

UCH-FC  
MAG-B -  
A 203  
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS



FORMACIÓN DE AMILOIDES INTRACELULARES A PARTIR DE  
MICROCINA E492 E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS QUE  
AFECTAN SU AMILOIDOGÉNESIS

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Por

Paulina Andrea Aguilera Cortés

Abril de 2015

Director de tesis: Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Co-Directores de tesis: Dr. Andrés Marcoleta Caldera

Dr. Octavio Monasterio Opazo

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**Paulina Andrea Aguilera Cortés**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 8 de abril de 2015.

**Director de Tesis:**

Dra. Rosalba Lagos M.

**Co-director de Tesis:**

Dr. Andrés Marcoleta C.

Dr. Octavio Monasterio O.

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Marcelo Baeza C.

Dra. Margarita Carú M.



## FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y fue financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico: Proyecto FONDECYT Regular 1140430 y Proyecto FONDECYT Postdoctoral 3140496; por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile: Proyecto VID UI 12 905/2; y por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica: Beca de Magíster Nacional 2013 CONICYT.

Parte del trabajo de esta tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. José María Valpuesta en el laboratorio de Estructura y Función de las Chaperonas Moleculares del Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología de España. Esta estadía fue financiada por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile – Departamento de Postgrado y Postítulo: Ayudas para Estadías Cortas de Investigación Destinadas a Estudiantes Tesistas de Doctorado y Magíster de la Universidad de Chile.

## AUTOBIOGRAFÍA



Nací en la ciudad de Santiago un lunes 12 de septiembre en el año 1988, gracias a mi madre que no se movió el domingo para que su hija no tuviese que celebrar su cumpleaños en una fecha tan compleja. Crecí en una casa llena de amor junto a mi bisabuela, mis abuelos y mi mamá. Recuerdo perfectamente mi infancia jugando en el patio, recogiendo bichitos y con mis mascotas (cada una con su propia historia trágica). Cuando tenía 9 años, hubo cambio de casa y ampliación de la familia, pues mi mamá conoció y se casó con Juan Pablo. Tiempo después nació un ser revoltoso, hiperactivo y con las ideas más locas: Fernanda, que nos llenó de felicidad. Y así, entre los 4, armamos la linda familia que tenemos hoy.

Cursé toda mi enseñanza básica y media en el Andr e English School, colegio donde conocí a grandes personas, grandes amigas, y donde comencé a desarrollar mi interés por las ciencias, en particular por la biología. La idea de intentar entender los fenómenos naturales que observamos a nuestro alrededor, es ambiciosa y por sobretodo apasionante, por lo que en el momento de decidir qué estudiar, la Licenciatura en Ciencias con mención Biología en la Universidad de Chile fue mi primera y única opción. Y no me arrepiento. Sé que tomé la mejor decisión, tanto en el ámbito humano como académico. Al llegar a la universidad me encontré con personas extraordinarias, que hoy en día son mis más grandes amigos.

En el último año de carrera, llegué al Laboratorio de Biología Estructural y Molecular, donde me acogieron muy gratamente. En el BEM recibí las herramientas esenciales para mi formación como científica y aprendí lo que realmente es el trabajo de laboratorio.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi familia. Gracias por su apoyo incondicional, por escuchar mis sufrimientos y compartir mis alegrías. Mamá, Juan Pablo, Fernanda: este trabajo también es de ustedes. Gracias a mis queridos tatas, Manuel y Rosa, que siempre me han apoyado y confiado en mis capacidades.

Gracias a la Dra. Rosalba Lagos por recibirme en su laboratorio, por su constante guía, por ser una jefa presente y preocupada y por tener siempre la puerta abierta a sus estudiantes. Al Dr. Octavio Monasterio, por su preocupación, por los consejos durante las reuniones y sus aportes desde otra perspectiva. A Andrés Marcoleta, quien me recibió y guio desde mi primer día en el laboratorio. Gracias por las enseñanzas, la paciencia, la ayuda desinteresada, la confianza, las risas y la amistad.

Gracias al Dr. José María Valpuesta y a Rocío Arranz, y a todas las personas del Centro Nacional de Biotecnología de España, por su hospitalidad y por su colaboración en los estudios de microscopía electrónica.

Gracias a todos los integrantes del BEM, por estar siempre dispuestos a ayudar y resolver dudas cuando lo necesité. Gracias a Macarena Collao, por las conversaciones y por ser un pilar fundamental en el laboratorio. A Erika Lang, por su cariño y preocupación constantes. Gracias a Pedro Núñez por su imprescindible apoyo técnico y por su disposición para ayudarme a solucionar más de algún problema. Gracias a Nicole Molina, no sólo por mantener el laboratorio funcionando como reloj, si no que por ser una amiga que apareció durante mi último tiempo en el laboratorio. A mis amigos de Siberia: Felipe Hurtado, Felipe Villanelo y Andrea Poch, por recibirme como una amiga más, por las conversaciones, las risas (muchas), por todos los momentos vividos. Gracias a Yerko Argandoña, con quien he recorrido este camino a la par y he podido contar con su ayuda todo este tiempo. A todos los microcinos y tubulinos actuales por su constante ayuda y consejos: Pablo Lobos, Gonzalo Díaz, Luis Pouchoucq, Gissela Araya, Daniela Coromer, Esteban Nova, Josefina Marín, Camilo Berríos y Francisca Hofmann. También a los que ya no están pero que recuerdo con mucho cariño, en particular a Alexis Órdenes, Gonzalo Núñez, Daniela Muñoz y Milena Gonzalo.

Gracias a todos a mis amigos de la vida, que me han acompañado a lo largo de este proceso, en particular a Sofía, Paula, Karina, Valentina y Nicolás. Gracias por llenar mis días de amor y felicidad, por escuchar mis quejas (que a veces son muchas) y por estar siempre que los he necesitado.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Bacteriocinas.....	1
1.2	Características generales de la MccE492 .....	1
1.3	Determinantes genéticos de la MccE492 .....	2
1.4	Mecanismo de acción de la MccE492 .....	5
1.5	La MccE492 forma fibras amiloides.....	7
1.6	Características generales de las fibras amiloides .....	9
1.7	Amiloides "funcionales" .....	9
1.8	Formación de amiloides intracelulares .....	10
1.9	Determinantes en la secuencia que afectan la amiloidogénesis.....	11
1.10	Hipótesis .....	14
1.11	Objetivos .....	15
2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
2.1	Materiales.....	16
2.1.1	Reactivos .....	16
2.1.2	Cepas bacterianas.....	18
2.1.3	Plasmidios .....	18
2.2	Métodos.....	18
2.2.1	Medios de cultivo.....	18
2.2.2	Técnicas de biología molecular.....	21
2.2.3	Construcciones genéticas .....	21
2.2.4	Diseño de mutantes de MceA .....	22
2.2.5	Ensayo de inducción .....	23
2.2.6	Extracto total de proteínas.....	24
2.2.7	Electroforesis en gel con SDS (SDS-PAGE) .....	24
2.2.8	Tinción con plata .....	25

2.2.9	Inmunoblot.....	25
2.2.10	Microscopía confocal.....	26
2.2.11	Citometría de flujo .....	27
2.2.12	Purificación de MccE492.....	28
2.2.13	Ensayos de agregación.....	29
2.2.14	Medición con rojo Congo.....	29
2.2.15	Microscopía electrónica de transmisión .....	30
2.2.16	Cuantificación de la actividad bactericida .....	30
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	Formación de amiloides intracelulares de la MccE492 .....	31
3.2	Diseño y construcción de un sistema de expresión finamente regulada de la MccE492.....	33
3.2.1	Construcción del plasmidio p33pETAB.....	33
3.2.2	Ensayo de inducción del sistema p33pETAB .....	38
3.3	Búsqueda de regiones o residuos que promueven la formación de agregados amiloides de la MccE492 <i>in vivo</i> .....	40
3.3.1	Estrategia de construcción y análisis de mutantes de la MccE492 ....	40
3.3.2	Diseño de mutantes que afectan distintas regiones de la MccE492 ..	44
3.3.3	Análisis mediante citometría de flujo de la versión silvestre de MccE492 y de las mutantes $\Delta$ N-terminal, $\Delta$ central y $\Delta$ C-terminal .....	45
3.3.4	Predicción bioinformática de regiones pro-amiloidogénicas.....	48
3.3.5	Diseño de mutantes puntales y deleciones de pequeñas regiones de la MccE492 que afecten la formación de amiloides .....	50
3.3.6	Citometría de flujo de las diversas mutantes de la MccE492. ....	52
3.3.7	Visualización mediante microscopía confocal de células que expresan la MccE492 silvestre y las mutantes P57A, P59A y $\Delta$ 54-63 .....	56
3.4	Efecto de las mutaciones P57A, P59A y $\Delta$ 54-63 sobre la polimerización de fibras amiloides <i>in vitro</i> .....	59

3.4.1	Cinética de agregación <i>in vitro</i> de MccE492 silvestre, P57A, P59A y $\Delta$ 54-63 seguida mediante rojo Congo .....	59
3.4.2	Caracterización mediante TEM de fibras de MccE492 formadas por las mutantes P57A y P59A.....	63
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>79</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo .....	19
Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Genes involucrados en la producción de MccE492.....	3
Figura 2: Pasos involucrados en la producción de MccE492. ....	6
Figura 3: Mecanismo de acción de la MccE492. ....	8
Figura 4: Imágenes de microscopía confocal de <i>E. coli</i> que portan distintos sistemas productores de MccE492. ....	32
Figura 5: Estrategia para la construcción del plasmidio p33pETAB.....	34
Figura 6: Digestiones de p33AM y pUC57pETAB con <i>Bam</i> HI. ....	36
Figura 7: Selección y posterior revisión de posibles transformantes p33pETAB...37	
Figura 8: Evaluación de la expresión de la MccE492 en el sistema p33pETAB y detección de la actividad bactericida.....	39
Figura 9: Estrategia de clonamiento de distintas mutantes de <i>mceA</i> en el vector p33pETAB. ....	41
Figura 10: Calibración de tinción con Th-S. ....	43
Figura 11: Mutantes por delección de las regiones N-terminal, central y C-terminal de la MccE492. ....	46
Figura 12: Detección de agregados intracelulares <i>in vivo</i> formados por MccE492 silvestre y mutantes $\Delta$ N-terminal, $\Delta$ central y $\Delta$ C-terminal, mediante citometría de flujo. ....	47
Figura 13: Predicción bioinformática de regiones pro-amiloidogénicas de la MccE492.....	49
Figura 14: Diseño de mutantes de la MccE492 que afecten su amiloidogénesis. .51	
Figura 15: Detección mediante citometría de flujo de agregados intracelulares <i>in vivo</i> formados por MccE492 silvestre y por distintas mutantes. ....	53
Figura 16: Análisis estadístico de mutantes de la MccE492 que presentan alteraciones en la formación de agregados intracelulares.....	55
Figura 17: Imágenes de microscopía confocal de <i>E. coli</i> BL21-A1 que sobre-expresan la versión silvestre de la MccE492 y de las mutantes $\Delta$ 54-63, P57A y P59A. ....	57

Figura 18: Imágenes de microscopía confocal de <i>E. coli</i> BL21-AI que sobre-expresan la versión silvestre de la MccE492 y de las mutantes $\Delta$ 54-63, P57A y P59A en presencia de np220. ....	58
Figura 19: Cinética de polimerización <i>in vitro</i> de fibras amiloides de la MccE492 y las mutantes P57A, P59A y $\Delta$ 54-63. ....	61
Figura 20: Curvas de actividad bactericida durante el ensayo de agregación de la MccE492 silvestre y de las mutantes P57A y P59A. ....	62
Figura 21: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la MccE492 silvestre a distintos tiempos de agregación. ....	64
Figura 22: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la mutante P57A a distintos tiempos de agregación. ....	65
Figura 23: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la mutante P59A a distintos tiempos de agregación. ....	66

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-indolilfosfato
<b>BTA-1</b>	2-(4'-metilaminofenil)benzotiazol
<b>CF</b>	Contraste de fase
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MccE492</b>	Microcina E492
<b>NBT</b>	nitro-blue tetrazolium
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PIPES</b>	Ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético

<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>Th-S</b>	Tioflavina S
<b>Tricina</b>	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>UA</b>	Unidades arbitrarias

## RESUMEN

La microcina E492 (MccE492) es una toxina antibacteriana producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Además de su actividad tóxica, esta proteína es capaz de formar fibras amiloides tanto *in vitro* como *in vivo* en el medio extracelular, siendo un posible mecanismo de regulación de dicha actividad. La amiloidogénesis ha sido asociada principalmente a patologías en mamíferos, sin embargo, durante la última década se han descubierto proteínas que en su forma amiloide cumplen un rol biológico. Entre las proteínas amiloidogénicas bacterianas, destaca RepA, proteína capaz de formar agregados amiloides intracelulares en *E. coli*, fenómeno que también ocurriría con la MccE492. Por otro lado, se ha descrito que la formación de fibras amiloides estaría controlada por regiones específicas de la secuencia de las proteínas y que, a su vez, existirían residuos denominados *gatekeepers* que previenen una agregación descontrolada. Así, en este trabajo se planteó como objetivos determinar si la MccE492 es capaz de formar amiloides intracelulares e identificar residuos de la proteína que controlen su agregación.

Se encontró que células que portan todos los genes del *cluster* que permite la producción de MccE492, acumulan inclusiones intracelulares de naturaleza amiloide. En contraste, células que expresan sólo el gen estructural de la MccE492 y su proteína de inmunidad no acumulan inclusiones. Por otra parte, se diseñaron una serie de mutantes de la MccE492 con alteraciones en posibles regiones proamiloidogénicas y se clonaron en un sistema de expresión finamente regulada. Al expresar tanto la MccE492 silvestre como las mutantes, junto con el resto de los genes del *cluster*, hubo un aumento en la tendencia a formar inclusiones amiloides

intracelulares. En conjunto estos resultados sugieren que algún componente del sistema productor actuaría como nucleador, promoviendo la formación de inclusiones amiloides de la MccE492.

Las mutantes P57A y P59A mostraron una capacidad amiloidogénica aumentada *in vivo*. Además, al eliminar la región 54-63 se encontró una disminución en la formación de amiloides intracelulares, evidenciando que la región 54-63 participa en el proceso amiloidogénico de la MccE492 *in vivo*. Dichos resultados coinciden con lo observado *in vitro*, pues las mutantes P57A y P59A mostraron una cinética de polimerización más rápida que la proteína silvestre, mientras la mutante  $\Delta$ 54-63 polimerizó más lentamente que esta última. La polimerización de las mutantes P57A y P59A se relacionó directamente con la pérdida de actividad. Por último, las fibras formadas por ambas mutantes mostraron una morfología similar a las formadas por la MccE492 silvestre.

De este modo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la MccE492 es capaz de formar amiloides intracelulares en presencia de todos los genes del sistema productor de dicha proteína. También se identificó un grupo de residuos, del 54 al 63, que promueven la agregación de la MccE492, tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre estos residuos están las prolinas en la posición 57 y 59, que se identificaron como *gatekeepers*, pues evitan una agregación descontrolada de la MccE492.

## ABSTRACT

Microcin E492 (MccE492) is an antibacterial peptide produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Besides its toxic activity, MccE492 forms amyloid fibrils, phenomenon that has been described *in vitro* and *in vivo* in the extracellular space, and that may regulate such activity. Amyloid formation has mainly been related to pathologies in mammals, however, during the last decade it has been proposed that the amyloidogenesis of a group of proteins may play a biological role. Among bacterial amyloidogenic proteins due to its capability to form intracellular amyloid inclusions, stands RepA and probably MccE492. Furthermore, it has been proposed that amyloid formation is promoted by specific regions of the protein and that particular residues, known as *gatekeepers*, prevent uncontrolled aggregation. Thus, the aim of this work was to elucidate if MccE492 forms intracellular amyloid inclusions and identify residues that may control its aggregation.

It was found that intracellular amyloid inclusions accumulate inside *E. coli* cells that carry all the genes of MccE492 cluster. In contrast, when only the structural and immunity genes were expressed no amyloid inclusions were observed. A series of mutants with alterations within the potential pro-amyloidogenic regions were designed and cloned into a tightly regulated expression system. When MccE492 (wild-type or mutants) was expressed together with all the components of the genetic cluster, there was an increased tendency to form amyloid intracellular inclusions. These results suggests that some component of the MccE492 producing cluster may act as a nucleator, promoting MccE492 amyloid formation.



Mutants P57A and P59A showed an increased amyloidogenic behavior *in vivo*. Also, when the 54-63 region was deleted, a decrease in intracellular amyloid formation was observed, showing that the 54-63 region is involved in MccE492 amyloidogenic process *in vivo*. These results are coincident with those observed *in vitro*, since P57A and P59A mutants presented a faster aggregation kinetics than wild-type MccE492, whereas  $\Delta$ 54-63 mutant polymerized slower than the wild-type protein. P57A and P59A polymerization correlated with the loss of antibacterial activity. Finally, fibrils formed by both mutants showed a similar morphology to those formed by the wild-type protein.

These results show that MccE492 forms intracellular amyloid inclusions when all of the components of the producing cluster are present. Also, a group of residues, 54-63, were identified as those that controls MccE492 amyloid formation *in vitro and in vivo*. This region harbors two residues, proline 57 and 59 that act as *gatekeepers* by preventing uncontrolled aggregation.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son proteínas producidas y secretadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas y ejercen un efecto tóxico sobre cepas filogenéticamente cercanas a la cepa productora (Riley y Wertz, 2002). Se ha sugerido que estas moléculas cumplen un rol en la mantención de la homeostasis poblacional en los ecosistemas que las producen (Baquero y Moreno, 1984). Sus mecanismos de acción van desde la inhibición de la síntesis de proteínas, la inhibición de la DNA girasa, hasta la formación de poros en la membrana interna, entre otros. Las bacteriocinas producidas por Gram negativas han sido clasificadas en 2 grupos de acuerdo a su tamaño: las colicinas (> 10 kDa) y las microcinas (<10 kDa). Las microcinas son péptidos hidrofóbicos producidos por bacterias de la familia de las Enterobacterias y se caracterizan por ser termoestables, resistentes a condiciones extremas de pH y a proteasas (Asensio y cols., 1976). Los determinantes genéticos necesarios para la producción de microcinas suelen ser: un gen estructural, un gen que otorga inmunidad a la célula que lo expresa y genes asociados a modificaciones post-traduccionales y exportación de la proteína (Kolter y Moreno, 1992).

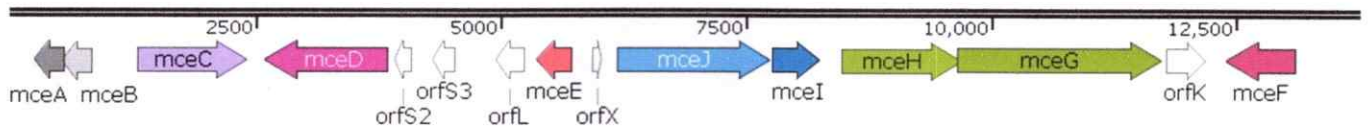
## 1.2 Características generales de la MccE492

La microcina E492 (MccE492) es un péptido de 7,887 Da en su forma no modificada, producida y secretada por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (Lagos y cols., 1999, de Lorenzo, 1984). Ejerce su actividad antibacteriana sobre cepas de la familia Enterobacteriaceae tales como: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*,

*Escherichia* y *Klebsiella*. Su actividad tóxica consiste en la formación de poros en la membrana citoplasmática de la célula blanco, lo que en consecuencia genera despolarización y finalmente muerte celular (de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols. 1993).

### 1.3 Determinantes genéticos de la MccE492

Los determinantes genéticos para la producción y secreción de microcina activa se encuentran organizados en un *cluster* de genes en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492. Recientemente se ha descrito que dicho *cluster* de genes se encuentra dentro de una isla genómica de aproximadamente 23 kb (Marcoleta y cols., 2013a; Nuñez G., 2015). Sin embargo, los determinantes necesarios para la producción de microcina activa se encuentran en un segmento de 13 kb de dicha isla (Figura 1). Este segmento fue clonado y expresado en *Escherichia coli*, donde la microcina recombinante presentó las mismas propiedades bioquímicas y electrofisiológicas que la MccE492 producida naturalmente por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkins y cols., 1997). El *cluster* clonado y expresado en *E. coli* está compuesto por 10 genes y 5 marcos de lectura abiertos (ORF). Los genes *mceA* y *mceB* forman una única unidad transcripcional, donde las últimas bases del gen *mceB* se solapan con las primeras del gen *mceA*. El gen *mceA* corresponde al gen estructural de la MccE492, el que codifica una pre-pro-proteína de 99 aa que posteriormente es modificada post-traduccionalmente, clivada y secretada como una proteína de 84 aa al medio ante la MccE492 a la célula que la expresa, insertándose en la membrana interna (Lagos y cols., 1999). Los productos de los



**Figura 1: Genes involucrados en la producción de MccE492**

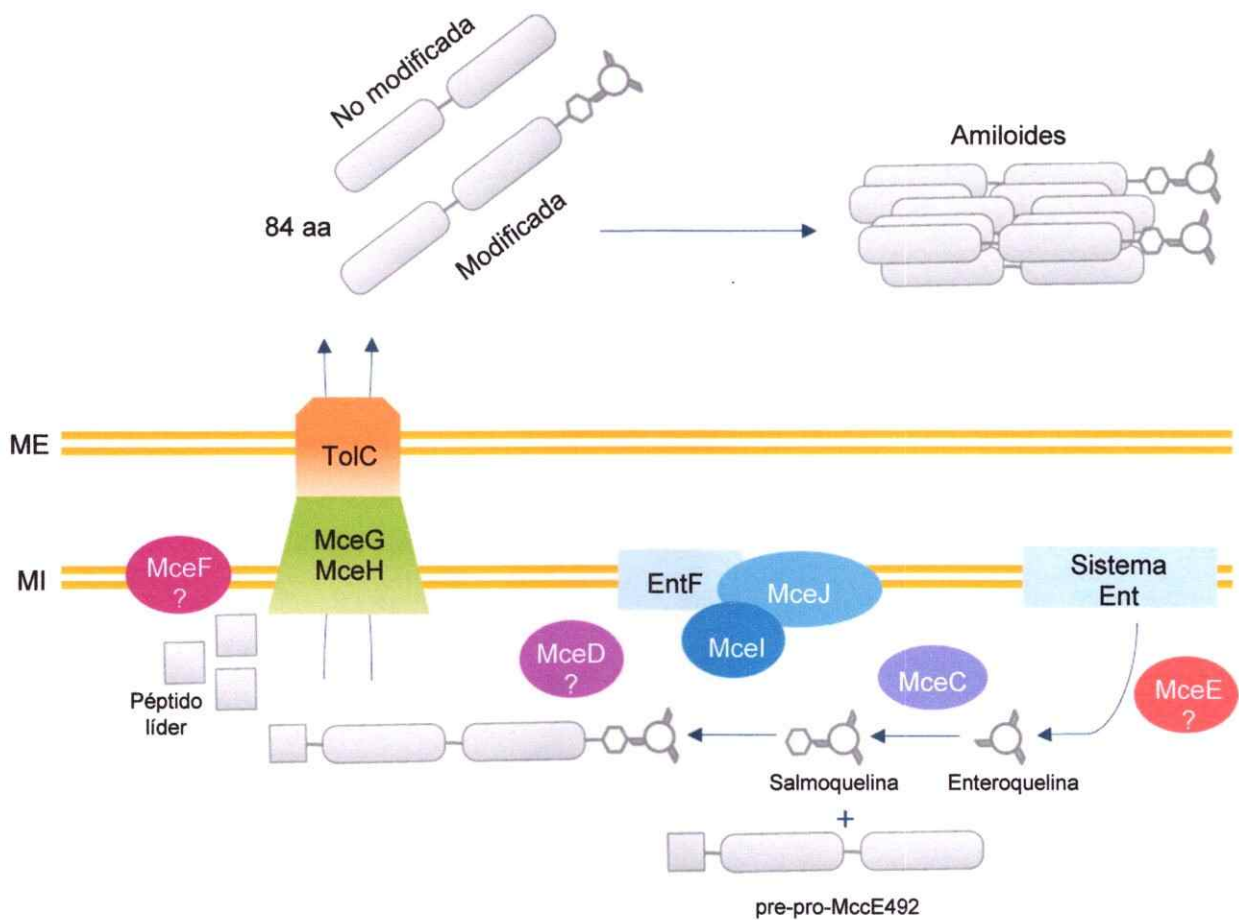
Los determinantes necesarios para la producción de MccE492 activa se encuentran en un segmento de 13 kb. Las flechas coloreadas representan los genes ya descritos y las flechas vacías representan marcos de lectura abiertos sin función asignada. La dirección de las flechas corresponde a su dirección transcripcional. La escala de tamaño está en pares de bases.

genes *mceC*, *mceD*, *mceI* y *mceJ* participan en la modificación post-traduccional de la *mccE492*. *mceC* codifica una glicosil-transferasa de 370 aa que glicosila a la enteroquelina formando una molécula de salmoquelina. (Nolan y cols., 2007). *mceD* codifica una salmoquelina-esterasa de 414 aa, la cual hidrolizaría salmoquelina en su forma apo y férrica (Lagos y cols., 2001; Nolan y cols., 2007). El gen *mceE* codifica una proteína de 114 aa que no tiene una función asignada, pero presenta identidad de secuencia con la proteína MchS4 del sistema de la *MccH47*, la cual estimula la producción de enteroquelina (Lagos y cols. 2009). *mceI* y *mceJ* forman una unidad transcripcional que codifica dos proteínas de 163 aa y 524 aa, respectivamente. Ambas proteínas forman un complejo que une covalentemente una molécula de salmoquelina a la serina-84 de la *MccE492* (Nolan y cols., 2007). *mceG* codifica un exportador de tipo ABC de 698 aa y *mceH* a la proteína accesoria de 413 aa (Lagos y cols., 2001). *MceG* y *MceH* junto a la proteína de membrana externa TolC participan en la exportación de la *MccE492*. *mceF* codifica una proteína transmembrana putativa de 6 hélices que presenta actividad proteolítica. Se ha propuesto que sus posibles funciones son: participar en el clivaje de la *mccE492* u otorgar inmunidad a la célula productora (González B., 2011). Por otro lado, dentro del *cluster* hay una serie de marcos de lectura abiertos que no tienen una función asignada, pero tienen equivalentes en otros sistemas productores de bacteriocinas. *orfK* codifica una proteína de 136 aa y *orfL* codifica una proteína de 89 aa. *OrfK* presenta identidad con *McmA* y *McmI*, la proteína estructural y de la inmunidad de *MccM* (Lagos y cols., 2009). *OrfK* no tiene actividad bactericida y tampoco otorga inmunidad ante la *Mcm* ni a la *MccE492* por sí solo. Sin embargo, en presencia de los demás componentes del *cluster* productor, *OrfK* potencia la

inmunidad ante la MccE492 (González B., 2011). Por su parte OrfL en su región N-terminal tiene similitudes tanto con la MccE492, la MccH47 y la MccM y en sus últimos 10 aa presenta un dominio rico en serina con un motivo glicina-serina que la haría susceptible a la modificación por unión de una molécula de salmoquelina, pero su función aún no ha sido determinada (Lagos y cols., 2009; Nuñez G., 2012). Por último, *orfS2*, *orfS3* y *orfX*, codifican proteínas de 55, 68 y 35 aa respectivamente. *OrfS2* y *S3* codificarían proteínas truncas con identidad a *MchS2* y *MchS3*, que son equivalentes a *MccI47* y su inmunidad, mientras *orfX* es similar a *mchX*. *mchX* codifica una proteína que aparentemente regula la expresión de otros genes involucrados en la producción de *MccH47*. (Lagos y cols., 2009).

#### **1.4 Mecanismo de acción de la MccE492**

Como se mencionó anteriormente, la MccE492 es sintetizada como un precursor de 99 aa, de los cuales los primeros 15 corresponden a un péptido líder. Este precursor puede o no ser modificado post-traduccionalmente, mediante la unión covalente de una molécula de salmoquelina a la serina 84. Tanto la MccE492 modificada como no modificada, es clivada y exportada al medio extracelular como una proteína de 84 aa (Figura 2). Únicamente la proteína modificada presenta actividad antibacteriana, debido a que la molécula tipo salmoquelina es esencial para el reconocimiento en la membrana externa y posterior translocación e inserción en la membrana citoplasmática en la célula blanco, en un proceso mediado por los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir (Strahsburger y cols., 2005).



**Figura 2: Pasos involucrados en la producción de MccE492.**

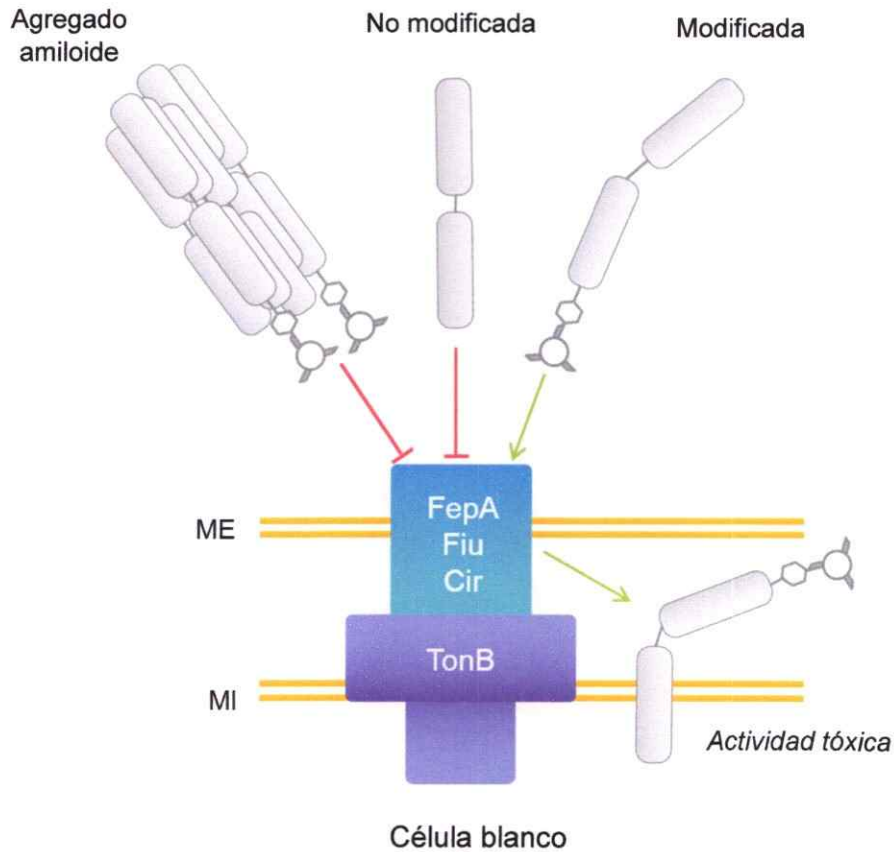
La MccE492 es producida como un precursor que puede o no ser modificado post-traduccionalmente mediante la unión covalente de una molécula de salmoquelina en su extremo C-terminal. Luego, es clivada y exportada mediante el sistema MceG-MceH-TolC hacia el espacio extracelular. En ciertas condiciones la MccE492 se acumula en el espacio extracelular y se agrega en forma de fibras amiloides. (Modificado de Lagos y cols., 2009).

Estos receptores reconocen la molécula de salmoquelina y permiten el ingreso de la MccE492 modificada al periplasma de la célula blanco y además están acoplados al complejo TonB-ExbB-ExbD (Destoumieux-Garzón y cols., 2003). TonB es una proteína necesaria para la inserción de la MccE492 en la membrana citoplasmática, para posteriormente formar un poro y generar la consecuente depolarización y muerte celular (Figura 3).

### **1.5 La MccE492 forma fibras amiloides**

A diferencia de otras microcinas, la MccE492 es producida en su forma activa durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano (de Lorenzo, 1985). También destaca que la pérdida de actividad antibacteriana se ha asociado con un fenómeno particular: la formación de fibras amiloides. Se ha mostrado que la MccE492 existe en dos formas en el espacio extracelular: una soluble o monomérica y otra insoluble en forma oligomérica o como fibras amiloides. Por ende, se ha sugerido que la formación de fibras amiloides sería un mecanismo capaz de regular la actividad tóxica de la MccE492 (Bieler y cols., 2005). Este fenómeno ha sido estudiado principalmente *in vitro*, pero también ha sido observado *in vivo* en el espacio extracelular (Bieler y cols., 2005). Las fibras formadas por la MccE492 han sido caracterizadas tanto químicamente mediante unión de sondas específicas, como estructuralmente mediante difracción de rayos X, dicroísmo circular y





**Figura 3: Mecanismo de acción de la MccE492.**

La MccE492 exportada en forma modificada es reconocida por los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir presentes en la membrana externa de la célula blanco. Mediante estos receptores la MccE492 es translocada al periplasma y entonces, con la ayuda de TonB, es capaz de insertarse en la membrana citoplasmática y posteriormente formar un poro. Tanto la MccE492 no modificada como aquella en forma de fibras amiloide, carecen de actividad bactericida.

microscopía electrónica (Bieler y cols., 2005; Arranz y cols., 2012; Marcoleta y cols, 2013b).

Las fibras formadas por MccE492 están compuestas por microcina no modificada y modificada, pero la incorporación de cada una de estas versiones presenta una cinética distinta. La MccE492 no modificada se incorpora con una cinética más eficiente que la MccE492 modificada (Marcoleta y cols., 2013).

## **1.6 Características generales de las fibras amiloides**

Las fibras amiloides son agregados de proteínas que presentan una estructura cuaternaria estable denominada "cross- $\beta$ ". Esta estructura consiste en hebras  $\beta$  (formadas por la proteína en cuestión) que se estabilizan entre sí mediante puentes de hidrógeno y que se ubican de manera perpendicular al eje de la fibra (Chiti y Dobson, 2006; Fowler y cols., 2007). Además de sus características estructurales, los amiloides comparten ciertas características químicas, como lo es la unión específica de sondas como la tioflavina-T y el rojo Congo, y la resistencia a la denaturación y proteólisis (Chiti y Dobson, 2006).

## **1.7 Amiloides "funcionales"**

Tradicionalmente, la formación de fibras amiloides ha sido asociada a patologías de mamíferos, principalmente enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, Alzheimer y Parkinson. Sin embargo, durante la última década han surgido una serie de estudios que muestran la existencia de los

llamados amiloides “funcionales”, es decir, proteínas que en su forma amiloide cumplen un rol biológico. La existencia de amiloides “funcionales” ha sido descrita en muchos organismos, desde hongos y bacterias, hasta en insectos, peces y mamíferos (Fowler y cols., 2007), mostrando, por un lado, que la amiloidogénesis no es necesariamente un proceso perjudicial y, por otro, que es un fenómeno más ubicuo de lo que se pensaba. Entre las proteínas bacterianas que forman amiloides que cumplen un rol biológico está curli, un tipo de fibras amiloides extracelulares producidas por *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, que forman una matriz extracelular que permite a las bacterias colonizar superficies (Chapman y cols., 2002). TasA también forma fibras amiloides que participan en la formación de biofilms en *Bacillus subtilis* (Romero y cols, 2010). Las chaplinas producidas por *Streptomyces coelicolor* forman fibras amiloides que disminuyen la tensión superficial del agua, permitiendo la formación de hifas aéreas (Claessen y cols., 2003).

### **1.8 Formación de amiloides intracelulares**

Un caso que destaca es el de RepA, una proteína que interactúa con secuencias de DNA (iterones) y que en su forma monomérica actúa como iniciador de la replicación del plasmidio pPS10 en *Pseudomonas aeruginosa* (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004). RepA está compuesta por los dominios WH1 y WH2. Se ha encontrado que el dominio WH1 en presencia de cierto segmento de DNA es capaz de formar fibras amiloides *in vitro* (Giraldo, 2007). En particular, la variante WH1-A31V fusionada a la proteína fluorescente mCherry, forma

inclusiones que se acumulan al interior de las células que la expresan. (Fernández-Tresguerres y cols., 2010). Dichos agregados, al ser caracterizados estructural y químicamente, resultaron ser de naturaleza amiloide. Al purificar las inclusiones y utilizarlas como semillas, se encontró que promueven la agregación WH1-A31V soluble *in vitro* en ausencia del segmento de DNA. Aún más, bacterias que expresaban dicha variante y que por lo tanto portaban agregados amiloides intracelulares mostraron un menor *fitness* celular, traducido en un mayor tiempo generacional. Además, se encontró que los agregados amiloides eran heredables, transmitiéndose verticalmente a la progenie. Este sería el primer reporte de una proteinopatía de naturaleza amiloide, intracelular y capaz de transmitirse verticalmente en procariontes (Fernández-Tresguerres y cols., 2010; Giraldo y cols., 2011).

Por otro lado, se ha visto que al expresar en *E. coli* proteínas amiloides de mamíferos, como los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, estos forman inclusiones intracelulares de naturaleza amiloide (Dasari y cols. 2011; Espargaró y cols, 2012). Este fenómeno podría ocurrir con otras proteínas amiloides de origen bacteriano, como la MccE492, pero que a diferencia de proteínas recombinantes, formaría inclusiones intracelulares en su hospedero natural y, por lo tanto, tendría un significado biológico más profundo.

### **1.9 Determinantes en la secuencia que afectan la amiloidogénesis**

De acuerdo a los ejemplos ya mencionados, es posible notar que el grupo de proteínas capaces de formar fibras amiloides es muy diverso e incluyen amiloides

patogénicos y también los llamados amiloides funcionales. Así, se ha sugerido que la amiloidogénesis es una propiedad inherente de la cadena polipeptídica y no de un pequeño grupo de proteínas capaces de formar este tipo de estructuras (Chiti y cols., 2003). Además, se ha mostrado que la propensión a formar fibras amiloides depende de ciertas regiones o residuos presentes en la cadena polipeptídica (López de la Paz y Serrano, 2004; Fernández-Escamilla y cols., 2004; Maurer-Stroh y cols., 2010). Un clásico ejemplo es el de la proteína CsgA, la subunidad mayor de curli. La polimerización de CsgA depende de la interacción de CsgB que actúa como nucleador, promoviendo un cambio conformacional de CsgA hacia una estructura amiloide (Chapman y cols., 2002). CsgA está conformada por 5 repeticiones imperfectas los cuales son los responsables de la respuesta ante CsgB. Ciertas mutaciones puntuales de residuos conservados afectan la amiloidogénesis de CsgA, siendo este un ejemplo claro de que la formación de amiloides depende de residuos específicos (Wang y Chapman, 2008). Se encontró que al reemplazar ciertos residuos presentes en regiones conservadas, CsgA es capaz de polimerizar *in vivo* en ausencia del nucleador CsgB y a su vez, se acelera su cinética de agregación *in vitro*. Estos residuos fueron denominados *gatekeepers*, dado que de algún modo previenen una agregación descontrolada (Wang y cols., 2010). Los residuos *gatekeepers* suelen ser residuos que inhiben la formación de hebras  $\beta$ , tales como residuos cargados, de cadena lateral larga o prolina (Beerten y cols., 2012). En resumen, estos antecedentes señalan que la tendencia a formar fibras amiloides está determinada por ciertas regiones de la secuencia de las proteínas y que existen residuos denominados *gatekeepers* que previenen una agregación descontrolada.

Respecto a la formación de amiloides de la MccE492 se desconoce si ésta es capaz de formar agregados amiloides intracelulares y tampoco se sabe si hay determinantes en su secuencia que controlen su amiloidogénesis.



## 1.10 Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes señalados, se propone que:

La MccE492 es capaz de formar agregados amiloides intracelulares y su capacidad amiloidogénica depende de la secuencia primaria de la proteína, por lo que deben existir regiones que al ser eliminadas o modificadas, afecten la formación de fibras amiloides tanto *in vivo* como *in vitro*.

## **1.11 Objetivos**

### **Objetivo General**

Estudiar y caracterizar la potencial formación de amiloides intracelulares de MccE492 e identificar residuos y/o regiones de la proteína que controlan su agregación tanto *in vivo* como *in vitro*.

### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar si la MccE492 forma agregados intracelulares de naturaleza amiloide.
2. Generar construcciones para la expresión regulada del gen estructural (*mceA*) de la MccE492 silvestre y mutantes derivadas.
3. Diseñar y generar mutantes de la MccE492 y evaluar su propensión a formar agregados amiloides intracelulares *in vivo*.
4. Purificar versiones mutantes de la MccE492 con alteraciones en la propensión a formar agregados intracelulares y evaluar su tendencia a formar fibras amiloides *in vitro*.



## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Reactivos

Las enzimas de restricción, T4 DNA ligasa, marcadores de peso molecular para fragmentos de DNA, escala 1Kb y escala 100 bp, se compraron en New England BioLabs Inc. (Massachusetts, Estados Unidos).

La enzima *Taq* DNA polimerasa se compró en Invitrogen Life Technology, (California, Estados Unidos).

El cloruro de amonio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato de sodio mono y di básico, fosfato de potasio monobásico, hidróxido de sodio, citrato de sodio, glucosa, SDS, acrilamida, azul de bromofenol, etanol, metanol, isopropanol, ácido clorhídrico, ácido acético, glicina y  $\beta$ -mercaptoetanol se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania).

Tris-Base y la bis-acrilamida se compraron en Amresco Inc. (Ohio, Estados Unidos).

El cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, EDTA, Tween 20 y glicerol se compraron en Winkler Ltda. (Santiago, Chile).

Los desoxirribonucleótidos trifosfato y el kit de purificación de ADN plasmidial (Plasmid DNA Mini Kit I) fueron comprados en Omega Bio-Tek (Georgia, Estados Unidos).

El kit para purificar ADN de geles y soluciones (UltraClean 15 DNA Purification Kit) se compró a MO BIO Laboratories, Inc. (California, Estados Unidos).

El APS, tiamina, rojo Congo, tioflavina-S, BTA-1, NBT, TEMED y anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase) se compraron en Sigma Chemical Co. (Missouri, Estados Unidos).

La membrana de nitrocelulosa y los filtros de polietersulfona (Steritop, 0,22  $\mu\text{m}$ ) se compraron en Merck Millipore (Massachusetts, Estados Unidos).

El estándar de proteínas (PageRuler Prestained Protein Ladder) y la membrana de diálisis (Snake Skin Dialysis Tubing 3,5 MWCO, 35 mm dry I.D.) se compraron en Thermo Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

Las cubetas para electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc. (California, Estados Unidos).

La agarosa se compró en Fermelo Biotec (Santiago, Chile).

El bactoagar, casaminoácidos y LB se compraron en BD Becton, Dickinson and Company (New Jersey, Estados Unidos).

La resina Bondapak C18 fue comprada en Waters Corporation (Massachusetts, Estados Unidos).

Los reactivos de grado técnico: ácido acético, etanol y metanol se compraron en TCL (Santiago, Chile).

La tricina, PIPES, arabinosa, IPTG, BCIP, kanamicina y ampicilina se compraron en US Biological (Massachusetts, Estados Unidos).

El cloranfenicol se compró en Laboratorios Andrómaco S.A. (Santiago, Chile).

La tetraciclina se compró en Laboratorio Benguerel Ltda. (Santiago, Chile).

La estreptomicina se compró en Laboratorio Chile S.A. (Santiago, Chile)

### **2.1.2 Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se presentan en la Tabla 1.

### **2.1.3 Plasmidios**

Los plasmidios utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla 2. El plasmidio pWH1 (A31V) fue gentilmente donado por el Dr. Rafael Giraldo del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Medios de cultivo**

Caldo de Lisogenia (LB): Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 3,5 mM final.

Medio mínimo (M9):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, NaCl 0,5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g/L.

Medio mínimo (M9) suplementado: El medio M9 fue suplementado con  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 mg/mL, casaminoácidos 1 mg/mL y glucosa 0,2% p/v.

**Tabla 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo**

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Fuente</b>
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> rB mB	Novagen
BI21 AI	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm</i> <i>araB::T7RNAP tetA</i>	Invitrogen
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Promega

**Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.**

Plasmidio	Características relevantes	Fuente o referencia
pHC79	Cosmidio derivado de ColE1, de propósito general. (Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ).	Hohn y Collins, 1980
pMccE492	Derivado de pHC79. Contiene todos los genes del <i>cluster</i> de la MccE492. Produce microcina activa. (Amp <sup>r</sup> ).	González B., 2011
pJEM15	Contiene los genes para la producción de MccE492 activa. Posee la triplicación de un fragmento interno <i>Sall</i> (doble copia de <i>mceF</i> ). Es un sobre-productor de microcina modificada. (Amp <sup>r</sup> ).	Wilkins y cols., 1997
np220	Contiene todos los genes del <i>cluster</i> de la MccE492, con una mutación <i>mceA::Tn5</i> . Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido. No produce microcina. (Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> ).	Lagos y cols., 2001
pBAML	Derivado de pACYC184. Contiene los genes <i>mceBA</i> bajo el promotor natural de la MccE492. (Cm <sup>r</sup> ).	Colección laboratorio
pUC57pETAB	Sistema pETAB: genes <i>mceA</i> y <i>mceB</i> bajo el control del promotor T7 con sitio operador <i>lac</i> . Flanqueado por sitios <i>BamHI</i> y sintetizado en pUC57. (Amp <sup>r</sup> ).	Este trabajo
pUC57mceA	Gen <i>mceA</i> flanqueado por sitios <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i> , sintetizado en pUC57. (Amp <sup>r</sup> ).	Este trabajo
p33AM	Derivado de pACYC184. Contiene el gen <i>lacI<sup>q</sup></i> , lo que permite regular genes asociados al sistema pET. (Cm <sup>r</sup> ).	Colección laboratorio
p33pETAB	Derivado de p33AM. Contiene el sistema pETAB ( <i>mceA</i> silvestre o mutante). También contiene el gen <i>lacI<sup>q</sup></i> . (Cm <sup>r</sup> ).	Este trabajo
pWH1	Contiene secuencia que codifica la versión hiperamiloidogénica (A31V) del dominio WH1 de RepA, fusionado a la proteína fluorescente mCherry. (Amp <sup>r</sup> ).	Fernández-Tresguerres y cols., 2010

Medio LB agar sólido: se preparó con medio LB y bactoagar 1,5% p/v y fue suplementado con Arabinosa al 0,2% e IPTG 1mM final, cuando se indique.

El agar blando preparó con medio LB y bactoagar 0,7% p/v.

Las cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, se crecieron en medios líquidos o sólidos suplementados con los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 50 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml.

### **2.2.2 Técnicas de biología molecular**

Las técnicas de biología molecular no detalladas utilizadas en este trabajo, tales como digestiones con enzimas de restricción, ligado de fragmentos de DNA, preparación de células electrocompetentes, transformación por electroporación y PCR, se realizaron mediante protocolos estandarizados (Sambrook y cols., 1989).

Las purificaciones de ADN plasmidial y de ADN a partir de geles, se realizaron utilizando el kit Plasmid DNA Mini Kit I y el UltraClean 15 DNA Purification Kit respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **2.2.3 Construcciones genéticas**

Por un lado, se sintetizó la construcción pETAB donde los genes *mceA* y *mceB* se encuentran río abajo de la región promotora T7 y del sitio operador *lac*. Esta

construcción se sintetizó en el vector pUC57, el cual fue diseñado de manera tal que la construcción pETAB estuviera flanqueada por sitios *Bam*HI. El vector pUC57pETAB se digirió con *Bam*HI, se purificó el segmento pETAB y se ligó en el mismo sitio presente en el vector p33AM, obteniendo la construcción p33pETAB, la cual permite la expresión regulable de la MccE492 mediante la adición de IPTG y además es compatible con plasmidios que contienen los sistemas productores de MccE492.

Por otro lado, se diseñaron una serie de mutantes del gen *mceA* (ver sección 2.2.4), las cuales se sintetizaron en el vector pUC57*mceA*, que fue diseñado de manera tal que *mceA* estuviera flanqueado por los sitios *Nde*I y *Hind*III. Así, *mceA* se ligó en los mismos sitios presentes en el vector p33pETAB  $\Delta$ líder, diseñado con el propósito de clonar todas las mutantes generadas a lo largo de este trabajo, en el sistema de expresión p33pETAB.

Todas las construcciones del tipo p33pETAB se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21-AI con el objetivo de minimizar la expresión basal de la polimerasa T7. Las construcciones fueron secuenciadas, para comprobar que no existen cambios no deseados en la secuencia nucleotídica.

## **2.2.4 Diseño de mutantes de MceA**

### **2.2.4.1 Predicción bioinformática de regiones pro-amiloidogénicas**

Se realizaron estudios de predicción bioinformática para identificar regiones en la secuencia primaria de la MccE492 que promuevan la formación de fibras

amiloides. Para esto se utilizó la herramienta Amylpred2 (Tsolis y cols., 2013), un predictor de regiones pro-amyloidogénicas conformado por 11 métodos diferentes: Aggrescan, AmyloidMutants, Amyloidogenic Pattern, Average Packing Density, Beta-strand contiguity, Hexapeptide Conformational Energy, NetCSSP, Pafig, SecStr, Tango y Waltz. Amylpred2 muestra como resultado las regiones predichas por cada uno de los 11 algoritmos y señala qué regiones muestran un mayor consenso.

#### **2.2.4.2 Mutaciones por delección y sustitución**

Una vez obtenidas las secuencias consenso predichas como pro-amyloidogénicas, se diseñaron mutantes por delección, donde se eliminaron las posibles regiones pro-amyloidogénicas dentro de la secuencia primaria de MccE492. A su vez, se sustituyeron ciertos residuos que podrían cumplir un rol inhibitorio de la amyloidogénesis, descritos como *gatekeepers*. Así, se obtuvieron una serie de mutantes a las que posteriormente se les evaluó su capacidad amyloidogénica.

#### **2.2.5 Ensayo de inducción**

Se inocularon 15 ml de LB más el respectivo antibiótico, con una dilución 1:20 de cultivo de noche de las cepas a estudiar. Se crecieron a 37°C y 220 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5-0,6. Luego, se separó cada muestra en dos y se indujo un duplicado de cada una, agregando 0,2% de arabinosa y 1 mM IPTG y se dejaron en las mismas condiciones mencionadas inicialmente. Después de cierto tiempo, para las muestras inducidas y no inducidas, se midió la DO<sub>600</sub> y se colectó una alícuota para posteriormente continuar con protocolos de extracto total de proteínas,



tinción con BTA-1 para observarlas mediante microscopía de fluorescencia, o tinción con Th-S para analizarlas mediante citometría de flujo.

### **2.2.6 Extracto total de proteínas**

El cultivo colectado se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y el precipitado bacteriano se resuspendió en 500 µl de *buffer* PBS. Luego, se incubaron las muestras a 95°C por 20 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se retiraron 400 µl del sobrenadante a un nuevo tubo y se les agregó 100 µl de TCA frío. Esta mezcla se dejó incubar 10 minutos en hielo. Pasado ese tiempo, nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C. S se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 200 µl de acetona fría, centrifugando en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, se evaporó la acetona a 95°C y el precipitado se resuspendió en 50 µl de *buffer* de carga 1X.

### **2.2.7 Electroforesis en gel con SDS (SDS-PAGE)**

Los geles consistieron en tres fases con distintas concentraciones de acrilamida (con 3% de entrecruzamiento): fase concentradora, espaciadora y separadora. La fase concentradora se compuso por acrilamida 16%, Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol 0,1%. La fase espaciadora se compuso por acrilamida 10%, Tris-HCl 1 M pH 8,5 y SDS 0,1%. Por último, la fase separadora se compuso por acrilamida 5%, Tris-HCl 1M pH 8,5 y SDS 0,1%. A cada una de las fases, además, se les agregó APS 0,033% y TEMED 2,2 mM final. Por otra parte, se prepararon soluciones de corrida para cátodo y ánodo. La primera consistió en Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1%; y la segunda, en Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. Las proteínas fueron

visualizadas por tinción con plata o fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar un inmunoblot.

### **2.2.8 Tinción con plata**

Una vez terminada la electroforesis se lavó exhaustivamente el gel con agua destilada y se dejó incubando 1 hora con agitación en solución de fijado (etanol 50%, ácido acético 12% y formaldehído 0,2%). Luego, se lavó dos veces con etanol 50%, incubando 20 minutos y después se dejó incubando 1 minuto en solución sensibilizadora ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  8 mM). Enseguida, se realizaron 3 lavados con agua nanopura y se dejó incubando en solución de plata ( $\text{AgNO}_3$  12 mM y formaldehído 0,03%) por 20 minutos con agitación. Pasado ése tiempo se lavó dos veces con agua nanopura y se incubó en solución de revelado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,57 M,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  16  $\mu\text{M}$  y formaldehído 0,02%) entre 5 a 10 minutos hasta lograr la visualización deseada. Finalmente, la reacción se detuvo agregando ácido acético 10%.

### **2.2.9 Inmunoblot**

Las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, durante 90 minutos a 400 mA y 100 V (corriente constante) a  $-20^\circ\text{C}$ , utilizando *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20%). La membrana fue bloqueada con leche descremada 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 0,1%) durante toda la noche con agitación. Luego, se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti-MccE492 (dilución 1:2000 preparado en

leche 5% en TBS-Tween) durante 1 hora, seguido de 3 lavados con TBS-Tween. Enseguida, se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5000 preparado en leche 5% en TBS-Tween), seguido nuevamente por 3 lavados con TBS-Tween.

Posteriormente, se continuó con el protocolo de revelado, mediante la detección colorimétrica de actividad fosfatasa alcalina. Para esto, la membrana se lavó con *buffer* FAL (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y se incubó en 10 ml de solución BCIP/NBT (BCIP 0,4 mM y NBT 0,4 mM en *buffer* FAL) hasta obtener una señal óptima.

## **2.2.10 Microscopía confocal**

### **2.2.10.1 Tinción con BTA-1**

Se colectaron 500 µl de cultivo y se centrifugó a 4000 rpm por 4 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se lavó con 250 µl de *buffer* PBS. Nuevamente, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm por 4 minutos, las células se resuspendieron en 250 µl de paraformaldehído al 4% y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego de ser fijadas, se lavaron 2 veces con 250 µl de *buffer* PBS, se resuspendieron en 125 µl BTA-1 y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron 2 veces con 125 µl de *buffer* PBS. Alícuotas de 10 µl de las células en PBS se montaron sobre portaobjetos con agarosa al 1% disuelta en PBS.

### **2.2.10.2 Observaciones microscópicas**

Las observaciones microscópicas de las células se realizaron utilizando el microscopio confocal LSM 710 (Zeiss), con una óptica de 63x/NA 1.40 con aceite de inmersión. La fluorescencia de la sonda Th-S se excitó utilizando un láser de argón de 488 nm y la emisión se registró en el rango de 410-520 nm. Para la sonda BTA-1 la excitación se realizó con el diodo láser de 405 nm y la emisión se registró en el rango de 493-552 nm. Las imágenes fueron adquiridas digitalmente con el programa ZEN 2012 y analizadas con el programa Fiji-ImageJ.

### **2.2.11 Citometría de flujo**

#### **2.2.11.1 Tinción con Tioflavina-S**

Se colectaron 500 µl de cultivo y se centrifugaron a 4000 rpm por 4 min. El precipitado bacteriano se lavó 2 veces con 500 µl de *buffer* PBS y luego se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en 250 µl de tioflavina-S (Th-S) al 0,05% p/v en etanol al 12,5%. Luego de la incubación con Th-S se lavaron las células 3 veces con *buffer* PBS. Las células fueron resuspendidas en PBS para luego ser analizadas mediante citometría de flujo.

#### **2.2.11.2 Detección de células**

La detección de células que presentan agregados intracelulares teñidos con Th-S se realizó utilizando el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II. Primero se realizó un *gating* de las células por señales de dispersión frontal (FSC) y de dispersión

lateral (SSC). Luego, se midió la fluorescencia de dichas células, excitando con una longitud de onda de 405 nm y la emisión fue colectada a 510/50 nm.

### **2.2.12 Purificación de MccE492**

La MccE492 se purificó a partir del sobrenadante de cultivos celulares. En el caso de cepas que expresan la proteína bajo su promotor natural, se inocularon 4 L de medio M9 suplementado, con una dilución 1:2000 de un cultivo de noche y se crecieron entre 18-20 horas a 37°C a 180 rpm. En el caso de cepas que expresan la proteína con el sistema inducible p33pETAB, se inocularon 4 L de medio M9 suplementado (glucosa 0,1% p/v), con cultivo de noche con una dilución 1:1000 y se crecieron a 37°C y 180 rpm hasta fase exponencial. Luego se agregó arabinosa 0,2% e IPTG 0,5 mM final y se crecieron en las mismas condiciones por 13 horas. Los 4 L de cultivo se centrifugaron a 7000 rpm por 30 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de polietersulfona de 0,22 µm. El filtrado se incubó con la resina C18, previamente activada con ACN, por 2,5 horas con agitación a 4°C. Posteriormente, la resina se filtró mediante presión negativa, a través de un embudo Buchner con dos capas de papel filtro acoplado a un matraz Kitasato. En seguida, se lavó con 200 ml de metanol 40% y con 200 ml de ACN 25% sucesivamente. La MccE492 se eluyó con fracciones sucesivas de 50 ml de ACN 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%.

Las fracciones de 50 ml de ACN enriquecidas con MccE492 se dializaron con agitación suave en dos pasos de 2 horas, contra 4 L de buffer Tris 5mM pH 8,5 a

4°C. Luego, la solución dializada se congeló en un baño frío de metanol a -80°C, se liofilizó y se guardó a -20°C.

### 2.2.13 Ensayos de agregación

Se disolvió proteína liofilizada en buffer Tris 5mM pH 8,5 y se centrifugó a 16000g por 40 min a 4°C con el objetivo de eliminar agregados. El sobrenadante se diluyó en *buffer* de agregación (100 mM PIPES, NaOH, 0,5 M, NaCl pH 6,5), dejando los ensayos de agregación a una determinada concentración de proteína, los que se incubaron a 37°C con agitación (800 rpm). A distintos tiempos de agregación se colectaron alícuotas para, por un lado observar la formación de fibras mediante microscopía electrónica de transmisión y, por otro lado, para cuantificar la formación de fibras mediante la disminución de rojo Congo libre. De este modo fue posible seguir la formación de fibras amiloides a lo largo del tiempo (cinética de agregación).

### 2.2.14 Medición con rojo Congo

Alícuotas colectadas a distintos tiempos de agregación se incubaron con rojo Congo 33  $\mu$ M con agitación (800 rpm) a 37°C por 15 min y luego se centrifugaron a 16000g por 30 min a 4°C. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 490 nm. El porcentaje de rojo Congo libre de cada muestra se obtuvo relativo a la absorbancia registrada en el tiempo inicial, como la razón entre la absorbancia medida en cada tiempo y la registrada a tiempo cero.



### **2.2.15 Microscopía electrónica de transmisión**

Alícuotas de los ensayos de agregación se colocaron sobre rejillas de Cu-Rh de 300 mesh recubiertas por carbón sometidas a descarga luminiscente, y fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Las micrografías se obtuvieron mediante un microscopio JEOL 1200EX con un filamento de tungsteno operado a 100 kV y a una magnificación de 60000X.

### **2.2.16 Cuantificación de la actividad bactericida**

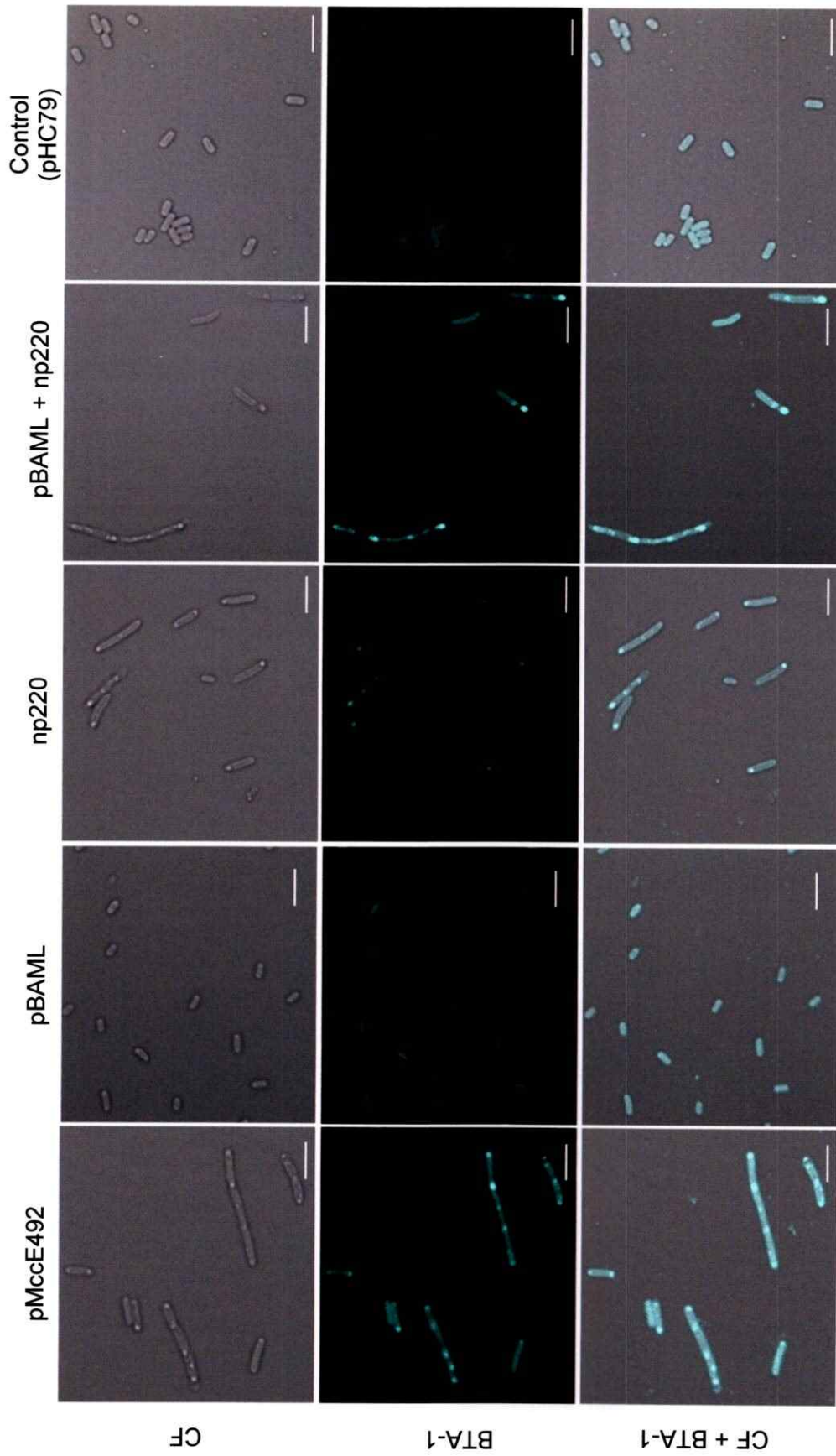
Para la cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492 silvestre y mutantes, se realizaron diluciones seriadas de las muestras en base 2 con agua nanopura estéril. Se colocaron alícuotas de 3  $\mu$ l de cada tubo de la dilución sobre placas de césped sensible a la MccE492. El césped se preparó mezclando 3 ml de agar blando fundido con 300  $\mu$ l de cepa sensible en fase exponencial. Las placas se incubaron a 37°C durante 12-14 h, y se determinó el título de la muestra en unidades arbitrarias (U.A.), definidas como el inverso de la dilución del último tubo cuya alícuota es capaz de producir un halo de inhibición de crecimiento.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Formación de amiloides intracelulares de la MccE492

Se han descrito ciertas proteínas que forman agregados intracelulares de naturaleza amiloide en bacterias. Tal es el caso de la proteína bacteriana RepA y de proteínas amiloidogénicas humanas que al ser expresadas en bacterias forman inclusiones amiloides intracelulares. La MccE492 es una bacteriocina capaz de formar fibras amiloides *in vitro*, sin embargo no existen reportes de la ocurrencia de este fenómeno *in vivo* en el medio intracelular. Para evaluar si la MccE492 forma amiloides intracelulares, células de *E. coli* BL21-AI que expresaban distintos sistemas de producción de la MccE492 se tiñeron con la sonda amiloidofílica BTA-1. Se utilizaron células que expresaban: i) el sistema completo de producción (pMccE492), ii) sólo los genes estructural y de inmunidad (pBAML), iii) el *cluster* completo pero sin el gen estructural (np220) y iv) células que co-expresaban los dos últimos (pBAML + np220). Dichas células se crecieron por 48 horas en medio M9 suplementado a 37°C con agitación. La morfología celular y los resultados de la tinción se observaron mediante microscopía confocal (Figura 4). Al expresar el sistema de producción completo, se observaron inclusiones intracelulares fluorescentes reconocidas por la sonda amiloidofílica que se localizaron a lo largo de las células. Al expresar únicamente el gen estructural y de la inmunidad no se encontraron inclusiones fluorescentes, pero al co-expresar pBAML y np220, cuya suma genera la expresión del sistema completo, se observó el mismo fenotipo que con pMccE492. Al expresar todos los genes del *cluster* pero sin el gen estructural





**Figura 4: Imágenes de microscopía confocal de *E. coli* que portan distintos sistemas productores de MccE492.**

Células de *E. coli* BL21-AI que portan distintos sistemas productores de MccE492, fueron teñidas con la sonda amiloídofílica BTA-1. Se observaron células que expresaban el sistema completo de producción (pMccE492), sólo los genes estructural y de inmunidad (pBAML), el *cluster* completo pero sin el gen estructural (np220) y células que co-expresaban los dos últimos (pBAML + np220). La morfología celular y la acumulación de agregados intracelulares fueron observados mediante microscopía confocal con contraste de fases (CF) y fluorescencia. Las barras corresponden a 4  $\mu\text{m}$ .

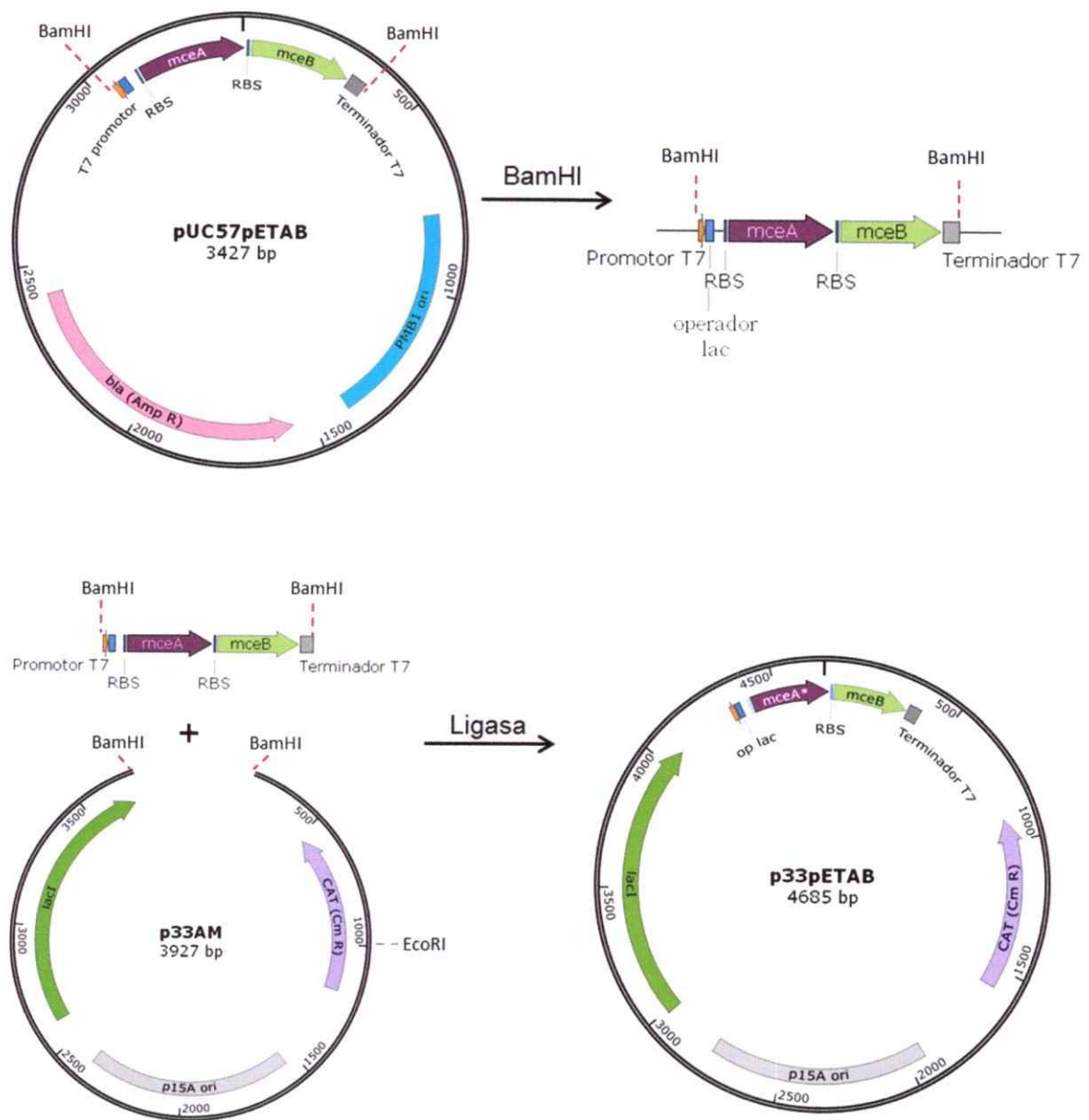
se observaron pequeñas inclusiones fluorescentes ubicadas en uno de los polos de las células. Estos resultados iniciales indican que células de *E. coli* que expresan la MccE492 bajo el control de su promotor natural, en presencia de los genes del sistema productor, acumulan inclusiones amiloides en su citoplasma.

### **3.2 Diseño y construcción de un sistema de expresión finamente regulada de la MccE492**

#### **3.2.1 Construcción del plasmidio p33pETAB**

Para estudiar la formación de amiloides intracelulares de la MccE492 en posteriores ensayos de microscopía y citometría de flujo, se quiso obtener un sistema de expresión finamente regulado. Para esto se diseñó el sistema p33pETAB, de modo que los genes *mceA* (estructural) y *mceB* (inmunidad) se encuentran río abajo de la región promotora T7 y del sitio operador *lac*. A su vez, en este vector se expresa constitutivamente el represor LacI. De este modo, la expresión de la MccE492 y de la proteína de inmunidad, depende de la adición de IPTG (Figura 5).

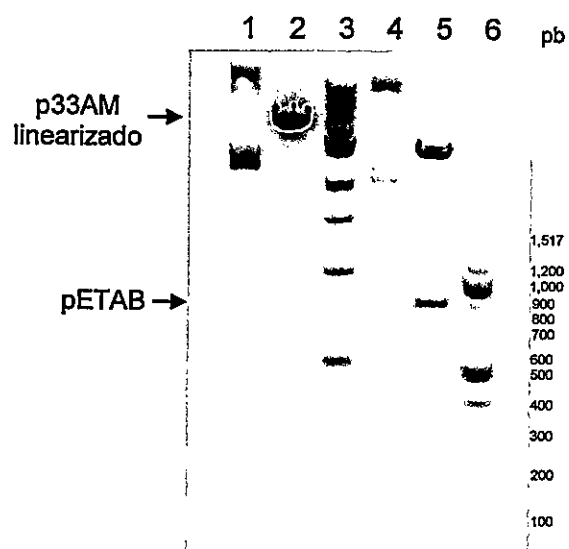
Cabe mencionar que naturalmente los genes *mceA* y *mceB* forman una unidad transcripcional, en donde *mceB* se encuentra río arriba y cuyos últimos nucleótidos se solapan con el inicio de *mceA*. Hay evidencias que señalan la existencia de una posible región promotora dentro del gen *mceB* la cual podría afectar la expresión de *mceA* (Argandoña, 2015). Debido a esto, el sistema pETAB fue diseñado invirtiendo el orden de los genes, evitando un efecto de la posible región promotora interna y



**Figura 5: Estrategia para la construcción del plasmidio p33pETAB.**

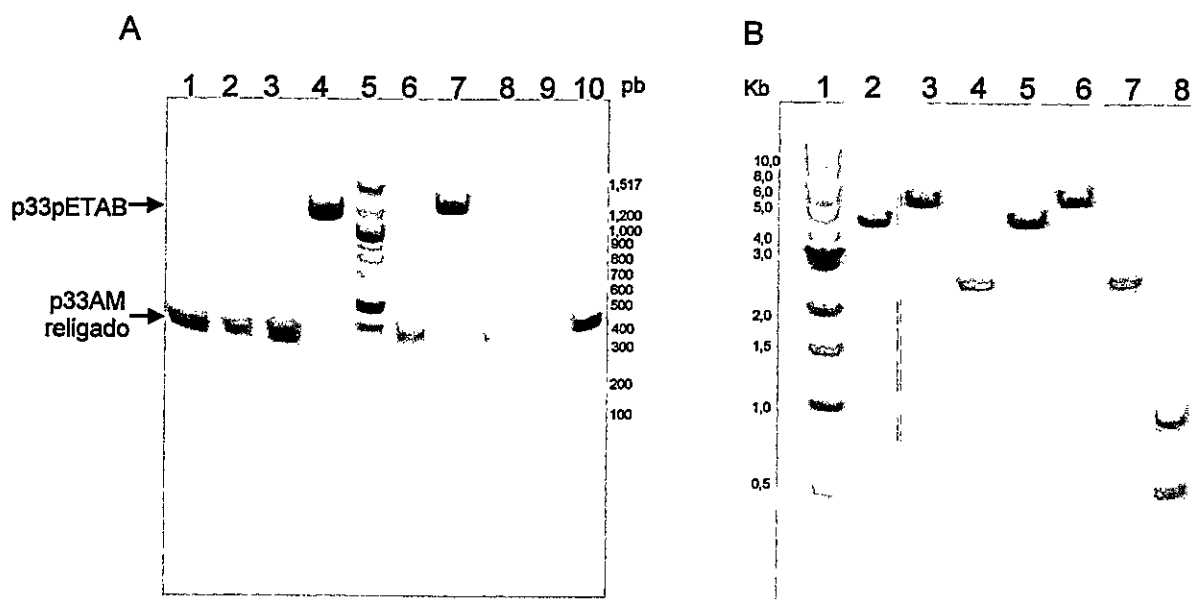
**A)** El plasmidio pUC57pETAB fue digerido con la enzima *Bam*HI, liberando el fragmento pETAB **B)** El fragmento pETAB fue ligado al vector p33AM, previamente digerido con *Bam*HI, originando el vector p33pETAB

asegurando que la expresión de *mceA* sea controlada únicamente por el promotor T7. Para generar la construcción, se clonó el sistema pETAB en el vector p33AM. El vector p33AM tiene un origen de replicación compatible con otros plasmidios que se desean co-expresar con este sistema y también contiene el gen que codifica al represor LacI. Se digirieron los plasmidios p33AM y pUC57pETAB con la enzima *Bam*HI. Ambas digestiones se visualizaron en un gel de agarosa, dando como resultado el vector p33AM linearizado (3,9 Kb), el vector pUC57 vacío (3,4 kb) y la banda pETAB liberada (756 pb), de los tamaños esperados (Figura 6). El vector p33AM linearizado y la banda pETAB fueron purificados a partir del gel y posteriormente fueron ligados con la enzima ligasa T7. Con la mezcla de ligado se transformaron por electroporación células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , las que se crecieron en placas con cloranfenicol para seleccionar aquellas células que incorporaron la construcción. Para distinguir las colonias que incorporaron la construcción p33pETAB de aquellas que incorporaron el vector p33AM religado, se realizó un PCR de colonias de los transformantes con los partidores p33AM\_FW y p33AM\_RV. Se encontraron 2 clones con un amplificado del tamaño esperado para la construcción p33pETAB (1,1 kb) (Figura 7A). Se extrajo DNA plasmidial de ambos clones y se chequearon los patrones de digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Los 2 clones presentaron el patrón esperado (Figura 7B). Se seleccionó un clon el cual se envió a secuenciar y se verificó que la secuencia correspondía con la esperada para la construcción p33pETAB sin ninguna alteración.



**Figura 6: Digestiones de p33AM y pUC57pETAB con *Bam*HI.**

Carril 1: Plasmidio p33AM sin digerir. Carril 2: Plasmidio p33AM digerido con *Bam*HI. Carril 3: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 4: Plasmidio pUC57pETAB sin digerir. Carril 5: Plasmidio pUC57pETAB digerido con *Bam*HI. Carril 6: marcador de peso molecular 100 bp.



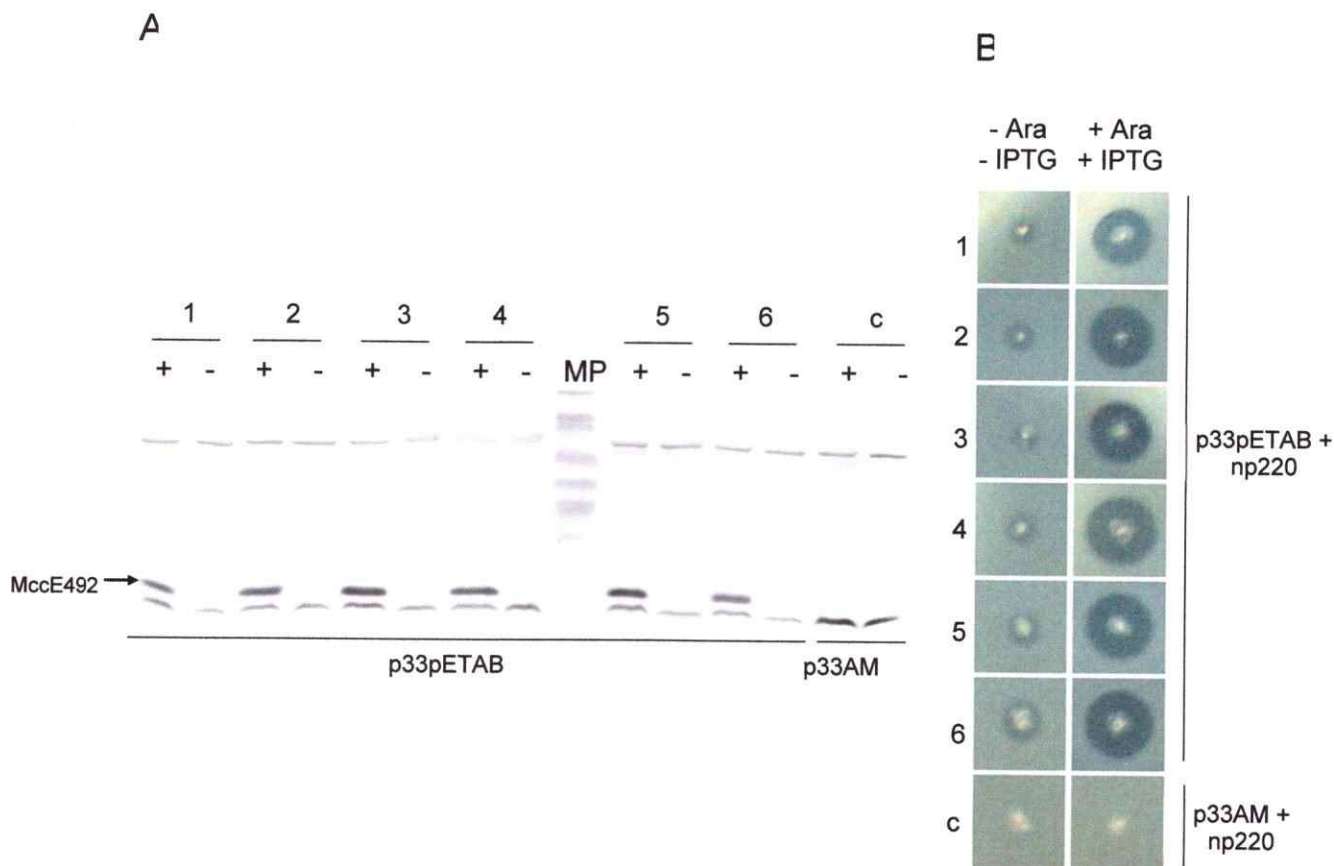
**Figura 7: Selección y posterior revisión de posibles transformantes p33pETAB.**

**A)** PCR-colonia de transformantes p33pETAB. Para distinguir la construcción p33pETAB de posibles religados del plasmidio p33AM se realizó un PCR-colonia de los transformantes. Carriles 1-4 y 6-10: amplificado de PCR-colonia de 10 transformantes. Carril 5: marcador de peso molecular 100 bp. **B)** Patrones de restricción de la construcción p33pETAB. Se seleccionaron 2 clones que presentaron el amplificado del tamaño esperado en el PCR y se digirieron con *Bam*HI y *Eco*RI. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: digestión con la enzima *Bam*HI. Carril 3: digestión con enzima *Eco*RI. Carril 4: vector sin digerir. Carriles 5,6 y 7 ídem pero para otro clon. Carril 8: marcador de peso molecular 100 bp.

### 3.2.2 Ensayo de inducción del sistema p33pETAB

Una vez obtenida la construcción p33pETAB (Figura 7), se evaluó si dicho sistema efectivamente permite una expresión regulada de la MccE492. Para ello, se introdujo p33pETAB en células *E. coli* BL21-AI, donde la expresión de la polimerasa T7 depende de la adición de arabinosa. Se realizó un ensayo de inducción seleccionando seis clones, los que se incubaron por 4 horas en presencia de los inductores IPTG y arabinosa. Luego, se preparó un extracto total de las muestras inducidas y no inducidas y se analizó mediante SDS-PAGE y posterior inmunoblot (Figura 8A). En las muestras inducidas se observó una banda del tamaño esperado para la MccE492 que está ausente tanto en las muestras no inducidas, como en el control negativo con el vector p33AM. Esto indica que la MccE492 sólo se expresa en presencia de inductor, es decir, el sistema p33pETAB es óptimo para una regulación fina de la expresión de dicha proteína. Además, el vector p33pETAB se co-expresó con el plasmidio np220 para permitir la modificación y exportación de la proteína, y así evaluar la actividad bactericida de la MccE492 sobre un césped sensible, en placas con y sin inductor (Figura 8B). Se sembraron seis clones en ambas placas y se observó un halo de inhibición de crecimiento de mayor tamaño en presencia de los inductores, demostrando que en el sistema p33pETAB, co-expresado con np220, produce MccE492 activa y que, al igual que lo observado en el inmunoblot, es posible regular su expresión mediante la adición de inductor. Esto también muestra que la inversión de los genes *mceA* y *mceB* no tiene un efecto aparente sobre la actividad bactericida de la MccE492.





**Figura 8: Evaluación de la expresión de la MccE492 en el sistema p33pETAB y detección de la actividad bactericida.**

**A)** SDS-PAGE e inmunoblot de un extracto total de proteínas a partir de 6 clones de células *E. coli* BL21-AI que contienen la construcción p33pETAB (inducidos con arabinosa 0,2 % p/v e IPTG 1mM; y el control no inducido). Como control negativo se utilizó un extracto total de células que contienen el plasmidio vacío p33AM. **B)** Colonias de *E. coli* BL21-AI que contienen la construcción p33pETAB y el plasmidio np220, que porta los genes que permiten modificar y exportar la MccE492, se sembraron sobre un césped de células sensibles a la actividad bactericida de la MccE492. Se sembraron 6 colonias en placas con y sin inductores (arabinosa 0,2% p/v e IPTG 1mM). Como control negativo (c) se utilizó el vector p33AM más el plasmidio np220 en BL21-AI.



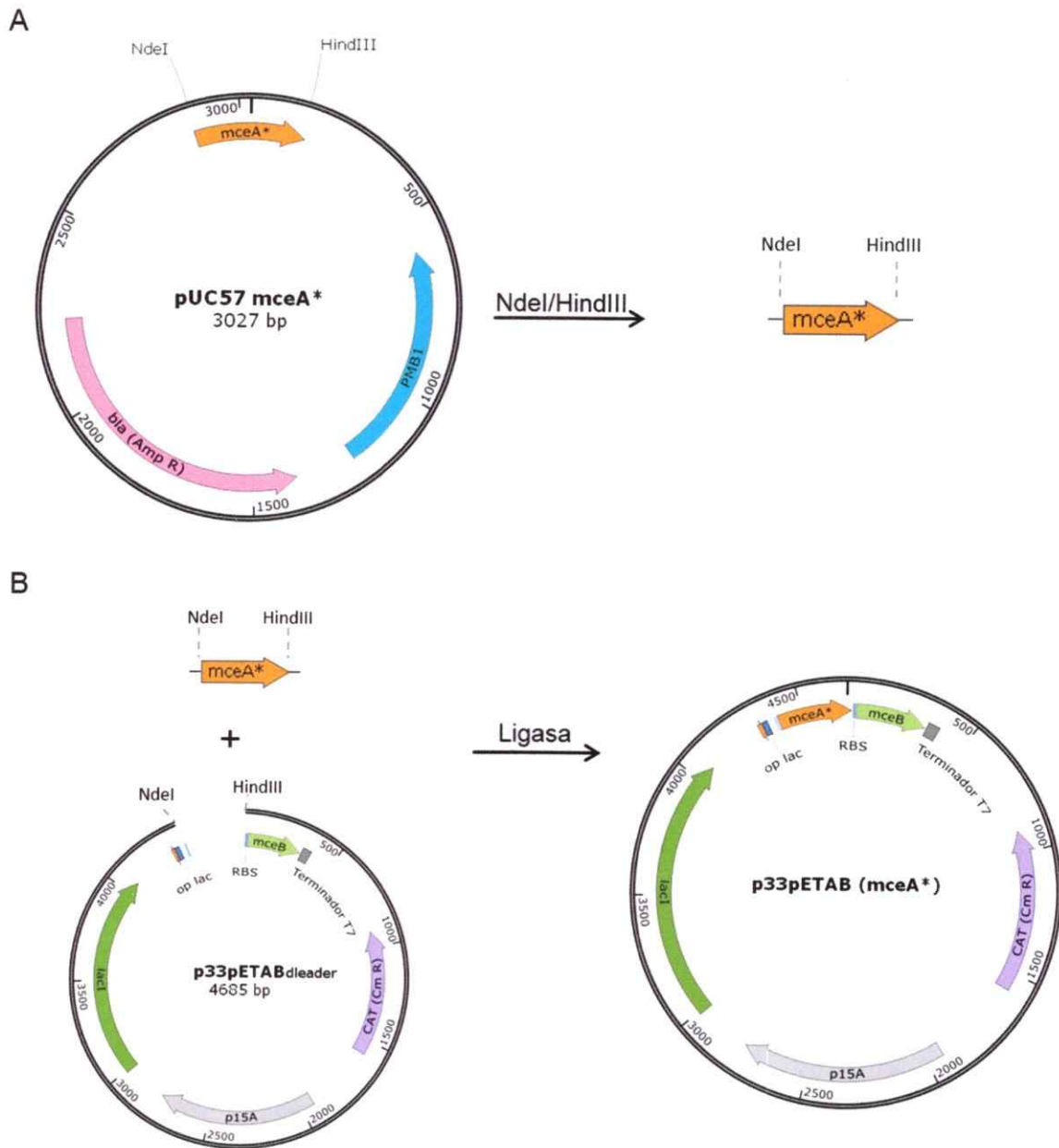
### **3.3 Búsqueda de regiones o residuos que promueven la formación de agregados amiloides de la MccE492 *in vivo*.**

#### **3.3.1 Estrategia de construcción y análisis de mutantes de la MccE492**

##### **3.3.1.1 Clonamiento de mutantes en el sistema p33pETAB**

Para evaluar si ciertas regiones o residuos en la MccE492 controlan su amiloidogénesis, se diseñaron una serie de mutantes del gen *mceA* que se clonaron en el sistema de expresión p33pETAB. Para ello, se ideó una estrategia de clonamiento para reemplazar sólo la secuencia *mceA* sintética mutada (301 bp) y no el vector completo (Figura 9). Para esto se diseñó y se sintetizó el vector p33pETAB  $\Delta$ líder. A diferencia del vector p33pETAB generado al comienzo de este trabajo, el vector p33pETAB  $\Delta$ líder tiene el gen *mceA* flanqueado por los sitios *NdeI* y *HindIII*. Las versiones mutantes de *mceA* se diseñaron de modo que la secuencia estuviera flanqueada por los mismos sitios. Luego, siguiendo los mismos procedimientos que en el punto 3.2.1, el vector p33pETAB  $\Delta$ líder y las versiones mutantes de *mceA* se digirieron con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. Se purificó el vector vacío y la banda de *mceA*. Se ligaron y se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  con la mezcla de ligado. Las transformantes se analizaron mediante PCR-colonia y los clones positivos fueron seleccionados y secuenciados.

Así, fue posible clonar de manera direccional y con una estrategia sencilla, todas las versiones mutantes de *mceA* diseñadas a lo largo de este trabajo en el sistema de expresión p33pETAB.

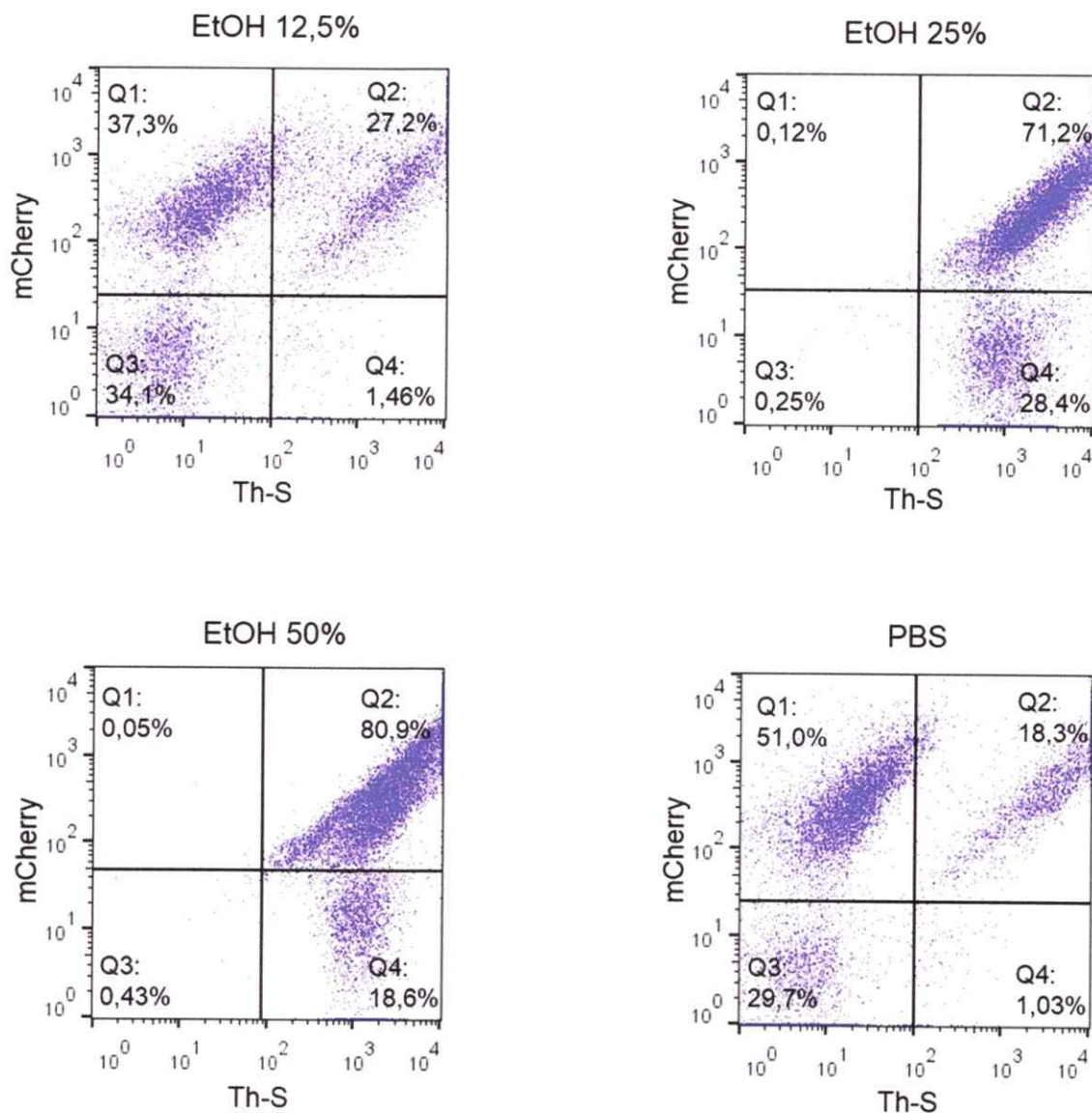


**Figura 9: Estrategia de clonamiento de distintas mutantes de *mceA* en el vector p33pETAB.**

**A)** El plasmidio pUC57*mceA\**, que contiene versiones mutantes del gen *mceA*, fue digerido con las enzimas *NdeI* y *HindIII*, liberando el fragmento *mceA\** **B)** El fragmento *mceA\** fue ligado al vector p33pETABΔlíder, previamente digerido con *NdeI* y *HindIII*.

### 3.3.1.2 Calibración de la tinción con Tioflavina S

Con el propósito de evaluar la formación de agregados amiloides intracelulares *in vivo* formados por la MccE492, de una manera rápida, robusta y cuantitativa, se utilizó el método publicado por Espargaró y cols. (2012) donde se tiñeron células de *E. coli*, que expresan proteínas amiloidogénicas, con la sonda amiloidofílica Tioflavina S (Th-S) y las inclusiones fluorescentes se detectaron y cuantificaron mediante citometría de flujo. En este trabajo, se tiñeron las células que expresan las distintas mutantes de la MccE492 con la sonda Th-S y se midió el porcentaje de la población que presentó una señal positiva para esta sonda mediante citometría de flujo (Figura 10). Para calibrar la tinción con la sonda Th-S, se utilizaron células que contienen el vector pWH1 (A31V), pues expresan una versión hiperamiloidogénica de la proteína RepA fusionada a la proteína fluorescente mCherry, inducible por la adición de IPTG. Cabe destacar que de acuerdo a lo descrito por Giraldo y cols. (2010), al inducir la expresión de dicha fusión se acumulan inclusiones amiloides intracelulares. De este modo se tendrían dos canales para seguir la formación de amiloides intracelulares: mCherry y Th-S. Si la sonda se une efectivamente a los agregados intracelulares, se esperaría una coincidencia entre ambos canales, es decir, la población que resulte positiva para mCherry debiera ser positiva para Th-S y las negativas debieran serlo para ambos canales. Así, se tiñeron las células que expresan la proteína RepA(A31V)mCherry con la sonda Th-S, siguiendo el protocolo descrito por Espargaró y cols. (2012). Se preparó la sonda en *buffer* PBS y se incubó 1 hora con dichas células. Se midió la fluorescencia de 10000 células en cada una de las muestras.



**Figura 10: Calibración de tinción con Th-S.**

Células de *E. coli* que expresan una versión hiperamiloidogénica de RepA fusionada a mCherry fueron teñidas con la sonda amiloidofílica Th-S. Se probaron distintas condiciones de tinción: en PBS, etanol al 12,5%, al 25% y al 50%. En cada condición se cuantificó el porcentaje de población positiva o negativa para Th-S y mCherry, mediante citometría de flujo. Q1: falsos negativos. Q4: falsos positivos.

Los resultados se muestran en gráficos bivariados, donde Q1 es la población que muestra una alta señal de fluorescencia de mCherry y baja para Th-S (falsos negativos), Q2 es la población que muestra una alta señal para ambos canales, Q3 es la población que presenta una baja señal para ambos canales y Q4 es la población que presenta una baja señal para mCherry y alta señal para Th-S (falsos positivos). Por lo tanto, lo óptimo sería tener el menor porcentaje posible de la población en Q1 y Q4. Al analizar estas muestras mediante citometría de flujo se encontró que un gran porcentaje de la población que expresaba la proteína en Q1, lo que indicó que la sonda no tiñó gran parte de los agregados intracelulares generando un número importante de falsos negativos (Figura 10). En consecuencia, se realizaron variaciones del protocolo original y se preparó la sonda al 0,05% p/v en distintas concentraciones de etanol (50%, 25% y 12,5%) de manera de permeabilizar las células y favorecer el ingreso de la sonda. Con 50% y 25% de etanol, células que no expresaban mCherry fueron fuertemente teñidas con Th-S, generando un número importante de falsos positivos. Con etanol al 12,5% fue posible reducir el número de falsos negativos y falsos positivos y así aumentar la coincidencia entre ambos canales. Por lo tanto, se eligió esta condición para teñir las células en todos los experimentos sucesivos realizados en este trabajo.

### **3.3.2 Diseño de mutantes que afectan distintas regiones de la MccE492**

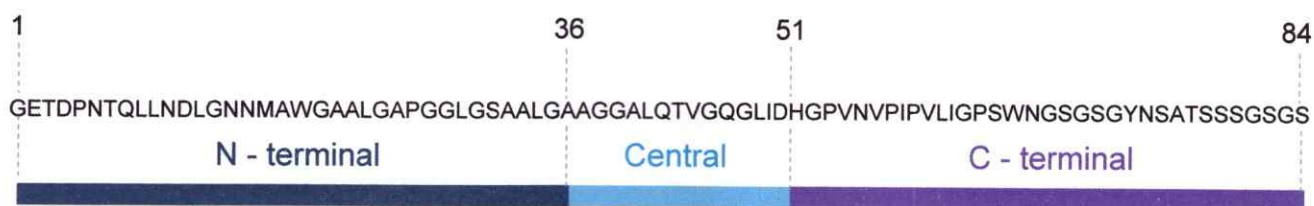
Con el objetivo de buscar dentro de la secuencia de la MccE492, regiones que afecten su amiloidogénesis, se diseñaron mutantes en las que se eliminaron tres regiones que en conjunto abarcan la proteína completa: región amino terminal

( $\Delta$ N-terminal), central ( $\Delta$ central) y carboxilo terminal ( $\Delta$ C-terminal) (Figura 11). En la primera, se eliminaron los residuos desde el 1 al 36; en la segunda, desde el 37 al 51 y en la última se eliminaron los residuos desde el 52 al 84. En todos los casos se conservó la secuencia del péptido líder.

### **3.3.3 Análisis mediante citometría de flujo de la versión silvestre de MccE492 y de las mutantes $\Delta$ N-terminal, $\Delta$ central y $\Delta$ C-terminal**

Las mutantes  $\Delta$ N-terminal,  $\Delta$ central y  $\Delta$ C-terminal clonadas en el sistema p33pETAB fueron analizadas para evaluar la formación de amiloides intracelulares. La MccE492 silvestre y las tres mutantes clonadas en el sistema p33pETAB se expresaron en células BL21-AI y células BL21-AI que contienen el vector np220. Este vector el presenta todos los genes del sistema productor de MccE492 excepto el gen estructural, el cual se encuentra interrumpido por el transposón Tn5.

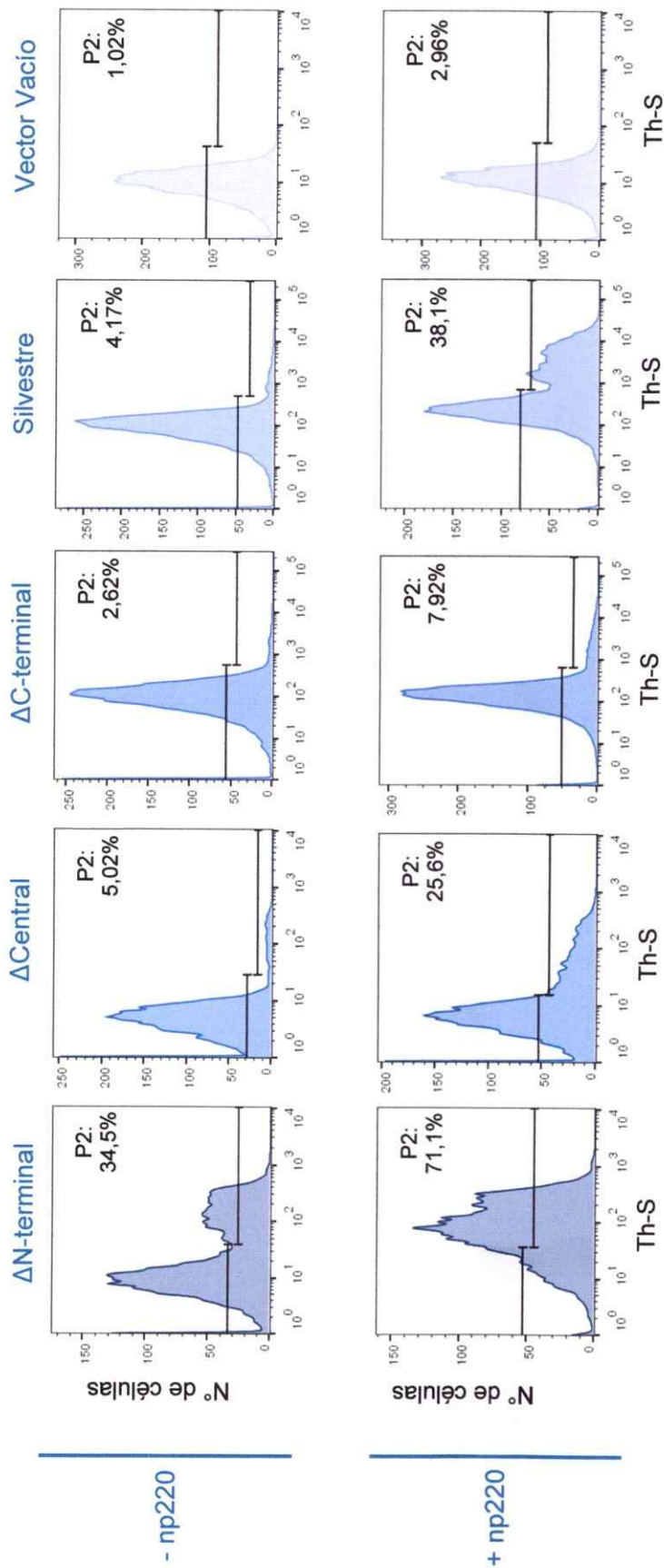
Tal como se describe en la sección 3.2.2, se hizo un ensayo de inducción, con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM por 5,5 horas. Las células inducidas y las no inducidas se tiñeron con la sonda Th-S y la formación de amiloides intracelulares se cuantificó mediante citometría de flujo (Figura 12). Se midió la fluorescencia de 10000 células en cada una de las muestras. Los resultados se muestran en histogramas de frecuencia, donde P2 es la población que muestra una alta señal de fluorescencia de Th-S. Todas las muestras no inducidas presentaron un porcentaje menor al 2% de la población en P2 (datos no mostrados). A su vez, se observó que en presencia de np220 hubo un aumento en el porcentaje de población positiva para



**Figura 11: Mutantes por delección de las regiones N-terminal, central y C-terminal de la MccE492.**

Se diseñaron tres mutantes de la MccE492, donde se eliminó una de las tres regiones de la proteína madura: desde el residuo 1 al 36 ( $\Delta$ N-terminal), del 37 al 51 ( $\Delta$  central) y del 42 al 53 ( $\Delta$ C-terminal).





**Figura 12: Detección de agregados intracelulares *in vivo* formados por MccE492 silvestre y mutantes ΔN-terminal, ΔCentral y ΔC-terminal, mediante citometría de flujo.**

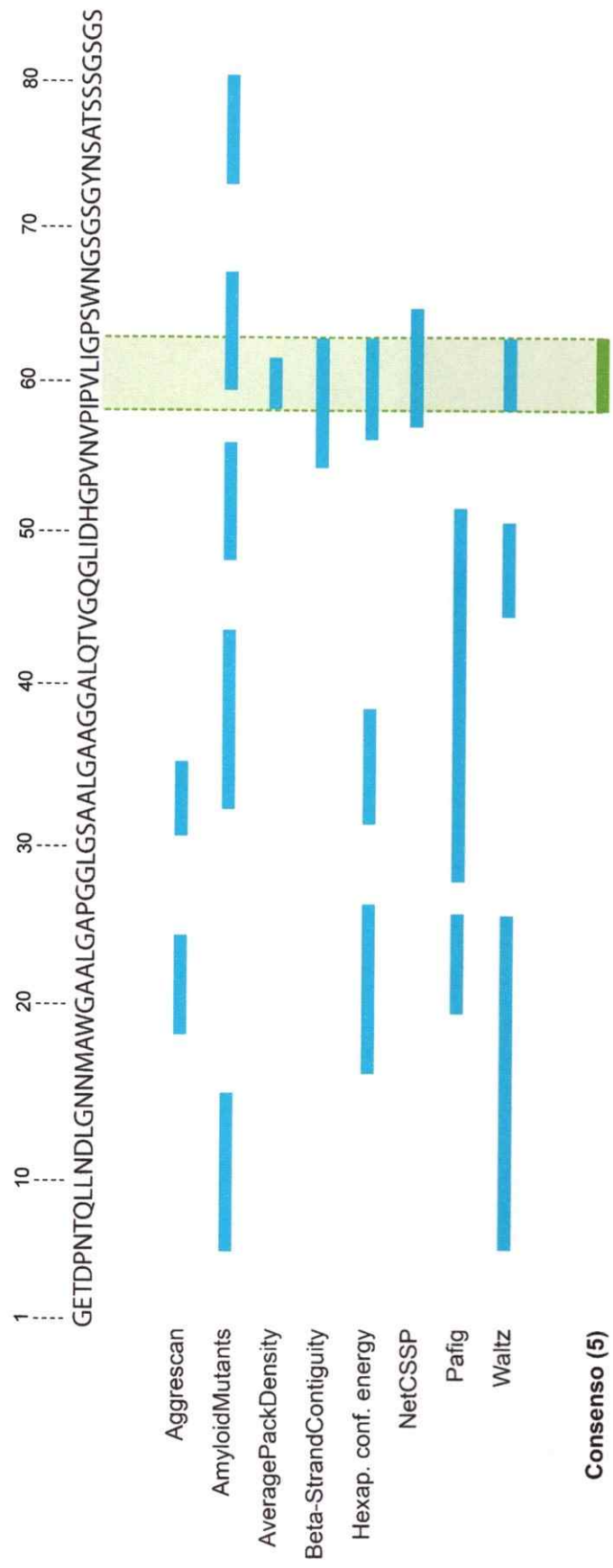
Se analizó la formación de amiloides intracelulares de células de *E. coli* BL21-AI que portan el sistema p33pETAB con MccE492 silvestre y mutantes por delección de las tres regiones. Para esto, células inducidas por 5,5 horas fueron teñidas con la sonda amiloidofílica Th-S. En cada muestra se detectó y cuantificó el porcentaje de la población Th-S positiva (P2). Esto se realizó tanto en ausencia (-np220) como en presencia (+np220) como en presencia (+np220) que aportan el resto de los genes del sistema productor de MccE492. Como control se utilizó el vector vacío p33AM.



Th-S en todos los casos. En ausencia de np220, las células inducidas que expresan la MccE492 silvestre mostraron alrededor de un 4% de la población en P2. Sin embargo, en presencia de np220 el porcentaje en P2 en las células inducidas aumentó hasta un 38%. La mutante  $\Delta$ central mostró un comportamiento muy similar a la proteína silvestre. En cambio, la mutante  $\Delta$ N-terminal presentó alrededor del 71% de la población en P2 en presencia de np220 y un 34% en ausencia de np220. Por el contrario, en la mutante  $\Delta$ C-terminal inducida con np220 hubo una disminución de las células en P2, llegando sólo a un 8%. Estos resultados sugieren que los últimos 33 residuos de la MccE492 podrían contener una posible región pro-amiloidogénica, pues al eliminar dichos residuos hay una disminución en la propensión de formar amiloides intracelulares.

#### **3.3.4 Predicción bioinformática de regiones pro-amiloidogénicas**

Paralelamente, se realizó una búsqueda bioinformática de posibles regiones pro-amiloidogénicas presentes en la secuencia de la proteína (Figura 13). Se utilizó la herramienta Amylpred2 (Tsolis y cols., 2013) que se compone por once algoritmos que predicen posibles regiones pro-amiloidogénicas presentes en la secuencia primaria de la proteína en cuestión y realiza el consenso de las regiones predichas. Con esta herramienta se analizó la secuencia de la MccE492 madura. La región que obtuvo un mayor consenso fue la región 60-62, la cual fue predicha como una posible región amiloidogénica por seis de los once métodos. A su vez con un consenso de cinco métodos se obtuvo la región 58-63. Cabe destacar que un



**Figura 13: Predicción bioinformática de regiones pro-amiloidogénicas de la MccE492.**

Se analizó la secuencia peptídica de la proteína MccE492 madura con el predictor Amylpred2. Ocho de los once algoritmos que lo componen reconocieron diversas regiones pro-amiloidogénicas. La región comprendida entre los residuos 58 y 63 fue predicha como pro-amiloidogénica con un consenso de cinco algoritmos (barra verde).

consenso de cinco métodos es el umbral mínimo para seleccionar una región como pro-amiloidogénica de acuerdo a los autores de la herramienta Amlypred2. Estos resultados, en conjunto con los resultados de citometría de flujo obtenidos con la mutante  $\Delta$ C-terminal, sugieren fuertemente que los residuos dentro y/o entorno a la región 58-63 estarían participando en la formación de amiloides de la MccE492.

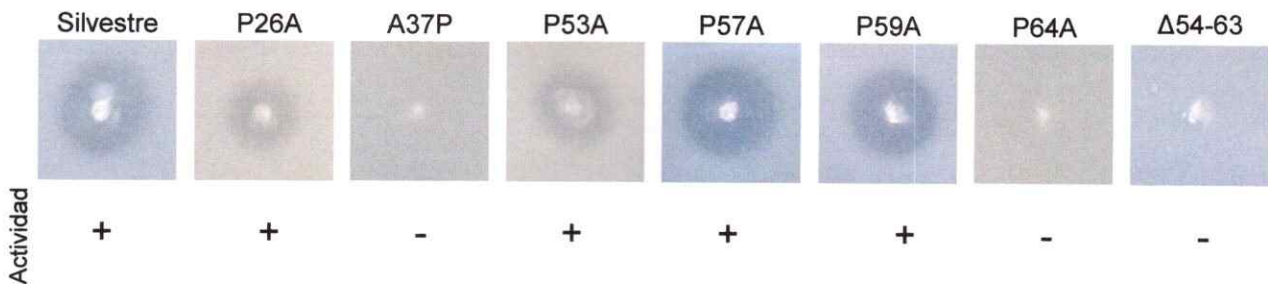
### **3.3.5 Diseño de mutantes puntales y deleciones de pequeñas regiones de la MccE492 que afecten la formación de amiloides**

De acuerdo a los resultados obtenidos de la formación de agregados intracelulares de las mutantes  $\Delta$ N-terminal,  $\Delta$ central y  $\Delta$ C-terminal y a las predicciones bioinformáticas, se diseñaron mutantes puntales de la MccE492 de acuerdo a diferentes criterios (Figura 14A). Investigaciones señalan que residuos particulares denominados *gatekeepers* se ubican en posiciones cercanas a regiones pro-amiloidogénicas e impiden una agregación descontrolada (Wang y cols., 2010; Beerten y cols., 2012). Interesantemente, alrededor y dentro de la región 58-63, hay 4 prolina en las posiciones 53, 57, 59 y 64. La prolina es un residuo particular que dificulta la formación de hebras  $\beta$  y que ha sido previamente descrito como un residuo *gatekeeper*, por lo que se diseñaron mutantes en las que se sustituyó este residuo por una alanina. A su vez, se han descrito casos en que existen repetidos en la secuencia de proteínas que determinan su agregación (Wang y Chapman, 2008). Al analizar la secuencia de la MccE492 se encontró un repetido casi perfecto de 8 residuos (posiciones 21-28 y 32-39), por lo tanto se diseñaron mutantes puntales para dejar estos repetidos exactamente iguales.

**A**



**B**



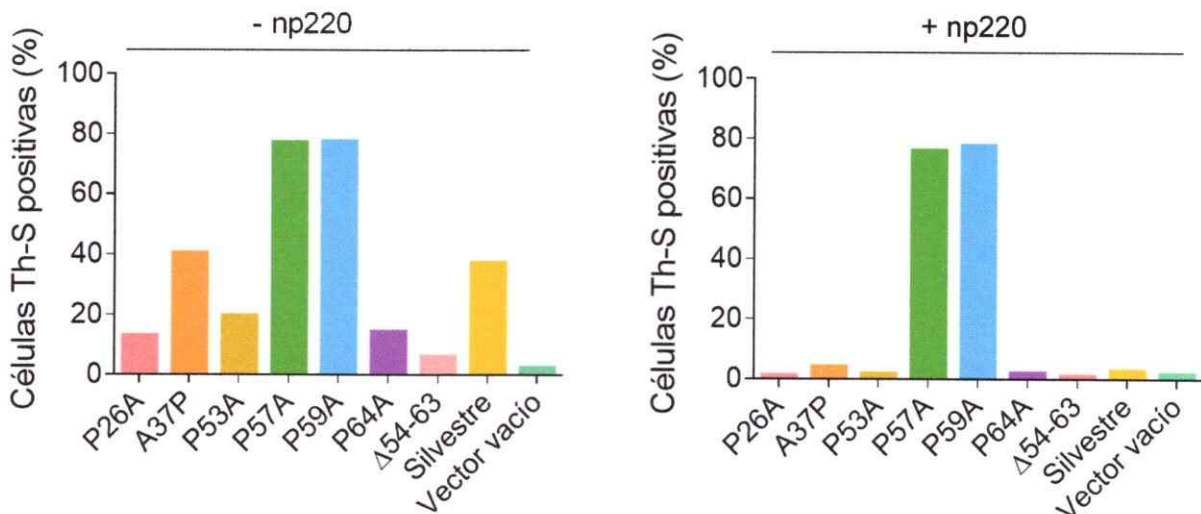
**Figura 14: Diseño de mutantes de la MccE492 que afecten su amiloidogénesis.**

**A)** Se diseñaron una serie de mutantes de la MccE492 a partir de los siguientes hallazgos. Por un lado, se encontró un repetido imperfecto (barras moradas) y para dejarlo idéntico se construyeron las mutante P26A y A37P. Por otro lado, se encontraron cuatro prolinas alrededor de la región predicha como pro-amiloidogénica (barra verde), por lo que se diseñaron las mutantes P53A, P57A, P59A y P64A. **B)** Colonias de *E. coli* BL21-AI que contienen la construcción p33pETAB versión silvestre y mutantes co-expresadas con el plasmidio np220, se sembraron sobre un césped de células sensibles a la actividad bactericida de la MccE492 y se evaluó la aparición de un halo de inhibición del crecimiento.

Cabe mencionar que en un trabajo paralelo a éste (Lobos P., Tesis de Doctorado en desarrollo), se generó una mutante en el cual se eliminó la región 54-63 de la MccE492 que posiblemente contiene la región pro-amiloidogénica propuesta. Considerando lo anterior, se aprovechó la existencia de esta mutante para analizar su capacidad de formación de agregados amiloides intracelulares.

### **3.3.6 Citometría de flujo de las diversas mutantes de la MccE492.**

Todas las mutantes diseñadas fueron clonadas en el sistema de expresión p33pETAB siguiendo los mismos procedimientos señalados en el punto 3.3.2. Una vez clonadas se co-expresaron con np220 de modo de evaluar si presentaban actividad bactericida (Figura 14B). Todas las mutantes mostraron actividad bactericida sobre un césped de *E. coli* sensibles a MccE492, excepto las mutantes A37P, P64A y  $\Delta$  54-63, indicando que estas últimas mutaciones podrían estar en regiones esenciales para la actividad de la MccE492. Posteriormente se evaluó la formación de amiloides intracelulares de cada una de ellas mediante citometría de flujo, siguiendo el mismo procedimiento señalado en la sección 3.3.3 (Figura 15). Uno de los primeros resultados que destaca es que en presencia de todos los genes del sistema productor de MccE492, el porcentaje de células Th-S aumentó en todos los casos, lo que se condice con lo observado en el caso de MccE492 silvestre y con las mutantes por delección de regiones de la proteína. Al analizar el comportamiento de cada una de las mutantes relativo a la proteína silvestre, las mutantes P26A, A37P, P53A y P64A mostraron un comportamiento



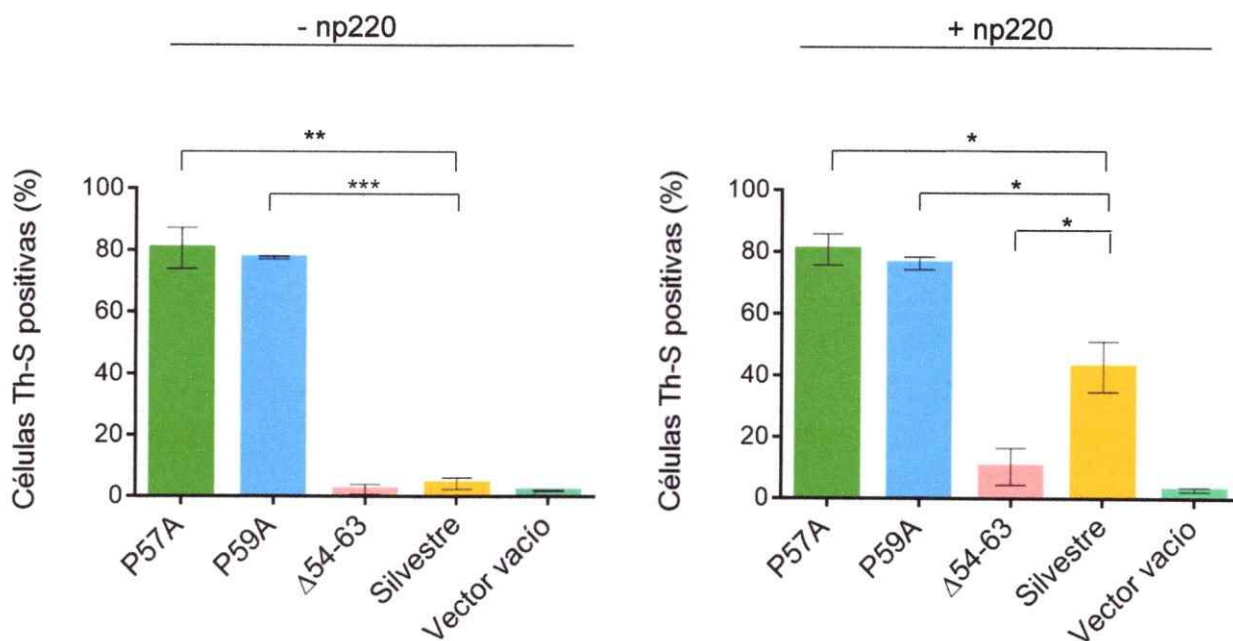
**Figura 15: Detección mediante citometría de flujo de agregados intracelulares *in vivo* formados por MccE492 silvestre y por distintas mutantes.**

Se analizó la formación de amiloides intracelulares de células de *E. coli* BL21-AI que portan el sistema p33pETAB con la versión silvestre y mutantes P26A, A37P, P53A, P57A, P59A, P64A y Δ54-63. Para esto, células inducidas por 5,5 horas fueron teñidas con la sonda amiloidofílica Th-S. En cada muestra se detectó y cuantificó el porcentaje de la población Th-S positiva mediante citometría de flujo. Esto se realizó tanto en ausencia (-np220) como en presencia (+np220) del vector que porta el resto de los genes del sistema productor de MccE492. Como control se utilizó el vector vacío p33AM.

similar o con una señal ligeramente más baja que la proteína silvestre, tanto en presencia como en ausencia del *cluster* productor, indicando que dichos residuos no actuarían como *gatekeepers*. Sin embargo, la mutante P57A y la mutante P59A mostraron un comportamiento particular. Al inducir la expresión de ambas mutantes, en ausencia del resto de los genes del sistema productor de MccE492, hubo aproximadamente un 70% de células con una señal positiva para Th-S, siendo un porcentaje mucho mayor que el mostrado por la proteína silvestre en esta condición. Este resultado se repitió en presencia del *cluster* productor. A su vez, se estudió por citometría la mutante  $\Delta 54-63$  la cual mostró un porcentaje muy bajo de células Th-S positivas en presencia de np220, en relación a la proteína silvestre y a las demás mutantes (Figura 15).

Se seleccionaron las mutantes que presentaban mayores diferencias respecto a la proteína silvestre y se repitió el análisis de modo tal de tener más réplicas para hacer un análisis estadístico (Figura 16). Se repitió el mismo análisis para las mutantes P57A, P59A y  $\Delta 54-63$ , encontrándose el mismo comportamiento previamente observado. En ausencia de todos los genes del sistema productor la mutante P57A y la mutante P59A mostraron un mayor porcentaje de células Th-S positivas relativo a la silvestre (P57A:  $p < 0,004$ ; P59A:  $p < 0,0003$ ). Este comportamiento se repitió en presencia de los genes del *cluster* productor (P57A:  $p < 0,0308$ ; P59A:  $p < 0,0305$ ). En cambio, la mutante  $\Delta 54-63$  en presencia de np220, mostró un menor porcentaje de células Th-S positivas en comparación a la proteína silvestre ( $p < 0,0462$ ), aportando evidencias respecto a la importancia de dicho grupo de residuos en la amiloidogénesis de la MccE492.





**Figura 16: Análisis estadístico de mutantes de la MccE492 que presentan alteraciones en la formación de agregados intracelulares.**

La detección de agregados intracelulares *in vivo* formados por las mutantes P57A, P59A y  $\Delta$ 54-63 mediante citometría de flujo, se realizó por duplicado. Esto se analizó tanto en ausencia (-np220) como en presencia (+np220) del vector que porta el resto de los genes del sistema productor de MccE492. Se muestra el valor promedio (n=2). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ )

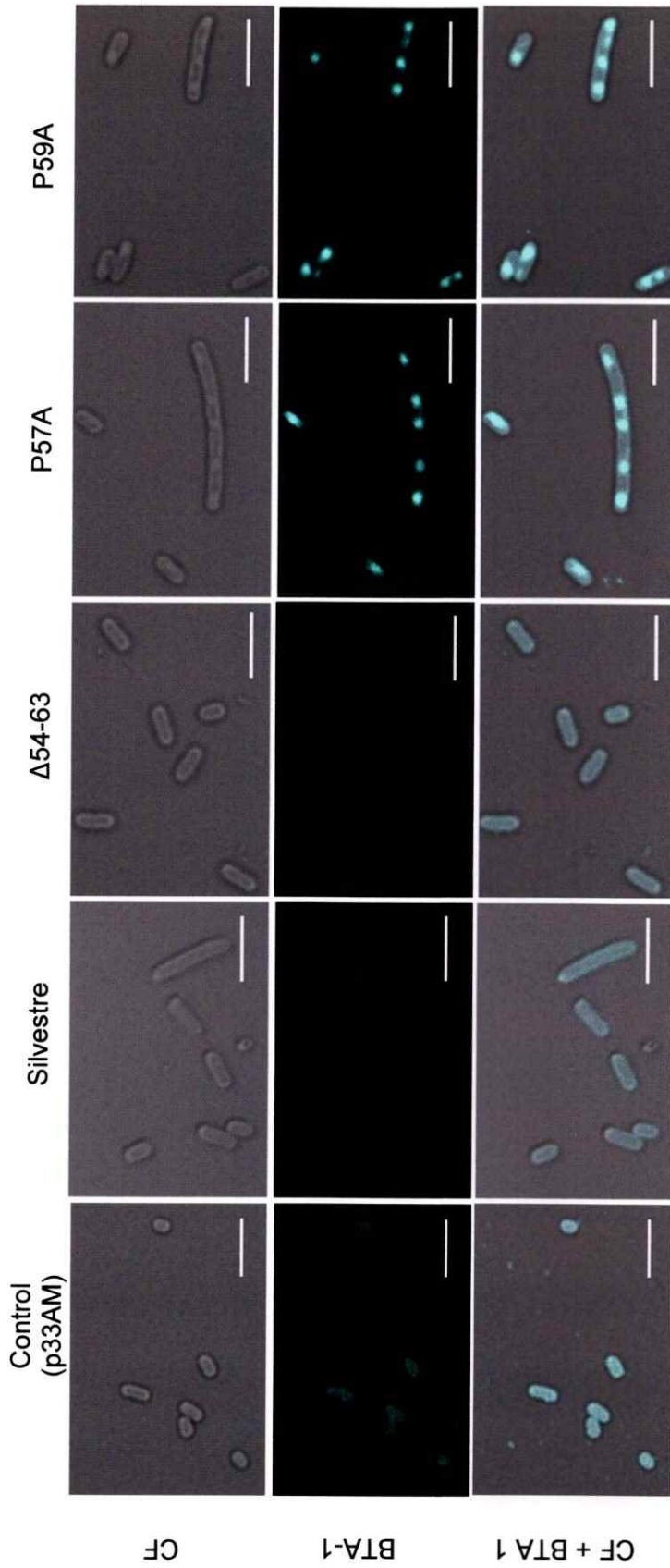


### **3.3.7 Visualización mediante microscopía confocal de células que expresan la MccE492 silvestre y las mutantes P57A, P59A y $\Delta$ 54-63**

De acuerdo a los resultados obtenidos por citometría de flujo, se seleccionaron las mutantes P57A, P59A y  $\Delta$ 54-63 para observarlas mediante microscopía confocal (Figura 17 y 18). Al igual que para los estudios de citometría de flujo, se hizo un ensayo de inducción de las células que contienen las mutantes seleccionadas y la versión silvestre de la MccE492. Las células inducidas y no inducidas fueron fijadas con PFA y posteriormente teñidas con Th-S y con BTA-1. Al igual que en los ensayos de citometría de flujo, se estudiaron las células que contienen la construcción p33pETAB en presencia y en ausencia del sistema np220.

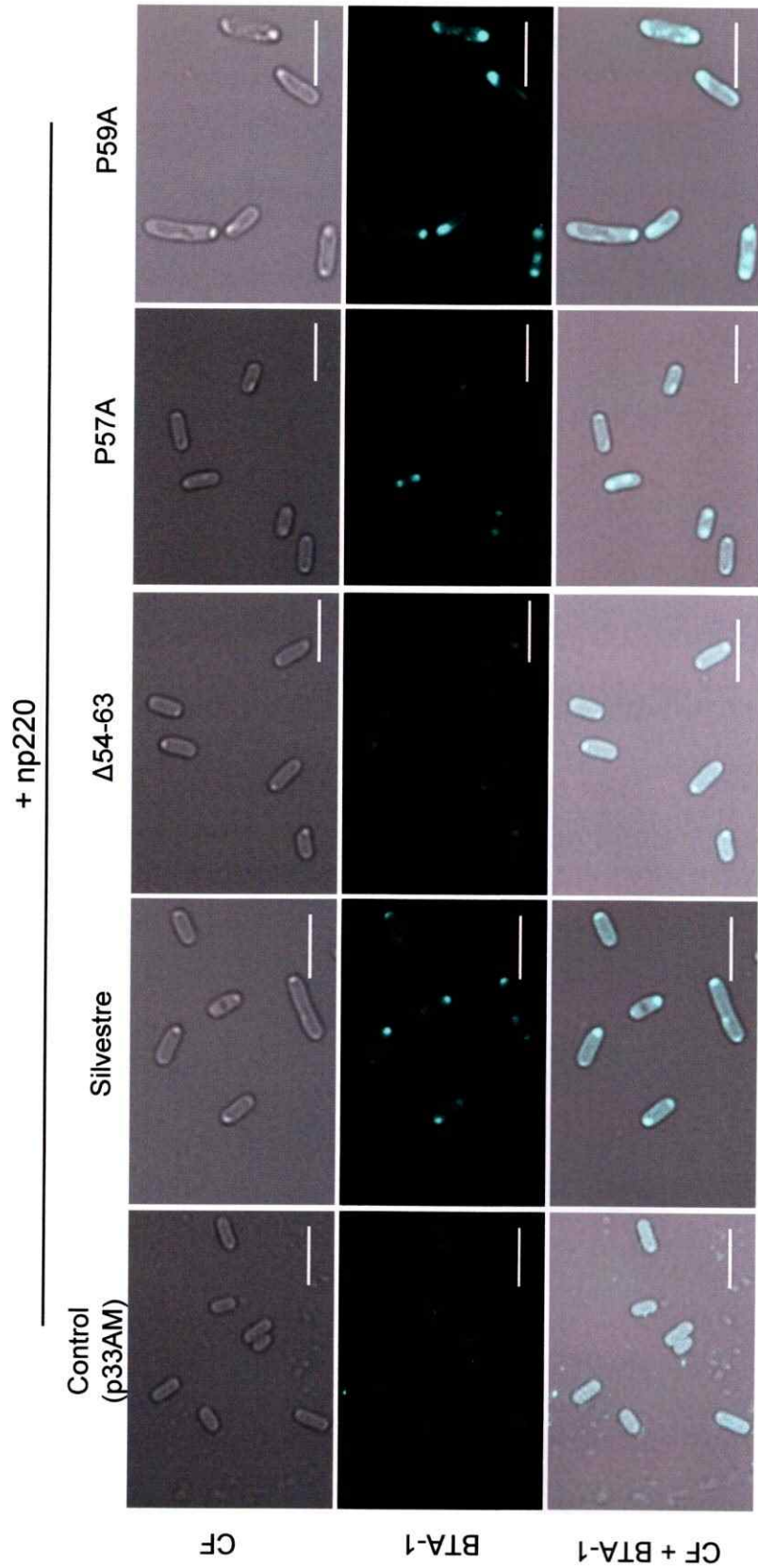
Las muestras se observaron mediante contraste de fase y fluorescencia. En ausencia de np220, todas las muestras no inducidas mostraron una fluorescencia tenue y homogénea al interior de las células (datos no mostrados). Al sobre-expresar la MccE492, la versión silvestre y la mutante  $\Delta$ 54-63 también mostraron una fluorescencia tenue y homogénea. En cambio, al sobre-expresar las mutantes P59A y P57A se encontraron focos de fluorescencia intensos en el interior de las células. Estos focos son de tamaño, forma y localización variable. Además de ser observados mediante fluorescencia, es posible ver los focos como zonas más densas con contraste de fase (Figura 17):-

En presencia de np220, las muestras no inducidas se comportaron de un modo similar a lo observado en ausencia de np220, y no se visualizaron focos de fluorescencia (datos no mostrados). Al sobre-expresar la proteína silvestre en presencia de np220 se encontraron focos de fluorescencia pequeños, ubicados



**Figura 17: Imágenes de microscopía confocal de *E. coli* BL21-AI que sobre-expresan la versión silvestre de la MccE492 y de los mutantes  $\Delta 54-63$ , P57A y P59A.**

Células de *E. coli* inducidas que expresan la versión silvestre y las mutantes de MccE492 en ausencia de los genes del *cluster* producto (- np220), fueron teñidas con la sonda amiloifílica BTA-1. La morfología celular y la acumulación de agregados intracelulares fueron observados mediante microscopía confocal con contraste de fases (CF) y fluorescencia. Como control se utilizó el vector vacío p33AM. Las barras corresponden a 4  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18:** Imágenes de microscopía confocal de *E. coli* BL21-AI que sobre-expresan la versión silvestre de la MccE492 y de las mutantes  $\Delta 54-63$ , P57A y P59A en presencia de np220.

Células de *E. coli* inducidas que expresan la versión silvestre y las mutantes de MccE492 en presencia de todos los genes del *cluster* productor (+np220), fueron teñidas con la sonda amiloidofílica BTA-1. La morfología celular y la acumulación de agregados intracelulares fueron observados mediante microscopía confocal con contraste de fases (CF) y fluorescencia. Como control se utilizó el vector vacío p33AM. Las barras corresponden a 4  $\mu\text{m}$ .

principalmente en los polos. En las mismas condiciones, las mutantes P57A y P59A presentaron focos de fluorescencia de mayor tamaño, similares a los observados en ausencia de np220. A diferencia de la versión silvestre y de las mutantes P57A y P59A, la mutante  $\Delta 54-63$  no presentó focos fluorescentes de ningún tipo en presencia de np220 (Figura 18).

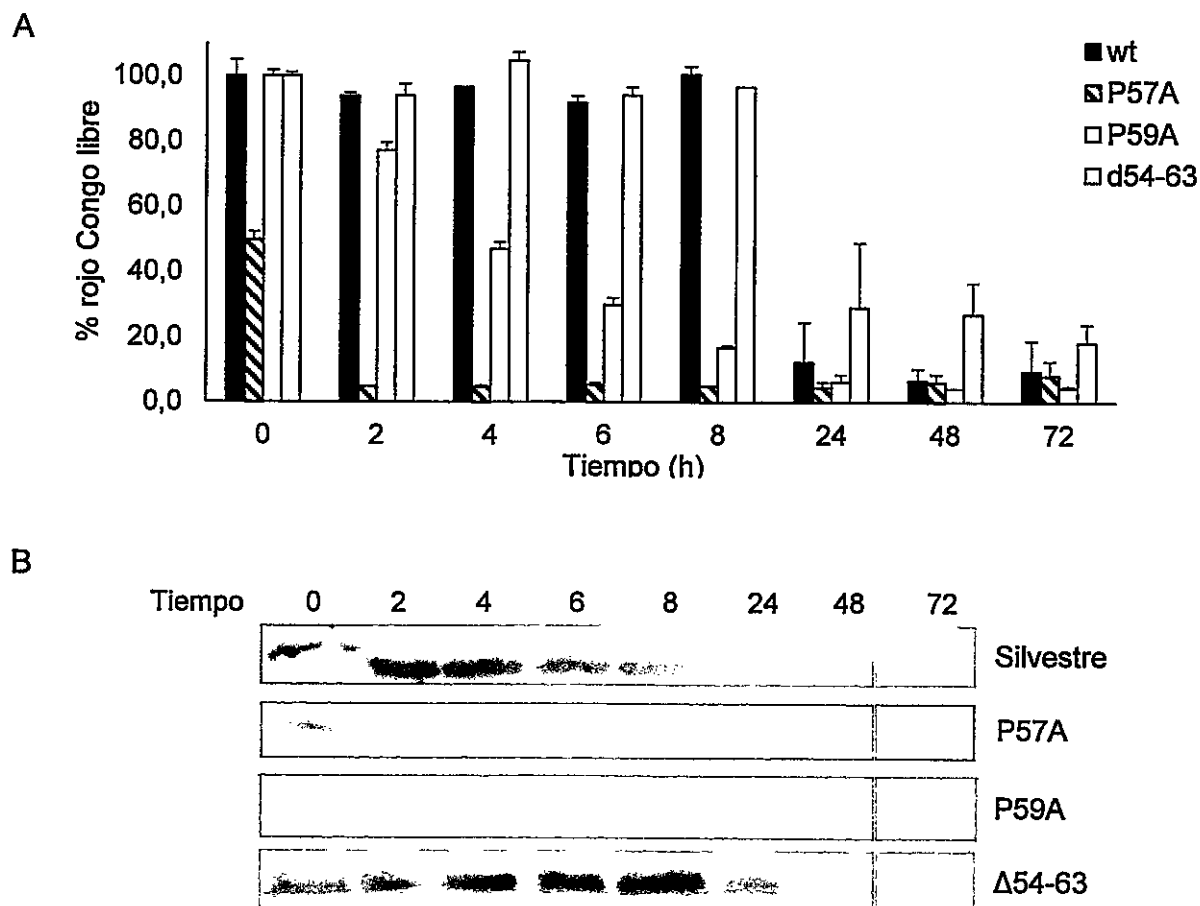
Los resultados obtenidos por microscopía coinciden con los resultados obtenidos por citometría de flujo. Estos experimentos demuestran que al sustituir el residuo prolina en las posiciones 57 y 59 por una alanina, ocurre una importante agregación de la MccE492 *in vivo*, traducida en la formación de inclusiones amiloides al interior de las células. A su vez, se encontró que al eliminar la región 54-63 la propensión a agregar disminuye, indicando que dicha región es o contiene residuos que promueven la amiloidogénesis *in vivo* de esta proteína.

### **3.4 Efecto de las mutaciones P57A, P59A y $\Delta 54-63$ sobre la polimerización de fibras amiloides *in vitro***

#### **3.4.1 Cinética de agregación *in vitro* de MccE492 silvestre, P57A, P59A y $\Delta 54-63$ seguida mediante rojo Congo**

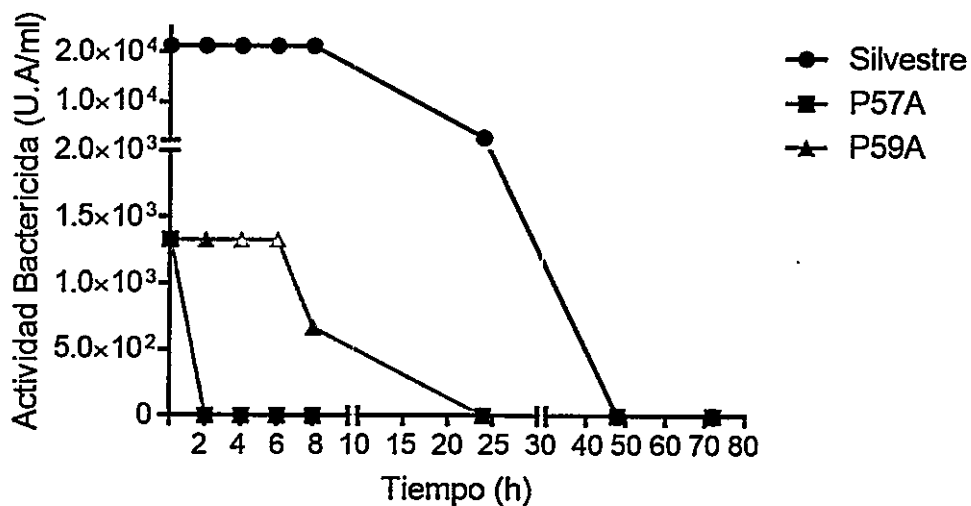
Con el objetivo de evaluar si los residuos que afectan la agregación *in vivo* de la MccE492 son también relevantes para la formación de fibras *in vitro*, se purificaron la versión silvestre de la MccE492 y de las mutantes P57A, P59A y  $\Delta 54-63$  a partir del sobrenadante de las células que las producen. Con los distintos tipos de MccE492 purificada se prepararon ensayos de agregación para seguir la cinética de formación de fibras amiloides *in vitro*. Para ello, se resuspendió la proteína

llofilizada y se llevó a una concentración de 200 µg/ml en *buffer* de agregación. Se siguió la formación de fibras amiloides midiendo la unión de rojo Congo a 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas de agregación (Figura 19A). El rojo Congo es una sonda ampliamente utilizada para detectar agregación amiloide y se ha usado previamente para seguir la cinética de agregación de la MccE492 (Bieler y cols., 2005; Arranz y cols., 2012; Marcoleta y cols., 2013b). Adicionalmente, se analizó la proteína soluble presente en cada uno de los tiempos medidos, mediante SDS-PAGE e inmunoblot (Figura 19B). Como se muestra en la Figura 19, la proteína silvestre permaneció soluble aun después de 8 horas de iniciado el ensayo de agregación. Recién a las 24 horas la proteína silvestre polimerizó. La mutante P57A en el tiempo inicial (t=0 h) mostró un 50% de agregación y a las 2 horas ya estaba completamente agregada. La mutante P59A también polimerizó más rápido que la proteína silvestre, pero no fue un proceso tan abrupto como el de la mutante P57A. En cambio, la mutante  $\Delta$ 54-63 presentó una cinética más retardada iniciando la agregación a las 24 horas y en los tiempos estudiados no alcanzó el 100% de agregación, lo que se evidencia en el inmunoblot donde se observa que esta mutante permaneció soluble durante todo el ensayo de agregación. En paralelo, se cuantificó la actividad bactericida de la MccE492 silvestre y de las mutantes P57A y P59A en cada uno de los tiempos de agregación (Figura 20). Este experimento no se realizó para la mutante  $\Delta$ 54-63, pues como se mencionó anteriormente, dicha mutante carece de actividad bactericida. Los resultados de la cuantificación de la actividad bactericida se correlacionaron bien con lo observado en los inmunoblot, pues a medida que disminuyó la proteína soluble, disminuyó su actividad bactericida. La



**Figura 19: Cinética de polimerización *in vitro* de fibras amiloides de la MccE492 y las mutantes P57A, P59A y Δ54-63.**

Se purificaron la versión silvestre de la MccE492 y las mutantes P57A, P59A y Δ54-63 a partir del sobrenadante de cultivos bacterianos. **A)** La cinética de formación de fibras amiloides fue seguida mediante la unión de rojo Congo. Para cada tiempo se utilizaron 2 muestras independientes. **B)** La proteína que permaneció soluble en cada uno de los puntos fue analizada mediante SDS-PAGE e inmunoblot.



**Figura 20: Curvas de actividad bactericida durante el ensayo de agregación de la MccE492 silvestre y de las mutantes P57A y P59A.**

Se cuantificó la actividad bactericida de la MccE492 silvestre y de las mutantes P57A y P59A a distintos tiempos de agregación. La actividad se expresa en unidades arbitrarias (U.A./ml).

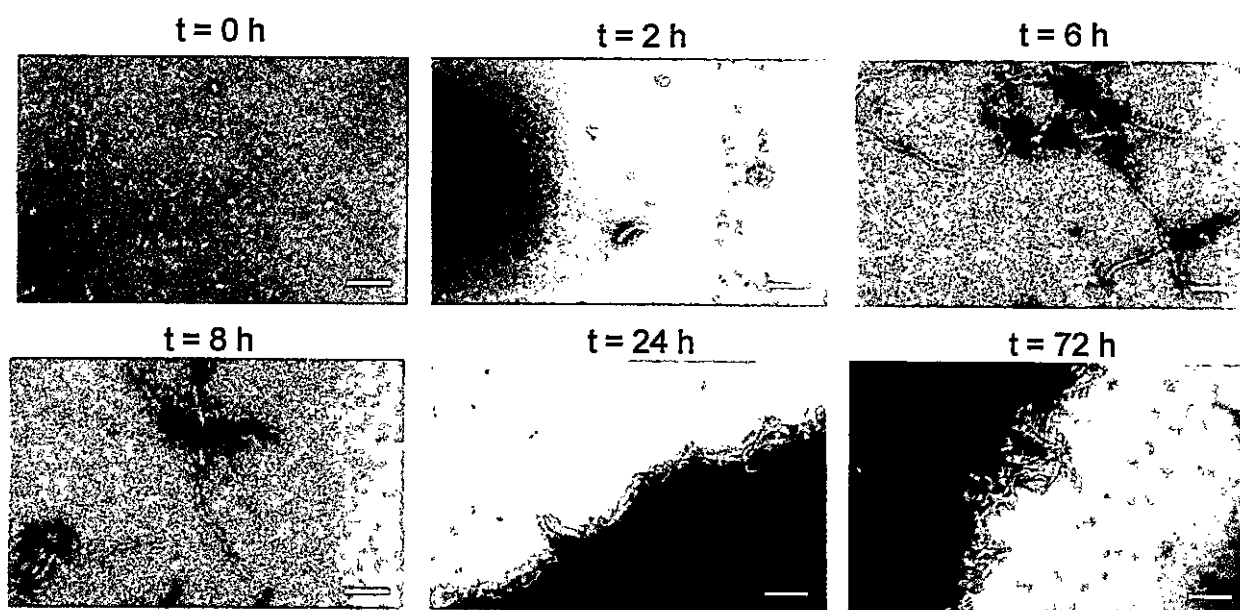


proteína silvestre perdió por completo su actividad bactericida entre las 24 y 48 horas de agregación. Las mutantes P59A y P57A a 0 horas de agregación mostraron una actividad bactericida 20 veces menor que la proteína silvestre. La mutante P57A a las 2 horas de agregación había perdido completamente su actividad bactericida. La mutante P59A perdió la actividad de una manera más gradual, a las 8 horas su actividad disminuyó a la mitad y a las 24 horas ya no mostraba actividad bactericida.

#### **3.4.2 Caracterización mediante TEM de fibras de MccE492 formadas por las mutantes P57A y P59A**

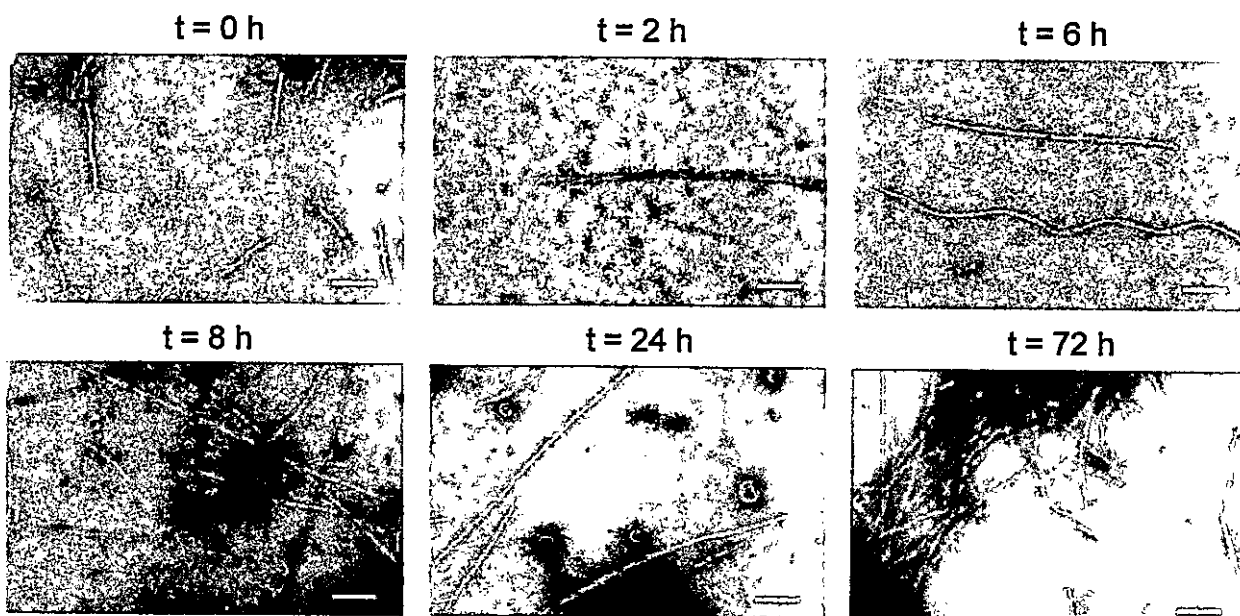
En cada uno de los tiempos del ensayo de agregación descrito anteriormente se colectaron muestras para visualizar los agregados mediante TEM (Figura 21, 22 y 23). En la muestra con MccE492 silvestre en el tiempo inicial ( $t=0$  h), se encontraron pequeños agregados y recién a las 6 horas se observaron fibras de naturaleza amiloide. En los últimos tiempos medidos en este ensayo, 24 y 72 horas, se encontraron aglomerados densos de fibras amiloides formadas por la proteína silvestre (Figura 21). Por otro lado, la muestra de la mutante P57A en el tiempo cero presentó pequeños agregados y también agregados globulares y fibras cortas, lo que coincide con la cinética de agregación. En los tiempos finales se observaron fibras de una mayor longitud y aglomeradas entre sí (Figura 22). La mutante P59A a tiempo cero no formó fibras, pero a las 2 horas se observaron fibras largas, las que a mayores tiempos de agregación también aumentaron en longitud y número (Figura 23). Estos resultados muestran que la morfología de las fibras formadas por





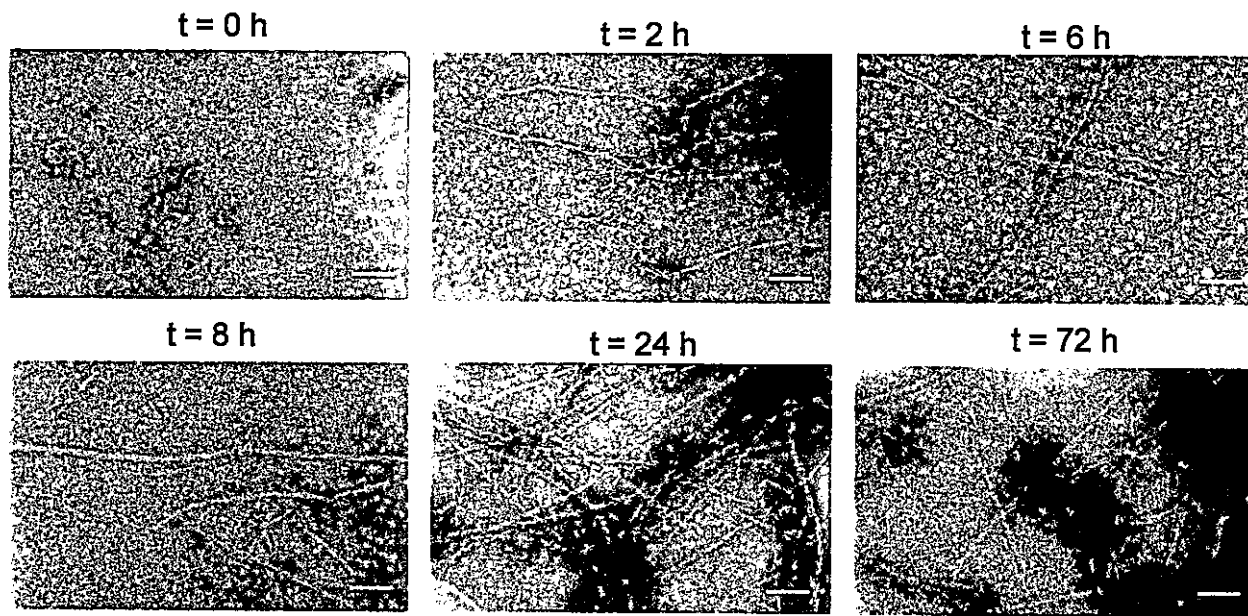
**Figura 21: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la MccE492 silvestre a distintos tiempos de agregación.**

Se colectaron muestras a distintos tiempos del ensayo de agregación de la MccE492 silvestre. Las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% para ser analizadas mediante TEM. Las microfografías fueron obtenidas a una magnificación de 60000x. Las barras corresponden a 100 nm.



**Figura 22: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la mutante P57A a distintos tiempos de agregación.**

Se colectaron muestras a distintos tiempos del ensayo de agregación de la mutante P57A. Las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% para ser analizadas mediante TEM. Las micrografías fueron obtenidas a una magnificación de 60000x. Las barras corresponden a 100 nm.



**Figura 23: Microfotografías electrónicas de fibras amiloides formadas por la mutante P59A a distintos tiempos de agregación.**

Se colectaron muestras a distintos tiempos del ensayo de agregación de la mutante P59A. Las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% para ser analizadas mediante TEM. Las microfografías fueron obtenidas a una magnificación de 60000x. Las barras corresponden a 100 nm.

las mutantes P57A y P59A es similar, pero no idéntica a las fibras formadas por la proteína silvestre. Aparentemente, la mutante P59A presenta un *pitch* menor que las fibras helicoidales formadas por la proteína silvestre, observación que debe ser evaluada con un tratamiento de imágenes más profundo en futuros estudios.

De acuerdo al conjunto de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* en este trabajo, se puede afirmar que las mutantes P57A y P59A poseen una mayor tendencia a la formación de agregados amiloides, que presentan una cinética más rápida de polimerización y que forman fibras de características similares a la proteína silvestre. Esto demuestra el rol de las prolínas en la posición 57 y 59 como residuos *gatekeepers* que previenen la agregación descontrolada de la MccE492.

## 4 DISCUSIÓN

El fenómeno de formación de agregados amiloides actualmente está sufriendo un cambio de paradigma. Tradicionalmente, ha sido asociado a enfermedades neurodegenerativas en mamíferos, pero actualmente se han descubierto proteínas que en su forma amiloide cumplen un rol biológico (Fowler y cols., 2007). Además, destaca el caso de RepA, proteína capaz de formar agregados amiloides intracelulares en *E. coli* (Fernández-Tresguerres y cols., 2010). La MccE492 es una bacteriocina que además de su actividad bactericida, forma fibras amiloides, fenómeno descrito *in vitro* e *in vivo* en el medio extracelular. El objetivo principal de este trabajo fue determinar si la MccE492 es capaz de formar agregados intracelulares amiloides e identificar residuos particulares que afecten su amiloidogénesis.

### **La presencia de los genes del sistema productor de MccE492 promueve la formación de amiloides: Posible nucleador**

Al expresar distintos sistemas productores de MccE492 en células de *E. coli*, se encontró que en presencia de los genes del sistema productor de MccE492 se formaban focos intracelulares que son reconocidos por la sonda amiloidofílica, lo cual indica que la MccE492 efectivamente forma agregados intracelulares de naturaleza amiloide (Figura 4). Al expresar únicamente el gen estructural y su inmunidad bajo el control de su promotor natural, no se encontró este fenotipo, sugiriendo que algún otro elemento codificado en el *cluster* podría intervenir en la formación de amiloides los intracelulares formados por la MccE492.

Inesperadamente, al observar células que sólo contienen el sistema np220, el cual expresa todos los genes del *cluster* excepto el gen estructural, se encontraron focos pequeños en uno de los polos de algunas células. Esto indicaría que hay algún componente del sistema productor de la MccE492, además del gen estructural, que formaría agregados intracelulares aunque en un grado menor y que posiblemente este mismo componente promovería la formación de amiloides de la proteína en cuestión. Este supuesto es respaldado por los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Al detectar la formación de amiloides intracelulares *in vivo*, uno de los primeros resultados que llamó la atención fue que al sobre-expresar la MccE492 silvestre en presencia de todo el *cluster* productor hubo un aumento en el número células que contienen amiloides intracelulares, relativo a la expresión en ausencia de todos los genes del *cluster* (Figura 15). Este fenómeno se repitió al expresar todas las mutantes estudiadas a lo largo de este trabajo. Cabe mencionar que se hicieron ensayos *in vitro* que se condicen con lo observado *in vivo*. Se realizaron ensayos de agregación con proteína silvestre purificada a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos y también con la misma proteína, pero obtenida sintéticamente. Esta última mostró una cinética de agregación mucho más lenta que la proteína obtenida a partir de cultivos bacterianos, tardando hasta 48 horas en comenzar a agregar (datos no mostrados). Una posible explicación es que al obtener proteína a partir de sobrenadante de cultivos bacterianos, co-purifican otros compuestos entre los cuales podría estar alguno que favorezca la formación de fibras amiloides. En conjunto con lo observado inicialmente, se piensa que algún componente del sistema productor de MccE492 estaría favoreciendo la formación de amiloides, actuando como un nucleador. La presencia de un nucleador es algo

ya descrito en otras proteínas amiloidogénicas. Un clásico ejemplo es el de CsgA (curli). CsgA permanece soluble hasta que se encuentra con CsgB que actúa como molde para la polimerización de CsgA. No obstante, *in vitro* CsgA es capaz de polimerizar en ausencia de CsgB e *in vivo* una mutante hiperamiloidogénica es capaz de formar fibras amiloides en ausencia de un nucleador (Chapman y cols., 2002). Hechos que se repiten en el sistema de la MccE492.

De acuerdo a ciertos antecedentes, surgen 2 candidatos como posibles nucleadores de la MccE492. Un candidato es MceC. MceC es una proteína de 370 aa que actúa como una glicosil-transferasa. Resultados previos en nuestro laboratorio señalan que al sobre-expresar MceC fusionada a una proteína fluorescente, ésta se acumula en los polos formando algún tipo de agregado intracelular (S. Gutiérrez, resultados no publicados), similar a lo observado en células teñidas con una sonda amiloidofílica que expresan np220. Se analizó la secuencia de MceC con el programa Amylpred2 en busca de regiones pro-amiloidogénicas, encontrándose casi 20 regiones predichas como pro-amiloidogénicas con un consenso mayor a 5. Otro candidato es un péptido trunco que se produce en el sistema np220. Como ya se mencionó, en el sistema np220 se encuentran todos los genes del *cluster* productor, excepto el gen estructural el cual está interrumpido por el transposón Tn5. Al revisar la secuencia y buscar el sitio en donde está inserto el transposón se encontró que se debería producir un péptido de 45 aa formado por los primeros 40 aa de la MccE492. A pesar de que este péptido no contiene la región 54-63 predicha como pro-amiloidogénica, ya se vio que en su ausencia hay agregación aunque sea en un menor grado. Además

este péptido contiene otra región de interés: desde el residuo 16 al 38. Esta región tiene un 57% de identidad y un 74% de similitud con la proteína priónica humana (Baeza M., 2003). Así, es factible que el péptido de 45 aa sea capaz de agregar y fomentar la formación de amiloides de la MccE492. Actualmente, se están llevando a cabo estudios adicionales para esclarecer este posible efecto nucleador (Díaz G., Tesis de Magíster en desarrollo).

Es necesario recalcar que el vector np220 contiene todos los genes del *cluster*, incluyendo los genes que codifican exportadores de la MccE492. En ese sentido, en ausencia de np220, es decir, en ausencia de los exportadores, se esperaría que toda la MccE492 permaneciera dentro de las células. En principio esto debiese inducir la formación de inclusiones, pues habría una alta concentración citoplasmática de la proteína. No obstante, y como ya se mencionó, en presencia de np220 hay un aumento en la formación de inclusiones amiloides citoplasmáticas. Esto indicaría que el efecto nucleador aparentemente es un efecto muy fuerte, pues en términos totales sería más significativo que el efecto de exportación de la MccE492.

Se desconoce el efecto de las inclusiones amiloides formadas por MccE492 sobre la viabilidad y metabolismo de las células que las contienen. Sin embargo, se ha demostrado que en el caso de otras proteínas, como RepA, las inclusiones citoplasmáticas formadas por ésta son tóxicas para las células (Giraldo y cols. 2010). Además, se han descrito mecanismos celulares capaces de controlar la formación de dichos agregados, tal es el caso de las chaperonas. Particularmente, en el caso de RepA se encontró que DnaK participa en el remodelamiento de las



inclusiones (Gasset-Rosa y cols., 2014). En el caso de la MccE492 este tipo de sistema de control y el efecto de las inclusiones sobre el metabolismo celular están siendo estudiados actualmente (Díaz G, Tesis de Magíster en desarrollo).

**La región de la MccE492 comprendida entre los residuos 54-63 promueve la formación de amiloides, pero no es imprescindible.**

La formación de amiloides intracelulares de la mutante  $\Delta 54-63$  en presencia del sistema np220 es significativamente menor que la silvestre. Aun así, la mutante es capaz de formar en menor grado agregados amiloides (Figura 18). En efecto, esta mutante también agrega *in vitro*, pero con una cinética más lenta que la proteína silvestre y no alcanza el 100% de agregación en los tiempos medidos en este trabajo (Figura 19). Se realizaron experimentos exploratorios en que se duplicó la región 58-63 después del residuo en la posición 7 y en la posición 68 de la secuencia de la MccE492. Se esperaba encontrar un aumento en la capacidad amiloidogénica de dichas mutantes, pero ambas mutantes por duplicación mostraron una capacidad amiloidogénica similar a la MccE492 silvestre (datos no mostrados). De estos resultados se deduce que efectivamente la región 54-63 contiene residuos capaces de promover la formación de amiloides intracelulares, pero estos residuos deben estar en un contexto particular. A su vez, se deduce que deben existir otros residuos que también actúen como una región proamiloidogénica "secundaria" que promueven la polimerización en ausencia de la región 54-63. Al revisar los resultados obtenidos con el predictor de regiones proamiloidogénicas Amylpred2, se encontró que la región con el consenso más alto después de la 58-63, es la región 20-24. En este caso se alcanzó un consenso de

cuatro predictores. Dicha región está dentro de la región 16-38, que como se mencionó tiene un 74% de similitud con la proteína priónica humana. Así, la región 16-38 o específicamente los residuos 20-24 son un fuerte candidato como una región pro-amiloidogénica "secundaria". A lo largo de este trabajo se realizaron algunas mutantes en que se eliminaron regiones de cuatro residuos dentro de la región 16-38 y también mutaciones puntuales contenidas en esta región. Sin embargo, al analizar su capacidad amiloidogénica *in vivo* mediante citometría de flujo, mostraron un comportamiento similar a la proteína silvestre. Aún así, no se ha evaluado su capacidad de polimerizar *in vitro* y tampoco se ha estudiado la agregación de una mutante que carezca exactamente de la región 16-38 o de la 20-24, por lo que aún no es posible descartar por completo la posibilidad de que esta región efectivamente promueva en menor grado la formación de amiloides de la MccE492.

Es importante comentar que en todos los ensayos de agregación *in vitro* de la MccE492 realizados en este trabajo y en trabajos anteriores, hay un factor que no se ha tomado en cuenta: la presencia de pre-agregados al inicio de todos los ensayos. A pesar de que antes de comenzar los ensayos se centrifugan las muestras para eliminar la mayor cantidad de pre-agregados, es fácil imaginar que aunque efectivamente se eliminen fibras de un tamaño importante, queden oligómeros que pudiesen actuar como semillas acelerando la polimerización de la MccE492. Se desconoce si al purificar MccE492 a partir del sobrenadante de cultivos bacterianos, se encuentren pequeños agregados. Es por eso que lo correcto sería realizar los ensayos de agregación con la seguridad de tener sólo proteína

monomérica en todos los casos. Lamentablemente, el método de purificación para obtener proteína monomérica tiene un rendimiento muy bajo, lo que hace inviable obtener la cantidad de proteína necesaria para los ensayos de agregación.

### **Las prolinas en la posición 57 y 59 actúan como residuos *gatekeepers*.**

En varios trabajos se ha postulado que aminoácidos cargados, de cadena lateral larga u otros que inhiben la formación de hebras  $\beta$ , como las prolinas, podrían actuar como *gatekeepers*, previniendo la formación de fibras amiloides (Beerten y cols, 2012). Se ha mostrado que estos residuos no están ubicados al azar dentro de la proteína, sino más bien se encuentran localizados en posiciones específicas, flanqueando regiones que promueven la formación de amiloides (Beerten y cols., 2012). Es por esto que llamó la atención la presencia de cuatro prolinas en las posiciones 53, 57, 59 y 63 de la MccE492, presentes dentro o alrededor de la región descrita en este trabajo como pro-amiloidogénica. Al reemplazar dichas prolinas por una alanina y analizar la capacidad amiloidogénica de cada una de las mutantes se encontró que sólo las mutantes P57A y P59A presentaron una capacidad amiloidogénica aumentada, lo que se tradujo en un aumento de la formación de agregados amiloides intracelulares y en una cinética más rápida de agregación *in vitro* en comparación a la proteína silvestre. Sólo las prolinas 57 y 59 actuarían como *gatekeepers* de la amiloidogénesis de la MccE492, siendo éste un mecanismo que posiblemente otorga cierto control en la agregación de la MccE492. El uso de residuos *gatekeepers* como mecanismo para controlar la agregación es una estrategia muy común, pues en el proteoma de *E. coli* el 90% de las secuencias predichas como pro-amiloidogénicas presentan al menos un residuo cargado o una

prolina en la primera posición de la secuencia (Monsellier y cols., 2007). Un caso concreto es el de la ya mencionada CsgA, la que también presenta residuos como el ácido aspártico y glicina que impiden una agregación descontrolada (Wang y cols., 2010). Esto último es interesante, pues el residuo glicina no ha sido fuertemente reconocido como *gatekeeper*. La glicina es un residuo muy particular pues dadas sus propiedades estructurales intrínsecas es un desestabilizador de hebras  $\beta$ . Justamente, en la posición 63 de la MccE492, exactamente al final de la región propuesta como pro-amiloidogénica, hay una glicina que potencialmente también podría actuar como *gatekeeper*, hipótesis que debe ser evaluada en futuros estudios.

Un último aspecto a discutir es que las mutantes P57A y P59A mantienen la actividad bactericida propia de la MccE492 silvestre. La MccE492 en fase estacionaria pierde actividad bactericida y esto se ha asociado a la formación de fibras amiloides (Bieler y cols., 2005). Es por esto que lo primero que se pensó fue que mutantes hiperamiloidogénicas no presentarían actividad bactericida. Sin embargo, al sembrar colonias de las mutantes P57A y P59A sobre un césped sensible se formó un halo de inhibición. La colonia está constantemente produciendo microcina, por lo que a su alrededor debe haber una población diversa de microcina tanto en forma de fibras amiloides, como oligómeros y también soluble recién exportada al medio extracelular, siendo esta última la responsable de la formación del halo de inhibición de crecimiento.

La pérdida de actividad asociada a la formación de fibras amiloides fue observada en un mayor grado en las mutantes hiperamiloidogénicas P57A y P59A.

Al cuantificar su actividad durante un ensayo de agregación *in vitro* se encontró que al comienzo del ensayo ambas presentaban una menor actividad que la proteína silvestre y, a su vez, las dos mutantes perdieron su actividad bactericida antes que la MccE492 silvestre. Por otro lado, la ausencia de actividad en la mutante  $\Delta 54-63$  sugiere que dicha región, además de ser relevante para la polimerización amiloides, también participaría de alguna manera en la actividad tóxica de la MccE492.

Este trabajo muestra que la amiloidogénesis de la MccE492 sirve como modelo para entender nuevos aspectos de este proceso, lo que podría aplicarse para el estudio de otras proteínas amiloidogénicas, como aquellas patológicas. Se podría utilizar el fenómeno de formación de inclusiones intracelulares en bacterias, para encontrar residuos que controlen la amiloidogénesis como se hizo en este trabajo, y también para el estudio de otros factores, como por ejemplo inhibidores de la agregación amiloide. Particularmente, la MccE492 presenta ciertas ventajas para ser utilizada como modelo de estudio. Por un lado, esta proteína tiene un tamaño pequeño, lo que facilita la caracterización de las regiones importantes para la agregación, y por otro lado, polimeriza en una escala de tiempo corta comparada a otras proteínas amiloides. Así, la formación de inclusiones amiloides de la MccE492 en *E. coli*, sería un modelo que, mediante ensayos rápidos y simples, permitiría estudiar el efecto de factores extrínsecos y celulares involucrados en la amiloidogénesis de ésta y potencialmente otras proteínas.

## 5 CONCLUSIONES

- La MccE492 bajo el control de su promotor natural y en presencia de todos los componentes del sistema productor, forma agregados intracelulares de naturaleza amiloide.
- Existe al menos una región particular de la MccE492, la comprendida entre los aminoácidos 54-63 de la proteína madura, que controla la amiloidogénesis de ésta tanto *in vivo* como *in vitro*. Dicha región contiene 2 residuos, las prolinas en la posición 57 y 59, que actúan como *gatekeepers* previniendo una polimerización descontrolada.
- La región 54-63 promueve la formación de amiloides de la MccE492, pero no es imprescindible. Debe existir otro grupo de residuos en la secuencia de la proteína que actúen como una región amiloidogénica "secundaria".
- La formación de agregados amiloides intracelulares de la proteína MccE492 es favorecida en presencia de todos los genes del sistema de producción de dicha proteína contenidos en el plasmidio np220. Esto sugiere que alguno de los componentes de np220 podría actuar *in vivo* como nucleador de la polimerización de la MccE492.
- La formación intracelular de amiloides en *E. coli* es un modelo simple que podría ser aplicado para el estudio de diversas proteínas amiloidogénicas.

En particular, la citometría de flujo en conjunto con la microscopía confocal, son métodos óptimos para el estudio de factores involucrados en el proceso de formación de amiloides de la MccE492.

## 6 REFERENCIAS

- Argandoña Y. (2015) Regulación de la expresión de los genes *mceBA* del sistema productor de Microcina E492. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Arranz R., Mercado G., Martín-Benito J., Giraldo R., Monasterio O., Lagos R. y Valpuesta J.M. (2012) Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *J. Struct. Biol.* **178**: 54-60.
- Asensio C., Perez Díaz J.C., Martinez M.C. y Baquero F. (1976) A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **69**: 7-14.
- Baeza M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de translocación y de conversión tipo príon de la microcina E492. Tesis Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero F. y Moreno F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Letters.* **23**: 117-124.
- Beerten J., Jonckheere W., Rudyak S., Xu J., Wilkinson H., De Smet F., Schymkowitz J. y Rousseau F. (2012) Aggregation gatekeepers modulate protein homeostasis of aggregating sequences and affect bacterial fitness. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**: 357-366.
- Bieler S., Estrada L., Lagos R., Baeza M., Castilla J. y Soto C. (2005) Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 26880-26885.
- Chapman M., Robinson L., Pinkner J., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S. y Hultgren S. (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**: 851-855.
- Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G. y Dobson C.M. (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature.* **424**: 805-808.
- Chiti F. y Dobson C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 333-366.



Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F.G.H., Dijkhuizen L. y Wösten H.A.B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* **17**: 1714-1726.

Dasari M., Espargaro A., Sabate R., Lopez del Almo JM., Fink U., Grelle G., Bieschke J., Ventura S y Reif B. (2011) Bacterial inclusion bodies of Alzheimer's Disease  $\beta$ -amyloid peptides can be employed to study native-like aggregation intermediate states. *Chem. BioChem.* **12**: 407 – 423

de Lorenzo V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**: 72 – 75.

de Lorenzo V. (1985) Factors affecting microcin E492 production. *J. Antibiot.* **36**: 340-345.

de Lorenzo V. y Pugsley A.P. (1985) Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **27**: 666-669.

Destoumieux-Garzón D., Thomas X., Santamaria M., Goulard C., Barthélémy M., Boscher B., Bessin Y., Molle G., Pons A.M., Letellier L., Peduzzi J. y Rebuffat S. (2003) Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031-1041.

Espargaró A., Sabate R. y Ventura S. (2012) Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect in vivo protein aggregation. *Mol. BioSyst.*, **8**: 2839-2844.

Fernández-Escamilla A.M., Rousseau F., Schymkowitz J. y Serrano L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1302-1306.

Fernández-Tresguerres M.E., Moreno-Díaz de la Espina S., Gasset-Rosa F. y Giraldo R. (2011) A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **77**: 1456–1469.

Fowler D.M., Koulov, A.V., Balch W.E. y Kelly J.W. (2007) Functional amyloid: from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 17-224.

- Gasset-Rosa F., Coquel A.S., Moreno-del Álamo, M., Serrano A.M., Fernández-Tresguerres M.E., Moreno-Díaz de la Espina S., Lindner A.B. y Giraldo R (2014). Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone. *Mol. Microbiol.* **91**: 1070-7087.
- Giraldo R. y Fernández-Tresguerres M.E. (2004) Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid.* **52**: 69-83.
- Giraldo R. (2007) Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *PNAS* **104**: 17388–17393.
- Giraldo R., Moreno-Díaz de la Espina S., Fernández-Tresguerres M.E. y Gasset-Rosa F. (2011) RepA WH1 prionoid, A synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host. *Prion* **5**: 60-64.
- González B. (2011) Efecto de la expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre cepas productoras de microcina E492. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Hohn, B., y Collins, J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**: 291-298.
- Kolter R. y Moreno F. (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- López de la Paz M. y Serrano L. (2004) Sequence determinants of amyloid fibril formation. *PNAS.* **101**: 87-92.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- Lagos R., Villanueva J.E. y Monasterio O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.
- Lagos R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C. y 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**: 229-243.

- Lagos R., Tello M., Mercado G., García V. y Monasterio O. (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**: 74-85.
- Marcoleta A., Gutiérrez-Cortez S., Maturana D., Monasterio O. y Lagos R. (2013a) Whole-genome sequence of the microcin E492-producing strain *Klebsiella pneumoniae* RYC492. *Genome Announc.* **1**: 1-2.
- Marcoleta A., Marin M., Mercado G., Valpuesta J.M., Monasterio O., y Lagos R. (2013b) Microcin E492 amyloid formation is retarded by posttranslational modification. *J. Bacteriol.* **195**: 1-10.
- Maurer-Stroh S., Debulpaep M., Kuemmerer N., Lopez de la Paz M., Martins I.C., Reumers J., Morris K.L., Copland A., Serpell L. y Serrano L. (2010) Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat. Methods* **7**: 237-245.
- Monsellier E. y Chiti F. (2007) Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. *EMBO reports.* **8**: 737-742.
- Nolan E.M., Fischbach M.A., Koglin A. y Walsh C.T. (2007) Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 14336-14347.
- Núñez G. (2012) Caracterización del efecto de la sobreexpresión de *orfL* y *orfK*, dos proteínas similares a microcinas. Seminario de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Núñez G. (2015) Caracterización de la isla genómica de la Microcina E492. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Riley M.A. y Wertz J. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.
- Romero D., Aguilar C., Losick R. y Kolter R. (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *PNAS.* **107**: 2230-2234.
- Strahsburger E., Baeza M., Monasterio, O. y Lagos R. (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore

enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3083–3086.

Tsolis A.C., Papandreou N.C., Iconomidou V.I. y Hamodrakas S.J. (2013) A consensus method for the prediction of 'Aggregation-Prone' peptides in globular proteins. *PLoS One.* **8**: e54175.

Wang X. y Chapman M.R. (2008) Sequence determinants of bacterial amyloid formation. *J. Mol. Biol.* **380**: 570-580.

Wang X., Zhou Y., Ren J.J., Hammer N.D. y Chapman M.R. (2010) Gatekeeper residues in the major curling subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *PNAS.* **107**: 163:168.

Wilkens M., Villanueva J.E., Cofre J., Chnaiderman J.S. y Lagos R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetics determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789-4794.