

UCH-FC  
Biotecnología  
L 115  
C 1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por el Sr.:

MARIO FELIPE HERNÁN LEIVA HIDALGO

**“IMPORTANCIA DE LA SERINA-84 Y EL MOTIVO GLICINA-83 SERINA-84 DE LA MICROCINA E492 EN LA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL Y EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Rosalba Lagos Mónaco  
**Directora Seminario de Título**

Dr. Octavio Monasterio Opazo  
**Co-Director Seminario de Título**

### Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford  
**Presidente Comisión**

Dr. Marcelo Baeza  
**Corrector**

*Rosalba Lagos*  
*Octavio Monasterio*

*Michael Handford*

*Marcelo Baeza*



Santiago de Chile, Diciembre del 2008.

## AUTOBIOGRAFÍA



Nací, eso está más que claro. Lo hice en la ciudad de Temuco, gracias a mi madre, un 25 de Mayo. De pequeño no recuerdo mucho, pero vivía en un lugar tranquilo y apacible: Loncoche. Sí, Loncoche donde se situaba la planta de esa conocida lechera. Ahí, cursé Kinder sin mucho que mencionar, excepto que ya creo me daba cuenta de mi ceguera parcial (soy miope y en ese entonces nadie tenía idea de eso). Luego, y no sé por qué, nos trasladamos a una pequeña y hermosa localidad cerca de Arauco: Laraquete. Sí, Laraquete, aquel lugar donde hay un río en el que piedra que coges tiene una marca con forma de cruz (algo sorprendente e inexplicable). Comencé a cursar mi enseñanza básica en la Escuela F-743 San Pedro de Laraquete (creo que ese era el nombre, sino, es la única en todo el pueblo). Me desarrollé con dificultad en el primer año, de hecho me querían mover a un primero básico de repitentes, con lo cual mis padres hicieron una de las muchas cosas buenas que han hecho por mí... me enseñaron a estudiar. Mi padre siempre me supo motivar. Jugábamos “damas” bajo la higuera, me compraba libros que por lo demás motivaron mi gusto por la lectura. Julio Verne y otros autores me maravillaban con esos relatos fantásticos. Luego de las “damas” pasamos al ajedrez, lo cual se convirtió en mi pasatiempo por un buen rato. Siguiendo nuestra conducta familiar nómada, migramos hacia Santiago. Yo con 8 años de edad me integraba y con dificultades (sociales por sobre todo, ya que siempre me fue bien en el Colegio) a lo que sería mi parada definitiva hasta el día de hoy. Llegamos a una casa en Puente Alto, la que nos trató bien, hasta que sufrimos la primera inclemencia: mi padre trabajaba mucho fuera de la ciudad, y estaba en Antofagasta cuando sufrió una infección por tífus. Pasamos momentos crudos ya que el sustento del hogar estaba en receso. Los momentos malos pasan (y los buenos también), fue así como nos mudamos muy cerca y encontramos muy buenos amigos, muchos de los cuales, perduran hasta la actualidad. Destaco y con mayúsculas, a mi hermano ya a estas alturas, Eduardo. Construimos nuestras vidas juntos, con saltos y baches, pero creo que hoy en día pasamos por buenos momentos. Cuando ya cursaba octavo básico, mi madre y mi profesora jefe me estimularon a postular a un liceo de los grandes para cursar mi enseñanza media. Postulé al Liceo de Aplicación y quedé. Creo que fue gravitante en mi formación y acumulación de experiencias el haber cursado esos 4 años en aquel Liceo. Durante el último año, sufrí un quiebre en la percepción de mi realidad. Supe que debía hacerme responsable de algunas cosas si quería comenzar a hacer carrera universitaria. Fue eso y gracias a mis padres el que haya podido ingresar a la Universidad de Chile. Cursé un año de Biología Ambiental, donde conocí muchas personas que hasta el día de hoy disfruto viendo. Pero aún no estaba en mi camino... en mi segundo año logré mi objetivo principal. Ingresé a Ing. en Biotecnología Molecular vía transferencia interna. Mis grandes amigos los conocí estudiando lo que me gusta, y no me arrepiento ni un poco de mi decisión. Hoy, a punto de Titularme, comprendo el comportamiento nómada de mi familia: mis padres siempre quisieron lo mejor para mí, que pudiera estar en el lugar y el momento adecuado para que tuviera todas las opciones posibles, aunque eso significase recorrer el camino más largo. Muchos de los caminos son válidos si llegas a lo que te gusta. Hoy, realmente Soy.



*Dedico esta tesis a mis padres,  
porque realmente han sido padres, y de los mejores.*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer infinitamente a mi tutora, guía y mentora, la Doctora Rosalba Lagos. El estudiar cinco años nos da una formación base, la que sin duda, se complementa con la que recibimos al momento de incorporarnos a un laboratorio para hacer nuestras Tesis. Estoy muy orgulloso de haber estado bajo su mano, porque realmente siento que he aprendido mucho y que me he criado en un ambiente de rigurosidad. También en este párrafo no puedo dejar de mencionar el apoyo, las opiniones y reparos a mi trabajo del Doctor Octavio Monasterio.

Ahora me quiero referir a los miembros del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular. Quisiera hacer una mención especial a las 3 guías que estuvieron junto a mí cuando llegué al laboratorio: Dra. Verónica García, Macarena Marín y Gabriela Mercado. Sin duda, las tres con muy buen criterio científico y siempre con un consejito para hacer más dulce la vida. También no puedo dejar de mencionar a mi amigo y compañero Jorge Flores, junto al que llegamos a este laboratorio, y con el que hemos pasado las frustraciones y alegrías de cada uno de nuestros trabajos. Además quiero agradecer al Dr. Andrés Barriga por los análisis de Espectrometría de Masas; los consejos del Dr. Mario Tello y el de los integrantes del laboratorio por parte del profesor Octavio, es decir, María José Gallardo, Jose Jaima Arbildúa, Alexis Órdenes, Luis Pouchuq, César Díaz, Felipe Montecinos y David Weinstein. Y las chicas BEM, cómo podría dejar de mencionarlas: Gissela Araya, Beatriz González y Daniela Muñoz. Con Uds. he podido compartir actividades del laboratorio y muchas cosas de la vida (como diría la Bea). Beatriz y Daniela fueron nuestras aprendices. Llegaron al laboratorio y tuvimos la suerte de que nos fueran asignadas. Realmente es bueno participar del proceso de enseñar. Es una experiencia nueva y muy satisfactoria. Sin ser menos importante que todos los que mencioné anteriormente, está nuestra queridísima Roselyn Orellana. ¿¿Qué sería nuestra vida sin ti, Roselyn?? Muchos hemos repetido esa frase y lleva siempre mucha sinceridad, de verdad que eres una excelente Asistente en el laboratorio. Y se me iba la Maca, nuestra querida y efectiva secretaria, también siempre nos estás facilitando la vida.

Sin duda que sin amigos nada sería igual. Por eso quiero hacer otra mención especial a mis más queridos amigos: Eduardo, Kuri, Schranzsista, Jorge, Gissela, Fran.... Vicho, Jorge Vera, Urbanfield, Mati, Claudias, Isas, Danieles, Danielas, Caroline, Pato, Emilia y muuuuuuchos muchos más. Yo creo que tengo una frase para cada uno de Uds. pero en honor a la "hoja" permitida, me remito a hacerles una breve pero gran cita. Muchas gracias por todos los momentos compartidos, ya que la U no es sólo para aprender de Ciencia, también para aprender a vivir y a conocernos.

Finalmente quería hacer una cita a mis padres. Lo más importante dentro de mi vida, sin duda, ha sido el que ustedes hayan sido mis padres. Los quiero, los amo, tal como han sido conmigo. Cuando alguien hace bien su trabajo hay que reconocerlo, y ustedes sí que lo han hecho muy bien. Mi vida de aquí en adelante siempre los contemplará en todo momento y lugar, y aunque tengamos que separarnos en algún momento, siempre estaremos juntos.

Sinceramente a todos... Mario, MFH, Felipe, Gothmog...

## TABLA DE CONTENIDOS



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO	ii
AUTOBIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Bacteriocinas.	1
1.2. Microcina E492.	2
1.2.1. Características generales.	2
1.2.2. Descripción del clúster genético de la mccE492.	3
1.2.3. Sideróforos de tipo catecol y la modificación post-traducciona de la mccE492.	5
1.2.4. Mecanismo de acción de la mccE492.	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
2.1. Materiales.	13
2.1.1. Reactivos.	13
2.1.2. Cepas bacterianas.	14
2.1.3. Plasmidios y vectores.	14
2.1.4. Partidores.	14

2.2. Métodos.	17
2.2.1. Medios de Cultivo.	17
2.2.2. Técnicas moleculares.	17
2.2.3. Purificación de la mceE492.	18
2.2.4. Cuantificación de la mceE492.	18
2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y marcación de las muestras de mceE492 mediante fluorescamina.	18
2.2.6. Western blot.	19
2.2.6.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.	19
2.2.6.2. Electroquimioluminiscencia.	20
2.2.7. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la mceE492.	20
2.2.7.1. Detección de la actividad bactericida.	20
2.2.7.2. Cuantificación de la actividad bactericida mediante el método de la dilución crítica.	20
2.2.7.3. Cuantificación de la actividad bactericida mediante ensayo de viabilidad celular en cultivo líquido.	21
2.2.8. Espectrometría de masas.	21
3. RESULTADOS.	23
3.1. Obtención de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84.	23
3.2. Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84.	23
3.3. Coexpresión del sistema pJEM15 con pS84T y p $\Delta$ GS84.	26
3.4. Purificación de las microcinas S84T y $\Delta$ GS84, y determinación de la actividad bactericida.	28

3.5. Análisis de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84 mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).	32
4. DISCUSIÓN.	36
5. CONCLUSIONES.	43
6. REFERENCIAS.	44
ANEXO I	48
¿METIONINA-5 COMO CODÓN DE INICIO DE LA MICROCINA E492?	48



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en esta memoria	15
Tabla 2. Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo	16
Tabla 3. Secuencia de los partidores empleados en este trabajo	16
Tabla 4. Ensayo de actividad bactericida de la microcina S84T y $\Delta$ GS84 en la cepa <i>E. coli</i> BL21	31
Tabla 5. Masas obtenidas de las microcinas mutantes analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados	34





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de maduración y procesamiento de la <i>mccE492</i>	4
Figura 2. Sideróforos tipo catecol y <i>mccE492</i> modificada post-traduccionalmente	6
Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de la <i>mccE492</i>	10
Figura 4. PCR <i>pS84T</i> y <i>pΔGS84</i> y patrones de digestión de los DNAs plasmidiales mutados	24
Figura 5. Alineamiento de las secuencias del gen estructural de la <i>mccE492</i> correspondiente al C-terminal y de las mutantes <i>S84T</i> y <i>ΔGS84</i>	25
Figura 6. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de mutantes en el C-terminal de la <i>mccE492</i>	27
Figura 7. SDS-PAGE, Western blot y actividad bactericida de preparaciones de las mutantes <i>S84T</i> y <i>ΔGS84</i>	29
Figura 8. Espectros de masas MALDI-TOF de las mutantes <i>S84T</i> y <i>ΔGS84</i>	33
Figura 9. Alineamiento de las regiones del carboxilo terminal de las microcinas M, H47, I47 y E492	39
Figura 10. Caracterización de la mutante <i>V<sup>5V</sup></i>	50

## ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Cassette
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
bp	pares de bases
Cit	citrato
Cm	cloranfenicol
DHBS 2,3-	2,3-Dihidroxibenzoilserina
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
Glc	glucosa
Kan	kanamicina
kb	kilobases
LB	caldo Luria
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo
Mcc	microcina
mccE492	microcina E492
MGE	enteroquelina mono-glucosilada
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por min
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sm	estreptomina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tet	tetraciclina
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
β-MeOH	beta mercaptoetanol

## RESUMEN

Las bacteriocinas son antibióticos de naturaleza peptídica producidas por un amplio espectro de bacterias Gram positivas y negativas. La microcina E492 es un péptido antimicrobiano de 84 aminoácidos producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 activo contra especies de la familia Enterobacteriaceae. Su mecanismo de acción es la formación de poros en la membrana interna de la célula blanco. Mediante un proceso de modificación post-traducciona una molécula del tipo salmoquelina se une covalentemente a la Ser-84 del C-terminal, lo cual sería necesario para el reconocimiento por los receptores FepA, Fiu y Cir de la célula blanco. Cepas mutantes en los genes que codifican para las enzimas a cargo del proceso de modificación post-traducciona de la microcina E492 producen microcina inactiva y no modificada. Alineamientos múltiples entre la microcina E492 y otras microcinas de la misma familia han mostrado que hay una gran identidad a nivel del C-terminal, conservándose en un 100% la Ser-84 y uno de los dos motivos Gly-Ser en las posiciones 83-84. En esta Memoria se construyó una mutante de la microcina E492 en la que se reemplazó la Ser-84 por Thr, y otra con una remoción en el último motivo Gly-Ser. Estas mutantes presentaron una menor actividad bactericida comparadas con la microcina E492 silvestre. Por otra parte, la coexpresión de las microcinas mutantes con la silvestre no afectó la actividad global. El análisis mediante espectrometría de masas de muestras purificadas de ambas mutantes revela la presencia de formas de mayor peso a la forma no modificada, que corresponderían a las especies modificadas post-traduccionalmente con moléculas del tipo salmoquelina.

## ABSTRACT

Bacteriocins are peptide antibiotics produced by a wide range of Gram negative and positive bacteria. Microcin E492 is an antimicrobial 84 amino acids peptide produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Microcin E492 acts by forming pores in the inner membrane of the target cells. Microcin is post-translationally modified at the carboxyl termini Ser-84 by a covalent link to salmochelin, which is recognized by the catechol-siderophores receptors FepA, Fiu and Cir. Mutants in genes encoding enzymes related with microcin E492 post-translational modification generate inactive unmodified microcin. Multiple alignments between microcin E492 and other microcins from the same family show a high identity at their C-termini, with a 100% identity in Ser-84 and the last Gly-Ser motif at 84-83 amino acid position. In this work, two mutants of microcin E492 were constructed; Ser-84 was replaced by Thr, and the last Gly-Ser motif was deleted. Activity assays showed that both purified mutants possess less activity than the wild type purified microcin. In addition, co-expression assays of the mutant microcins and wild type microcin did not affect global activity. Analysis of purified microcin through mass spectrometry showed that both mutants have higher mass species than the unmodified microcin, which correspond to post-translational modified forms with salmocheline type molecules.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Bacteriocinas.**

Para sobrevivir en competencia con otros organismos, las bacterias han adquirido nuevas propiedades adaptativas, incluyendo la producción de agentes antimicrobianos. Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar en dos grupos: los sintetizados enzimáticamente y los codificados genéticamente y sintetizados en el ribosoma (bacteriocinas) (Pavlova y Severinov, 2006). Las bacteriocinas son producidas tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas y son secretadas al medio extracelular, donde ejercen su acción. Los mecanismos de acción de las bacteriocinas son muy variados. Algunas poseen actividad endodesoxiribonucleasa o endoribonucleasa, otras son inhibidoras de la síntesis de proteínas, de la DNA girasa o de la RNA polimerasa, y también están las formadoras de poros, que actúan sobre la membrana plasmática de la célula blanco disipando el potencial de membrana (Braun y cols., 2002).

Dentro de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas hay dos grupos clasificados según su tamaño: las colicinas y las microcinas (Baquero y Moreno, 1984). Las colicinas fueron las primeras en ser caracterizadas y son las más estudiadas hasta la fecha. Poseen un peso molecular superior a los 10 kDa y se encuentran codificadas en plasmidios. Son producidas mayoritariamente por *Escherichia coli* y su expresión es regulada por el sistema SOS, es decir, son producidas cuando la célula está bajo condiciones de estrés (Riley y Wertz, 2002).

Las microcinas son péptidos que poseen un peso molecular <10 kDa y son producidas por bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae (Baquero y Moreno, 1984). Las microcinas son generalmente hidrofóbicas y presentan una alta

estabilidad al calor, pH extremo y proteasas (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984). Sus clúster génicos habitualmente contienen marcos abiertos de lectura codificantes para el precursor de la microcina, factores de inmunidad, proteínas secretoras y en general enzimas de modificación, dando origen a una increíble diversidad de estructuras de microcinas y mecanismos de acción (Duquesne y cols., 2007).

En una revisión reciente (Duquesne y cols., 2007) se propone una clasificación de las microcinas, la que incorpora algunos criterios tales como la presencia, naturaleza y ubicación de las modificaciones post-traduccionales; la organización del clúster genético; y las secuencias del péptido líder. De acuerdo a esta clasificación, las microcinas clase I son péptidos con un peso molecular inferior a 5 kDa, las cuales se encuentran ampliamente modificadas post-traduccionamente en su esqueleto (MccB17, MccC7/C51, MccJ25). La clase II incluye péptidos de mayor peso molecular (en el rango de 5-10 kDa), y se divide en dos subclases: la IIa, algunas que contienen enlaces disulfuro pero no modificación post-traduccionales (MccL, MccV, Mcc24); y la IIb, la cual integra a aquellas microcinas lineales que pueden portar una modificación post-traduccionales en el C-terminal (MccE492, MccM y presumiblemente MccH47 y MccI47).

## **1.2. Microcina E492.**

### **1.2.1. Características generales.**

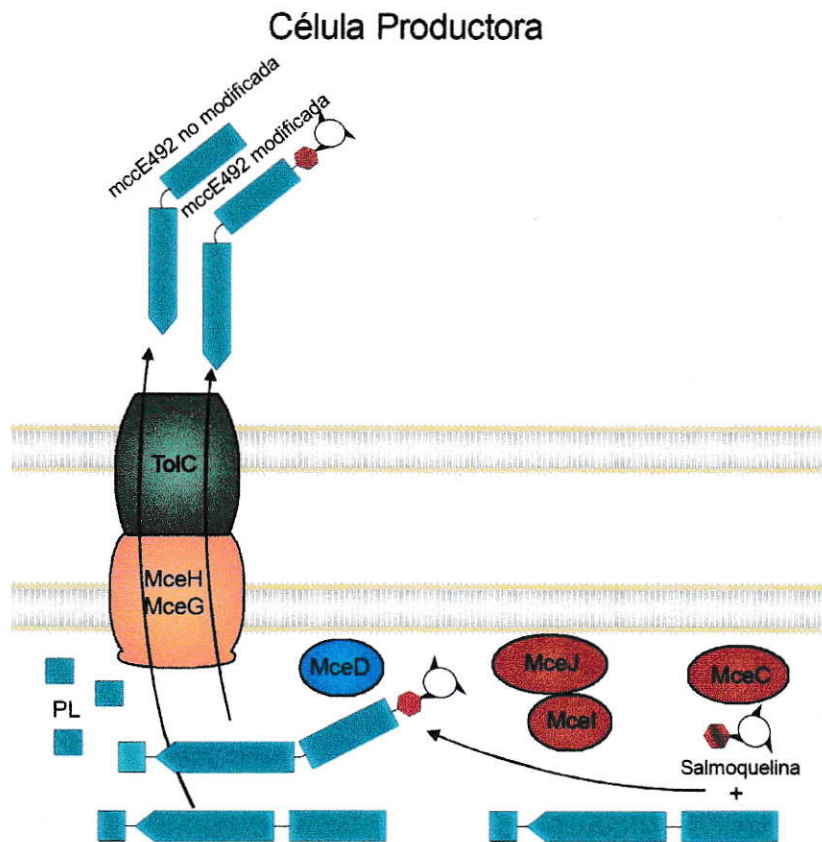
La microcina E492 (mccE492) es una bacteriocina formadora de poros (Lagos y cols., 1993) producida naturalmente por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que presenta actividad bactericida sobre otras cepas Gram negativas tales como *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984).

La *mccE492* es un péptido hidrófobo, con un peso molecular de 7887 kDa (forma no modificada) y un *pI* de 3,8 (Lagos y cols., 1999). Al igual que otras microcinas es resistente al tratamiento con tripsina, a condiciones de pH ácido y a temperaturas sobre los 90° C. Esta microcina puede encontrarse modificada post-traduccionalmente en la serina-84 del extremo carboxilo terminal mediante la unión covalente de una molécula del tipo salmoquelina (Thomas y cols., 2004).

### **1.2.2. Descripción del clúster genético de la *mccE492*.**

Los determinantes genéticos necesarios para la producción de *mccE492* activa han sido clonados y expresados en *E. coli* obteniéndose una microcina con propiedades idénticas a la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). El gen estructural de la *mccE492* (*mceA*) codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en su extremo amino terminal produciéndose una proteína madura de 84 aminoácidos (Lagos y cols., 2001). No se ha dilucidado aún si la proteína precursora tiene 98 o 103 aminoácidos, pues hay dos metioninas (posición 1 y 5) que podrían corresponder al codón de inicio (Lagos y cols., 1999). El gen *mceB* codifica para una proteína de 95 aminoácidos que le confiere inmunidad ante su propia actividad bactericida (Lagos y cols., 1999), y se sobrepone con la región que codifica para el péptido líder de la *mccE492*.

La *mccE492* puede encontrarse tanto en una forma activa como una inactiva. La actividad bactericida es otorgada a través de un proceso de maduración en el cual están implicados los productos génicos *MceC*, *MceI* y *MceJ* (Lagos y cols., 2001) (figura 1). Cepas con mutaciones en los genes de la maduración producen microcina inactiva (Lagos y cols., 2001) y no modificada (datos no publicados de nuestro



**Figura 1. Esquema de maduración y procesamiento de la *mceE492*.**

La *mceE492* se sintetiza como una pre-proteína, que puede o no sufrir un proceso de modificación post-traducciona en el que participan los productos génicos MceC, MceI, MceJ y MceD. Ambas formas, la modificada y la no modificada, al ser exportadas al medio extracelular son procesadas por MceG, perdiendo el péptido líder (PL). Modificado de Lagos y cols., 2009.



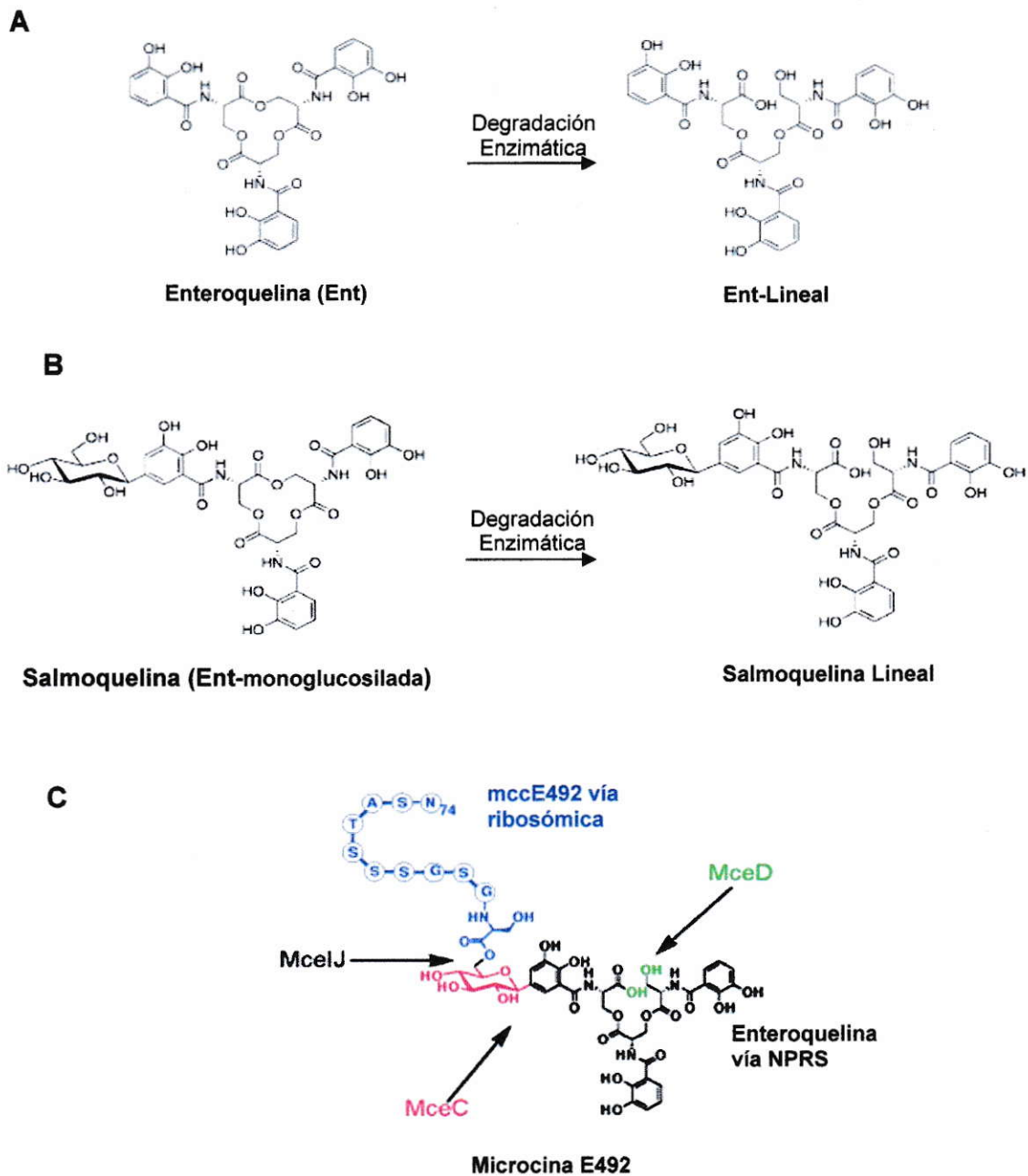
laboratorio). MceC es homóloga a una glicosil transferasa que participa en la síntesis del sideróforo salmoquelina, MceD homóloga a una enteroquelina esterasa (*iroD*), MceI a una acil transferasa, en tanto que MceJ no tiene homólogo conocido. Recientemente se ha demostrado *in vitro* que estas 4 proteínas son responsables del proceso de modificación post-traducciona, tanto en la *mccE492* silvestre como en un decapeptido sintético que contiene los 10 últimos aminoácidos del carboxilo terminal de la *mccE492* (Nolan y cols., 2007).

El gen *mceE* codifica para una proteína de 114 aminoácidos y no tiene homólogo conocido. El producto del gen *mceF* sería una proteína de 230 residuos, la cual posee un 75% de identidad con la proteína McmM de los sistemas de las microcinas H47 y M (Lagos y cols., 2009).

Los productos de los genes *mceH* y *mceG* están involucrados en la exportación de la *mccE492* (figura 1). MceG tiene una alta identidad con los transportadores ABC del sistema de exportación tipo I (Lagos y cols., 2001), en tanto que MceH corresponde a la proteína accesoria del sistema de exportación.

### **1.2.3. Sideróforos de tipo catecol y la modificación post-traducciona de la *mccE492*.**

El miembro más prominente dentro de los sideróforos de tipo catecol es la enteroquelina (figura 2A), también llamada enterobactina, que fue aislada desde *E. coli* y *S. enterica* (Pollack y Neilands, 1970; O'Brien y Gibson, 1970). Este sideróforo une hierro con una constante de afinidad extraordinariamente alta de  $10^{-52}$  M (Crossa y Walsh, 2002). La enteroquelina consiste en un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS), cuya biosíntesis requiere en primera instancia de la



**Figura 2. Sideróforos tipo catecol y mceE492 modificada post-traduccionamente.**

**A)** Enteroquelina y su producto de degradación enzimática, enteroquelina lineal. **B)** Salmoquelina y su producto de degradación enzimática, salmoquelina lineal. **C)** mceE492 modificada post-traduccionamente con una molécula de salmoquelina. Se muestran las enzimas del sistema de la mceE492 que participan en el proceso de modificación post-traducciona. MceC: glicosilación de la molécula de enteroquelina; MceD: linealización de la molécula de salmoquelina; MceIj: unión covalente de la molécula de salmoquelina a la serina-84 de la mceE492. NPRS: Sintetasa de péptidos no ribosómica. Figuras adaptadas de Nolan y cols., 2007.

vía del chiquimato (síntesis de aminoácidos aromáticos) para generar el corismato (Bentley, 1990). Posteriormente, a partir del corismato, una serie de reacciones gobernadas por la maquinaria codificada en el operón *entABCDEF* producen la enteroquelina (Crossa, 1989; Gehring y cols., 1997; Gehring y cols., 1998). La apo-enteroquelina (forma no unida a hierro) es secretada fuera de la célula para capturar hierro, siendo ingresada en su forma holo (unida a hierro) principalmente por el receptor de sideróforos tipo catecol FepA (Pugsley y Reeves, 1977). Una vez dentro de la célula es hidrolizada para liberar el hierro unido (O'Brien y cols., 1971).

Recientemente en *Salmonella enterica* se ha descrito que la presencia del locus *iroA*, conformado por dos operones convergentes *iroN* e *iroBCDE*, codifica para proteínas que permiten la glicosilación de los bloques de DHBS que constituyen la enteroquelina. Estas moléculas han sido llamadas genéricamente salmoquelinas, las cuales son sideróforos de tipo catecol más hidrofílicos (Hantke y cols., 2003). En el año 2005 Fischbach y cols. demostraron que las reacciones de glicosilación son catalizadas por IroB, utilizando como sustrato más robusto la enteroquelina y UDP-glucosa como dador del grupo glicosil, formando así enteroquelina monoglucosilada (MGE) (figura 2B), enteroquelina diglucosilada (DGE) e incluso enteroquelina triglucosilada (TGE), en reacciones sucesivas. La glicosilación de la enteroquelina cambiaría sus propiedades físicas y estéricas sin comprometer su actividad biológica (Fischbach y cols., 2006). Así, a diferencia de la enteroquelina, la salmoquelina no sería secuestrada por la siderocalina, una proteína del sistema inmune innato de los mamíferos (Fischbach y cols., 2006). La proteína IroN, homóloga a FepA, es el receptor para la salmoquelina férrica y al igual que FepA y Cir es capaz de reconocer otros sideróforos (Hantke y cols., 2003; Rabsch y cols., 2003).

En el año 2004, Thomas y cols., determinaron que la *mccE492* se encuentra

modificada post-traduccionamente en la serina-84 del carboxilo terminal (figura 2C) con una molécula de salmoquelina. En dicho trabajo se determinó mediante espectrometría de masas que existen a lo menos 3 especies de mayor tamaño que la mceE492 sin modificar (7887 Da), las que corresponden a microcina modificada con el trímero de DHBS glucosilado (8718 Da); el dímero de DHBS glucosilado (8495 Da); con el monómero de DHBS glucosilado (8272 Da). Se postula que dicha modificación post-traducciona favorecería la interacción de la mceE492 con los receptores de tipo catecol FepA, Fiu y Cir de la célula blanco (Patzner y cols., 2003).

#### **1.2.4. Mecanismo de acción de la mceE492.**

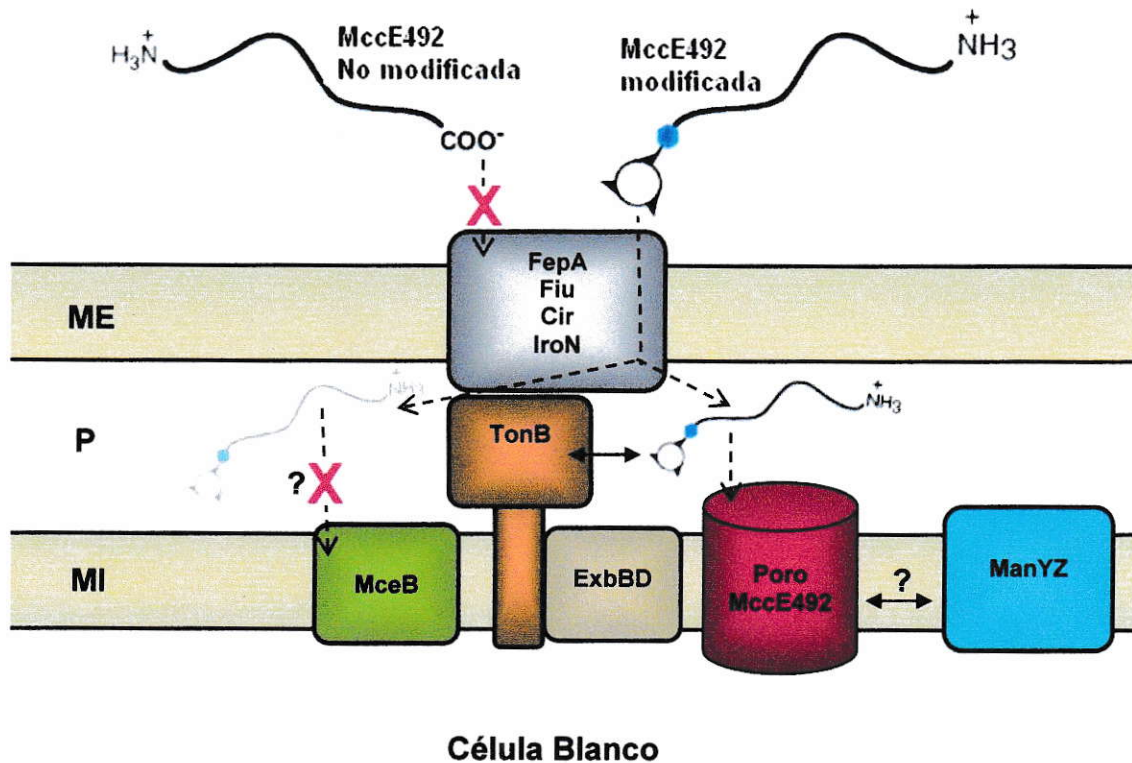
El mecanismo de acción de la mceE492 contempla en primera instancia el reconocimiento en la membrana externa de la célula blanco por los receptores de sideróforos tipo catecol FepA, Fiu y Cir (Strahsburger y cols., 2005). Tal reconocimiento estaría mediado por la molécula de salmoquelina unida al extremo carboxilo terminal de la mceE492, por lo que se ha planteado que la mceE492 modificada post-traduccionamente con la molécula sideróforo salmoquelina favorece su interacción con los receptores para la posterior internalización a la célula blanco (Thomas y cols., 2004), facilitando la importación de esta toxina emulando una estrategia tipo “caballo de Troya” (Fischbach y cols., 2006). La translocación al periplasma de la célula sensible usa el sistema transductor de energía TonB/ExbBD (Pugsley y cols., 1986), dentro de los cuales TonB interactuaría con la mceE492 (Baeza, 2003; Flores, 2008). La actividad bactericida sería llevada a cabo mediante la despolarización de la membrana interna (de Lorenzo y Pugsley, 1985), producto de la formación de poros, hecho que se infiere por su capacidad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

En el año 2006, Bieler y cols. determinaron que hay un componente esencial para la actividad bactericida de la *mccE492*. Su toxicidad es estrictamente dependiente de la presencia de ManYZ, un complejo proteico de membrana interna involucrado en la captación de manosa. Sin embargo, no ha sido posible determinar si interactúa y a qué nivel con el sistema TonB/ExbBD y con la *mccE492*.

En la figura 3 se muestra un esquema con todos los elementos implicados hasta la fecha y su participación en el mecanismo de acción de la *mccE492*.

Alineamientos múltiples entre la *mccE492* y otras microcinas de la clase IIb (*MccM*, *MccH47* y *MccI47*) muestran que hay una gran identidad a nivel del carboxilo terminal (Nolan y cols., 2007; Azpiroz y Laviña, 2007). Dentro de los 10 últimos aminoácidos, hay al menos 5 que están 100% conservados. Uno de esos es la serina-84 y la glicina que la antecede en la posición 83, motivo que se repite en las posiciones 81 y 82 en la *mccE492* (Gly-Ser-Gly-Ser).

En esta Memoria, se estudió el papel de la serina-84 y del último motivo glicina-serina en la actividad bactericida y en la modificación post-traducciona l de la *mccE492*. Para tal efecto se construyó una mutante en que se cambia la serina-84 por una treonina (S84T), y otra que carece de los dos últimos aminoácidos ( $\Delta$ GS84) acortando el carboxilo terminal, dejando glicina-81-serina-82 como últimos aminoácidos. Se investigó si la serina-84, que es esencial para la modificación post-traducciona l y la actividad bactericida, puede ser sustituida por un aminoácido de características similares. Además se estableció si es que la remoción de uno de los motivos Gly-Ser, que deja Gly-81-Ser-82 en el C-terminal, conserva la actividad bactericida y si es susceptible de modificar post-traducciona lmente en la serina-82, emulando lo que ocurre en la serina-84 de la microcina silvestre. Para determinar si este planteamiento



**Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de la mceE492.**

La microcina modificada post-traduccionalmente entraría a la célula mediante la interacción con los receptores de sideróforos tipo catecol (FepA, Fiu, Cir e Iron), en tanto que la forma no modificada, no podría llevar a cabo tal reconocimiento. La microcina es traslocada hacia el periplasma gracias al complejo TonB/ExbBD, donde TonB probablemente interacciona con los receptores y con la microcina. Posteriormente se produce la despolarización de la membrana interna, producto de la formación de poros. Para llevar a cabo esta acción bactericida se requiere de la presencia del complejo ManYZ, pero se desconoce la manera en que participaría en este proceso. Por otra parte, la actividad bactericida de la mceE492 es anulada en una célula que posee la proteína de inmunidad (MceB) mediante un mecanismo aún no dilucidado. ME: Membrana externa, P: Periplasma, MI: Membrana interna.

es correcto, se evaluó si las microcinas mutantes poseen actividad bactericida. Las muestras purificadas de estas mutantes se analizaron mediante espectrometría de masas para determinar si se encuentran modificadas post-traduccionalmente.

**Hipótesis:**

*“La serina 84 de la microcina E492 puede ser cambiada por un aminoácido de características similares como la treonina, sin perder la capacidad de ser modificada post-traduccionalmente ni la actividad bactericida. Además, la ausencia del último motivo GS del C-terminal de la microcina E492 es dispensable para la actividad bactericida y la modificación post-traducciona, pues es redundante.”*

**Objetivo General:**

1.- Determinar la importancia de los residuos Gly-83 y Ser-84 del C-terminal de la microcina E492 en la actividad bactericida y en la modificación post-traducciona.

**Objetivos Específicos:**

1.- Construcción de una mutante conservada en la que se reemplaza la serina 84 por una treonina (S84T) y de otra que carece de los últimos dos aminoácidos ( $\Delta$ GS84).

2.- Determinar si las microcinas mutantes S84T y  $\Delta$ GS84 presentan actividad bactericida.

3.- Determinar si las microcinas mutantes S84T y  $\Delta$ GS84 presentan modificación post-traducciona.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **2.1. Materiales.**

#### **2.1.1. Reactivos.**

La bis-acrilamida, SDS, fosfato di-ácido de sodio, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, tricina, L-aminoácidos, tiamina, ácido p-cumárico se compraron en Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., USA.

Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para remover las sales de los ácidos nucleicos pre-electroporación se obtuvieron en Millipore, USA.

Las membranas de nitrocelulosa para Western blot, acrilamida, persulfato de amonio, TEMED y cubetas de electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc., Hercules, C.A., USA.

El azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, cloruro de calcio y sacarosa se compraron en Merck, Darmstadt, Alemania.

El cloruro de sodio, agar, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio,  $\beta$ -MeOH, citrato de sodio, agarosa, acetato de amonio, marcadores de peso molecular para fragmentos de DNA escala 1 kb y escala 100 pb, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

El cloruro de potasio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio se obtuvieron de Fluka Chemie AG, Messershmittstr, Suiza.

Los reactivos de grado técnico: ácido acético, etanol, metanol, ácido clorhídrico se adquirieron en TCL, Santiago, Chile.

La triptona, bactotriptona, casaminoácidos y extracto de levadura se compraron en DIFCO Laboratories, Detrit, Michigan, USA.

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

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

La tetraciclina en el Laboratorio Benguerel Ltda., Chile.

La kanamicina, estreptomina y cloranfenicol se compraron en el Laboratorio Bestpharma S.A.

La ampicilina se compró en US Biological, Swampscott, MA, USA.

El anticuerpo secundario IgG-HRP anti-conejo de cabra se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

La película autoradiográfica X-OMAT BT Film, se compró en Kodak, Windsor, Colorado, USA.

Los partidores diseñados se compraron a Alpha DNA, Montreal, Quebec H4C 3N9.

#### **2.1.2. Cepas bacterianas.**

En la tabla 1 se describen las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

#### **2.1.3. Plasmidios y vectores.**

En la tabla 2 se describen los plasmidios y vectores utilizados en este trabajo

#### **2.1.4. Partidores.**

En la tabla 3 se muestran los partidores y sus secuencias utilizados en esta memoria.

**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> r <sub>B</sub> m <sub>B</sub>	Novagen
DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
X8605	F <sup>-</sup> <i>trpR</i> Δ( <i>lac</i> ) <i>U169 strA</i> Δ( <i>tonB lacP</i> )	Guarente y Beckwith, 1978
H1876	Δ <i>lac aroB cir::MudX fepA::Tn10 fiu::MudX</i>	Hantke, 1990

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

Plasmidio	Características relevantes	Fuente o referencia
pACYC184	Plasmidio de propósito general Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Chang y Cohen, 1978
pJAM229	Derivado de pJ. Construido en el cosmidio pH79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , contiene los genes para la producción de <i>mccE492</i> activa. Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
pJAM434	Derivado de pJ. Construido en el cosmidio pH79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de <i>mccE492</i> activa. Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
pJEM15	Derivado de pJAM229, posee la duplicación de un fragmento interno de 2,5 Kb <i>SalI</i> (gen <i>mceF</i> ). Es un sobreproductor de <i>mccE492</i> activa. Amp <sup>r</sup>	Wilkins y cols., 1997
np220	pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	Lagos y cols., 2001
pAB	Derivado de pACYC184. Contiene los genes <i>mceBA</i> bajo el mando del promotor natural de la <i>mccE492</i> , clonado en el sitio <i>BamHI</i> . Cm <sup>r</sup>	Colección Laboratorio
p157	Derivado de pT7-7 que lleva el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>NdeI-EcoRI</i> de 0,3 kb. Amp <sup>r</sup>	Lagos y cols., 1999

**Tabla 3. Secuencia de los partidores empleados en este trabajo.**

Partidor	Secuencia (5'→3')
ΔGS84r	CGT CCG GCG TAG AGG ATG CTT TAT <b>CAT</b> CAA CTA CCG GAA CTG GAT G
ΔGS84f	CAT CCA GTT CCG GTA GTT <b>GAT</b> GAT AAA GCA TCC TCT ACG CCG GAC G
S84Tr	GCG TCC GGC GTA GAG GAT <b>GCT</b> TTA <b>AGT</b> ACC ACT ACC GGA ACT GG
S84Tf	CCA GTT CCG GTA GTG GTA <b>CTT</b> AAA GCA TCC TCT ACG CCG GAC GC

En negrita y destacado, se muestran las bases que no están presentes en la secuencia silvestre, y que incorporarán los cambios deseados para la obtención de las mutantes.

## **2.2. Métodos.**

### **2.2.1. Medios de Cultivo.**

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

**Medio mínimo M9.** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L.

**M9 suplementado (M9-S).** El medio M9 se suplementó con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 mg/mL, casaminoácidos 1 mg/mL, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v.

**Agar blando.** Se preparó con medio mínimo M9 y 0,7% p/v de agar agar.

**Placas de agar.** Se prepararon las placas con medio LB y 1,5% p/v de agar agar.

**Placas de césped.** Sobre placas de agar se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 150 µL de un cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria. Las cepas bacterianas que portan plasmidios recombinantes y/o transposones con resistencia a antibióticos, se crecieron en medio líquido o placas suplementadas con los antibióticos correspondientes, a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, estreptomina 10 µg/mL y el ácido nalidíxico a 10 µg /mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambrook y cols. (1989).

### **2.2.2. Técnicas moleculares.**

Los procedimientos de biología molecular no detallados, como aislamiento de DNA plasmidial, preparación de células electrocompetentes, transformación mediante electroporación, digestión con enzimas de restricción, etc., se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook y cols. 1989; Ausubel y cols., 1992).

La mutagénesis sitio dirigida se realizó usando la estrategia propuesta en el kit QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis, de Stratagene®, con partidores diseñados de modo de cambiar la serina-84 por una treonina (S84T) y de producir la remoción de los dos últimos aminoácidos de la mceE492 ( $\Delta$ GS84).

### **2.2.3. Purificación de la mceE492.**

Se crecieron cultivos a 37° C, 220 rpm por 22 h hasta una  $DO_{600}$  de 1,0 en medio mínimo M9-S. 1L de sobrenadante de cultivo fue filtrado a través de una columna de fase reversa Sep-Pack C-18 (Waters). La columna fue lavada con 3 mL de metanol 65% y 3 mL de acetonitrilo 25%. La microcina fue eluída con 3 mL de acetonitrilo 50%.

### **2.2.4. Cuantificación de la mceE492.**

La microcina purificada fue cuantificada mediante el kit Micro BCA protein assay (Pierce), según las recomendaciones del fabricante.

### **2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y marcación de las muestras de mceE492 mediante fluorescamina.**

Los geles fueron preparados con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador consistió en 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. La solución de corrida para el cátodo fue Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. Se concentró 300

$\mu\text{L}$  de la preparación de mccE492 utilizando un equipo de Centrivap (Labconco) a  $60^\circ\text{C}$  hasta un volumen de aproximadamente  $15\ \mu\text{L}$ , y luego se agregó  $4\ \mu\text{L}$  de solución borato ( $0,4\ \text{M}$ ;  $\text{pH}\ 9,0$ ),  $8\ \mu\text{L}$  de fluorescamina ( $2\ \text{mg/mL}$  en DMSO) y  $7\ \mu\text{L}$  de amortiguador de carga 4X (glicerol a 40%; Tris-HCl  $50\ \text{mM}$   $\text{pH}\ 7,6$ ; SDS 10%;  $\beta$ -MeOH 20%; azul de bromofenol 0,04% p/v). La mezcla se incubó a  $95^\circ\text{C}$  durante 10 min. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (Lagos y cols., 2001).

Como marcador de peso molecular se utilizó Sigma MW-SDS (2.500-17.000 Da), que contiene mioglobina de 16.950 Da y fragmentos de mioglobina de 14.440 Da, 10.600 Da, 8.160 Da, 6.210 Da y 2.510 Da, y glucagón de 3.480 Da. Estas proteínas se marcaron con fluorescamina de la misma manera que las muestras. Las bandas de proteínas se visualizaron en un transiluminador UV e inmediatamente fotografiadas.

## **2.2.6. Western blot.**

### **2.2.6.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.**

Las proteínas del gel de la SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 90 min a 100 V, 500 mA y  $-20^\circ\text{C}$  empleando amortiguador de transferencia (Tris-HCl  $25\ \text{mM}$ ; glicina  $190\ \text{mM}$ ; metanol 20%) previamente enfriado. La membrana fue bloqueada con leche al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl  $50\ \text{mM}$   $\text{pH}\ 7,5$ ; NaCl  $150\ \text{mM}$ , Tween 0,1%) durante al menos 1 h con agitación a temperatura ambiente. Luego fue incubada con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el fragmento C-terminal de la mccE492 [SGSGYNSATSSSGSGS] (Mercado y cols., 2008) (dilución 1:1.000) durante 1 h, seguido de 3 lavados con amortiguador TBS-Tween. A continuación se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario anticonejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000). La membrana fue revelada mediante electroquimioluminiscencia.

Como marcador de peso molecular se empleó New England Biolabs de amplio rango (7-175 kDa), que contiene proteínas con los siguientes pesos: 175, 80, 58, 46, 30, 25, 17 y 7 kDa.

#### **2.2.6.2. Electroquimioluminiscencia.**

La membrana fue revelada en 10 mL de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, con 50  $\mu$ L de luminol 250 mM (preparado en DMSO) y 22  $\mu$ L de ácido p-cumárico 90 mM (preparado en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 5  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana se expuso entre 5 s y 5 min a los films autoradiográficos, dependiendo de intensidad de la señal obtenida.

#### **2.2.7. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la mceE492.**

##### **2.2.7.1. Detección de la actividad bactericida.**

La detección de la actividad bactericida se realizó sembrando colonias provenientes de las muestras que se deseaban analizar sobre una placa con un césped sensible de *E. coli* BL21. Luego de incubar las placas a 37° C durante 14-16 h, la actividad bactericida se visualizó por la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible.

##### **2.2.7.2. Cuantificación de la actividad bactericida mediante el método de la dilución crítica.**

Para la cuantificación de la actividad bactericida de la microcina se realizaron diluciones seriadas de las muestras en base 2 en agua nanopura estéril. Se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se depositaron sobre placas con un césped de la cepa a probar. Se incubó a 37° C durante 14-16 h, y el título de la muestra



se determinó como la última dilución cuya alícuota es capaz de producir un halo de inhibición de crecimiento en la placa de césped sensible.

### **2.2.7.3. Cuantificación de la actividad bactericida mediante ensayo de viabilidad celular en cultivo líquido.**

Se crecieron cultivos de la cepa BL21 a 37° C hasta una  $DO_{600}$  de 0,3. Se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 1 mL de medio LB; se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Posteriormente las células se resuspendieron en 1 mL de LB. Se mezcló 100  $\mu$ L de la resuspensión con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (control), y otros 100  $\mu$ L con 100  $\mu$ L de microcina a una concentración inicial de 50  $\mu$ g/mL. Las mezclas se incubaron a 37° C por 25 min. A continuación se hicieron diluciones seriadas en base 10 en agua nanopura estéril y se depositaron 3 alícuotas de 10  $\mu$ L de cada dilución sobre una placa de agar LB. Se incubó a 37° C durante 14-16 h y se contó el número de colonias crecidas, y se determinó el promedio del triplicado de cada dilución. Posteriormente se calculó las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) y el porcentaje de viabilidad, normalizando el 100% como el control de las células incubadas con H<sub>2</sub>O.

### **2.2.8. Espectrometría de masas.**

Las muestras de microcina purificada se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

La matriz ácido sinapínico (SA) se preparó a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:2.

Se prepararon diluciones 1:2 de las muestras con la matriz y se depositaron 2  $\mu$ L de cada una de las diluciones en una placa porta muestra micro scout. Los

espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 5.000-17.000 Da. Para la obtención de espectros se trabajó en modo ion positivo y detección lineal. Los espectros finales corresponden a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de 40 disparos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar de las muestras previamente preparadas en placa.

### **3. RESULTADOS.**

#### **3.1. Obtención de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84.**

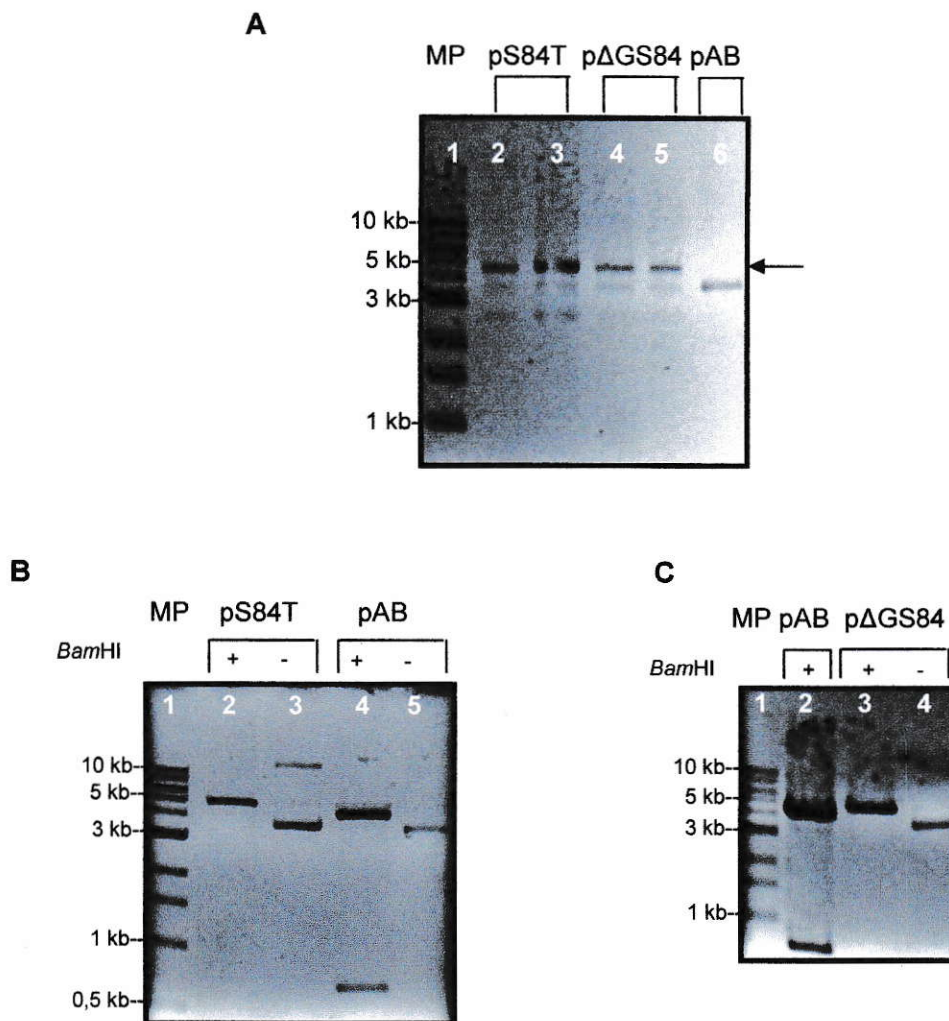
Siguiendo la estrategia planteada en el kit de mutagénesis QuickChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis, de Stratagene<sup>®</sup>, se amplificó el vector pAB mediante PCR con los partidores indicados en la tabla 3, obteniéndose, luego de la optimización de la reacción, productos de PCR del tamaño esperado (aproximadamente 5 kb, figura 3A).

Para diferenciar los plasmidios amplificados que poseen la mutación, los partidores eliminan un sitio *Bam*HI existente en la construcción parental pAB. Esto permite discriminar entre los clones parentales y los mutantes, ya que en el primer caso se espera que la digestión genere dos fragmentos: uno de aproximadamente 4.200 pb, correspondiente al vector pACYC184 linealizado, y otro de aproximadamente 670 pb, correspondiente a la unidad bicistrónica *mce*BA (gen de la inmunidad y el estructural, respectivamente) con su promotor natural. Para el caso de los DNA mutantes, se espera que la digestión genere un sólo fragmento de 4.900 pb, correspondiente a la construcción pAB linealizada.

Se analizó mediante restricción algunos de los transformantes y se seleccionaron los clones con un correcto patrón de digestión (figura 4, panel B y C). La secuencia de los posibles DNAs mutantes, confirma los cambios deseados para la construcción de cada mutante (figura 5).

#### **3.2. Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84.**

Para determinar si las microcinas mutantes  $\Delta$ GS84 y S84T poseen actividad bactericida se utilizó como huésped la cepa *E. coli* BL21 np220, a la cual se



**Figura 4. PCR pS84T y pΔGS84, y patrones de digestión de los DNAs plasmidiales mutados.**

Tanto los productos de PCR como los de digestión se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. **A)** PCR pS84T y pΔGS84. Carril 1: Marcador de peso molecular (MP), ladder 1 kb; Carril 2 y 3: Productos de PCR pS84T; Carriles 4 y 5: Productos de PCR pΔGS84; Carril 6: DNA plasmidial parental (pAB) sin digerir. La flecha indica el amplificado lineal del vector pAB. **B)** Patrón de digestión del DNA plasmidial pS84T. Carril 1: Marcador de peso molecular (MP), ladder 1 kb; Carril 2: Digestión DNA pS84T con *Bam*HI; Carril 3: DNA pS84T sin digerir; Carril 4: Digestión DNA pAB con *Bam*HI; Carril 5: DNA pAB sin digerir. **C)** Patrón de digestión del DNA plasmidial pΔGS84. Carril 1: Marcador de peso molecular (MP), ladder 1 kb; Carril 2: Digestión DNA pAB con *Bam*HI; Carril 3: Digestión DNA pΔGS84 con *Bam*HI; Carril 4: DNA pΔGS84 sin digerir. Para ambos casos “-” indica que no se añadió la enzima *Bam*HI y “+” indica que ésta se adicionó.

```

mceA GGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTGGTAGT-----
pAB GGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTGGTAGTTAAAGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGG
ΔGS-84 GGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTTGATGATAAAGCATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGG
ΔGS-84f -----CATCCAGTCCGGTAGTTGATGATAAAGCATCCTCTACGCCGGACG-----
pAB GGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTGGTAGTTAAAGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGG
S84T GGTAGCGGTAGTGGTTATAACAGCGCAACATCCAGTCCGGTAGTGGTACTTAAAGCATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGG
S84Tf -----CCAGTCCGGTAGTGGTACTTAAAGCATCCTCTACGCCGGACGC-----

```

**Figura 5. Alineamiento de las secuencias del gen estructural de la *mccE492* correspondiente al C-terminal y de las mutantes S84T y ΔGS84.**

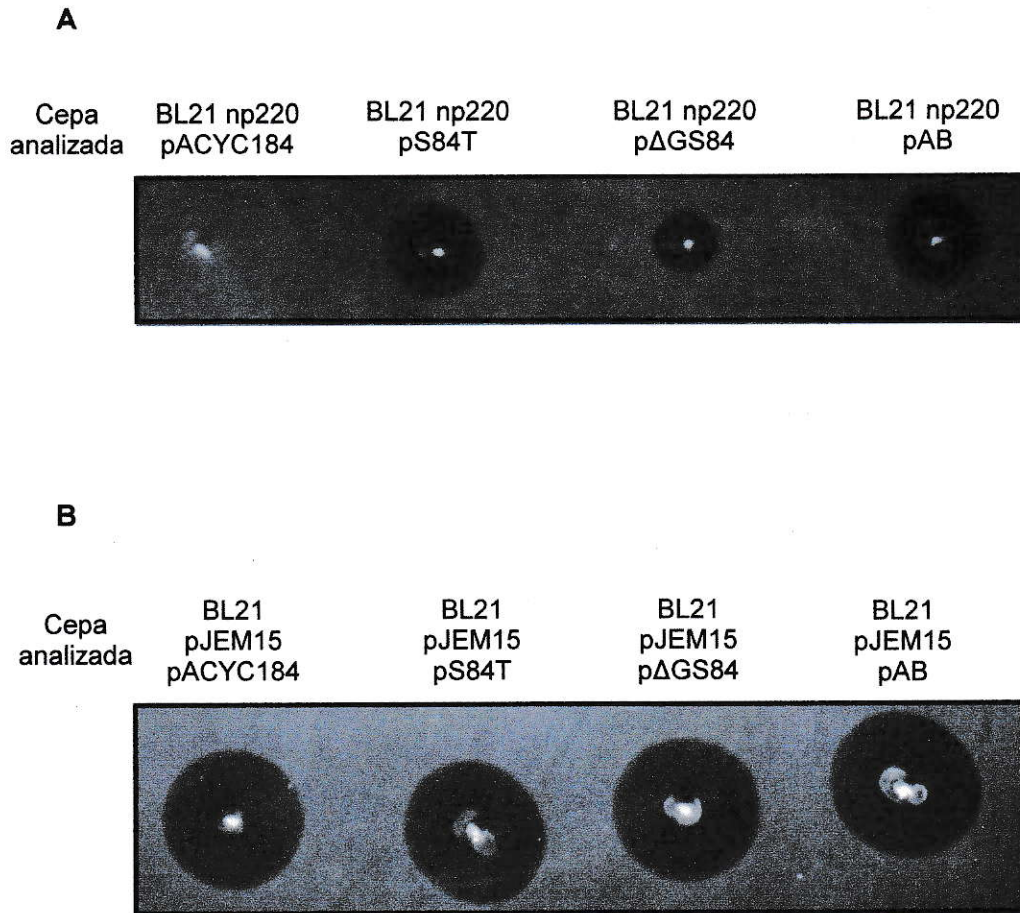
Se hizo un alineamiento (5'→3') entre la secuencia de la microcina silvestre (*mceA*) y las mutantes S84T y ΔGS84 enviadas a secuenciar, usando la herramienta AlignX del software Vector NTI Advance (Invitrogen®). Además se incorporó la secuencia de los partidores "forward" (f) y la de la construcción parental pAB. El cuadro verde muestra que el codón que codifica para la serina-84 en la construcción pAB (AGT), cambia a ACT (treonina) en la secuencia de la mutante S84T. El cuadro rojo muestra que los codones que codifican para la glicina-83 (GGT) y serina-84 (AGT) en la secuencia silvestre, cambian por codones de término (TGA) en la mutante ΔGS84. En el cuadro azul, se muestra que uno de los sitios *Bam*HI existente en la secuencia parental (GGATCC) es anulado en las secuencias de las mutantes (GCATCC). El resto de la secuencia del gen estructural *mceA* de ambas mutantes presenta un 100% de identidad en relación a la construcción parental pAB. Las bases resaltadas en amarillo son 100% conservadas en el alineamiento, en tanto que las resaltadas en verde son parcialmente conservadas.

le introdujo mediante transformación los DNAs de ambas mutantes. La cepa np220 posee todos los determinantes genéticos para la producción de mceE492 salvo el gen estructural, pues tiene una inserción del transposón Tn5 en el gen *mceA* (Tn5::*mceA*), lo cual la hace una cepa no productora de mceE492. Esta cepa puede ser complementada con la construcción pAB, que posee una copia del gen que codifica para la mceE492, y se puede utilizar para probar la actividad de nuevas variantes de ésta.

La actividad bactericida de las microcinas mutantes se midió mediante la formación de halo de inhibición del crecimiento sobre un césped de *E. coli* BL21, sensible a la microcina silvestre (figura 6A). El sistema np220 transformado con el vector pACYC184, no presentó actividad bactericida. La complementación con la construcción parental mostró actividad bactericida, al igual que ambas mutantes. Cabe hacer notar que el halo de inhibición del crecimiento producido por las colonias complementadas con la microcina mutante  $\Delta$ GS84 siempre pareció ser de menor tamaño que el mostrado por np220 pAB, a pesar de que todas las colonias son de un tamaño similar.

### **3.3. Coexpresión del sistema pJEM15 con pS84T y p $\Delta$ GS84.**

Además de utilizar el sistema np220 para determinar si las mutantes poseían actividad, se transformó sobre una cepa portadora del sistema pJEM15 (hiperproductor de microcina activa) con el objetivo de establecer si la microcina mutante interfería con la actividad de la microcina silvestre al co-expresarlas, ya sea por competencia con el sistema productor, por el de modificación o de exportación, o



**Figura 6. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de mutantes en el C-terminal de la mceE492.**

**A)** Colonias productoras de microcina S84T y ΔGS84. **B)** Colonias BL21 pJEM15 co-expresadas con las mutantes pS84T y pΔGS84. Se usó un césped de la cepa sensible *E. coli* BL21. Las colonias fueron analizadas por triplicado. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

bien por interacción entre ambos tipos de microcinas. Las cepas *E. coli* BL21 pJEM15 pS84T, pJEM15 pΔGS84 y pJEM15 pAB se ensayaron sobre un césped de la cepa *E. coli* BL21 sensible (figura 6B). La co-expresión de *mccE492* silvestre con pS84T y con pΔGS84, presentó un halo de inhibición de crecimiento con características similares al de las transformadas con el vector pACYC184 y con pAB. Se concluyó que las mutantes S84T y ΔGS84 no afectan la actividad global de la cepa productora al ser co-expresadas.

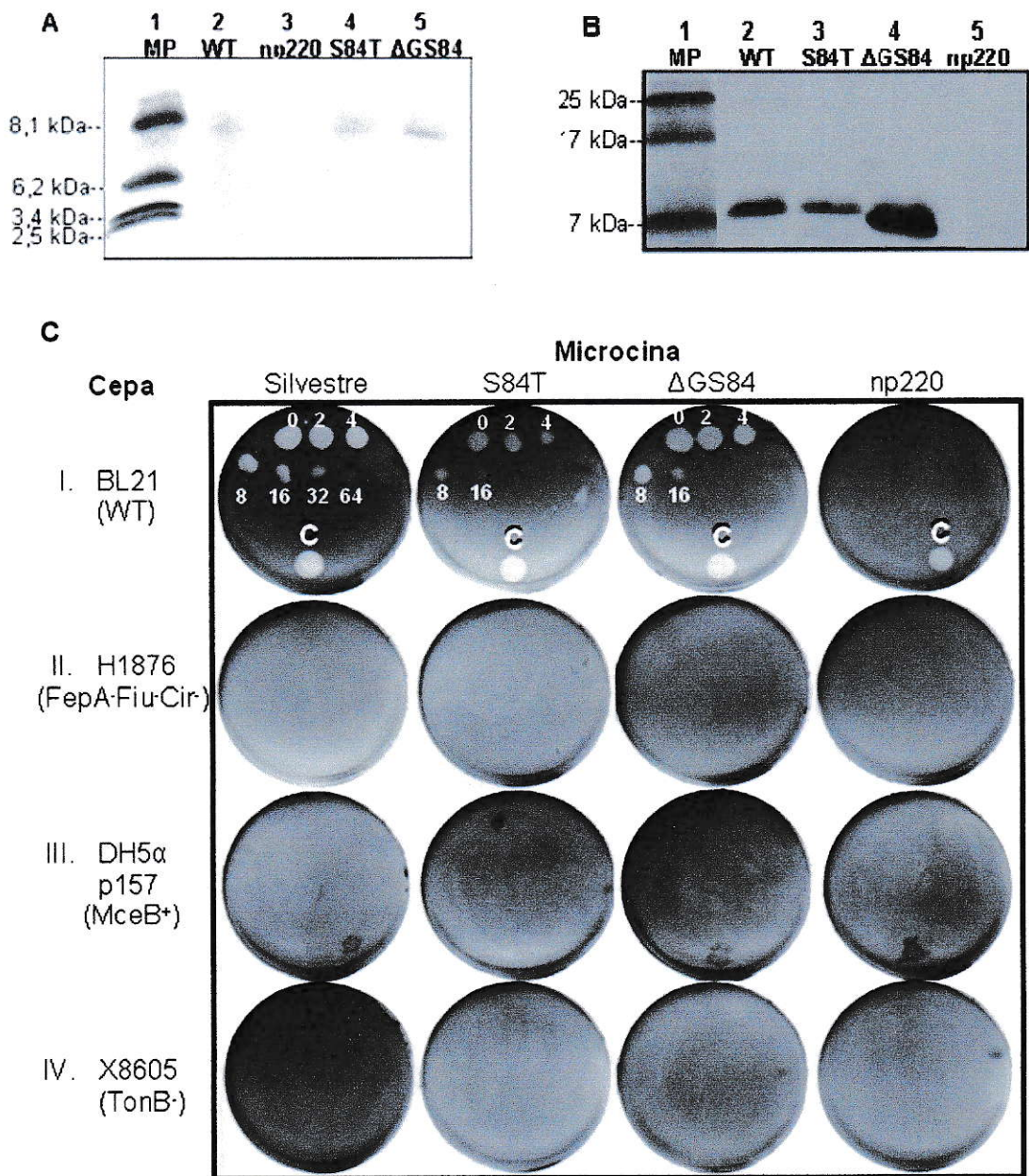
#### **3.4. Purificación de las microcinas S84T y ΔGS84, y determinación de la actividad bactericida.**

Las microcinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas *E. coli* BL21 np220 S84T, BL21 np220 ΔGS84, BL21 np220 pAB y BL21 np220 se purificaron mediante columnas Sep-Pack C-18 de fase reversa como se indica en Métodos. Con las muestras purificadas se realizó un Western blot (figura 7A). El revelado muestra que las purificaciones de microcina S84T y ΔGS84 unen el anticuerpo antimicrocina, observándose bandas aproximadamente a la altura de la microcina silvestre. El sobrenadante purificado de la cepa np220 (control negativo) no mostró unión al anticuerpo antimicrocina.

Para que la *mccE492* tenga actividad bactericida se requiere que una serie de elementos estén presentes en la célula blanco. FepA, Fiu y Cir son tres receptores de sideróforos tipo catecol, los cuales reconocen a la *mccE492* a nivel de la membrana externa. Por otro lado, se requiere TonB, una proteína de la membrana interna, para ejercer su acción en la membrana citoplasmática.

Para determinar si la actividad bactericida observada en la cepa *E. coli* BL21 sensible es producida por la microcina empleada, se usaron un conjunto de cepas





**Figura 7. SDS-PAGE, Western blot y actividad bactericida de preparaciones de las mutantes S84T y ΔGS84.**

**A)** La purificación, marcaje con fluorescamina y electroforesis de la mceE492 purificada a partir de las diferentes cepas se realizó como se indica en Métodos. **B)** Las proteínas de un nuevo gel con las mismas muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y revelaron mediante electroquimioluminiscencia. **C)** Ensayo de actividad bactericida de las purificaciones de las microcinas S84T y ΔGS84 sobre céspedes de diferentes cepas indicadoras. En la figura se indica el fenotipo relevante de cada cepa usada. Se emplearon las microcinas purificadas que se muestran en la parte A de la figura, a una concentración inicial de 100 μg/mL. Todos los ensayos incluyeron un control microcina silvestre denominado "C" en la figura. Se muestra el recíproco de las diluciones en las que se observó halo de inhibición del crecimiento.

mutantes en los determinantes genéticos necesarios para la actividad de la *mccE492* en la célula blanco: X8605 es una cepa mutante en *TonB* y es resistente a la actividad bactericida de la *mccE492*; H1876 es una cepa triple mutante en los receptores de sideróforos catecólicos *FepA*, *Fiu* y *Cir*, y es resistente a la *mccE492*; y DH5 $\alpha$  p157 es una cepa que posee la proteína de la inmunidad *MceB*, por lo que es resistente a la acción de la *mccE492*. No se observó actividad bactericida sobre las cepas antes mencionadas (figura 7B), comprobándose que la actividad en la cepa sensible es específica para la *mccE492*.

Preparaciones de microcina S84T,  $\Delta$ GS84 y silvestre presentaron actividad bactericida sobre el césped de la cepa *E. coli* BL21. S84T y  $\Delta$ GS84 presentaron una actividad hasta la dilución 1/16 y la silvestre hasta 1/64. En tanto que el sobrenadante de la cepa np220 no presentó actividad en ninguna dilución. Esto indica que las mutantes tienen una actividad específica más baja que la silvestre.

Otra manera de medir la actividad bactericida es mediante ensayos de cuantificación de viabilidad celular de un cultivo líquido. Para esto se usó la cepa sensible *E. coli* BL21 y las microcinas S84T,  $\Delta$ GS84 y silvestre a una concentración inicial de 50  $\mu$ g/mL (tabla 4). Para el tratamiento con la microcina silvestre se observó un  $8,1 \times 10^{-4}$  % de sobrevida. La sobrevida obtenida con S84T fue de 0,088%, en tanto que para la mutante  $\Delta$ GS84 fue de 0,15%. Este resultado nos indica que las microcinas S84T y  $\Delta$ GS84, tienen una menor actividad bactericida que la silvestre y son similares entre ellas, y es consistente con lo observado en la determinación de la actividad bactericida mediante el método de la dilución seriada.

**Tabla 4. Ensayo de actividad bactericida de las microcinas S84T y  $\Delta$ GS84 en la cepa *E. coli* BL21.**

<b>Tratamiento</b>	<b>UFC/mL</b>	<b>% Sobrevida<sup>a</sup></b>
H <sub>2</sub> O	$1,7 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^7$	100 $\pm$ 24
Mcc Silvestre	$1,4 \times 10^3 \pm 7,1 \times 10^1$	0,00081 $\pm$ 0,00004
Mcc $\Delta$ GS84	$2,5 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^4$	0,15 $\pm$ 0,02
Mcc S84T	$1,5 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$	0,088 $\pm$ 0,009

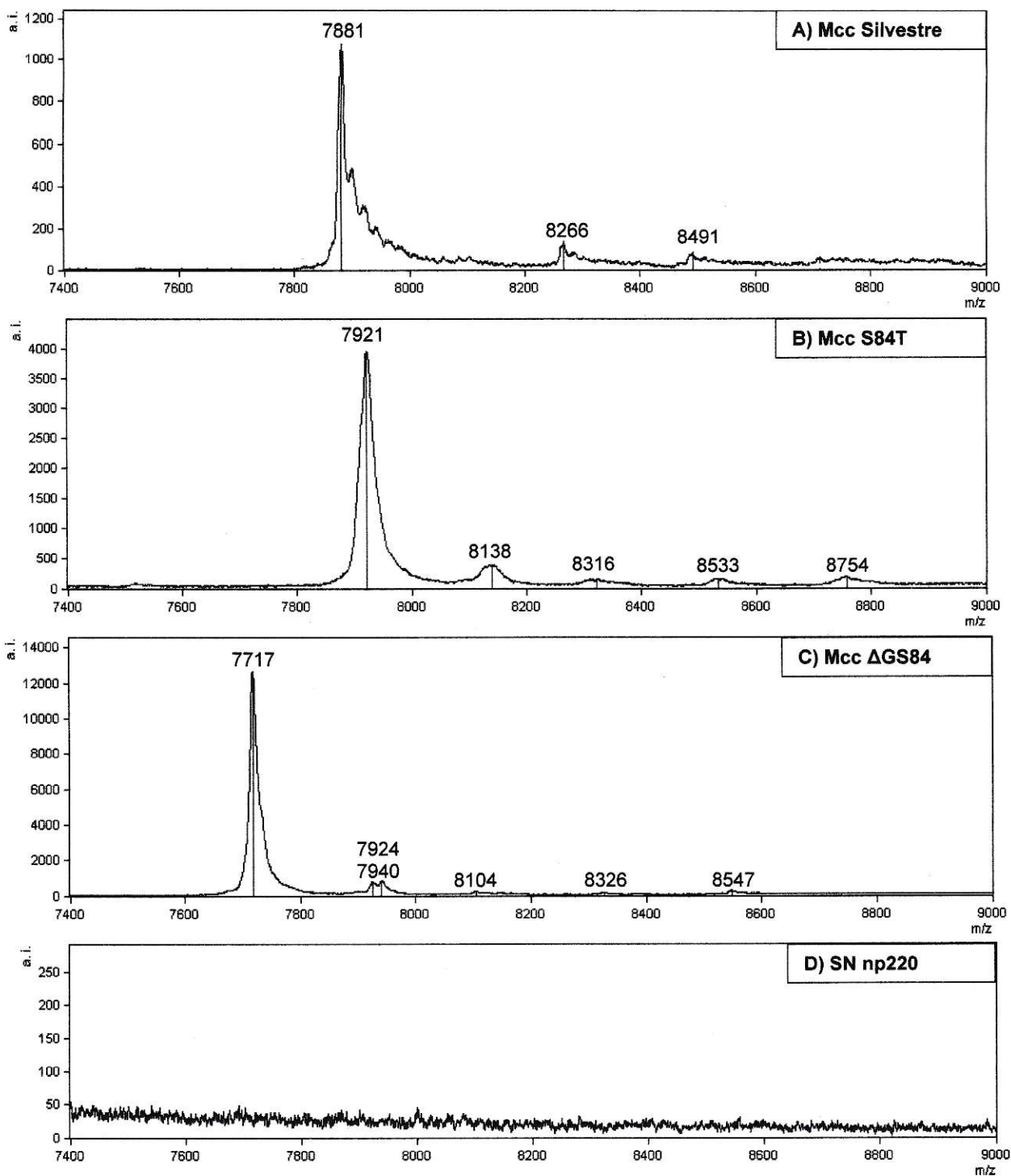
<sup>a</sup>Los porcentajes de viabilidad fueron calculados considerando como 100% el número de colonias obtenidas después de incubar con H<sub>2</sub>O. Los porcentajes son representativos de tres ensayos independientes. Los conteos de colonias y los porcentajes de sobrevida fueron obtenidos de un triplicado. Las células se crecieron hasta una DO<sub>600</sub> 0,3. La microcina se utilizó a una concentración inicial de 50  $\mu$ g/mL.

### **3.5. Análisis de las microcinas mutantes S84T y $\Delta$ GS84 mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).**

La espectrometría de masas es una técnica muy resolutiva y sensible que permite determinar las especies presentes en una muestra y sus masas moleculares con gran definición. Con el objetivo de demostrar si las microcinas mutantes S84T y  $\Delta$ GS84 se encuentran modificadas post-traduccionalmente, se analizaron muestras purificadas de cada una de estas microcinas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile).

Los espectros muestran que existe una mezcla de diferentes formas de microcina, predominando en gran proporción el ión de la forma no modificada (figura 8). En el espectro de masas de la microcina silvestre (figura 8A) se aprecia un pico de  $m/z$  7881 el cual correspondería a la forma no modificada. Además se aprecian dos picos a 8266 y 8491, las cuales corresponderían a formas modificadas post-traduccionalmente con una molécula de Glc-DHBS y Glc-DHBS<sub>2</sub> respectivamente. La diferencia de masa entre la forma no modificada y las modificadas se ajusta bien a lo esperado por la unión de Glc-DHBS y Glc-DHBS<sub>2</sub> (tabla 5).

El espectro de la microcina S84T (figura 8B) muestra un pico preponderante a 7921 el cual se aproxima al peso teórico calculado de la forma no modificada. Además se observan tres picos a 8316, 8533 y 8754, los cuales se aproximan al peso teórico de las formas modificadas por Glc-DHBS, Glc-DHBS<sub>2</sub> y Glc-DHBS<sub>3</sub> respectivamente. Se observa además un pico importante a 8138, cuya diferencia con la forma no modificada es 217. Este valor es muy cercano a la masa de DHBS, por lo que es



**Figura 8. Espectros de masa MALDI-TOF de las mutantes S84T y ΔGS84.**

**A)** Microcina Silvestre. **B)** Microcina S84T. **C)** Microcina ΔGS84. **D)** Sobrenadante purificado de la cepa np220. Se muestran los espectros de las muestras analizadas sobre la matriz ácido sinapínico (SA).

**Tabla 5. Masas obtenidas de las microcinas mutantes analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados.**

Microcina	mccE492	mccE492+Glc+DHBS	mccE492+Glc+DHBS <sub>2</sub>	mccE492+Glc+DHBS <sub>3</sub>
<b>Silvestre</b>	7881 (7887) <sup>a</sup>	8266 (8272) <sup>a</sup>	8491 (8495) <sup>a</sup>	-
	-6 <sup>b</sup>	-6 <sup>b</sup>	-4 <sup>b</sup>	-
	-	385 (385) <sup>c</sup>	225 (223) <sup>c</sup>	-
<b>S84T</b>	7921 (7901) <sup>a</sup>	8316 (8286) <sup>a</sup>	8533 (8509) <sup>a</sup>	8754 (8732) <sup>a</sup>
	20 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>
	-	395 (385) <sup>c</sup>	217 (223) <sup>c</sup>	221 (223) <sup>c</sup>
<b>ΔGS84</b>	7717 (7707) <sup>a</sup>	8104 (8092) <sup>a</sup>	8326 (8315) <sup>a</sup>	8547 (8538) <sup>a</sup>
	10 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>
	-	387 (385) <sup>c</sup>	222 (223) <sup>c</sup>	221 (223) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Los números en paréntesis corresponden al peso teórico calculado en base a la secuencia proteica de la mccE492 y adición con la respectiva modificación.

<sup>b</sup>Se muestra la diferencia entre la relación m/z obtenida experimentalmente y el peso calculado de forma teórica.

<sup>c</sup>Se muestra la diferencia entre la relación m/z de un pico y el inmediatamente anterior (de menor m/z) obtenidos experimentalmente. Entre paréntesis se muestra el valor del peso calculado teóricamente para esta diferencia.

probable que esta microcina mutante sea preferentemente modificada con una molécula de DHBS.

El análisis de la microcina  $\Delta$ GS84 (figura 8C) muestra un pico de una m/z de 7717 el cual correspondería a la forma no modificada. También se observan picos de bastante menor intensidad a 8104, 8326 y 8547, los cuales corresponderían a formas modificadas post-traduccionalmente con una molécula de Glc-DHBS, Glc-DHBS<sub>2</sub> y Glc-DHBS<sub>3</sub>, respectivamente. La diferencia entre los picos se aproxima a la adición consecutiva de moléculas de DBHS calculadas teóricamente (tabla 5). Además se observan dos picos sobrepuestos a 7924 y 7940, los cuales al igual que en la mutante S84T podrían corresponder a microcina modificada con DHBS, la de menor masa con un oxígeno menos.

El espectro del sobrenadante de la cepa np220 (figura 8D) no mostró ninguna señal en el rango analizado (5.000-21.000 m/z).

El resumen de los picos obtenidos y los pesos teóricos calculados para cada mutante se muestra en la tabla 5.

#### 4. DISCUSIÓN.

Las microcinas que sufren modificaciones post-traduccionales tienen codificadas en sus sistemas productores proteínas encargadas del proceso de maduración, el cual es crítico para la producción de microcina activa. En el caso de la microcina J25, se requieren los productos génicos *mcjB* y *mcjC* (que codifican para una denominada MccJ25 sintasa) para generar una estructura tipo lazo enroscado, en la cual se forman enlaces internamente entre los aminoácidos de la forma madura. Dicha estructura es muy estable y es la que presenta actividad bactericida (Clarke y Campopiano, 2007; Severinov y cols., 2007). La microcina B17 contiene anillos oxazol y tiazol, los cuales son sintetizados post-traduccionamente por la enzima McbBCD en reacciones subsecuentes de ciclización, deshidratación y deshidrogenación desde los dipéptidos Gly-Ser (oxazol) y Gly-Cys (tiazol) de la pro-MccB17 (Li y cols., 1996). Tales modificaciones se fusionan generando heteroanillos. La mutación puntual S49N en la microcina B17, lleva a una pérdida de actividad >99% (Yorgey y cols., 1994). Estos antecedentes indicarían que hay una relación muy fina entre el proceso de modificación post-traducciona l y la actividad bactericida.

El grupo de Thomas y cols. (2004) observó por primera vez la forma modificada de la *mccE492*, al emplear un medio de cultivo suplementado con bactotripton a. Este grupo postula que la modificación post-traducciona l aumenta la actividad bactericida de la forma modificada entre 2 y 8 veces en relación a la microcina no modificada, la cual también presentaría actividad bactericida. Sin embargo, los resultados de nuestro laboratorio son compatibles con la hipótesis de que la modificación post-traducciona l es la que otorga la actividad bactericida, pues al purificar microcina de una cepa mutante en el gen *mceC* o *mceI*, que codifican para un par de proteínas que participan en el



proceso de modificación post-traducciona, se produce microcina inactiva, la que al ser examinada mediante espectrometría de masas corresponde a microcina no modificada (7887 Da). Los resultados obtenidos en esta Memoria, demuestran que las mutantes S84T y  $\Delta$ GS84 presentan actividad bactericida. El análisis mediante espectrometría de masas muestra picos correspondientes a formas modificadas con una molécula de Glc-DHBS, Glc-DHBS<sub>2</sub> y Glc-DHBS<sub>3</sub>, lo cual también se presenta en la microcina silvestre. Además, se observa un pico que podría corresponder a microcina modificada con DHBS. Lo anterior respalda la evidencia que la modificación post-traducciona es esencial en la actividad bactericida, pese a que en todos los casos se encuentra en mucha menor abundancia la forma modificada respecto de la forma no modificada. Este estudio no intenta hacer un análisis cuantitativo de las formas de la mceE492, pues cabe la posibilidad de que la tasa de ionización de las formas modificadas sea inferior a la de la forma no modificada, por lo que la técnica de MALDI-TOF podría estar privilegiando una forma sobre otra. Alternativamente, no se puede descartar que el procedimiento de purificación enriquezca la preparación con la forma no modificada. Sin embargo, preparaciones a partir de cepas que sobreexpresan los genes de la maduración muestran un significativo aumento en la proporción de la forma modificada, y por el contrario, preparaciones a partir de cepas que sobreexpresan el gen estructural de la mceE492 presentan una proporción muy disminuida en la forma modificada. En su conjunto, estos resultados indican que los procedimientos empleados son apropiados para examinar cualitativamente la tendencia a producir la forma modificada *versus* la no modificada en diferentes condiciones experimentales.

El hecho que muestras de microcina que contienen cantidades muy bajas de la forma modificada, pero que presentan una buena actividad bactericida se puede explicar mediante dos hipótesis: i) un modelo tipo "semilla", en que la microcina

modificada post-traduccionalmente con una conformación activa induce un cambio conformacional de la microcina inactiva no modificada, haciéndola activa. Esto se sustenta en que es posible activar microcina inactiva purificada desde una mutante en *mceC* o *mceJ* utilizando una fracción de microcina activa, que tiene un componente de microcina modificada; ii) alternativamente, la microcina modificada actuaría como una especie de "llave", de manera que al interactuar con los receptores de sideróforos tipo catecol en la célula blanco, permita el paso de la forma no modificada, la cual podría formar poros en la membrana interna. Esto se sustenta en que para la actividad bactericida endógena son dispensables los 11 últimos aminoácidos de la *mccE492* (Bieler y cols., 2006), anulando el factor de la modificación post-traducciona a este nivel (formación del poro) y haciéndolo sólo necesario para el proceso de reconocimiento de la *mccE492* a nivel de los receptores de la célula blanco.

En el año 2007, Azpiroz y Laviña demostraron que la microcina H47 y la colicina V poseen estructuras modulares, con un módulo de captación en el carboxilo terminal y un módulo tóxico localizado en el amino terminal. Al fusionar cruzadamente los módulos de las dos microcinas, se demostró que tanto el reconocimiento por receptores específicos como su actividad tóxica resultan ser intercambiables. El dominio de captación de la microcina H47 estaría ubicado específicamente en los últimos 10 aminoácidos del C-terminal. Alineamientos de esta región muestran una gran identidad entre las microcinas H47, I47, M y E492 (figura 9), lo que sugiere que este dominio sería reconocido por los receptores de sideróforos de la misma forma para las microcinas H47, I47, M y E492, y que es muy probable que esto ocurra gracias a que se encuentran modificadas post-traduccionalmente mediante la unión covalente de una molécula del tipo salmoquelina (Nolan y cols., 2007). Un par de elementos

MccE492...	GSGSGYN	SATSSSGSGS
MccH47....	GSTVGSG	SASSSAGGGS
MccI47....	GPSYSMS	SSTSSANS GS
MccM.....	GSGRGTS	SASSSAGSGS

Dominio de captación

**Figura 9. Alineamiento de las regiones del carboxilo terminal de las microcinas M, H47, I47 y E492.**

En rojo se muestran los aminoácidos que son 100% conservados. El cuadro indica el posible dominio de captación establecido en la literatura.

conservados de este dominio son la glicina-83 y la serina-84 del carboxilo terminal de la mceE492. En esta Memoria se determinó que el cambio de la serina-84 por treonina y que la remoción de uno de los motivos glicina-serina no son esenciales para la actividad bactericida. Además se demostró que estas mutantes se modificaron post-traduccionalmente. Bieler y cols. en el año 2006, determinaron que una mutante carente de la serina-84, pierde la actividad bactericida. Lo anterior no es contradictorio con lo obtenido en esta Memoria, ya que aquí se postula que el último aminoácido debe ser serina o uno de características similares, a diferencia del trabajo de Bieler y cols. en el que se deja una glicina como último aminoácido el cual no sería sustrato para la modificación post-traducciona, y produciría una microcina no modificada inactiva. Este hallazgo sugiere que el posible dominio de captación requiere de la presencia de una serina como último aminoácido. Sin embargo, presentaría cierto grado de plasticidad, ya que al reemplazar la serina-84 por un aminoácido de similar naturaleza, tal como la treonina, o que se conserve uno de los dos motivos glicina-serina, el proceso de modificación post-traducciona se lleva a cabo, manteniéndose la actividad bactericida.

La mutante Q8H (García, 2008) de la mceE492 no presenta actividad bactericida. La coexpresión de Q8H con el sistema pJEM15 (hiperproductor de mceE492 activa), produce la pérdida de actividad. En esta Memoria se coexpresaron las mutantes S84T y  $\Delta$ GS84 con el sistema hiperproductor de microcina activa silvestre pJEM15 no obteniéndose diferencias en la actividad global en relación a la coexpresión con la construcción parental pAB. Esto indicaría que las microcinas mutantes no establecen una relación de competencia con la microcina silvestre ni por la maquinaria de modificación post-traducciona, ni por los receptores de la célula blanco (FepA, Fiu y Cir), de modo que actuarían como una microcina única, sin haber diferencias significativas entre las dos especies.

Una forma de cuantificar la actividad bactericida específica de una preparación de microcina es mediante el ensayo de viabilidad celular a partir de un cultivo líquido. En este trabajo se utilizó las microcinas mutantes S84T y  $\Delta$ GS84, obteniéndose una diferencia en la viabilidad entre los tratamientos con cada microcina, con una menor actividad bactericida (de alrededor de 100 veces, ver tabla 4) comparado con la microcina silvestre. Una probable causa es que la proporción de microcina modificada es bastante menor que la observada en la microcina silvestre, posiblemente porque el proceso de modificación post-traducciona l ocurre de forma menos eficiente. Esto resultaría en un menor reconocimiento por los receptores FepA, Fiu y Cir en la célula blanco, produciéndose una menor actividad bactericida en relación a la forma silvestre. Además se observa una mayor proporción de forma modificada en el espectro de la microcina S84T respecto de  $\Delta$ GS84, lo cual se asocia con una mayor actividad bactericida.

La unión covalente de una molécula de salmoquelina al C-terminal de la mceE492 para el posterior reconocimiento por los receptores de sideróforos tipo catecol en la célula blanco, ha sido descrita como una estrategia tipo “caballo de Troya”, en que la entrada de una molécula de mceE492 sería a través de receptores que la célula usa para funciones vitales, como es la captación de hierro (Fischbach y cols., 2006). En el artículo de Nolan y cols. (2007) se menciona que otros productos tóxicos naturales explotan el mismo tipo de estrategia de reconocimiento. Por ejemplo la albomicina, producida por *Streptomyces*, está compuesta de un antibiótico nucleósido unido a un sideróforo hidroxamato, y se une a porinas específicas para el elemento sideróforo, como lo hace la colicina. Bombas de captación de sideróforos también permiten la entrada a la célula a complejos macromoleculares más grandes, tales como el bacteriófago H8, y han sido consideradas como blanco para combatir infecciones de

*Pseudomonas*. Estas observaciones, en conjunto con la conservación de un posible dominio de captación entre las microcinas M, H47, I47 y E492, sugiere que hay estrategias que se han conservado en la evolución entre los microorganismos que han resultado ser de gran eficiencia y de amplio rango de acción. Por otra parte, en base a la estructura modular prevista para algunas microcinas, es posible generar nuevas versiones de moléculas antibióticas que tengan formas de reconocimiento y actividades combinadas provenientes de diferentes microcinas, lo cual ampliaría el espectro de acción de los antibióticos con el objetivo de combatir nuevos patógenos resistentes a múltiples drogas.

## 5. CONCLUSIONES.

- La serina-84 de la *mccE492* puede ser cambiada por treonina, un aminoácido de naturaleza similar, sin perder la capacidad bactericida ni la de ser modificada post-traduccionalmente.
- El último motivo GS del carboxilo terminal de la *mccE492* es dispensable para la modificación post-traducciona l y su actividad bactericida.
- Tanto la mutante S84T como la  $\Delta$ GS84 presentan una menor actividad bactericida que la *mccE492* silvestre, y se correlaciona con una disminución del grado de modificación post-traducciona l.

## 6. REFERENCIAS.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N. Y.
- Azpiroz, M.F. y Laviña, M. (2007) Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**:2412-2419.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la mceE492. Tesis Doctoral, Doctorado en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **23**:117-124.
- Bentley, R. (1990) The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**:307–384.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C. y Belin, D. (2006) Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.*, **188**:7049-7061.
- Braun, V., Patzer, S.I. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, **84**:365-380.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.*, **134**:1141-1156.
- Clarke, D.J. y Campopiano, D.J. (2007) Maturation of McjA precursor peptide into active microcin MccJ25. *Org. Biomol. Chem.*, **5**:2564-2566.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **84**:539-544.
- Crosa, J.H. y Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**:223-249.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, **139**:72-75.
- de Lorenzo, V. y Pugsley, A. P. (1985) Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**:666-669.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J. y Rebuffat, S. (2007) Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **24**:708-734.



- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C.T. (2005) In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 571-576.
- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C.T. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.*, **2**: 132-138.
- Flores, J. (2008) Memoria de título. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fotheringham, I.G., Dacey, S.A., Taylor, P.P., Smith, T.J., Hunter, M.G., Finlay, M.E., Primrose, S.B., Parker, D.M. y Edwards, R.M. (1986) The cloning and sequence analysis of the *aspC* and *tyrB* genes from *Escherichia coli* K12. Comparison of the primary structures of the aspartate aminotransferase and aromatic aminotransferase of *E. coli* with those of the pig aspartate aminotransferase isoenzymes. *Biochem. J.*, **234**:593-604.
- García, V. (2008) La agregación espontánea de la mutante Q8H de la microcina E492 anula la actividad bactericida y aumenta el efecto citotóxico en células tumorales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A. y Walsh, C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, **36**:8495-8503.
- Gehring, A.M., Mori, I. y Walsh, C.T. (1998) Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE and EntF. *Biochemistry*, **37**:2648-2659.
- Genser, K.F., Renner, G. y Schwab, H. (1998) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124. *J. Biotechnol.*, **64**:125-135.
- Guarente, L., y Beckwith, J. (1978) Mutant RNA Polymerase of *Escherichia coli* Terminates Transcription in Strains Making Defective Rho Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**: 294-297.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**:557-580.
- Hantke, K. (1990) Dihydroxybenzoylserine a siderophore for *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**:5-8.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. y Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**: 3677-3682.
- 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, C., 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.* En prensa.

Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. y Walsh, C.T. (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science*, **274**:1188-1193.

Mercado, G., Tello, M., Marín, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2008) The production *in vivo* of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.*, **190**:5464- 5471.

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.

O'Brien, I.G. y Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-*N*-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **215**:393-402.

O'Brien, I.G., Cox, G.B. y Gibson, F. (1971) Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **237**:537-549.

Patzer, S.I., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology*, **149**:2557-2570.

Pavlova, O.A. y Severinov, K.V. (2006). Posttranslationally modified microcins. *Russian Journal of Genetics*, **42**:1380–1389.

Pollack, J.R. y Neilands, J.B. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**:989-992.

Pugsley, A.P. y Reeves, P. (1977) The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**:903-911.

Pugsley, A.P., Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986) Microcin E492 insensitive mutants of *E. coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.*, **132**:3253-3259.

- Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschape, H., Reissbrodt, R. y Williams, P.H. (2003) Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.*, **71**:6953-6961.
- Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**:117-137.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sazuka, T. y Ohara, O. (1996) Sequence features surrounding the translation initiation sites assigned on the genome sequence of *Synechocystis* sp. strain PCC6803 by amino-terminal protein sequencing. *DNA Res.*, **3**:225-232.
- Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., Kazakov, T. y Gelfand, M.S. (2007) Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Mol. Microbiol.*, **65**:1380-1394. Erratum en: *Mol. Microbiol.*, **66**:277.
- 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.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Alfonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J-C. y Rebuffat, S. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.*, **279**:28233-28242.
- Wang, G., Nie, L. y Tan, H. (2003) Cloning and characterization of *sanO*, a gene involved in nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **37**:452-457.
- Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J. y Lagos, R. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **179**:4789- 4794.
- Yorgey, P., Lee, J., Kördel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D. y Kolter, R. (1994) Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**:4519-4523.

**ANEXO I**

**¿METIONINA-5 COMO CODÓN DE INICIO DE LA  
MICROCINA E492?**

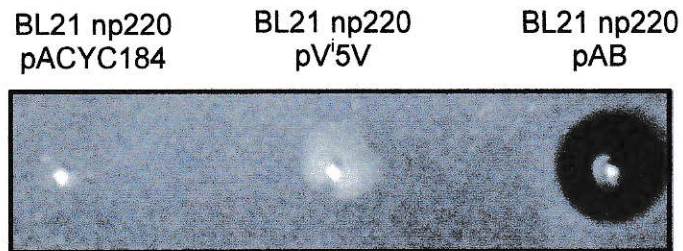
**MARIO LEIVA H.**

El gen estructural de la *mccE492* (*mceA*) codifica para una pre-proteína que es procesada al momento de su exportación en su extremo amino terminal produciéndose una proteína madura de 84 aminoácidos. No se ha dilucidado aún si la proteína precursora tiene 98 o 103 aminoácidos, pues hay dos metioninas (posiciones 1 y 5) que podrían corresponder al codón de inicio. Alineamientos de la secuencia de la *mccE492* con las secuencias de otras microcinas (H47, I47 y M) sugieren que el quinto codón (metionina-5) es el mejor candidato como codón de inicio.

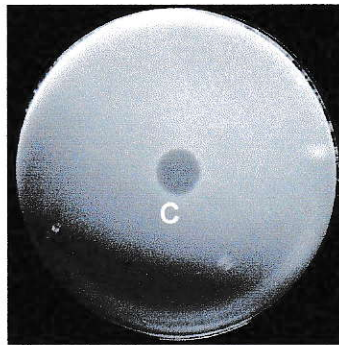
En el proceso de generación de la construcción pAB, ocurrió una mutación en el codón que codifica para la metionina-5 cambiando ATG (metionina) por GTG (valina). Al purificar desde una cepa portadora de pAB se obtiene *mccE492* activa, por lo que el cambio en el quinto codón no altera la producción de *mccE492*. Sin embargo, se ha determinado que el codón GTG de valina puede ser usado como codón de inicio (Fotheringham y cols., 1986; Sazuka y Ohara 1996; Genser y cols., 1998; Wang y cols., 2003). Por lo tanto, con esta construcción no es posible determinar cuál es el codón de inicio de la *mccE492*. En la colección del laboratorio, se disponía de una mutante obtenida mediante mutagénesis al azar con hidroxilamina del plasmidio pAB (García, 2008), denominada V<sup>5</sup>V. En esta mutante el quinto codón de la construcción pAB, GTG, cambió a GTA, el cual también codifica para valina, y que no tiene actividad bactericida. Por lo tanto, la caracterización de esta mutante nos podrá permitir determinar cuál es el codón de inicio de la *mccE492* ya que la explicación más probable para esta observación es que se inicia la traducción en el codón 5, ya sea metionina o valina, pero si el codón de inicio de valina es reemplazado por otro no hay traducción.

La carencia de actividad bactericida de V<sup>5</sup>V se estudió por complementación en el sistema np220 (figura 9A). En este ensayo, se aprecia que la mutante no produce

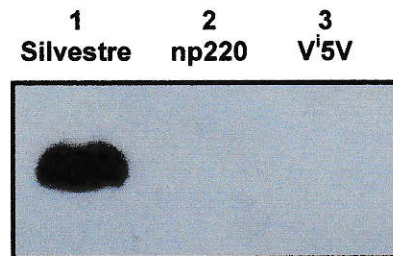
A



B



C



### Figura 10. Caracterización de la mutante V<sup>5V</sup>.

**A)** Ensayo de actividad bactericida de las colonias complementadas con la mutante V<sup>5V</sup>. Para evaluar la actividad bactericida, se usó un césped de la cepa sensible *E. coli* BL21. Las colonias fueron sembradas en triplicado. La figura es representativa de 3 ensayos independientes. **B)** Ensayo de actividad de la purificación de la mutante V<sup>5V</sup>. La actividad bactericida de la purificación fue determinada mediante el método de dilución crítica sobre un césped de la cepa sensible *E. coli* BL21 (En la figura, C: Control microcina silvestre). **C)** Western blot de la purificación de la mutante V<sup>5V</sup>. La purificación se realizó como se indica en Métodos, y las muestras obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas mediante electroquimioluminiscencia.

halo de inhibición del crecimiento, al igual que en el control transformado con el vector pACYC184. Por el contrario, se observó actividad en la colonia complementada con la construcción parental (pAB).

A continuación, se purificó el sobrenadante de BL21 np220 V<sup>i</sup>5V mediante columna Sep-Pack C-18 de fase reversa, para determinar si se produce microcina. Como se esperaba, la purificación no presentó actividad bactericida (figura 9B) y mediante Western blot no se detectó presencia de mceE492 (figura 9C). Todo esto indica que la cepa complementada con pV<sup>i</sup>5V no exporta microcina al espacio extracelular.

Estos resultados sugieren fuertemente que la mceE492 usa la metionina-5 para la iniciación de la traducción, sin embargo falta completar estos estudios, verificando que no se produce microcina intracelularmente, y que la remoción o reemplazo de la primera metionina es irrelevante en la producción de microcina activa.