4 kb <i>SacI</i> - <i>ApaI</i> del plásmido pC1 Lleva los genes <i>mceBCDEGHIJ</i> . <i>Amp^r</i> <i>Kn^r</i>	Este trabajo
pJAC1-7 ¹⁶	Derivado de pSC101. Lleva un fragmento amplificado en dos etapas que codifica para la microcina con péptido líder de la colicina V. <i>Tet^r</i>	Este trabajo
pJAC2-12 ¹⁷	Derivado de pSC101. Lleva un fragmento amplificado en dos etapas que codifica para la colicina V con péptido líder de la microcina. <i>Tet^r</i>	Este trabajo
Mce-sin PL	Derivado de pBAD33. Tiene el gen <i>mceA</i> sin la secuencia correspondiente al péptido líder de la microcina. <i>Cm^r</i>	Este trabajo
Mce-con PL	Derivado de pBAD33. Tiene el gen <i>mceA</i> . <i>Cm^r</i>	Este trabajo

Amp^r ampicilina, *Kn^r* kanamicina, *Cm^r* cloramfenicol, *Tet^r* tetraciclina.

2. MÉTODOS.

Medios de cultivo.

Caldo Luria. Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 3,5 mM final. Se usó para el crecimiento de todos los clones de *E. coli*.

Medio SOB. Bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5,0 g/l, NaCl 0,5 g/l KCl 2,5 mM. Se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5N (~0,2 ml/l).

Medio SOC. Se añadió al medio SOB estéril 20 ml de una solución estéril de glucosa 1 M. Esta solución se preparó disolviendo 18 g de glucosa para un volumen total de 100 ml de solución y fue esterilizado por filtro de 0,22 μ m.

Medio mínimo (M9). Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l. Se suplementó con CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 μ g/ml, casaminoácidos 1 mg/ml, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v. Las cepas que portan el plásmido pBAD33 se cultivaron en medio mínimo completo al que se agregó además 5 aminoácidos que no son aportados por los casaminoácidos: triptófano, cisteína, glutamina, asparagina y tirosina a una concentración final de 50 μ g/ml. Para inducir la expresión del promotor P_{BAD} se utilizó arabinosa (0,2% p/v) en vez de glucosa.

Placas de agar LB. Se prepararon las placas con el medio caldo Luria y con 1,5% o 1,0% de agar.

Placas de césped. Sobre placas de agar LB se esparcieron 3 a 5 ml de agar LB al 0,7% en que se incluyó 300 μ l de un cultivo bacteriano crecido toda la noche.

Las células bacterianas que portan plásmidos recombinantes se crecieron en placas o en medio líquido suplementado con antibióticos, cuya concentración final es la siguiente: ampicilina 100 μ g/ml, cloranfenicol 50 μ g/ml, tetraciclina 10 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml.

Detección y cuantificación de la actividad de la microcina E492 y colicina

V. Se detectó la actividad bactericida de la microcina purificada, depositando alícuotas de la muestra sobre un césped de una cepa bacteriana indicadora [BL21(DE3)]. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche. La actividad de la microcina se visualizó por la presencia de halos de inhibición de crecimiento de la cepa sensible y en algunos casos se midió el diámetro de los halos formados. La cuantificación de la actividad microcina de estas preparaciones se realizó determinando la máxima dilución de la muestra donde es posible observar un halo de inhibición de crecimiento bacteriano en el césped de la cepa sensible (Dilución Mínima Inhibitoria, Mayr-Harting *et al.*, 1972). Para diluir las muestras se utilizó metanol al 95%.

La detección de la actividad microcina o colicina V en colonias bacterianas se realizó sembrando las bacterias sobre placas de céspedes bacteriano. En este caso, para elaborar los céspedes respectivos se emplearon las siguientes cepas indicadoras de *E. coli*: BL21(DE3) sensible a la microcina y a la colicina

V; X8605 (mutante en el gen *tonB*) resistente a ambas bacteriocinas; p157 resistente a la microcina y sensible a la colicina V; ZK520 sensible a la microcina y resistente a la colicina V. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche, para luego determinar la actividad de la microcina y/o la colicina V, observando la presencia de halos de inhibición de crecimiento de las cepas sensibles y eventualmente se midió el diámetro de los halos formados.

Detección de actividad intracelular de microcina. Un cultivo bacteriano (20 ml) crecido hasta una $DO_{600} = 0,7$ se centrifugó por 5 min a 5.000 x g. El "pellet" bacteriano obtenido se lavó con STE (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM) para luego resuspender las células en 100 μ l de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM) al que se agregó una 'punta de espátula' de lisozima. Después de incubar por 10 min en hielo, se hirvió la mezcla por 1 min a baño maría. Con el fin de obtener una fracción que contenga microcina y poca concentración de proteínas bacterianas, la mezcla se centrifugó por 5 min en la microfuga a 14500 x g. El sobrenadante se tituló colocando 4 μ l de cada dilución sobre césped de la cepa sensible, la cual se dejó incubando toda la noche a 37°C.

Purificación de la microcina E492 extracelular. A un litro de medio de cultivo mínimo se agregó 3-5 ml de un cultivo crecido toda la noche y se dejó crecer a 37°C con una agitación de 80-100 rpm, hasta una $DO_{600} = 0.7$. El cultivo se centrifugó a 8.000 rpm por 30 min en un rotor GSA. El sobrenadante, sometido

a una presión negativa se pasó por una columna de extracción en fase sólida Sep Pak C₁₈, activada previamente con 3 ml de metanol al 95% y 3 ml de agua desionizada. En esta matriz quedó retenida la microcina y algunos contaminantes. La columna se lavó con 3 ml de metanol al 60% para retirar los contaminantes que tienen un pigmento de color amarillento, y a continuación la microcina se eluyó con 3 ml de metanol al 95%.

Purificación de la microcina E492 desde extractos celulares. La preparación de microcina a partir de extractos celulares (intracelular) no es más que el enriquecimiento de la fracción celular obtenida en el procedimiento para detectar la actividad intracelular de microcina empleando columnas Sep-Pak. Brevemente, las cepas se cultivaron en un litro del mismo medio descrito para el caso de la purificación de microcina extracelular y las células se cosecharon a la misma DO. Después de centrifugar el cultivo, el "pellet" de células (aproximadamente 5 ml) se resuspendió en un amortiguador (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y MgCl₂ 10 mM) y se dejaron en baño maría a ebullición por 20 min. La suspensión se agitó vigorosamente en un vortex, cada 5 min, mientras transcurría el calentamiento. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 2.000 x g para descartar la mayor parte de los restos celulares, y a continuación se tomó solamente el sobrenadante para hacerlo pasar por una columna Sep-Pak C₁₈ previamente activada con agua y metanol. El procedimiento de elución de la microcina de extractos celulares se realizó de la misma forma que para la purificación de la microcina extracelular.

Purificación de la colicina V extracelular. Se siguió el protocolo descrito por Fath y colaboradores (1994). Se utilizó un cultivo crecido en medio con 0.1 mM de dipiridil (quelante de hierro) y antibióticos para diluirlo con mismo medio fresco en una proporción de 1:10. El cultivo se dejó crecer hasta una $DO_{600}=0,7$ y luego se obtuvo el sobrenadante por centrifugación. Este se esterilizó por filtración, y posteriormente se trató con TCA a una concentración final de 10%. Después de incubar por 45 min en hielo, las muestras se centrifugaron a 30.000 x g por 15 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en Tris-HCl pH 9,5 para neutralizar al TCA. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida agregando previamente a las muestras el amortiguador de carga.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para microcina y/o colicina V. Los geles se prepararon como está descrito por Schägger y von Jagow (1987) que separa proteínas de un rango de masa molecular de 1 a 100 kDa. El gel separador contenía: 16.5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento) Tris-HCl 1,0 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%, el gel espaciador, 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento) Tris-HCl 1,0 M pH 8,5, SDS 0,1% y el gel concentrador, 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento) Tris-HCl 1,0 M pH 8,5, SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se agregó 0,033% de persulfato de amonio y 2,2 mM de TEMED.

La solución de corrida de estos geles para el cátodo es Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1%, y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. Los geles se

corrieron sometiéndolos a un voltaje de entre 20 y 200 V usando una fuente de poder EC-420 de EC Apparatus Corporation o Power Pac 300 de BioRad.

El marcador de peso molecular empleado en los geles de poliacrilamida para hacer experimentos de western blot estaba preteñido con rojo fenol y tiene fragmentos de los siguientes pesos moleculares aparentes: 175, 83, 62, 47, 32, 25, 16.5 y 6.5 kDa.

Marcación y preparación de la microcina y/o colicina V con fluorescamina.

El método de marcación de péptidos con fluorescamina se describe en Rangland y colaboradores (1974). Para ello se concentraron 300 μ l (o 1 ml para el caso de la microcina de extractos celulares) del eluido de la columna Sep Pak por evaporación al vacío, hasta un volumen de 10 μ l. Se agregó 4 μ l de solución borato (0,4 M pH 9,0), luego 8 μ l de fluorescamina (una 'punta de espátula' disuelta en 1 ml de DMSO), y 7 μ l de amortiguador de carga 4x (glicerol al 40%, Tris-HCl 50 mM pH 7,6, SDS 10%, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,04% (w/v)). La mezcla se calentó a baño maría por 3 min y se cargó 10 μ l en cada pocillo del gel.

Como marcador de peso molecular se usó Sigma MW-SDS, el cual contiene mioglobina de 16,950 Da y fragmentos de mioglobina de 14,440, 8,160, 6,210, 3,460 y 2,210 Da. Estas proteínas se marcaron con fluorescamina de la misma manera que las muestras. Las bandas de proteínas se visualizaron en un

transiluminador UV. Inmediatamente después se tomaron fotografías con película instantánea Polaroid 667.

Preparación de anticuerpo policlonal anti-microcina. Se preparó un anticuerpo policlonal que reacciona con la microcina. Para preparar el anticuerpo policlonal se empleó como antígeno un péptido sintético de 23 aminoácidos que corresponde al extremo C-terminal de la microcina, cuya secuencia es CSWNGSGSGYNSATSSSGSG. El péptido sintético se acopló a Blue Carrier (Hemocianina, BioSonda S.A.) con glutaraldehído. Se inocularon a dos conejos en forma subcutánea e intraepidérmica con 1 ml del antígeno (500 μg en PBS y coadyuvante de Freund completo). A las dos y a las cuatro semanas, se volvieron a inocular con 500 μg del antígeno, pero utilizando coadyuvante de Freund incompleto. Luego de analizar el anticuerpo extrayendo una pequeña muestra, fue necesario aplicar un refuerzo con el antígeno (800 μg del antígeno utilizando coadyuvante de Freund incompleto). La sangría final se realizó a los 72 días después de que los conejos recibieron la primera inmunización. Tanto el suero pre-inmune como los sueros inmunes se evaluaron por ELISA.

Purificación de anticuerpo policlonal anti-microcina. Cualquier preparación de anticuerpos policlonales contiene una mezcla de anticuerpos séricos contra varios antígenos bacterianos, debido a que los conejos no viven en condiciones absolutamente asépticas. Esto ocasiona que los experimentos de western blot

de lisados bacterianos presenten un fondo constituido por varias proteínas además de la proteína correspondiente al antígeno en estudio. Este fenómeno es usual cuando se trabaja con anticuerpos policlonales y antígenos bacterianos. Para separar los IgG específicos anti-microcina de los demás IgG anti-proteínas bacterianas, se utilizó el método descrito por Harlow y Lane (1988). El procedimiento implica realizar una electroforesis en poliacrilamida del antígeno puro. A continuación se hizo un western blot incompleto, ya que después de la incubación con el anticuerpo primario y del lavado, se cortó una tira de la membrana de nitrocelulosa y con ella se desarrolló el procedimiento inmunológico hasta el final para localizar la posición del antígeno en la membrana. A continuación se alineó la tira de nitrocelulosa con el resto de la membrana y se cortó en pedazos pequeños el área de la membrana que contiene el antígeno y el anticuerpo primario. Los trozos de membrana se incubaron en glicina 100 mM (pH 2,5) por 10 min, luego se descartó este amortiguador y se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Los anticuerpos disueltos en Tris estaban listos para su uso. Se utilizó el anticuerpo purificado para comprobar la especificidad de éste en su reconocimiento de la microcina. La mayoría de los experimentos de western blot se realizaron con anticuerpo no purificado, ya que el título del anticuerpo purificado es bajo y por tanto dificulta reconocer cantidades pequeñas de antígeno.

Western blot. Electrotransferencia. Después de realizar un SDS-PAGE, se retiró el gel de los vidrios e inmediatamente se construyó el sándwich para la

transferencia colocando 3 papeles filtro, seguidos del gel, de la membrana de nitrocelulosa y por último de otros tres papeles filtro. La membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) se empapó completamente en agua y luego en amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol al 20%), así como las hojas de papel filtro y las esponjas antes de montar la transferencia.

La transferencia se realizó por 2 h a 100 v y a -20°C empleando el amortiguador de transferencia enfriado previamente.

Desarrollo inmunológico. La membrana se bloqueó con BSA al 3% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM) por 1 h a temperatura ambiente, luego se traspasó a una solución de BSA al 1% en PBS que contiene el anticuerpo primario. La membrana permaneció con el anticuerpo primario 2 h con agitación y a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con amortiguador TS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), la membrana se incubó por 2 h en BSA al 1% en TS con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. La dilución empleada del anticuerpo policlonal anti-microcina fue de 1:1000 y del anticuerpo secundario de acuerdo a las instrucciones del fabricante (1:30.000).

Para realizar el revelado, se colocó la membrana en 10 ml de amortiguador para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM), complementado con 33 μl de BCIP (0.5 g del reactivo disuelto en 10 ml de

dimetilformamida al 100%) y 66 μ l de NBT (0.5 g del reactivo disuelto en 10 ml de dimetilformamida al 70%). Al cabo de algunos minutos de agitación aparecieron las bandas y posteriormente la reacción se detuvo con abundante agua destilada.

Inmuno Slot blot. Este método consistió básicamente en hacer pasar a través de los orificios de la cámara de slot blot de 0,5 a 20 ml de sobrenadantes de cultivos bacterianos. Previamente se colocó una membrana de nitrocelulosa en medio de la cámara de slot blot. Los sobrenadantes se esterilizaron empleando un filtro Acrodisk con poro de 0,22 μ m para evitar que las células queden adheridas a la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se sometió al mismo desarrollo inmunológico descrito para el western blot.

Ensayo de ELISA. Se activó la placa incubando 50 μ l de antígeno toda la noche a 4°C. Luego se bloqueó con BSA al 1% azida de sodio al 0,02% en PBS durante 1 h. Después de lavar se agregó el anticuerpo en diluciones seriadas con BSA-azida en PBS y se incubó por 2 h. Se lavó con PBS-Tween-20 al 0,1% para luego incubar por 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti Ig-G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina,. Se volvió a lavar con PBS-Tween-20 al 0,1%, para agregar en seguida el sustrato PNPP (1 mg/ml en tampón bicarbonato de sodio 0,05 N, 1 mM MgCl₂, pH 9,6) y se incubó durante

30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con NaOH 3 N y se leyó la absorbancia a 405 nm.

Fraccionamiento subcelular. El fraccionamiento subcelular se realizó empleando un método de choque osmótico, descrito en Skvirsky y colaboradores (1991) con algunas modificaciones. De acuerdo a este procedimiento, un cultivo se centrifugó para luego resuspender el precipitado de células resultante en amortiguador de esferoplastos frío (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM y sacarosa 0,5 M). Después de incubar en hielo por 15 min esta suspensión fue nuevamente centrifugada, el sobrenadante obtenido se descartó y las células se llevaron a temperatura ambiente por 15 min. Luego las células se resuspendieron en agua destilada fría y agitadas vigorosamente. Este procedimiento produce un choque osmótico, y por tanto, libera el contenido periplasmático. La mezcla se centrifugó para separar los restos celulares del periplasma, el cual fue colectado y guardado. El precipitado conteniendo las células sin periplasma se resuspendió en amortiguador de esferoplastos frío al que se agregó lisozima para digerir la pared celular y se dejó incubando en hielo. A continuación se centrifugó la suspensión brevemente para obtener un precipitado de esferoplastos. Para lisar los esferoplastos, se resuspendieron en una solución constituida por Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, DNAsa 100 µg/ml y RNAsa 10 µg/ml y posteriormente se sometieron a 5 ciclos de sonicación a 12 W por 30 s con intervalos de 1 min en hielo para dejar que se enfríe la mezcla. Los esferoplastos que quedaron intactos a pesar de la

fosfatasa alcalina (localizada en el periplasma), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (localizada en el citoplasma) y la NADH oxidasa (localizada en la membrana citoplasmática). Para el ensayo de la fosfatasa alcalina se utilizó un amortiguador (Tris-HCl 1,275 M pH 8,0), el sustrato (p-nitrofenilfosfato 0,15 mM) y la fracción a estudiar. La reacción se siguió en el tiempo midiendo el incremento de absorbancia a 410 nm resultante de la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato en p-nitrofenol a 25°C. La reacción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se llevó a cabo en un amortiguador (Tris-HCl 4,3 mM pH 7,8 con MgCl₂ 2,57 mM), al que se añadió la coenzima NADP (0,3 mM), el sustrato glucosa-6-fosfato (5 mM) y la fracción proteica. La reacción se incubó a 30°C y la velocidad de reacción se determinó observando el incremento de absorbancia a 340 nm resultante de la reducción del NADP. Por último, se realizó la reacción de la NADH oxidasa mezclando el NADH (0,2 mM) con el lisado en un amortiguador (fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 a 30°C). Se determinó el transcurso de la reacción leyendo el descenso de la absorbancia a 340 nm. En todas las reacciones se hicieron los controles respectivos sin enzima y sin sustrato, y se utilizó el espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con arreglo de diodos para leer las absorbancias.

Secuenciación de DNA. El DNA templado se obtuvo purificando productos de amplificación por PCR con partidores correspondientes al gen a analizar y al transposón (Tn1) empleando el kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System según el protocolo descrito por el fabricante. Para secuenciar el producto

sonicación, se separaron por centrifugación a 2.000 x g y finalmente descartaron. Se colectó el sobrenadante, y luego se lo sometió a una centrifugación por 60 min a 105.000 x g para separar las membranas del citoplasma. El sobrenadante que constituye la fracción citoplásmica se retiró cuidadosamente para su análisis posterior y el precipitado se resuspendió en un amortiguador que posee Tritón X-100 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM y Triton X-100 al 2%) por 45 min. Este detergente solubiliza solamente la membrana interna, la cual se separa de la fracción de membrana externa centrifugando una última vez por 90 min a 105.000 x g. Así, el sobrenadante constituye la fracción de membrana interna solubilizada por el Tritón y el precipitado es la fracción de membrana externa.

La fracción de periplasma se concentró por evaporación en vacío antes de aplicarse en geles de poliacrilamida. La fracción de membrana interna y/o de citoplasma se concentró por precipitación con acetona. Cada una de estas fracciones se mezclaron con igual volumen de acetona fría y se dejaron a -20°C por 30 min. A continuación la mezcla se centrifugó para precipitar las proteínas, las que se secaron al vacío una vez que la acetona fue retirada. Este procedimiento permitió contar con proteína concentrada lista para ser mezclada con amortiguador de carga y ser sometida a SDS-PAGE.

Para verificar el correcto fraccionamiento subcelular, las fracciones obtenidas se sometieron a ensayos con enzimas marcadoras. Se utilizaron tres proteínas: la

amplificado y purificado se empleó el kit PCR dsDNA Cycle Sequencing System. El método de incorporación de marca radiactiva a la reacción de secuencia se realizó empleando el partidor Tn1 marcado con $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ y T_4 polinucleótido quinasa

Aislamiento y purificación de DNA plasmidial bacteriano (miniprep). El DNA plasmidial se extrajo según el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y colaboradores (1989). El método consiste en centrifugar 4.5 ml de un cultivo bacteriano crecido por toda la noche en medio LB o medio mínimo. El precipitado bacteriano se resuspendió en 200 μl de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Después de dejar por 5 min a temperatura ambiente se agregó 400 μl de una solución fresca de SDS/NaOH (SDS 1% y NaOH 0,2 M) y se mezcló invirtiendo los tubos 10 veces. A continuación se agregaron 80 μl de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y se mezcló suavemente por inversión. Esta solución se dejó a -20°C por 15 min, para luego centrifugar a 14.500 x g. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo previamente rotulado, y se agregó 250 μl de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas contaminantes. Cada tubo se agitó en el vortex por 10 s y se centrifugó por 5 min en una microcentrífuga. Luego se procedió a extraer la fase acuosa (superior) para ponerla en un tubo limpio. Los restos de proteínas y fenol se extrajeron añadiendo 250 μl de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1). Posteriormente se extrajo la fase superior que contiene el DNA a la cual se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol y se

dejó a -20°C por 15 min para precipitar el DNA. El DNA precipitado por centrifugación se lavó con etanol al 70% y posteriormente se dejó secar el precipitado en estufa (37°C) o en Speed Vac. El precipitado de DNA se disolvió en 30-40 μl de agua nanopura usando vortex.

Electroforesis en geles de agarosa. *Geles para DNA plasmidial.* Esta electroforesis se llevó a cabo horizontalmente, usando el amortiguador TEA (Tris-HCl 40 mM pH 8,1, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 2 mM). La concentración de agarosa varió entre 1.0 y 2.0% dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La muestra se preparó mezclándola con amortiguador de carga (glicerol al 50%, EDTA 50 mM, xilén cianol 1 mg/ml, azul de bromofenol 1,5 mg/ml) antes de su incorporación a los pocillos del gel. La electroforesis se realizó con un potencial de corriente eléctrica de 80-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 $\mu\text{g/ml}$) y se puso sobre un transiluminador para observar las bandas de DNA.

Geles para RNA total. Se logró la visualización del RNA total mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa especialmente elaborados para RNA. Se disolvió 1 g de agarosa en 90 ml de agua DEPC y se agregaron 10 ml de MOPS 10X cuando la solución estuvo tibia. La preparación de la muestra consistió en resuspender el RNA en formamida desionizada (12,5 μl), MOPS 10X (2,5 μl) y agua DEPC (10 μl). Las muestras se calentaron a 65°C por 10 min y se agregó amortiguador de carga (2,5 μl de glicerol al 50%, EDTA 50 mM,

xilén cianol 1 mg/ml, azul de bromofenol 1,5 mg/ml). Se usó MOPS 1X como amortiguador de corrida. La electroforesis se realizó a 100 v durante 1 h y luego se tiñó el RNA con bromuro de etidio. Las bandas de RNA se observaron en el transiluminador UV.

Digestión de DNA con enzimas de restricción. En un volumen total de 20 μ l se mezcló el amortiguador comercial de la enzima correspondiente, el DNA plasmidial (10-100 ng), la enzima de restricción (3-5 U) y ribonucleasa A. Las reacciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima para cada enzima por 2 h (o 14 h para el caso de *Xho*I). La reacción se detuvo agregando la mezcla del amortiguador de carga para hacer correr geles de agarosa o agregando 200 μ l de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) para precipitar posteriormente el DNA de acuerdo al protocolo descrito para la miniprep. Este DNA debe estar libre de proteínas para las reacciones de ligación o desfosforilación.

Desfosforilación. Para evitar el re-ligamiento del vector cortado con la misma enzima de restricción, se procedió a desfosforilar los extremos de éste. La reacción de desfosforilación consistió en incubar a 37°C por 2-12 h una mezcla constituida por amortiguador de desfosforilación (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 0,1 mM), el DNA a desfosforilar (1 picomol) y la enzima CIAP diluida (7 u) en el amortiguador de dilución (Tris-HCl 25 mM pH 7,6; MgCl₂ 1 mM; ZnCl₂ 0,1 mM y glicerol al 50%) provisto por el fabricante.

Ligación de fragmentos de DNA. Antes de ligar los fragmentos de DNA se determinó la concentración de DNA del vector y del inserto por espectroscopía a 260 y 280 nm o por geles de agarosa comparando con estándares de concentración conocida. La relación de concentración entre el DNA del inserto y del vector fue de 3:1. En todo experimento de ligación se dejó un control que no llevaba inserto. La reacción de ligación se realizó mezclando el inserto, el vector, el amortiguador de la ligasa y la T4 DNA ligasa, para luego incubarla por toda la noche a 14°C. El producto de la ligación fue desalado por medio de una precipitación con etanol o empleando membranas Millipore de 0,025 µm de poro para prepararla para la electrotransformación.

Amplificación de fragmentos de DNA por PCR. *PCR de DNA plasmidial.* La reacción de amplificación se realizó mezclando DNA plasmidial (0,1-10 ng) con 2,5 o 5,0 µl de amortiguador de PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), 0,5-1,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1,0 µl de dNTPs 10 mM, 1,0-2,0 µl de cada partidor a una concentración de 25 pmol/µl y 2,5 U de Taq DNA polimerasa para un volumen final de 25 o 50 µl. Las condiciones estándares de la reacción fueron: 30 a 33 ciclos de 45 s a 94°C para la desnaturalización, 30 s a 55°C para el "annealing", y 1,5 min a 72°C para la elongación, seguidas por una elongación final a 72°C por 10 min. Los fragmentos más largos de 3 Kb se amplificaron usando el kit Elongase Amplification System de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con 30 ciclos (94°C por 30 s, 55-60°C por 30-35 s y 68°C por 1 min por cada Kb de amplificación). Los partidores empleados para la amplificación

Tabla 3. Partidores usados en la amplificación de fragmentos de DNA.

Nombre	Secuencia	Polaridad	Sitios de Restricción
JF	5'TTCCAAGGGTCGACTATTCTTTGTCAATGTTCTGA GCT 3'	Sentido	<i>Sall</i>
GR	5'AATAGTTCGGTCGACAGTCCTCA 3'	Antisentido	<i>Sall</i>
IR	5'AACGCATCCTGTGACACAAAATATAT 3'	Antisentido	<i>Sall</i>
PLCoIV1 ²	5'GAATTAGATTCTGTTTCTGGTGGTGGAGAGACCG ATCCAAATACTCA 3'	Sentido	-
PLCoIV2 ²	5'ACCACCAGAAACAGAATCTAATTCATTTAGAGTC AGAGTTCTCATATTACCTCCTAATTTCTCTCATTCTT AGCTCCA 3'	Antisentido	-
PPE1	5'CATATGCGTATGAATTCGCCGACTTGATGCCCAA TTAAGGTAGTTGACGTCTAATTAGGATTCC 3'	Sentido	<i>EcoRI</i>
RL3	5'GAAATTTTCAGGCAGAATTCTGGTGCAGTTGCA 3'	Antisentido	<i>EcoRI</i>
PLMce1 ³	5'GAATGAGAGAAATTAGTCAAAGGACTTAAATC TTGCTTTTGGTGCAGCTTCAGGGCGTGATATTGCG A 3'	Sentido	-
PLMce2 ³	5'GTCCTTAAGACTAATTTCTCTCATTCTTAGCTCCA TACAGCCTCCTTATTCATTTAGAGTCAGAGTTC 3'	Antisentido	-
cvi1	5'GACGTGGGGAATTCGGTTTTCCA 3'	Sentido	<i>EcoRI</i>
cvaC2	5'TTCTGTGTGGAATCCAATAACTGTT 3'	Antisentido	<i>EcoRI</i>
S1	5'TAAGCAACTGCAGAGGAGGAATTCACCATGGGAG AGACCGATCCAAATACTCAAC 3'	Sentido	<i>PstI</i>
R2	5' ATCCAAAAGCTTTTAACTACCACTACCGGA ACTGGATG 3'	Antisentido	<i>HindIII</i>
C1	5'TAAGCAACTGCAGAGGAGGAATTCACCATGGAGC TAAGAATGAGAGAAATTAG 3'	Sentido	<i>PstI</i>
RL1	5'CGGATAAAACATATGACATTACTTTTCAATTTGG 3'	Sentido	-
PEG	5'CACACTCCGAGGTCTCCGTCTGATGA 3'	Antisentido	-
PEH	5' CTATAACGAACGTCAGAAATGCCGTGATA 3'	Antisentido	-
G1	5' AGGGCCGACATATGAGTAACGGGAATGT 3'	Sentido	-
F1	5'CTTCTTGCCCATATGTTATTCATCCTCGAA 3'	Sentido	-
F2	5'TCCAGAGCGAAGCTTATTATGGACTATTGA 3'	Antisentido	-
H1	5' TAGAAAACAGACATATGAAATGGCGGGGA 3'	Sentido	-
Tn1	5'AGGTCACATGGAAGTCAGATCCTGGAAAA 3'	Sentido	-

¹ Sitios de restricción creados para clonamiento

² La secuencia del oligonucleótido indicada en negrilla corresponde a la secuencia del péptido líder de la colicina V (*cvaC*).

³ La secuencia del oligonucleótido indicada en negrilla corresponde a la secuencia del péptido líder de la microcina (*mceA*).

de los distintos segmentos están detallados en la Tabla 3. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el kit CONCERT Rapid PCR Purification System, para realizar posteriormente las reacciones de ligación.

PCR de colonia. La amplificación de fragmentos de DNA utilizando directamente colonias bacterianas como fuente de DNA templado se realizó introduciendo una pequeña modificación al procedimiento descrito para hacer PCR a partir de DNA plasmidial. Se mezclaron los componentes de la reacción de PCR como se ha descrito anteriormente excepto que no se añadió la polimerasa ni el DNA plasmidial. A continuación se resuspendió una colonia bacteriana fresca en la solución y se colocó en el termociclador a 99°C por 10 min. Después de enfriada la mezcla, se agregó la Taq DNA Polimerasa y se prosiguió según el protocolo de amplificación de DNA plasmidial.

Aislamiento y purificación de RNA bacteriano. Se utilizó RNA total bacteriano para los experimentos de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR). El RNA bacteriano se tomó de cultivos crecidos toda la noche o hasta $DO_{600}=0,4$. Una vez agrupadas, las bacterias se resuspendieron en una solución denominada Z6 (clorhidrato de guanidina 8 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,0, EDTA 20 mM) complementada con β -Mercaptoetanol frío (al 10%). A la mezcla se agregó fenol:cloroformo saturado en agua y después de agitar fuertemente en un vortex se dejó en hielo por 20 min. Las proteínas y el DNA se precipitaron centrifugando la solución a 13.000 rpm por 30 min en una microfuga de mesón.

La fase acuosa se trasladó a un tubo nuevo y se añadió 1/20 del volumen de ácido acético 1 M (en agua DEPC) y 0,7 volúmenes de etanol al 95% frío. Se dejó a -20°C por 15 a 20 min. El RNA se sedimentó por centrifugación a 13.000 rpm a 4°C y se lavó con etanol al 70% (con agua DEPC) frío. Luego de secarlo al aire se disolvió en agua DEPC y se calentó a 65°C por 10 min. Inmediatamente después se enfrió en hielo.

Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR). Se realizó un tratamiento con DNAsa I (libre de RNAsa) para retirar completamente todo el DNA que pudo haber sido co-purificado mediante el procedimiento de purificación de RNA total. Varias alícuotas de RNA se trataron con 10 U de DNAsa I en una solución de MgCl_2 2,5 mM durante 30 min a 25°C . La reacción se detuvo con EDTA 2,27 mM y calentamiento a 65°C durante 15 min. La mezcla resultante se incubó con el partidador antisentido durante 5 min a 75°C y luego se realizó la transcripción reversa empleando 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV de Promega y dNTP 400 μM durante 1 h a 42°C . La reacción se calentó 10 min a 65°C , para desnaturar la enzima. La etapa de PCR se realizó empleando como templado una alícuota de 5 μL de la reacción de transcripción reversa, MgCl_2 1 mM, dNTP's 200 μM , amortiguador de PCR 1X, 25 pmoles de cada partidador, 2,5 U de Taq DNA polimerasa utilizando el siguiente programa: un ciclo de 94° por 6 min, 55° por 2 min y 72° por 30 min, seguido de 25 ciclos rápidos de 94° por 45 s, 55° por 30 s, y 72° por 90 s y una extensión final de 10 min a 72°C .

Preparación de células electro-competentes. Estas células se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial, obtenido inoculando en medio SOB fresco 1 ml de un cultivo crecido de noche en 100 ml de medio fresco. Las células se colectaron a una DO_{550} de 0,75 ($3-6 \times 10^8$ cel/ml) en tubos de centrifuga fríos y se lavaron dos veces con glicerol al 10% frío y usando un vortex para resuspenderlas en el glicerol. Al cabo de los lavados, las células se mezclaron con las pocas gotas de sobrenadante que quedan en el tubo después de la última centrifugación. A continuación se midió el volumen de la suspensión celular y se determinó la DO_{550} diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol al 10%. Luego se ajustó el volumen del "pellet" celular con glicerol al 10% para llegar a una DO_{550} final de 200-250/ml. Las células se alicuotaron para luego guardarlas a -80°C o se usaron directamente para la electroporación.

Transformación por electroporación. Se utilizó un equipo BioRad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. El aparato se preparó colocando el voltaje a 2.500 V, la resistencia a 200 Ohms y la capacitancia a 25 μF . Las células, las cubetas y el portacubetas se dejaron en hielo antes de proceder a la transformación. Se mezclaron 20 μl de células con 1-2 μl de DNA plasmidial puro en un tubo y se trasladó la mezcla a la cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación de los electrodos. La cubeta se colocó en el portador de cubetas y se apretaron los dos botones que tiene el aparato hasta escuchar la señal. Inmediatamente

después se agregó 1 ml de medio SOC estéril a la cubeta con las células electroporadas y luego se las incubó a 37°C por 1 h. Las células transformadas se plaquearon en un medio selectivo en dos concentraciones de células: 1x y 9x.

Transformación con genes de microcina y colicina V. Los experimentos de transportadores heterólogos fueron realizados transformando células competentes *E. coli* VCS257 que ya llevaban los plásmidos del sistema de la microcina, con los plasmidios de la colicina V (pHK22, pHK22-4, pHK22-6, pHK22-8, pLY21, ver Tabla 2) y a su vez las células *E. coli* MC4100 que ya portaban los plásmidos de la colicina V fueron transformadas con los plásmidos de la microcina (pJAM434, pJAM229, pJRS1, pC1, pJEM15, pA1, np220, np108, np203, pB40, ver Tabla 2). Ambos grupos de plásmidos son compatibles entre si ya que los de la microcina tienen un origen de replicación ColE1, y los de la colicina V el p15A. La figura 2 esquematiza el procedimiento de transformación empleado en los experimentos de transportadores heterólogos.

Construcción de plásmidos con mutaciones dobles y triples en los genes transportadores. La construcción de los plásmidos pA1, pB40 y pC1 (Tabla 2) está bosquejada en la figura 3. Para construir el plásmido pA1 se amplificó por PCR con los partidores IR y JF un fragmento de DNA que comprende los genes *mceIJ*, usando el plásmido pJAM434 como templado. Luego este producto de amplificación fue digerido con *SaII* para unir posteriormente al plásmido p4S-12

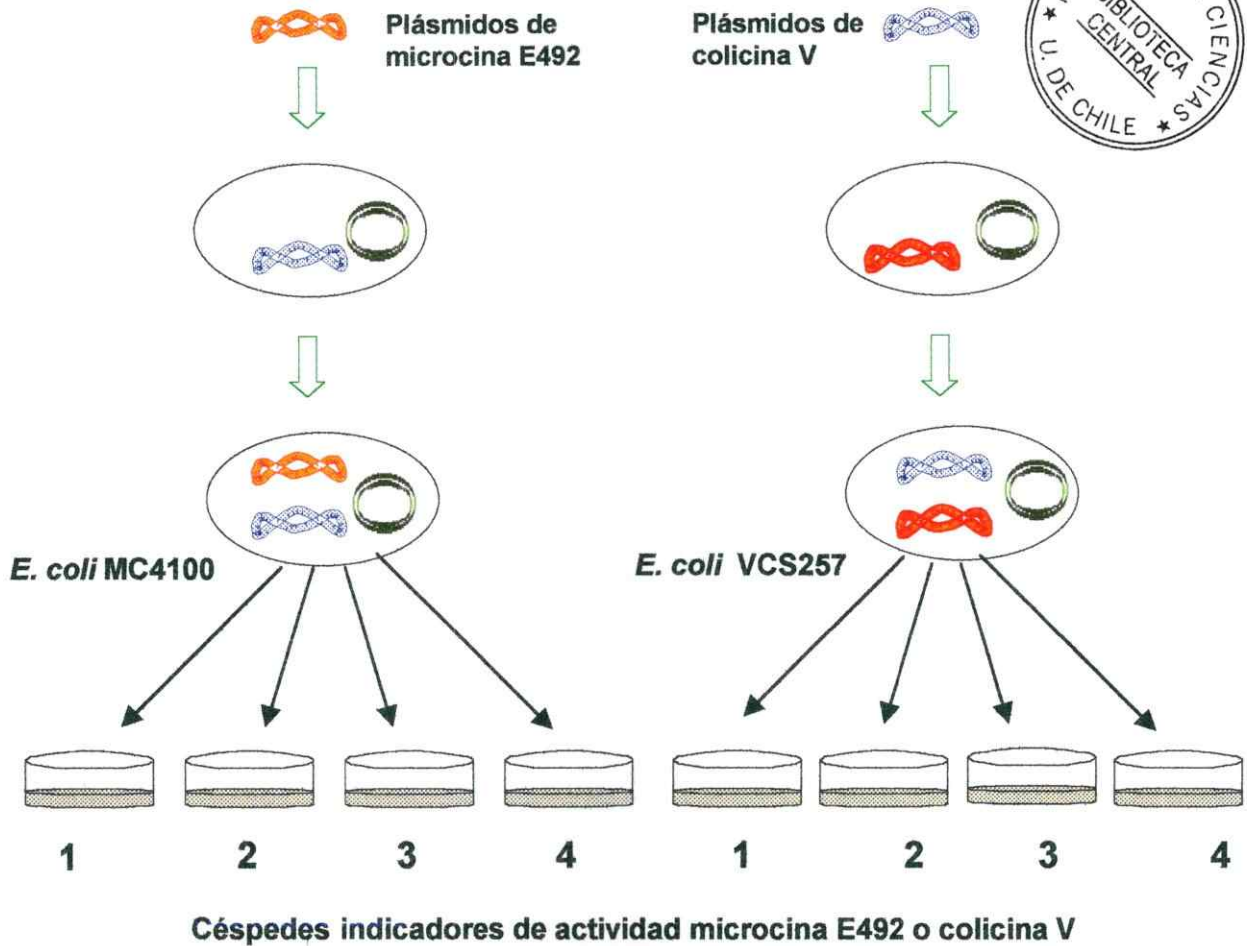


Figura 2. Esquema de las transformaciones realizadas para combinar los sistemas genéticos de la microcina E492 (en naranja) y la colicina V (en azul). Céspedes: 1. BL21, sensible a ambas bacteriocinas; 2. X8605, resistente a ambas bacteriocinas; 3. p157, resistente a microcina y sensible a colicina V; 4. ZK520, sensible a microcina y resistente a colicina V.

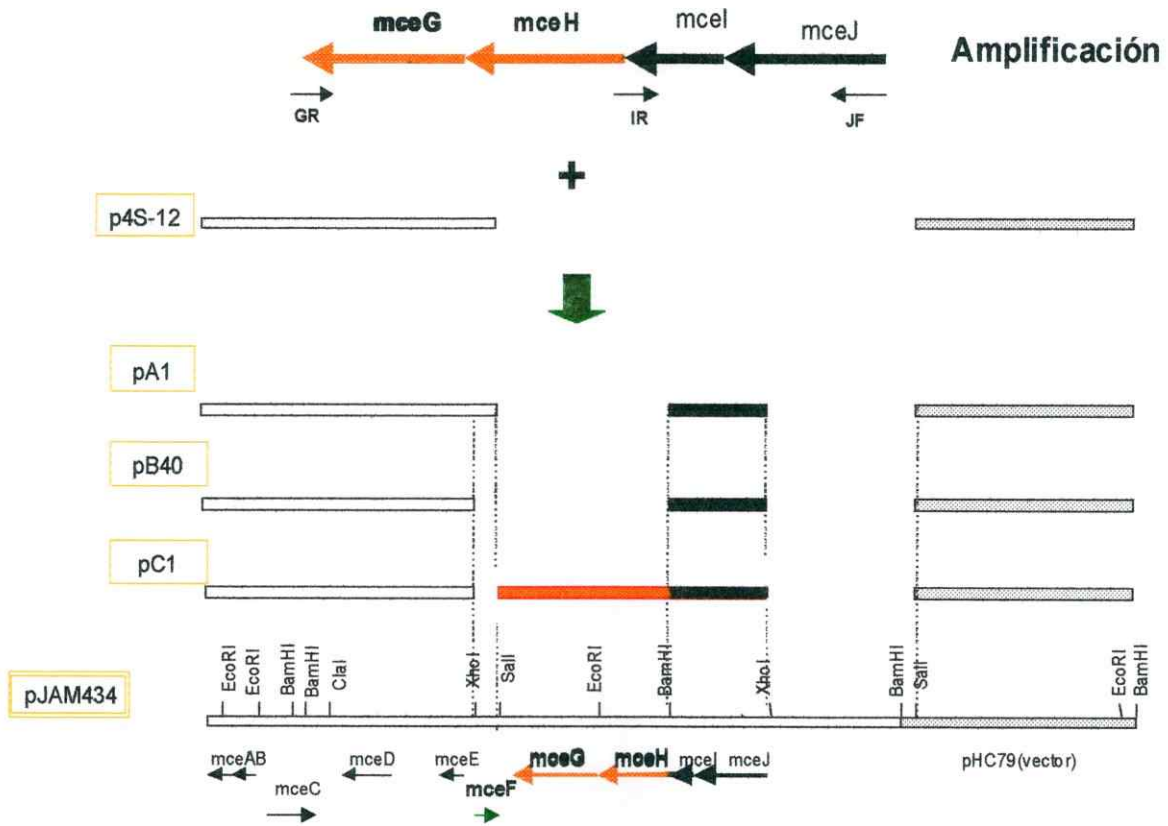


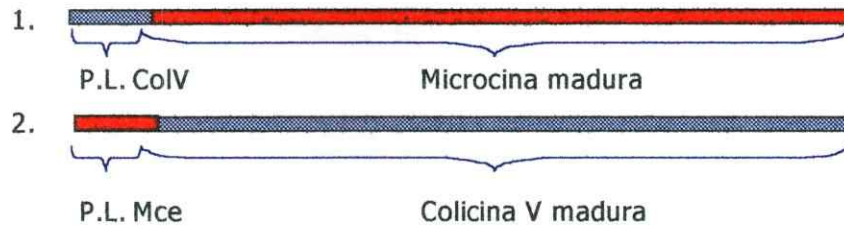
Figura 3. Construcciones realizadas para obtener doble y triple mutantes en los genes transportadores de la microcina E492.

el cual fue previamente digerido con la misma enzima de restricción. El plásmido pB40 fue construido en forma similar, mediante la ligación del fragmento amplificado con los partidores IR y JF al plásmido p4S-12 digerido con *Sall* y *XhoI*. La doble digestión de p4S-12 permite que el segmento *XhoI-Sall* de 1.2 Kb que codifica el gen *mceF* sea liberado. El plásmido pC1 se construyó insertando un fragmento amplificado de 5.7 Kb usando los partidores GR y JF, en p4S-12 digerido con *XhoI* and *Sall*. El fragmento GR-JF lleva los genes *mceGHIJ* que son comandados por un promotor localizado detrás del gen *mceJ*. El plásmido pC1220 contiene una inserción del transposón Tn5 en el gen *mceA* y una deleción del gen *mceF*. Este plásmido fue construido intercambiando los fragmentos *SacI-ApaI* entre los plásmidos np220 y pC1.

Construcción de plásmidos para las proteínas quimeras. Se empleó una estrategia de amplificación por PCR de dos etapas para construir los genes que codifican las proteínas quimeras. La figura 4 esquematiza el proceso de construcción de estas proteínas.

En la primera etapa, se amplificó independientemente el DNA que corresponde a los genes *mceA* y *mceB* para construir la microcina con péptido líder de colicina V, y *cvaC* y *cvi* para construir la colicina V con péptido líder de la microcina. En estas amplificaciones se usaron partidores que llevan la secuencia del péptido líder de la bacteriocina que se desea intercambiar (oligonucleótidos PLCoIV1, PLCoIV2, PLMce1 y PLMce2, Tabla 3). Por ejemplo

Proteínas quimeras



Estrategia:

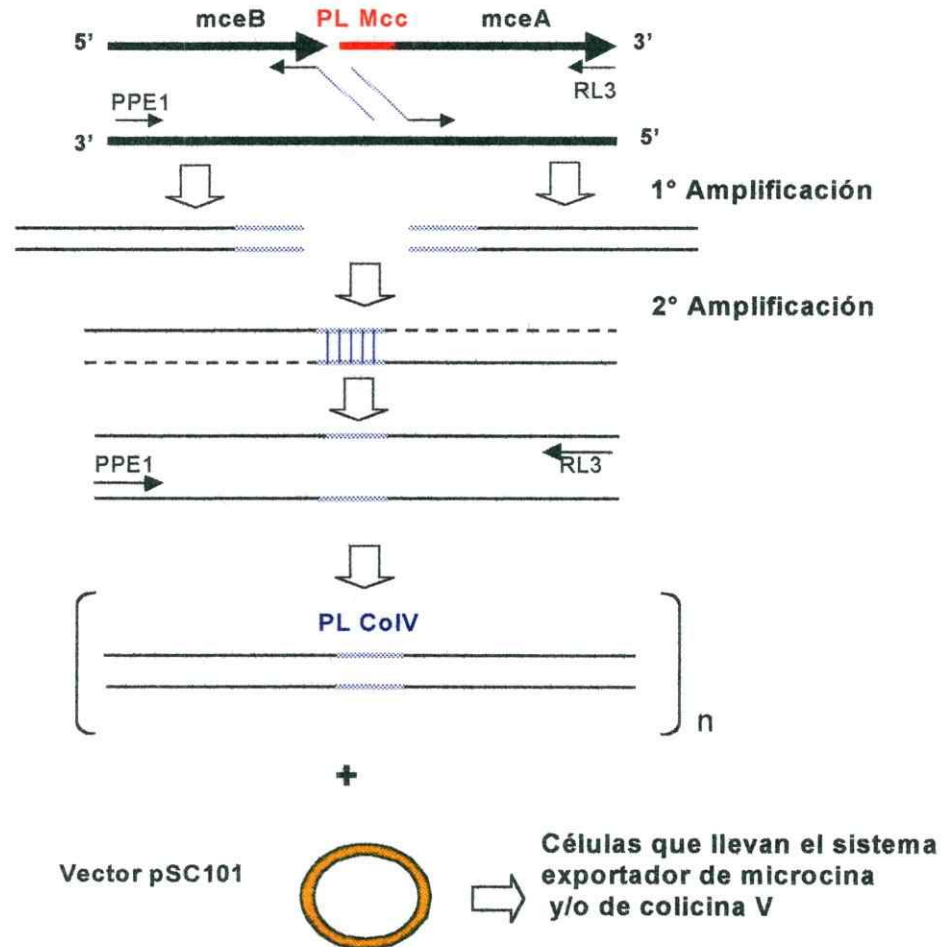


Figura 4. Estrategia empleada para construir las proteínas quimeras (1. y 2.). La figura detalla el procedimiento empleado para la construcción de la micrococcina con péptido líder de la colicina V. Los genes de cada bacteriocina y de sus respectivas proteínas de inmunidad se amplificaron independientemente en un primer paso. Luego los productos de amplificación se mezclaron y se sometieron a una segunda amplificación sin partidores. Las líneas celestes denotan zonas de los partidores y de los productos de amplificación que poseen secuencias complementarias de modo que en la segunda amplificación se pueden aparear y permitir la elongación por parte de la DNA polimerasa. Después de dos ciclos completos de amplificación se añadieron los partidores para obtener la amplificación del fragmento compuesto de los dos genes, *mceA*-PLCoIV y *mceB* y *cvaC*-PLMce y *cvi*.

el partidor PLCoIV-1 tiene 23 nt que sirven para amplificar el gen *mceA* (con el partidor RL3) y una secuencia de 24 nt que calza con la secuencia codificante del péptido líder de la colicina V, secuencia que es útil para el segundo paso de amplificación. Por otro lado, PLCoIV-2, además de los 25 nt usados para amplificar *mceB* (con el partidor PPE1), tiene 53 nt que son complementarios a la secuencia del péptido líder de la colicina V. Así entonces, existen 24 nt que se aparean en los partidores PLCoIV1 y PLCoIV2. Esta característica de los partidores fue diseñada para introducir el péptido líder de la colicina V en lugar del de la microcina, manteniendo la organización transcripcional natural del sistema, ya que *mceA* y *mceB* están en operón, así como también *cvaC* y *cvi*.

Para realizar la segunda etapa de amplificación, los fragmentos purificados de los amplificados PLCoIV1-RL3 y PLCoIV2-PPE1 se mezclaron en una reacción y por otro lado los productos PLMce1-CvaC2 y PLMce2-cvi1 se mezclaron en otra reacción. Ambas mezclas de productos de PCR se sometieron a dos ciclos de desnaturación, "annealing" y extensión, luego de los cuales, se añadieron los partidores correspondientes (PPE1 y RL3 para el caso de la microcina con péptido líder de colicina V, y *cvi1* y *cvaC2* para el caso de la colicina V con péptido líder de microcina) para continuar con 28 ciclos de amplificación en condiciones estándar. El amplificado resultante se unió al vector pSC101 empleando T4 DNA ligasa y luego cada construcción se introdujo a células que llevan el sistema genético de la microcina (excepto el gen *mceA*) y/o de la colicina V (excepto el gen estructural *cvaC*). El origen de replicación pSC101 es

compatible como los plásmidos que portan los sistemas de la microcina y la colicina V.

Construcción de plásmidos para microcina sin péptido líder. La microcina sin péptido líder y su respectivo control, la microcina con péptido líder se construyeron amplificando por PCR el gen *mceA* utilizando los partidores S1-R2 y C1-R2 respectivamente. El partidor S1 no tiene la secuencia correspondiente al péptido líder de la microcina, sino solamente una metionina para que el gen pueda traducirse, en cambio, el partidor C1 posee la secuencia completa del gen *mceA*. Ambos fragmentos amplificados fueron introducidos direccionalmente y en fase en los sitios *Pst*I y *Hind*III del plásmido pBAD33 que lleva el promotor P_{BAD} . El vector pBAD33 es compatible con los plásmidos de microcina por su origen de replicación p15A y posee el mencionado promotor P_{BAD} además del gen regulador del operón arabinosa *araC*.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPORTADOR DE LA MICROCINA E492.

El estudio de la secuencia del gen estructural de la microcina sugiere que esta bacteriocina utiliza para su secreción un sistema transportador ABC conformado por los productos de los siguientes genes: *mceG*, codifica para la proteína transportadora ABC, *mceH*, para la proteína accesoria (MFP) y *mceF* para un factor adicional que interviene en el procesamiento y exportación de la microcina.

Análisis de la secuencia de las proteínas transportadoras de la microcina E492. El análisis computacional de la secuencia de MceG y MceH usando los programas BLASTP y TBLAST (Altschul *et al.*, 1997) muestran que ambas proteínas son homólogas a las proteínas transportadoras de la colicina V CvaB y CvaA respectivamente. MceG, tiene una identidad del 87% y una similitud del 92% con el transportador ABC de la colicina V (CvaB), en tanto que MceH tiene una identidad del 91% y una similitud del 94% con la proteína accesoria (CvaA). La figura 5a-b muestra la comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de los exportadores de microcina y colicina V.

MceG pertenece a la familia de transportadores ABC de HlyB (transportador ABC de la α -hemolisina). Debido a la alta identidad de MceG con CvaB, se

a)

cvaB MTNRNFRQI INLLDLRWQRRVPIHQETETAECGLACLAMICGHFGKNIDLIYLRRKFNLS 60
 mceG MSNGNVRRMINQLDMRWRRRVPVIHQETETSECGLACLAMICGHFGKNIDLISLRRKFNLS 60
 : *.:*:** **:*:*****:***** *****

cvaB ARGATLAGINGIAEQLGMATRALSLELDELRLVLTPCILHWDFSHFVVLVSVKRNRYVLH 120
 mceG ARGANLAGINSIAEQLG MVTRALSLELDELGALKTPCILHWDFSHFVVLVSVKRNRYVLH 120
 ****.*****.*****.*****.*****

cvaB DPARGIRYISREEMSRFTGVALEVWPGSEFQSETLQTRISLRSLINSIYGIKRTLAKIF 180
 mceG DPARGRRNVGLEEMTRYFTGVALEVWPGSEFSEETTQNRIQLRSLINSIYGIKSTLAKIF 180
 ***** * :. ***:***** ** * ** *****

Secuencia LTL

cvaB CLSVVIEAINLMPVGTQLVMDHAI PAGDRGLLTLISAALMFFILLKAATSTLRAWSSLV 240
 mceG CLSVVIEAINLMPVGTQLVMDHAI PAGDRGLLTLISAGLMFFILLRAATGMLRAWSSLV 240
 *****:*****.*****:***. *****

cvaB MSTLINVQWQSGLEFDHLLRPLAFFERRKLGDIQSRFDSLDTLRATFTTSVIGFIMDSIM 300
 mceG MGTLINVQWQSGLEFNHLLRPLAFERRKLGDIQSRFDSLDTLRATFTTSVVGAIMDSIM 300
 *.*****:*****:*****.*****.* *****

cvaB VVGVCVMMLLYGGYLTWIVLCFTTIYIFIRLVTYGNYROISEECLVREARAASYFMETLY 360
 mceG VVGVFVMMLLYGGYLTWIVLGF TTVYVLLIRLVTYGYROISEETLVRGARASSYFMETLY 360
 **** ***** **:*:***** ***** ** * *:*****

cvaB GIATVKIQGMVGIRGAHWLNMKIDAINSGIKLTRMDLFFGGINTFVTACDQIVILWLWLGAG 420
 mceG GIATVKIQGMAERRGTHWLNKIDAINSGIKLTRMDLFFGGINTFVAACDQVAILWLWLGTS 420
 *****. **:***:*****:***:*****:***:*****:

cvaB LVIDNQMTIGMFVAFSSFRGQFSERVASLTSFLLQLRIMSLHNERIADIALHEKEEKKPE 480
 mceG LVIDNQMTIGMFVAFSGSFRGQFSRVASLTNFFLLQLRMSLHNERIADIALHEKEEKKPE 480
 *****.*****:*****.*****:*****

Walker A

cvaB IEIVADMGPISLETNGLSYRYDSQSAPIFSALSLSVAPGESVAITGASGAGKTTLMKVLC 540
 mceG LDIVADMTPVSLETTDLSYRYDSQSAPVFSGLYLSVTPGESVAITGTSGAGKTTLMKVLC 540
 :***** *:***.*****:*** * ** :*****:*****

cvaB GLFEPDSGRVLINGIDIRQIGINNYHRMIACVMQDDRLFSGSIRENICGFAEEMDEEWMV 600
 mceG GLFEPDSGKVLVNGTDIRQLGINNYHRMIACVMQDDRLFSGSIRENICGFSEEMDEAWMI 600
 *****:*** ** ***:*****:***** ** *

ABC signature Walker B

cvaB ECARASHIHVDVIMNMPMGYETLIGELGEGLSGGQQRIF IARALYRKPGILFMDEATSAL 660
 mceG ECARASYIHDVIMKMPMGYETLIGELGEGLSGGQQRIF IARALYRRPGILFMDEATSSL 660
 *****:*****:*****:*****:*****:

cvaB DSESEHFVNVAIKNMNITRVI IAHRETTLR TVDRVISI 698
 mceG DTESERFVNVAIRNMNITRVI IAHRETTLR TVDRVISI- 697
 ::*****:*****.***

(continúa)

b)

```

cvaA MKWQGRAILLPGIPLWLIMLGSIVFITAFILMFIIVGTYSRRVNVSGEVTTPRAVNIYSG 60
mceH MKWRGRAILLPGIPLWLTMLGSI AFITAFILTFVIAGTYSRRVNVSGEVTTPRAVNIYSG 60
***:*****

cvaA VQGFVVRQFVHEGQLIKKGD PVYLIDISKSTRNGIVTDNHRDIENQLVVRVDNIISRLEE 120
mceH VQGFVVRQFVHEGQSIKKGDPIYQIDVSKSTRSGVVTDNQRDIENQLVVRVDNIISRLEE 120
*****:*****:* **:******.*:******:*****

cvaA SKKITLDTLEKQRLQYTDAFRSSDI IQRAEEGIKIMKNMENYRYYQSKGLINKDQLTN 180
mceH SKKITLNTLEKQHLQYSDAFRRSSDI IRRAEEDIKIMKNMENYRNYQLKGLINKDQLTN 180
*****:*****:***:*****:*****:***** ** *****

cvaA QVALYYQQNNLLSLSGQNEQNALQIT TLESQIQTQAADFNDRIYQMELQRLELQKELVN 240
mceH QVALYYQQNNLLSLSGQNEQNALQIT SLESQIQTQAADFNDRIYQMELQRYELQKELID 240
*****:*****:*****:***** *****:

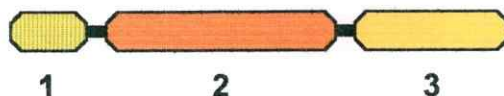
cvaA TDVEGEI IIRALS DGKVDLSVTVGQMVNTGDSLLQVIPENIENYYLILWVPND AVPYIS 300
mceH TDVGGEI IIRALS DGKVDLSVTVGQMVNAGDSLLQVIPENIENYYLILWVPND AVPYIS 300
*** *****:*****

cvaA AGDKVNIRYEAF PSEKFGQFSATVKTISRTPASTQEMLTYKGAPQNTPGASVPWYKVIAT 360
mceH AGDKVNIRYEAF PAEKFGQFSATVKTISRTPASTQEMLTYKGAPQNTLGT'SVPWYKVIIVK 360
*****:*****:*****:***** *:******..

MFP family signature
cvaA PEKQIIRYDEKYLPLENGMKAESTLFLEKRR IYQWMLSPFYDMKHSATGPIND 413
mceH PEKQIISYGGKSLPLENGMKAESTLFLEKRR IYQWMLSPFYDMKHSATGPID- 412
***** * . * *****:

```

c) Dominios de MceG



Dominio	Aminoácidos		E-value
1. Peptidasa	24	150	1.2e-49
2. Transmembrana	176	446	1.2e-49
3. Unión de ATP	519	696	1.2e-49



Dominio	Aminoácidos		E-value
MFP (HlyD)	53	380	5.7e-45

(continua)

Figura 5 a). Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos del transportador ABC de la microcina y de la colicina V utilizando el programa CLUSTAL W. La cisteína conservada involucrada en el procesamiento del péptido líder está señalada por un triángulo (▼), las secuencias de consenso características del dominio de transmembrana de los transportadores ABC y del dominio de unión de ATP están destacadas por la secuencia LTL, "ABC signature" y las cajas Walker A y B respectivamente y los residuos que formarían la cámara de acuerdo a los datos de Chang & Roth (2001) están señalados con □ **b)** Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína accesoria de la microcina y de la colicina V, utilizando el programa CLUSTAL W. Las secuencia de consenso características de la subfamilia de HlyD está destacadas. * indica la posición en la que se encuentra un residuo idéntico; † indica la posición en la que existe un residuo sustituido por otro muy conservado y . indica la posición en la que un residuo esta sustituido por otro poco conservado. **c)** Esquema que describe la posible disposición de los diversos dominios de MceG y MceH, inferidos utilizando el programa Pfam a partir de sus respectivas secuencias. En las Tablas se indican los dominios que forman MceG y MceH incluyendo los aminoácidos que comprenden cada dominio y el E-value de comparación con la base de datos de familias de proteínas que reúne Pfam (Bateman *et al.*, 2002).

puede inferir que la estructura secundaria y terciaria de MceG es muy similar a otros transportadores ABC. Empleando varios programas computacionales y bases de datos como Pfam¹, Interpro y otros se deduce que MceG está conformada por un dominio amino terminal de ubicación citoplasmática con propiedades catalíticas (líder peptidasa), un segmento con varias hélices de transmembrana y un dominio C-terminal encargado de la hidrólisis del ATP (Figura 5c). MceG presenta las secuencias conservadas características de cada dominio, puesto que posee ambos motivos de consenso característico del dominio proteolítico de los exportadores ABC encargado de procesar el péptido líder (QX₄D/ECX₂AX₃MX₄Y/FGX₄l/l y HY/FYVX₁₀l/LDP, Havarstein *et al.*, 1995). En el dominio de membrana, se puede observar la secuencia LTL en tanto que en el tercer dominio se encuentran las cajas Walker y la secuencia de consenso LSGGQkQRvaiARaL ("ABC signature") propio de los transportadores ABC (PROSITE entrada PS00211, Bairoch *et al.*, 1997).

Se emplearon diversos programas computacionales para predecir la cantidad y arreglo de las hélices de transmembrana que presenta MceG en el dominio de membrana. Frecuentemente es difícil realizar esta predicción ya que los transportadores ABC tienen pocos aminoácidos hidrofóbicos y relativamente pequeñas cantidades de regiones helicoidales que puedan ser fuertemente predichas, lo que complica la determinación del número y disposición de los

¹ Pfam es una colección de alineamientos múltiples de secuencias protéicas y de modelos de Markov que agrupa a los dominios y las familias de proteínas más comunes. (Bateman *et al.*, 2002)

segmentos de transmembrana (Holland y Blight, 1996). Para superar esta inconveniencia se han aplicado todos los programas de predicción de fragmentos de transmembrana a MsbA, otro transportador ABC cuya estructura fue determinada experimentalmente por cristalografía de rayos X (Figura 6b, Chang y Roth, 2001). Así, se ha tomado como molde la disposición de los fragmentos de transmembrana de MsbA y con esta información se ha determinado que el dominio de membrana de MceG estaría formado por 6 segmentos de transmembrana. La primera hélice de transmembrana empezaría en la cara citoplasmática de la membrana, en el aminoácido 179 hasta el 196, a continuación, la segunda hélice estaría comprendida entre los aminoácidos 211 y 230. Luego de un pequeño "loop" en la superficie citoplasmática, la tercera hélice estaría extendida entre los aminoácidos 235 a 254. La cuarta y quinta hélice estarían formadas por los aminoácidos 291 al 310 y 315 al 337 respectivamente. Por último, la sexta hélice, que termina en el lado citoplasmático de la membrana interna, estaría formada por los aminoácidos 397 al 421 (Figura 6a). Los diagramas de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en los segmentos de transmembrana de MceG predichos con ayuda del programa SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) están mostrados en la figura 6c.

La proteína accesoria, MceH, pertenece a la familia MFP (Membrane Fusion Protein) y a la subfamilia de HlyD, ya que posee un dominio característico de esta familia entre los aminoácidos 53 y 380 y la secuencia de consenso

a)

TopPred2	DAS	TMHMM	HMMTOP2	TMpred	Sosui	MEMSAT	HNN
28-48	35-41	179-201	179-196	176-194	28-50	179-201	156-192
177-197	104-110	211-233	211-230	211-229	175-197	211-233	209-271
210-230	177-193	289-311	235-254	228-250	218-240	291-310	289-301
235-255	180-189	315-337	291-310	291-314	288-310	317-337	324-334
298-318	213-229	397-419	315-336	309-329	315-337	397-417	352-366
403-423	215-227		397-421	394-416	399-421		403-417
503-523	238-244						442-476
	290-333						
	295-331						

b)

TopPred2	DAS	TMHMM	HMMTOP2	TMpred	Sosui	MEMSAT	HNN
16-36	27-336	21-43	25-48	20-40	27-49	25-48	21-54
61-81	65-78	63-85	69-93	62-81	60-82	63-84	61-81
154-174	153-162	140-162	139-162	167-185	138-160	141-160	150-198
256-276	167-181	167-186	167-185	257-276	165-186	167-185	251-270
	257-269	245-267	244-267		252-274	254-272	286-296
	284-292				278-300	279-295	203-212
							300-317

c)

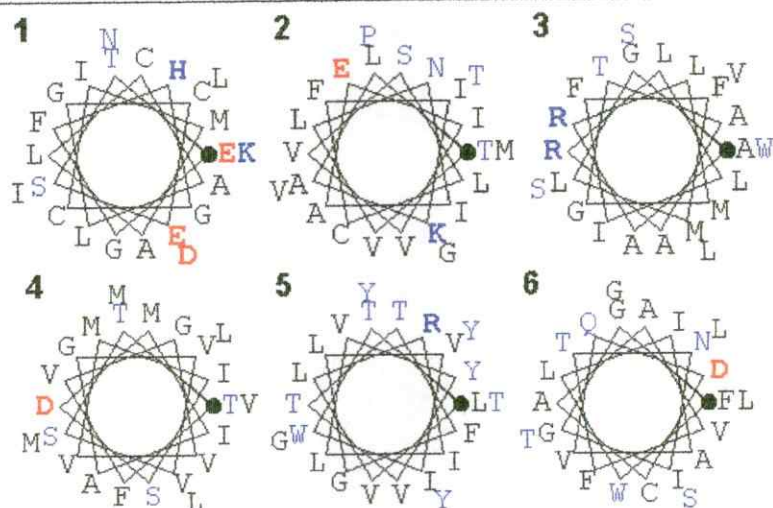


Figura 6. Comparación por diferentes algoritmos de predicción de hélices de transmembrana de **a)** la proteína MceG y **b)** la proteína MsbA. Los números indican los aminoácidos que comprenden las diferentes hélices de transmembrana calculadas por cada programa. Los programas empleados fueron TopPred2 (Claros & von Heijne, 1994); TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993); Sosui (Hirokawa *et al.*, 1998); DAS (Cserzo *et al.*, 1997); TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998); HMMTOP2 (Tusnády & Simon, 2001); HNN (Guermeur, 2001) y MEMSAT (Jones *et al.*, 1994). **c)** Representación de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en las hélices de transmembrana de MceG predichas con el programa SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998). Los residuos hidrofóbicos están destacados en negro, los polares en azul y los cargados en azul-negrita (positivos) y en rojo-negrita (negativos); el punto representa el residuo que inicia la hélice de transmembrana.

LXXGMXXXAXITGXR XVIXFLL propia de la familia, ubicada en el extremo C-terminal (PROSITE entrada PS00543, Young y Holland, 1999) (Figura 5). La mayor parte de MceH estaría dispuesta en el periplasma, teniendo únicamente una hélice de transmembrana (entre los aminoácidos 15 y 35) cerca del extremo N-terminal inserto en la membrana citoplasmática.

La proteína MceF es homóloga (44% de identidad y 63% de similitud) a una proteína hipotética de función desconocida codificada por el plásmido R1 de *E. coli* (Bravo *et al.*, 1987). Sin embargo tratando de encontrar una proteína de función conocida que sea homóloga a MceF se utilizó el programa PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e independientemente la base de datos Pfam. Con PSI-BLAST se encontró un alineamiento (*E*-value 10^{-22}) que convergió en la quinta iteración con una región de una proteasa del tipo de las CAAX-proteasas de *Drosophila melanogaster* (número de acceso CAB64383). A su vez Pfam indica que MceF tiene entre los aminoácidos 74 y 169 un dominio 'Abi' que pertenece a la familia de las CAAX proteasas (*E*-value 5.2×10^{-18}) (Figura 7b). Los miembros de esta familia no tienen función conocida sin embargo es muy probable que sean metaloproteasas dedicadas a la modificación y secreción de péptidos y proteínas (Pei y Grishin, 2001). La prenilación es una modificación crucial para el funcionamiento de muchas proteínas eucarióticas. El grupo prenilo está unido generalmente a la cisteína del motivo CAAX en el extremo C-terminal de estas proteínas, sitio donde una endopeptidasa realiza un corte proteolítico liberándose el tripéptido AAX. Las CAAX proteasas estarían

a)

MLFILEFIIILVPLLYLFFFRKRDGLGIGTFENLKLFFILFFIIIFIQFMVPIY-50
CAAX protease family signature
 LLGFRKAESWSTSQISYEHYIFWINVLPALFIVPIYEEIVFRGCLFNSEFK-100
 ▼
 FWFNGNVYGSAAVVTSLFAVMHLQYSDIRTFVMLFLVSLTLIVARVKSNG-150
 ▼
 IILMPILLHMLMNVVVIGVQYLVYINHAHQ-179

b) Dominio de MceF



Dominio	Aminoácidos		E-value
Abi	74	169	5.2e-18

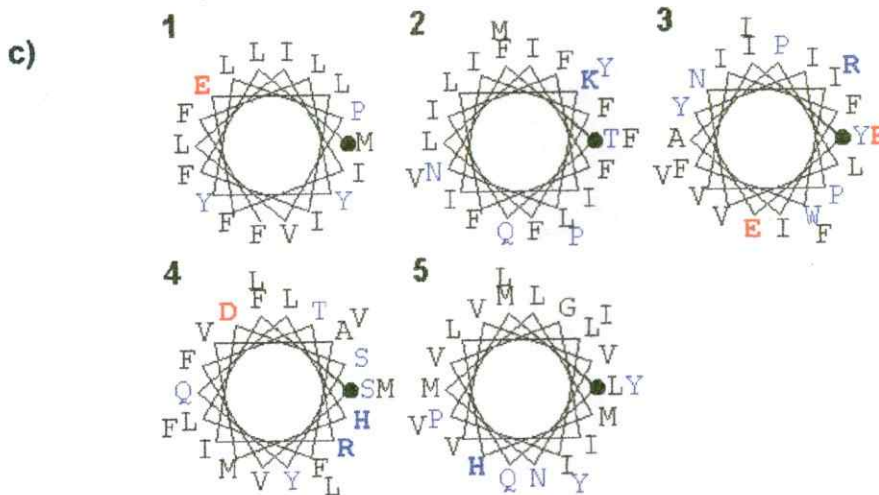


Figura 7. a) Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína MceF. La secuencia de consenso característica de la familia de las CAAX proteasas está destacada por la barra, así como las dos histidinas que coordinan el zinc están indicadas por el triángulo ▼. b) Esquema que describe la posible disposición del dominio de MceF, inferido utilizando el programa Pfam a partir de su secuencia. En la Tabla se indica el dominio que forma MceF incluyendo los aminoácidos que comprende el dominio y el E-value de comparación con la base de datos de Pfam (Bateman *et al.*, 2002). c) Representación de la disposición y organización espacial de los aminoácidos en las hélices de transmembrana predichas con el programa SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) que posee MceF. Los residuos hidrofóbicos están destacados en negro, los polares en azul y los cargados en azul-negrita (positivos) y en rojo-negrita (negativos); el punto representa el residuo que inicia la hélice de transmembrana.

encargadas de realizar dicho corte proteolítico (Pei y Grishin, 2001). Estas proteasas contienen un motivo altamente conservado conformado por dos ácidos glutámicos y una arginina de acuerdo a la secuencia EExxfRg, además el alineamiento de los miembros de esta familia también muestra dos histidinas que pueden estar involucradas en la unión de zinc (Figura 7a).

El análisis computacional de la estructura secundaria de MceF muestra que posee entre cinco a seis posibles hélices de transmembrana dependiendo del programa que sea utilizado para predecir las hélices (Figura 7c), y además es una proteína altamente hidrofóbica. Esta predicción sugiere que MceF estaría ubicada en la membrana interna de la bacteria (Lagos *et al.*, 2001).

Localización del transposón Tn5 en el sistema genético de la microcina E492. El análisis de la secuencia del sistema genético de la microcina indica que esta bacteriocina requiere para su secreción un aparato transportador dedicado conocido como exportador ABC, y el péptido líder que es procesado concomitantemente con la exportación, corresponde a las bacteriocinas que son secretadas por exportadores de este tipo. (Lagos *et al.*, 1999). Se realizaron experimentos de mutagénesis al azar por transposición para identificar los genes que intervienen en la síntesis, maduración, procesamiento y exportación de la microcina, identificándose aquellos implicados en el transporte.

El estudio que se detalla a continuación se limita al sistema exportador de la microcina. Se analizaron más de 150 mutantes por transposición que

presentaban un fenotipo no productor de microcina activa. Para localizar la inserción del Tn5 en estas mutantes del sistema genético de la microcina se utilizaron tres métodos: análisis de restricción, amplificación por PCR y secuenciación. Los mapas de restricción se realizaron empleando diferentes enzimas de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *Sall*, *XhoI*, *Clal*, *Apal*, *Scal*, *Sacl*), que tienen sitios dentro del plásmido que lleva los genes de la microcina, y de las cuales sólo algunas tienen sitios en el transposón (*BamHI*, *Sall*, *XhoI*). La figura 8a-b muestra la ubicación de los sitios de restricción tanto en el sistema de la microcina como en el transposón. En la figura 8c se presenta un ejemplo del análisis de restricción de DNA plasmidial obtenido de diferentes cepas mutantes por transposición.

Con el propósito de determinar el gen en el cual se produjo la inserción del transposón en cada mutante, se diseñaron partidores específicos para amplificar los extremos del Tn5 (partidor Tn1) y los genes *mceF* (partidores F1 y F2), *mceG* (partidores G1 y PEG) y *mceH* (partidores H1 y PEH)(ver Tabla 3). Las parejas de partidores que se utilizaron para la amplificación por PCR constaron de un partidor del gen a investigar y el otro partidor del transposón. La migración relativa en geles de agarosa de los segmentos amplificados indica el sitio más probable de la inserción. La figura 8d-e muestra un ejemplo del análisis realizado empleando PCR. Como resultado del análisis de restricción y de la amplificación por PCR se encontraron varios clones que tenían una única inserción de Tn5 en los genes *mceG* y *mceH*. Se observó una mayor cantidad

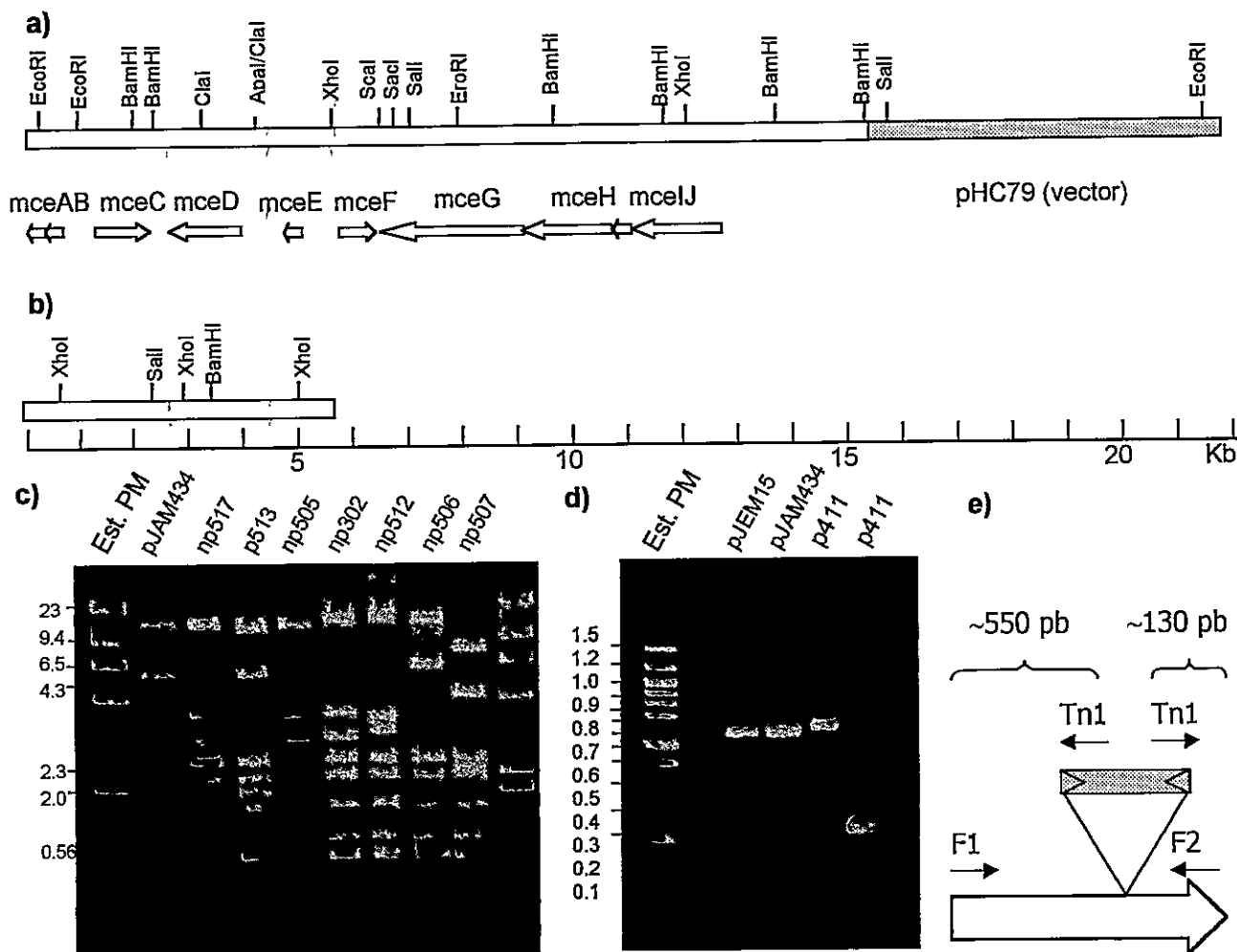


Figura 8. Localización del transposón Tn5 en el sistema genético de la microcina E492. **a)** Resumen de los ORFs del sistema genético de la microcina E492. La barra superior representa el DNA (pJAM434) y las diferentes enzimas utilizadas para el análisis de restricción. Las flechas indican los genes y la dirección de la transcripción. **b)** Sitios de restricción del transposón Tn5 utilizados para localizar su inserción dentro del sistema genético de la microcina. La barra bajo la figura indica el tamaño de los fragmentos en Kb. **c)** Ejemplo del análisis de restricción de DNA plasmidial de la cepa control (pJAM434) y de diversas cepas mutantes por transposición. En este caso se emplearon las enzimas *XhoI* y *Sall* y las mutantes np517, np505, np302, np512, np506 y np507 presentan la inserción del Tn5 en un fragmento de 5.7 Kb lo cual sugiere que está en el gen *mceG* o gen *mceH* y p513 en el fragmento 11.8 Kb entre los genes *mceA* y *mceE*. **d)** y **e)** Localización de la inserción del Tn5 por PCR de la mutante p411. El gen *mceF* se amplificó a partir del DNA plasmidial pJAM434 y pJEM15 (controles) empleando los partidores F1y F2 como se indica en el esquema. Para determinar la inserción del Tn5, se amplificaron dos fragmentos empleando los partidores F1-Tn1 (banda grande de ~ 550 pb) y F2-Tn1 (banda pequeña de ~130 pb), tomando como molde el DNA plasmidial de la mutante p411. Los estándares de peso molecular indican valores en Kb.

de inserciones en el gen *mceG* (36% del total de inserciones) en comparación con otras regiones del sistema genético. Esto indica que existen regiones en pJAM434 donde el transposón Tn5 se inserta preferentemente ("hot spots"). Aunque se sabe que Tn5 es el transposón que se inserta más aleatoriamente de todas las partículas transponibles bacterianas, este resultado no es muy sorprendente dado que se conoce también que Tn5 tiene sitios preferentes de inserción (Goryshin *et al.*, 1998). Se escogieron para la secuenciación dos mutantes que presentaron una sola inserción en la mitad de *mceG* y de *mceH* respectivamente con el propósito de ubicar la inserción de Tn5 a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica. La Tabla 4 resume el sitio de la inserción del Tn5 en los genes de transporte de la microcina.

Se buscó una mutante por transposición en el gen *mceF*. De las 151 mutantes analizadas no se encontró ninguna que inactivara este gen. Se encontró únicamente una mutante que muestra una inserción en su extremo C-terminal pero no es adecuada para nuestro estudio: la mutante p411, que presenta la inserción de Tn5 en el aminoácido 173, no inactiva la función de MceF, pues aparentemente, los últimos 6 aminoácidos de esta proteína no son importantes para su función ya que esta cepa continúa produciendo microcina activa extracelular. Por este motivo, para los estudios posteriores se utilizó una mutante por delección en el gen *mceF* denominada pJRS1 (Wilkens *et al.*, 1997) y se construyó otra mutante por delección en el mismo gen (pC1) como se detalla en la sección 3 de Resultados en esta Tesis.

Tabla 4. Localización de las mutaciones por transposición en los genes implicados en el transporte de microcina.

Gen/ Proteína	Clones mutantes	Tamaño		Localización de Tn5		Actividad bactericida extracelular	Actividad bactericida intracelular	SDS- PAGE
		aa	kDa	nt	aa			
<i>mceF</i>	p411	179	21.1	6551	173	+	ND	+
<i>mceG</i>	np108	698	78.1	8422	351	-	-	-
	np201			8977	116	-	-	-
<i>mceH</i>	np109	413	46.9	9959	200	-	-	-
	np203			9937	207	-	-	-

nt Nucleótidos

aa Aminoácidos

ND No determinado

Caracterización de mutantes en genes transportadores. Ninguna cepa mutante en genes transportadores ($mceF^-$, $mceG^-$, $mceH^-$) produce microcina extracelular activa, dado que no forman el halo de inhibición de crecimiento producido por la acción bactericida de la microcina. Sin embargo, cabe la posibilidad que estos clones sean capaces de exportar el péptido microcina en forma inactiva. Para averiguar la presencia de este péptido a nivel extracelular se siguió el procedimiento de purificación de microcina a partir de cultivos líquidos según el protocolo empleado comúnmente. Se realizó electroforesis de estas muestras para comprobar la presencia de proteínas en geles de poliacrilamida. Los resultados del SDS-PAGE mostrados en la figura 9 indican que los clones $mceG^-$ y $mceH^-$ no producen microcina extracelular ya que no se distinguen las bandas de proteína correspondientes a la microcina. La mutante $mceF^-$ presenta, en algunas preparaciones de microcina, una banda de proteína de mayor peso molecular que la microcina producida por la cepa silvestre. Esto insinúa la posibilidad que esta proteína de mayor peso pudiera corresponder a la forma no procesada de la microcina. Se hicieron 13 preparaciones independientes en las que se encontró que 6 producían la proteína de mayor tamaño que la microcina y que 7 no producían proteína. Esta proteína se produce en bastante menor cantidad que la microcina silvestre y es necesario poner un mayor volumen de la preparación para poderla detectar. La presunción que esta proteína pudiera corresponder a la microcina no procesada se confirmó por los experimentos detallados en la sección 2 de Resultados. Así mismo, no siempre las cepas $mceF^-$ (pC1 o pJRS1) presentan un fenotipo

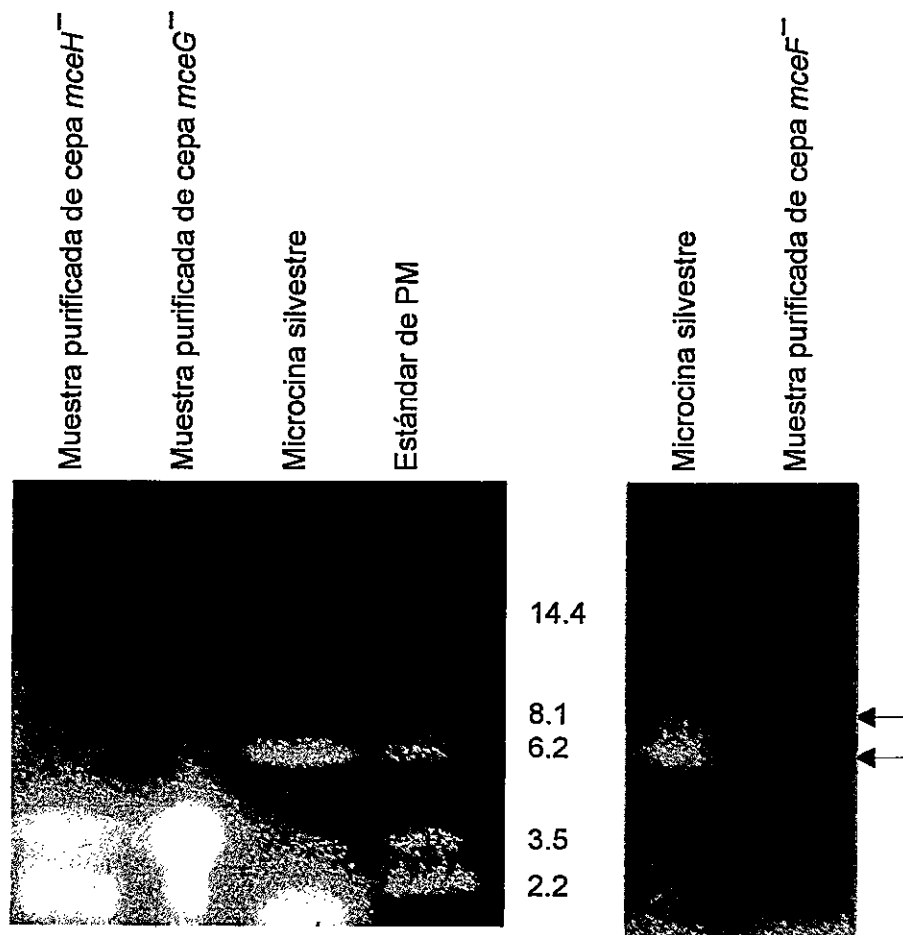


Figura 9. Electroforesis de muestras purificadas a partir de cultivos de cepas mutantes en los genes *mceH*, *mceG* y *mceF*. Las muestras de microcina se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos líquidos empleando columnas Sep-Pak C-18 y elución con metanol 95%. La flecha inferior indica la migración de la banda de la microcina silvestre y la flecha superior, indica la probable microcina no procesada. El estándar de peso molecular indica valores en kDa.

inmune a la acción de microcina extracelular cuando las células en fase estacionaria se emplean para hacer céspedes sobre los cuales se deposita microcina silvestre activa. En algunos casos se puede observar la formación de halos sobre estos céspedes. Es decir un cultivo dado de las cepas $mceF^-$ puede ser inmune o sensible a la acción de la microcina. Cabe señalar que las cepas pC1 y pJRS1 poseen el gen funcional que codifica la proteína de inmunidad a la microcina, $mceB$, por tanto siempre deberían presentar un fenotipo inmune a la microcina. Este comportamiento de la pérdida de inmunidad a la microcina que presentan las cepas $mceF^-$ es aleatorio y está correlacionado con la producción de la microcina extracelular de mayor tamaño: la versión sensible produce la microcina extracelular de mayor tamaño, no así la versión inmune. La pérdida de inmunidad en fase estacionaria no es definitiva, pues después de varios traspasos del cultivo es posible recuperar la inmunidad. No se conoce el mecanismo que gobierna esta pérdida de inmunidad a la microcina de las cepas $mceF^-$, fenómeno que sin duda está relacionado también con la producción de microcina extracelular. Postulamos que las cepas $mceF^-$ sufren una variación de fase por corrimiento del marco de lectura lo que "apaga" o "enciende" el gen de inmunidad. Debido a deleciones o inserciones de pocas bases en el gen $mceB$ o su región promotora, el marco de lectura de este gen puede ser afectado provocando la formación de una proteína trunca no funcional. Esta presunción se basa en los resultados obtenidos por M. Baeza, quién realizó fusiones de MceB con fosfatasa alcalina utilizando el transposón TnphoA para hacer estudios topológicos de esta proteína de inmunidad.

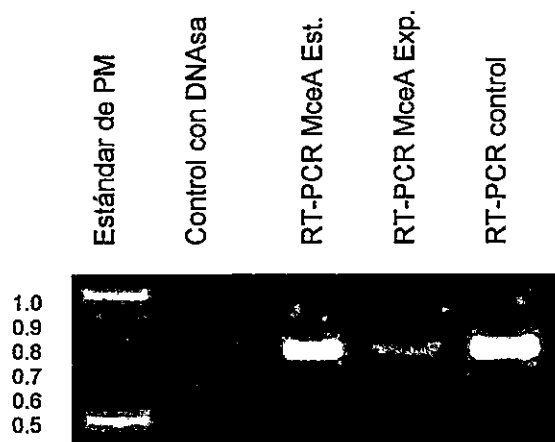
Sorprendentemente, todas las fusiones *mceB::phoA* sufrieron un corrimiento del marco de lectura (Baeza y Lagos, resultados no publicados). Este fenómeno de la variación de fase se ha descrito ampliamente en *Neisseria gonorrhoeae* y en *N. meningitidis* (Tettelin *et al.*, 2000).

Expresión transcripcional de los genes *mceA*, *mceG* y *mceH* en la mutante

***mceF*⁻**: Como se mencionó anteriormente, la mutante *mceF*⁻ no es capaz de exportar a la microcina. Una explicación probable para este fenómeno y que no guarda relación con la exportación es que esta proteína sea un regulador de los genes transportadores o del gen estructural de la microcina, es decir, que en ausencia de MceF, los genes *mceGH* o *mceA* no se transcriban. Para confirmar o descartar esta hipótesis se realizaron experimentos de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR) empleando RNA total extraído de cultivos de la cepa *mceF*⁻ crecida hasta la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Se utilizaron los partidores RL1 con RL3, G1 con PEG y H1 con PEH para realizar la amplificación de los cDNA de *mceA*, *mceG* y *mceH* respectivamente (Tabla 3) Los resultados obtenidos indican que en ausencia de MceF, tanto el gen *mceA* (Figura 10a) como los genes *mceGH* (Figura 10b) se transcriben en ambas fases de crecimiento, por tanto queda descartada una función reguladora de MceF a nivel transcripcional.

Proteína de membrana externa. Como se ha explicado en la Introducción el aparato de secreción Tipo I está conformado por una proteína exportadora

a)



b)

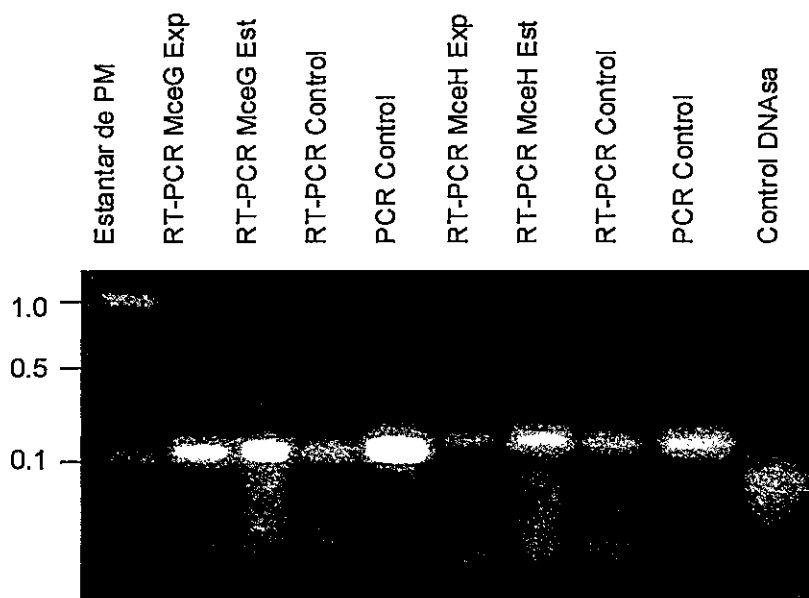


Figura 10. Estudio de la expresión transcripcional del a) gen *mceA* y b) de los genes *mceGH* mediante RT-PCR en la mutante *mceF*⁻. Se empleó como molde RNA total aislado a partir de un cultivo en fase exponencial y fase estacionaria y partidores (RL1 y RL3) específicos para amplificar el cDNA del gen *mceA* y partidores (G1-PEG y H1-PEH) para amplificar los cDNAs de los genes *mceG* y *mceH*. El RNA para el control de RT-PCR se obtuvo de las cepas controles (pJEM15 y pJAM434, respectivamente). Los estándares de peso molecular indican valores en Kb.

ABC, una accesoria y una de membrana externa (Fath y Kolter, 1993). Antecedentes bibliográficos indican que proteínas como la α -hemolisina (Wandersman y Delepelaire, 1990) y la colicina V (Gilson *et al.*, 1990) son exportados por aparatos exportadores ABC cuya proteína de membrana externa es TolC. Por esta causa se escogió como primera aproximación una mutante en *tolC* ZK796 (*tolC::Tn10*) para ser la receptora del plásmido pJAM434 que lleva todos los genes del sistema de microcina. La cepa *tolC*⁻-pJAM434 fue incapaz de exportar microcina, ya que no forma halos de inhibición de crecimiento en la cepa indicadora, ni presenta una banda correspondiente a la microcina en un western blot realizado con muestras purificadas a partir del sobrenadante de cultivos de estas células (Figura 11).

Para confirmar la participación de TolC, se complementó la cepa *tolC*⁻-pJAM434 con el plásmido pAX629 que porta el gen *tolC* intacto y funcional y que es compatible con pJAM434 (Hiraga *et al.*, 1989). Las células transformantes *tolC*⁻-pJAM434 -pAX629 recuperaron el fenotipo productor de microcina como lo demostraron los halos de inhibición de crecimiento formado por estas células sobre el césped de la cepa indicadora, demostrando que TolC es la proteína de membrana externa que forma parte del aparato transportador de la microcina en *E. coli*.

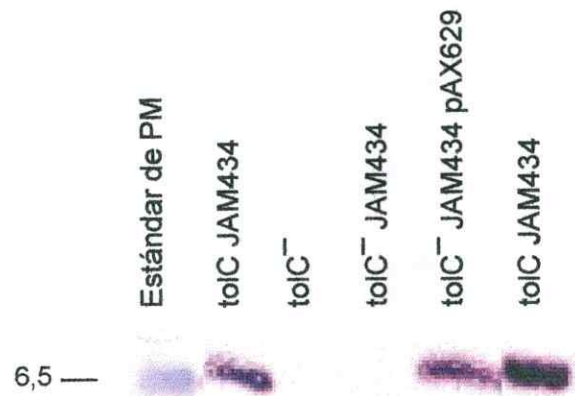


Figura 11. Western blot de muestras purificadas a partir de cultivos de cepas *toIC*⁻, *toIC*⁻-pJAM434, *toIC*⁻-pJAM434-pAX629 y *toIC*⁺-pJAM434 para detectar presencia de microcina extracelular. El estándar de peso molecular indica el valor en kDa.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *mceFGH* EN EL PROCESAMIENTO Y EXPORTACIÓN DE LA MICROCINA E492.

Como se indicó anteriormente, la microcina tiene un péptido líder del tipo doble glicina que es cortado enzimáticamente en el momento de su exportación. Las proteínas candidatas de realizar este corte proteolítico son: MceG, porque posee un dominio con posible función catalítica y MceF, por su dominio de CAAX-proteasa. Para dilucidar la participación de los genes *mceFGH* en el procesamiento y exportación de la microcina, se hicieron estudios de western blot para identificar a la microcina en diferentes preparaciones proteicas obtenidas de cepas mutantes. Una banda de proteína que sea de un tamaño mayor a la microcina tipo silvestre en alguna (o en ambas) de estas cepas mutantes, indicará cuál de estos genes son requeridos para cortar el péptido líder, debido a que la microcina precursora tiene un peso molecular mayor (calculado en 10.091 Da) que la microcina procesada (calculado en 7.869 Da).

Desarrollo de un anticuerpo policlonal anti-microcina. Para realizar los experimentos de western blot se requiere contar con un anticuerpo anti-microcina que sea específico y con alta afinidad. En el laboratorio se intentó en dos ocasiones anteriores obtener anticuerpos monoclonales anti-microcina sin resultado debido a la inespecificidad de éstos. Por esta razón se buscó como alternativa: el desarrollo de un anticuerpo policlonal. En Materiales y métodos se describe el procedimiento empleado para elaborar este anticuerpo y su

purificación. Se obtuvo un anticuerpo anti-microcina y de buen título (detectable hasta una dilución de 1:20.000), el cual fue purificado para separar los IgG específicos anti-microcina de los demás IgG anti-proteínas bacterianas. Esta purificación permitió contar con anticuerpo policlonal puro anti-microcina pero de bajo título (dilución 1:100) y baja productividad.

Western blot del medio sobrenadante producido por la mutante *mceF*⁻.

Como se indicó en la sección anterior, el proceso de purificación de microcina a partir del medio sobrenadante producido por la mutante *mceF*⁻ muestra una proteína de mayor tamaño que la microcina silvestre en geles de poliacrilamina (Figura 12a). Si esta proteína de mayor tamaño corresponde a la microcina no procesada, significa que MceF sería la proteína que corta el péptido líder o colabora en esta tarea. Para resolver esta incógnita se procedió purificar la presunta microcina precursora a partir de los sobrenadantes de las cepas pJRS1 o pC1 (ambas llevan una mutación por delección en el gen *mceF*) empleando el procedimiento habitual de purificación. Estas preparaciones se sometieron a SDS-PAGE para luego realizar experimentos de western blot. Los resultados indican que la cepa *mceF*⁻ exporta la microcina precursora, ya que la proteína que se creía correspondía a la microcina precursora fue identificada por el anticuerpo anti-microcina (Figura 12b). Como se ha explicado anteriormente, únicamente la versión de las células *mceF*⁻ que son sensibles a la microcina en la fase estacionaria, son capaces de producir microcina

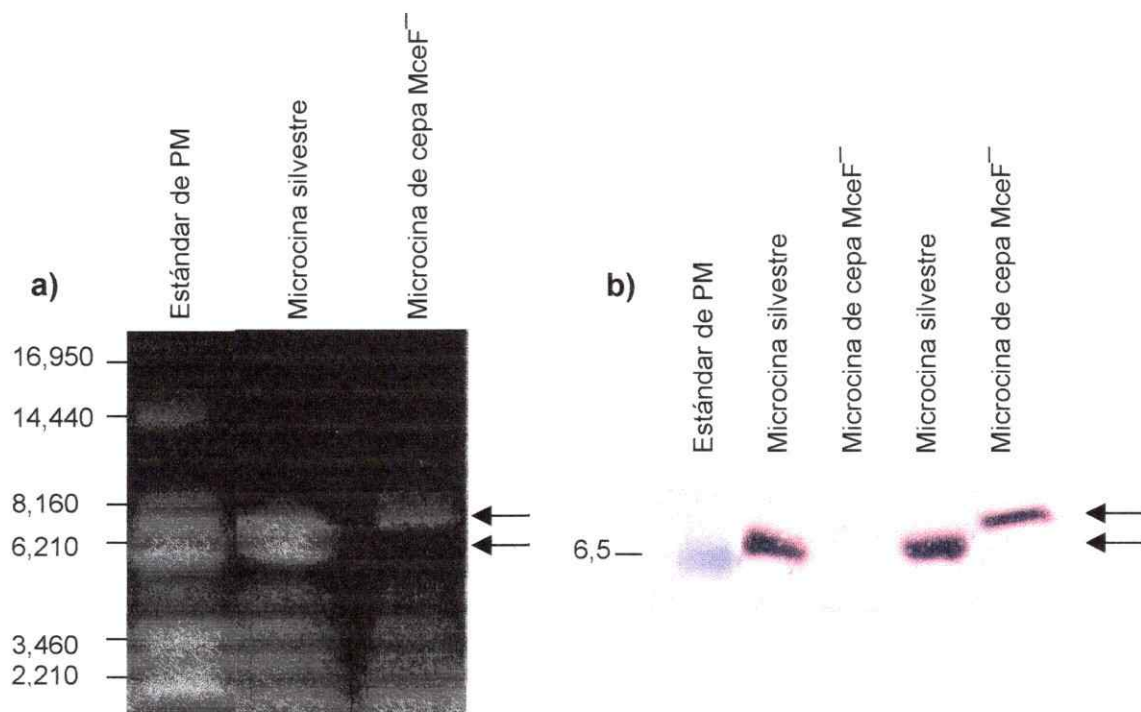


Figura 12. a) SDS-PAGE de muestras purificadas a partir de medios sobrenadantes de cultivos de una cepa que produce microcina silvestre y de una cepa mutante en el gen *mceF*. Los sobrenadantes se sometieron al proceso habitual de purificación de microcina. Ambos carriles del gel se cargaron con la misma cantidad de muestra obtenida a partir de 1 l de cultivo respectivamente b) Western blot de medios sobrenadantes obtenidos de cultivos de una cepa que produce microcina silvestre (cepa control pJEM15) y una cepa mutante carente del gen *mceF* (pC1). Cada carril del gel se cargó con la misma cantidad de proteína. Las flechas señalan la posición del posible precursor de la microcina (flecha superior) y de la microcina silvestre (flecha inferior). Los estándares de peso molecular indican valores en kDa.

precursora extracelular. Estos resultados indican que MceF interviene en el procesamiento de la microcina precursora.

Western blot de lisados provenientes de las mutantes *mceF*⁻, *mceG*⁻, *mceH*⁻. Es probable que en el procesamiento de la microcina intervenga, además de MceF, otra proteína del sistema transportador: MceG. Para dilucidar la posible participación de MceG, se hicieron estudios de inmuno blot de lisados obtenidos de cepa *mceG*⁻. Los resultados del inmuno blot sugieren que el transportador MceG también interviene en el procesamiento de la microcina precursora, ya que se puede distinguir una proteína de mayor tamaño en el lisado de la cepa *mceG*⁻, respecto a los controles (Figura 13). Este resultado concuerda con un dato informado en la siguiente sección de esta Tesis respecto a los experimentos de transportadores heterólogos, que indica que el péptido líder de la microcina puede ser procesado por el transportador ABC de la colicina V. Cabe hacer notar que no se aprecia una banda de proteína de mayor tamaño en el carril cargado con el lisado elaborado a partir de la cepa *mceF*⁻ como debería esperarse de acuerdo al resultado mostrado en la figura 12b. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el procedimiento de lisis celular es grosero y toma algunos minutos. Durante este tiempo la microcina precursora pudo haberse puesto en contacto con el dominio peptidasa de MceG dado que los compartimentos celulares se disgregaron como resultado de la lisis. Este tiempo sería más que suficiente para procesar al péptido líder de la microcina si tomamos en cuenta, por ejemplo, que la mayor parte de la colicina

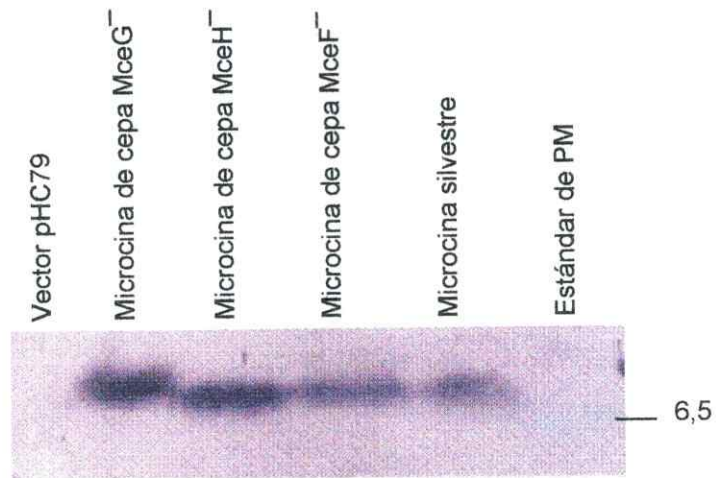


Figura 13. Análisis de western blot de extractos celulares totales provenientes de cepas controles y de cepas mutantes en los genes *mceF*, *mceG* y *mceH*. Los plásmidos contenidos en las células que se utilizaron para obtener los extractos celulares son los siguientes: pHC79 vector vacío (control); np108 plásmido con genotipo *mceG⁻*; np203, plásmido con genotipo *mceH⁻*; pC1, plásmido con genotipo *mceF⁻*; pJAM434, plásmido control productor de microcina silvestre. El estándar de peso molecular indica valor en kDa.

V precursora es procesada en los primeros 10 segundos después de la traducción (Zhang *et al.*, 1995). Por último se realizaron también experimentos de western blot de lisados provenientes de la cepa *mceH*⁻, obteniéndose el resultado esperado: se detecta la presencia de la microcina procesada que migra a la altura de la microcina control (Figura 13). Esto significa que la proteína MceH no interviene en el procesamiento de la microcina.

Western blot de microcina purificada a partir de extractos celulares provenientes de las mutantes *mceF*⁻, *mceG*⁻, *mceH*⁻. Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en el análisis inmunológico de las fracciones totales de clones mutantes en los genes transportadores, se procedió a purificar la microcina a partir de extractos celulares. Se siguió el procedimiento descrito en Materiales y métodos para purificar la microcina desde extractos celulares, a partir de precipitados de cultivos colectados en la fase de crecimiento exponencial tardía. El procedimiento de purificación de la microcina de extractos celulares fue efectivo, pudiéndose obtener microcina purificada en un 90% pero con bajo rendimiento. A partir de un litro de cultivo se obtiene aproximadamente 100 veces menos cantidad de microcina de extractos celulares que la purificación realizada comúnmente desde medio sobrenadantes de cepas productoras de microcina. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad de los western blot se puede detectar hasta 1 ng de proteína (Harlow y Lane, 1988). Se estudió la migración relativa de la microcina de extractos celulares producida por las cepas *mceF*⁻, *mceG*⁻, *mceH*⁻, observándose que la

microcina de extractos celulares producida por la cepa $mceG^-$ presenta una proteína de un tamaño mayor que el resto de las microcinas producidas por la cepas $mceF^-$ y $mceH^-$ (no mostrado).

Fraccionamiento subcelular. Para establecer en qué compartimiento intracelular ocurre el procesamiento de la microcina, y entender la participación de MceF dentro de este mecanismo, se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular (Skvirsky *et al.*, 1991). Estos estudios que determinan la localización subcelular en que se encuentra la microcina mientras viaja desde el medio intracelular al extracelular, en las cepas silvestre y mutantes ($mceF^-$, $mceG^-$ y $mceH^-$) permiten establecer el lugar donde actuarían estas proteínas exportadoras en el proceso de exportación y procesamiento.

Se realizaron fraccionamientos subcelulares de cada cepa mutante en los genes transportadores y de las cepas control. Para verificar que los compartimentos subcelulares han sido correctamente identificados y separados, se utilizaron enzimas marcadoras de cada fracción subcelular. Así, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina como enzima propia del periplasma, de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima encontrada únicamente en el citoplasma y de la NADH oxidasa que indica la fracción de membrana interna. La fracción de membrana externa se determinó por la presencia de porinas. Después de realizar el fraccionamiento celular, cada fracción obtenida se

sometió a una electroforesis de SDS-PAGE al 16.5% y la microcina se identificó mediante western blot.

Se puede observar bandas correspondientes a la microcina en la fracción de membrana interna de la cepa silvestre así como de las mutantes *mceF*⁻, *mceG*⁻ y *mceH*⁻ (Figura 14d). Esta situación se repite en la fracción de periplasma (Figura 14c) (en esta fracción la mutante *mceF*⁻ presenta una proteína de mayor tamaño que el control). Sin embargo, sólo se detecta microcina en la fracción de membrana externa de la cepa silvestre (Figura 14b), lo cual indicaría que ninguna de las mutantes permite la llegada de la microcina hasta este punto. Solo fue posible detectar microcina en la fracción citoplasmática de la mutante *mceF*⁻ (Figura 14a) lo cual sugiere que MceF sería necesaria para promover la entrada de la microcina a los transportadores.

3. SISTEMAS TRANSPORTADORES HETERÓLOGOS.

Dado que el aparato transportador de la microcina E492 (MceG y MceH) presenta una identidad cercana al 90% con el transportador ABC de la colicina V (CvaB) y su proteína accesoria (CvaA), se realizaron experimentos para estudiar la relación funcional que existe entre el sistema transportador de la microcina E492 y de la colicina V tratando de establecer el papel que juega MceF en este proceso. El análisis funcional se realizó combinando los componentes del sistema exportador de la microcina con los de la colicina V y viceversa. Se utilizó una colección de plásmidos que llevan mutaciones simples

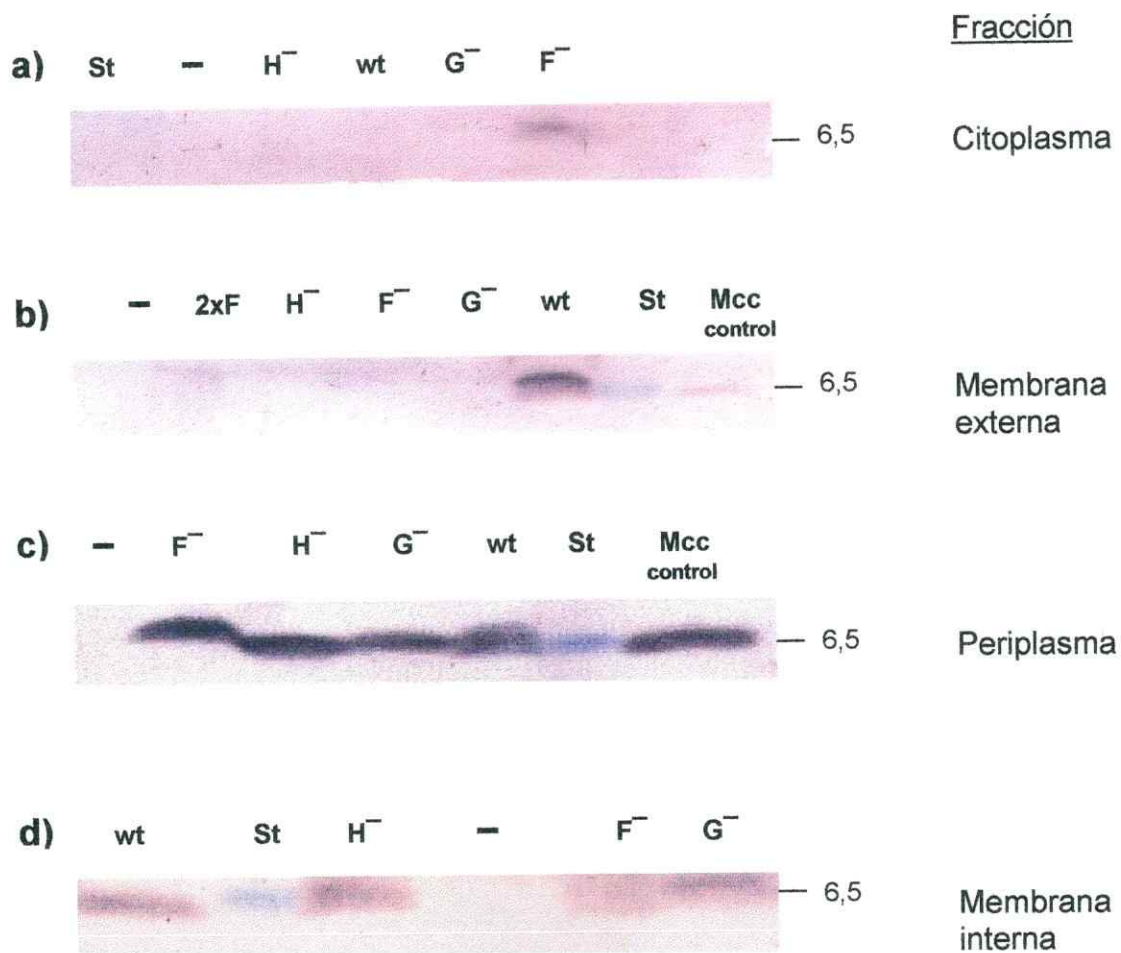


Figura 14. Localización de la microcina en fracciones subcelulares de cepas mutantes en los genes *mceF*, *mceG* y *mceH*. Las fracciones subcelulares se sometieron a SDS-PAGE y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar un western-blot. **a)** Fracción de citoplasma, **b)** Fracción de membrana externa, **c)** Fracción de periplasma, **d)** Fracción de membrana interna. **St** estándar de peso molecular preteñido; **F⁻** pC1, cepa *mceF⁻*; **G⁻** np108, cepa *mceG⁻*; **H⁻** np203, cepa *mceH⁻*; **2xF** pJEM15, cepa con doble copia de *mceF*; **wt** pJAM434, cepa control productora de microcina silvestre; **-** pHC79 cepa control que lleva únicamente el vector, **Mcc control** Microcina extracelular purificada. Los estándares de peso molecular indican valores en kDa.

en cada gen transportador ($mceF^-$, $mceG^-$, $mceH^-$), en el gen estructural ($mceA^-$) y los demás genes necesarios para la producción de microcina activa [$mceBCDEIJ$ (ver Materiales y métodos, y Tabla 2)]. Estos plásmidos se introdujeron a células de *E. coli* MC4100 que llevan los genes plasmidiales requeridos para la producción de colicina V o mutantes de éstos (Tabla 2), en todas las combinaciones posibles. Las cepas resultantes que llevan ambos sistemas genéticos son llamadas en esta Tesis cepas "heterólogas". La complementación se realizó también recíprocamente, es decir, los plásmidos con genes de la colicina V fueron introducidos en *E. coli* VCS257 que porta los genes de la microcina, con el fin de descartar alguna influencia de la cepa huésped en la exportación de las bacteriocinas (Dueñas *et al.*, 1994). La exportación de cada bacteriocina a través de los sistemas transportadores heterólogos se determinó observando la actividad bactericida específica de cada una, mediante la formación de un halo de inhibición de crecimiento que forman las colonias sobre céspedes indicadores de actividad microcina o colicina V. Los céspedes indicadores se elaboraron empleando cepas que son resistentes y/o inmunes a la microcina, a la colicina V, a ambas bacteriocinas, o a ninguna. Para confirmar la exportación de estas bacteriocinas, se hizo crecer un litro de cultivo de cada cepa 'heteróloga', de cuyo medio sobrenadante se purificó microcina de acuerdo al procedimiento estándar usado en el laboratorio. Las preparaciones de microcina purificadas de estas cepas se examinaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE para observar si presentan o no la banda correspondiente a la microcina. Así mismo, se trató de identificar por

inmuno slot blot la presencia de la microcina a nivel extracelular en medios sobrenadantes de cultivos de cepas 'heterólogas', sin embargo no fue posible discriminar entre la exportación de la microcina y la colicina V, ya que el anticuerpo que empleamos es policlonal y aparentemente reacciona con la colicina V (Figura 15). Se realizaron 28 complementaciones funcionales en cada una de las cepas hospederas (VCS257 y MC4100), realizándose los ensayos por cuadruplicado.

Exportación de microcina y colicina V a través de ambos sistemas transportadores. Antes de iniciar los experimentos de transportadores heterólogos, se verificó el fenotipo de cada mutante en los genes estructurales y transportadores de la microcina y la colicina V. Como se muestra en la Tabla 5 (controles 1-9), las cepas silvestres producen microcina y colicina V, en cambio no se detecta actividad en ninguna de las cepas mutantes. Los experimentos de transportadores heterólogos se realizaron transformando las células con plasmidios compatibles que llevan todos los genes intactos tanto del sistema de microcina como de colicina V (pJAM434 y pHK22 respectivamente) de modo de establecer si existe interferencia en la exportación de ambas bacteriocinas. Los resultados de la Tabla 5 muestran que la microcina fue exportada en menor cantidad que el control (comparar la complementación 1 con el control 1), mientras que la colicina V produce un halo mucho más grande cuando el sistema de microcina está presente (comparar la complementación 1 con el control 2). Estos resultados indican que cuando los sistemas exportadores

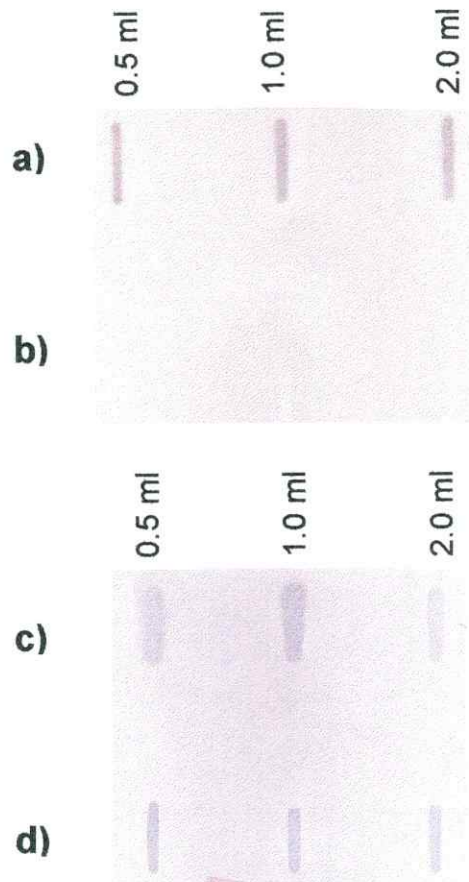


Figura 15. Reconocimiento de la microcina E492 y la colicina V por el anticuerpo no purificado anti-microcina. Se realizó un inmuno slot-blot de 0.5.-2.0 ml de medio sobrenadante de una cepa que produce y exporta microcina silvestre, (pJAM434, fila a y d), de una cepa que no produce ninguna bacteriocina (pHC79, fila b) y de una cepa que produce y exporta colicina V (pHK22, fila c).

Tabla 5. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de ambos transportadores en *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador ABC	Proteína accesoria			Microcina E492	Colicina V
Control 1 ^{1,2}	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	++	-
Control 2 ⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC</i>	-	-	++
Control 3 ⁶	-	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	-	-
Control 4 ⁷	<i>mceG</i>	-	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	-	-
Control 5 ⁵	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	-	<i>mceF</i>	-	-
Control 6 ^{3,15}	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	-	-	-
Control 7 ⁹	-	<i>cvaA</i>	<i>cvaC</i>	-	-	-
Control 8 ¹¹	<i>cvaB</i>	-	<i>cvaC</i>	-	-	-
Control 9 ¹⁰	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	-	-	-	-
Complementación 1 ¹⁻⁸	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	+	+++
Complementación 2 ¹⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	++	-
Complementación 3 ⁵⁻⁸	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC</i>	<i>mceF</i>	-	++

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: + Halo de <2 mm de diámetro; ++ Halo de 2-10 mm de diámetro; +++ Halo de >10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos).

completos de ambas bacteriocinas están presentes dentro de una misma célula, ambas pueden ser exportadas. Sin embargo, aparentemente existiría competencia entre las dos bacteriocinas para ser exportadas, ya que se detecta una mayor actividad extracelular de la colicina V en desmedro de la microcina.

Cuando se usaron los plásmidos np220 y pH22-6 que llevan los genes del sistema de la microcina y de la colicina V pero carecen de los respectivos genes estructurales, se encontró que ambas bacteriocinas podían ser exportadas eficientemente en presencia de ambos exportadores (Tabla 5, complementación 2 y 3), lo cual indica que la interferencia observada en el experimento anterior, no está determinada por los exportadores sino por la competencia entre bacteriocinas.

Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes en los genes transportadores ABC. Se usaron plásmidos con mutaciones en los genes transportadores de la microcina y la colicina V (*mceG* y *cvaB*). Así, se transformaron células que llevan el sistema completo de la colicina V con el plásmido np108 (*mceG*⁻). Los resultados mostrados en la Tabla 6 indican que la microcina no puede utilizar el transportador CvaB para su exportación, en presencia y ausencia del gen estructural de la colicina V (complementación 4 y 5). Estos resultados fueron corroborados mediante SDS-PAGE de muestras obtenidas de cultivos de cepas con transportadores heterólogos para las proteínas ABC, como se muestra en Figura 16. Por el contrario, una cepa

Tabla 6. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutantes en los genes transportadores ABC.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador ABC	Proteína accesoria			Microcina E492	Colicina V
Complementación 4 ⁶⁻⁸	<i>cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	++
Complementación 5 ⁶⁻¹⁰	<i>cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	-	-
Complementación 6 ⁹⁻¹	<i>mceG</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	❖❖
Complementación 7 ⁹⁻⁵	<i>mceG</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC</i>	<i>mceF</i>	-	❖❖

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. ❖ Actividad bactericida secretada por la complementación funcional entre exportadores heretólogos. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: ++ Halo de 2-10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

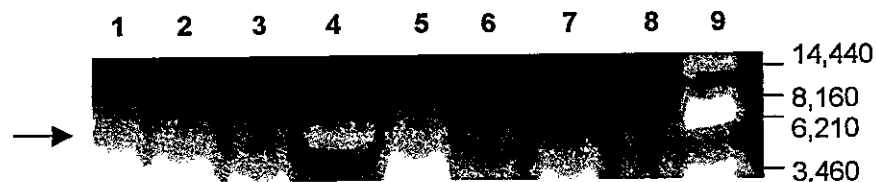


Figura 16. Electroforesis de medios sobrenadantes provenientes de cultivos de células que llevan diferentes plásmidos combinados para estudiar la exportación de la microcina y la colicina V. Carriles. 1. Plásmidos np203 y pHK22 (complementación 6); 2. plásmidos np108 y pHK22 (complementación 4); 3. plásmidos pB40 y pHK22 (complementación 23); 4. plásmidos pA1 y pHK22 (complementación 21); 5. plásmidos pA1 y pHK22-6 (complementación 22); 6. plásmidos pC1 y pHK22 (complementación 14); 7. plásmidos pC1 y pHK22-6 (complementación 15); 8. plásmido pJEM15 (microcina silvestre); 9. estándar de peso molecular en Da. La flecha indica la banda correspondiente a la microcina.

heteróloga que contiene el sistema completo de microcina y el sistema de colicina V carente de CvaB, puede exportar a la colicina V tanto en presencia como en ausencia de producción de microcina (Tabla 6, complementación 6 y 7). Esto significa que CvaB no puede complementar a MceG para la exportación de la microcina, en cambio, la colicina V si puede usar el transportador MceG para salir al medio extracelular.

Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes en los genes de las proteínas accesorias. Para investigar si la microcina puede usar CvaA para su exportación, se introdujo el plásmido pHK22 (sistema completo de colicina V) a células que llevan el plásmido np203 (*mceH⁻*). Estas células no son capaces de exportar microcina (Tabla 7, complementación 8, ver más atrás Figura 16), sin embargo, si en vez de usar el plásmido pHK22 se introduce el plásmido pHK22-6, se observa exportación de microcina en menor cantidad (complementación 9, comparar con control 1). La única diferencia entre los plasmidios pHK22 y pHK22-6 es que este último lleva una mutación en el gen *cvaC*. Este resultado indica que CvaA puede complementar parcialmente a MceH para la exportación de la microcina, solamente cuando la colicina V no está presente dentro de la misma célula. Además, confirma el fenómeno encontrado en la exportación a través de los transportadores completos: la colicina V interfiere con la exportación de la microcina.

Tabla 7. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos en las proteínas accesorias.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador ABC	Proteína accesoria			Microcina E492	Colicina V
Control 1 ¹	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	++	-
Control 2 ⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC</i>	-	-	++
Complementación 8 ⁷⁻⁸	<i>mceG cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-*	++
Complementación 9 ⁷⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	+	-
Complementación 10 ¹¹⁻⁸	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	+
Complementación 11 ¹¹⁻⁵	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC</i>	<i>mceF</i>	-	+

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. + Actividad bactericida secretada por la complementación funcional entre exportadores heretólogos. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: + Halo de <2 mm de diámetro; ++ Halo de 2-10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. * Resultado confirmado por SDS-PAGE, en que no se observa microcina extracelular. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

Por otro lado, la colicina V puede usar la proteína MceH para alcanzar el medio extracelular, ya que células que portan los plasmidios pJAM434 y pHK22-4 (*cvaA*⁻) forman halo de inhibición de crecimiento en céspedes de las cepas indicadoras (Tabla 7, complementación 10 y 11). La presencia o ausencia del gen estructural de la microcina, *mceA*, en la célula no influye en la exportación de la colicina V a través de MceH (comparar complementaciones 10 y 11).

Se puede mencionar, entonces que existe complementación funcional entre las proteínas accesorias de ambos sistemas para la exportación de la colicina V. En este sentido, la proteína accesoria de la microcina (MceH) permite la exportación de la colicina V en ausencia de la proteína accesoria de la colicina V (CvaA) y viceversa, CvaA complementa parcialmente a MceH para la exportación de la microcina, solo en ausencia de producción de colicina V.

Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: mutantes simples en los genes de los transportadores y de las proteínas accesorias.

Estos experimentos fueron diseñados para determinar si cada componente del aparato transportador de la microcina o colicina V puede interactuar con la proteína complementaria heteróloga, en presencia de solo un transportador ABC y una única proteína accesoria heteróloga. Es así que las complementaciones se realizaron con plásmidos que llevan una proteína exportadora ABC con su correspondiente proteína accesoria heteróloga.

Las células que llevan los plásmidos np203 (*mceH*⁻) y pHK22-4 (*cvaB*⁻) poseen la combinación de los genes transportadores *mceG* y *cvaA*, los cuales están intactos, son funcionales y permiten la exportación de la colicina V, no así de la microcina (Tabla 8, complementación 12). En este caso, MceG es capaz de establecer una interacción productiva con CvaA para la exportación de la colicina V. Por el contrario la combinación *cvaB-mceH* (plásmidos np108 y pHK22-8) no permite la exportación de ninguna bacteriocina (Tabla 8, complementación 13), pese a que estos genes están intactos. Esto indicaría que la interacción entre CvaB y MceH es deficiente.

Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: gen *mceF*.

Todos los experimentos con transportadores heterólogos realizados hasta este momento incluyeron el gen *mceF*. Con el propósito de establecer cual es la participación de MceF en la exportación, se llevaron a cabo experimentos de complementación funcional sin la intervención de este gen. Para realizar estos experimentos se construyó una cepa *mceF*⁻, por delección ya que, como se indicó en la sección 1, no se pudo encontrar una mutante *mceF*⁻ por transposición. La mutante pC1 (*mceF*⁻) se construyó a partir del plásmido p4S-12, el cual fue digerido con *Sall* y *XhoI* liberando un fragmento de 1.228 pb que contiene el gen *mceF* y luego se agregó un segmento que tiene los genes *mceGHIJ* (para mayor detalle ver Materiales y métodos). pC1 tiene la misma disposición de los genes que el plásmido pJAM434, excepto que tiene una delección del gen *mceF*. La organización de los genes encontrada en el plásmido

Tabla 8. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutaciones simples en los genes de los transportadores y de las proteínas accesorias.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador	Proteína accesoría			Microcina E492	Colicina V
	ABC					
Control 1 ¹	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	++	-
Control 2 ⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC</i>	-	-	++
Complementación 12 ⁷⁻⁹	<i>mceG</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	❖❖
Complementación 13 ⁶⁻¹¹	<i>cvaB</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	-

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. ❖ Actividad bactericida secretada por la complementación funcional entre exportadores heretólogos. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: ++ Halo de 2-10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

pJAM434 corresponde a aquella encontrada en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492, por tanto representa al sistema genético tipo silvestre (Lagos *et al.*, 2001). En el laboratorio se cuenta con otro plásmido mutante *mceF*⁻ (pJRS1) que es un derivado del plásmido pJAM229, en el cual, parte de la organización génica está invertida respecto a pJAM434 (Wilkins *et al.*, 1997).

A diferencia de lo observado en el experimento en que MceG complementa a CvaB para la exportación de la colicina V en presencia de MceF, en ausencia de esta proteína la colicina V no es exportada (Tabla 9, complementación 17). Para realizar este experimento se co-transformaron células VSC257 y MC4100 con los plásmidos pC1 o pJRS1 y el plásmido pHK22-4 del sistema de la colicina V. Similarmente, en ausencia de MceF, MceH solo complementa parcialmente a CvaA para la exportación de la colicina V (Tabla 9, complementación 16, comparar con complementaciones 10 y 11 de la Tabla 7). Sin embargo la complementación 14 (Tabla 9) muestra que ambas bacteriocinas pueden ser exportadas, siendo un resultado interesante por cuanto la exportación de la microcina sería posible si está presente el sistema completo de colicina V incluido el gen estructural de esta bacteriocina. Este resultado será discutido más adelante. Así podemos decir que la exportación a través de MceGH tanto de la microcina E492 como de la colicina V requiere de MceF. Esta afirmación es apoyada por los resultados obtenidos cuando se tiene una mayor cantidad de MceF dentro de la célula. Así, las células que llevan doble copia del gen *mceF* además de los demás genes del sistema de la

Tabla 9. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con mutantes y doble copia en gen *mceF*.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador ABC	Proteína accesoria			Microcina E492	Colicina V
Control 2 ⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC</i>	-	-	++
Control 6 ³	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceA</i>	-	-	-
Complementación 14 ³⁻⁸	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	-	✚*	+
Complementación 15 ³⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceA</i>	-	-*	-
Complementación 16 ³⁻¹¹	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	-	-	✚
Complementación 17 ³⁻⁹	<i>mceG</i>	<i>cvaA mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	-	-	-
Complementación 18 ⁴⁻¹¹	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	2x <i>mceF</i>	+++	✚✚✚
Complementación 19 ⁴⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceA</i>	2x <i>mceF</i>	+++	-
Complementación 20 ⁴⁻⁹	<i>mceG</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	2x <i>mceF</i>	+++	✚✚✚

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. ✚ Actividad bactericida secretada por la complementación funcional entre exportadores heretólogos. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: + Halo de <2 mm de diámetro; ++ Halo de 2-10 mm de diámetro; +++ Halo de >10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. * Resultado confirmado por SDS-PAGE en que se observa la presencia o ausencia de microcina extracelular, dependiendo de la complementación. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

microcina y de la colicina V, exportan ambas bacteriocinas y en mayor cantidad (complementaciones 18, 19 y 20).

Exportación a través de sistemas transportadores heterólogos: dobles mutantes en los genes de exportación. Los experimentos descritos arriba fueron realizados usando plásmidos con mutaciones en un solo gen de transporte, ya sea en el sistema de la microcina como en el de la colicina V. Es interesante también estudiar la exportación de ambas bacteriocinas utilizando plásmidos que llevan mutaciones en dos genes transportadores: *mceGH⁻* y *cvaBA⁻*, ya que de esta manera se puede saber si MceGH puede complementar a CvaBA y viceversa. Para realizar estas complementaciones fue necesario construir dos plásmidos que tienen una mutación doble por delección (plásmido pA1 cuyo genotipo es *mceGH⁻ mceABCDEFGHIJ⁺*) y una triple también por delección (plásmido pB40, con genotipo *mceFGH⁻ mceABCDEIJ⁺*). Con los plásmidos obtenidos se procedió a realizar nuevos experimentos de transformación utilizando el procedimiento ya descrito. Los resultados mostrados en la Tabla 10 fueron notables:

1. La microcina E492 utiliza los transportadores de la colicina V (CvaAB), solo si simultáneamente hay exportación de la colicina V (comparar complementación 21 con 22 y 23 con 24, Tabla 10, ver más atrás Figura 16). Aparentemente la colicina V "arrastraría" a la microcina hasta el medio extracelular. Esto se puede explicar entendiendo que la colicina V una vez que se pone en contacto con su

Tabla 10. Secreción de microcina E492 y colicina V a través de transportadores heterólogos con dobles mutantes en los genes de exportación.

Casos	Genes de proteínas exportadoras		Gen estructural	Gen <i>mceF</i>	Actividad bactericida	
	Transportador ABC	Proteína accesoria			Microcina E492	Colicina V
Complementación 21 ¹³⁻⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	+	++
Complementación 22 ¹³⁻	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>mceA</i>	<i>mceF</i>	-*	-
Complementación 23 ¹⁴⁻⁸	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>cvaC mceA</i>	-	+	++
Complementación 24 ¹⁴⁻	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	<i>mceA</i>	-	-	-
Complementación 25 ¹²⁻¹	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>mceF</i>	-	++
Complementación 26 ¹²⁻⁵	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC</i>	<i>mceF</i>	-	++
Complementación 27 ¹²⁻³	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	-	-	-
Complementación 28 ¹²⁻⁴	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>cvaC mceA</i>	<i>2xmceF</i>	+++	+++

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. + Actividad bactericida secretada utilizando sus propios transportadores. + Actividad bactericida secretada por la complementación funcional entre exportadores heretólogos. - No se detecta actividad bactericida extracelular. Los tamaños de los halos fueron: + Halo de <2 mm de diámetro; ++ Halo de 2-10 mm de diámetro; +++ Halo de >10 mm de diámetro. La Tabla es representativa de cuatro experimentos independientes. * Resultado confirmado por SDS-PAGE en que observa la presencia o ausencia de microcina extracelular, dependiendo de la complementación. Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 y *E. coli* MC4100.

respectiva translocasa (CvaB), ésta recluta los demás integrantes del sistema exportador para formar un complejo activo en forma de túnel, a través del cual la microcina puede acceder al espacio extracelular en conjunto con la colicina V. Este mecanismo de exportación de los transportadores ABC ha sido postulado y estudiado en el sistema de la α -hemolisina (Koronakis *et al.*, 2000). Este resultado es consistente con lo observado en la complementación 14, Tabla 9).

2. La microcina E492 prescinde de MceF cuando utiliza los transportadores de la colicina V para su secreción (comparar complementación 23 con 21). Esto implica que el transportador ABC de colicina V realizaría el procesamiento proteolítico de la microcina.

3. La colicina V interfiere con la exportación de la microcina aún a través de sus propios transportadores (complementación 25, Tabla 10). Este resultado confirma nuevamente los datos obtenidos en las complementaciones 6 (Tabla 6) y 10 (Tabla 7), que indican que la colicina V dificulta la exportación de la microcina.

4. Por último, las complementaciones 26, 27 y 28 confirman que la colicina V requiere de MceF para su exportación a través de los transportadores MceGH.

4. EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS QUIMERAS.

Contrariamente a la similitud que existe entre las proteínas transportadoras MceGH y CvaBA, la secuencia primaria de aminoácidos de la microcina es muy diferente a la secuencia de la colicina V. La semejanza más significativa se encuentra a nivel del péptido líder (Figura 17). Ambas bacteriocinas poseen un péptido líder del tipo doble glicina que es cortado por su respectivo transportador ABC concomitantemente con la exportación. Sin embargo para el caso de la microcina es posible que el gen *mceF* también intervenga en este proceso en forma indirecta, por los antecedentes detallados en la Introducción y los resultados mencionados anteriormente. Los experimentos que se describen a continuación tratan de establecer la relación que tiene MceF con el péptido líder de la microcina, con su propio sistema exportador y con el de la colicina V.

Se construyeron proteínas quimeras en las cuales el péptido líder de la colicina V se fusionó a la versión madura de la microcina y viceversa. Para conseguir estas proteínas se siguió una estrategia de amplificación en dos pasos detallada en Materiales y métodos. La forma de construcción de estas proteínas quimeras implicó alterar el mecanismo de expresión traduccional del sistema ya que se colocó una secuencia Shine-Dalgarno (SD) de consenso en frente del gen *mceA*, lo que provocó su sobreexpresión. Fue necesario hacer esta manipulación pues los genes *mceA* y *mceB* están en un operón y solapados, por tanto se desplazó la secuencia de *mceA* río abajo para dejar intacto el gen

Péptido líder

```

cvaC  --MRTLTLNELDS-VSGGASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHK
mceA  MELRMREISQKDLNLAFGAGETDPNTQLLNDLGNNMAWG---AALGAPGG--LGSAAALGA
      :*  :: *  :: **  *  : .  * : * *  ** *..**  . *:

cvaC  PNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPS-----EAWNYAAGRLCNWSPNNLSDVCL
mceA  AGGALQTVGQG-LIDHGPNVPIPVLIQPSWNGSGSGYNSATSSSSGSGS--
      .. *:.. * ~ *.: + .:*  :** :.. . :... *.

```

Figura 17. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la microcina y de la colicina V, utilizando el programa CLUSTAL W. La secuencia del péptido líder está destacadas por la línea. * indica la posición en la que se encuentra un residuo idéntico; : indica la posición en la que existe un residuo sustituido por otro fuertemente conservado y . indica la posición en la que un residuo está sustituido por otro débilmente conservado.

de la inmunidad (*mceB*) asegurando de esta manera que la cepa sea resistente a la acción de la microcina. Así mismo fue necesario agregar la secuencia SD para cerciorarse que ocurra la traducción de las proteínas quimeras, puesto que *mceA* no tiene un adecuado sitio SD. La sobre-traducción del gen *mceA* tuvo efectos dañinos sobre la célula hospedera provocando su muerte. Este problema fue solucionado introduciendo un tercer plásmido (p157) que lleva el gen de la inmunidad *mceB*, de modo que aumenta la cantidad de esta proteína.

Los plásmidos (ver Tabla 2, en Materiales y métodos) que llevan los genes para producir las proteínas quimeras se introdujeron a células que tienen el sistema genético de la microcina (*mceA⁻ mceBCDEFGHIJ*), de la colicina V (*cvaC⁻ cvi cvaBA*) o de ambos para analizar si estas proteínas pueden ser exportadas y procesadas. En presencia de MceF, la microcina quimera únicamente puede ser exportada por los aparatos transportadores MceFGH y CvaBA en conjunto (Tabla 11). Por su lado, la colicina V quimera puede utilizar su propio aparato exportador para salir al medio extracelular (relacionar los casos de la Tabla 11 con la Figura 18).

En forma paralela, se construyó un plásmido doble mutante en los genes *mceAF*, denominado pC1220, a partir de un plásmido mutante por delección en el gen *mceF* y otro mutante por transposición en el gen *mceA*. Este plásmido constituye el fondo adecuado para complementar con los plásmidos que llevan los genes de las proteínas quimeras y ver la influencia del producto génico de

Tabla 11. Exportación de proteínas quimeras a través del aparato transportador ABC de la microcina E492 y la colicina V.

Proteína quimera (casos)	Genes de proteínas exportadoras		Gen <i>mceF</i>	Actividad	
	Transportador ABC	Proteína accesoria		Microcina E492	Colicina V
I. Microcina-PLCoIV ¹⁶⁻⁵	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceF</i>	-	-
II. Microcina-PLCoIV ¹⁶⁻⁵⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceF</i>	+	-
III. Microcina-PLCoIV ¹⁶⁻¹⁰	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	-	-	-
IV. Colicina V-PLMce ¹⁷⁻⁵⁻¹⁰	<i>mceG cvaB</i>	<i>mceH cvaA</i>	<i>mceF</i>	-	-
V. Colicina V-PLMce ¹⁷⁻¹⁰	<i>cvaB</i>	<i>cvaA</i>	-	-	+
VI. Colicina V-PLMce ¹⁷⁻⁵	<i>mceG</i>	<i>mceH</i>	<i>mceF</i>	-	-

La actividad bactericida se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento (halo) que producen las bacteriocinas en céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. Los tamaños de los halos fueron: + Halo de ≤ 2 mm de diámetro. Todas las cepas co-transformadas con los sistemas exportadores de microcina, colicina V y proteínas quimeras mostradas en esta Tabla llevan además de los genes señalados, los genes necesarios para activar a la microcina (*mceCDEIJ*) y para conferir inmunidad a la acción bactericida de las bacteriocinas (*mceB* para el caso de la microcina y *cvi*, para colicina V). Los números en superíndice corresponden a los plásmidos utilizados en estos ensayos de acuerdo a la Tabla 2 (ver Materiales y Métodos) y las cepas hospederas de estos plásmidos son *E. coli* VCS257 o *E. coli* MC4100.

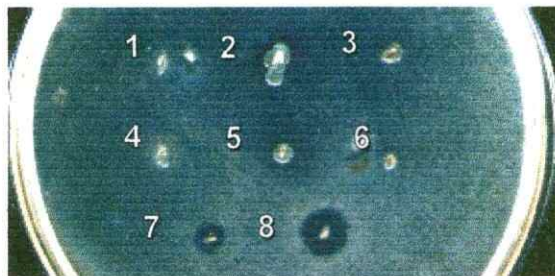


Figura 18. Actividad bactericida debida a la exportación de las proteínas quimeras microcina-péptido líder de colicina V y colicina V-péptido líder de microcina. Se depositaron sobre un césped de *E. coli* BL21 células que llevan los siguientes plásmidos: **1.** pJAC1-7, np220 (microcina quimera, caso I); **2.** pJAC2-12, pHK22-6 (colicina V quimera, caso II); **3.** pJAC1-7, pHK22-6 (colicina V quimera, caso III); **4.** pJAC2-12, np220 (microcina quimera, caso IV); **5.** pJAC1-7, np220, pHK22-6 (microcina quimera, caso V); **6.** pJAC2-12, np220, pHK22-6 (colicina V quimera, caso VI). **7.** pHK22 (colicina V silvestre); **8.** pJAM434 (microcina silvestre).

mceF. Esta doble mutante es muy delicada ya que muestra un crecimiento lento y colonias muy pequeñas. Cuando a las células portadoras del plásmido pC1220 se les introdujeron los plásmidos que tienen los genes que codifican para las proteínas quimeras en experimentos independientes, las células resultaron ser inviables, no así las células control que tienen el plásmido pC1220 y el vector (pSC101).

Postulamos que ocurría una acumulación tóxica de la bacteriocina dentro de la célula, y esta sería la causa de inviabilidad.

5. FUNCIÓN DEL PÉPTIDO LÍDER EN LA EXPORTACIÓN DE LA MICROCINA E492.

La señal de secreción de algunas proteínas exportadas por transportadores ABC está localizada en el extremo C-terminal, como es el caso de la α -hemolisina, en contraste con otras bacteriocinas, como la colicina V, en que la señal para su exportación está ubicada en el péptido líder. Dada la semejanza que existe entre los transportadores de la microcina y la colicina V y que ambas bacteriocinas tienen un péptido líder del mismo tipo, se puede inferir que el péptido líder de la microcina dirige su exportación. Para determinar si la señal de exportación localizada en el péptido líder de la microcina es indispensable para la exportación, se clonó el gen de la microcina sin péptido líder en un vector (pBAD33) cuyo promotor es inducido por arabinosa y es completamente reprimido por glucosa lo que permite modular la expresión del gen que se desea

clonar (Guzmán *et al.*, 1995). pBAD33 es útil para hacer experimentos de complementación ya que es compatible con plásmidos que llevan los genes del sistema de microcina. Como control se clonó además el mismo gen pero con la secuencia correspondiente al péptido líder.

Las células que recibieron por electroporación la construcción pBAD33-MceA sin el péptido líder se crecieron inicialmente en medio mínimo adicionado con glucosa para detener la expresión del gen y de esta manera evitar un posible efecto letal que la microcina sin péptido líder pudiera ocasionar a la célula. La expresión del gen *mceA*-sin péptido líder se indujo trasladando a las células del medio con glucosa a otro con arabinosa de acuerdo al protocolo seguido por Guzmán y colaboradores (1995). Cuando se mantenían estos cultivos en el tiempo, únicamente sobrevivieron las células que lograron reorganizar su DNA, excluyendo el fragmento que contiene el gen de la microcina, ya que se observa un patrón de restricción diferente al esperado. Esto indica claramente que la microcina sin péptido líder ejerce un efecto deletéreo sobre la célula huésped. Este resultado fue corroborado al tratar de clonar el mismo gen en otros vectores (pSC101 y pCG1921) que no poseen un promotor cuya expresión se pueda reprimir completamente. En estos casos, la expresión basal del gen *mceA* es causal de muerte celular, debido a que nunca se pudo obtener el patrón de restricción esperado al intentar construir las mutantes de microcina sin péptido líder en los vectores pSC101 y pCG1921.

Para determinar si la microcina sin péptido líder puede ser exportada, se complementó esta construcción con el plásmido np220. El plásmido np220 lleva todos los genes del sistema, excepto el gen estructural ($mceA^-$, $mceBCDEFGHIJ^+$), ya que contiene una inserción del transposón Tn5 en el gen $mceA$, concretamente en el nucleótido 132, que equivale al aminoácido 44 de la microcina.

Así, cuando se complementa la construcción microcina-sin-péptido-líder-pBAD33 con el plásmido np220 la microcina sin péptido líder no puede ser exportada (Tabla 12). El control correspondiente fueron las células que portan el gen de la microcina con péptido líder en pBAD33 y además el plásmido np220. Al inducir estas células con arabinosa, se produce microcina extracelular (Tabla 12). De esta manera queda experimentalmente demostrado que el péptido líder es necesario para la exportación de la microcina y que el péptido líder evita el efecto tóxico de la microcina sobre la célula.

Por último, se repitieron estos experimentos en un fondo sin MceF utilizando el plásmido pC1220 ($mceAF^-$, $mceBCDEFGHIJ^+$). Como muestra la Tabla 12, la microcina no fue exportada por esta cepa, sino mas bien, otra vez se observó un efecto deletéreo de la microcina sin péptido líder sobre las células ya que éstas tienden a lisarse espontáneamente y a crecer muy pobremente.

Tabla 12. Estudios de exportación realizados con microcina con y sin péptido líder.

Plásmido	Cepa huésped			
	<i>E coli</i> VCS257 np220		<i>E coli</i> VCS257 pC1220	
	Actividad de microcina		Actividad de microcina	
	Condición reprimida	Condición inducida	Condición reprimida	Condición inducida
Vector pBAD33 (control)	-	-	-	-
Microcina con PL (control)	-	+	-	-
Microcina sin PL	-	*	-	*

La cepa de *E. coli* VCS257 que lleva el plásmido np220 o pC1220 fue utilizada como cepa huésped receptora de los plásmidos que portan el gen de la microcina con y sin péptido líder y del vector. La exportación de la microcina se determinó observando la zona de inhibición de crecimiento que producen las respectivas cepas como resultado de la actividad bactericida extracelular de la microcina sobre céspedes de cepas indicadoras de *E. coli*. Las cepas indicadoras empleadas son: BL21(DE3) sensible a la microcina y np220-pBAD33 resistente a la microcina. + Actividad bactericida secretada que forma un halo de 2-4 mm de diámetro. – No se detecta actividad bactericida extracelular. Las condiciones reprimida e inducida de expresión transcripcional del gen *mceA* se logró incluyendo en el medio de cultivo glucosa o arabinosa respectivamente. La Tabla es representativa de dos experimentos independientes. * Resultado confirmado por inmuno slot blot de medios sobrenadantes.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta Tesis indican que la microcina E492 utiliza un sistema de secreción del Tipo I conocido también como aparato transportador ABC para su procesamiento y exportación hacia el medio extracelular. El aparato transportador de la microcina E492 está constituido por las proteínas MceG y MceH que corresponden a la proteína transportadora ABC y la proteína accesoria (MFP), respectivamente y por una proteína de membrana externa (OMP) que en *E. coli* es TolC. Además en la exportación de la microcina E492 interviene un factor adicional, MceF, cuya función exacta se desconoce.

Los genes *mceF*, *mceG* y *mceH* están localizados en el sistema genético de la microcina, no así el gen que codifica al tercer componente del aparato transportador, la OMP. Algunas proteínas que son exportadas por medio de un aparato transportador ABC utilizan OMPs cuyos genes no forman parte del sistema genético propio de la proteína, como ocurre con la α -hemolisina y la colicina V. En estos casos ambas toxinas utilizan a TolC como el componente de membrana externa (Wandersman y Delepelaire, 1990; Gilson *et al.*, 1990). En cambio, otras proteínas poseen dentro de su grupo de genes uno que codifica para la respectiva OMP, como es caso del sistema genético de las proteasas de *Erwinia chrysanthemi*, donde el gen *prtF* codifica para la OMP y está localizado junto a los genes de transporte *prtD* y *prtE* (Létoffé *et al.*, 1990). Otro ejemplo que ilustra a este último grupo es HasF, la OMP del sistema

transportador HasDE encargado de secretar al hemóforo HasA producido por *Serratia marcescens* (Binet y Wandersman, 1996). Frecuentemente la OMP codificada por un gen localizado dentro del grupo de genes del sistema transportador de estas proteínas es homólogo a TolC, como ocurre con PrtF y HasF (Andersen *et al.*, 2000).

El estudio de las cepas mutantes [(pC1 (*mceF*⁻), np108 (*mceG*⁻) y np203 (*mceH*⁻)] junto con el análisis de la secuencia de MceF, MceG y MceH indican que estas proteínas están involucradas en la exportación de la microcina.

Las mutantes *mceG*⁻ y *mceH*⁻ no muestran actividad microcina extracelular ni son capaces de exportar el péptido microcina (confirmado por SDS-PAGE y western blot). Cuando se purificó microcina a partir de sobrenadante de mutantes en MceF, se observó que en un porcentaje significativo de preparaciones ($\approx 50\%$) se encontraba un péptido de mayor tamaño que la microcina silvestre que fue identificado como el precursor de la microcina, por análisis de western blot. Este precursor se encontraba en menor cantidad y no es claro si es secretado por la célula o es liberado al espacio extracelular producto de lisis bacteriana.

Por otro lado la microcina purificada a partir de extractos celulares de mutantes pudo ser identificada con la ayuda de anticuerpos y está presente en muy pocas cantidades. La pequeña fracción de microcina detectada y recuperada para su purificación puede corresponder a aquella que quedó atrapada en la membrana

interna y/o en el periplasma. La escasez de microcina de extractos celulares encontrada en estas mutantes probablemente se deba a que el recambio de esta clase de péptidos antibióticos es muy rápido dentro de la célula, puesto que, en nuestro caso, una acumulación de microcina podría ejercer una acción nociva en contra de la célula, como indican algunos experimentos que son discutidos a continuación. Un fenómeno similar ha sido observado en la colicina V, que sufre una degradación en el citoplasma de células mutantes en los genes transportadores *cvaB* y *cvaA* (Zhang *et al.*, 1995).

Existe una diferencia notable entre la microcina y la colicina V intracelular presente en las mutantes *mceF*⁻, *mceG*⁻ y *mceH*⁻: se puede detectar colicina V activa en el citoplasma (Zhang *et al.*, 1995), en cambio, no se ha encontrado microcina intracelular activa. En estas condiciones, la colicina V intracelular no posee un efecto deletéreo sobre células de cepas *cvaBA*⁻ (Zhang *et al.*, 1995), mientras que al contrario, la microcina aparentemente si lo posee en mutantes *mceF*⁻, *mceG*⁻ y *mceH*⁻ en *E. coli*. Una excesiva producción de microcina puede afectar a la célula como se ha visto en los experimentos de proteínas quimeras. Los genes que codifican las proteínas quimeras (experimento que se discutirá más adelante) fueron clonados de tal manera que se incrementó su traducción, lo que provocó una sobre producción de proteínas quimeras. Es decir, en el procedimiento seguido para realizar el intercambio de los péptidos líder entre ambas bacteriocinas (ver Figura 4) se manipuló el sitio de unión al ribosoma colocando una secuencia de consenso para comandar la traducción

de los genes estructurales de la microcina y de la colicina V dado que éstos y los de inmunidad (*mceAB* y *cvaC cvi*, respectivamente) están en operón, sus secuencias están solapadas y no es claro cual sería el sitio de unión al ribosoma. El plásmido que lleva el gen de la microcina quimera no pudo ser transformado a células VCS257pHK22-6 (*cvi*, *cvaAB*), pero si a células VCS257pHK22-6p157. En este caso, fue necesario agregar un plásmido extra (p157) que lleva el gen de la proteína de inmunidad (*mceB*) para proveer a la célula un número mayor de copias de MceB de tal manera de protegerla y evitar su daño por la microcina. En este experimento, el daño producido por el exceso de microcina intracelular puede deberse a que afecta funciones generales de la célula. Sin embargo, el efecto protector que brinda la proteína MceB sugiere preferentemente que la microcina puede exhibir una actividad bactericida desde el interior de la célula lo que afectaría su integridad. Por el contrario, la colicina V quimera no necesitó copias extras de su proteína de inmunidad (Cvi). Este hecho es apoyado por las observaciones de Zhang y colaboradores (1995) que indican que cuando la colicina V se acumula en el citoplasma de células mutantes en los transportadores, no se requiere la acción de la proteína de inmunidad para protegerlas de la posible acción tóxica de la colicina V. Así la colicina V solo tiene actividad bactericida desde la cara periplasmática de la membrana citoplasmática (Zhang *et al.*, 1995).

Los resultados discutidos en el párrafo anterior confirman que existen diferencias propias entre la microcina y la colicina V no solo a nivel de

secuencia primaria (ver Figura 17) sino también a nivel del mecanismo de inmunidad y de secreción. Respecto al mecanismo de exportación de la microcina hay que destacar que las secuencias de las proteínas transportadoras MceG y MceH son singularmente parecidas a CvaB y CvaA, las proteínas transportadoras de la colicina V. Ante este hecho buscamos evidencia que indique la existencia de semejanza a nivel funcional entre el sistema transportador ABC de la microcina y el de la colicina V. Los resultados fueron sorprendentes ya que aún cuando la similitud de ambos sistemas es muy alta, la complementación funcional entre ellos no es recíproca. La microcina no puede emplear a CvaB en cambio la colicina V si puede salir al medio a través de MceG (ver resultados de Tabla 6). Por otro lado, CvaA complementa parcialmente a MceH para la exportación de la microcina, mientras que la colicina V puede utilizar a MceH para su exportación (ver resultados de Tabla 7). Un fenómeno similar ha sido descrito en experimentos de transportadores heterólogos constituidos por los sistemas de α -hemolisina y de colicina V. El aparato transportador ABC de la α -hemolisina o algún componente de éste permite la exportación de la colicina V mientras que por el contrario la α -hemolisina no puede utilizar el sistema CvaBA (Fath *et al.*, 1991). Otro ejemplo lo constituye las proteínas del aparato transportador de *S. marcescens* que son capaces de transportar la metaloproteasa C de *E. chrysanthemi* y a su propio sustrato, HasA_{SM}. Sin embargo, el sistema transportador de *E. chrysanthemi* PrtDE no es capaz de transportar a HasA_{SM} (Binet y Wandersman, 1995). En

experimentos de transportadores heterólogos, el aparato transportador de *S. marcescens* además de secretar su propia proteína, exporta las producidas por *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa*, HasA_{PF} y HasA_{PA}, sin embargo HasA_{SM} no puede utilizar los transportadores de las *Pseudomonas* mencionadas (Idei *et al.*, 1999). Aún más, solo los transportadores formados por componentes del mismo sistema (HasD_{SM}-HasE_{SM}-TolC o HasD_{PF}-HasE_{PF}-HasF_{PF}) son capaces de secretar HasA_{PF} ya que los transportadores híbridos HasD_{SM}-HasE_{PF}-HasF_{PF} no lo hacen (Idei *et al.*, 1999). Estos experimentos apoyan la idea ampliamente aceptada que establece que la proteína ABC es el componente del sistema transportador encargado de reconocer y discriminar al sustrato (Binet y Wandersman, 1995; Holland y Blight, 1999). Nuestros experimentos también confirman esta afirmación ya que la microcina no puede ser exportada a través de CvaB en cambio puede usar parcialmente CvaA para salir hacia el medio extracelular. Esto sugiere que el componente del sistema transportador que está encargado de reconocer al sustrato es mayormente la proteína ABC (MceG) que la proteína accesoria (MceH).

Podemos señalar que las pequeñas diferencias que existen entre las secuencias primarias de los sistemas transportadores de la microcina y la colicina V darían cuenta de diferencias a nivel funcional. Es interesante tratar de distinguir cuales son los residuos o regiones de las proteínas transportadoras MceGH y CvaBA que determinan estas diferencias funcionales. Una información útil que puede ayudar a responder esta pregunta es la que

encontramos en los resultados mostrados en la Tabla 8. En ella se muestra la exportación de la colicina V a través del aparato transportador híbrido MceG-CvaA, y no así a través del par CvaB-MceH. Esto sugiere que existe una interacción efectiva entre MceG y CvaA para la exportación de al menos una de las bacteriocinas en estudio. Es ampliamente aceptado el hecho que la MFP está formando un complejo proteico con la proteína ABC en los aparatos transportadores ABC (Létoffé *et al.*, 1996; Thanabalu *et al.*, 1998). Así por ejemplo, si hacemos referencia a los trabajos realizados en uno de los aparatos transportadores ABC más estudiados, el de la α -hemolisina, podemos señalar que la proteína accesoria (HlyD) está en contacto con la proteína ABC (HlyB) formando un complejo proteico estable (Thanabalu *et al.*, 1998). HlyD interacciona a través de su extremo C-terminal con el aminoácido 313 de HlyB (Schlör *et al.*, 1997) que está localizado en el sexto segmento de transmembrana, de acuerdo al modelo de Holland y Blight (1996) y a la predicción realizada empleando el programa Sosui¹. Cabe la posibilidad también que HlyD interaccione con otras regiones de HlyB (Schlör *et al.*, 1997). Dado que MceG y CvaB pertenecen a la misma familia de transportadores ABC de HlyB con el cual son homólogos y que a su vez ocurre lo mismo con MceH y CvaA en relación a HlyD, podemos inferir que el extremo C-terminal de MceH y CvaA interacciona con algún segmento de transmembrana de MceG y CvaB, respectivamente. En efecto, Hwang y colaboradores (1997) demostraron que

¹ El programa SOSUI es útil para la clasificación y predicción de estructura secundaria de proteínas de membrana (Hirokawa *et al.*, 1998).

existe interacción física entre CvaB y CvaA. Por tanto no sería extraño suponer que el extremo C-terminal de MceH interaccione con alguna hélice de transmembrana de MceG. Los diagramas predichos en la figura 6c y el alineamiento de la secuencia de MceG con HlyB nos ayudan a proponer que MceH interaccionaría con el segmento de transmembrana número 5, con el número 6 o con el "loop" periplasmático que los interconecta. Si buscamos la explicación que responda a la falta de reciprocidad funcional entre los sistemas transportadores de microcina y colicina V podemos observar que las únicas diferencias potencialmente significativas a nivel de organización secundaria se encuentran en las proteínas ABC (MceG y CvaB) y no en las MFP (MceH y CvaA). Los muy pequeños cambios que existen en las secuencias aminoacídicas pueden influir en la conformación estructural de las hélices de transmembrana de MceG y CvaB. Las diferencias que existen entre los segmentos de transmembrana se encuentran únicamente en las hélices 1 y 6 (Figura 6c y 19). Así la interacción CvaB-MceH sería defectuosa debido probablemente a que el extremo C-terminal de MceH no encuentra el segmento de transmembrana correspondiente en CvaB (como se discute más adelante) o que este segmento tiene una diferente disposición estructural que no permite una interacción efectiva impidiendo la consecuente exportación del sustrato.

Con el fin de encontrar respuesta a las diferencias funcionales se hizo un análisis exhaustivo de los pocos aminoácidos en que difieren las secuencias de MceG y CvaB. Encontramos que en la posición 174 se encuentra un residuo no

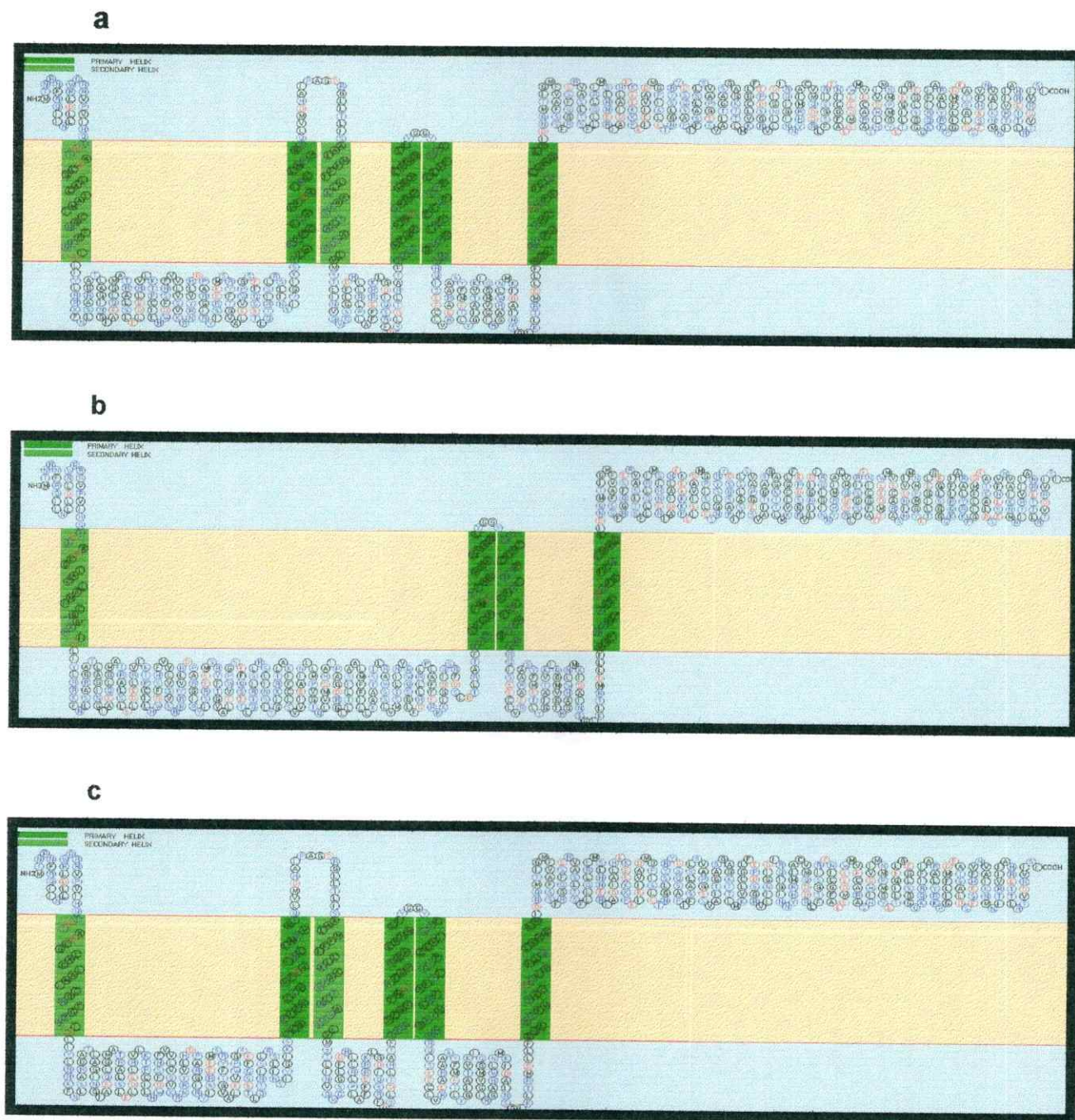


Figura 19. Representación del número y disposición de las hélices de transmembrana predichas con el programa SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) que posee **a)** MceG, **b)** CvaB y **c)** CvaB con el cambio de una arginina por una serina en el sitio 174 de la secuencia proteica. Las hélices de transmembrana están destacadas en color verde y la membrana interna en color pardusco.

cargado (serina) en el caso de MceG y uno cargado (arginina) en el caso de CvaB. El análisis topológico teórico predice que MceG tendría seis fragmentos de transmembrana, no así CvaB que solo poseería cuatro (Figura 6c y 19). Si de manera arbitraria cambiamos la arginina 174 de CvaB por una serina, el estudio prevee que esta proteína podría tener seis hélices de transmembrana (Figura 19c). Por tanto, el residuo 174 puede influir en el arreglo de las hélices de transmembrana 2, 3, 4, 5 y 6 de CvaB y por consiguiente en la conformación de la cámara que recibe al sustrato para su secreción. Los estudios estructurales de MsbA, un transportador ABC de *E. coli* encargado de exportar al lípido A, indican que la cámara que recibe transientemente al sustrato antes de su paso hacia la OMP está formado por algunos aminoácidos presentes en los segmentos de transmembrana (Chang y Roth, 2001). En otras palabras, los segmentos de transmembrana juegan un importante papel en la formación de la cámara y en los cambios conformacionales que sufre la proteína ABC durante el reconocimiento, unión y transporte del sustrato (Higgins y Linton, 2001; Chang y Roth, 2001). Ante estas evidencias no resulta fácil descartar la posibilidad que las diferencias funcionales entre MceG y CvaB están determinadas por la naturaleza y posición de algunos aminoácidos claves (como el residuo 174) que determinarían el número y la disposición tridimensional de las hélices de transmembrana lo que a su vez influye en organización de la cámara y en la interacción con la respectiva MFP.

Otro factor que puede determinar las diferencias funcionales entre MceG y CvaB en relación a la exportación de la colicina V y la microcina lo constituye las propiedades hidrofóbicas de estas proteínas. Como se ha detallado en la Introducción, los transportadores ABC de bacteriocinas que tienen un péptido líder del tipo doble glicina son más grandes que aquellos que transportan proteínas sin péptido líder. Havarstein y colaboradores (1995) encontraron que esta clase de transportadores poseen un dominio extra de aproximadamente 150 aminoácidos que está encargado de cortar el péptido líder en el momento de la exportación de los sustratos. Este dominio probablemente es el sitio donde se une la bacteriocina precursora y por tanto constituye otro nivel de reconocimiento del sustrato. Se ha propuesto que la naturaleza hidrofóbica del sustrato es un factor crítico para un eficiente transporte (van Belkum *et al.*, 1997; Hui y Ling, 2002). Comparando las propiedades hidrofóbicas de la microcina y la colicina V y de los primeros 150 aminoácidos de sus respectivos transportadores (empleando el algoritmo de Kyte y Doolittle, 1982) se puede apreciar que existen diferencias significativas en el nivel de hidrofobicidad. La colicina V y su respectivo transportador son relativamente más hidrofóbicos que la microcina y MceG, en aproximadamente diez veces.

Los resultados de esta Tesis indican que la colicina V puede emplear el transportador MceG como si fuera su propio transportador. Esto puede deberse a las características del reconocimiento por parte del complejo transportador MceG-MceH como también a las propiedades intrínsecas de la colicina V.

Sheps y colaboradores (1995) han propuesto que el reconocimiento del sustrato en los transportadores ABC ocurre a través de un mecanismo común que involucra regiones homólogas de las proteínas aun cuando el sustrato por si mismo no es muy conservado. En este sentido, el reconocimiento ocurriría por medio de varias interacciones con el sustrato (y/o péptido líder) que contiene señales múltiples y superpuestas. Los transportadores ABC son complejos versátiles demostrando que pueden transportar una no despreciable variedad de sustratos diferentes o mutantes del sustrato original como ocurre con HlyB (Hui y Ling, 2002). Por su lado, la colicina V es aparentemente una molécula muy dócil en cuanto a su secreción. Para salir al medio extracelular la colicina V puede emplear su propio sistema transportador o aparatos heterólogos como el de la α -hemolisina, de la proteasa de *E. chrysanthemi* (Fath *et al.*, 1991), de la microcina H47 (Azpiroz *et al.*, 2001) y de la microcina E492. Esta propiedad de la colicina V se destaca claramente en los experimentos mostrados en la Tabla 5. Cuando los sistemas exportadores completos de la colicina V y de la microcina están presentes dentro de una misma célula, éstas pueden ser exportadas, sin embargo, se detecta una mayor actividad extracelular de la colicina V en desmedro de la microcina.

A diferencia de la exportación de la colicina V, la microcina E492 requiere su propio sistema transportador para su exportación. Esto se debe probablemente a que el aparato transportador de la microcina E492 es más complejo que el de otras bacteriocinas o toxinas descritas hasta el momento. Los resultados de la

Tabla 9 sugieren que interviene un factor adicional en la exportación de la microcina, la proteína MceF, la cual es imprescindible para la exportación de la microcina y aún de la colicina V vía MceGH. Aparentemente MceF actúa como un componente estructural del sistema exportador necesario para la secreción de las bacteriocinas y sería un factor limitante en la exportación de ambas bacteriocinas. Esta última afirmación es apoyada por los resultados obtenidos cuando se tiene una mayor cantidad de MceF dentro de la célula. Así, las células que llevan doble copia del gen *mceF* además de los otros genes del sistema de la microcina, o de la colicina V, exportan ambas bacteriocinas en elevada medida (complementaciones 18, 19 y 20, Tabla 9). La complementación 14 constituye un caso particular de estos experimentos ya que las células que portan el sistema completo de colicina V y solamente MceGH son capaces de exportar microcina y colicina V. La exportación de la colicina V en este caso ocurriría a través de su propio aparato transportador, dado que éste está completo. De manera similar, la microcina probablemente está usando el complejo CvaBA para su exportación, ya que, como se verá más adelante y en algunos casos muy definidos, la microcina puede salir al medio extracelular vía CvaBA. Más adelante se tratará con más detalle la posible función de MceF en ocasión de discutir el procesamiento del péptido líder de la microcina.

Los resultados de las complementaciones funcionales mostrados en la Tabla 10 fueron sorprendentes y aparentemente contradictorios a los resultados

previamente obtenidos. En estos se observa que la microcina puede emplear el sistema transportador de la colicina V y que puede prescindir de MceF para su secreción. Estos resultados pueden ser explicados de la siguiente manera: primero, es necesario destacar que el único aparato transportador presente en las complementaciones 21, 22, 23 y 24 (Tabla 10) es el de la colicina V y que por tanto no existe interferencia con otras proteínas transportadoras de microcina. Fath y colaboradores (1991) encontraron que la exportación de la colicina V a través de HlyBD o de PrtDEF fue mucho mayor cuando CvaB y CvaA estaban ausentes, demostrando así que la presencia de un sola proteína exportadora de colicina V interfiere con la exportación heteróloga; segundo, la microcina puede ser secretada a través de CvaBA únicamente cuando existe co-secreción con la colicina V (compárese las complementaciones 21 y 23 con las complementaciones 22 y 24, Tabla 10). Es decir, la microcina utiliza los transportadores CvaBA, solo si simultáneamente hay exportación de la colicina V (lo que implica que el gen *cvaC* está presente dentro de la célula y se expresa). Aparentemente la colicina V "arrastraría" a la microcina hasta el medio extracelular. Para aclarar esta expresión debemos entender el mecanismo de exportación de proteínas por los aparatos transportadores ABC. El modelo más sólido que detalla el proceso de exportación es el de la α -hemolisina (ver Figura 20): Las proteínas ABC y MFP (HlyBD) están formando un pre-complejo estable en la membrana interna. Cuando el sustrato se pone en contacto con el pre-complejo transportador, éste sufre un cambio

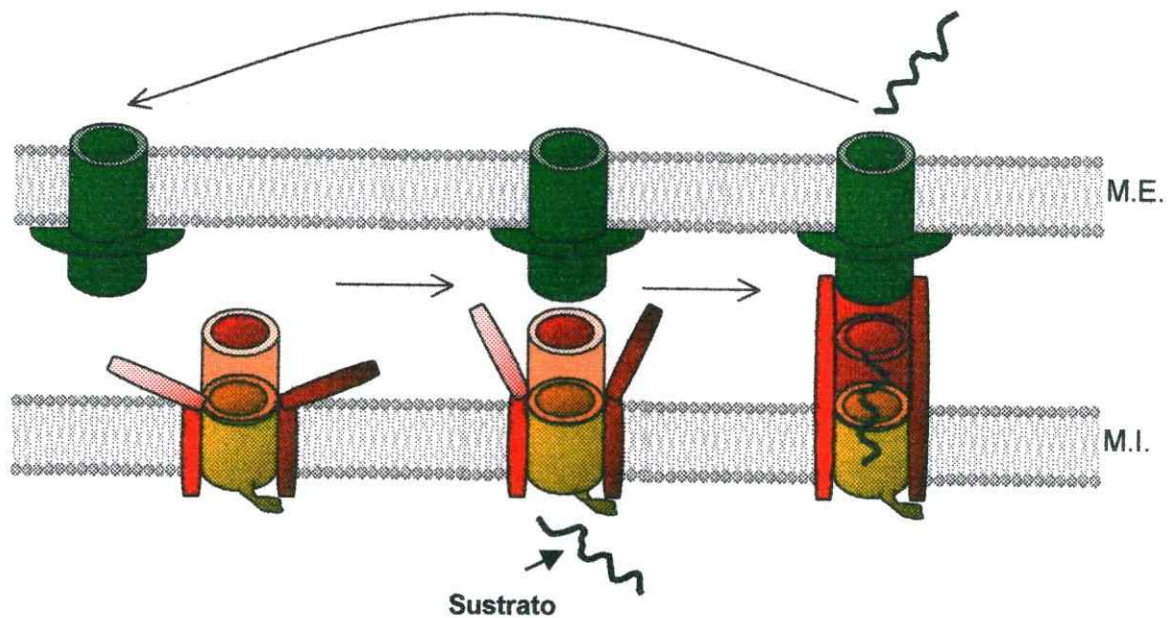


Figura 20. Representación de un modelo que indica la posible interacción reversible de TolC o sus homólogos (verde) con un complejo anclado en la membrana interna conformado por la proteína accesoria (rojo) y la proteína ABC (amarillo). El complejo pre-ensamblado es activado por el sustrato lo que permite reclutar la proteína TolC. La interacción de la proteína accesoria con TolC se realiza a través de sus correspondientes regiones "coiled coil" facilitando un cambio conformacional que establece un canal y abre la entrada por donde el sustrato atraviesa. La energía liberada en la hidrólisis del ATP es necesaria para la definitiva salida del sustrato. Seguidamente después del transporte, los componentes revierten al estado inactivo

conformacional que permite reclutar a la OMP (TolC) para conformar un canal en forma de túnel por donde el sustrato atraviesa. Este ensamble es transiente, cuando el sustrato termina de pasar por el canal, la maquinaria se desacopla y los componentes vuelven al estado inactivo. La energía liberada como resultado de la hidrólisis del ATP por parte del dominio de unión de ATP del transportador ABC interviene en gatillar los cambios conformacionales y en liberar al sustrato del sitio de reconocimiento del sustrato que posee el transportador ABC (Koronakis *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2000). Aplicando este modelo a nuestro estudio funcional, se puede entender que cuando la colicina V interacciona con su sistema transportador, el pre-complejo CvaBA se ensambla con TolC para formar un complejo activo que es capaz de transportar a la colicina V. En este estado la microcina podría así mismo utilizar el canal para salir al medio extracelular. Esta explicación es coherente ya que cuando no está presente la colicina V dentro de la célula (complementaciones 22 y 24, Tabla 10) no ocurre la exportación de la microcina.

En la Introducción de esta Tesis se ha postulado que el péptido líder de la microcina podría ser procesado por MceF o por MceG mientras ocurre la secreción. El resultado de la complementación 23 (Tabla 10) sugiere que la proteína que corta el péptido líder de la microcina es la proteína ABC, que en este caso es CvaB. En este experimento está ausente MceF y sin embargo la microcina extracelular es activa y del mismo tamaño relativo que el control (Tabla 10 y Figura 16). Esto apunta a que en este experimento CvaB está

realizando la función proteolítica que normalmente realiza MceG en el sistema transportador original de microcina.

Las proteínas que son exportadas a través de aparatos transportadores ABC poseen señales que dirigen su secreción. Estas señales comúnmente están situadas en el extremo C-terminal de la proteína (Koronakis *et al.*, 1989; Sheps *et al.*, 1995; Duong *et al.*, 1996), sin embargo, en las bacteriocinas con péptido líder del tipo doble glicina, los primeros aminoácidos el extremo N-terminal dirigen la secreción. Así por ejemplo el péptido líder funciona como señal de transporte del precursor de varias bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas y de colicina V (van Belkun *et al.*, 1997). En esta Tesis se demostró que el péptido líder de la microcina tiene esta función, y que además aparentemente protege a la célula de la acción tóxica de la microcina. Así, estos experimentos (ver Tabla 12) confirman que el péptido líder es requerido para mantener a las pre-bacteriocinas en estado inactivo (Venema, 1995). La necesidad que tienen las bacteriocinas de las señales de secreción contenidas en el péptido líder para su exportación es apoyada y estudiada con más detalle en los experimentos con proteínas quimeras.

Los experimentos de proteínas quimeras en los que se han intercambiado los péptidos líder de la microcina y la colicina V indican que los aminoácidos del péptido líder de la microcina que difieren de la secuencia consenso no son cruciales en la exportación de la microcina. La microcina quimera puede ser

exportada cuando ambos sistemas transportadores están presentes en la misma célula (ver caso II, Tabla 11). El hecho que la microcina quimera no pueda ser exportada por MceFGH o por CvaBA (ver casos I y III, Tabla 11) y que si lo hace por medio de la combinación de MceFGH y CvaBA, sugiere que los componentes de cada sistema transportador probablemente contactan entre si conformando un aparato "mixto" que, a su vez interacciona con sitios afines de la microcina quimera que permite su exportación. Por su lado, la colicina V quimera puede utilizar el aparato CvaBA para salir al medio extracelular. Este experimento indica que el péptido líder de la microcina puede ser reconocido por el aparato CvaBA, y por tanto la glicina -1 no es de mayor relevancia en la exportación de la colicina V y puede ser sustituida funcionalmente por la alanina. Trabajos que aparecieron posteriormente al inicio de esta Tesis informan que la posición -1 puede estar ocupada por una alanina como es el caso de varias proteínas producidas por *Xylella fastidiosa*, *P. aeruginosa* y por la microcina 24 de *E. coli* (Michiels *et al.*, 2001). Estos datos están de acuerdo con la noción cada vez más aceptada que indica que las señales de exportación no sólo se encuentran a nivel de secuencia primaria, sino también en la estructura y propiedades biofísicas que adopta la región que guía la secreción de la proteína (Izadi-Pruneyre *et al.*, 1999; Hui *et al.*, 2000; Hui y Ling, 2002). Así, los péptidos líder del tipo doble glicina comparten un alto grado de conservación asumiendo una estructura helicoidal que se conecta con la

porción madura de la bacteriocina por medio de una vuelta β (Fremaux *et al.*, 1993).

La presencia de la microcina sin péptido líder o de la microcina quimera en un fondo *mceAF*⁻ aparentemente daña la célula huésped. Las bacterias que recibieron el plásmido con el gen que codifica la microcina quimera no sobrevivieron, debido probablemente a la acumulación de microcina intracelular. Por otro lado, las células que llevan el plásmido con el gen de la microcina sin péptido líder crecieron pobremente y fueron propensas a lisarse. Estos experimentos confirman que el efecto dañino de ambas versiones de microcinas puede ser ejercido por la versión madura y no por la proteína precursora, desde el interior de la célula. Como se ha visto anteriormente, aparentemente MceF actúa como un factor que estimula la exportación (ver experimentos de transportadores heterólogos, Tabla 9), y al no estar presente, la microcina no puede ser exportada y queda acumulada en el interior de la célula. Sin embargo, MceF también podría intervenir en procesos relacionados con la inmunidad a la actividad microcina, de una manera todavía desconocida.

Como se ha mencionado anteriormente, la microcina sufre un procesamiento proteolítico antes de salir al espacio extracelular, pudiendo ser el transportador ABC (MceG), la proteína adicional (MceF) o ambas, las encargadas de realizar el corte del péptido líder. Los resultados presentados en esta Tesis muestran que MceG juntamente con MceF intervienen en el procesamiento de la

microcina. MceG participa en el procesamiento de la microcina directamente como lo muestran los estudios de western blot de lisados totales y de microcina intracelular purificada. Este resultado es confirmado por el experimento de transportadores heterólogos (ver complementación 23, Tabla 10), en el cual la microcina precursora fue cortada por el transportador CvaB, proteína que procesa a la colicina V (Gilson *et al.*, 1990, Zhang *et al.*, 1995). Los resultados presentados en la figura 13 y la complementación 23 (Tabla 10) no son sorprendentes ya que la secuencia de MceG (Figura 5a) sugería fuertemente que esta proteína estaba encargada de procesar el péptido líder. MceG posee el dominio citoplásmico extra en el extremo N-terminal así como algunos aminoácidos conservados (una cisteína y una histidina) que formarían parte del sitio activo de la enzima (Havarstein *et al.*, 1995).

Los experimentos mostrados en las figuras 12 y 14c indican que MceF también participa en el procesamiento de la microcina precursora. MceF no interviene regulando la expresión transcripcional del gen estructural ni de los genes transportadores como lo demuestran los experimentos de transcripción reversa acoplada a PCR (Figura 10a-b), sino más bien en el procesamiento de la microcina. Sin embargo, no se puede descartar además un rol regulatorio a nivel post-transcripcional ya que las mutantes *mceF*⁻ suelen perder la inmunidad a la microcina en células en fase estacionaria. ¿Qué función específica tiene MceF en el procesamiento de la microcina? Los experimentos realizados en esta Tesis no responden completamente a esta pregunta, sin

embargo algo se puede comentar al respecto. Los experimentos de fraccionamiento subcelular mostraron que se pudo detectar el precursor de la microcina únicamente en el citoplasma de la cepa *mceF*⁻ y no así en el citoplasma de las demás mutantes (*mceG*⁻, *mceH*⁻) o de los controles. Como se ha comentado anteriormente, aparentemente el recambio de la microcina en estas mutantes es comúnmente rápido probablemente para evitar posibles efectos tóxicos de la acumulación de microcina intracelular. Cabe hacer notar que los experimentos de fraccionamiento subcelular se realizaron en un lapso de tiempo mayor que 15 min lo que da cuenta del posible degradación de la microcina intracelular. Al ser MceF una proteína residente de membrana, posiblemente está interaccionando con MceG y/o MceH formando un complejo proteico que está encargado de la exportación de la microcina. No se ha comprobado aún la interacción MceF-MceG o MceF-MceH, sin embargo, MceF podría intervenir en el reconocimiento de la microcina precursora conjuntamente con MceG y permitiría o facilitaría que el dominio de líder-peptidasa de MceG se encuentre con la microcina precursora. Es decir, MceF 'presentaría' la microcina al transportador MceG. Este comentario surge del hecho que en ausencia de MceF la microcina aún reside en el citoplasma y en cambio en las mutantes *mceG*⁻ y *mceH*⁻ donde MceF está intacto, la microcina se encuentra retenida en la membrana interna de la bacteria.

A pesar que el sistema exportador de la colicina V no tiene una proteína similar a MceF, se ha descrito que la proteína CvpA podría interferir en este sistema

exportador y/o podría estar directamente involucrada en la expresión de algunos genes. CvpA está codificada por un gen ubicado en el cromosoma de *E. coli* y sería requerida bajo ciertas condiciones de crecimiento bacteriano (Fath *et al.*, 1989). Aunque las secuencias de CvpA y MceF no presentan identidad significativa entre si, ambas son proteínas de membrana y se ha postulado que comparten una función común (Braun *et al.*, 2002)

Lagos y colaboradores (2002), postularon que durante la exportación, la microcina podría ser activada por los productos de los genes *mceC*, *mceI* y *mceJ*. Alguna de las proteínas MceC, MceI o MceJ (o todas) podrían servir como chaperonas moleculares que promueven la conformación activa de la microcina durante su exportación. Esta idea toma mayor fuerza si tomamos en cuenta que algunas proteínas que son exportadas por medio de aparatos transportadores ABC requieren de la intervención de una chaperona que mantiene al sustrato en una conformación desplegada (Delepelaire y Wandersman, 1998) o semi-plegada (Sharff *et al.*, 2001) para su correcto paso a través del canal de exportación. Así por ejemplo, la proteína HasA producida por *S. marcescens* no puede salir al medio extracelular si está completamente plegada (Debarbieux y Wandersman, 2001), por lo que requiere la intervención de SecB para mantenerla desplegada. Sin embargo algunas proteínas pueden ser exportadas semi-plegadas como es el caso de la proteasa de *E. chrysanthemi* (Sapriel *et al.*, 2002). Hablando en términos de la exportación de la microcina, probablemente ésta sale al medio extracelular en una

conformación semi-plegada como resultado de la mediación de MceC, MceI o MceJ, siendo la estructura secundaria en α -hélice la conformación que posiblemente puede atravesar el canal de exportación en forma plegada ya que el diámetro promedio de una α -hélice es algo más de 5 Å (Stryer, 1988) y el diámetro del canal de exportación es de 30 Å (Koronakis *et al.*, 2000).

Así mismo, el aparato transportador ABC puede poseer, además de su rol secretorio, una función indirecta en el plegamiento del sustrato que atraviesa por él. El aparato transportador ABC actuaría manteniendo desplegado (o parcialmente plegado) al sustrato, facilitando de esta manera su secreción (Sharff *et al.*, 2001). De manera opuesta, el aparato transportador ABC también podría jugar un rol en el re-plegamiento del sustrato. Por ejemplo, de acuerdo a los estudios publicados por Holland y Blight (1999), HlyD interviene en todos los estados de la secreción del sustrato incluyendo el re-plegamiento y liberación final de la α -hemolisina. De esta forma, la α -hemolisina durante el proceso de secreción interacciona con el aparato translocador y con estructuras celulares para adquirir un plegamiento correcto que origina su conformación activa (Stanley *et al.*, 1993; Bauer y Welch, 1997; Holland y Blight, 1999). En nuestro estudio, la microcina requiere de un correcto plegamiento para ser activa como antibiótico (Lagos *et al.*, 2003). La forma activa (tóxica) de la microcina muestra un alto contenido de hojas β , conformación que podría adquirirse antes o durante la secreción por alguno o algunos componentes del aparato transportador (sin descartar la participación de otras proteínas). Así por

ejemplo, además de MceG o MceH, MceF podría intervenir de alguna manera en el plegamiento de la microcina durante su secreción.

RECAPITULACIÓN

1. La microcina E492 utiliza un aparato transportador ABC para su secreción, constituido por las proteínas MceG, MceH y una proteína de membrana externa, que en *E. coli* es TolC.
2. La proteína transportadora MceG, conjuntamente con MceF, procesa el péptido líder de la microcina concomitantemente con la exportación.
3. Aún cuando la similitud a nivel de secuencia entre el transportador de la microcina (MceG) y el de la colicina V (CvaB) es muy alta, la complementación funcional entre ellos no es recíproca. La colicina V puede utilizar a MceG para salir al medio extracelular, en cambio, CvaB no complementa a MceG para la exportación de la microcina.
4. Existe complementación funcional entre las proteínas accesorias de ambos sistemas para la exportación de la colicina V. En este sentido, la proteína accesoria de la microcina (MceH) permite la exportación de la colicina V en ausencia de la proteína accesoria de la colicina V (CvaA), mientras que CvaA complementa parcialmente a MceH para la exportación de la microcina.
5. El aparato transportador de la microcina MceF, MceG y MceH complementa a CvaB CvaA para la exportación de la colicina V. Esto implica que la

colicina V puede emplear el sistema transportador completo de la microcina para su secreción.

6. La exportación vía MceG y MceH tanto de la microcina E492 como de la colicina V requiere de MceF. En estos casos, MceF es un factor limitante en la exportación de ambas bacteriocinas.
7. Cuando los sistemas exportadores completos de ambas bacteriocinas están presentes dentro de una misma célula, éstas pueden ser exportadas. Sin embargo, existiría competencia entre las dos bacteriocinas para ser exportadas, ya que se detecta una mayor actividad extracelular de la colicina V en desmedro de la microcina.
8. La microcina E492 utiliza los transportadores de la colicina V (CvaAB), solo si simultáneamente hay exportación de la colicina V. Aparentemente la colicina V "arrastraría" a la microcina hasta el medio extracelular. En este único caso, la microcina E492 puede prescindir de MceF.
9. La microcina quimera con péptido líder de colicina V puede ser exportada a través de la combinación de los aparatos exportadores estudiados en esta Tesis. La colicina V quimera con péptido líder de microcina puede ser exportada por su propio sistema exportador.

10. El péptido líder de la microcina funciona como una señal de exportación que dirige su secreción. El péptido líder también es requerido para mantener a las microcina precursora en un estado no tóxico.

REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.
- Andersen, C., Hughes, C., and Koronakis, V. (2000) Chunnel vision. *EMBO Rep.* **1**:313-8.
- Andersen, C., Hughes, C., and Koronakis, V. (2001) Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:412-6.
- Azpiroz, M.F., Rodriguez, E., and Laviña, M. (2001) The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:969-72.
- Baba, T., and Schneewind, O. (1998) Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends Microbiol.* **6**:66-71.
- Bairoch, A., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**:217-21.
- Baquero, F., and Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:117-24.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M., and Sonnhammer, E.L. (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res.* **30**:276-80.
- Bauer, M.E. and Welch, R.A. (1997) Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **65**:2218-24.
- Binet, R., and Wandersman, C. (1995) Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* **14**:2298-306.
- Binet, R., and Wandersman, C. (1996) Cloning of the *Serratia marcescens* hasF gene encoding the Has ABC exporter outer membrane component: a TolC analogue. *Mol. Microbiol.* **22**:265-73.

- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene*. **192**:7-11.
- Bishop, L., Agbayani, R. Jr, Ambudkar, S.V., Maloney, P.C., and Ames, G.F. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:6953-7.
- Blight, M.A., Chervaux, C., and Holland I.B. (1994) Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**:468-74.
- Bravo, A., de Torrontegui, G., and Díaz, R. (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, parD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **210**:101-10.
- Braun, V., Patzer, S.I., and Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* **84**: 365-80.
- Buchanan, S.K. (2001) Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends Biochem. Sci.* **26**:3-6.
- Chang, A.C.Y., and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-56.
- Chang, G., and Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*. **293**:1793-800.
- Claros, M.G., and von Heijne, G. (1994) TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* **10**:685-86.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., and Helling, R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3240-4.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* **10**:673-6.
- Davidson, A.L. (2002) Not just another ABC transporter. *Science*. **296**:1038-40.

- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. Arch. Microbiol. **139**:72-5.
- de Lorenzo, V. (1985) Factors affecting microcin E492 production. J. Antibiot. **38**:340-5.
- de Lorenzo, V., and Pugsley, A.P. (1985) Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. Antimicrob. Agents Chemother. **27**:666-9.
- Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1998) The SecB chaperone is involved in the secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein through an ABC transporter. EMBO J. **17**:936-44.
- Debarbieux, L., and Wandersman, C. (2001) Folded HasA inhibits its own secretion through its ABC exporter. EMBO J. **20**:4657-63.
- Dinh, T., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. Jr. (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **176**:3825-31.
- Doige, C.A., and Ames, G.F.L. (1993) ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. Annu. Rev. Microbiol. **47**:291-319.
- Dueñas, M., Vázquez, J., Ayala, M., Soderlind, E., Ohlin, M., Pérez, L., Borrebaeck, C.A.K., and Gavilondo, J.V. (1994) Intra- and Extracellular Expression of an scFv Antibody Fragment in *E. coli*: Effect of Bacterial strains and Pathway Engineering Using GroES/L Chaperonins. Biotech. **16**:476-77, 480-2.
- Duong, F., Lazdunski, A., and Murgier, M. (1996) Protein secretion by heterologous bacterial ABC-transporters: the C-terminus secretion signal of the secreted protein confers high recognition specificity. Mol. Microbiol. **21**:459-70.
- Fath, M.J., Mahanty, H.K., and Kolter, R. (1989) Characterization of a *purF* operon mutation which affects colicin V production. J. Bacteriol. **171**:3158-61.
- Fath, M.J., Skvirsky, R.C., and Kolter, R. (1991) Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. J. Bacteriol. **173**:7549-56.

- Fath, M.J., and Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
- Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush, J., and Kolter, R. (1994) Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry* **33**:6911-7.
- Fremaux, C., Ahn C., and Klaenhammer, T.R. (1993) Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3906-15.
- Gilson, L., Mahanty, H.K., and Kolter, R. (1987) Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* **169**:2466-70.
- Gilson, L., Mahanty, H.K., and Kolter, R. (1990) Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* **9**:3875-94.
- Goryshin, I.Y., Miller, J.A., Kil, Y.V., Lanzov, V.A., and Reznikoff, W.S. (1998) Tn5/IS50 target recognition *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10716-21
- Guarente, L.P., and Beckwith, J. (1987) Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in strains making defective rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:294-7.
- Guermeur, Y. (2001) Combinaison de classifieurs statistiques. Application a la prediction de structure secondaire des proteines. Ph.D. Thesis [Online Resource http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html]
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-30.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA.
- Havarstein, L.S., Holo, H., and Nes, I.F. (1994) The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology.* **140**:2383-9.

- Havarstein, L.S., Diep, D.B., and Nes, I.F. (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**:229-40.
- Hetz, C., Bono, M.R., Barros, L.F., and Lagos R. (2002) Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:2696-701.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:67-113.
- Higgins, C.F, and Linton, K.J. (2001) The xyz of ABC transporters. *Science.* **293**:1782-4.
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., and Jaffe, A. (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* **171**:1496-505.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. *Bioinformatics (formerly CABIOS)* **14**:378-9.
- Hofmann, K., and Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**:166.
- Hohn, B., and Collins, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene.* **11**:291-8.
- Holland, B., and Blight, M.A. (1996) Structure and function of HlyB, the ABC-transporter essential for Haemolysin secretion from *Escherichia coli*. In: Konings, W.N., Kaback, H.R., Lolkema, J.S. editors. *Handbook of Biological Physics.* Elsevier Science. 112-35.
- Holland, I.B., and Blight, M.A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**:381-99.
- Hui, D., Morden, C., Zhang, F., and Ling, V. (2000) Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. *J. Biol. Chem.* **275**:2713-20.

- Hui, D., and Ling, V. (2002) A combinatorial approach toward analyzing functional elements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. *Biochemistry* **41**:5333-9.
- Hwang, J., Zhong, X., and Tai, P.C. (1997) Interactions of dedicated export membrane proteins of the Colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. *J. Bacteriol.* **179**:6264-70.
- Idei, A., Kawai, E., Akatsuka, H., and Omori, K. (1999) Cloning and characterization of the *Pseudomonas fluorescens* ATP-binding cassette exporter, HasDEF, for the heme acquisition protein HasA. *J. Bacteriol.* **181**:7545-51.
- Izadi-Pruneyre, N., Wolff, N., Redeker, V., Wandersman, C., Delepierre, M., and Lecroisey, A. (1999) NMR studies of the C-terminal secretion signal of the haem-binding protein, HasA. *Eur. J. Biochem.* **261**:562-8.
- Johnson, J.M., and Church, G.M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J. Mol. Biol.* **287**:695-715.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., and Thornton, J.M. (1994) A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**:3038-49.
- Jones, P.M., and George, A.M. (2002) Mechanism of ABC transporters: A molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:12639-44.
- Juranka, P., Zhang, F., Kulpa, J., Endicott, J., Blight, M., Holland, I.B., and Ling, V. (1992) Characterization of the hemolysin transporter, HlyB, using an epitope insertion. *J. Biol. Chem.* **267**:3764-70.
- Kolter, R., and Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:141-63.
- Koronakis, V., Koronakis, E., and Hughes, C. (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* **8**:595-605.

- Koronakis, V., Hughes, C., and Koronakis, E. (1993) ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol. Microbiol.* **8**:1163-75.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature.* **405**:914-9.
- Koronakis, V., Andersen, C., and Hughes, C. (2001) Channel-tunnels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:403-7.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-32.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., and Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**:145-8.
- Lagos, R., Villanueva, J.E., and Monasterio, O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**:212-7.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C., and Monasterio, O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**:229-43.
- Lagos, R., Baeza, M., Hetz, C., Adessi, C., Monasterio, O., and Soto, C. (2003). The production of active microcin E492 involves a prion-like conformational conversion. Enviado a publicación.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., and Wanderman, C. (1990) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* **9**:1375-82.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1996) Protein secretion in Gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *EMBO J.* **15**:5804-11.
- Lewis, K. (2000) Translocases: a bacterial tunnel for drugs and proteins. *Curr. Biol.* **10**:R678-81.

- Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*. **296**:1091-8.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A., and Berkeley, C. (1972) Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol.* **7A**:315-422.
- Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden, J., and Xi, C. (2001) Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **9**:164-8.
- Nikaido, H. (2000) How do exported proteins and antibiotics bypass the periplasm in Gram-negative bacterial cells? *Trends Microbiol.* **8**:481-3.
- Orellana, C., and Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:297-303.
- Pei, J., and Grishin, N.V. (2001) Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem. Sci.* **26**:275-7.
- Pimenta, A., Blight, M., Clarke, D., and Holland, I.B. (1996) The Gram-negative cell envelope 'springs' to life: coiled-coil trans-envelope proteins. *Mol. Microbiol.* **19**:643-5.
- Pons, A.M., Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., and Cottenceau, G. (2002) Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:229-30.
- Pugsley, A.P., and Schwartz, M. (1984) Colicin E2 release: lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J.* **3**:2393-7.
- Pugsley, A.P. (1985) *Escherichia coli* K12 strains for use in the identification and characterization of colicins. *J. Gen. Microbiol.* **131**:369-76.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.
- Rangland, W.L., Pace, J.L., and Kemper, D.L. (1974) Fluorometric scanning of fluorescamine-labelled proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **59**:24-33.

- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1999) The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**:129-33.
- Rodriguez-Sainz, M.C., Hernandez-Chico, C., and Moreno, F. (1990) Molecular characterization of *pmbA*, an *Escherichia coli* chromosomal gene required for the production of the antibiotic peptide MccB17. *Mol. Microbiol.* **4**:1921-32.
- Saier, M. (2000) Transport Protein Classification. <http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/titlepage.html>
- Salmond, G.P.C., and Reeves, P.J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trend Biochem. Sci.* **18**:7-12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2^o ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapriel, G., Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2002) The N terminus of the HasA protein and the SecB chaperone cooperate in the efficient targeting and secretion of HasA via the ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **277**:6726-32.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-79.
- Schlör, S., Schmidt, A., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., and Gentschev, I. (1997) *In vivo* and *in vitro* studies on interactions between the components of the hemolysin (HlyA) secretion machinery of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **256**:306-19.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C., and Luisi, B. (2001) The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* **268**:5011-26.
- Sheps, J.A., Cheung, I., and Ling, V. Hemolysin transport in *Escherichia coli*. (1995) Point mutants in HlyB compensate for a deletion in the predicted amphiphilic helix region of the HlyA signal. *J. Biol. Chem.* **270**:14829-34.
- Skvirsky, R.C., Gilson, L., and Kolter, R. (1991) Signal sequence-independent protein secretion in Gram-negative bacteria: colicin V and microcin B17. *Methods Cell Biol.* **34**:205-21.

- Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., Sensen, C. editors. *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 175-182, Menlo Park, CA. AAAI Press.
- Stanley, P., Koronakis, V., and Hughes, C. (1991) Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol. Microbiol.* **5**:2391-403.
- Stanley, P.L., Diaz, P., Bailey, M.J., Gygi, D., Juarez, A., and Hughes, C. (1993) Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an rfaP lesion in core lipopolysaccharide assembly. *Mol. Microbiol.* **10**:781-7.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. Third edition. W.H. Freeman and Co. N.Y.
- Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J., Nelson, W. C., Gwinn, M. L., DeBoy, R., Peterson, J. D., Hickey, E. K., Haft, D. H., Salzberg, S. L., White, O., Fleischmann, R. D., Dougherty, B. A., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, D. S., Blair, E., Cittone, H., Clark, E. B., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Khouri, H., Qin, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Maignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H. O., Fraser, C. M., Moxon, E. R., Rappuoli, R., and Venter, J. C. (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. **287**: 1809-15.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17**:6487-96.
- Thanassi, D.G., and Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:420-30.
- Tusnády, G.E., and Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-50.
- van Belkum, M.J., Worobo, R.W., and Stiles, M.E. (1997) Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **23**:1293-301.

- Venema, K. (1995) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Lactococcins from *Lactococcus lactis* and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* – Ph. D. Thesis. Groningen University, Netherlands [Online Resource <http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/k.venema/>]
- Venema, K., Venema, G., and Kok, J. (1995) Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbiol.* **3**:299-304.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-51.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4776-80.
- Wandersman, C. (1992) Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.* **8**:317-22.
- Wang, R.C., Seror, S.J., Blight, M., Pratt, J.M., Broome-Smith, J.K., and Holland, I.B. (1991) Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.* **217**:441-54.
- Wilkins, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J., and Lagos, R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**:4789-94.
- Young, J., and Holland, B. (1999) ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**:177-200.
- Zhang, L.H., Fath, M.J., Mahanty, H.K., Tai P.C., and Kolter, R. (1995) Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics.* **141**:25-32.
- Zhong, X., and Tai, P.C. (1998) When an ATPase is not an ATPase: at low temperatures the C-terminal domain of the ABC transporter CvaB is a GTPase. *J. Bacteriol.* **180**:1347-53.