

UCH-FC  
Doc-Microbiología  
M553  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIÓN DE LA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE  
LA MICROCINA E492 CON LA VÍA DE SÍNTESIS DE LA  
ENTEROQUELINA.  
EFECTO DE LA MODIFICACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA Y LA FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES.**

Tesis

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

Por

**María Gabriela Mercado Guerra**

Octubre de 2009

Director de tesis: Dra. Rosalba Lagos

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

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

**María Gabriela Mercado Guerra**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28, de Septiembre de 2009.

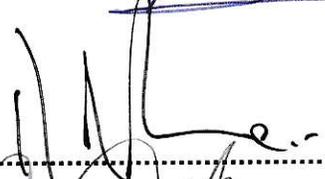
**Director de Tesis:**

**Dra. Rosalba Lagos Mónaco**

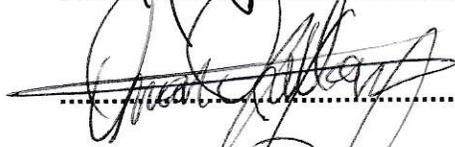
  
.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

**Dr. Romilio Espejo**

  
.....

**Dr. Omar Orellana**

  
.....

**Dr. Eugenio Spencer**

  
.....

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 a través de subsidios otorgados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico: Proyecto FONDECYT Regular 1061128 y Programa Nacional de Becas de Postgrado 21050723.

Parte del trabajo de esta tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. J.M. 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, mediante subsidios otorgados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyecto FONDECYT de Incentivo a la Cooperación Internacional 7070139), y mediante becas de estadías financiadas por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile – Departamento de Postgrado y Postítulo (Becas de Estadías Cortas de Investigación Destinadas a Estudiantes Tesistas de Doctorado y Magister de la Universidad de Chile) y por el Banco Internacional de Reconstrucción y Fomento a través de su programa de Financiamiento de la Educación Terciaria en Base a Resultados MECESUP2 (Mejoramiento del Programa Conjunto de Doctorado en Microbiología de la Universidad de Chile y la Universidad de Santiago de Chile: generación de capital humano avanzado y su proyección internacional UCH 0604), adjudicadas los años 2007 y 2008 respectivamente.





**"Las leyes de san Bernardino:**

*La primera es la que podríamos llamar del **afecto**. Uno entra al saber a través del amor. Quien no ama el saber al que aspira, quien no siente nada hacia sus maestros ni hacia los grandes maestros de todos los tiempos no tiene nada que hacer.*

*La segunda regla es **saber pasar**. Es como la preparación de un atleta: si no se abstiene de una serie de cosas no llegara a ninguna parte. Hay que saber pasar, si es posible con elegancia, de compañías, diversiones y caprichos.*

*La tercera es la **necesaria paz**. Nuestra alma es como el agua de un estanque. Para ver las profundidades, ha de estar tranquila.*

*La cuarta es el **orden en todo**. Una hora para descansar, es mejor que descansar a cualquier hora. Un poco de ejercicio y de ocio y ninguna de las dos cosas en exceso. No abrumarse con las cosas, sino que abordarlas una tras otra. Con profundidad y sin olvidar ningún detalle.*

*La quinta es la **perseverancia** Más que un gran talento es imprescindible la voluntad y la tenacidad.*

*La sexta regla es la **discreción**. No pretender resultados de un día para otro, no empezar demasiadas cosas a la vez y no desanimarse si no se llega a ser el primero. Hemos de conocer nuestra medida y aceptarla con naturalidad.*

*La séptima y última regla es la del **deleite**. Algo que no se compra ni se vende, y que con frecuencia hay que saber esperar. La regla presupone que el hombre siente un natural deleite o placer en la investigación y el estudio. Se trata del íntimo placer que conlleva tomar conciencia de nuestra propia racionalidad. Como pez en el agua, como ave planeando majestuosamente en el cielo."*

**Ramón Parés**

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia y amigos, sobretodo a mis padres Anita y Lautaro por su incondicional apoyo y cariño.

De manera especial quisiera agradecer a Mario Tello y Leonardo Sepúlveda, por la invaluable contribución que significaron tanto para este trabajo como para mi formación sus conocimientos y su desinteresado trabajo.

A toda la gente que trabaja en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Universidad de Chile, especialmente a la Dra. Rosalba Lagos y al Dr. Octavio Monasterio, por haberme recibido en su laboratorio, por su constante guía y confianza en mi trabajo.

A Roselyn Orellana, Rodrigo Gallardo y Felipe Montecinos por su asistencia técnica y su ayuda en la discusión y realización de los experimentos durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José María Valpuesta, y a las personas que trabajan en su laboratorio en Centro Nacional de Biotecnología de España, por su cariñosa hospitalidad, particularmente a José Martín-Benito y a Rocío Arranz por su colaboración, bajo la supervisión del Dr. Valpuesta, en los estudios de microscopía electrónica.

## TABLA DE CONTENIDOS.

	Página
<b>TABLA DE CONTENIDOS.</b>	vi
<b>LISTA DE TABLAS.</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS.</b>	xi
<b>ABREVIATURAS.</b>	xiv
<b>RESUMEN.</b>	xvi
<b>ABSTRACT.</b>	xx
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. Sideróforos de tipo catecol: péptidos de síntesis no-ribosomal.	1
1.2. Bacteriocinas: péptidos de síntesis ribosomal.	7
1.3. La producción de MccE492 modificada conjuga la unión a través de un puente de glucosa de moléculas peptídicas obtenidas a través de síntesis ribosomal y no-ribosomal.	8
1.4. Efecto de la modificación post-traducciona l de la MccE492 sobre la actividad antibacteriana.	14
1.5. Objetivos.	16
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>17</b>
2.1. Materiales.	17
2.1.1. Reactivos.	17
2.1.2. Cepas bacterianas y plasmidios.	19
2.1.3. Partidores.	22
2.2. Métodos.	23
2.2.1. Medios de cultivo.	23
2.2.2. Técnicas de biología molecular.	24
2.2.3. Generación de construcciones plasmidiales.	24
2.2.4. Mutagénesis puntual.	24
2.2.5. Purificación de MccE492 en columnas Sep-Pak C8.	25

	Página
2.2.6. Purificación de MccE492 en columnas Sep-Pak C18.	25
2.2.7. Purificación preparativa de MccE492.	26
2.2.8. Determinación de la concentración de muestras de MccE492 purificada.	26
2.2.9. Espectrometría de masas (MALDI-TOF).	26
2.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).	27
2.2.11. Hibridación western.	27
2.2.11.1. Electrotransferencia.	27
2.2.11.2. Desarrollo inmunológico.	28
2.2.12. Detección de la producción de sideróforos.	28
2.2.13. Detección de la actividad bactericida.	29
2.2.14. Cuantificación de la actividad bactericida o determinación del título.	29
2.2.15. Transcomplementación con DHB, salmoquelina u otro cultivo.	29
2.2.16. Producción de fibras de tipo amiloide.	30
2.2.17. Medición de la formación de fibras de tipo amiloide mediante la unión de rojo Congo (RC).	30
2.2.18. Producción de semillas de fibras de tipo amiloide.	31
2.2.19. Dicroísmo circular (DC).	31
2.2.20. Microscopía electrónica (ME).	32
2.2.21. Medición de fibras de tipo amiloide.	32
2.2.22. Procesamiento bi-dimensional de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica.	33
2.2.23. Modelamiento por homología.	33
2.2.23.1. Análisis de mutaciones correlacionadas.	37
2.2.24. Predicción de zonas de interacción proteína-proteína.	39

	Página
<b>3. RESULTADOS.</b>	<b>45</b>
3.1. Relación entre la producción de MccE492 activa y la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol.	45
3.1.1. Mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina producen MccE492 inactiva.	46
3.1.2. Los derivados glucosilados de enteroquelina utilizan principalmente el receptor Fiu para ingresar a células de <i>E. coli</i> .	50
3.1.3. La producción de MccE492 activa requiere de la sintetasa EntF.	51
3.2. Construcción de un modelo molecular de la sintetasa de péptidos no-ribosomal EntF de <i>E. coli</i> .	55
3.3. La producción de MccE492 activa requiere solo del dominio de adenilación de la sintetasa EntF.	63
3.4. Predicción de residuos catalíticos y zonas de interacción proteína-proteína en el dominio de adenilación de EntF.	65
3.5. La actividad catalítica del dominio de adenilación de EntF no es necesaria en la maduración de la MccE492.	71
3.6. La proporción de MccE492 modificada post-traduccionalmente aumenta conforme aumenta la expresión de los genes de la maduración.	73
3.7. La capacidad de formar fibras amiloides es inversamente proporcional a la cantidad de MccE492 modificada y a la actividad bactericida.	75
3.8. Las semillas provenientes de MccE492 no-modificada actúan como centros nucleadores más eficientes que las provenientes de su contraparte modificada.	77
3.9. Las fibras amiloide producidas por preparaciones de MccE492 con diferentes grados de modificación post-traduccionales poseen formas y dimensiones similares.	79
3.10. Caracterización por microscopía electrónica de diferentes tipos de fibras amiloides producidas por la MccE492.	82
3.10.1. Obtención de promedios bi-dimensionales de las fibras amiloides de MccE492.	84
3.11. Caracterización del proceso de formación del amiloide de MccE492.	86
3.11.1. La MccE492 aumenta el contenido de estructura secundaria beta durante el proceso de agregación.	89

	Página
3.11.2. Visualización de los primeros estadios de agregación de la MccE492 mediante microscopía electrónica.	89
3.11.3. Generación de promedios bi-dimensionales de las estructuras observadas en los primeros estadios de la agregación de la MccE492.	92
<b>4. DISCUSIÓN.</b>	<b>98</b>
4.1. El proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492 <i>in vivo</i> y su efecto en la actividad bactericida.	98
4.2. Efecto de la modificación post-traducciona l en la conformación de la MccE492.	108
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	<b>118</b>
<b>6. REFERENCIAS.</b>	<b>120</b>

## LISTA DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Genotipos/Fenotipos de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	20
Tabla 2. Características relevantes de los plasmidios utilizados en este trabajo.	21
Tabla 3. Secuencias de los partidores utilizados en este trabajo.	22
Tabla 4. Dominios de EntF con sus respectivos homólogos estructurales encontrados mediante el servidor de <i>threading</i> Phyre.	35
Tabla 5. Programas utilizados para realizar los alineamientos múltiples.	36
Tabla 6. Programas utilizados para la predicción de zonas de interacción proteína-proteína en el dominio de adenilación de EntF.	42
Tabla 7. Residuos del dominio de adenilación de EntF predichos por cada método que formarían parte de una interfase de interacción proteína-proteína.	43
Tabla 8. Consenso de los datos de predicción por conservación de secuencia y propensión a la formación de interfases en el dominio de adenilación de EntF.	44

## LISTA DE FIGURAS.

		Página
Figura 1.	Vía de síntesis no-ribosomal de enteroquelina.	4
Figura 2.	Sideróforos de tipo catecol: la enteroquelina y sus derivados glucosilados o salmoquelinas.	6
Figura 3.	Comparación de los sistemas codificados en el cromosoma de las microcinas E492, H47 I47 y M.	9
Figura 4.	Espectro MALDI-TOF-MS de una muestra de MccE492 modificada post-traduccionalmente.	13
Figura 5.	Esquema del protocolo utilizado en el modelamiento de la sintetasa de péptidos no-ribosomal EntF de <i>E. coli</i> .	34
Figura 6.	Esquema de la confección manual de un alineamiento consenso a partir de cuatro metodologías de alineamiento múltiple.	37
Figura 7.	Esquema del protocolo utilizado en la predicción de zonas de interacción proteína-proteína en la superficie del dominio de adenilación de EntF.	41
Figura 8.	Resumen de la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol.	47
Figura 9.	Producción de MccE492 inactiva en cepas mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina.	48
Figura 10.	Espectros MALDI-TOF-MS de MccE492 purificada desde cepas mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina.	49
Figura 11.	Transcomplementación con MGE y DGE de cepas de <i>E. coli</i> mutantes en receptores para sideróforos de tipo catecol.	52
Figura 12.	Recuperación de la actividad bactericida en cepas deficientes en la vía de síntesis de enteroquelina mediante transcomplementación y complementación.	54
Figura 13.	Esquema de la secuencia de EntF, sus dominios y homólogos estructurales.	58
Figura 14.	Modelos obtenidos para cada uno de los dominios de EntF.	59
Figura 15.	Representación gráfica de los resultados obtenidos del análisis de mutaciones correlacionadas.	61
Figura 16.	Modelo molecular de la sintetasa EntF de <i>E. coli</i> .	62
Figura 17.	La producción de MccE492 activa requiere del dominio de adenilación de EntF.	64
Figura 18.	Alineamiento entre el dominio de adenilación de EntF y seis de sus homólogos de estructura conocida.	67
Figura 19.	El dominio de adenilación de EntF presenta tres zonas de interacción.	69

	Página
Figura 20. Residuos dentro del dominio de adenilación de EntF que son posibles blancos de mutagénesis sitio-dirigida.	70
Figura 21. Efecto de la mutagénesis puntual E750 en el dominio de adenilación de EntF.	72
Figura 22. Efecto de la sobre-expresión de los genes de la maduración y del gen estructural sobre la proporción de MccE492 modificada post-traduccionalmente.	74
Figura 23. Efecto de la modificación post-traducciona en la formación de amiloides y en la actividad bactericida de la MccE492.	76
Figura 24. Patrón de agregación de la MccE492 modificada y no-modificada y efecto de semillas preparadas de estas muestras sobre la cinética de agregación.	78
Figura 25. Micrografías electrónicas de fibras amiloides de MccE492 con diferentes proporciones de modificación post-traducciona.	80
Figura 26. Dimensiones de las fibras helicoidales producidas por la MccE492 aislada desde diferentes cepas.	81
Figura 27. Micrografías electrónicas de distintos tipos de fibras amiloides producidas por la MccE492.	83
Figura 28. Obtención de promedios bi-dimensionales de fibras helicoidales de amiloides de MccE492.	85
Figura 29. Obtención de promedios bi-dimensionales de fibras planas de amiloides de MccE492.	87
Figura 30. Cinética de agregación de la MccE492 no-modificada.	88
Figura 31. Espectros de dicroísmo circular de la MccE492 a diferentes tiempos de agregación.	90
Figura 32. Micrografías electrónicas de los primeros estados de agregación de la MccE492.	91
Figura 33. Promedios bi-dimensionales de las estructuras observadas en los primeros estadios de la agregación de la MccE492.	93
Figura 34. Re-alineamiento de las estructuras precursoras generadas a partir de los primeros alineamientos bi-dimensionales.	94
Figura 35. Imagen de promedio bi-dimensional de un hexámero de MccE492.	96
Figura 36. La MccE492 modificada es una molécula que conjuga dos capas independientes del metabolismo secundario.	107

		Página
Figura 37.	Esquema del mecanismo de agregación en fibras de tipo amiloide de la MccE492.	113
Figura 38.	Formación de fibras de amiloides a partir de la mutante puntual MccE492 Q8H.	116

## ABREVIATURAS.

3D	Tridimensional
A	Dominio de adenilación
aa	amino ácidos
ABC	<b>ATP-Binding Cassette</b>
A	Absorbancia
ACP	<b>Acyl Carrier Protein</b> (proteína portadora de acilos)
AMP	Adenosín monofosfato
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
C	Dominio de condensación
CAS	cromoazurol-S
CHCA	ácido $\alpha$ -ciano-4-hidróxicíámico
Cit	Citrato
Cm	Cloranfenicol
CTF	<b>Contrast Transfer Function</b> (función de transferencia de contraste)
Da	Dalton
DGE	Enteroquelina di-glucosilada
DHB	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico
DHBS	<i>N</i> -(2,3-dihidroxibenzoil)-L-serina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
Glc	Glucosa
HDTMA	Bromuro de hexadeciltrimetiamonio
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ID	Identidad
IPTG	Isopropil-tio- $\beta$ D-galactopiranosido
Kan	Kanamicina
kpb	Kilo pares de bases
LB	Caldo Luria
MALDI	Desorción/Ionización Asistida por Matriz
MccE492	Microcina E492
ME	Microscopía electrónica
MGE	Enteroquelina mono-glucosilada
MS	Espectrometría de masas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCP	<b>Peptidil Carrier Protein</b> (proteína portadora de péptidos)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
Phyre	<b>Protein Homology/analogy Recognition Engine</b>
RC	Rojo Congo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Ser	Serina
Sm	Estreptomina
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Dominio tioesterasa
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamino

Tet	Tetraciclina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Time of Flight (tiempo de vuelo)
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta
β-MeOH	β-mercapto etanol

## RESUMEN.

La microcina E492 es un péptido antibiótico de bajo peso molecular producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Hasta el momento se han descrito dos actividades para la microcina E492, una actividad bactericida mediante la formación de poros en la membrana interna de las cepas sensibles y una actividad citotóxica sobre algunas líneas celulares cancerosas. La microcina E492 puede sufrir un proceso de modificación post-traducciona, que consiste en la adición en su carboxilo terminal de una molécula de salmoquelina, un sideróforo de tipo catecol correspondiente a derivados glucosilados de enteroquelina. En este proceso de modificación post-traducciona participan los productos de los genes de la maduración del sistema productor de microcina E492, los cuales *in vitro* son capaces de glucosilar enteroquelina y unirla covalentemente a la serina 84 del péptido. El máximo de la actividad antibacteriana de la microcina E492 ocurre en fase exponencial de crecimiento y se correlaciona con el máximo en la expresión de los genes de la maduración, mientras que en fase estacionaria de crecimiento se observa la desaparición de la actividad antibacteriana acompañada por la agregación de la microcina E492 en fibras de tipo amiloide. Los agregados de tipo amiloide de la microcina E492 presentan una mayor actividad antitumoral.

En este trabajo se estudiaron: i) los requerimientos de la cepa productora para la modificación post-traducciona de la microcina E492 *in vivo*; y además se determinó como esta modificación post-traducciona afecta ii) la actividad antibacteriana iii) y la capacidad de esta microcina de agregar formando fibras de tipo amiloide.

Se determinó: i) que para el proceso de modificación post-traducciona de la microcina E492 *in vivo* se requiere de la vía de síntesis de enteroquelina; y que mientras mayor es la proporción de péptido modificado post-traduccionalmente ii)

mayor es su actividad antibacteriana y iii) menor es su capacidad de agregar en fibras de tipo amiloide.

La vía de síntesis de enteroquelina se encuentra codificada en enterobacterias en el locus *ent*. Cepas mutantes en los genes *entC* y *entF*, defectuosas en la vía de síntesis de enteroquelina, producen microcina E492 no-modificada y sin actividad bactericida, pues se requiere a la enteroquelina como precursor para la modificación. Derivados mono y diglucosilados de enteroquelina (salmoquelinas), producidos por enterobacterias patógenas, son capaces de ingresar a células de *E. coli* no-patógenas principalmente a través del receptor de membrana externa para sideróforos de tipo catecol Fiu y en menor medida mediante FepA y Cir. Si esto ocurre en una célula productora de microcina, estas moléculas pueden ser utilizadas como sustratos para la modificación post-traducciona. Así, el derivado diglucosilado de enteroquelina y el sustrato ácido 2,3-dihidroxibenzoico fueron utilizados para trascomplementar cepas deficientes en la vía de síntesis de enteroquelina y producir microcina activa desde las mutantes *entC*<sup>-</sup> y *entB*<sup>-</sup> respectivamente. En contraste, no fue posible transcomplementar diversas cepas mutantes en *entF* (*entF*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *entF* y  $\Delta$ *entDF*). EntF es la sintetasa de péptidos no-ribosomal que con sus cuatro dominios modulares participa en la síntesis de enteroquelina. Este resultado indica que EntF sería necesaria para la producción de microcina activa en un proceso independiente de la síntesis de enteroquelina. Mediante la complementación con distintas combinaciones de los dominios modulares de EntF, fue posible determinar que para la función dual de EntF en la producción de microcina activa se requiere solo de su dominio de adenilación. Una mutante puntual E750A en el dominio de adenilación de EntF elimina su capacidad de producir enteroquelina, pero al ser transcomplementada con enteroquelina diglucosilada es capaz de producir microcina activa, por lo que se

deduce que la participación del dominio de adenilación de EntF en la producción de microcina activa es independiente de su actividad catalítica. Una posible explicación para este papel dual del dominio de adenilación de EntF en el proceso de modificación post-traducciona de la microcina E492, es que actúe como una proteína de andamiaje para las proteínas de la maduración propias del sistema productor de microcina E492. Hipótesis que se apoya en la evidencia derivada del modelo molecular de EntF que predice que sus dominios interactúan de forma dinámica y que el dominio de adenilación presenta un putativo parche de interacción proteína-proteína no atribuible a la interacción con los otros dominios de la sintetasa.

Los niveles de modificación post-traducciona que presenta una muestra de microcina dependen del nivel de expresión de los genes de la maduración. Una cepa portadora del sistema productor de microcina (pJEM15) posee una proporción de 1:0,7 de péptido no-modificado *versus* modificado. Esta proporción disminuye a 1:0,5 cuando esta cepa sobre-expresa el gen estructural de la microcina (pT7-AB) y aumenta a 1:1,5 y 1:1,1 cuando sobre-expresa los genes de la maduración pT7-IJ y pT7-C respectivamente. Mutantes en los genes de la maduración *mceC*<sup>-</sup> y *mceI*<sup>-</sup> no producen microcina modificada. Estas diferencias en la proporción de microcina modificada se traducen en diferencias en la actividad específica de las diferentes muestras y en la capacidad de éstas de agregar en fibras de tipo amiloide. La microcina con una mayor proporción de forma modificada presenta una mayor actividad bactericida y una menor tendencia a formar fibras de tipo amiloide. Sin embargo, las fibras producidas por microcina con diferentes grados de modificación post-traducciona poseen formas y dimensiones similares, con una morfología típica de este tipo de fibras, que corresponden a filamentos polimórficos largos y no-ramificados. Dentro de este polimorfismo es posible distinguir en todas las preparaciones filamentos helicoidales y

filamentos no-helicoidales simples y dobles. Mediante la obtención de promedios bidimensionales calculados a partir de la reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica se determinaron las dimensiones de las fibras helicoidales, que presentan 50 nm de paso y 14 nm de ancho; y de las fibras planas simples que tienen 7 nm de ancho, en tanto que las dobles 14 nm de ancho. Al preparar muestras para microscopía electrónica en los primeros estadios de la agregación de la microcina E492 se observaron filamentos rectos de 7 nm de ancho y estructuras anulares de 7 nm de diámetro que corresponderían a precursores de la agregación. Estas estructuras anulares compatibles con pentámeros y hexámeros de microcina E492 resultan indistinguibles de aquellas denominadas poros amiloides y que son consideradas altamente tóxicas.

## ABSTRACT.

Microcin E492 is a low-molecular weight antibiotic peptide produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Until now have been described two activities for microcin E492, antibacterial activity through the formation of pores in the inner membrane of sensitive cells and a cytotoxic activity against some cancerous cell lines. Microcin E492 can undergo a post-translational modification process, which consists of the addition of a salmocheline molecule, a catecholate siderophore corresponding to enterocheline glucosylated derivatives, to its carboxyl terminal. The products of maturation genes from the microcin E492 producing system, which *in vitro* are capable of glucosylating enterocheline and covalently attaching it to the peptide's serine 84, participate in this process. The maximum antibacterial activity and the expression of maturation genes are correlated, and both take place during the exponential phase of growth, meanwhile in stationary phase of growth we found a disappearance of antibacterial activity accompanied by the assembly of microcin E492 amyloid-like fibrils. Amyloid aggregates of microcin E492 have higher antitumor activity.

This thesis studied: i) the producing strain's requirements for the *in vivo* post-translational modification of microcin E492 and also determined how this modification affects iii) the antibacterial activity of the peptide and iii) its capacity to aggregate by forming amyloid-like fibrils.

Was determined that: i) the process of post-translational modification of microcin E492 *in vivo* requires the enterochelin synthesis pathway and that the greater the proportion of post-translational modified peptide ii) higher is the antibacterial activity and iii) less able is this microcin to aggregate into amyloid-like fibers.

The enterochelin synthesis pathway is encoded in the locus *ent* in enteric bacteria. Mutant strains in the *entC* and *entF* genes, defective in the enterocheline

synthesis pathway, produce non-modified and inactive microcin E492, thus it requires enterocheline as a precursor for modification. Mono and diglucosylate enterocheline derivatives (salmocheline) are capable of entering non-pathogenic *E. coli* cells, principally through the external membrane receptor for catecholate siderophores Fiu, and in lesser part through FepA and Cir. If this occurs in a microcin-producing cell, these molecules can be utilized as substrates for post-translational modification. Thus, the enterocheline diglucosylate derivative and the 2,3-dihydroxybenzoic acid were used to transcomplement mutant strains in enterocheline synthesis pathway and produce active microcin from *entC*<sup>-</sup> and *entB*<sup>-</sup> mutants, respectively. In contrast, it was not possible to transcomplement various mutant strains in *entF* (*entF*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *entF* and  $\Delta$ *entDF*). EntF is the non-ribosomal peptides synthetase with four modular domains involved in the synthesis of enterochelin. This result indicates that EntF is necessary for the production of active microcin in a process that is independent of enterocheline synthesis. Through complementation with different combinations of EntF modular domains, it was possible to determine that the only necessary domain was the adenilation domain for the dual function of EntF in active microcin production. The punctual mutant E750A in the adenilation domain eliminates the enterocheline production capacity, but after being transcomplemented with diglucosylate enterocheline, it is capable of producing active microcin. Therefore, the catalytic activity of this domain is not involved in the synthesis of active microcin. One possible explanation for this dual role of Entf adenilation domain in the microcin E492 post-translational modification process would be that it acts as a scaffolding protein for the maturation proteins of the microcin E492 producing system. Hypothesis supported by the evidence from the molecular model of EntF which predicts that its domains interact

in a dynamic way and a patch of protein-protein interaction in the adenilation domain not attributable to the interaction with the other domains of the synthetase.

The levels of post-translational modification that present a sample of microcin depend on the level of expression of the maturation genes. A strain carrying the microcin-producing system (pJEM15) has a 1:0.7 ratio of non-modified to modified peptides. This ratio decreases to 1:0.5 when this strain over-expresses the microcin structural gene (pT7-AB) and increases to 1:1.5 and 1:1.1 respectively when the maturation genes pT7-IJ and pT7-C are over-expressed. Mutants in the maturation genes *mceC* and *mceI* do not produce modified microcin. These differences in the proportion of modified microcin translate into differences in the activity level of the different samples and their capacity to aggregate into amyloid-like fibrils. The microcin with the highest proportion of modified forms presents higher antibacterial activity and a lesser tendency to form amyloid-like fibrils. Nevertheless, the fibers produced by microcin with different grades of post-translational modification have similar forms and dimensions, with a typical morphology of these types of fibers, which correspond to long polymorphic and unbranched filaments. Within this polymorphism it is possible to distinguish in all of the preparations helical filaments and simple and double non-helical filaments. The dimensions of these filaments were obtained through bi-dimensional averages calculated from the reconstruction of electron microscopic images. The helical fibers are 50 nm in pitch and 14 nm in width; the simple flat fibers are 7 nm in width and the double flat fibers are 14 nm in width. Preparing samples for electron microscopy in the early stages of microcin E492 aggregation were observed straight filaments 7 nm in width and annular structures 7 nm in diameter that correspond to precursors of aggregation. These annular structures consistent with pentamers and hexamers of

microcin E492 are indistinguishable from those called amyloid pores and considered highly toxic.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las enterobacterias producen un arsenal de moléculas, algunas de ellas de naturaleza péptidica, para erradicar a sus competidores y sobrevivir en el ambiente hostil del hospedero. Dentro de estos péptidos con actividad biológica podemos encontrar, entre otros ejemplos, antibióticos y sideróforos quelantes de hierro. Muchos de estos productos del metabolismo secundario son producidos por vías de síntesis no-ribosomal, mientras otros son producidos por la vía ribosomal.

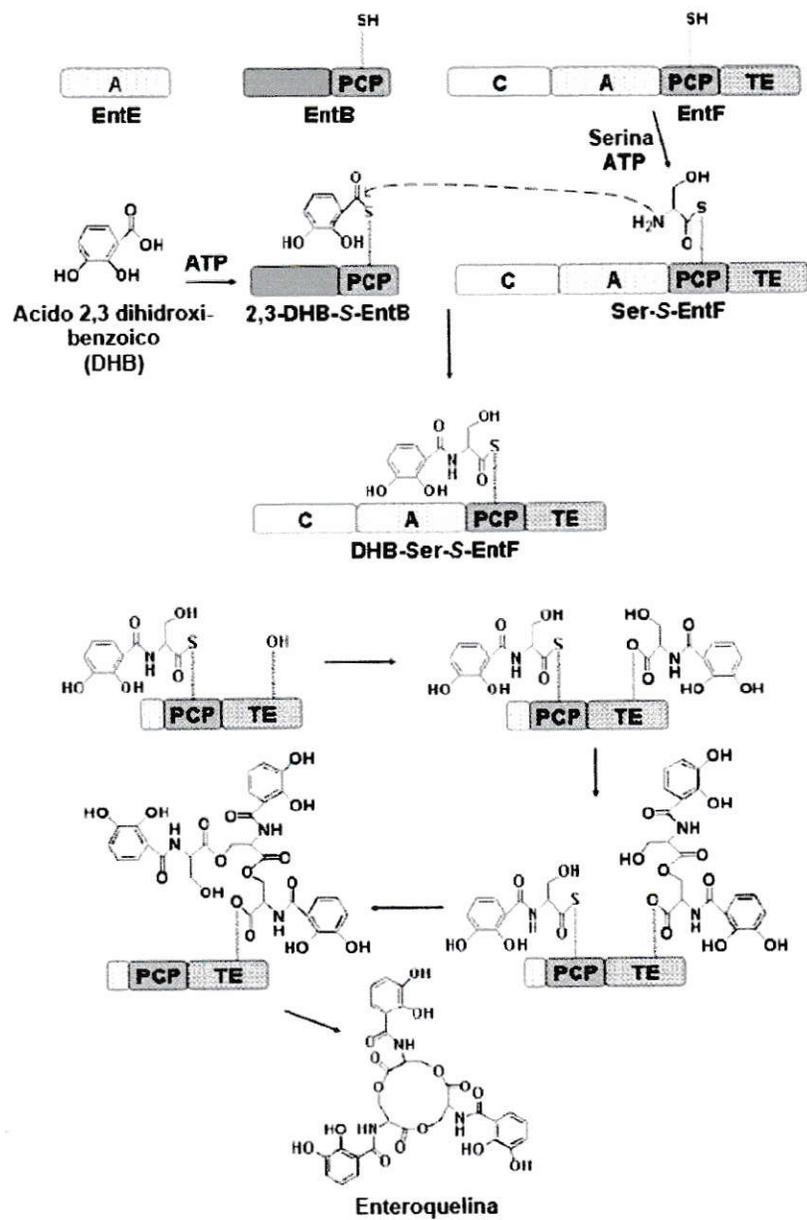
### 1.1. Sideróforos de tipo catecol: péptidos de síntesis no-ribosomal.

El hierro es un nutriente esencial para los organismos vivos, cuya adquisición representa un problema debido a su baja solubilidad en agua (revisado en Ratledge, 2007), por lo que en los fluidos de vertebrados se le encuentra en su mayoría unido a transferrina, lactoferrina y hemoglobina. Debido a esto, se vuelve clave para la supervivencia de los microorganismos que viven dentro de estos animales la capacidad de secuestrar el hierro acomplejado por las proteínas del hospedero. Las enterobacterias han desarrollado mecanismos agresivos para la adquisición de hierro, dentro de los cuales se encuentra ampliamente distribuido el uso de sideróforos o moléculas quelantes de hierro de alta afinidad (Neilands, 1995). En enterobacterias la enteroquelina o enterobactina es el sideróforo más común (revisado en Grass, 2006). A pesar de ser producida por un gran número de enterobacterias, este quelante de hierro no resulta muy efectivo en promover el crecimiento bacteriano dentro de su hospedero, ya que esta molécula es reconocida y unida por la siderocalina o lipocalina-2, una proteína del plasma que forma parte de sistema inmune innato de mamíferos (Goetz y cols., 2002; Flo y cols., 2004; Holmes y cols., 2005). La estructura de esta molécula

quelante de hierro corresponde a un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoil-L-serina (DHBS) (O'Brien y Gibson, 1970), que por la presencia de los anillos catecólicos (o dihidroxibenzoicos) se le clasifica como un sideróforo de tipo catecol. La enteroquelina es sintetizada a través de una vía de síntesis no-ribosomal de péptidos que está asociada al locus *ent* presente en todas las enterobacterias. Esta vía de síntesis no-ribosomal se puede dividir en dos etapas importantes: la primera en la cual se sintetiza el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) a partir de corismato, etapa catalizada por las enzimas EntA, EntB y EntC; y la segunda que consiste en la síntesis no-ribosomal del trímero cíclico a partir de DHB y serina. Esta etapa está catalizada por EntB, EntD, EntE y EntF, donde EntF es la sintetasa de péptidos no-ribosomal que utiliza la energía de seis moléculas de ATP para llevar a cabo este proceso (revisado en Crosa y Walsh, 2002). La sintetasa EntF posee cuatro dominios independientes catalíticos y portador de péptidos, todos los cuales participan en la síntesis del sideróforo. Debido a que este complejo multi-enzimático solamente utiliza al DHB y a los residuos de serina como sustratos, los monómeros, dímeros y el trímero lineal de DHBS, que también son utilizados por las enterobacterias como sideróforos, son considerados productos de hidrólisis y no precursores de la enteroquelina (O'Brien y cols., 1971).

Tanto bacterias como hongos producen mediante la síntesis de péptidos no-ribosomales una gran variedad de moléculas bio-activas que van desde antibióticos, inmunosupresores y antitumorales, hasta sideróforos. La manipulación de la síntesis de familias de productos naturales correspondientes a moléculas estructuralmente complejas y con actividades biológicas importantes se ha convertido en un asunto de suma importancia en los últimos años (Lamb y Wright, 2005; Vosburg y Walsh, 2005). En estos estudios la sintetasa EntF se ha convertido en un modelo de estudio muy difundido, pues sus cuatro dominios independientes muy bien definidos la convierten

en una de las más simples. Debido a esto, la vía de síntesis de la enteroquelina se encuentra muy bien descrita. Así, EntC cataliza la conversión del corismato a isocorismato (Liu y cols., 1990). El dominio isocorismato liasa (ICL) de EntB hidroliza el grupo piruvato del isocorismato para producir 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi benzoato (Rusnak y cols., 1990), el que es convertido a DHB mediante la actividad de EntA, una 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi benzoato dehidrogenasa (Liu y cols., 1989). En la etapa de la síntesis no-ribosomal (Figura 1) EntD, que es una fosfopantetoinil transferasa, une este grupo prostético a residuos de serina conservadas en los dominios portadores de EntB y EntF (Lambalot y cols., 1996; Gehring y cols., 1998). EntE que contiene un dominio de adenilación específico para DHB, transfiere esta molécula al fosfopantetoinato (PPant) que está unido al dominio portador ArCP (*aryl carrier protein*) de EntB (Rusnak y cols., 1989). Por lo tanto EntB es una proteína bi-funcional, con sus dominios ICL y ArCP, que participa en las dos etapas de la vía de síntesis de la enteroquelina (Gehring y cols., 1997). EntF es una sintetasa de péptidos no-ribosomales de 142 kDa que consta de cuatro dominios, el dominio de condensación (C), de adenilación (A), un dominio portador de péptidos (*peptidyl carrier protein*) (PCP) y un dominio tioesterasa (TE). El dominio de adenilación de EntF activa y carga las serinas al PCP (Gehring y cols., 1998). El dominio de condensación cataliza la formación del enlace amida entre el DHB cargado en el PCP de EntB y la serina cargada al PCP de EntF dando paso a la formación del intermediario DHB-Ser-S-EntF (Gehring y cols., 1998). En los sucesivos pasos de la ciclotrimerización el dominio tioesterasa se encarga de almacenar uniéndose sucesivamente de manera covalente DHB-Ser, (DHB-Ser)<sub>2</sub>, (DHB-Ser)<sub>3</sub> lineal, antes de la ciclación que dará como resultado el sideróforo tricatómico (Shaw-Reid y cols., 1999).



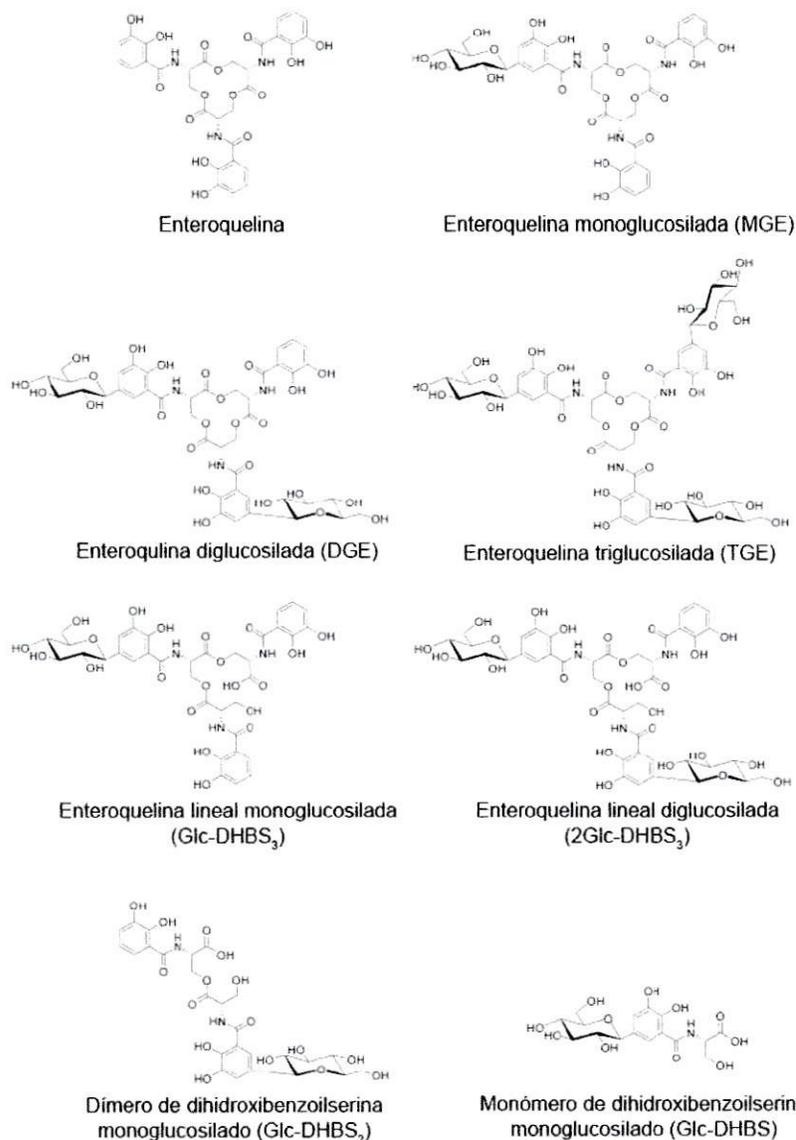
Roche y Walsh, 2003.

**Figura 1. Vía de síntesis no-ribosomal de enteroquelina.** Esquema adaptado de Roche y Walsh, 2003. Para detalles ver el texto.

Algunas cepas patógenas de enterobacterias Gram-negativa codifican para el locus *iroA* que se expresa bajo condiciones de carencia de hierro (Welch y cols., 2002; Wu y cols., 2002). Estas cepas producen una nueva clase de sideróforos de tipo catecol denominados salmoquelina, cuya estructura corresponde a derivados glucosilados de enteroquelina y de sus productos de hidrólisis (Figura 2) (Hantke y cols., 2003; Bister y cols., 2004).

El locus *iroA* de 9,6 kpb esta compuesto por cinco genes (*iroBCDEN*) que codifican para el transportador IroC (Crouch y cols., 2008), el receptor de membrana externa IroN (Hantke y cols., 2003), las estererasas IroE e IroD (Lin y cols., 2005; Zhu y cols., 2005) y la glucosil transferasa IroB que *in vitro* transfiere grupos glucosilos desde la uridina-5'-difosfoglucosa al carbono 5 de una, dos o tres de las unidades de 2,3-dihidroxibenzoil que componen la enteroquelina (Fischbach y cols., 2005).

El estudio de las salmoquelinas ha tenido mucho revuelo en los últimos años, pues se descubrió que a diferencia de la enteroquelina, las salmoquelinas son capaces de evadir la respuesta inmune innata del hospedero mediada por la lipocalina-2 (Flo y cols., 2004; Abergel y cols., 2006), lo cual les confiere una ventaja adaptativa a las bacterias que las expresan. La producción de salmoquelinas además promueve la virulencia de *E. coli* en ratones (Fischbach y cols., 2006b; Valdebenito y cols., 2007). Se ha demostrado que IroN contribuiría a la invasión de estos patógenos en células uroteliales (Feldmann y cols., 2007) y que la síntesis y exportación de salmoquelinas es esencial para la virulencia en *Salmonella enterica* (Crouch y cols., 2008; Raffatellu y cols., 2009). Estos antecedentes han llevado a considerar al locus *iroA* como un importante factor de virulencia en enterobacterias (comentado y revisado en Fischbach y cols., 2006b; Skaar, 2009).



**Figura 2. Sideróforos de tipo catecol: la enteroquelina y sus derivados glucosilados o salmoquelinas.** Se muestra arriba la estructura de la enteroquelina correspondiente a un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina y sus derivados monoglucosilados (MGE), diglucosilado (DGE) y triglucosilado (TGE). Abajo las estructuras de algunos de los derivados de enteroquelina glucosilados e hidrolizados. Enteroquelina lineal monoglucosilada (Glc-DHBS<sub>3</sub>), enteroquelina lineal diglucosilada (2Glc-DHBS<sub>3</sub>), dímero de dihidroxibenzoilserina monoglucosilado (Glc-DHBS<sub>2</sub>) y monómero de dihidroxibenzoilserina monoglucosilado (Glc-DHBS). Todos los derivados glucosilados han sido clasificados dentro del grupo de las salmoquelinas.

## **1.2. Bacteriocinas: péptidos de síntesis ribosomal.**

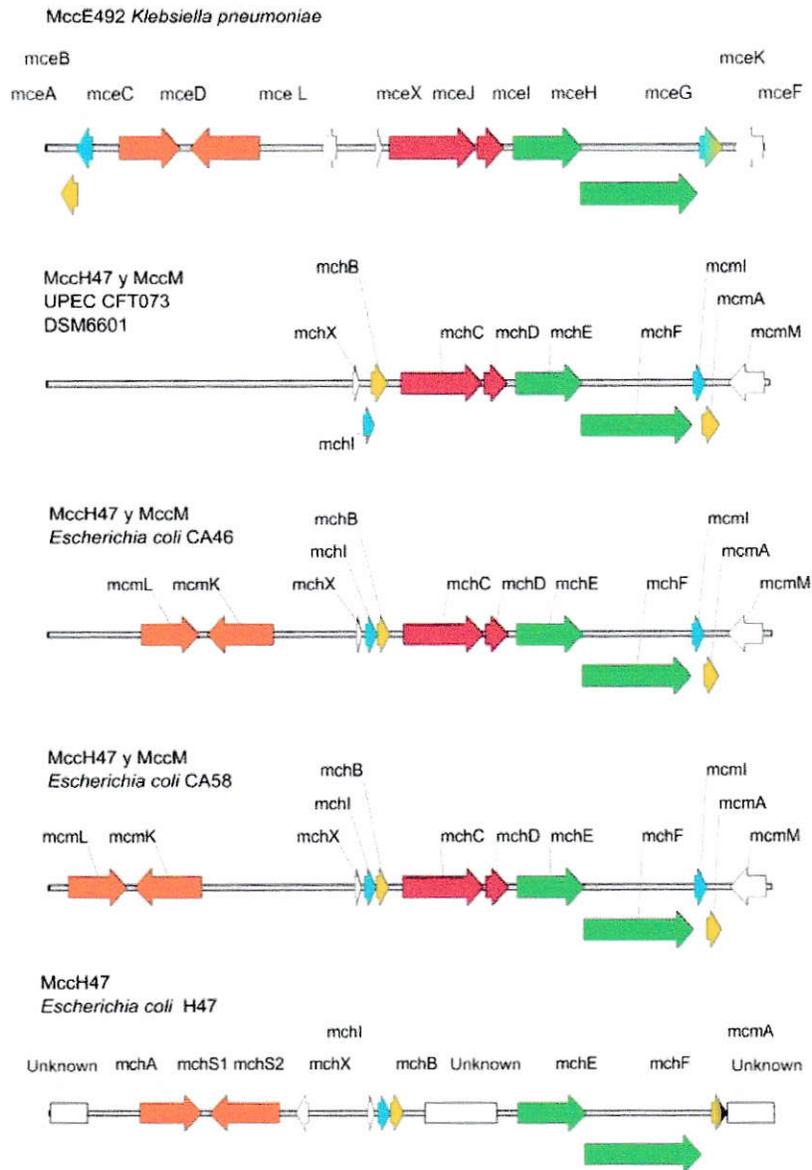
Las bacteriocinas son una clase de péptidos antibióticos de síntesis ribosomal, con un reducido espectro de acción, ya que son activas solo sobre cepas relacionadas a la cepa productora. Poseen variados mecanismos de acción que afectan procesos o estructuras vitales de la célula blanco como lo son la generación de energía, la integridad del material genético, la producción de proteínas o la integridad de la membrana citoplasmática.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas se dividen en dos grupos: las de alto peso molecular o colicinas (25-80.000 Da) y las de bajo peso molecular o microcinas (< 10.000 Da) (Baquero y Moreno, 1984). Las microcinas son un grupo diverso en estructura y mecanismos de acción, pero que comparten características comunes además de su bajo peso molecular, tales como el carácter hidrofóbico que las hace solubles en metanol, la resistencia a condiciones extremas de temperatura y pH, y al tratamiento con algunas proteasas (Baquero y Moreno, 1984). Muchas de ellas sufren procesos de modificación post-traducciona que son esenciales para la actividad bactericida (Duquesne y cols., 2007a; Duquesne y cols., 2007b). La producción de cada microcina descrita requiere de determinantes genéticos que usualmente se encuentran codificados en plasmidios, con excepción de los sistemas productores de las microcinas E492, H47, I47 y M, que se encuentran codificados en el cromosoma de sus cepas productoras y poseen una organización genética similar (Figura 3). En estos sistemas el gen de inmunidad está río arriba y solapado con el gen estructural del péptido bactericida, formando una sola unidad transcripcional. Además presentan un grupo de genes que codifican para las proteínas de exportación de la microcina, y dos proteínas llamadas de la maduración que son necesarias para la actividad bactericida. Además los sistemas productores de estas microcinas presentan

un tercer segmento de unidades transcripcionales distintas y convergentes, también considerados dentro del grupo de los genes de maduración de estas microcinas, que codifican para dos proteínas relacionadas con el metabolismo de los sideróforos de tipo catecol, una de ellas homóloga a la glucosil transferasa IroB y la otra homóloga a la esterasa IroD.

### **1.3. La producción de microcina E492 modificada conjuga la unión a través de un puente de glucosa de moléculas peptídicas obtenidas a través de síntesis ribosomal y no-ribosomal.**

La microcina E492 (MccE492) aislada desde la cepa de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (de Lorenzo, 1984), es un péptido ribosomal de 84 residuos que produce la despolarización de la membrana interna de las células sensibles mediante la formación de poros en la membrana interna de dichas células (de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols., 1993). El mecanismo preciso mediante el cual la MccE492 alcanza la membrana interna y forma los poros es aún desconocido, sin embargo se ha logrado identificar a las proteínas implicadas. Las microcinas H47, M y E492 utilizan para su internalización los receptores de membrana externa para sideróforos de tipo catecol FepA, Cir, Fiu e IroN (Patzner y cols., 2003). En *E. coli* la internalización de la MccE492 ocurre de manera cooperativa mediante los receptores FepA, Fiu y Cir, contribuyendo éstos de manera diferencial en la sensibilidad de la célula blanco, siendo FepA el más importante (Strahsburger y cols., 2005). Estos receptores se encontrarían acoplados al sistema energizador ExbBD y la proteína de membrana interna TonB (Pugsley y cols., 1986; Lagos y cols., 2001; Destoumieux-Garzon y cols., 2003). La actividad de esta microcina se produce mayoritariamente en fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo, 1984) y se encuentra modulada por la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo (Orellana y Lagos, 1996), por la expresión transcripcional de los genes de



Tello, 2006.

**Figura 3. Comparación de los sistemas codificados en el cromosoma de las microcinas E492, H47 I47 y M.** Se utilizó el siguiente código de colores: amarillo, genes estructurales de cada microcina; celeste, genes de inmunidad; verde, genes relacionados con la exportación; rojo, genes de la maduración; naranja, genes relacionados con el metabolismo de los sideróforos de tipo catecol; blanco, los marcos abiertos de lectura sin función conocida. Los rectángulos corresponden a las regiones no secuenciadas; en gradiente de dos colores los genes fusionados y en negro los genes truncos (Esquema tomado de Tello, 2006).

maduración *mceJ* (Corsini y cols., 2002) y por la formación de fibras tipo amiloide en fase estacionaria de crecimiento (Bieler y cols., 2005).

El sistema productor de la MccE492 (GenBank: AF063590) incluye más de 10 marcos abiertos de lectura (ver figura 3) en un fragmento de aproximadamente 13,5 kpb (Lagos y cols., 2001; Lagos y cols., 2009). Este fragmento ha sido clonado y expresado en *E. coli* obteniéndose una microcina recombinante con las mismas características bioquímicas y electrofisiológicas que la secretada por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). Dentro del sistema productor de la MccE492 se identificaron genes que se denominaron de la maduración, pues mutantes en estos genes producían un péptido con la misma movilidad electroforética que las cepas silvestres, pero sin actividad bactericida. MccE492 aislada desde las cepas mutantes en los denominados genes de maduración eran capaces de producir poros en bicapas lipídicas y presentaban actividad antibacteriana sobre esferoplastos, que son células a las cuales se le ha permeabilizado su membrana externa (Lagos y cols., 2001). La producción de MccE492 inactiva durante la fase estacionaria de crecimiento se debe a la falta de transcripción de la unidad que codifica para los genes *mceI* y una disminución de *mceC* (Corsini y cols., 2002). Al analizar la secuencia de los productos génicos codificados por los genes de la maduración *mceC*, *mceI* y *mceJ*, se encontró que MceC codifica para una proteína de 370 aminoácidos con un 77% de identidad y 86% de similitud con la enteroquelina glucosil transferasa IroB de *S. enterica*. MceI codifica para una proteína de 163 aminoácidos que presenta un dominio conservado HylC presente en la familia de aciltransferasas (pfam 02794) que participan en la activación de toxinas mediante la acilación de residuos de lisina. En cambio para MceJ, proteína de 524 aminoácidos, no ha sido posible encontrar homólogos con función

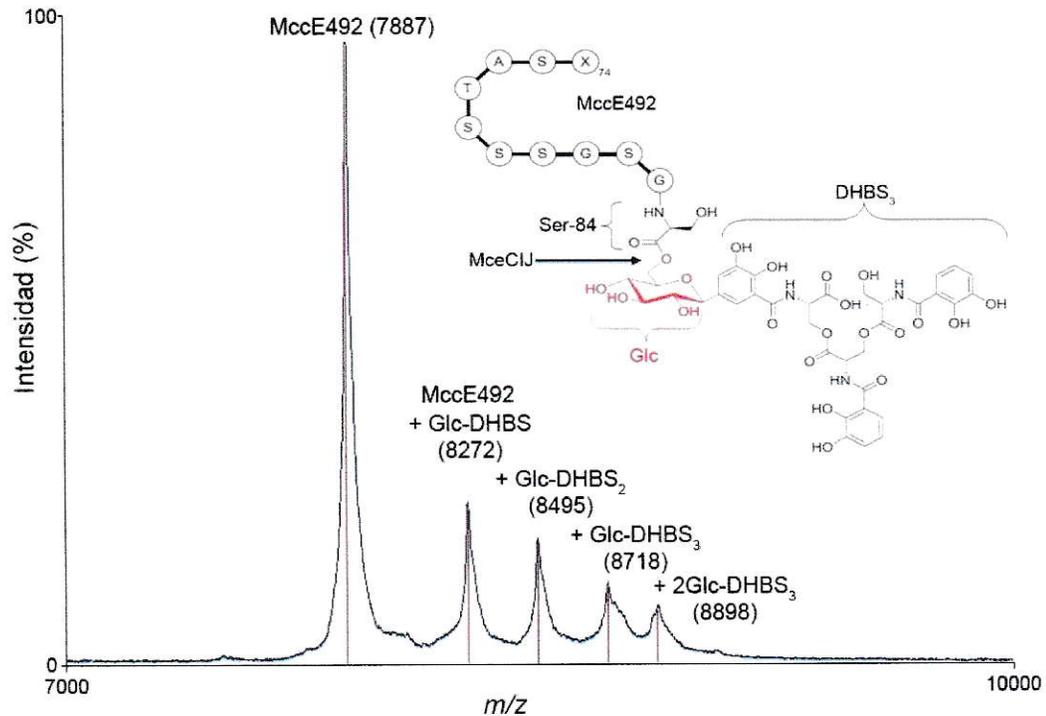
conocida. Los sistemas de producción de las microcinas H47, I47 y M poseen homólogos a los genes de la maduración de la MccE492 (Poey y cols., 2006).

La identificación de los genes de maduración sugería fuertemente que era indispensable una modificación post-traducciona para su actividad bactericida, en el paso del reconocimiento de la membrana externa (Corsini y cols., 2002). Sin embargo, no se detectó MccE492 modificada, y por tanto fue descrita como un péptido no-modificado (Lagos y cols., 2001; Pons y cols., 2002; Destoumieux-Garzon y cols., 2003). Hasta que el año 2004, al cambiar las condiciones del medio de cultivo de la cepa productora, fue posible el aislamiento e identificación de una forma modificada de la MccE492, con una masa de 8718 Da (Thomas y cols., 2004). La modificación de la MccE492 (Figura 4) fue identificada como una molécula de tipo salmoquelina, específicamente un derivado monoglucosilado y lineal de enteroquelina (Glc-DHBS<sub>3</sub>). También se describieron otros intermediarios modificados de la MccE492 que corresponden al péptido unido a un monómero (Glc-DHBS) y a un dímero monoglucosilado de DHBS (Glc-DHBS<sub>2</sub>) con pesos de 8272 y 8495 respectivamente (Thomas y cols., 2004; Vassiliadis y cols., 2007). Además de las formas recién mencionadas, en nuestro laboratorio hemos identificado una forma de 8898 Da que correspondería a un trímero diglucosilado de DHBS (2Glc-DHBS<sub>3</sub>) (resultados no publicados, ver figura 4). El mecanismo mediante el cual la MccE492 se une de manera covalente a la molécula de salmoquelina aún es objeto de estudio, sin embargo se estableció que la unión covalente se genera mediante un enlace éster entre la serina 84 del carboxilo terminal del péptido y la glucosa del sideróforo (Thomas y cols., 2004). Para que esta reacción ocurra *in vitro* se requiere de varias etapas de actividad enzimática en las que participan los productos de los genes de la maduración MceC y MceJ (Nolan y cols., 2007; Nolan y Walsh, 2008). Es importante dejar en

claro, que tal como se observa en la figura 4, las muestras purificadas de MccE492 contienen una mezcla de la forma no-modificada (que suele ser la mayoritaria) y las formas modificadas con diferentes derivados glucosilados de DHBS.

Los estudios *in vitro* sobre las proteínas de la maduración han demostrado que MceC glucosila enteroquelina y sus derivados de hidrólisis en cada una de las unidades de DHBS con una afinidad que disminuye a medida que se acumulan las glucosilaciones (Fischbach y cols., 2005; Nolan y cols., 2007). MceIJ forma un complejo proteico que une las moléculas tipo salmoquelina tanto a un decapeptido con la secuencia del carboxilo terminal de la MccE492 como a la bacteriocina completa, sin embargo no se ha reportado que la MccE492 modificada *in vitro* posea actividad bactericida (Nolan y cols., 2007).

La reacción catalizada por el complejo MceIJ requiere de ATP y  $Mg^{+2}$  como cofactores, y este complejo reconoce además los derivados glucosilados de enteroquelina ya mencionados y los utiliza como sustrato para modificar decapeptidos con las secuencias de los carboxilos terminales de las microcinas E492, H47, I47 y M (Nolan y Walsh, 2008). La producción de MccE492 modificada en una cepa mutante en MceC puede ser restaurada *in vivo* por complementación con el sistema productor de las microcinas H47, I47 y M (Vassiliadis y cols., 2007). Este resultado sugiere que estas microcinas sufrirían un proceso de modificación post-traducciona similar a la MccE492 catalizado por los productos de los genes homólogos a MceCIJ presentes en sus propios sistemas productores.



**Figura 4. Espectro MALDI-TOF-MS de una muestra de MccE492 modificada post-traduccionalmente.** Espectro de masa de una muestra purificada de MccE492 en que se aprecian todas las especies modificadas post-traduccionalmente. Se muestra además un esquema de los últimos diez residuos del péptido antibiótico; en rojo el residuo de glucosa unido a la serina 84 (Ser-84) y al trímero lineal de residuos de 2,3-dihidroxibenzoil-L-serina (DHBS). Las proteínas de la maduración MceCIJ catalizarían esta reacción mediante la formación de un enlace éster entre la MccE492 y la molécula tipo salmoquelina correspondiente.

#### **1.4. Efecto de la modificación post-traducciona de la MccE492 sobre la actividad antibacteriana.**

Las fibras de tipo amiloide se han descrito asociadas a diversas enfermedades, incluyendo el mal de Alzheimer, las encefalopatías espongiformes transmisibles (o enfermedades priónicas), Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y diabetes tipo II, razón por la cual la formación de amiloides se ha asociado a procesos patológicos. Sin embargo en los últimos años se han descrito proteínas que forman amiloides y que no están implicadas en procesos patológicos, a éstas se les ha denominado amiloides funcionales o amiloides naturales. El creciente número de este tipo de proteínas ha incrementado la creencia de que la formación de estos agregados altamente estructurados son funcionales en la naturaleza (Dobson, 2003; Gebbink y cols., 2005; Otzen y Nielsen, 2008).

La MccE492 posee dos actividades biológicas: la actividad bactericida sobre cepas de enterobacterias relacionadas a la cepa productora y la actividad citotóxica, mediante apoptosis, sobre algunas líneas celulares cancerosas humanas (Hetz y cols., 2002). Resultados de nuestro laboratorio indican que la actividad citotóxica se vería incrementada con la capacidad de agregarse formando fibras de tipo amiloide (Estrada, 2005; García, 2008; Estrada y cols., manuscrito enviado para su publicación). Las fibras de tipo amiloide son agregados proteicos insolubles, ricos en estructura beta que usualmente se detectan por su unión a sondas específicas como el rojo Congo y la tioflavina T. La estructura fibrilar de estos agregados poseen morfologías muy similares que se caracterizan por ser fibras largas no ramificadas, de unos cuantos nanómetros de diámetro y generalmente helicoidales. La producción *in vivo* de los agregados extracelulares de MccE492 ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento por lo que se ha postulado que el proceso de agregación en fibras de tipo amiloide podría

tener un rol fisiológico en la regulación de las actividades biológicas de este péptido (Bieler y cols., 2005). Los amiloides de MccE492 producidos *in vitro* no poseen actividad bactericida y su agregación sigue la cinética característica de los agregados de tipo amiloide con una fase de latencia seguida por un período de crecimiento rápido. Este comportamiento es típico de procesos dependientes de nucleación, como la cristalización, donde la fase de latencia puede ser eliminada mediante la adición de agregados preformados a una solución fresca, proceso conocido como nucleación o siembra (en inglés *seeding*) (Bieler y cols., 2005). Los agregados iniciales o protofibrillas tanto de proteínas relacionadas con enfermedades como de algunos amiloides naturales han demostrado ser altamente tóxicos para las células, a diferencia de los agregados maduros que son usualmente benignos o inertes (Bucciantini y cols., 2002; Walsh y cols., 2002; Caughey y Lansbury, 2003). Se ha planteado la posibilidad de que exista un mecanismo específico y común para la toxicidad de estos agregados iniciales como por ejemplo la formación de especies anulares oligoméricas, cuyas estructuras visualizadas mediante microscopía electrónica, son indistinguibles de aquellas producidas por algunas toxinas bacterianas formadoras de poros que rompen el balance iónico de la célula, y que se les ha denominado "poros amiloides" (Lashuel y cols., 2002).

Muestras de MccE492 obtenidas desde condiciones de cultivo en que se obtiene una baja proporción de microcina modificada (inferior al 5%) presentan actividades entre 4 y 8 veces más bajas que aquellas obtenidas en condiciones de alta modificación, en las cuales las formas modificadas representan entre el 50 al 70%, lo cual indica que no existe una relación lineal entre la fracción de MccE492 modificada y su actividad bactericida. La MccE492 inactiva, proveniente de mutantes en los genes de maduración, puede ser activada *in vitro* mediante un proceso de desnaturalización

suave de una mezcla con microcina activa. Esta activación está acompañada por un cambio en la estructura secundaria de la MccE492, aumentando su porcentaje de estructura beta (Baeza, 2003), al igual que ocurre en el proceso de oligomerización durante la formación de fibras de tipo amiloide. Estas observaciones han llevado a plantear la hipótesis de que la conformación activa y tóxica de la MccE492 sería un oligómero, cuya formación y posterior agregación en fibras de tipo amiloide estaría siendo controlada por el proceso de modificación post-traducciona.

### **1.5. Objetivos.**

El objetivo de esta tesis será estudiar *in vivo* el proceso de modificación post-traducciona de la MccE492 y su efecto tanto en la actividad bactericida como en la capacidad de formar fibras de amiloides.

El estudio del proceso de modificación post-traducciona se abordará mediante estudios genéticos, caracterizando la actividad y el estado de modificación de la MccE492 producida por mutantes en diferentes puntos dentro de la vía de síntesis de sideróforos catecólicos. Como se verá en el desarrollo de este trabajo, se pondrá especial énfasis en el estudio del papel que cumple la sintetasa EntF en este proceso, complementando los estudios genéticos con el uso de herramientas bio-informáticas.

Mediante el uso de técnicas microbiológicas y bioquímicas, se cuantificará el efecto que tiene la modificación de la MccE492 tanto en la actividad antibacteriana como en la producción de amiloides. Se estudiará su efecto sobre la estructura de los amiloides formados y sus precursores, principalmente utilizando técnicas de microscopía electrónica y reconstrucción de imágenes. Estos estudios serán complementados con espectros de dicroísmo circular y análisis cinéticos.

## 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., UK.

La enzima *Taq* DNA polimerasa se obtuvo de Invitrogen Life Technology, CA, USA.

La enzima *Pfu Turbo* DNA polimerasa y el QuickChange® XL Site-Directed Mutagénesis Kit se compraron en Stratagen, CA, USA.

El *MICRO-BSA Protein Assay Reagent Kit* fue comprado a Pierce, Illinois, USA.

La fluorescamina, bis-acrilamida, SDS, azida de sodio, fosfato di-ácido de potasio, azul brillante de Coomassie, estándar de bajo peso molecular para péptidos, glucosa, Tween 20, rojo Congo (RC), tricina, L-aminoácidos, ácido trifluoroacético (TFA) y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) se compraron en Sigma Chemical Co., MO, USA.

Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para remover las sales de los ácidos nucleicos pre-electroporación y filtros "low binding" SLHVR04NL con poros de 0,45 µm se obtuvieron en Millipore, USA.

La 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, TCA, TFA, CAS, cloruro de calcio y carbonato ácido de sodio se compraron en Merck, Darmstadt, Alemania.

El cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, tricloruro de hierro III, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, β-MeOH, citrato de sodio, agarosa, acetato de amonio, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

El cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y resina Silica Gel 100 C18 se obtuvieron de Fluka Chemie AG, Messersmittstr, Suiza.

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

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

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

Los cartuchos Sep-Pak C8 y C18, así como la columna C18, Spherisorb® 5 µm ODS2 4,6 µm x 250 mm, se adquirieron en Waters, USA.

Los desoxinucleótidos y los sistemas E.Z.N.A.™ PCR Purification System, E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit I se obtuvieron de Omega Bio-Tek Inc., Doraville, GA, USA.

El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se compró de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA.

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

La ampicilina se obtuvo en Lyka Lab Limited y la tetraciclina en el Laboratorio Benguerel Ltda., Chile.

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

Las salmoquelinas MGE y DGE fueron donadas gentilmente por Michael Fischbach del laboratorio del Dr. C. Walsh, Harvard Medical School, Boston, USA.

### **2.1.2. Cepas bacterianas y plasmidios.**

En las Tablas 1 y 2 se detallan respectivamente las cepas y plasmidios utilizados en esta tesis. Las cepas de *E. coli* H531, H1594, H1875, H1876 y H1885 fueron donadas por el laboratorio del Dr. Klaus Hantke, Universität of Tübingen, Tübingen, Alemania. Las cepas de *E. coli* ER1100A y ER1300H, así como los plasmidios pER311, pER307A y pER304A fueron donados por el Dr. Michael Fischbach del laboratorio del Dr. C. Walsh, Harvard Medical School, Boston, USA.

**Tabla 1. Genotipos/Fenotipos de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.**

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
VCS257	DP50, <i>sup F/supE44, supF58, hsd53(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>), dapD8, lacY1, glnV44, Δ(gal-uvrB)47, tyrT58, gyrA29, tonA53Δ(thyA57)</i> .	Stratagene
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT, r<sub>B</sub> m<sub>B</sub></i> .	Novagen
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> .	Promega
H1594	<i>araD139, Δ(argF-lac)U169, rpsL150, relA1, flbB5301, deoC1, ptsF25, rbsR, aroB fiu::Mud1X. (Amp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>)</i>	Hantke, 1990
H1875	<i>araD139, Δ(argF-lac)U169, rpsL150, relA1, flbB5301, deoC1, ptsF25, rbsR, aroB cir::Mud1X fepA::Tn10. (Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>)</i>	Hantke, 1990
H1876	<i>araD139, Δ(argF-lac)U169, rpsL150, relA1, flbB5301, deoC1, ptsF25, rbsR, aroB fiu::Mud1X, cir fepA::Tn10. (Amp<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>)</i>	Hantke, 1990
H5311	Derivada de H1143; <i>araD 139, Δ (argF lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB entC::Mud1X. (Amp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>)</i>	Hantke, 1983; K. Hantke colección de laboratorio
H1885	Derivada de H1143; <i>araD 139, Δ (argF lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB ΔentDF. (Sm<sup>r</sup>)</i>	Hantke, 1983; K. Hantke colección de laboratorio
K12 <i>entB</i> <sup>-</sup>	<i>entB</i> <sup>-</sup> obtenida reemplazando el gen por Kan. (Kan <sup>r</sup> )	Lai y cols., 2006
ER1100A	<i>entF</i> <sup>-</sup> obtenida reemplazando el gen por Cm.(Cm <sup>r</sup> )	Roche y Walsh, 2003
ER1300H	<i>entF</i> <sup>-</sup> , derivado de ER1100A sensible a Cm.	Roche y Walsh, 2003
<i>S. enterica</i> LT2	También conocida como <i>Salmonella thyphimurium</i> LT2, prototrófica.	S. Maloy colección de laboratorio

**Tabla 2. Características relevantes de los plasmidios utilizados en este trabajo.**

Plasmidios	Característica	Fuente o referencia
pHC79	Cosmidio derivado de ColE1, de propósito general. (Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> )	Hohn y Collins, 1980
pJAM229	Derivado de pJ digerido con <i>Xho</i> I. Contiene los genes para la producción de MccE492 activa. (Amp <sup>r</sup> )	Wilkins y cols., 1997
pJEM15	Derivado de pJAM229, posee la duplicación de un fragmento interno <i>Sal</i> I de 2,5 Kb. Es un sobre-productor de MccE492 activa. (Amp <sup>r</sup> )	Wilkins y cols., 1997
npB4	pJEM15 <i>mceC</i> ::Tn5. Inserción en el aa 60. (Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> )	Colección de laboratorio
np45	pJEM15 <i>mceI</i> ::Tn5. Inserción en el aa 133. (Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> )	Colección de laboratorio
p157	Gen <i>mceB</i> clonado en el plasmidio pT7-7. (Amp <sup>r</sup> )	Lagos y cols., 1999
pACYC184	Plasmidio con origen de replicación p15A de propósito general. (Cm <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> )	Chang y Cohen, 1978
pT7-AB	Genes <i>mceBA</i> bajo el control del promotor T7 clonados en pACYC184. (Cm <sup>r</sup> )	García, 2008
pT7-C	Gen <i>mceC</i> bajo el control del promotor T7 clonado en pACYC184. (Cm <sup>r</sup> )	Colección de laboratorio
pT7-IJ	Genes <i>mceIJ</i> bajo el control del promotor T7 clonados en pACYC184. (Cm <sup>r</sup> )	Colección de laboratorio
pER311	Gen <i>entF</i> clonado en pET28-a con una cola de 6-His en el C-terminal. (Amp <sup>r</sup> )	C.T. Walsh colección de laboratorio
pER307A	Dominios A-PCP-TE (entre los residuos 437-1293) de EntF clonado en pET28-a con una cola de 6-His en el C-terminal. (Amp <sup>r</sup> )	C.T. Walsh colección de laboratorio
pER304A	Dominios A-PCP (entre los residuos 437-1045) de EntF clonado en pET28-a con una cola de 6-His en el C-terminal. (Amp <sup>r</sup> )	C.T. Walsh colección de laboratorio
pACYC-EntF	Gen <i>entF</i> clonado en pACYC184 como en pER311. (Cm <sup>r</sup> )	Este trabajo

pACYC-A-PCP-TE	Dominios A-PCP-TE de EntF clonados en pACYC184 como en pER307A. (Cm <sup>r</sup> )	Este trabajo
pACYC-A-PCP	Dominios A-PCP de EntF clonados en pACYC184 como en pER304A. (Cm <sup>r</sup> )	Este trabajo
pACYC-A	Dominio A (entre los residuos 437-968) de EntF clonado en pACYC184. (Cm <sup>r</sup> )	Este trabajo
pACYC-EntF-E750A	Gen <i>entF</i> con la mutación E750A clonado en pACYC184. (Cm <sup>r</sup> )	Este trabajo

### 2.1.3. Partidores.

En la Tabla 3 se detallan los partidores utilizados en esta tesis.

**Tabla 3. Secuencias de los partidores utilizados en este trabajo.**

Partidor	Secuencia (5'→3')
T7pro	TAATACGACTCACTATAGGG
T7	GAAATTAATACGACTCACTATA
TER	GGATATAGTTCCTCCTTTCA
DomAR	TGGCGCTTATGCCTTCAGTT
A-E750A-F	GGCCCGACGGCAGCGGGGTA
A-E750A-R	TACCGCCGCTGCCGTCGGGCC

## 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, suplementado 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 y glucosa 0,2% p/v.

**Agar blando.** Se preparó el agar blando con medio caldo Luria o M9 y 0,7% p/v de agar agar.

**Placas de agar.** Se prepararon las placas con medio caldo Luria o M9 y 1,5% p/v de agar agar.

**Placas suplementadas con DHB.** Se prepararon agregando a placas con medio LB, DHB a una concentración final de 10 µg/mL.

**Placas de césped sensible.** Sobre placas de agar se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 150 µL de un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) sensible a la MccE492 crecido hasta fase estacionaria.

Las cepas bacterianas que portan plasmidios recombinantes y/o transposones con resistencia a antibióticos, se crecieron en medios líquidos o placas suplementadas con los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones finales y preparados según lo descrito en Sambrook y cols. (1989): ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y estreptomina 10 µg/mL.

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

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

### **2.2.3. Generación de construcciones plasmidiales.**

Rutinariamente se utilizó el vector pACYC184 para hacer las construcciones compatibles con aquellas correspondientes al sistema productor de la MccE492 clonado en el cosmidio pHc79. La sintetasa de péptidos no-ribosomal EntF fue clonada mediante PCR, utilizando como templado el plasmidio pER311 y los partidores T7 y TER. El producto de PCR purificado se ligó en el sitio de corte *EcoRV* que posee el vector pACYC184, dando como resultado la construcción pACYC-EntF. Con los mismos partidores (T7 y TER) y utilizando como templados los plasmidios pER307A y pER304A, se amplificaron las combinaciones de los dominios de EntF, y se clonaron en el sitio *EcoRV* del vector pACYC184 para obtener las construcciones pACYC-A-PCP-TE y pACYC-A-PCP. En el caso de la construcción pACYC-A, se utilizó como templado el plasmidio pER304A y los partidores T7 y DomaAR. El producto de PCR se clonó en el sitio *EcoRV* de pACYC184. Todas las construcciones antes mencionadas fueron completamente secuenciadas.

### **2.2.4. Mutagénesis puntual.**

La mutagénesis puntual se realizó bajo las indicaciones que recomienda el sistema QuickChange® XL Site-Directed Mutagénesis Kit. Brevemente, en la reacción

de mutagénesis puntual mediante PCR se utilizó 1  $\mu$ L DNA plasmidial del vector templado pACYC-EntF, los partidores A-E750A-F y A-E750A-R, con un tiempo de extensión de 16 min. El producto de PCR fue aislado del DNA templado y tratado con la enzima de restricción *DpnI*, que solo digiere DNA metilado (DNA aislado desde cultivo bacteriano) y no digiere al DNA producido *in vitro* (DNA proveniente de una reacción de PCR). Después de la digestión, el DNA fue dializado y transformado sobre células competentes DH5 $\alpha$ . La identidad de la mutación se confirmó mediante secuenciación.

#### **2.2.5. Purificación de MccE492 en columnas Sep-Pak C8.**

Medio litro de medio de cultivo M9 suplementado con Glc y Cit se inoculó con 5-500  $\mu$ L de un cultivo crecido toda la noche y se incubó a 37°C a una agitación constante de 220 rpm durante 20 h. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 17.000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, sometido a una presión negativa, se pasó por una columna de extracción en fase sólida Sep-Pak C8 (Waters), activada previamente con 5 mL de acetonitrilo 40%-TFA 0,1% y 5 mL de agua nano pura-TFA 0,1%, se lavó con 5 mL de acetonitrilo 30%-TFA 0,1% y la MccE492 se eluyó con 5 mL de acetonitrilo 40%-TFA 0,1%.

#### **2.2.6. Purificación de MccE492 en columnas Sep-Pak C18.**

Medio litro de medio de cultivo M9 suplementado con Glc y Cit se inoculó con 5-500  $\mu$ L de un cultivo crecido toda la noche y se incubó a 37°C a una agitación constante de 220 rpm durante 20 h. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 17.000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, sometido a una presión negativa, se pasó por una columna de extracción en fase sólida Sep-Pak C18 (Waters), activada previamente

con 10 mL de acetonitrilo 50% y 20 mL de agua nano pura, se lavó con 3 mL de metanol 60% y 3 mL de acetonitrilo 25%. La MccE492 se eluyó con 3 mL de acetonitrilo 50%.

#### **2.2.7. Purificación preparativa de MccE492.**

Cuatro matraces, cada uno con un litro de medio de cultivo M9 suplementado con Glc y Cit, se inocularon con 5-500  $\mu$ L de cultivo crecido toda la noche, se incubaron a 37°C a una agitación constante de 220 rpm durante 20 h y posteriormente se centrifugaron a 17.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante filtrado se incubó 2 h con una resina Silica Gel 100 C18 (Fluka), activada previamente con acetonitrilo 100%, y se filtró en un embudo Büchner con papel filtro. Se lavó la resina con un gradiente de 30 a 100% de acetonitrilo, obteniéndose el máximo de MccE492 en la fracción de 50%.

#### **2.2.8. Determinación de la concentración de muestras de MccE492 purificada.**

La concentración de las preparaciones de MccE492 se determinó utilizando el *MICRO-BSA Protein Assay Reagent Kit* de Pierce (Illinois, USA) según las indicaciones del fabricante.

#### **2.2.9. Espectrometría de masas (MALDI-TOF).**

Muestras de MccE492 purificada se mezclaron en diluciones 1:10 con la matriz CHCA previamente preparada a una concentración de 10 mg/mL. Se depositó 2  $\mu$ L de cada una de las mezclas en una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., MA, USA), en la Unidad de Espectrometría de Masas del Centro de Estudios para el Desarrollo de la Química (CEPEDEQ) de la Universidad de Chile. Previo a la obtención de los

espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de proteínas de masa que iban desde los 5.000 a los 17.000 Da. Para la obtención de los espectros se trabajó en modo ion positivo y detección lineal utilizando un método optimizado para péptidos y/o proteínas de masas de entre 5.000 y 20.000 Da (se usaron los parámetros por defecto del equipo). Cada espectro final corresponde a la sumatoria de 10 barridos de 40 tiros de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar.

#### **2.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE).**

Los geles se prepararon con tres fases: separador, espaciador y concentrador. 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 0,1M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9.

#### **2.2.11. Hibridación western.**

##### **2.2.11.1. Electrotransferencia.**

Después de realizar un SDS-PAGE, se retiró el gel de los vidrios y se montó la transferencia colocando el gel sobre una esponja y tres papeles filtro. Luego se colocó sobre el gel una membrana de nitrocelulosa, otros tres papeles filtro y esponja. Antes de montar la transferencia las hojas de papel filtro y las esponjas se humedecieron en

amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa se humedeció en agua y posteriormente en amortiguador de transferencia. El sistema se montó en la cámara respectiva y la transferencia se realizó durante 2 h a 100 V a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  empleando el amortiguador de transferencia previamente enfriado.

#### **2.2.11.2. Desarrollo inmunológico.**

La membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty) al 5% en TS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se traspasó a una solución de leche 1% en TS-Tween que contiene el anticuerpo primario. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-MccE492 durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con amortiguador TS y la membrana se incubó por 2 h en leche al 1% en TS-Tween con el anticuerpo secundario al cual está conjugado la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa. Se empleó una dilución 1:1.000 del anticuerpo policlonal anti-MccE492 y una dilución 1:20.000 para el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. La membrana se reveló en 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,5, a la cual se agregó 50  $\mu\text{L}$  de luminol 250 mM (preparado en DMSO) y 22  $\mu\text{L}$  de ácido p-cumárico 90 mM (preparados en DMSO). La reacción de quimioluminiscencia se inició agregando 3  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno. La membrana se expuso entre 5 s y 2 min, dependiendo de la señal obtenida.

#### **2.2.12. Detección de la producción de sideróforos.**

La determinación de la producción de sideróforos por parte de una cepa bacteriana se realizó creciéndola sobre placas CAS siguiendo el protocolo descrito por Schwyn y Neilands (1987). Estas placas poseen el indicador cromoazurol-S que al

encontrarse acompañado con hierro presenta una coloración azul, que vira a amarillo al desarmarse este complejo. La aparición de un halo de color amarillo alrededor de las cepas crecidas en estas placas durante 24 h, indica la presencia de sideróforos capaces de quelar el hierro desde el indicador.

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

La detección de la actividad bactericida se realizó depositando sobre una placa con un césped sensible incluido en agar blando una alícuota de 3  $\mu$ L proveniente de las muestras que se deseaban analizar. Luego de incubar las placas a 37°C durante 12-14 h, la actividad bactericida se visualizó como la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped.

#### **2.2.14. Cuantificación de la actividad bactericida o determinación del título.**

Para la cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492 se realizaron diluciones seriadas en base dos de las muestras, en agua nanopura estéril. Se tomaron alícuotas de 3  $\mu$ L de cada tubo de la dilución seriada y se pusieron sobre placas de césped sensible. Se incubó a 37°C durante 12-14 h, y el título de la muestra se determinó como 2 (base de la serie) elevado al número del último tubo de la dilución cuya alícuota es capaz de producir un halo de inhibición de crecimiento en la placa con el césped sensible.

#### **2.2.15. Transcomplementación con DHB, salmoquelina u otro cultivo.**

Sobre placas de césped sensible se pusieron alícuotas (3 $\mu$ L) del cultivo a ensayar crecido toda la noche y se esperó unos minutos para que se adsorbieran sobre la placa. Sobre éste se depositaron nuevas alícuotas (3 $\mu$ L) de otro cultivo

bacteriano crecido toda la noche o de soluciones con suplementos del medio de cultivo. Estos suplementos correspondientes a DHB, MGE o DGE fueron usados a una concentración de 1 mM. Luego de incubar las placas a 37°C durante 12-14 h, se evaluó como cepas positivas para transcomplementación a aquellas que en estas condiciones eran capaces de producir halos de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible.

#### **2.2.16. Producción de fibras de tipo amiloide.**

Para la producción de las fibras de tipo amiloide se utilizó un protocolo similar al descrito por Bieler y col. (2005). Brevemente, las muestras de MccE492 purificada fueron llevadas a una concentración de 800 µg/mL en un volumen de 100 µL y se les agregó 1 µL de NaOH 10N. Se incubaron durante 15 min a 37°C y luego se centrifugaron a 4°C durante 30 min a 75.000 x g. Se tomaron 100 µL del sobrenadante de la centrifugación y se llevaron a 400 µg/mL con amortiguador (PBS o PIPES) 10 mM ajustándose el pH entre 6,5 y 7,5. Se dejaron incubando a 37°C y 300 rpm durante un mínimo de 15 h para la formación de los agregados.

#### **2.2.17. Medición de la formación de fibras de tipo amiloide mediante la unión de rojo Congo (RC).**

El rojo Congo (RC) es una sonda que se une específicamente a fibras de tipo amiloide. La formación de amiloides mediante el ensayo de unión a RC fue cuantificada mediante la disminución de la sonda libre. Las muestras de MccE492 a distintos tiempos de agregación fueron incubadas con RC 22 µM durante 15 min a 37°C y centrifugadas a 75.000 x g durante 15 min a 4°C. Se tomaron los sobrenadantes y se midió la absorbancia a 490 nm. La fracción de RC libre fue determinada como la

diferencia con la absorbancia de la muestra del péptido a tiempo cero de agregación (100% de RC libre).

#### **2.2.18. Producción de semillas de fibras de tipo amiloide.**

Se dejaron muestras de MccE492 agregando a 37°C y 300 rpm en amortiguador de agregación (PIPES 10 mM, NaCl 0,5 M, NaOH pH 6,5) durante 48 h para la producción de fibras amiloides maduras. Para romper las fibras las muestras fueron sonicadas tres veces durante 10 s a una potencia de entrada de 6 watts en un sonicador 3000 (MISONIX) utilizando el *microtip*. Estas fibras sonicadas fueron utilizadas como semillas en una proporción de 1:10 con microcina soluble a una concentración final de 800 µg/mL en amortiguador de agregación. Las muestras con semillas fueron puestas a agregar a 37°C y 300 rpm y se tomaron muestras cada dos horas para cuantificar la formación de amiloides mediante la disminución de RC libre.

#### **2.2.19. Dicroísmo circular (DC).**

Se dejaron muestras de MccE492 agregando a 37°C y 300 rpm en amortiguador de agregación (PIPES 10 mM, NaCl 0,5 M, NaOH pH 6,5) para la producción de fibras amiloides. Se tomaron muestras a los tiempos de 0, 4, 6 y 24 horas. Para homogeneizar las muestras, estas fueron sonicadas tres veces durante 10 s a una potencia de entrada de 6 watts en un sonicador 3000 (MISONIX) utilizando el *microtip*. Luego se centrifugaron durante 30 min a 4°C y 75.000 x g. Se tomó el sobrenadante y se dejó 1 h a temperatura ambiente. Las mediciones se hicieron en un espectropolarímetro JASCO J-600. Se hicieron 10 barridos por muestra en el UV lejano (205 hasta 260 nm) a una velocidad de 50 nm/min, con una sensibilidad de 50 mdeg (miligrados), con un tiempo de respuesta de 0,25 s, un ancho de banda de 1 nm y en

cubetas de 1 mm. Se utilizó como blanco el amortiguador sometido a las mismas condiciones que las muestras. Luego de medir la elipticidad se volvió a determinar la concentración de proteína de las muestras recuperadas de la cubeta para poder expresar los datos en el gráfico como elipticidad molar y descartar que las diferencias observadas se debieran a cambio en la concentración de cada muestra debido al proceso de formación de fibras.

#### **2.2.20. Microscopía electrónica (ME).**

Las muestras de MccE492 agregadas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% sobre rejillas de cobre rodio de 300 mesh con sombreado de carbono a las que se les aplicó una descarga de ionización de 15 s. Las micrografías se tomaron bajo condiciones de mínima dosis sobre películas Kodak SO-163, en un microscopio JEOL JEM1200EXII equipado con un filamento de wolframio y operado a 100 KV, con magnificaciones de 20.000, 50.000 o 60.000 aumentos. Las micrografías se digitalizaron con un microdensitómetro Zeiss PhotoScan TD (INTERGRAPH) a 7  $\mu\text{m}$  para un muestreo final de 1,6  $\text{\AA}/\text{píxel}$  para las micrografías tomadas a 60.000 aumentos, 2,8  $\text{\AA}/\text{píxel}$  para las tomadas a 50.000 aumentos y 3,5  $\text{\AA}/\text{píxel}$  para las tomadas a 20.000 aumentos.

#### **2.2.21. Medición de las fibras tipo amiloide.**

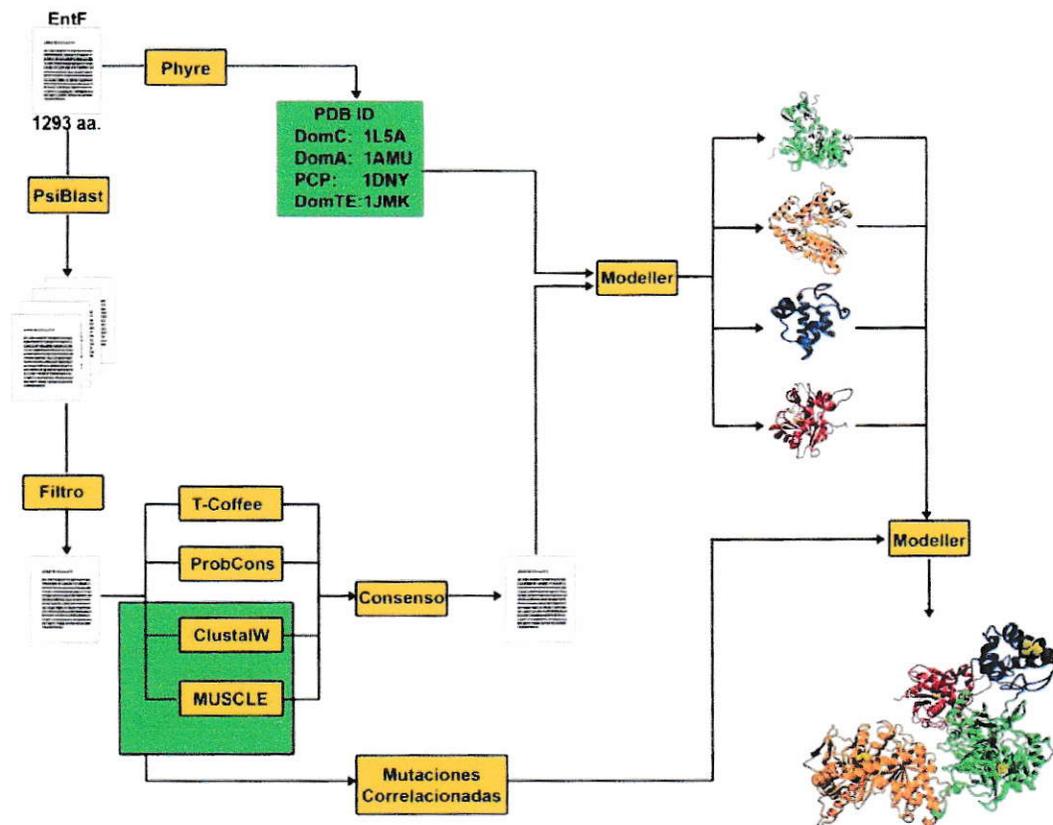
Se midieron las fibras de tipo amiloide de manera manual directamente desde las micrografías utilizando una lupa graduada y también desde las imágenes digitalizadas utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

### **2.2.22. Procesamiento bi-dimensional de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica.**

El procesamiento de las imágenes para la generación de promedios bi-dimensionales se realizó en una estación de trabajo Silicon Graphics utilizando el paquete de programas Xmipp (<http://xmipp.cnb.csic.es/>; Marabini y cols., 1996; Sorzano y cols., 2004; Scheres y cols., 2008). Se generó la CTF (función de transferencia de contraste) de las micrografías digitalizadas. Manualmente se picó sobre estas imágenes en el centro de las estructuras homogéneas seleccionadas, generando grupos de coordenadas sobre las cuales se cortó digitalmente las micrografías. Se generaron imágenes individuales a partir de ventanas de 240 x 240 o 50 x 50 píxeles para las estructuras fibrilares y anulares respectivamente. Luego, cada imagen fue normalizada para un valor medio de 0 y una desviación estándar de 1. Las imágenes se clasificaron usando algoritmos de máxima verosimilitud según sus características (Scheres y cols., 2005), generando grupos que se promediaron, obteniendo como resultado imágenes representativas de cada clase. Para la obtención del resultado final se realizaron varias vueltas de alineamiento para cada clase, usando como patrón las imágenes medias generadas con la clasificación de máxima verosimilitud.

### **2.2.23. Modelamiento por homología.**

La obtención del modelo 3D de la sintetasa EntF de *E. coli* requirió del desarrollo de un protocolo de modelamiento, ya que no existen antecedentes previos en el modelamiento de este tipo complejos. El protocolo de modelamiento utilizado es el que se esquematiza y explica brevemente en la Figura 5.



**Figura 5. Esquema del protocolo utilizado en el modelamiento de la sintetasa de péptidos no-ribosomal EntF de *E. coli*.** A partir de la secuencia de EntF de la cepa K12, se buscaron secuencias homólogas para la proteína completa (PsiBlast) y homólogos de estructura conocida para cada dominio (Phyre). Las secuencias encontradas en la base de datos se sometieron a un filtro, seleccionándose un grupo de secuencias homólogas de longitud parecida y eliminándose todas las secuencias redundantes (Filtro). Las secuencias filtradas se sometieron a cuatro diferentes protocolos de alineamiento múltiple (3D Coffe, ProbCons, ClustalW y Muscle), obteniéndose en forma manual un consenso. Los alineamientos consenso y los patrones estructurales se usaron de entrada para el programa Modeller 8v2, desde el cual se obtuvieron los modelos para cada dominio de la proteína EntF. Estos modelos se usaron en el análisis de mutaciones correlacionadas y refinamiento con el cual se construyó el modelo final de EntF.

Para el modelamiento se utilizó la secuencia de la sintetasa EntF de la cepa *E. coli* K12, cuya secuencia aminoacídica posee 1329 residuos y cuatro dominios según la definición de pfam. Desde el amino al carboxilo terminal se localizan secuencialmente el dominio de condensación, el dominio de adenilación, el dominio de unión de péptidos y el dominio tioesterasa. Se realizó una búsqueda de homólogos estructurales para cada uno de estos dominios en el servidor Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/index.cgi>) de *threading* (Kelley y Sternberg, 2009) método computacional para predecir la estructura de una proteína a partir de su secuencia, encontrándose homólogos con estructura conocida, que fueron utilizados de molde para modelar cada uno de los dominios. La identidad de secuencia de la proteína con los patrones encontrados es la que se resume en la tabla 4.

**Tabla 4. Dominios de EntF con sus respectivos homólogos estructurales encontrados mediante el servidor de *threading* Phyre.**

Dominio	pfam		Phyre			
	Limites <sup>a</sup>	E-Value	SCOP <sup>b</sup>	E-Value	%ID	Largo (aa)
C	1-301	1e-78	C115aa	6.1e-33	23	436
			C1q9jb	7.2e-18	14	422
A	482-887	4e-198	d1amua	8.4e-23	31	514
			c1amua	1.7e-21	28	563
			d1pg4a	4.9e-21	17	643
			d1v25a	3.2e-20	19	534
			d1t5hx	2.8e-18	23	503
PCP	978-1042	3e-12	d1dnya	0.043	28	76
			c2afda	0.44	21	88
TE	1066-1287	2e-56	d1jmkc	3.5e-20	15	230
			c1xkta	1.6e-18	17	289
			d1mo2a	3.2e-17	17	255
			c1keza	5.1e-17	17	300
			d1mnaa	9.1e-09	20	281
			d1m33a	2.3e-06	17	256

<sup>a</sup>: Limites de la pfam dentro de la secuencia de EntF desde el amino al carboxilo terminal.

<sup>b</sup>: SCOP: *Structural Classification of Proteins*.

Para generar los alineamientos que permitieran obtener el mejor ajuste entre la secuencia de EntF y los moldes, se realizó un PsiBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) de cuatro iteraciones y 8000 secuencias cada una. Las secuencias obtenidas desde la base de datos fueron depuradas utilizando como criterios que se tratara de ortólogos y no de parálogos de la secuencia, y para ello se seleccionaron solo aquellas secuencias que tienen un tamaño parecido a EntF, entre 1200 y 1400 residuos (tamaño de EntF  $\pm$  100). Además se eliminaron todas las secuencias redundantes o idénticas (con más de un 95% de identidad). Una vez obtenidas las secuencias, se realizaron alineamientos múltiples utilizando cuatro programas disponibles en la red (Tabla 5).

**Tabla 5. Programas utilizados para realizar los alineamientos múltiples.**

Nombre	Servidor	Referencias
T-Coffee EXPRESSO - <i>Structure based multiple sequence alignments</i>	<a href="http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=EXPRESSO(3DCoffee)::Advanced">http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=EXPRESSO(3DCoffee)::Advanced</a>	Notredame y cols., 2000
ProbCons - <i>Probabilistic consistency based multiple sequence alignment</i>	<a href="http://probcons.stanford.edu/index.html">http://probcons.stanford.edu/index.html</a>	Do y cols., 2005
ClustalW - <i>General purpose multiple sequence alignment program</i>	<a href="http://www.clustal.org/">http://www.clustal.org/</a>	Larkin y cols., 2007
MUSCLE - <i>Multiple sequence alignment software</i>	<a href="http://www.drive5.com/muscle/">http://www.drive5.com/muscle/</a>	Edgar, 2004

Utilizando los alineamientos obtenidos con los cuatro métodos se construyó manualmente un alineamiento consenso. Para consensuar zonas que presentaban diferencias entre los métodos utilizados, se eligió el consenso de acuerdo a las que presentaban coincidencias por más de una de las metodologías. Por ejemplo en la Figura 6, solo al utilizar ClustalW no se alinea la fenilalanina (F) con la leucina (L) 509

de la secuencia de EntF, por ello se escogió el consenso de acuerdo al alineamiento con los otros tres métodos utilizados.

```

      *           480           *           500           *           520
EntF:  I V A E Q A A K T E D A P A L A D A R Y C F S Y R E M R E Q V V A L A N L - L R E H G V K P G D S V A V A L P R S
T-Coffee: L E E E Q V S K R P N N V A I V C E N E Q L T Y E L N V K A N Q L A R I - F I E K G I G R D T I V G I M M E R S
ProbCons: L E E E Q V S K R P N N V A I V C E N E Q L T Y E L N V K A N Q L A R I - F I E K G I G R D T I V G I M M E R S
ClustalW: L E E E Q V S K R P N N V A I V C E N E Q L T Y E L N V K A N Q L A R I F I E - K G I G K D T I V G I M M E R S
MUSCLE:  L E E E Q V S K R P N N V A I V C E N E Q L T Y E L N V K A N Q L A R I - F I E K G I G R D T I V G I M M E K S

Consenso: L E E E Q V S K R P N N V A I V C E N E Q L T Y E L N V K A N Q L A R I - F I E K G I G R D T I V G I M M E K S

```

**Figura 6. Esquema de la confección manual de un alineamiento consenso a partir de cuatro metodologías de alineamiento múltiple.** Se muestra un segmento de la secuencia de la sintetasa EntF que comprende de los residuos 471 a 527 y los alineamientos producidos por los cuatro métodos utilizados (T-Coffee, ProbCons, ClustalW y MUSCLE) y el consenso generado manualmente.

El modelamiento por comparación se realizó utilizando el programa Modeller 8v2 (Sali y Blundell, 1993). En cada experimento de modelamiento se generaron 5 modelos de la proteína y para cada una de ellas 4 modelos de *loop*, lo que generó un total de 20 modelos. De éstos se escogió aquel que presentaba un menor valor de función objetiva. La evaluación de los modelos fue realizada con los programas Prosa II (*Protein structure análisis*; Sippl, 1993) y Verify3D ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/); Bowie y cols., 1991; Luthy y cols., 1992).

### 2.2.23.1. Análisis de mutaciones correlacionadas.

Durante la evolución de las proteínas, algunas sustituciones ocurren de manera coordinada debido a la interacción entre residuos. Al estar éstas bajo presión selectiva las mutaciones en residuos involucrados en interacciones productivas deben ser compensadas por una mutación complementaria en el residuo de contacto para mantener la estructura y/o función de la proteína. La información extraída de

alineamientos múltiples de familias de proteínas permite mejorar la predicción de contactos dentro de una proteína, siendo la interacción entre dominios de una misma proteína la fuente de información más fiable entre contactos estables y permanentes entre pares de aminoácidos que se correlacionan para mantener la función y estructura de la proteína. Para determinar pares de residuos correlacionados dentro de la secuencia de EntF se utilizaron los alineamientos múltiples generados durante el modelamiento. Con esto se alimentaron dos servidores que extraen pares de residuos correlacionados: el primero PlotCorr aporte del Dr. Florencio Olmea, Centro Nacional de Biotecnología, España (*Prediction of residue contacts in proteins using correlated mutations*; <http://www.pdg.cnb.uam.es/pazos/plotcorr.html>; Olmea y Valencia, 1997; Pazos y cols., 1997) y el segundo Crasp (*Correlation analysis of the amino acid substitutions in protein sequences*; <http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/crasp/index.html>; Afonnikov y cols., 2001; Afonnikov y Kolchanov, 2004) que se enfoca principalmente en las propiedades fisicoquímicas de los residuos sustituidos. Se seleccionaron solo los pares de residuos que por ambos métodos presentaron índices de correlación mayores a 0,6. De esta lista de pares de residuos se seleccionaron solo aquellos con una alta accesibilidad a solvente, pues para situar los modelos de los dominios individuales en el contexto del modelo de la sintetasa completa solo eran de interés las interacciones en la superficie de estos modelos. Para seleccionar las pares de residuos que se encuentran expuestos al solvente se utilizaron los modelos generados de cada dominio para alimentar el programa Naccess (*Atomic Solvent Accessible Area Calculations*; Hubbard y Thornton 1992-6 ©; <http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>). Los datos entregados por Naccess se filtraron para seleccionar aquellos residuos con una alta

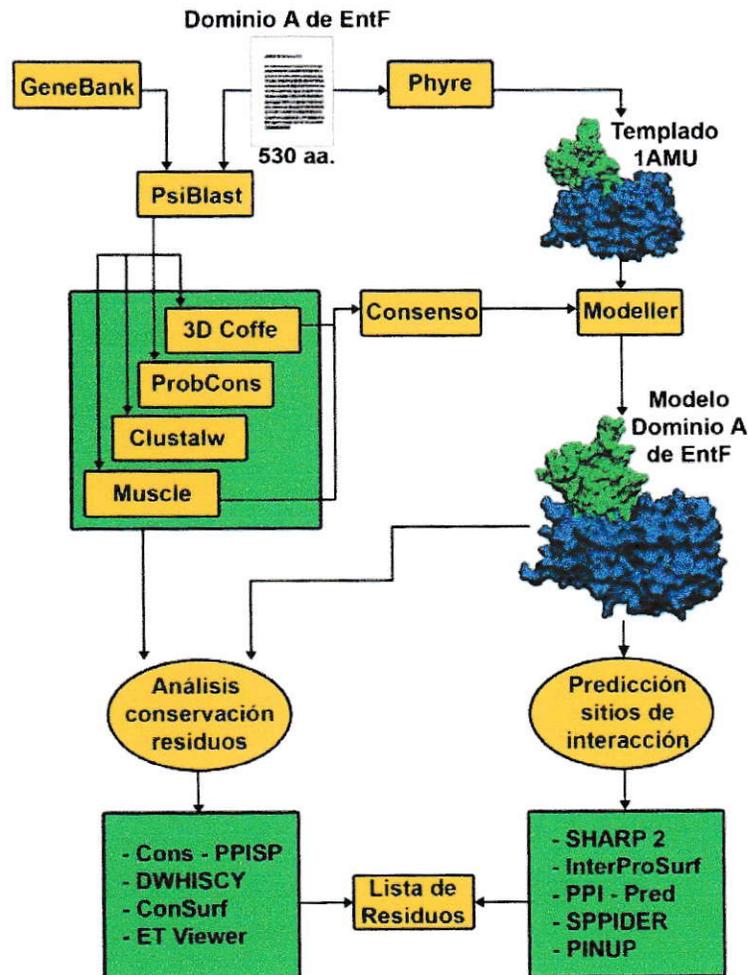
accesibilidad a solvente, parámetro especificado como un área accesible mayor a 10 Å<sup>2</sup>.

#### **2.2.24. Predicción de zonas de interacción proteína-proteína.**

La predicción de zonas de interacción proteína-proteína por métodos bioinformáticos presenta dos grandes ramas: el análisis de propiedades de la superficie molecular para encontrar parches con propiedades que favorezcan la interacción con otras proteínas y la búsqueda de zonas altamente conservadas en la superficie. Para generar una lista de residuos con alta probabilidad de formar parte de una interfase de interacción se siguió el protocolo que se esquematiza en la figura 7.

Luego de la generación del modelo molecular del dominio A de EntF, se utilizaron servidores o programas de libre uso para la comunidad científica para predecir zonas de interacción proteína-proteína. La lista de los servidores utilizados se muestra en la tabla 6. Estos se dividen en dos grupos: aquellos que utilizan solo la estructura de la proteína para llevar a cabo la predicción, y aquellos que adicionalmente utilizan información de conservación de secuencia. El primer grupo basa sus predicciones en las propiedades geométricas de la superficie o bien en la existencia de residuos con una mayor propensión a encontrarse en interfases, obtenidos de análisis de bases de datos. El segundo método utiliza información de conservación de secuencia obtenida a partir de alineamientos múltiples. En la tabla 7 se listan todos los residuos predichos por cada uno de los servidores como participantes en interfases de interacción proteína-proteína en la superficie del dominio de adenilación de EntF. Para integrar los datos obtenidos por distintos tipos de predicciones y establecer el conjunto de residuos que con mayor probabilidad se encuentran involucrados en una interacción proteína-proteína, los residuos se

clasificaron de acuerdo al número de veces que los servidores los incluyeron como parte de interfases de interacción y se combinaron los resultados para generar un consenso de predicción (Tabla 8). Utilizando el programa VMD: *Visual Molecular Dynamics* (Humphrey y cols., 1996; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) se mapearon y visualizaron los residuos consenso sobre la estructura del modelo del dominio de adenilación y se determinó el potencial electrostático de superficie del DomA de EntF. Se encontraron 5 zonas sobre la superficie de la proteína con un potencial electrostático de superficie neutro o cercano a neutro.



**Figura 7. Esquema del protocolo utilizado en la predicción de zonas de interacción proteína-proteína en la superficie del dominio de adenilación de EntF.** Se generó un modelo comparativo del dominio de adenilación (A) con el programa Modeller 8v2. El templado estructural (1AMU) del modelo se obtuvo a partir del servidor Phyre. Se generaron alineamientos múltiples usando cuatro algoritmos distintos (3D Coffe, ProbCons, ClustalW y Muscle), de secuencias de sintetasas de péptidos no-ribosomales con la misma estructura modular de EntF encontradas en la base de datos (GeneBank). El alineamiento para el modelamiento se obtuvo del consenso de los alineamientos anteriores. Los alineamientos y el modelo se utilizaron como entrada para cuatro servidores (Cons-PPISP, DWHISCY, ConSurf y ET Viewer) de predicción de zonas de interacción que se basan en la conservación de secuencia. El modelo se utilizó como entrada para cinco servidores (SHARP 2, InterProSurf, PPI-Pred, SPPIDER y PINUP) que buscan la presencia de residuos superficiales frecuentes en interfases.

**Tabla 6. Programas utilizados para la predicción de zonas de interacción proteína-proteína en el dominio de adenilación de EntF.**

Nombre	Servidor	Referencias
<b>Servidores que utilizan solo información estructural</b>		
<b>SHARP2</b> - <i>A server for the prediction of protein interaction sites on the surface of protein structures.</i>	<a href="http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/SHARP2/sharp2.html">http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/SHARP2/sharp2.html</a>	Jones y Thornton, 1996; Jones y Thornton, 1997a; Jones y Thornton, 1997b; Murakami y Jones, 2006
<b>PPI-pred</b> – <i>Protein Protein Interface prediction</i>	<a href="http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/ppi_pred/">http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/ppi_pred/</a>	Bradford y Westhead, 2005
<b>SPPIDER</b> - <i>Solvent accessibility based Protein-Protein Interface iDentification and Recognition</i>	<a href="http://sppider.cchmc.org/">http://sppider.cchmc.org/</a>	Porollo y Meller, 2007
<b>PINUP</b> - <i>Protein binding site prediction with an empirical scoring function</i>	<a href="http://sparks.informatics.iupui.edu/PINUP/">http://sparks.informatics.iupui.edu/PINUP/</a>	Liang y cols., 2006
<b>InterProSurf</b> - <i>Protein Protein Interaction Server</i>	<a href="http://curie.utmb.edu/prosurf.html">http://curie.utmb.edu/prosurf.html</a>	Negi y cols., 2007
<b>Servidores que utilizan información estructural y de secuencia</b>		
<b>cons-PPISP</b> – <i>consensus protein protein interaction site prediction</i>	<a href="http://pipe.scs.fsu.edu/ppisp.html">http://pipe.scs.fsu.edu/ppisp.html</a>	Zhou y Shan, 2001; Chen y Zhou, 2005
<b>WHISCY</b> – <i>what information does surface conservation yield</i>	<a href="http://www.nmr.chem.uu.nl/whiscy/">http://www.nmr.chem.uu.nl/whiscy/</a>	de Vries y cols., 2006
<b>ConsSurf</b> - <i>Server for the Identification of Functional Regions in Proteins</i>	<a href="http://consurf.tau.ac.il/">http://consurf.tau.ac.il/</a>	Glaser y cols., 2003; Landau y cols., 2005
<b>ETviewer</b> - <i>Evolutionary Trace viewer</i>	<a href="http://mammoth.bcm.tmc.edu/traceviewer/index.html">http://mammoth.bcm.tmc.edu/traceviewer/index.html</a>	Lichtarge y cols., 1996; Mihalek y cols., 2004; Morgan y cols., 2006

**Tabla 7. Residuos del dominio de adenilación de EntF predichos por cada método que formarían parte de una interfase de interacción proteína-proteína.**

Nombre	Residuos predichos que formarían parte de una interfase
<b>Residuos predichos por métodos que utilizan información estructural y de secuencia</b>	
<b>cons-PPISP – consensus protein interaction site prediction</b>	186 188 189 190 191 192 193 194 228 230 329 330 331 375 376 377 379 380 381 412 428 429 435 446 447 448 449 490 514 515 516 517 518 520 521 522 523 532 533 534
<b>WHISCY – what information does surface conservation yield</b>	123 126 129 186 187 188 189 190 191 192 197 227 279 306 307 331 371 374 378 380 382 383 389 394 398 399 400 401 402 403 404 405 406 408 409 411 414 415 417 420 422 426 435 438 439 440 442 444 446 447 449 453 529 530 531 533 534 535 536 537 538 540 542
<b>ConfSurf - Server for the Identification of Functional Regions in Proteins*</b>	21 41 52 54 64 65 68 70 78 84 97 98 100 119 120 123 126 161 186 187 188 189 190 191 227 257 258 271 300 306 307 308 310 331 360 371 378 380 381 383 389 394 398 399 402 403 404 406 408 411 417 420 422 426 430 431 435 438 440 442 443 444 446 447 449 453 454 456 462 490 506 514 516 518 529 530 531 533 534 535 536 537 538 540 542 545
<b>ETviewer - Evolutionary Trace viewer</b>	447 438 422 186 383 529 444 123 187 449 389 535 440 126 484 52 403 307 191 306 426 446 454 84 534 411 188 431 190 537 442 119 371 331 514 97 380 417 435 402 420 384 443 456 271 349 533 378 530 538 308 490 506 516 430 399 394 257 120 189
<b>Residuos predichos por métodos que utilizan información estructural</b>	
<b>SHARP2 - A server for the prediction of protein interaction sites on the surface of protein structures.</b>	<b>A:</b> 21 22 24 25 28 249 366 374 375 378 380 381 382 383 412 426 428 <b>B:</b> 58 62 63 64 72 76 79 95 96 98 100 103 142 143 144 145 146 156 157 158 160 161 162 163 164 165 <b>C:</b> 445 459 468 471 473 474 475 478 481 482 483 484 490 492 493 499 500 502 505 506 510 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 542 543 544 545 546 547 548
<b>InterProSurf – Protein Protein Interaction Server</b>	<b>A:</b> 60 61 62 63 96 97 98 100 373 374 375 408 409 411 38 41 42 87 88 172 173 174 176 177 178 179 18 19 20 21 22 23 315 342 344 345 346 347 <b>B:</b> 24 26 27 30 360 142 143 158 160 161 163 164 165 167 464 466 495 496 497 498 499 523 524 526 527 251 252 253 255 256 257 258 259 260 263 267 268 262 282 284 286 287 295 316
<b>PPI-pred– Protein Protein Interface prediction</b>	<b>A:</b> 90 114 119 122 123 126 130 133 180 183 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 197 199 224 225 226 227 228 229 230 255 279 306 307 308 327 329 330 331 332 333 358 384 392 393 394 395 396 397 400 402 403 404 405 406 407 417 420 422 423 424 435 438 439 440 441 453 456 457 528 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 <b>B:</b> 59 60 61 62 63 64 68 71 72 76 78 79 81 82 83 85 95 96 97 98 99 100 103 104 110 120 121 137 138 140 142 143 144 145 146 147 148 149 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 <b>C:</b> 442 443 444 445 446 447 448 449 451 452 454 458 461 462 471 472 474 475 476 477 478 480 481 482 483 484 485 486 487 488 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 542 543 544 545 546 547 548
<b>SPPIDER -Solvent accessibility based Protein-Protein Interface iDentification and Recognition</b>	18 19 20 21 22 24 25 30 37 59 62 63 64 76 81 83 84 100 119 122 123 137 143 155 156 158 160 161 163 164 165 170 172 173 174 175 176 186 187 188 189 190 191 192 193 227 256 257 258 282 283 287 289 290 291 292 320 323 360 368 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 390 394 400 404 407 408 409 411 412 413 414 415 416 417 420 422 426 429 431 439 440 442 443 444 445 446 447 448 449 475 482 483 485 486 495 498 499 501 502 503 505 506 510 514 515 516 517 518 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 542 543 545 547 548
<b>PINUP - Protein binding site prediction with an empirical scoring function</b>	22 26 55 58 59 60 61 62 63 64 98 99 100 138 139 141 143 156 157 158 159 160 161 163 164 213 214 248 250 251 268 303 326 327 340 341 342 344 356 357 359 360 368 369 371 372 373 374 375 376 377 378 381 382 383 384 385 386 408 409 411 412 420 431 432

A, B y C: resultados expresados por los servidores en grupos de residuos o parches de interacción.

**Tabla 8. Consenso de los datos de predicción por conservación de secuencia y propensión a la formación de interfases en el dominio de adenilación de EntF.**

Numero de métodos que encuentran los residuos	Lista de Residuos
<b>Consenso de métodos que utilizan información estructural y de secuencia</b>	
1	21 41 54 64 65 68 70 78 98 100 129 161 193 194 197 228 230 258 279 300 310 329 330 349 360 374 375 376 377 379 382 384 400 401 405 409 412 414 415 428 429 439 448 462 484 515 517 520 521 522 523 532 545
2	52 84 97 119 120 192 227 257 271 308 381 398 404 406 408 430 431 443 453 454 456 506 518 531 536 540 542
3	123 126 187 306 307 371 378 383 389 394 399 402 403 411 417 420 422 426 438 440 442 444 490 514 516 529 530 535 537 538
4	186 188 189 190 191 331 380 435 446 447 449 533 534
<b>Consenso de las predicciones basadas en información estructural</b>	
1	23 27 28 37 38 41 42 55 68 71 78 82 84 85 87 88 90 104 110 114 120 121 126 130 133 139 140 141 147 148 149 154 166 168 170 175 177 178 179 180 183 185 194 197 199 213 214 224 225 226 228 229 230 248 249 250 252 253 259 260 262 263 267 279 283 284 286 289 290 291 292 295 303 306 307 308 315 316 320 323 326 329 330 331 332 333 340 341 345 346 347 356 357 358 359 366 369 379 385 386 390 392 393 395 396 397 402 403 405 406 413 414 415 416 423 424 428 429 432 435 438 441 451 452 453 454 456 457 458 459 461 462 464 466 468 472 473 476 477 480 487 488 490 492 493 496 497 504 507 508 509 511 512 529 532 533 534 535 536 537 538 539
2	18 19 20 25 26 30 58 72 79 81,83 95 97 99 103 119 122 123 137 138 144 145 146 155 159 162 167 172 173 174 176 186 187 188 189 190 191 192 193 227 251 255 256 257 258 268 282 287 327 342 344 368 371 372 376 377 380 394 400 404 407 417 422 426 431 439 440 442 443 444 446 447 448 449 471 474 478 481 484 485 486 495 498 500 501 503 513 519 527 528 530 531 544 546
3	21 24 59 60 61 76 96 142 157 360 373 378 381 382 383 384 408 409 411 412 420 445 475 482 483 502 505 506 510 514 515 516 517 518 520 521 522 525 526 542 543 545 547 548
4	22 64 98 156 165 374 375 499 523 524
5	62 63 100 143 158 160 161 163 164

### 3. RESULTADOS.

Se han realizado varios estudios para entender el proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492 *in vitro*, lo que ha permitido entender la participación de los genes de la maduración (MceCIJ) en este proceso. Sin embargo, no se ha profundizado en el efecto que la modificación post-traducciona l podría tener sobre la estructura conformación y actividad del péptido. Es por eso que el objetivo de este trabajo se centra en el estudio del proceso de modificación post-traducciona l *in vivo* y en el efecto que esta modificación tendría sobre la conformación del péptido, y como consecuencia sobre su actividad. Con respecto al proceso de modificación post-traducciona l es de especial importancia el efecto que la vía de síntesis de metabolitos secundarios que se requiere para la producción del precursor de la modificación post-traducciona l, como lo es la vía de síntesis de los sideróforos de tipo catecol, podría ejercer en la actividad de la MccE492.

#### **3.1. Relación entre la producción de MccE492 activa y la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol.**

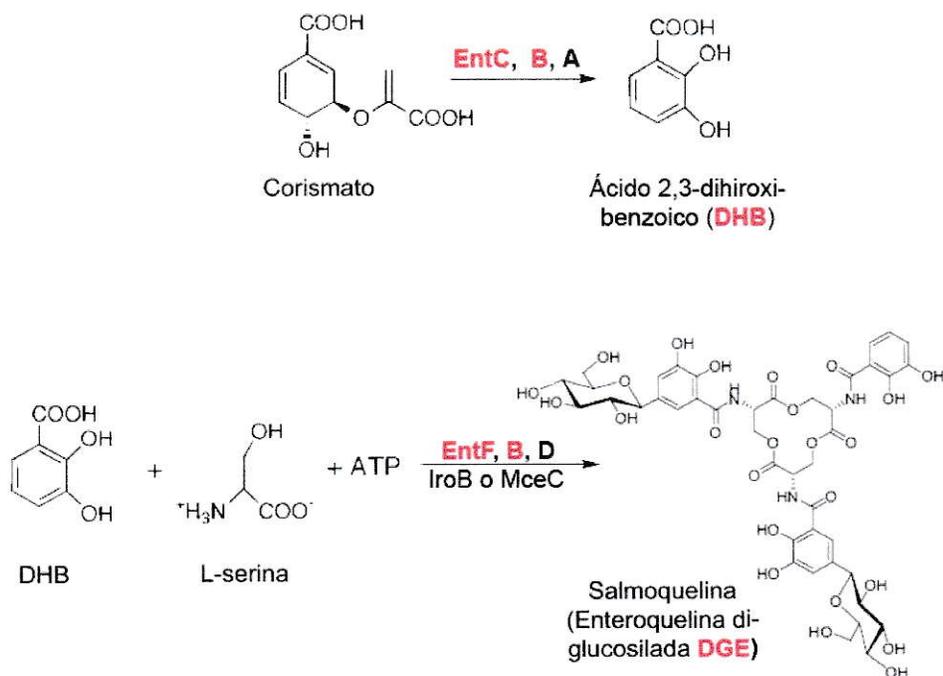
La MccE492 se encuentra modificada post-traducciona lmente por una molécula tipo salmoquelina, unida covalentemente a la serina 84 de su extremo carboxilo. El sistema de captación de hierro mediado por enteroquelina en enterobacterias es inducido en carencia de hierro. Con anterioridad se ha sugerido que la enteroquelina es el precursor de la modificación post-traducciona l de la MccE492, pues al crecer las cepas productoras en medios ricos en hierro se observaba una inhibición de la modificación post-traducciona l (Vassiliadis y cols., 2007). Sin embargo, nada se mencionó con respecto al efecto que tiene la producción de enteroquelina en

la actividad bactericida de la MccE492. Esta actividad bactericida puede ser evaluada cualitativamente mediante la observación de halos de inhibición de crecimiento sobre césped de células sensibles.

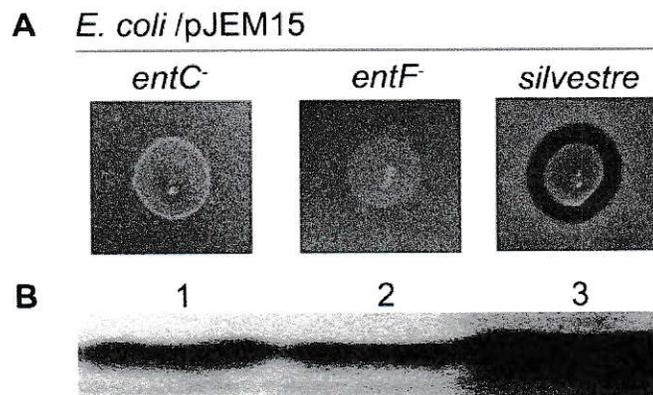
### **3.1.1. Mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina producen MccE492 inactiva.**

Como se ha mencionado con anterioridad la vía de síntesis de enteroquelina se divide en dos etapas: la primera en la que participan EntABC para la producción de DHB a partir de corismato, y la segunda catalizada por EntBDEF que permite la producción del trímero cíclico de DHBS (enteroquelina) a partir de DHB, Ser y ATP. Esta enteroquelina puede ser glucosilada por IroB o MceC para dar lugar a sus derivados glucosilados o salmoquelinas (Figura 8).

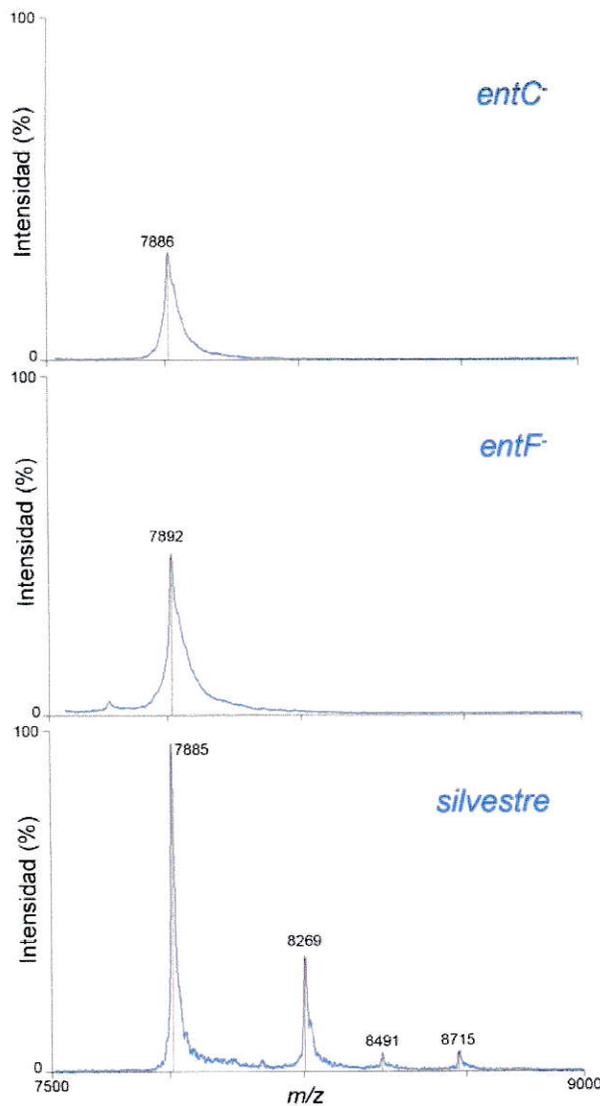
Con el fin de determinar si *in vivo* la enteroquelina es un precursor en la producción de la modificación post-traducciona, cepas mutantes en genes que afectan a cada una de las dos etapas de la síntesis de enteroquelina, se transformaron con el plasmidio pJEM15, que codifica para un sistema sobre-productor de MccE492. Se utilizaron las cepas de *E.coli* H5311 (*entC*) y ER1100 (*entF*). En la figura 9 A se observa que ninguna de las cepas mutantes en genes en la vía de síntesis de enteroquelina produce un halo de inhibición de crecimiento sobre un césped de células sensibles. Se purificó MccE492 desde estas cepas y se analizó la producción de MccE492 mediante hibridación *western* (Figura 9 B), comprobándose que estas cepas producen el péptido, pero que éste no presenta actividad bactericida. Estas muestras purificadas se analizaron mediante MALDI-TOF-MS y se determinó que no se encontraban modificadas post-traduccionalmente, pues no presentaron ninguno de los picos correspondientes a los pesos de las formas modificadas (Figura 10).



**Figura 8. Resumen de la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol.** Esquema que resume la síntesis de sideróforos de tipo catecol en dos etapas. La primera va desde el corismato hasta el ácido 2,3-dihidroxi-benzoico (DHB), y la segunda produce enteroquelina y sus derivados glucosilados a partir de DHB y serina. En rojo se muestran los mutantes utilizados y los sustratos con los que se suplementaron los medios de cultivo a una concentración de 10 mM.



**Figura 9. Producción de MccE492 inactiva en cepas mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina.** **A.** Alícuotas de 3  $\mu$ L de cultivo líquido crecido toda la noche de *E. coli* H5311 (*entC*<sup>-</sup>), *E. coli* ER1100 (*entF*<sup>-</sup>) y *E. coli* VCS257 (*silvestre*) que poseen el sistema pJEM15 sobre-productor de MccE492 fueron sembradas sobre placas de césped sensible (*E. coli* BL21 (DE3)) y la actividad bactericida fue determinada mediante la aparición de halos de inhibición de crecimiento. **B.** SDS-PAGE e hibridación *western* de muestras de MccE492 purificada desde las cepas mencionadas en A (1, *entC*<sup>-</sup>; 2, *entF*<sup>-</sup>; 3, *silvestre*) se realizó como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura 10. Espectros MALDI-TOF-MS de MccE492 purificada desde cepas mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina.** Muestras de MccE492 purificada desde las cepas *E. coli* H5311 (*entC*), *E. coli* ER1100 (*entF*) y *E. coli* VCS257 (*silvestre*) que poseen el sistema sobre-productor de MccE492 pJEM15 fueron mezcladas 1:10 con la matriz CHCA y los espectros fueron obtenidos como la suma correspondientes a 10 barridos de 40 tiros de láser aplicados a diferentes puntos tomados al azar.

Todas las muestras analizadas purificadas desde las diferentes cepas muestran un pico correspondiente a la MH<sup>+</sup> de la MccE492 no modificada (7887 Da), siendo los pesos encontrados de 7885 Da para aislada desde la mutante *entC*, y de 7892 Da para la *entF* y de 7885 para la aislada de la cepa silvestre. Solo la MccE492 purificada desde la cepa de *E. coli* silvestre presentó los otros tres picos correspondientes a las formas modificadas de la MccE492 con unos pesos calculados y encontrados de 8269 y 8272 Da para la modificación correspondiente a Glc-DHB; 8491 y 8495 Da para la Glc-DHB<sub>2</sub>; 8715 y 8718 Da para la Glc-DHB<sub>3</sub> respectivamente. Con los experimentos anteriores establecimos que la enteroquelina es *in vivo* el precursor de la modificación postraducciona l de la MccE492.

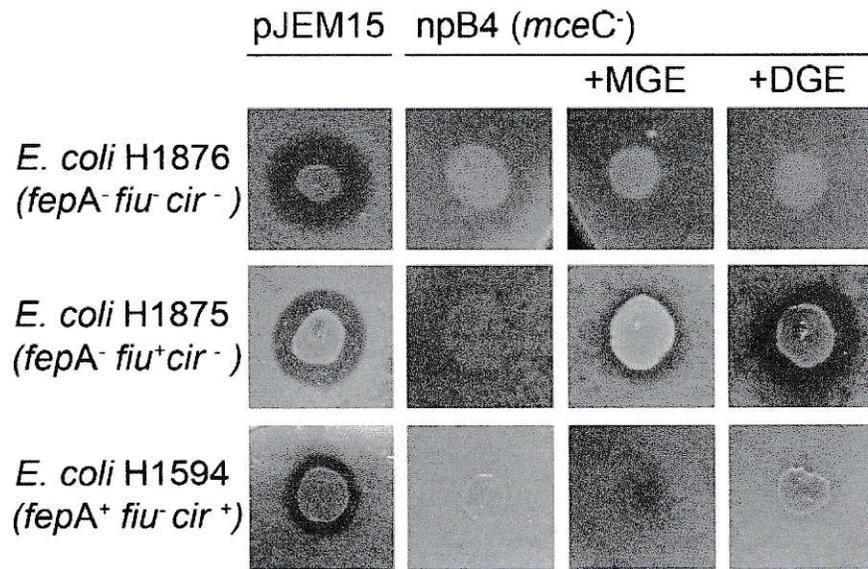
### **3.1.2. Los derivados glucosilados de enteroquelina utilizan principalmente el receptor Fiu para ingresar a células de *E. coli*.**

El receptor de sideróforos IroN codificado en el locus *iroA*, responsable de la producción y utilización de salmoquelinas, ha sido descrito como el receptor para moléculas de tipo enteroquelina glucosilada. Solo cepas patógenas de *S. enterica*, *K. pneumoniae* y *E. coli* codifican para el locus *iroA*, por lo que este locus se ha asociado a virulencia en enterobacterias. Debido a la presencia de este receptor específico en el locus *iroA* se especulaba que las salmoquelinas sólo podían ser internalizadas por cepas que expresaran IroN (discutido en Smith, 2007). Sin embargo con anterioridad en el laboratorio habíamos determinado que las salmoquelinas DGE (enteroquelina diglucosilada) y MGE (enteroquelina monoglucosilada) eran capaces de ingresar a una célula de *E. coli* y servir como sustratos para la modificación postraducciona l de la MccE492 (Mercado, 2007). *E. coli* posee tres receptores de membrana externa para sideróforos de tipo catecol: FepA, Fiu y Cir; que internalizan con diferente afinidad los

sideróforos enteroquelina y sus derivados de hidrólisis (Hantke, 1990). Para evaluar si la internalización de los derivados glucosilados de enteroquelina poseían mayor afinidad por alguno de los receptores de *E. coli*, se transformaron las cepas H1876 (*fepA<sup>-</sup>, fiu<sup>-</sup>, cir<sup>-</sup>*), H1875 (*fepA<sup>-</sup>, fiu<sup>+</sup>, cir<sup>-</sup>*) y H1594 (*fepA<sup>+</sup>, fiu<sup>-</sup>, cir<sup>+</sup>*) con pJEM15 y npB4 (*mceC<sup>-</sup>*). Como se observa en la figura 11 las tres cepas analizadas fueron capaces de producir halos de inhibición de crecimiento en un césped sensible al ser transformadas con pJEM15. Las cepas transformadas con npB4, mutante en el gen de la maduración *mceC*, no presentan halos de inhibición. Al ser transcomplementadas con los derivados mono (MGE) y di (DGE) glucosilados de enteroquelina, la cepa que expresa el receptor Fiu (*E. coli* H1875) produce un halo de inhibición de crecimiento muy parecido a su control (*E. coli* H1875/pJEM15), en cambio la que no expresa este receptor (*E. coli* H1594) produce un halo de inhibición tenue. Concluimos que tanto la salmoquelina MGE como la DGE estarían utilizando principalmente el receptor de membrana externa Fiu para ingresar a la célula de *E. coli* y ser utilizadas como sustrato para la modificación.

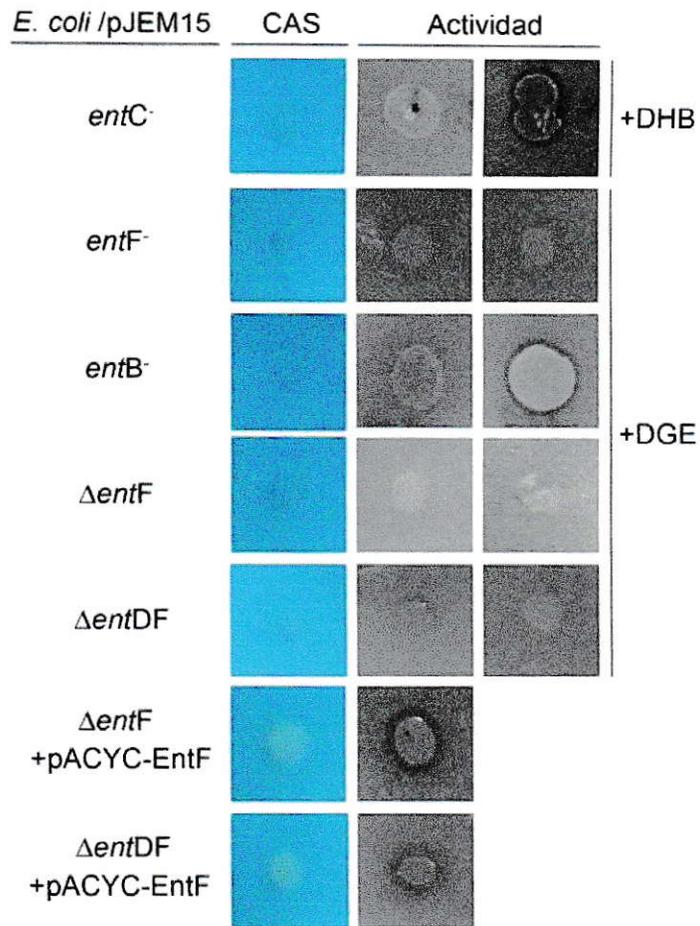
### **3.1.3. La producción de MccE492 activa requiere de la sintetasa EntF.**

La enteroquelina es el precursor de las moléculas de salmoquelina con las que se modifica la MccE492, por lo que mutantes en la vía de síntesis de estos sideróforos solo producen MccE492 no-modificada y sin actividad bactericida. El fenotipo de estas mutantes debería revertirse al agregar al medio de cultivo un producto posterior a la acción del producto génico del gen mutado. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos utilizando las siguientes cepas de *E. coli*: H5311 mutante en *entC*, que participa en la primera etapa de la vía de síntesis, a la cual se le adicionó DHB; ER1100A mutante en *entF*, que actúa en la segunda etapa de la vía de síntesis, con



**Figura 11. Transcomplementación con MGE y DGE de cepas de *E. coli* mutantes en receptores para sideróforos de tipo catecol.** Se sembraron alícuotas de 3  $\mu$ L de cultivos líquidos de las cepas de *E. coli* H1876 (*fepA*<sup>-</sup>, *fiu*<sup>-</sup>, *cir*<sup>-</sup>), H1875 (*fepA*<sup>-</sup>, *fiu*<sup>+</sup>, *cir*<sup>-</sup>) y H1594 (*fepA*<sup>+</sup>, *fiu*<sup>-</sup>, *cir*<sup>+</sup>) transformadas con pJEM15 o con npB4 sobre placas de césped sensible. La transcomplementación se realizó depositando sobre la alícuota seca del cultivo, alícuotas de 3  $\mu$ L de las salmoquelinas MGE o DGE 1 mM. Después de ser incubadas 18 h a 37°C se observó la aparición de halos de inhibición de crecimiento.

enteroquelina diglucosilada (DGE); y la cepa K12 *entB*<sup>-</sup>, siendo EntB una enzima bifuncional que actúa en ambas etapas de la vía de síntesis, con DGE. De estos ensayos de transcomplementación se observaron halos de inhibición de crecimiento, como indicador de la producción de MccE492 activa, en las mutantes en *entC* y *entB*, pero no en el caso de la cepa mutante en *entF* (Figura 12). Para descartar que este resultado sea producto de algo inusual en esta cepa, se realizaron ensayos con dos cepas adicionales también deficientes en el gen *entF*, la cepa HR1300H  $\Delta entF$  y la cepa H1885  $\Delta entDF$ , las cuales fueron suplementadas con DGE. En estos dos casos adicionales obtuvimos el mismo resultado que con la cepa inicial *entF*<sup>-</sup>, es decir no se observó la producción de halos de inhibición de crecimiento. Todas las cepas fueron evaluadas en su capacidad para producir sideróforos de tipo catecol creciéndolas sobre placas indicadoras de cromo azurol o placas CAS, sobre las cuales una cepa productora de estos quelantes de hierro forma un halo de color amarillo. Como control positivo, las cepas mutantes  $\Delta entF$  y  $\Delta entDF$  fueron transformadas con el plasmidio pACYC-EntF, que expresa el gen *entF* clonado en un vector compatible con aquel que contiene el sistema productor de MccE492 (Figura 12). De este modo fue posible obtener la complementación completa de fenotipo con la formación de halos de inhibición de crecimiento y producción de sideróforos. De estos resultados podemos deducir que el producto génico de *entF* es necesario para producción de MccE492 activa en un proceso distinto a la producción de enteroquelina como precursor de la molécula con la cual este péptido se modifica post-traduccionalmente.



**Figura 12. Recuperación de la actividad bactericida en cepas deficientes en la vía de síntesis de enteroquelina mediante transcomplementación y complementación.** Alícuotas de 3  $\mu$ L de las cepas de *E. coli* mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina H5311 (*entC*<sup>-</sup>), ER1100A (*entF*<sup>-</sup>), K12 (*entB*<sup>-</sup>), HR1300H ( $\Delta entF$ ) y H1885 ( $\Delta entDF$ ) transformadas con el sistema productor de MccE492 (pJEM15) fueron suplementadas con 1 mM de DHB o DGE (derecha). Las cepas HR1300H ( $\Delta entF$ )/pJEM15 y H1885 ( $\Delta entDF$ )/pJEM15 fueron complementadas con el plasmidio pACYC-EntF (abajo). Se determinó la producción de sideróforos tipo catecol sobre placas CAS y actividad la bactericida sobre placas de césped sensible.

### 3.2. Construcción de un modelo molecular de la sintetasa de péptidos no-ribosomal EntF de *E. coli*.

EntF es una sintetasa de péptidos no-ribosomal con cuatro dominios funcionales, necesaria para la producción de MccE492 activa, ya que participa en la síntesis del precursor para la modificación post-traducciona l de este péptido bactericida. Nuestros resultados indican que su participación en la producción de MccE492 activa no se limita a la síntesis del precursor enteroquelina, sino que tendría una función adicional en este proceso que aún no se ha investigado. Para comprender la función dual de EntF en la producción de MccE492 activa nos propusimos dos hipótesis de trabajo. Una de las posibilidades es que uno o más de los dominios de la sintetasa EntF participe en la formación del enlace éster entre la molécula de salmoquelina y la serina 84 del péptido, a ésta la denominamos **hipótesis catalítica**. La otra posibilidad es que uno o más de los dominios de EntF reclute o sirva de anclaje para las proteínas de la maduración propias del sistema productor de MccE492 (MccCIJ) encargadas de la catálisis del enlace éster, a esta la denominamos **hipótesis de interacción**.

EntF es una proteína de 104 kDa, implicada en la síntesis de los sideróforos enteroquelina y salmoquelina en enterobacterias. Esta compuesta por cuatro dominios independientes que poseen cuatro actividades catalíticas diferentes: de condensación, de adenilación, de unión de péptidos, y tioesterasa. La hipótesis catalítica se sustenta en la observación de que el enlace éster presente entre la serina 84 y la salmoquelina es similar a los que ocurren en la síntesis de lípidos, polikétidos y análogo al enlace amida presente en péptidos de síntesis no-ribosomal. Todas estas vías de síntesis son

homólogas y catalizan reacciones similares que comparten la necesidad de un carboxilo para la adenilación, un intermediario covalente entre el carboxilato y una ACP (*acyl carrier protein*) o PCP, y un grupo alcohol que funciona como aceptor, que para el caso de la modificación post-traducciona de la MccE492 podría tratarse de la activación del carboxilato de la serina 84, la formación de un intermediario covalente y su posterior transferencia al alcohol de la glucosa. Esta última reacción es catalizada por acil transferasas, grupo de enzimas con las cuales la proteína de la maduración Mcel comparte similitud. Para el caso de la hipótesis de interacción en que EntF funcionaría como proteína de anclaje o reclutadora, esta sintetasa debería presentar zonas de interacción proteína-proteína. Una de sus posibles funciones como proteína de anclaje podría ser disminuir la concentración crítica de los sustratos y enzimas implicadas en la producción del enlace éster y permitir el uso de la enteroquelina como sustrato de la modificación antes de que sea secretada al medio extracelular.

Debido a la falta de información estructural acerca de este tipo de sintetetasas, no nos era posible diseñar mutantes en putativos residuos catalíticos o de interacción, para discernir entre alguna de las hipótesis antes expuestas. Por esta razón nos decidimos a realizar un análisis bio-informático y generar un modelo 3D de EntF. Para realizar el modelo molecular utilizamos la secuencia de EntF de *E.coli* K12, que tiene 1293 residuos (GI: 15829879). La primera etapa consistió en la búsqueda de patrones estructurales, para usar como templados o moldes en el proceso de modelamiento, utilizando el servidor de *threading* Phyre. Se eligieron los patrones estructurales con mejor valor esperado (E-value), que son los que se esquematizan en la figura 13.

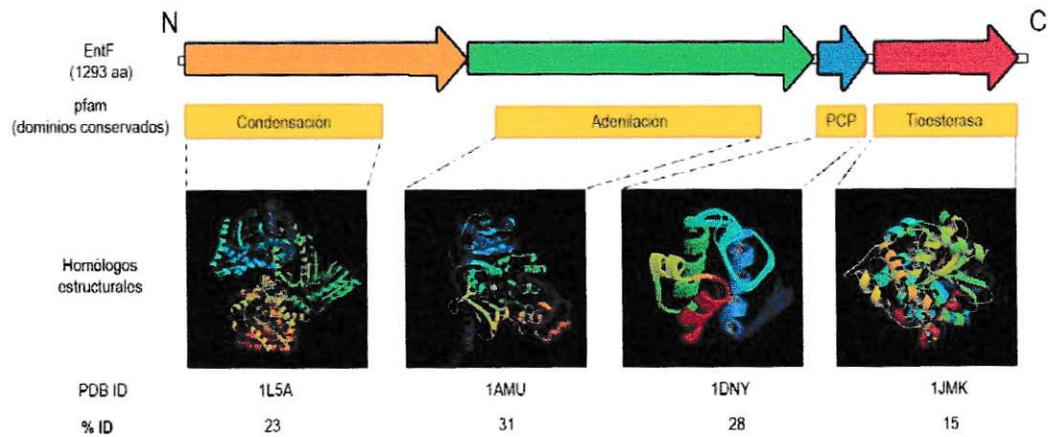
Se buscaron secuencias en las bases de datos para generar los alineamientos múltiples para posteriormente alinear la secuencia de EntF con los patrones estructurales encontrados. Para esto se realizó un PsiBlast de 4 iteraciones y 8000

secuencias cada una. Para depurar las secuencias obtenidas por PsiBlast se utilizó como criterio que las secuencias tuvieran un tamaño parecido a EntF (entre 1200 y 1400), de modo de asegurarse de que se trate de ortólogos y no de parálogos.

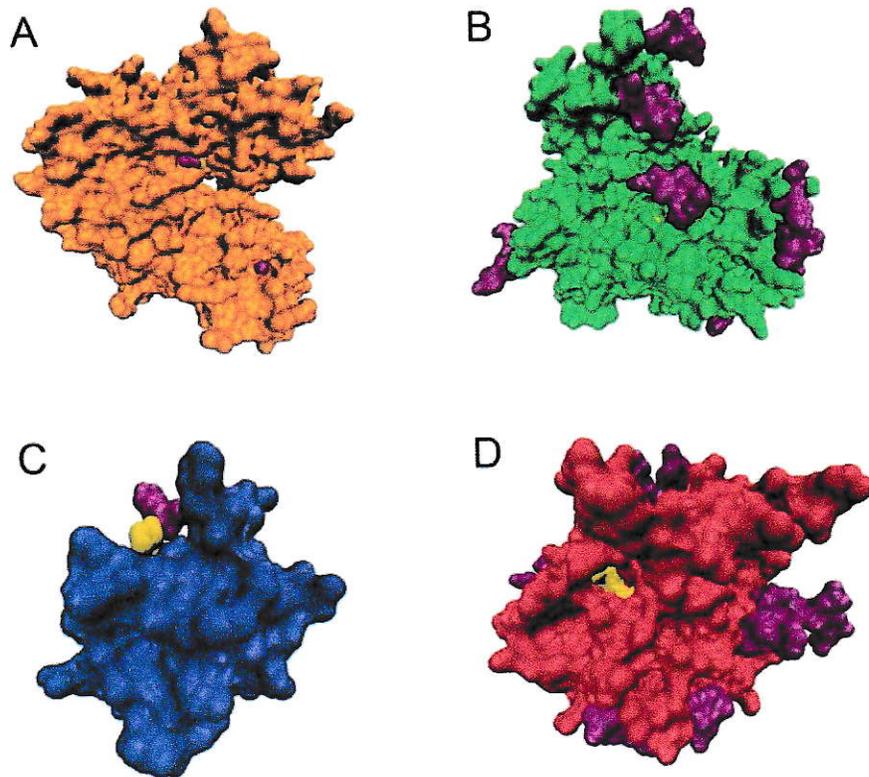
La mayoría de las secuencias encontradas que tienen un tamaño entre 1200 y 1400 residuos poseen una identidad de secuencia con EntF entre un 20-35%. Un conjunto de 50 secuencias que cumplían la condición de ortología fueron alineadas con la secuencia patrón (EntF de *E. coli* K12) utilizando cuatro métodos diferentes de alineamiento múltiple, con los cuales se creó manualmente un alineamiento consenso. Los patrones estructurales y los alineamientos consenso fueron utilizados como entrada para el programa Modeller 8v2 y se obtuvieron modelos de cada dominio de forma individual. En la figura 14 se muestran los modelos de cada dominio, seleccionados y evaluados con los programas Prosa II y Verify3D.

Es importante destacar que en el caso del modelo generado para el dominio de adenilación se observan dos sub-dominios. La presencia de abundantes moléculas de aguas cristalográfica en el surco que se forma entre ambos sub-dominios en el templado de este modelo sugiere que éstos podrían ser móviles dentro de la estructura.

Una vez obtenidos los modelos para cada dominio de EntF se realizó un análisis de mutaciones correlacionadas para predecir interacciones entre pares de residuos ubicados en diferentes dominios (inter-dominio) y dentro del mismo dominio (intra-dominio), con el fin de situar estos dominios en el contexto de la estructura de la sintetasa completa.



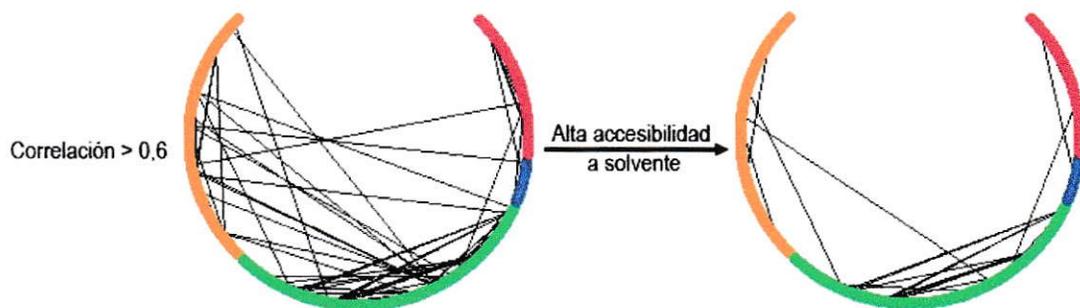
**Figura 13. Esquema de la secuencia de EntF, sus dominios y homólogos estructurales.** Dentro de la secuencia de EntF de *E. coli* K12 de 1293 residuos, es posible distinguir cuatro dominios definidos por pfam. De amino (N) a carboxilo (C) terminal encontramos: el de condensación, adenilación, PCP y tioesterasa. Con el servidor Phyre se encontraron y seleccionaron homólogos estructurales para cada uno de estos dominios con los identificadores (ID) del PDB (*protein data bank*) y porcentajes de identidad (% ID) que se indican.



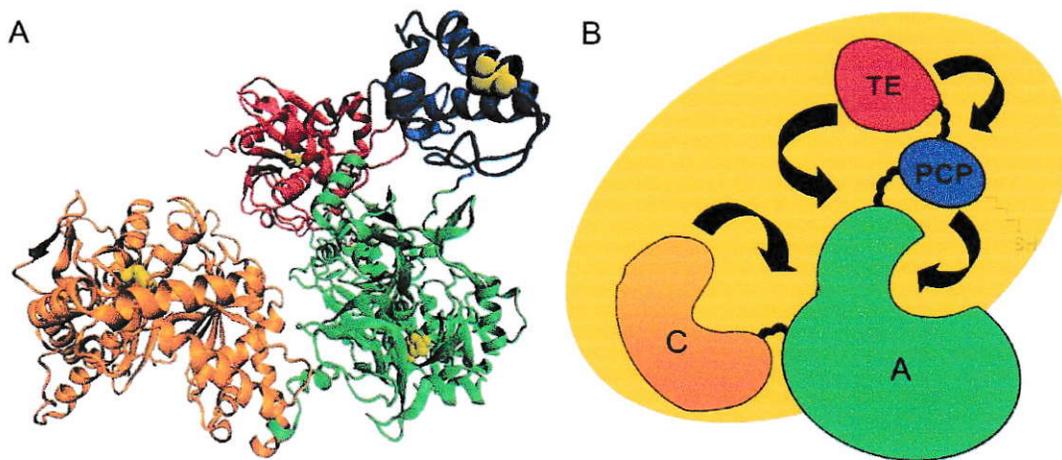
**Figura 14. Modelos obtenidos para cada uno de los dominios de EntF.** Vista de los modelos obtenidos para el dominio de condensación (A), adenilación (B), PCP (C), tioesterasa (D). En amarillo se muestran los putativos aminoácidos catalíticos y en morado las zonas peor evaluadas dentro de cada modelo.

Los alineamientos obtenidos se utilizaron para alimentar los programas PlotCorr y Crasp. Los datos obtenidos se filtraron para pares de residuos que presentaron índices de correlación mayores a 0,6 con ambos métodos y luego se seleccionaron solo aquellos pares con una alta accesibilidad a solvente. En la representación gráfica de estos resultados que se muestran en la figura 15, se observan interacciones discretas entre pares de residuos ubicados en diferentes dominios (inter-dominio). Por ejemplo, observamos que el dominio de adenilación posee residuos correlacionados con otros ubicados en el dominio de condensación y en el dominio tioesterasa, así como también se observa un par correlacionado entre el dominio PCP y el tioesterasa. Este resultado sugiere interacciones transientes o dinámicas entre los diferentes dominios de EntF. También se observan interacción intra-dominio para el dominio de adenilación, lo que sugiere interacción entre diferentes zonas de la superficie de este dominio y posiblemente entre los dos sub-dominios móviles.

Utilizando la información obtenida del análisis de mutaciones correlacionadas se construyó un modelo para la sintetasa completa (Figura 16). Del análisis de los datos obtenidos en el proceso de modelamiento, así como del modelo final se pudo concluir que los dominios de EntF deben interactuar de manera secuencial durante el proceso de catálisis, lo que explicaría como es que esta sintetasa pondría ser intervenida por otras proteínas. El dominio de adenilación presenta una zona libre de interacciones, en la superficie del sub-dominio mayor, que lo convierte en un buen candidato para la interacción con otras proteínas. Además este dominio reconoce específicamente serinas y posee una actividad catalítica de activación de AMP compatible con la formación del enlace entre la serina 84 de la microcina y la molécula tipo salmoquelina con la que se modifica post-traduccionalmente.



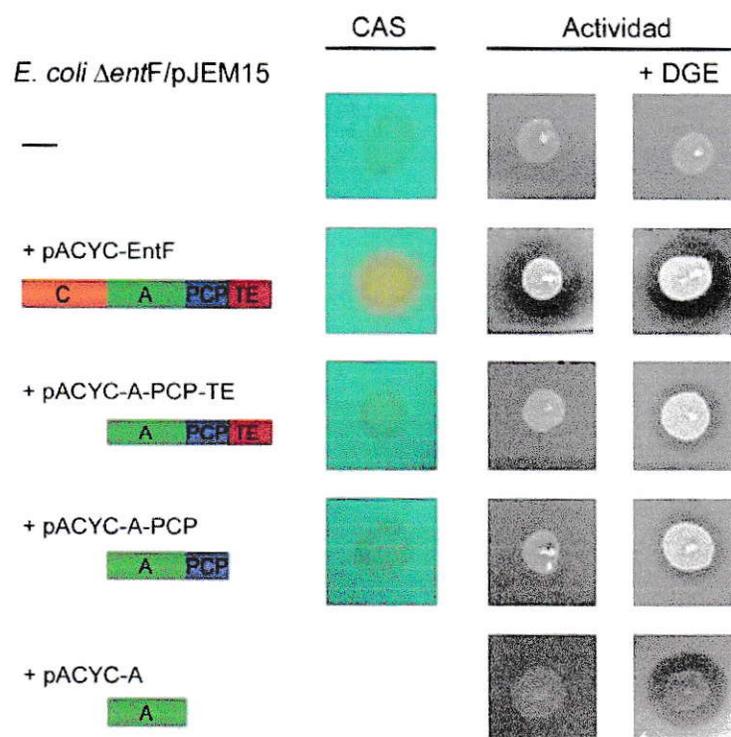
**Figura 15. Representación gráfica de los resultados obtenidos del análisis de mutaciones correlacionadas.** Los cuatro dominios de EntF están representados con los colores naranja para el de condensación, verde para el de adenilación, azul para el PCP y rojo para el tioesterasa. Las líneas se trazaron entre pares de residuos dentro de la secuencia de EntF que presentaron correlaciones mayores a 0,6 (izquierda). Se seleccionaron de estos pares de residuos aquellos que presenta una alta accesibilidad al solvente (derecha).



**Figura 16. Modelo molecular de la sintetasa EntF de *E. coli*.** En naranja el dominio de condensación (C), en verde el dominio de adenilación (A), en azul el dominio de unión a proteína (PCP) y en rojo el dominio tioesterasa (TE) **A.** Vista del modelo molecular de EntF. **B.** Esquema del modelo de EntF en el que las flechas indican las interacciones dinámicas inter-dominio, las uniones móviles entre dominios y la zona amarilla donde se concentran las interacciones entre residuos.

### **3.3. La producción de MccE492 activa requiere solo del dominio de adenilación de la sintetasa EntF.**

Como se mencionó, EntF posee cuatro dominios independientes, con actividades catalíticas o aceptora de péptidos diferentes, todos los cuales son necesarios para la producción de enteroquelina. Sin embargo es razonable pensar que no todos estos dominios y/o sus actividades sean necesarios en la producción de MccE492 activa. La información entregada por el modelo molecular apuntan al dominio de adenilación como el posible implicado en la producción de MccE492 activa. Para determinar si alguno de los dominios de EntF es o son dispensables en el proceso de modificación de la MccE492, se hicieron construcciones que expresan combinaciones de estos dominios. Se evaluó si algunas de las construcciones eran capaces de complementar la producción de MccE492 activa en una cepa mutante en EntF suplementada con salmoquelina. Se transformaron las construcciones con los dominios de EntF (pACYC-A-PCP-TE, pACYC-A-PCP y pACYC-A) sobre la cepa ER1300H ( $\Delta entF$ )/pJEM15. Todas las cepas obtenidas eran defectuosas en la producción de enteroquelina, como se comprobó al crecerlas sobre placas indicadoras CAS (Figura 17). A su vez, todas estas construcciones fueron capaces de producir halo de inhibición de crecimiento al ser transcomplementadas con salmoquelina DGE, por lo que se puede concluir que el dominio de adenilación (A) de EntF es suficiente para la modificación post-traducciona l de la MccE492 *in vivo*. Este resultado concuerda con las conclusiones obtenidas del modelo 3D de esta sintetasa, que apuntan a este dominio como el candidato más probable para participar con un papel dual en la producción de MccE492 activa.



**Figura 17. La producción de MccE492 activa requiere del dominio de adenilación de EntF.** Las cepas de *E. coli* ( $\Delta entF$ ) ER1300H/pJEM15 transformada con las construcciones pACYC-A-PCP-TE, pACYC-A-PCP y pACYC-A. Alícuotas (3  $\mu$ L) de cultivos se crecieron sobre placas CAS, para determinar la producción de enteroquelina y sobre placas de césped sensible para determinar la producción de MccE492 activa. Alícuotas de estas cepas se transcomplementaron con 3  $\mu$ L de salmoquelina DGE (panel derecho). Se utilizó como control negativo la cepa ER1300H/pJEM15 y como control positivo la misma cepa complementada con el plasmidio compatible pACYC-EntF.

Estos experimentos nos permiten acotar la participación de EntF en la modificación postraduccional de la MccE492 a uno de sus dominios modulares (el dominio de adenilación), pero no permiten discernir si la participación de este dominio es mediante su actividad catalítica o si se trata más bien de un rol en el reclutamiento de la maquinaria de modificación compuesta por las proteínas de la maduración propias del sistema productor de MccE492.

#### **3.4. Predicción de residuos catalíticos y zonas de interacción proteína-proteína en el dominio de adenilación de EntF.**

Para establecer si la participación del dominio de adenilación de EntF está mediada por las interacciones proteína-proteína que establece este dominio o por su actividad catalítica, se diseñaron mutantes que afectan cada una de estas funciones. No se cuenta con información acerca de residuos catalíticos de este dominio de adenilación, así como tampoco de residuos involucrados en zonas de interacción, por lo que se hizo un análisis bio-informático para poder predecir posibles blancos que mediante mutagénesis permitan confirmar alguna de las hipótesis planteadas para el rol de EntF en la producción de MccE492 activa.

El diseño de una mutante en el dominio de adenilación que afecte su actividad catalítica requiere conocer cuáles son él o los residuos involucrados en la catálisis o la estructura del dominio cristalizada con su sustrato. Debido a que hasta el momento no se cuenta con esa información, el diseño de la mutante se hizo a través de un estudio comparativo entre este dominio y dominios homólogos, cuya estructura cristalográfica ha sido obtenida en presencia de sus sustratos. El dominio de adenilación de EntF pertenece a la superfamilia de “enzimas formadoras de adenilato” y para ellas se han descrito residuos conservados con posible participación en la actividad catalítica de

estas enzimas. En la figura 18 se muestra el alineamiento entre el dominio de adenilación de EntF y seis homólogos cuya estructura ha sido cristalizada en presencia del sustrato. 1AMU es la estructura cristalográfica a 1,9 Å de resolución del dominio de adenilación de la sintetasa del péptido cíclico gramicidina S, obtenida en presencia de sus sustratos AMP y fenilalanina (Conti y cols, 1997). En este alineamiento destacamos con triángulos aquellos aminoácidos que en la estructura de 1AMU se encuentran a menos de 5 Å del AMP presente en el cristal. Esta es la estructura presente en el banco de datos que comparte el mayor porcentaje de identidad con el dominio de adenilación de EntF.

En el alineamiento múltiple se pueden observar las 10 regiones conservadas descritas para dominios de adenilación denominadas de A1-10 (Marahiel y cols., 1997). La ubicación de estas regiones en la estructura cristalográfica de 1AMU muestra que la mayor parte de ellas están cerca del sitio activo de esta enzima y principalmente en la región de unión a ATP. Destacados en amarillo se muestran los residuos conservados en toda la familia de enzimas. Con una flecha se señala el residuo de EntF E750. Este corresponde al residuo E327 de la estructura 1AMU. Se ha predicho que E327 y sus equivalentes en los otros dominios de la superfamilia participan en la estabilización de la carga del ion  $Mg^{+2}$  acomplejado con el ATP, facilitando el ataque nucleofílico del grupo carboxilato sobre el fosfato alfa del ATP necesario en la formación del aminoacil-AMP. Esto lo que se convierte en un buen candidato para una mutagénesis puntual que elimine la actividad catalítica del dominio de adenilación de EntF.

Para predecir posibles zonas de interacción proteína-proteína en la superficie de la estructura del dominio de adenilación de EntF se utilizaron dos aproximaciones. La primera está basada en la conservación de secuencia, para lo cual se utilizó el modelo del dominio y nuevos alineamientos en los que se incluyó solo aquellos

```

1AMU 46 EQVSRPNVAVTCEK-----EQLDHLNVEANQLARIFIEKTKDRTLVOIMMEKSIPLFQGLVLFANQAYPPDIEYPKERTCY 130
1RY2 131 LNAQYNCVDFHAKRTPKKAIIFRGGDEPQQGYSITKLEEVQCQAQVLYTSMVAKKDTVAIYNNMVPRAIITLAAISRTAAHSVNFAGFSSNSRD 230
2P2F 75 LNLAAACLDFHLQNGDRTAIMEGDDTSQSKHISLHRDVCRFANITLDDLKKQDVVAIYNNMVPRAAAMLCARIAVHSVFPGGEPFAVAG 173
1MDB 32 RDRAAAYVGDPIATCCN-----THMSRLDTRADRRAAGFGKTLQQQKRVVQLPNIKRFFVEVLFRLALPVFALPSSRSSEITV 116
1V25 25 ERAAALFGKREVVSRSLNTG-----EVHRTAAVYQBARRELVGGGLRA-LVQVGDRTVTLGFNHFHLEAVFVPCMAVYLHTANPLRPKEIAY 113
2D1Q 30 RKYNEFYAKLGAIAFTN-----AVTGVDSVAYLEKAXLQKALQNYLVVDGRVAACSENCEFFFPVIGLFI VGVAPTNEIYLDRELVH 118
EntF 462 AEQAAATPAPALADAR-----YLFSRHRROVVALANLRE-RVVKPDSVAVALPKSVFLTLALHIVEAAAWLPEPDTGPPDRRKM 546

                                     A1                                     A2
1AMU 131 LDPSCAPMGLTQKHLVHLIHNIFNGQEIFEED-----TFLKREGTNI-----LHVPS-KSTDLAYIITPS--P-- 198
1RY2 231 RENDDDKXVIITTESNRGGKVIETKRIWDDAR--ETPCVSMILYVYKRTNPSVAFHAPRDLDAIEKKKYKTYYPCTPVDSDPLITLLITSGSTGAP 328
2P2F 174 RVIDSPKAVLTADEGVVRAGREPLKKNVDDAKNPNVTSVCHVILKRTGS-DIDWQGRDLMDRDLLEKASPEHQPAMNPEPDLFLLYTSQSTGKPK 272
1MDB 117 FCFEFAAAAYIIPDAYS-GFDVRSLARQVQSILP-----LAKNLLVAGEAEE-----PLPLEDLHTPEVVKLEPVSSDAVALQISGGSTGLP 196
1V25 114 LNNHREDFLLIDFPN-----LPLVEARFGLK-----LVQNFVWAGEAFEG-----YLAYERALGEEADFPVRPERAACGMAYVLTGTTLTSP 192
2D1Q 119 SDGISKPTIIFPSKK-G-----LDKVIITQKIVT-----LTKTLLLDKQVDYRQYQCLDTFKRNTFPFGQASSFKTVEVDRPQVALIMN--SGLPK 206
EntF 547 MVEDARPSLLITTDQLPRFSDVNLTS-CYNAP-----LTPQGS-----APLQLS-QPHHTAYIITPSGSTGRPK 611

                                     A3
1AMU 199 GTLLEK-CISNLLFFENSLNVTQRISIQFASISDASYNEMFALLTGASLYLLEKTIIN--DFVKPEQINQKEEIVITLPGLVYHLDPERILS 294
1RY2 329 QVHSTAGYLICALLTMYRTDTHQEDVFFTAGCLOHITGH-TVYVYGLYGCATLVFQTPAYPNYSRWYMDLIEKHYTOFYMA-TAIRLAKRAGDSY 427
2P2F 273 QVHSTAGYLVAAATFKYVVDYHPGDIYKCTACQGVITGH-SLLVYGLACGATIMFEGVNPWPTFARMQVYKHKQYNIITYA-TAIRLMAEGDKA 371
1MDB 169 LPRFTHDDYIYSLKRSVVCVLDHSTVYLSALPMANNYPLS-SPGLGVVYAGGRVYLSF---SPSDDAFPLIEREKVYITAGVPLAMVWMDASS- 292
1V25 193 QVYVHR-ALVHSAAASLVDTGALSQKDVVLPVPMFHVNAWLCPVAATLVGKCVLPG-PRLDASLVLFDEGEVVTAGV-TWLAALADLYLS- 287
2D1Q 209 GVQVLTENITRFSHARDPIYGNQVSPGTAVLTVPFHHGFGMTLGLVICCFRVMYLT---KPDERTLKTQDYKCTSTLVV-TWLAALNKRELLN 304
EntF 612 QVVVGT-ALVHRLKMNHNYPLTGEVVVQKTPCSQDVSWEFVFPFAGAKLVMAEFAHR--DELAMQQFFAEYGVYITTFV-SKAAAFVARTLTPG 707

                                     A4
1AMU 295 -----GQLEIA-SATPSPVYKKEKVT-----YHRSPTT--TCATTMVATKEITIGHEVP-----IGAPLQNTQIYLDENLQLS--VEP 371
1RY2 428 IENHSLKSRKCGEVLEPAAEVWENYSEKIKNEIPIVDITWCTSGSHVNTPLAGGVTPMKPGEA-----SPFFGIDAVYLDNTGELNLSHA 519
2P2F 372 IEGDDESSRIIDQVLEPAPAEKRWYKIQEKCFVDTWCTGGGFITPLPG-AIEIKAGEA-----TRFFGVQPALVDEGHFQE--GNT 460
1MDB 293 -RRDDELSQVIVQVAKPSAAARRKAVRPE--CTLQVYQMAAC-LMNYTRLDDPEIIVNTQ-----GKPPSPYDESRWDDHRRDVK-PGE 377
1V25 268 -TGHRLVTRRIVVG-S---AAPRSLIAFPERMGVEVQGVGLTTSVPVYQNFVKSLSLSSEKELTKARTGLPLVRLRVADEGRFPVPKDGRA 382
2D1Q 305 --KYDLNVEVASELAPLKEVYGRAVAFHFN-LPGVRRQVGLTITSALLITPEG--DQKPGA-----GKVMPLFKAVIDLTTKKSLG-PNR 388
EntF 708 TARQSCATIKQVFCSEAPALCREVQQLTG--APLHMLVCTTAAVDYQWYPAFGELAQVRS---VPIGVYVWNTGLRIDAMHFPVP--P 796

                                     A5
1AMU 372 AELCTCGEGDARCYWKRPELSQKFDVDFVFPVCGKLYLTPQARLSDGNRELDLQINQKIRHEVELEEVEEILLKHYESETAVSVHKHQEQPY 471
1RY2 520 RVLAAZKAPFPFATINWHDRIY-LDYTLNIPYFGYFTQARAKKDDGYWLLQYDQVYNSHFASTAEIARAIEDIIPACAVVFNDDLTQQA 617
2P2F 461 RNLVITDSKPGQARILFGSHERF-EQYTFSTKMYFS-CARRLEDQYVWITQVDBYVMSDEAGTAEISSALRHKKAFAAVUGPHAIKGA 556
1MDB 378 THLLTGTPIRIVYKAEHNN-----AASPTEGQYFTLIVELTRDQYVWVQAKDQNRGKFAADEVNHLAAHAAHDAANVMPQFLGGR 471
1V25 383 LEVQLKPKRITGGVYGNCEAT-----RSALTDFCFEATLIVKVDKQYVYKEDLKDLSKGE-----WSSVDLENAAVVAIPHKKQER 476
2D1Q 399 RHEMCRCPMIMKGVVNNPEAT-----KELIDEPCHLRTLIVYVDEKHFHFDLKSLLKVKWONPPALESVLQHPSEFDAQVAGVFPVAGEL 482
EntF 789 AGLYVYGLQLAQGYLGRPELTSARFYIADFPFAPGRMYRGLVAVKWLQNGAYEYIGSDDLKRNQRELELGEIDRVVQQLPDMKQAVVTHACVINQAAAT 898

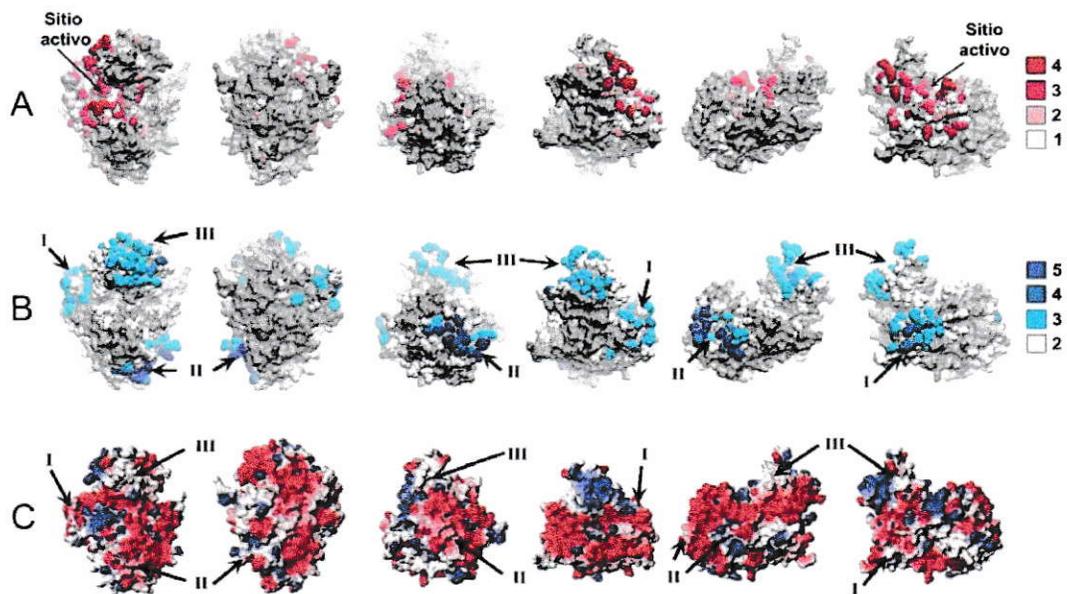
                                     A6                                     A7                                     A8
1AMU 472 -----CAVYVSEKHIP-----LEQLRQSS-EEPTPELISYFIQLKMFLSNKKIDRFQVPEPDLTF----- 530
1RY2 618 -----VAAVYVLLKQD-----IKKHIVTFYR-KDQPPFAAKKLLILYDDEPKTRSGKIMRHLKILAN-----PGIVRNHDSVKL 713
2P2F 559 -----IYAYVILNHGEEPSPELYAENKVVYR-KEVGLATFDVHNHTLSLQKTRSGKIMRHLKILKIAAGDTSSTLADPGVVEKLEEKQA 647
1MDB 472 -----SCVEIIFRDEAP-----KAELKARLIRERGAALKKIDDFEFVSPFQGVGKYSKALREASE-----K-LIAG-- 536
1V25 477 -----PLAVYVFAKQWLP-----DAYLRRALREQYKNYVGGV----- 541
2D1Q 483 -----PGAVVYVLESQKN-----MTEKEMDYASQVSNAKRERGGVRFVDEVPKGLTGLKIDGSALEIKL----- 542
EntF 899 GGDARQIVSYVTSQSGLP---LDTSLAQQLRETLPFHMVYVYVLLQLPLLSANGKIDRALPLFELKAQAPGRAPKAGSETITAAAFS 985

                                     A9                                     A10

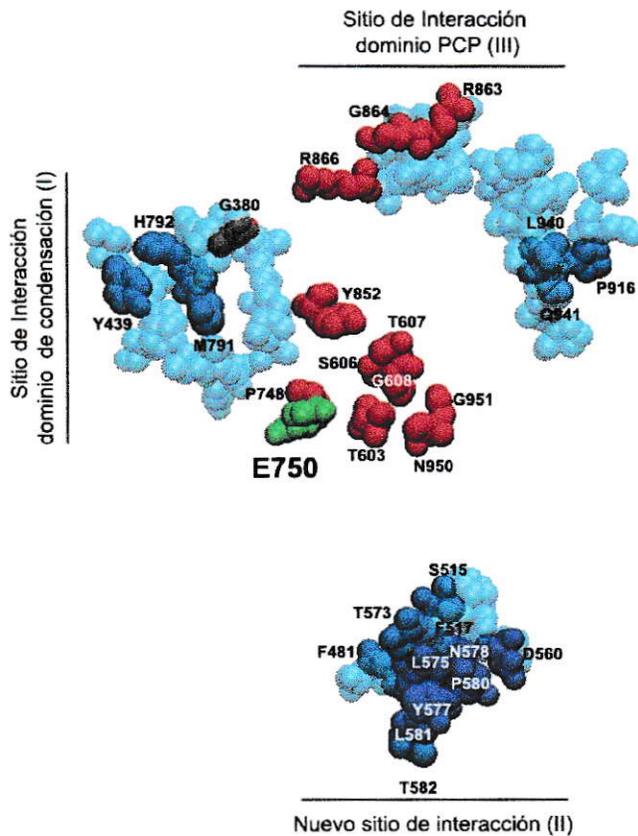
```

**Figura 18.** Alineamiento entre el dominio de adenilación de EntF y seis de sus homólogos de estructura conocida. Las regiones conservadas A1-A10 descritas en Marahiel y cols., 1997, dentro del alineamiento se muestran con barras negras. En amarillo se destacan los residuos completamente conservados, en verde los conservados con respecto al consenso y en celeste los idénticos con respecto al consenso. Con triángulos se marcan los residuos que se encuentran a 5 Å o menos del sitio activo en la estructura de 1AMU. Con una flecha se destaca el residuo E750 de EntF.

homólogos de EntF que poseen la misma estructura modular, es decir que hacia el amino del dominio de adenilación se encuentre un dominio de condensación y hacia el carboxilo un PCP. Con esta información se alimentaron cuatro servidores diferentes (Figura 19 A). Mediante esta aproximación se observaron tres parches de interacción en zonas distintas al surco del sitio activo, el cual presenta la mayor conservación de secuencia. En la segunda aproximación se utilizó el modelo del dominio para alimentar cinco diferentes servidores que buscan residuos frecuentes en interfaces en la superficie del modelo (Figura 19 B). Los parches I y II se encuentran en el sub-dominio mayor, el primero en el extremo amino y el segundo alejado del sitio activo, mientras que el parche III se encuentra en el dominio menor, cerca del extremo carboxilo. El análisis de potencial electrostático de superficie (Figura 19 C) muestra que todos los parches predichos poseen un potencial neutro, lo que permitiría su participación en una interfase de interacción, siendo el parche de potencial más neutro el III, seguido por el parche II y el I. En la figura 20 se muestran los residuos que serían posibles blancos de mutagénesis dentro de la estructura del modelo del dominio de adenilación de EntF. En rojo se muestran los residuos que muestran la mayor conservación de secuencia, ellos forman un surco o sitio activo dentro del cual se encuentra el residuo E750, que es nuestro putativo residuo catalítico. También se muestran los tres parches predichos como zonas de interacción proteína-proteína. La cercanía de los parches I y III, dentro del modelo de la sintetasa completa, con los extremos amino y carboxilo terminal sugiere que corresponden a zonas de interacción con el dominio de condensación y PCP respectivamente. El parche II no puede asociarse fácilmente con interacción de otros dominios de EntF y muestra el mayor número de residuos consenso, lo que sugiere que es un probable sitio de interacción con otras proteínas.



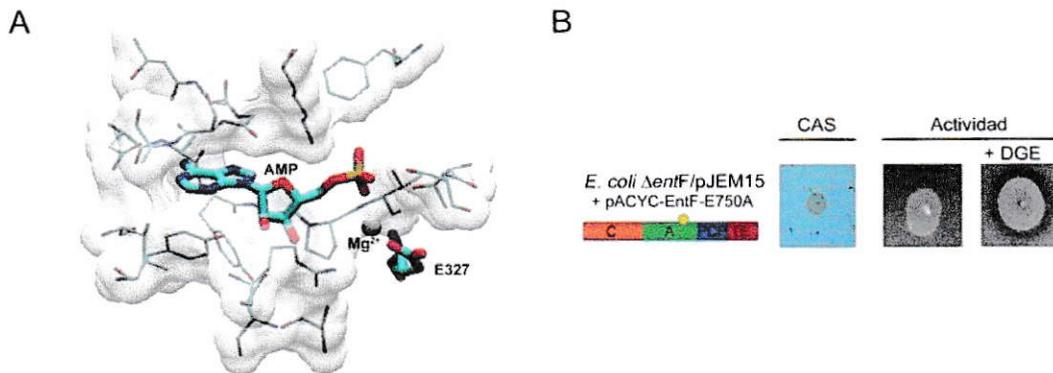
**Figura 19. El dominio de adenilación de EntF presenta tres zonas de interacción.** Los residuos relevantes para posibles interfases obtenidos por análisis de conservación de secuencia (A), y predicción de sitios de interacción basado en la estructura (B) Se mapearon en el modelo del dominio A y se colorearon según el número de veces que fueron incluidos por los distintos métodos (leyenda). El análisis de potencial electrostático de superficie (C). I, II y III indican los parches de interacción encontrados. Para detalles sobre la metodología ver sección 2.2.24.



**Figura 20. Residuos dentro del dominio de adenilación de EntF que son posibles blancos de mutagénesis sitio-dirigida.** Se muestran los residuos más conservados (rojo), el putativo residuo catalítico (verde), los residuos que forman parte de zonas de interacción proteína-proteína predichos por cuatro o más servidores (azul oscuro) y por tres servidores (celeste).

### 3.5. La actividad catalítica del dominio de adenilación de EntF no es necesaria en la maduración de la MccE492.

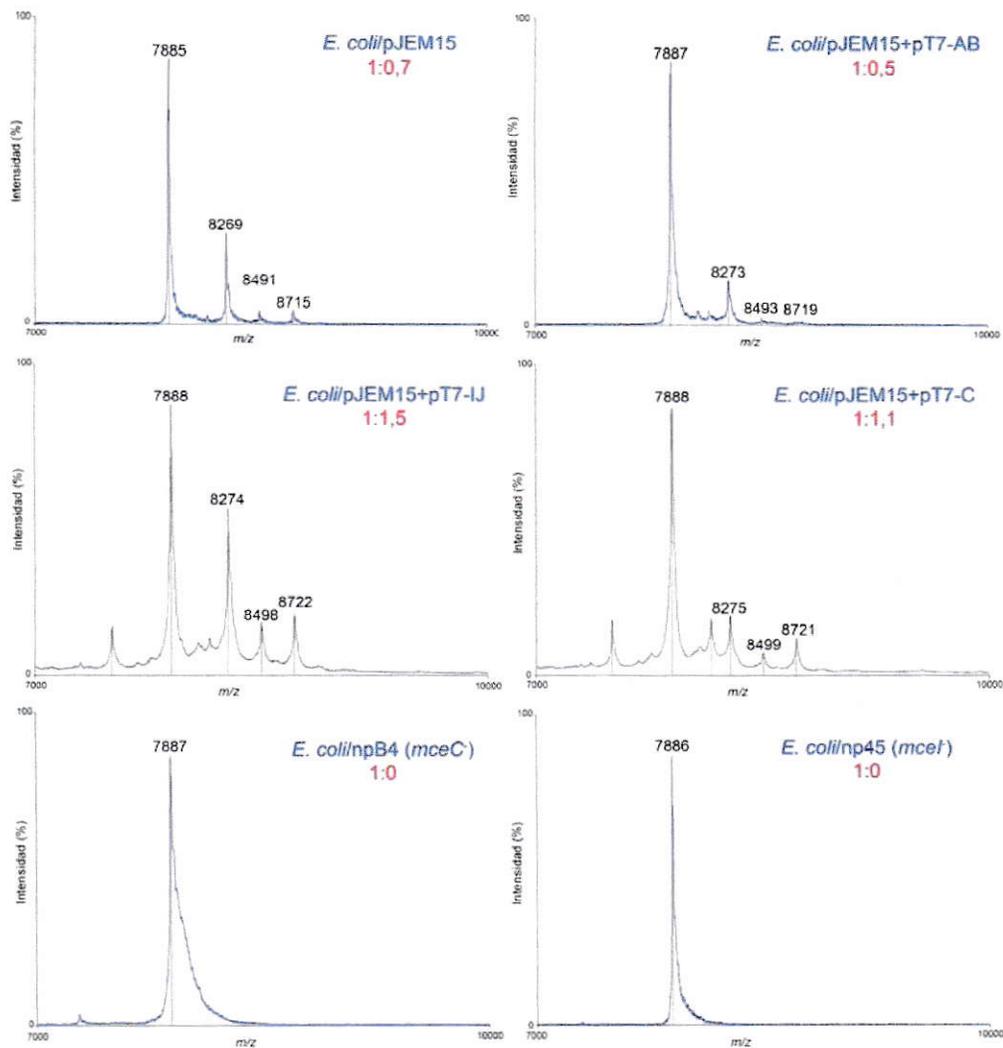
Se realizó la mutagénesis sitio dirigida cambiando el residuo E750 del dominio de adenilación de EntF por una alanina (E750A). En la figura 21 A se señala la ubicación del  $Mg^{+2}$  que forma el complejo AMP-  $Mg^{+2}$  y el residuo E327 de 1AMU equivalente al residuo E750 de EntF. Al introducir esta mutación se observó que afectaba la producción de enteroquelina evaluada sobre placas CAS (Figura 21 B). Este resultado indica que el residuo E750 del dominio de adenilación de EntF es esencial para su actividad catalítica. Sin embargo, al transcomplementar con salmoquelina DGE la cepa de *E. coli* que expresa la sintetasa con la mutación puntual E750A en EntF se obtuvo actividad bactericida. Este resultado permite concluir que la actividad catalítica de este dominio no es necesaria para la producción de MccE492 activa, y apoya la hipótesis que EntF y en particular su dominio de adenilación, participa en la modificación postraduccional de la MccE492 *in vivo* como proteína reclutadora de la maquinaria de modificación, posiblemente interactuando con una o más de las proteínas de la maduración MceCIJ (Mercado y cols., 2008).



**Figura 21. Efecto de la mutagénesis puntual E750A en el dominio de adenilación de EntF.** **A.** Vista del sitio activo de la estructura de 1AMU en la cual destacan AMP- $Mg^{+2}$  y el residuo E327 equivalente al E750 de EntF. **B.** Una cepa mutante en el gen *entF* (ER1300H) que porta el sistema productor de MccE492 (pJEM15) fue transformada con el plasmidio compatible que porta la mutante E750A de EntF. Se midió su capacidad de producir enteroquelina sobre placas CAS, y la actividad bactericida luego de ser transcomplementada con salmoquelina DGE.

### 3.6. La proporción de MccE492 modificada post-traduccionalmente aumenta conforme aumenta la expresión de los genes de la maduración.

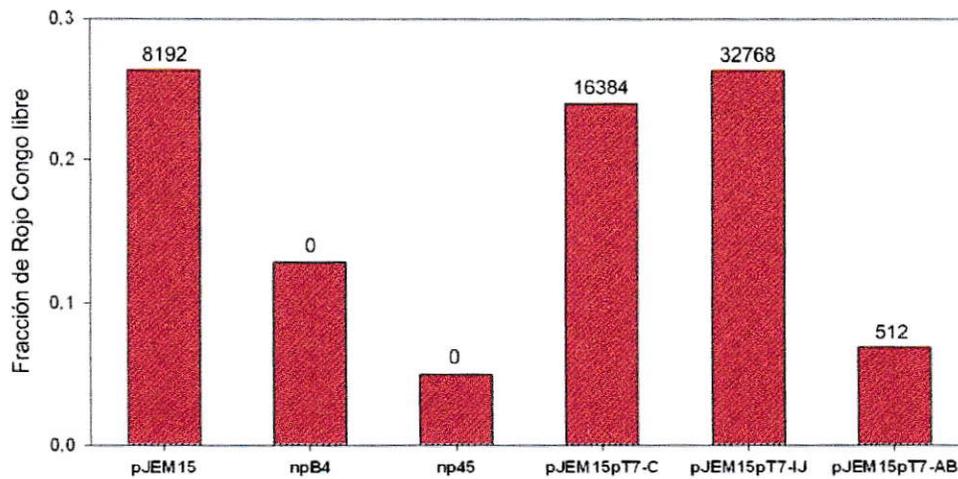
Otro objetivo de este trabajo era ahondar en el efecto que tiene la modificación post-traduccionales de la MccE492 sobre su estructura, conformación y actividad. Con el fin de estudiar que ocurre con la proporción de MccE492 modificada post-traduccionales al aumentar el número de copias de los genes de la maduración, se evaluó mediante MALDI-TOF-MS la cantidad de MccE492 modificada a partir de muestras purificadas desde cepas productoras que sobre-expresan diferencialmente los genes de la maduración. Como se observa en la figura 22, es posible distinguir la forma no-modificada y las tres formas descritas de microcina modificada en una purificación proveniente de una cepa de *E. coli* que posee el plasmidio con el sistema sobre-productor pJEM15, con una relación entre la forma no-modificada y modificada de 1:0,7. Esta relación aumenta a 1:1,5 al sobre-expresar los genes de la maduración *mceI*J (pT7-IJ) y a 1:1,1 al sobre-expresar el gen de la maduración *mceC* (pT7-C). Por el contrario, esta relación baja a 1:0,5 cuando a esta cepa se le introduce un plasmidio compatible que sobre-expresa el gen estructural de la MccE492 y su inmunidad (pT7-AB). No se observan formas modificadas en los espectros obtenidos de purificaciones desde cepas mutantes en los genes de la maduración *mceC* (npB4) y *mceI* (np45). Estos resultados muestran que al aumentar la expresión de los genes de la maduración se produce un aumento en la proporción de MccE492 modificada post-traduccionales.



**Figura 22. Efecto de la sobre-expresión de los genes de la maduración y del gen estructural sobre la proporción de MccE492 modificada post-traduccionalmente.** Los espectros fueron obtenidos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) desde muestras purificadas desde las siguientes cepas de *E. coli* sobre-productoras de MccE492 (pJEM15) que sobre-expresa el gen estructural *mceA* (pT7-AB); los genes de la maduración (pT7-IJ o pT7-C); y mutantes en los genes de maduración (npB4 *mceC*<sup>-</sup> o np45 *mceI*<sup>-</sup>). En rojo se muestran las proporciones de MccE492 no-modificada versus modificada, que se calculó como el área bajo el pico correspondiente a la forma no-modificada con respecto a la sumatoria de las áreas bajo los picos de todas las formas modificadas.

### **3.7. La capacidad de formar fibras amiloides es inversamente proporcional a la cantidad de MccE492 modificada y a la actividad bactericida.**

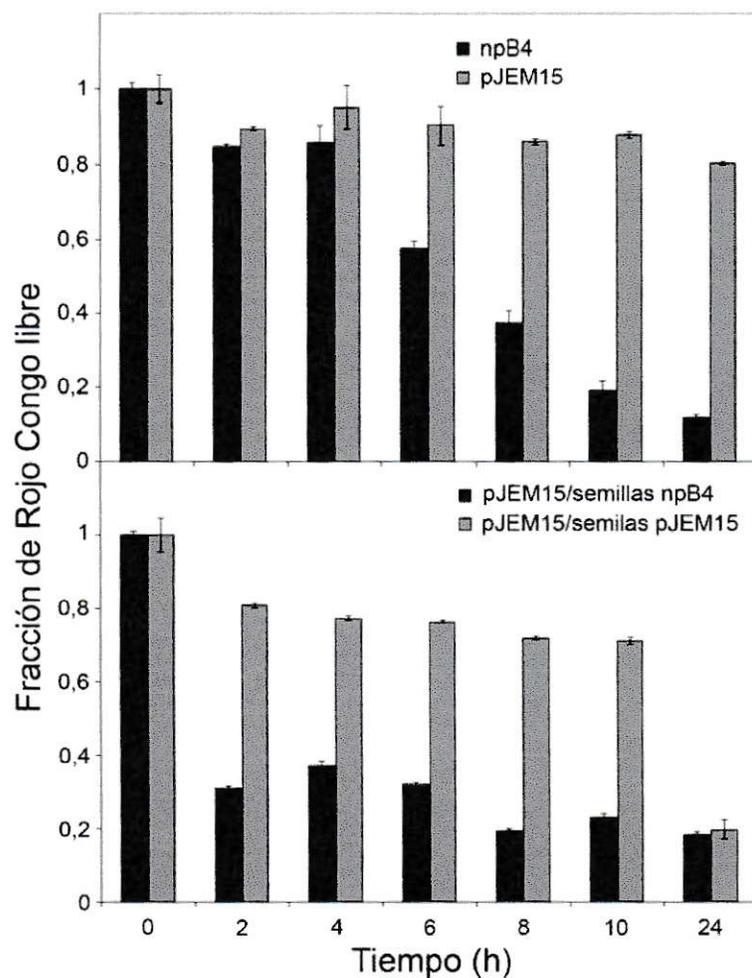
Hasta el momento se han descrito dos actividades biológicas para la MccE492, la actividad antibacteriana y la actividad citotóxica sobre células tumorales. Se obtiene una mayor actividad citotóxica cuando la MccE492 se encuentra agregada formando fibras de tipo amiloide (Estrada, 2005; García, 2008; Estrada y cols., manuscrito enviado para su publicación). Para establecer una relación entre el nivel de modificación post-traducciona, la actividad bactericida y la capacidad de formar fibras de amiloide se cuantificó la actividad bactericida de muestras purificadas de MccE492 con diferentes proporciones de forma modificada y se sometieron a un proceso de agregación *in vitro* para cuantificar la producción de amiloides. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 23, y en ellos se observa que las muestras provenientes de mutantes en genes de la maduración (npB4 o np45) no poseen actividad bactericida y presentan una mayor tendencia a la agregación. Las muestras fueron sometidas a un protocolo de agregación *in vitro*, que consistió en una incubación en un amortiguador a pH neutro durante 15 h a 37°C con agitación y la agregación se cuantificó por el método del RC. Las muestras de MccE492 que contenían una mayor proporción de péptido modificado, como las que provienen del sistema productor (pJEM15) y aquellas que sobre-expresan los genes de la maduración (pT7-C o pT7-IJ) presentaron una menor tendencia a formar agregados amiloides, lo que se refleja en una mayor fracción de RC libre. Adicionalmente, estas muestras presentaron una mayor actividad bactericida. Estos experimentos indican que a un mayor nivel de modificación post-traducciona existe una mayor actividad bactericida y una menor capacidad para formar agregados de tipo amiloide.



**Figura 23. Efecto de la modificación post-traducciona l en la formación de amiloides y en la actividad bactericida de la MccE492.** Muestras purificadas (400 µg/mL) desde las diferentes cepas productoras de MccE492 se agregaron incubando las muestras durante 15 h en PBS 10 mM pH 7. Las muestras agregadas fueron incubadas 15 min con RC 22 µM y centrifugadas a 75.000 x g. Se midió la absorbancia a 490 nm desde el sobrenadante y la fracción de sonda libre se calculó con respecto a las mismas muestras sin agregar. Sobre las barras se indica la actividad bactericida en unidades arbitrarias.

### **3.8. Las semillas provenientes de MccE492 no-modificada actúan como centros nucleadores más eficientes que las provenientes de su contraparte modificada.**

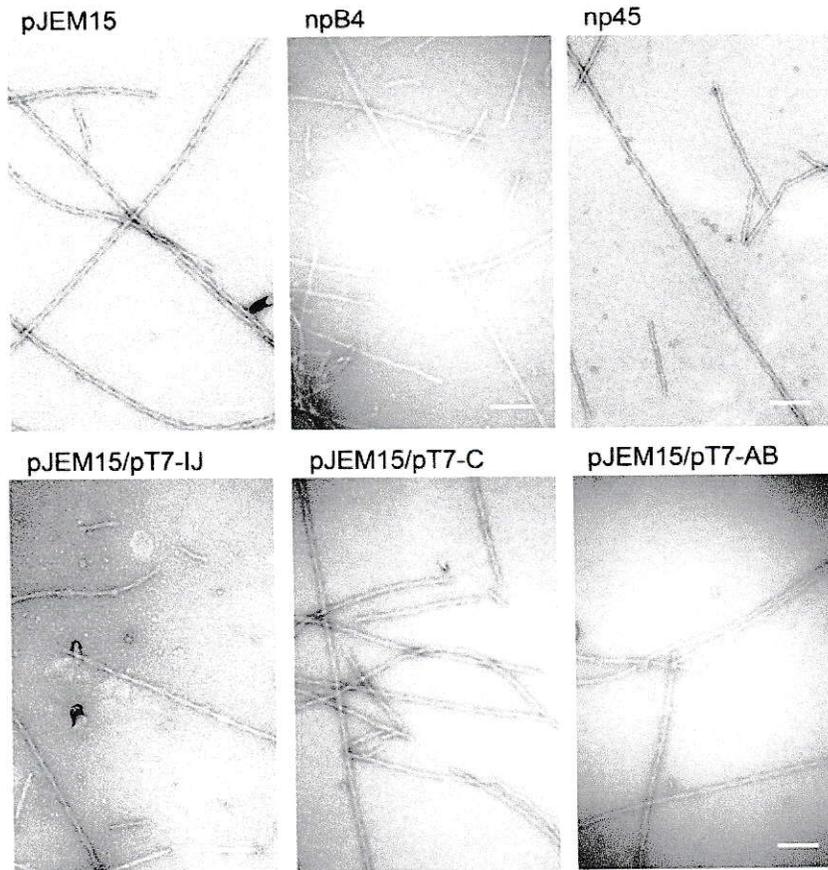
Como ya se mencionó la formación de fibras de tipo amiloide es un proceso dependiente de nucleación cuya fase de latencia puede ser acortada o eliminada al agregar semillas a la reacción de agregación. Estas semillas actúan como núcleos preformados que reclutan a la proteína soluble y aceleran su incorporación a las fibras. La MccE492 no-modificada tiene mayor capacidad de agregar, por lo que se decidió evaluar si esta capacidad se relaciona con la formación de centros de nucleación más efectivos. Con este objetivo se analizó la capacidad de semillas provenientes de una mutante en el gen de maduración *mceC* (MccE492 no-modificada) y de una cepa sobre-productora pJEM15 (que produce aproximadamente un 50% de MccE492 modificada) de promover la agregación. Para esto se determinaron las cinéticas de agregación de ambas muestras y como se observa en la figura 24 (parte superior) las curvas de agregación de npB4 (no-modificada) presentan una cinética de agregación acelerada, sin un período de latencia evidente. Se evaluó la capacidad de estas semillas de eliminar el período de latencia de la curva de agregación de pJEM15. Se prepararon semillas de ambas muestras de MccE492 (npB4 y pJEM15) las cuales se añadieron al tiempo cero en las cinéticas de agregación en proporción de 1:10 (semillas *versus* MccE492 soluble pJEM15). Las semillas provenientes de la MccE492 no-modificada (npB4) resultaron ser más eficientes en promover la agregación, pues aceleraron alrededor de 10 veces la cinética de formación de fibras de tipo amiloide de una muestra con MccE492 modificada (pJEM15) en comparación con las semillas preparadas desde fibras de esta misma microcina (Figura 24, parte inferior). Se concluye que las semillas de MccE492 preparadas con la forma no-modificada son centros nucleadores más eficientes para promover la formación de fibras amiloide.



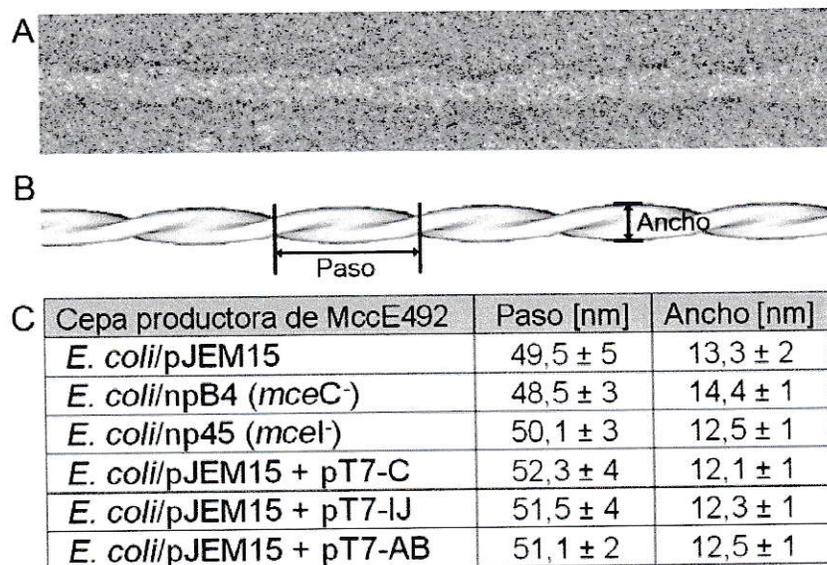
**Figura 24. Patrón de agregación de la MccE492 modificada y no-modificada y efecto de semillas preparadas de estas muestras sobre la cinética de agregación.** Muestras provenientes de cepas de *E. coli* npB4 (no-modificada) y pJEM15 (alta proporción de modificación) fueron incubadas en condiciones de agregación (arriba). Semillas preparadas a partir de la sonicación de fibras maduras (48 h de agregación) de ambas muestras de MccE482 fueron adicionadas al inicio de la agregación en una proporción 1:10 con respecto a la microcina soluble (abajo). La agregación se cuantificó con el método del RC libre.

### **3.9. Las fibras amiloide producidas por preparaciones de MccE492 con diferentes grados de modificación post-traducciona poseen formas y dimensiones similares.**

Debido a que muestras de MccE492 con mayor proporción de modificación post-traducciona poseen una menor capacidad de formar amiloides, se decidió estudiar mediante microscopía electrónica de transmisión si esta diferencia se traduce en una diferente morfología de las fibras formadas. Se prepararon rejillas con las fibras amiloide obtenidas a partir de las diferentes muestras de MccE492 las que fueron teñidas negativamente para su observación al microscopio electrónico. En la figura 25 se observa que todas las preparaciones formaron amiloides, que se caracterizan por ser fibras rectas y sin ramificaciones. En todas las preparaciones se obtuvieron fibras de tipo helicoidal y fibras no helicoidales o planas. Una inspección visual de las microfotografías muestra que las distintas preparaciones de MccE492 forman fibras similares (Figura 25). Para determinar si las fibras provenientes de las muestras purificadas de las distintas cepas poseían las mismas dimensiones se midieron y compararon las fibras helicoidales que correspondían a la forma más representada en todas las muestras. A partir de las microfotografías digitalizadas se tomaron las medidas utilizando el programa ImageJ. En la figura 26 A se muestra una ampliación de una de estas fibras helicoidales y en la figura 26 B un esquema de estas fibras donde se indican las dimensiones medidas. En la tabla (Figura 26 C) se muestran las dimensiones obtenidas para los amiloides formados con cada una de las muestras de MccE492. El análisis de estos datos indica que las fibras helicoidales de MccE492 poseen formas y dimensiones similares, sin importar el nivel de modificación post-traducciona que presentan las muestras de las cuales provienen.



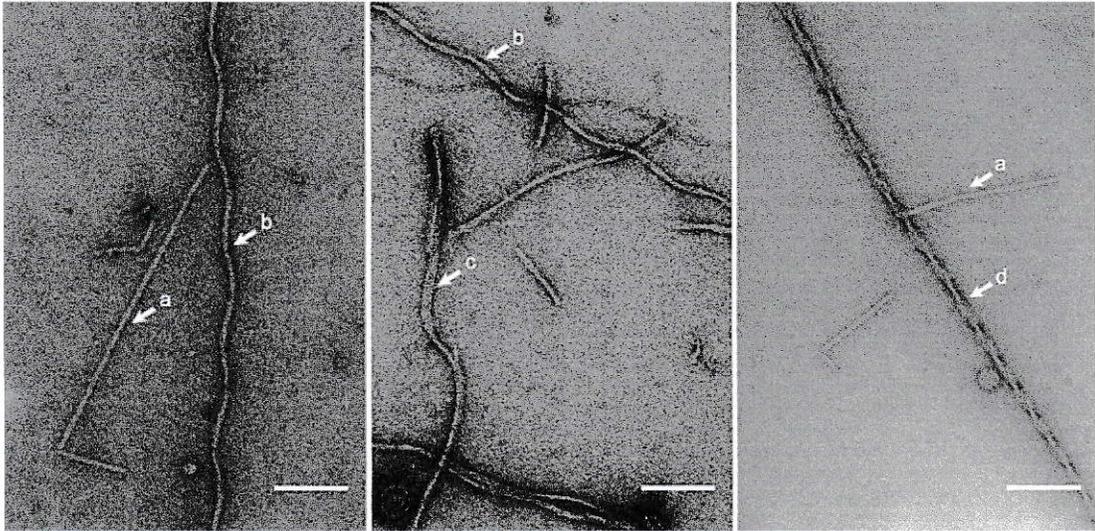
**Figura 25. Microfotografías electrónicas de fibras amiloides de MccE492 con diferentes proporciones de modificación post-traducciona. Las muestras de MccE492 agregadas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% para la microscopia electrónica. Las micrografías fueron obtenidas a una magnificación de 60.000 aumentos. Las barras corresponden a 100 nm.**



**Figura 26. Dimensiones de las fibras helicoidales producidas por la MccE492 aislada desde diferentes cepas. A.** Ampliación de una fibra helicoidal de MccE492 obtenida de una preparación de npB4. **B.** Esquema de la fibra ampliada para mostrar las dimensiones de paso y ancho medidas. **C.** Tabla con los promedios y las desviaciones estándar de las mediciones de las fibras obtenidas para cada muestra, realizadas con el programa ImageJ.

### **3.10. Caracterización por microscopía electrónica de diferentes tipos de fibras amiloides producidas por la MccE492.**

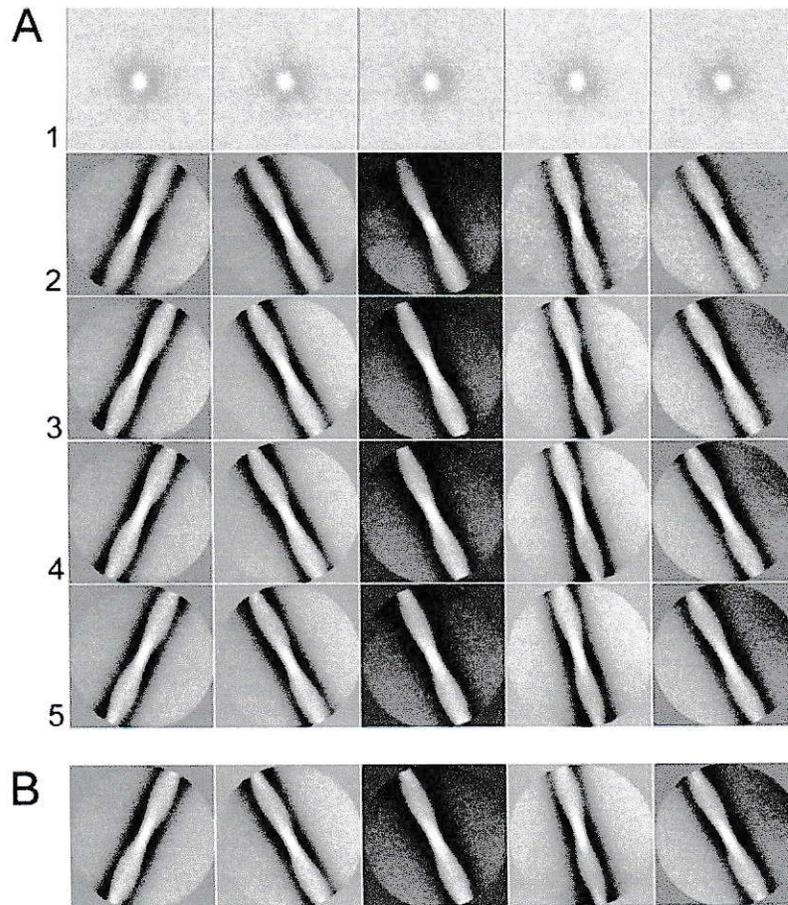
Una vez establecido que las dimensiones de las fibras producidas por las distintas muestras de MccE492 tienen formas y dimensiones similares, se decidió ahondar la caracterización de las distintas y menos representadas fibras de tipo amiloide de los agregados provenientes de la cepa productora de MccE492 no modificada *E. coli*/npB4, pues estas muestras presentan alta tendencia a la agregación y forman fibras limpias y homogéneas lo cual es ideal para la caracterización por microscopía electrónica. Las muestras de MccE492 npB4 agregadas, presentan varios tipos de fibras además de los ya descritos en la figura anterior. En la figura 27 se observan filamentos rectos **(a)** de aproximadamente 7 nm de ancho, filamentos curvos **(b)** de aproximadamente 14 nm de ancho, filamentos dobles o cintas **(c)** de 14 nm de ancho y filamentos helicoidales **(d)** de 50 nm de paso y 14 nm de ancho. A pesar de que todas las fibras tipo amiloide descritas hasta el momento presentan polimorfismos, también es posible que las distintas estructuras observadas correspondan a diferentes etapas en el curso de la formación de la fibra madura, por lo cual la caracterización de estas estructuras puede ser de mucha ayuda para elaborar un modelo de formación de la fibra que considere los intermediarios.



**Figura 27. Micrografías electrónicas de distintos tipos de fibras amiloides producidas por la MccE492.** Muestras purificadas desde la cepa *E. coli*/hpB4 fueron sometidas al protocolo de agregación durante 15 h y luego teñidas negativamente con acetato de uranilo 2%. Las micrografías fueron tomadas con un aumento de 60.000. Las barras corresponden a 100 nm.

### **3.10.1. Obtención de promedios bi-dimensionales de las fibras amiloide de MccE492.**

El estudio de las estructuras presentes en las muestras de MccE492 agregada y del proceso de formación de estos amiloides podría arrojar valiosa información respecto a la actividad antitumoral de esta microcina, pues los agregados presentan mayor actividad citotóxica. Con el fin de disminuir el ruido y obtener una mejor vista de las imágenes obtenidas, se profundizó el análisis de la estructura de los amiloides de MccE492 realizando promedios bi-dimensionales mediante el procesamiento de las imágenes de las fibras helicoidales y planas obtenidas por microscopía electrónica. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el paquete de programas Xmipp. Se tomó una serie de 12 microfotografías a una amplificación de 20 K. Estas se digitalizaron y manualmente se picó o marcó a lo largo de las fibras en el centro o paso de las hélices, o de manera continua a lo largo de las fibras planas. Se cortaron digitalmente imágenes a partir de una ventana de 240 x 240 píxeles utilizando como centro las marcas introducidas manualmente, las cuales posteriormente fueron tratadas como imágenes individuales. Éstas se clasificaron generando grupos que se promediaron, obteniéndose como resultado imágenes representativas de cada clase. Las fibras helicoidales se picaron al centro o paso de la hélice y el refinamiento obtenido a partir de estas imágenes se muestra en la figura 28. Se midieron las imágenes medias obtenidas y como resultado de sus dimensiones aproximadas se obtuvieron los valores de 500 Å de paso y 140 Å de ancho.



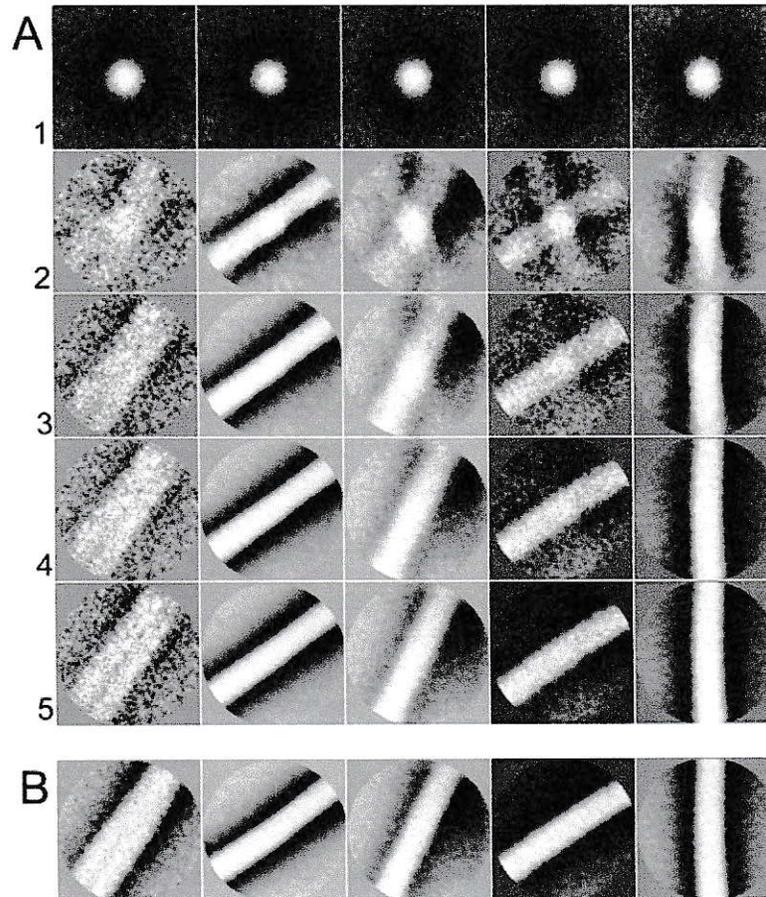
**Figura 28. Obtención de promedios bi-dimensionales de fibras helicoidales de amiloides de MccE492.** Procesamiento de las imágenes medias obtenidas picando en el centro o paso de la hélice. **A.** Vista de los primeros 5 ciclos de refinamiento de las 5 clases formadas para este grupo de imágenes. **B.** Vista del resultado de todas las vueltas de alineamiento de cada grupo.

Se realizó también el procesamiento de fibras no helicoidales o planas presentes en la muestra (Figura 29). Las fibras planas se encuentran menos representadas, y fueron picadas aleatoriamente a lo largo de ellas. Se observa que el primer grupo o clase (primera columna), es muy diferente de los otros 4 grupos, y corresponde a una fibra plana más ancha y en la cual es posible observar un surco central. Esta fibra de aproximadamente 140 Å es el doble de ancha que las fibras planas simples de los otros grupos (siguientes columnas a la derecha), cuyo ancho es de aproximadamente 70 Å.

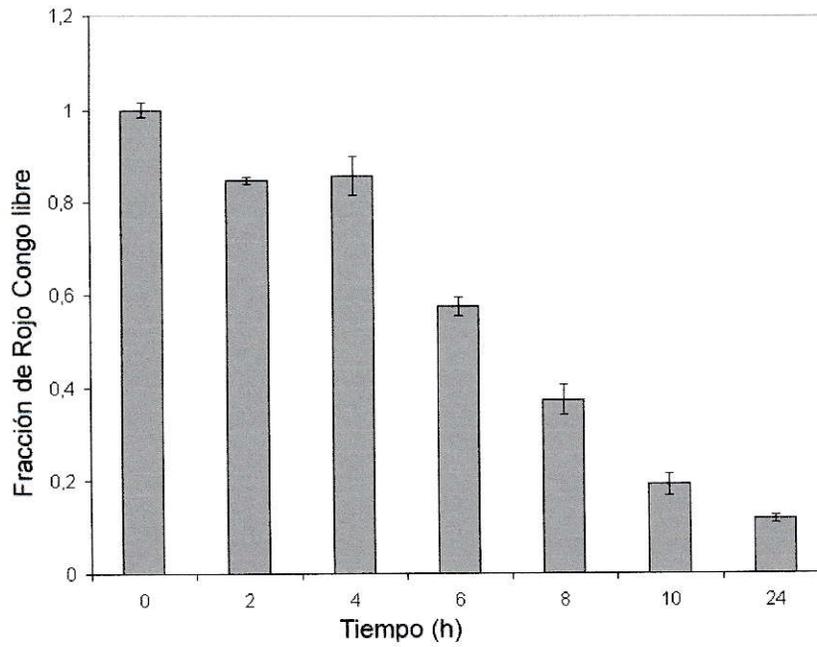
### **3.11. Caracterización del proceso de formación del amiloide de MccE492.**

La caracterización a nivel estructural del proceso de formación de fibras de amiloide por la MccE492 no solo puede ayudar a entender el mecanismo de su actividad antitumoral, sino que también puede servir de modelo para el estudio de la apoptosis inducida por agregados de amiloide asociados a diversas enfermedades.

Para estudiar el proceso de formación del amiloide de MccE492 se buscó una estructura precursora a partir de estudios cinéticos. Como primer paso se estandarizó una curva de agregación de MccE492 proveniente de la cepa *E. coli*/npB4. MccE492 purificada desde esta cepa se incubó en condiciones de agregación y se tomaron puntos cada dos horas durante 10 horas y un punto final a las 24 horas de agregación. En cada punto se determinó el porcentaje de RC libre como medida de la agregación de la muestra. Los datos obtenidos se muestran en el gráfico de la figura 30, en él se observa que el proceso de agregación exponencial comienza aproximadamente a las 4 h de incubación.



**Figura 29. Obtención de promedios bi-dimensionales de fibras planas de amiloides de MccE492.** Procesamiento de las imágenes medias obtenidas picando a lo largo de las fibras planas. **A.** Vista de los primeros 5 ciclos de refinamiento de las 5 clases formadas para este grupo de imágenes. **B.** Vista del resultado de todas las vueltas de alineamiento de cada grupo.



**Figura 30. Cinética de agregación de la MccE492 no-modificada.** Una muestra purificada desde la cepa *E. coli*/npB4 fue sometida a agregación. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se determinó la fracción de RC libre, con respecto a la absorbancia de la muestra a tiempo 0 de agregación.

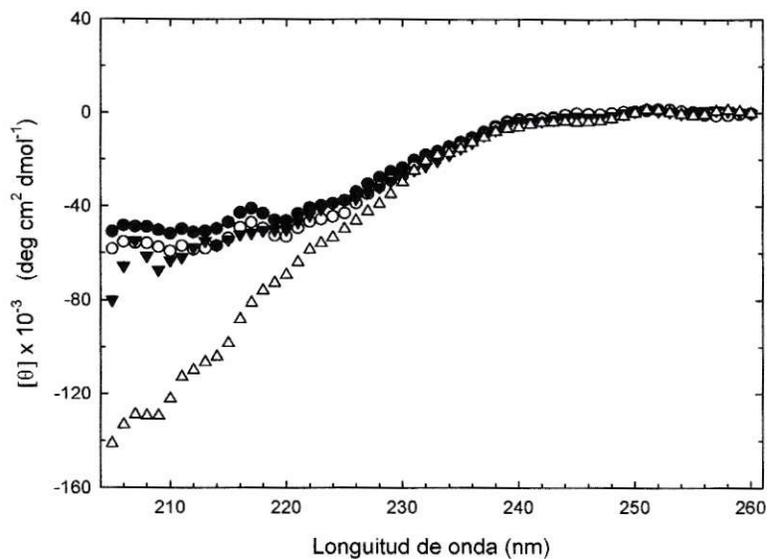
### **3.11.1. La MccE492 aumenta el contenido de estructura secundaria beta durante el proceso de agregación.**

Se analizó mediante dicroísmo circular el contenido de estructura secundaria durante el proceso de agregación de la MccE492 a 0, 4, 6 y 20 horas de incubación (Figura 31). Se tomaron espectros a estos tiempos y se normalizaron por la concentración molar de cada muestra. La MccE492 aumenta su contenido de estructura secundaria a medida que aumenta el tiempo de agregación con un cambio evidente a las 4 y 6 horas. Se observa que la agregación de la MccE492 tiene el comportamiento típico descrito para proteínas amiloidogénicas, es decir aumentan su contenido de estructura secundaria tipo hoja beta durante el curso de la agregación.

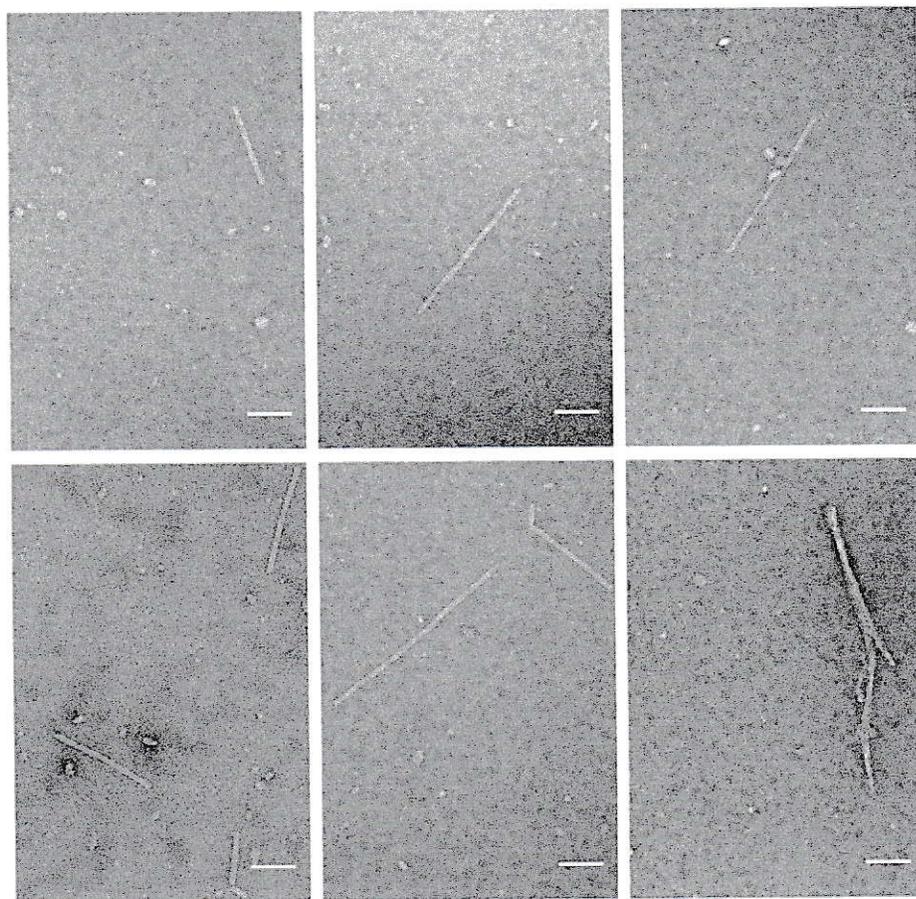
### **3.11.2. Visualización de los primeros estadios de agregación de la MccE492 mediante microscopía electrónica.**

Se prepararon rejillas con muestras de MccE492 en los primeros estadios de la agregación, entre 4 y 6 horas. En ellas se observaron filamentos rectos cortos y pequeñas estructuras anulares que podrían corresponder a oligómeros de MccE492. Se tomó una serie de 42 micrografías que se utilizaron para el procesamiento de imágenes. En la figura 32 se muestra una galería de imágenes tomadas de este conjunto de micrografías que ejemplifican las estructuras observadas.





**Figura 31. Espectros de dicroísmo circular de la MccE492 a diferentes tiempos de agregación.** Espectro de DC en el UV lejano de las muestras de MccE492 incubadas en las condiciones de agregación durante (●) 0h, (○) 4h, (▼) 6h y (Δ) 20h. A cada espectro se le restó el blanco que correspondía al amortiguador y se normalizó por la concentración molar de cada muestra determinada al momento de las mediciones.

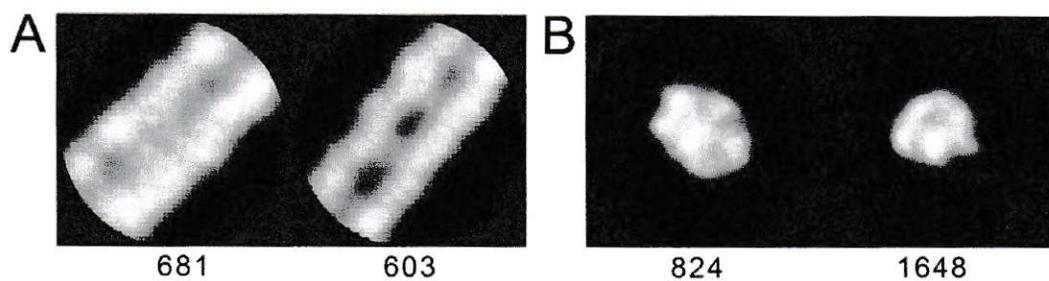


**Figura 32. Micrografías electrónicas de los primeros estados de agregación de la MccE492.** Muestras agregadas de 4 a 6 horas fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo 2%. Las imágenes mostradas fueron seleccionadas de placas tomadas a 50.000 aumentos. Las barras corresponden a 50 nm.

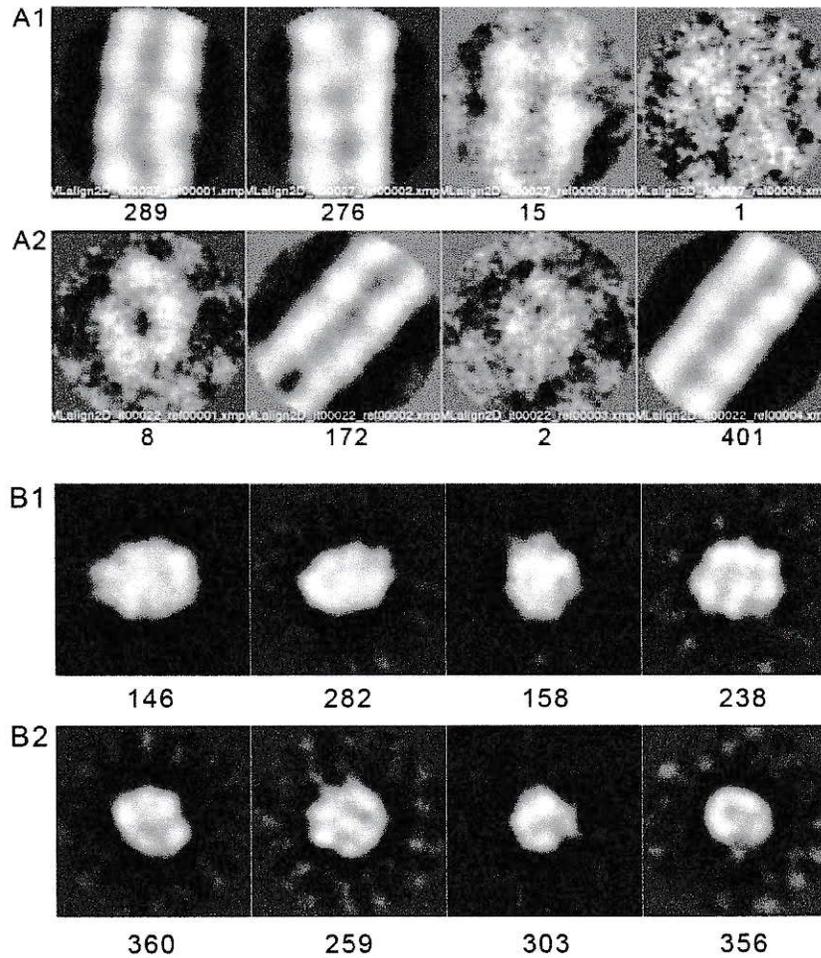
### **3.11.3. Generación de promedios bi-dimensionales de las estructuras observadas en los primeros estadios de la agregación de la MccE492.**

Se digitalizó la serie de 42 microfotografías tomadas a una amplificación de 50.000 aumentos. Se picaron manualmente las fibras planas y estructuras anulares observadas. Se cortaron digitalmente las imágenes con una ventana de 50 x 50 píxeles. Se obtuvieron 1284 partículas individuales de las fibras planas y 2472 de las estructuras anulares. Las imágenes generadas fueron normalizadas y luego alineadas bi-dimensionalmente en dos categorías o referencias y se obtuvieron las vistas que se muestran en la figura 33. En ambos alineamientos se observa que el número total de partículas individuales se clasifican de manera equitativa en las dos clases generadas en cada uno de ellos. En estas imágenes podemos observar que los filamentos rectos presentan un claro surco central y que las dos categorías generadas difieren ligeramente en su ancho (Figura 33 A). En el caso de los putativos oligómeros observamos una diferencia en el tamaño de las dos categorías obtenidas (Figura 33 B).

Se realizaron nuevos alineamientos bi-dimensionales, ahora con cuatro categorías de referencia para cada referencia obtenida desde ambas estructuras (Figura 34). La referencia A1 (Figura 33) produjo el alineamiento que se ve en la figura 34 A1, donde se observa que casi la totalidad de las partículas se clasifican equitativamente en dos nuevos grupos que se ven idénticos, y que los otros dos grupos de 15 y 1 partícula respectivamente parecen contener solo imágenes dañadas o sucias. Algo similar ocurre con el alineamiento de la referencia A2. En este alineamiento también se forman dos referencias que lucen muy similares y que agrupan casi la totalidad de las partículas individuales, mientras las referencias restantes parecen estructuras dañadas o sucias.



**Figura 33. Promedios bi-dimensionales de las estructuras observadas en los primeros estadios de la agregación de la MccE492.** Vista de las imágenes generadas en el alineamiento bi-dimensional (A) de los filamentos rectos, (B) de los putativos oligómeros. Bajo cada imagen se indica el número de partículas individuales que se alinearon en cada referencia.

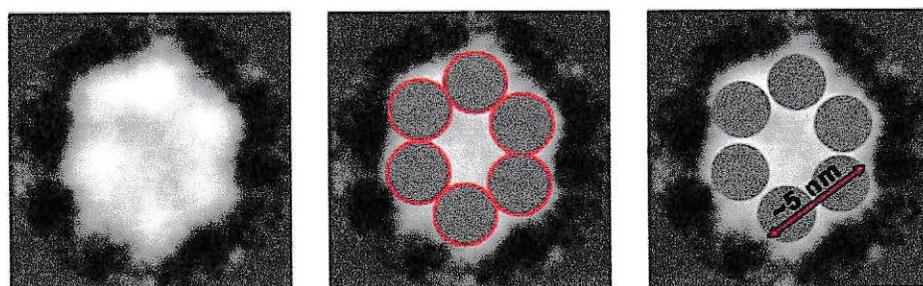


**Figura 34. Re-alineamiento de las estructuras precursoras generadas a partir de los primeros alineamientos bi-dimensionales.** Vista de los nuevos promedios generados en alineamiento bi-dimensional de las siguientes referencias de la figura 33: **(A1)** de los filamentos rectos gruesos, **(A2)** filamentos rectos delgados, **(B1)** de los putativos oligómeros grandes **(B2)** putativos oligómeros pequeños. Bajo cada imagen se indica el número de partículas individuales que se alinearon en cada referencia.

Esto sugiere que esta estructura está formando grupos cohesionados, es decir que todas las imágenes son casi idénticas y que el algoritmo solo los separa al poner un número fijo de referencias porque se fuerza el programa a crear nuevos grupos. En cambio, en el caso de las partículas anulares no se observa un comportamiento cohesionado del grupo, lo que sugiere que existe una diversidad de estructuras oligoméricas, o que es necesario aumentar el número de imágenes para incrementar la resolución de las referencias generadas por el alineamiento.

Se aumentó al doble el número de partículas de las estructuras anulares utilizadas en los alineamientos anteriores y se generó un nuevo promedio bi-dimensional de mayor resolución (Figura 35). En esta imagen promediada es posible ver con mayor claridad que estos putativos oligómeros corresponden a hexámeros. Se midió la distancia que abarcaría el diámetro de dos monómeros (como se esquematiza en la figura 35) y se obtuvo una distancia de aproximadamente 5 nm. Si suponemos que estas estructuras corresponden a bolas o esferas obtenemos un radio aproximado de 1,25 nm.

Se calculó el volumen de una molécula de MccE492, tomando como supuesto que forma una estructura esférica. Para esto se determinó la densidad de una molécula de acuerdo a la ecuación planteada por Fischer y cols. (2004) para proteínas de bajo peso molecular con límite inferior de 7 kDa. Según ésta, la densidad de una molécula de MccE492 que pesa 7887 Da es de 1,489 g/cm<sup>3</sup>. Con esta densidad calculamos un volumen de 8,79 nm<sup>3</sup>. Si suponemos que la MccE492 monomérica forma estructuras esféricas obtenemos un radio de 1,28 nm, distancia teórica similar a la obtenida de la medición del alineamiento bi-dimensional, lo cual es consistente con la hipótesis de que estos putativos oligómeros corresponderían a hexámeros de MccE492.



**Figura 35. Imagen de promedio bi-dimensional de un hexámero de MccE492.** Se generó esta vista el número de partículas iniciales del alineamiento bi-dimensional de los putativos oligómeros de MccE492. Se midió la distancia que abarca el diámetro de 2 monómeros (flecha roja).

En un estudio posterior a éste realizado en el laboratorio del Dr. J.M. Valpuesta, en que el análisis de estructuras anulares se amplió a 12.000 partículas se encontró que los pentámeros de MccE492 estaban más representados. Posiblemente las estructuras pentaméricas y en menor medida las hexaméricas serían estructuras precursoras de la formación de las fibras rectas observados en el mismo estadio temprano de la cinética de agregación.

## 4. DISCUSIÓN.

### 4.1. El proceso de modificación post-traducciona de la MccE492 *in vivo* y su efecto en la actividad bactericida.

Antecedentes previos indicaban que existía una relación entre la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol y la producción de MccE492. Entre éstos se destaca que el sistema productor de MccE492 posee los genes que codifican para MceC y MceD, ambos homólogos a proteínas implicadas en la síntesis de sideróforos de tipo catecol (Lagos y cols., 2001), y el hecho de que la MccE492 utilice para su internalización los receptores de membrana externa para sideróforos de tipo catecol FepA, Fiu, Cir e IroN (Patzner y cols., 2003). Esta relación quedó más claramente establecida cuando se identificó que la MccE492 estaba modificada post-traducciona con una molécula de tipo salmoquelina (Thomas y cols., 2004), una clase de sideróforos de tipo catecol correspondiente a derivados glucosilados de enteroquelina (Bister y cols., 2004). En un trabajo más reciente (Vassiliadis y cols., 2007) se informó que la enteroquelina era el precursor de la modificación post-traducciona de la MccE492, basándose en la observación que al reprimir la síntesis de enteroquelina, ya sea con altas concentraciones de hierro en el medio de cultivo o utilizando una cepa de *E. coli aroB* deficiente en la síntesis de enteroquelina, se inhibía también la modificación post-traducciona de la MccE492, situación que podía revertirse al agregar exógenamente enteroquelina al medio de cultivo. Sin embargo, nada se mencionó respecto de la actividad antibacteriana de la MccE492 obtenida bajo esas condiciones experimentales. Una situación similar se ha sugerido para la microcina H47, pues su actividad es dependiente de la presencia del gen *entF* en la cepa productora (Azpiroz y Lavina, 2004). En este trabajo se confirmó la utilización de enteroquelina como precursor para la modificación de la MccE492 utilizando cepas mutantes en genes del

locus *ent*, demostrándose además que la MccE492 producida por mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina (*entC*<sup>-</sup> y *entF*<sup>-</sup>) producen un péptido no-modificado y sin actividad bactericida. Así se relacionó de forma definitiva la actividad bactericida de esta microcina con la presencia de la modificación post-traducciona

Las salmoquelinas son sintetizadas solo por bacterias que expresan el locus *iroA*, por lo cual se especuló que este tipo de moléculas correspondiente a derivados glucosilados de enteroquelina solo podían ingresar a las células que expresaban el receptor de membrana externa IroN codificado dentro de este locus (revisado en Smith, 2007). Sin embargo, resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio demostraban que derivados mono y diglucosilados de enteroquelina eran capaces de ingresar a células de *E. coli* que no poseen locus *iroA*, y que estos derivados glucosilados eran sustrato para la modificación post-traducciona de la MccE492, pues revierten el fenotipo productor de MccE492 inactiva en cepas que no expresan una enteroquelina glucosil transferasa (Mercado, 2007; Mercado y cols., 2008). En esta tesis se quiso determinar cual o cuales eran los receptores utilizado por salmoquelinas para ingresar a una célula de *E. coli*, estableciéndose que ingresan utilizando principalmente el receptor de membrana externa Fiu y en menor medida FepA y Cir. Estos derivados glucosilados no solo son ingresados a las células de *E. coli* sino que también pueden ser utilizados como sustratos para el proceso de modificación post-traducciona de la MccE492. Por ello, utilizando una aproximación genética, se decidió evaluar el efecto de las diferentes mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina que producen MccE492 inactiva (*entB*<sup>-</sup>, *entC*<sup>-</sup>, *entF*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *entF* y  $\Delta$ *entDF*) cuando eran suplementadas con DHB (ácido dihidroxibenzoico) o DGE (enteroquelina diglucosilada). El fenotipo productor de MccE492 inactiva de estas mutantes pudo ser revertido adicionando al medio de cultivo el producto posterior a la actividad enzimática

mutada, con excepción de las cepas que tenían mutado el gen *entF*, la cual recuperó la producción de MccE492 activa solo al ser transformadas con un plasmidio que expresara *entF*. Lo mismo ocurrió con la cepa  $\Delta entDF$ , que carece de dos genes, pero que recupera la producción de enteroquelina y de MccE492 activa al ser transformada con un plasmidio que solo expresa el gen *entF*. Este resultado inesperado podría explicarse por que en el genoma de *E. coli* se encuentra el gen *acpT* (también llamado *yhhU*) que codifica para una 4'-fosfopantetoinil transferasa de sustrato desconocido en *E. coli* no-patógenas (Flugel y cols., 2000; De Lay y Cronan, 2006; De Lay y Cronan, 2008) y que podría reemplazar la función de EntD, que es la encargada de transferir los grupos fosfopantetoinil a los dominios PCP de EntB y EntF, en la vía de síntesis de enteroquelina. Además se determinó que la sintetasa de péptidos no-ribosomales EntF es necesaria para la actividad bactericida de la MccE492 en un proceso independiente de la síntesis de enteroquelina. La evidencia encontrada sobre la función dual de *entF* en la producción de MccE492 inmediatamente planteó la necesidad de saber si ésta dependía de alguna de sus actividades catalíticas o si se trataba de una función de andamiaje para las proteínas de la maduración propias del sistema productor de MccE492. Se ha demostrado que *in vitro*, solo las proteínas de maduración MceC y MceJ son necesarias para catalizar la producción de derivados glucosilados de enteroquelina y el enlace covalente entre estas y la serina 84 del péptido ribosomal (Nolan y cols., 2007; Nolan y Walsh, 2008).

Hasta el momento en que se realizó esta tesis de doctorado no existía información estructural sobre complejos de síntesis de péptidos no-ribosomal, por lo cual se decidió realizar un modelo molecular de EntF, el cual nos permitió por una parte diseñar nuevos experimentos para estudiar la función dual de esta sintetasa en la producción de MccE492 activa, y por otra parte hacernos una idea general del proceso

catalítico de esta sintetasa. De este modelo se dedujo que los dominios de EntF debían interactuar de manera secuencial durante el proceso de catálisis, debido a que las predicciones de interacciones discretas entre pares de residuos pertenecientes a diferentes dominios de la proteína no podían ser mapeados todos simultáneamente en contacto, dentro de una estructura rígida como la que se obtiene desde un proceso de modelamiento. Estas interacciones dinámicas entre los dominios de EntF serían las que permitirían que esta sintetasa sea intervenida por proteínas externas a la vía de síntesis de enteroquelina, como es el caso de las proteínas de maduración del sistema productor de MccE492, con una zona del sub-dominio mayor del dominio de adenilación libre para establecer estas interacciones. Nueva evidencia ha confirmado esas predicciones, ya que se ha logrado cristalizar la estructura del modulo terminador SrfA-C en la vía de síntesis no-ribosomal de surfactina (Tanovic y cols., 2008) que posee la misma organización de dominios que EntF, es decir C-A-PCP-TE. En esta estructura se observa que el sitio activo de los dominios de condensación y adenilación se encuentran formando lo que se denominó una “plataforma catalítica” en la cual están excluidos el sub-dominio mayor del dominio de adenilación y el dominio PCP, lo que permite movilidad durante el proceso de síntesis (Tanovic y cols., 2008). Además se observa que los sitios catalíticos del dominio de condensación y adenilación se encuentran separados por una gran distancia (63 Å), lo cual indica que deben ocurrir grandes re-arreglos y cambios conformacionales durante el proceso catalítico, inducidos por la unión de diferentes sustratos y por la interacción entre diferentes dominios, correspondiendo la estructura obtenida en el cristal a uno de los intermediarios (Tanovic y cols., 2008). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas logramos identificar tres posibles zonas de interacción proteína-proteína en la superficie del dominio de adenilación de EntF, dos de las cuales son fácilmente

asociables con las interfases de interacción entre este dominio y los dominios adyacentes de condensación y PCP. Sin embargo una tercera putativa interfase de interacción, conformada por 11 residuos (ver figura 20), no es atribuible a interacciones con otros de los dominios de la proteína, por lo que es probable que sea una zona de interacción con otras proteínas. Cuando se caracterizaron las zonas de interacción entre los dominios del modulo terminador de surfactina SrfA-C utilizando la estructura cristalográfica, se encontró un gran número de residuos en la interfase de interacción entre los dominios de condensación y adenilación, mientras que solo la mitad (15 residuos) se encontraron en contacto dentro de la interfase de interacción entre el dominio de adenilación y el PCP (Tanovic y cols., 2008). Estos últimos datos denotan la dificultad que se planteó durante el desarrollo de este trabajo, de encontrar un número discreto de residuos susceptibles de ser mutagenizados, dentro del parche de interacción predicho conformado por 11 residuos, que afectasen el proceso de modificación post-traducciona de la MccE492.

Respecto a la participación de EntF en la producción de MccE492 activa, la aproximación experimental de complementaciones con construcciones que expresaban versiones trunca de EntF con combinaciones de sus dominios, permitió acotar la participación dual de EntF a su dominio de adenilación. Mediante la mutación sitio dirigida de un putativo residuo catalítico pudimos determinar que el residuo de ácido glutámico (E750) es esencial para la producción de enteroquelina y dispensable en la producción de MccE492 activa. Los dominios de adenilación de las sintetasas de péptidos no-ribosomales son el punto de entrada de los aminoácidos que van a ser utilizados en la línea de ensamblaje. Estos dominios catalizan la activación de los aminoácidos como adenilatos o aminoacil-AMP utilizando  $Mg^{+2}$ -ATP (revisado en Marahiel y cols., 1997). Este proceso es similar al que catalizan las aminoacil tRNA

sintetasas (aaRS) en las vías de síntesis ribosomal, donde los aminoácidos también son activados como adenilatos, sin embargo los dominios de adenilación y las aaRS no son homólogos ni en su secuencia ni en sus estructuras tridimensionales (revisado en Marahiel y cols., 1997). De la misma manera que las aaRS definen el código genético, es ampliamente aceptado que los dominios de adenilación definen el código de ensamblaje de los aminoácidos utilizados en la síntesis de péptidos no-ribosomales (Lautru y Challis, 2004). Sin embargo el código utilizado por los dominios de adenilación aún no ha sido develado, a pesar que se han caracterizado múltiples complejos de síntesis de péptidos no-ribosomal. Probablemente la dificultad en la obtención de este código, que además permitiría la reprogramación de estos complejos para la síntesis de nuevas moléculas con actividades biológicas de relevancia (Walsh, 2002; Walsh, 2004), es la elevada diversidad de secuencias de dominios que existen y el reducido número de estructuras tridimensionales. El mecanismo de AMP-cilación de aminoácidos por parte de los dominios de adenilación ha sido poco estudiado y a pesar que en conjunto con las acil-CoA sintetasas y las luciferasas han sido clasificadas en el grupo de las enzimas formadoras de adenilato, que se encuentra separado de las aaRS, pareciera que ambos grupos comparten algunos elementos comunes que permitirían esclarecer el mecanismo catalítico de los dominios de adenilación. La comparación estructural de sus sitios activos muestra similitudes que permiten interpretar la posible función de ciertas regiones conservadas (Marahiel y cols., 1997) en el mecanismo catalítico. Para llevar a cabo su catálisis las aaRS de clase II, además de orientar los sustratos de manera adecuada para permitir el ataque nucleofílico del carboxilato del aminoácido al fosfato alfa de la molécula de ATP<sub>i</sub>, deben neutralizar las cargas electronegativas de los grupos fosfato. Éstas son neutralizadas mediante la interacción con un residuo de lisina conservado a través de la esfera de coordinación

del  $Mg^{+2}$  formada por el mismo fosfato alfa y dos residuos de ácido aspártico. Así, mutantes ya sea en los residuos de lisina o en los aspartatos que participan en la quelación del  $Mg^{+2}$  anularían la actividad de las aaRS de clase II (Cavarelli y cols., 1994; Schmitt y cols., 1998; Ador y cols., 2004). Dentro de las regiones conservadas en las secuencias de dominios de adenilación, la región conservada A10 (ver figura18) presenta un residuo de lisina conservado que interactúa con el fosfato alfa del AMP y al igual que en el caso de las aaRS de clase II, una mutación realizada en este residuo elimina la actividad de AMP-cilación (Pavela-Vrancic y cols., 1994; Conti y cols., 1997; Branchini y cols., 2000; Horswill y Escalante-Semerena, 2002). Se observa además que el residuo glutámico que se encuentra conservado en la región A5 interactúa con el ion  $Mg^{+2}$  mediante su grupo carboxilato de la misma manera que lo hacen los aspartatos de las aaRS de clase II. Es interesante destacar que la ubicación espacial de los residuos de lisina (de la región conservada A10) y glutamato (de la región conservada A5) varía en las estructuras de los dominios de adenilación dependiendo si estos fueron cristalizados en presencia o ausencia de  $Mg^{+2}$ . En las estructuras cristalizadas en presencia de  $Mg^{+2}$ , el residuo de glutamato está en contacto directo con el ion, provocando un alejamiento entre la cadena lateral del residuo de lisina y el fosfato alfa del ATP, mientras que en las estructuras resueltas en ausencia de  $Mg^{+2}$  la cadena lateral del residuo de lisina se encuentra próximo al fosfato alfa. Este movimiento de los residuos de glutamato y lisina, esenciales para la catálisis, posiblemente refleje la dinámica de eventos necesaria para la AMP-cilación.

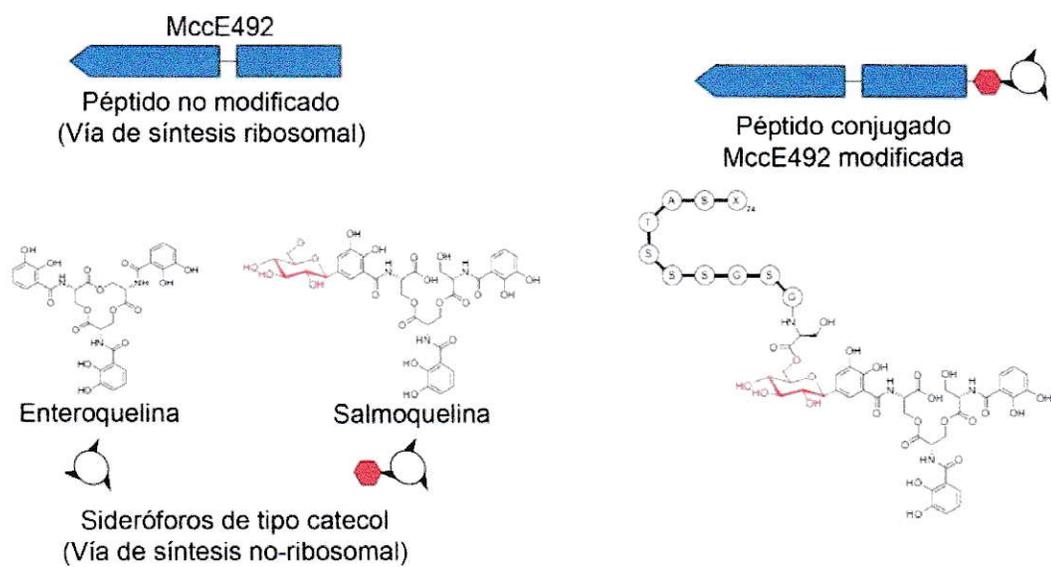
La mutación puntual que anula la actividad catalítica del dominio A de EntF no impide su participación en el proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492 que es independiente de la síntesis de enteroquelina, lo cual favorece la hipótesis de que su función sea la de actuar como proteína de andamiaje para las enzimas de

maduración. Ésta posiblemente ocurre en la zona de interacción proteína-proteína predicha en la superficie del modelo del domino de adenilación. Un argumento que apoya la necesidad de las proteínas de la maduración de la MccE492 de interactuar específicamente con EntF, es que las enzimas que catalizan la segunda etapa en la vía de síntesis de enteroquelina, entre las que se encuentra EntF, se encuentran asociadas a la membrana citoplasmática (Hantash y Earhart, 2000), observación que ha llevado a plantear que este sistema se encuentra asociado al sistema transportador que secreta directamente estos sideróforos al medio extracelular inmediatamente después de que son sintetizados (discutido en Crosa y Walsh, 2002). Las enzimas encargadas de la modificación post-traducciona l de la MccE492 invadirían este sistema cerrado de síntesis/exportación para tener acceso al precursor de la modificación (enteroquelina) antes de que sea secretado al medio extracelular. En nuestro laboratorio ya se están realizando experimentos de colocación subcelular mediante microscopía de fluorescencia encontrándose que la proteína de maduración MceC posee una localización polar, que se pierde al ser expresada en un fondo genético mutante para *entF* (Sergio Gutiérrez, Tesis de Doctorado).

El proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492 (Figura 36) es extremadamente novedoso, pues la modificación del residuo C-terminal del péptido con un enlace éster que lo une a una glucosa, que a su vez está unida a una molécula de enteroquelina, transforma a esta glucosa en un puente que une dos péptidos de diferentes orígenes y funciones: un antibiótico ribosomal y un sideróforo no-ribosomal, dos capas diferentes del metabolismo secundario que se unen y convierten en lo que se ha denominado una tercera capa de metabolismo o metabolismo terciario (Nolan y cols., 2007; Nolan y Walsh, 2009). La denominada tercera capa del metabolismo conduciría a procesos de co-evolución que permitirían por ejemplo la interacción

específica entre componentes de las dos capas del metabolismo secundario para dar origen a moléculas estructuralmente novedosas y posiblemente multi-funcionales que aportan una ventaja adaptativa, en términos de competencia e invasión, a los individuos que la producen. Este sería en caso del proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492, que mediante la participación de EntF da lugar a un péptido conjugado, compuesto por un antibiótico y un sideróforo, que sería capaz de actuar utilizando una estrategia tipo “caballo de Troya” ingresando a las células sensibles por los transportadores de sideróforos para ejercer su actividad bactericida, y eliminando selectivamente a las cepas que expresan estos receptores y que por lo tanto poseen el mismo sistema de captación de hierro (Fischbach y cols., 2006a).

Otra posibilidad que no se ha descartado completamente es que la bacteria productora de MccE492 modificada, pueda utilizar esta molécula conjugada también como sideróforo, pues se ha determinado que es capaz de unir hierro (Thomas y cols., 2004; Vassiliadis y cols., 2007). La presencia del sistema productor de MccE492 que codifica para la enteroquelina glucosil transferasa (MceC) y de la esterasa (MceD), le darían a la cepa portadora, aun cuando no posea el locus *iroA*, la posibilidad de utilizar como sideróforos los derivados glucosilados de enteroquelina, evadiendo así la respuesta inmune innata del hospedero mediada por lipocalina-2. Así sería posible colonizar nuevos nichos disponibles solo para patógenos, como es el caso de las *E. coli* uropatógenicas (Henderson y cols., 2009).



**Figura 36.** La MccE492 modificada es una molécula que conjuga dos capas independientes del metabolismo secundario. La MccE492 modificada post-traduccionalmente (derecha) une mediante un puente de glucosa (en rojo) un péptido de síntesis ribosomal (izquierda arriba) con un péptido de síntesis no-ribosomal (izquierda abajo).

#### **4.2. Efecto de la modificación post-traducciona l en la conformación de la MccE492.**

Mediante el proceso de modificación post-traducciona l las cepas productoras de MccE492 secretan una mezcla de péptidos modificado y no-modificado cuya actividad y proporción varían durante la etapa de crecimiento en la cual se encuentre la cepa productora. Esta variación depende de factores como la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de sideróforos de tipo catecol, y la disponibilidad de hierro y aminoácidos aromáticos en el medio de cultivo. La mayor actividad bactericida se observa en fase exponencial de crecimiento, etapa en la cual se encuentra el máximo de expresión transcripcional y traducciona l de los genes de la maduración (Corsini y cols., 2002; Mercado, 2007). La expresión de los genes de la maduración *mceCIJ*, esta finamente controlada mediante varios mecanismos que están siendo estudiados en profundidad en nuestro laboratorio (Sergio Gutiérrez, Tesis de Doctorado). Los estudios genéticos realizados en este trabajo tanto con mutantes en la vía de síntesis de enteroquelina como en los genes de la maduración del sistema productor de MccE492 han demostrado que la modificación post-traducciona l es necesaria para la actividad bactericida y que la proporción de péptido que encontramos modificado es dependiente de los niveles de expresión de los genes de la maduración. Es así que cepas productoras de MccE492 (pJEM15) que sobre-expresan los genes de la maduración (pT7-IJ o pT7-C) emulando células que se encuentran en fase exponencial de crecimiento producen una mayor proporción del péptido modificado. De manera inversa una cepa que sobre-expresa el gen estructural de la microcina (pT7-AB) emula células en fase estacionaria produciendo una menor proporción de péptido modificado. Estas diferencias se traducen en diferencias en la actividad específica de las muestras aumentando a medida que aumenta la proporción de péptido modificado, lo cual apoya

fuertemente la idea que es la modificación post-traducciona la que permite el reconocimiento a nivel de los receptores de membrana (discutido en Fischbach y cols., 2006). De manera inversa se ve afectada la capacidad de formar fibras de tipo amiloide, ya que muestras con menores niveles de modificación e incluso aquellas provenientes de mutantes en los genes de la maduración son las que poseen una mayor capacidad para formar amiloides. La mayor producción de amiloides está relacionada con la capacidad que poseen las semillas de una muestra de microcina no-modificada de actuar como mejores centros nucleadores. Esto indicaría que la modificación post-traducciona no solo está implicada en el reconocimiento de la microcina a nivel de los receptores de membrana externa, sino que también afectaría la capacidad amiloidogénica de la MccE492. Se ha descrito que modificaciones post-traduccionales alteran la habilidad de proteínas amiloidogénicas para agregar en fibras de tipo amiloide, como por ejemplo las glicosilaciones de la proteína priónica (Tuzi y cols., 2008) y del amiloide- $\beta$  (Atwood y cols., 2002). El nivel de modificación post-traducciona de la MccE492 no afecta la morfología de las fibras sino más bien la cinética de agregación. Todas las muestras forman fibras que presentan las características típicas de las fibras de tipo amiloides descritas hasta el momento, con filamentos rectos, no-ramificados y polimórficos. La fibra más representada en todas las muestras con diferentes grados de modificación que se analizaron fueron fibras helicoidales cuyas medidas promedio fueron de ~14 nm de ancho y ~50 nm de paso. La MccE492 constituye un excelente modelo de estudio a nivel estructural mediante la reconstrucción de imágenes debido a la alta pureza de las muestras, la buena calidad de las fibras y homogeneidad de las estructuras observadas. La caracterización más detallada a nivel estructural del proceso de formación de fibras de amiloide por la MccE492 no solo puede ayudar a entender el mecanismo de su potencial actividad

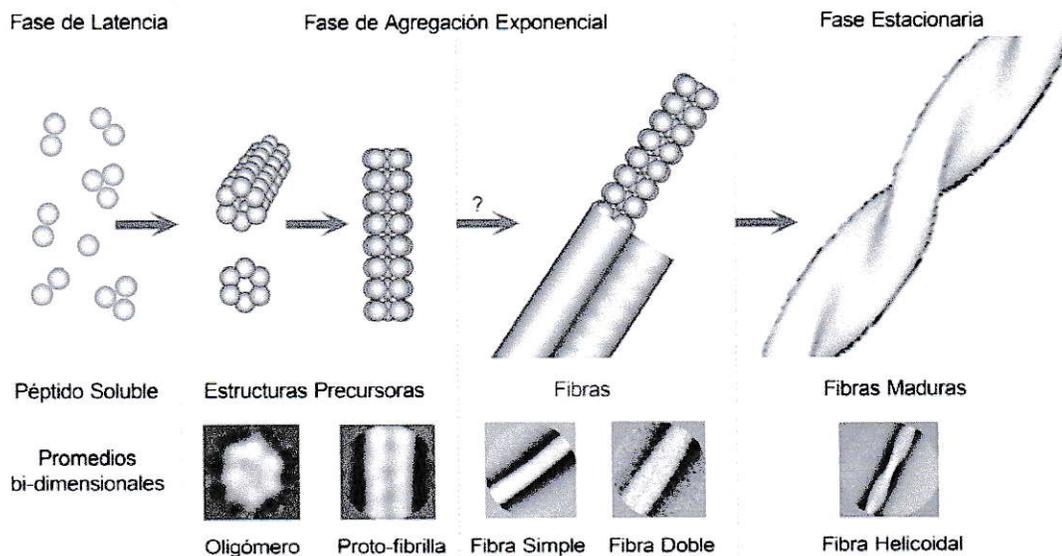
anti-tumoral, sino que también puede servir de modelo para el estudio de la apoptosis inducida por agregados de amiloide asociados a diversas enfermedades. Fibras de tipo amiloide formadas por diversas proteínas han sido caracterizadas a nivel estructural mediante técnicas de microscopía electrónica y reconstrucción de imágenes, sin embargo estas fibras se forman solo en condiciones extremas de temperatura, pH y durante tiempos de incubación muy largos de incluso meses u años (Jimenez y cols., 1999; Serpell y Smith, 2000; Jimenez y cols., 2002). En el caso de la MccE492 el protocolo de agregación que ha permitido visualizar estas fibras por microscopía electrónica es llevado a cabo incubando durante 12 horas a pH 7 y 37°C, parámetros que se acercan más a las condiciones fisiológicas o de cultivo en las cuales la bacteria crece y en las cuales la formación de estas fibras podría estar regulando la actividad del péptido. Para estudiar el proceso de formación de fibras de tipo amiloide de la MccE492 se realizaron promedios bi-dimensionales a partir de las micrografías electrónicas que se obtuvieron de muestras de microcina no-modificada proveniente de una mutante en el gen de maduración *mceC* (npB4). Se seleccionó esta muestra en particular pues presentó las estructuras más claras y limpias, que es un requisito importante en el proceso de reconstrucción de imágenes. Nuestros resultados indican que en las muestras de microcina npB4 el proceso de agregación comienza aproximadamente a partir de las 4 horas, a diferencia de lo descrito para muestras provenientes de una cepa que expresa el plasmidio sobre-productor pJEM15 para las cuales el proceso de agregación comienza aproximadamente a las 10 horas (Bieler y cols., 2005). En ambas muestras este proceso de agregación está acompañado por un aumento en la estructura secundaria del péptido a medida que éste va agregando, como se puede deducir de los espectros de dicroísmo circular.

El procesamiento de las imágenes obtenidas para las estructuras anulares no llegó a una convergencia de las imágenes individuales posiblemente porque estas estructuras son heterogéneas, es decir las imágenes obtenidas corresponden a diferentes oligómeros, entre los que son fácilmente distinguibles pentámeros y hexámeros, así como también a vistas diferentes, ligeramente laterales, de dímeros o trímeros de anillos. Todas ellas en promedio presentan un diámetro externo entre 7 a 8 nm. Esta heterogeneidad también está presente en las proto-fibrillas observadas, que corresponden a multímeros mayores de los anillos. En este caso no hubo inconvenientes en su procesamiento, pues las ventanas digitales utilizadas para generar las imágenes individuales eran de menor tamaño que las estructuras. En este caso únicamente se encontraron diferencias en el ancho de las imágenes promediadas de las fibras, que fueron de  $\sim 7$  y 8 nm, lo que se podría deber a que algunas de ellas corresponden a multímeros de pentámeros y otras de hexámeros. Sin embargo es muy difícil comprobar a priori con imágenes obtenidas mediante tinción negativa de cual estructura se trata, pues la capa que se forma sobre las estructuras con la sal del metal pesado (en este caso acetato de uranilo) no es perfectamente uniforme ni siquiera dentro de una misma rejilla. Las imágenes de las estructuras antes descritas que son las encontradas durante las primeras etapas de agregación por tratarse de estructuras muy pequeñas se obtuvieron a altas magnificaciones (50.000 aumentos). Las imágenes para los promedios de las fibras propiamente tal, se obtuvieron a baja magnificación (20.000 aumentos) pues se trataba de estructuras de mayor tamaño. Dentro de las estructuras menos representadas, encontramos fibras simples y dobles que por sus dimensiones nos hacen pensar en intermediarios en la formación de las fibras que están más representadas o maduras que serían las fibras helicoidales. Dentro de las fibras simples encontramos las fibras rectas y cortas que serían las

estructuras precursoras y también observamos fibras largas y onduladas a largos tiempos de agregación, que se obtendrían posiblemente por algún tipo de re-ordenamiento, empaquetamiento o cambio conformacional de la MccE492 dentro de la fibra. Estas fibras simples de ~7 nm de ancho se unirían generando fibras dobles de ~14 nm de ancho con un surco central, las que en algunas micrografías se observan parcialmente enrolladas, para generar finalmente las fibras helicoidales maduras. Las fibras helicoidales maduras son muy homogéneas y sus dimensiones de ~14 nm de ancho y ~50 nm de paso se conservan dentro de todas las muestras analizadas.

A partir de los promedios bi-dimensionales de las estructuras encontradas tanto en las fases tempranas como tardías de la agregación se pudo plantear el modelo del mecanismo de formación de estas fibras que se esquematiza en la figura 37.

En la fase de latencia se espera encontrar el péptido soluble en forma de dímeros y trímeros, pues se ha descrito que esos son los estados de oligomerización que adopta la MccE492 en solución acuosa (Destoumieux-Garzón y cols., 2003). Esta microcina soluble formaría los anillos, estructuras similares a la descrita tanto para precursores y estructuras tóxicas de proteínas amiloidogénicas, como para algunas toxinas bacterianas formadoras de poros (discutido en Lashuel y cols., 2002). En condiciones de agregación y al alcanzar una concentración crítica estos anillos polimerizarían para formar las proto-fibrillas rectas dentro de cuyas estructuras aún es posible distinguir los monómeros de MccE492. Durante la fase de agregación exponencial, mediante un proceso de re-ordenamiento, empaquetamiento o cambio conformacional, estas proto-fibrillas rectas darían lugar a las fibras simples que se observan lisas y onduladas, y dentro de cuya estructura no es posible distinguir los monómeros de MccE492.



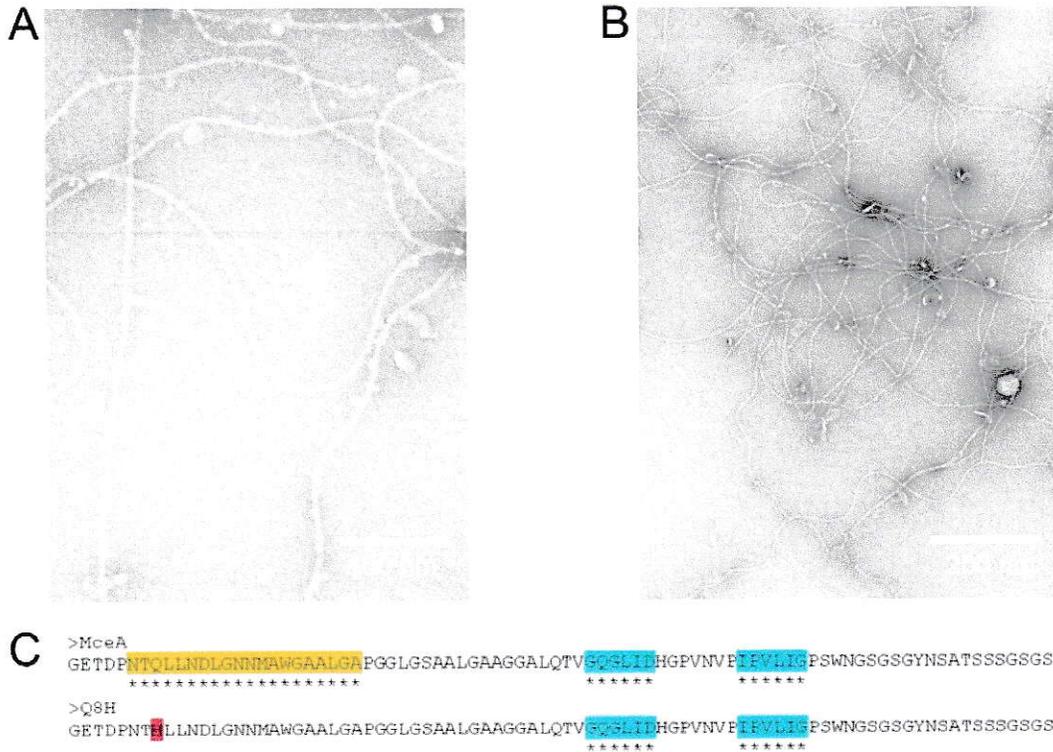
**Figura 37. Esquema del mecanismo de agregación en fibras de tipo amiloide de la MccE492.** En la parte superior de la figura se muestran los esquemas de las estructuras obtenidas por promedios bi-dimensionales (abajo). En la fase de latencia previo a la agregación existe solo péptido soluble. Luego ocurriría la formación de los oligómeros anulares de microcina que polimerizarían dando lugar a las proto-fibrillas rectas. Estas estructuras serían precursoras para la formación de las fibras amiloides simples y dobles, procesos que ocurrirían en la fase exponencial de la agregación mediante un proceso aún desconocido (?) de re-ordenamiento, empaquetamiento o cambio conformacional del péptido. Las fibras dobles, que presentan un surco central, darían origen a las fibras helicoidales maduras que son las más representadas durante la fase estacionaria. Este modelo es válido tanto si se considera el oligómeros pentamérico o hexamérico como precursor.

Luego estas fibras simples mediante interacciones laterales formarían las fibras dobles que presentan un surco central. Finalmente las fibras dobles se enrollarían para formar las fibras helicoidales que se encuentran más representadas en fase estacionaria. Este modelo es válido también si se incluye la estructura pentamérica que es la más abundante como precursor. Se escogió la representación del hexámero pues fue la primera estructura caracterizada durante mi trabajo realizado en el laboratorio del Dr. J.M. Valpuesta.

Una característica común de las proteínas amiloidogénicas es que poseen dos vías de plegamiento: la vía de "plegamiento correcto" que usualmente da como resultado proteínas solubles y activas; y una vía de "plegamiento incorrecto" que resulta en las proteínas que agregan de forma ordenada en fibras de tipo amiloide, siendo este último proceso dependiente de nucleación y termodinámicamente irreversible (Dobson, 2003; Chiti y Dobson, 2009). El intenso estudio del que han sido objeto las proteínas formadoras de amiloides ha permitido que hoy sea ampliamente aceptado que las estructuras tóxicas tanto de proteínas implicadas en procesos patológicos como de amiloides naturales son los oligómeros precursores (Bucciantini y cols., 2002), mientras que las fibras maduras han sido descritas como estructuras más bien inertes. Por esta razón se ha especulado que un mecanismo mediante el cual las células se protegerían de la toxicidad de las proteínas incorrectamente plegadas sería formando grandes depósitos insolubles de fibras maduras. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que estas fibras maduras supuestamente insolubles e inertes pueden ser solubilizadas hasta sus estructuras tóxicas mediante un tratamiento con lípidos que están presentes en la membrana celular (Martins y cols., 2008).

Estos antecedentes y las observaciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo permiten plantear un mecanismo que relaciona el proceso de formación de

amiloides de MccE492 y su actividad tóxica. Postulamos que las estructuras anulares oligoméricas que forma la MccE492 serían las que presentan toxicidad tanto sobre bacterias sensibles como sobre células tumorales. Durante la fase exponencial de crecimiento de las cepas productoras de MccE492, se secretaría una mayor proporción de péptido modificado, y la presencia de la modificación en uno o más de los péptidos dentro de los oligómeros anulares serían las que permitirían el reconocimiento a nivel de membrana externa principalmente por el receptor FepA, mediante el cual la célula es capaz de traslocar estructuras moleculares grandes, como por ejemplo fagos (Rabsch y cols., 2007). La presencia de las modificaciones post-traduccionales en estos oligómeros además retrasaría la formación de las fibras maduras, pues estos oligómeros modificados se comportan como pobres centros nucleadores en comparación con su contrapartida no-modificada. En fase estacionaria de crecimiento se secretaría una mayor cantidad de péptido no-modificado y en consecuencia los oligómeros formados serían mejores centros nucleadores, lo que daría origen rápidamente a fibras maduras que no presentan actividad bactericida. La formación de las fibras maduras no sería una condición esencial para la actividad citotóxica sino más bien permitirían una liberación más estable de oligómeros tóxicos, una vez que las fibras están en contacto con la membrana lipídica de sus células blanco, que en este caso corresponden a células tumorales. Una observación adicional que respalda este modelo está relacionada con el estudio de la mutante puntual MccE492 Q8H. Esta mutante se agrega espontáneamente, tiene una mayor actividad anti-tumoral, pero no presenta actividad bactericida (García, 2008). Se analizaron las fibras producidas por esta mutante y se observó que estas correspondían a fibras simples no-helicoidales (Figura 38 A y B).



**Figura 38. Formación de fibras de amiloides a partir de la mutante puntual MccE492 Q8H.** Muestras purificadas y agregadas de MccE492 Q8H se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% para la microscopía electrónica. Las micrografías fueron obtenidas a una magnificación de 60.000 (A) y 20.000 (B) aumentos. C. Las secuencias de las microcinas silvestre (MceA) y de las mutante puntual (Q8H) fueron enviadas al servidor Waltz para la predicción de zonas involucradas en la formación de amiloides (\*). En la secuencia de la MccE492 silvestre se observan dos zonas menores en celeste y una zona mayor en amarillo. En la secuencia de la mutante Q8H solo se observan las zonas menores en celeste. En rojo se destaca la mutación puntual.

No se pudo realizar una reconstrucción de estas fibras, ya que en todas las muestras analizadas se encontraron siempre asociadas a pequeñas vesículas lipídicas (ver figura 38), que interfieren con el procesamiento. Para explicar la ausencia de fibras helicoidales maduras, se analizó la secuencia de la microcina silvestre y de la mutante puntual Q8H mediante el algoritmo Waltz (<http://switpc7.vub.ac.be/cgi-bin/submit.cgi>), el cual basado en propiedades fisicoquímicas predice las zonas de formación de estructura beta nucleadoras de amiloides dentro de una secuencia (Maurer-Stroh y cols., manuscrito enviado para su publicación). El resultado del análisis se muestra en la figura 38 C, observándose que la secuencia de la microcina silvestre muestra tres zonas de formación de amiloide, y que la mutación puntual en el residuo 8 hace que desaparezca la zona de mayor tamaño. Basados en estas predicciones planteamos que la presencia de las dos zonas nucleadoras menores son las involucradas en la formación de la fibra simple que se observa en la mutante, siendo este proceso espontáneo en ausencia de las interacciones de la zona mayor, las cuales se necesitarían para las interacciones laterales de la fibra helicoidal. La espontaneidad de este proceso secuestraría todos los oligómeros formados impidiendo la actividad bactericida de esta mutante. También es posible que estas fibras "inmaduras" sean fácilmente solubilizadas al entrar en contacto con la superficie lipídica de las células tumorales sensibles, lo cual daría cuenta de su mayor toxicidad.

## 5. CONCLUSIONES.

- Los derivados mono y diglucosilados de enteroquelina pueden ingresar a cepas no-patógenas de *E. coli* utilizando mayoritariamente el receptor de membrana externa para sideróforos de tipo catecol Fiu.
- Cepas con mutaciones en la vía de síntesis de enteroquelina producen una MccE492 inactiva y no-modificada post-traduccionamente, de lo cual se desprende que la enteroquelina es el precursor para modificación post-traducciona de la MccE492.
- La sintetasa de péptidos no ribosomal EntF participa en la producción de MccE492 activa en un proceso adicional a la síntesis de enteroquelina. En esta función dual solo participaría el dominio de adenilación de manera independiente de la actividad catalítica necesaria para la síntesis de enteroquelina. En esta última actividad el residuo E750 es imprescindible.
- El modelo molecular de EntF predice que sus dominios interactúan de forma dinámica y que la zona del sub-dominio mayor del dominio de adenilación presenta un parche de interacción proteína-proteína, no atribuible a la interacción con los otros dominios de la sintetasa, lo que convierte a esta zona en una buena candidata para interactuar con otras proteínas.
- La proporción de microcina E492 modificada post-traduccionamente aumenta conforme aumenta la expresión de los genes de la maduración. Este nivel de

modificación post-traducciona es directamente proporcional a la actividad bactericida e inversamente proporcional a la capacidad de agregar en fibras de tipo amiloide.

- Muestras de MccE492 no-modificadas presentan una cinetica de agregación acelerada y las semillas de fibras amiloides proveniente de éstas actúan como centros nucleadores más eficientes en el proceso de agregación de la MccE492.
- En estadios tempranos del proceso de agregación de la MccE492 se observan proto-fibrillas y estructuras oligoméricas anulares típicas de poros amiloides altamente tóxicos. Estos precursores dan lugar a fibras helicoidales maduras que poseen formas y dimensiones similares, de ~14 nm de ancho y ~50 nm de paso, en muestras con diferentes grados de modificación post-traducciona.

## 6. REFERENCIAS.

- Abergel, R. J., Moore, E. G., Strong, R. K., y Raymond, K. N. (2006). Microbial evasion of the immune system: structural modifications of enterobactin impair siderocalin recognition. *J Am Chem Soc* 128, 10998-10999.
- Ador, L., Jaeger, S., Geslain, R., Martin, F., Cavarelli, J., y Eriani, G. (2004). Mutation and evolution of the magnesium-binding site of a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 43, 7028-7037.
- Afonnikov, D. A., y Kolchanov, N. A. (2004). CRASP: a program for analysis of coordinated substitutions in multiple alignments of protein sequences. *Nucleic Acids Res* 32, W64-68.
- Afonnikov, D. A., Oshchepkov, D. Y., y Kolchanov, N. A. (2001). Detection of conserved physico-chemical characteristics of proteins by analyzing clusters of positions with co-ordinated substitutions. *Bioinformatics* 17, 1035-1046.
- Atwood, C. S., Martins, R. N., Smith, M. A., y Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23, 1343-1350.
- Ausbel, F., Brent, R., Kingtons, E., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., y Struhl, K. (1992). Short protocols in molecular biology (New York, Greene Publishing Associates).
- Azpiroz, M. F., y Lavina, M. (2004). Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1235-1241.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de translocación y conversión tipo prion de la microcina E492. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile.
- Baquero, F., y Moreno, F. (1984). The microcins. *FEMS Microbiology Letters* 23, 117-124.
- 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.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K., y Sussmuth, R. D. (2004). The structure of salmochelins: C-glycosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biomaterials* 17, 471-481.
- Bowie, J. U., Luthy, R., y Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- Bradford, J. R., y Westhead, D. R. (2005). Improved prediction of protein-protein binding sites using a support vector machines approach. *Bioinformatics* 21, 1487-1494.
- Branchini, B. R., Murtiashaw, M. H., Magyar, R. A., y Anderson, S. M. (2000). The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. *Biochemistry* 39, 5433-5440.
- Bucciantini, M., Gianni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., y Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-511.
- Caughey, B., y Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26, 267-298.
- Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J. C., y Moras, D. (1994). The active site of yeast

- aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *Embo J* 13, 327-337.
- Chang, A. C., y Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156.
- Chen, H., y Zhou, H. X. (2005). Prediction of interface residues in protein-protein complexes by a consensus neural network method: test against NMR data. *Proteins* 61, 21-35.
- Chiti, F., y Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* 5, 15-22.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., y Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* 16, 4174-4183.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., y Lagos, R. (2002). The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie* 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.
- Crouch, M. L., Castor, M., Karlinsey, J. E., Kalhorn, T., y Fang, F. C. (2008). Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 67, 971-983.
- De Lay, N. R., y Cronan, J. E. (2006). A genome rearrangement has orphaned the *Escherichia coli* K-12 AcpT phosphopantetheinyl transferase from its cognate *Escherichia coli* O157:H7 substrates. *Mol Microbiol* 61, 232-242.
- De Lay, N. R., y Cronan, J. E. (2008). Genetic interaction between the *Escherichia coli* AcpT phosphopantetheinyl transferase and the YejM inner membrane protein. *Genetics* 178, 1327-1337.
- 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.
- de Vries, S. J., van Dijk, A. D., y Bonvin, A. M. (2006). WHISCY: what information does surface conservation yield? Application to data-driven docking. *Proteins* 63, 479-489.
- Destoumieux-Garzon, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthelemy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A. M., Letellier, L., y cols. (2003). Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49, 1031-1041.
- Do, C. B., Mahabhashyam, M. S., Brudno, M., y Batzoglou, S. (2005). ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res* 15, 330-340.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., y Rebuffat, S. (2007a). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 24, 708-734.

- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., y Rebuffat, S. (2007b). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 200-209.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Estrada, L. (2005) Efecto antitumoral de la microcina E492, un amiloide bacteriano. Seminario de Título Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.
- Estrada, L., Urayama, A., Garcia, V., Bieler, S., Lagos, R., y Soto, C. (manuscrito enviado para su publicación). A novel strategy for cancer treatment using amyloid fibrils.
- Feldmann, F., Sorsa, L. J., Hildinger, K., y Schubert, S. (2007). The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infect Immun* 75, 3183-3187.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R., y Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 571-576.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R., y Walsh, C. T. (2006a). How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol* 2, 132-138.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R. J., Liu, D. R., Raymond, K. N., Wanner, B. L., Strong, R. K., Walsh, C. T., y cols. (2006b). The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16502-16507.
- Fischer, H., Polikarpov, I., y Craievich, A. F. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci* 13, 2825-2828.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S., y Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-921.
- Flugel, R. S., Hwangbo, Y., Lambalot, R. H., Cronan, J. E., Jr., y Walsh, C. T. (2000). Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 959-968.
- 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 de Doctorado, Universidad de Chile.
- Gebbink, M. F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L., y Wosten, H. A. (2005). Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 3, 333-341.
- 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.
- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., y Ben-Tal, N. (2003). ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics* 19, 163-164.

- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N., y Strong, R. K. (2002). The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10, 1033-1043.
- Grass, G. (2006). Iron transport in Escherichia coli: all has not been said and done. *Biomaterials* 19, 159-172.
- Hantash, F. M., y Earhart, C. F. (2000). Membrane association of the Escherichia coli enterobactin synthase proteins EntB/G, EntE, and EntF. *J Bacteriol* 182, 1768-1773.
- Hantke, K. (1983). Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet* 191, 301-306.
- Hantke, K. (1990). Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for E. coli. *FEMS Microbiol Lett* 55, 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 U S A* 100, 3677-3682.
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., Hooton, T. M., y Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic Escherichia coli. *PLoS Pathog* 5, e1000305.
- Hetz, C., Bono, M. R., Barros, L. F., y Lagos, R. (2002). Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from Klebsiella pneumoniae, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2696-2701.
- Hohn, B., y Collins, J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11, 291-298.
- Holmes, M. A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C., y Strong, R. K. (2005). Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13, 29-41.
- Horswill, A. R., y Escalante-Semerena, J. C. (2002). Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of Salmonella enterica: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis. *Biochemistry* 41, 2379-2387.
- Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
- Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M., y Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *Embo J* 18, 815-821.
- Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., y Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9196-9201.
- Jones, S., y Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13-20.
- Jones, S., y Thornton, J. M. (1997a). Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J Mol Biol* 272, 121-132.
- Jones, S., y Thornton, J. M. (1997b). Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis. *J Mol Biol* 272, 133-143.
- Kelley, L. A., y Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363-371.
- 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., Garcia, V., y Monasterio, O. (2009). Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 74-85.
- 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., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., y Monasterio, O. (1993). Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membrane. *FEBS Lett* 321, 145-148.
- Lai, J. R., Fischbach, M. A., Liu, D. R., y Walsh, C. T. (2006). A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5314-5319.
- Lamb, S. S., y Wright, G. D. (2005). Accessorizing natural products: adding to nature's toolbox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 519-520.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., y Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* 3, 923-936.
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T., y Ben-Tal, N. (2005). ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res* 33, W299-302.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., y cols. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., y Lansbury, P. T., Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291.
- Lautru, S., y Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* 150, 1629-1636.
- Liang, S., Zhang, C., Liu, S., y Zhou, Y. (2006). Protein binding site prediction using an empirical scoring function. *Nucleic Acids Res* 34, 3698-3707.
- Lichtarge, O., Bourne, H. R., y Cohen, F. E. (1996). An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 257, 342-358.
- Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R., y Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* 127, 11075-11084.
- Liu, J., Duncan, K., y Walsh, C. T. (1989). Nucleotide sequence of a cluster of *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis genes: identification of entA and purification of its product 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase. *J Bacteriol* 171, 791-798.
- Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G. A., y Walsh, C. T. (1990). Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* 29, 1417-1425.
- Luthy, R., Bowie, J. U., y Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83-85.

- Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martín, M. C., Marco, S., Fernández, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, C., y Carazo, J. M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol* 116, 237-240.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., y Mootz, H. D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* 97, 2651-2674.
- Martins, I. C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W., Van Gelder, P., Hartmann, D., D'Hooge, R., De Strooper, B., y cols. (2008). Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *Embo J* 27, 224-233.
- Maurer-Stroh, S., Kuemerer, N., Martins, I., Rousseau, F., Serrano, L., y Schymkowitz, J. (manuscrito enviado para su publicación). Accurate prediction of sequence determinants of amyloid formation using the Waltz algorithm.
- Mercado, G. (2007) Regulación de la actividad bactericida de la microcina E492 por los genes de maduración. Seminario de Título Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.
- Mercado, G., Tello, M., Marin, 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.
- Mihalek, I., Res, I., y Lichtarge, O. (2004). A family of evolution-entropy hybrid methods for ranking protein residues by importance. *J Mol Biol* 336, 1265-1282.
- Morgan, D. H., Kristensen, D. M., Mittelman, D., y Lichtarge, O. (2006). ET viewer: an application for predicting and visualizing functional sites in protein structures. *Bioinformatics* 22, 2049-2050.
- Murakami, Y., y Jones, S. (2006). SHARP2: protein-protein interaction predictions using patch analysis. *Bioinformatics* 22, 1794-1795.
- Negi, S. S., Schein, C. H., Oezguen, N., Power, T. D., y Braun, W. (2007). InterProSurf: a web server for predicting interacting sites on protein surfaces. *Bioinformatics* 23, 3397-3399.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270, 26723-26726.
- 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.
- Nolan, E. M., y Walsh, C. T. (2008). Investigations of the MceJ-catalyzed posttranslational modification of the microcin E492 C-terminus: linkage of ribosomal and nonribosomal peptides to form "trojan horse" antibiotics. *Biochemistry* 47, 9289-9299.
- Nolan, E. M., y Walsh, C. T. (2009). How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *ChemBiochem* 10, 34-53.
- Notredame, C., Higgins, D. G., y Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217.
- 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.
- 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.
- Olmea, O., y Valencia, A. (1997). Improving contact predictions by the combination of correlated mutations and other sources of sequence information. *Fold Des* 2, S25-32.

- Orellana, C., y Lagos, R. (1996). The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol Lett* 136, 297-303.
- Otzen, D., y Nielsen, P. H. (2008). We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65, 910-927.
- 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.
- Pavela-Vrancic, M., Van Liempt, H., Pfeifer, E., Freist, W., y Von Dohren, H. (1994). Nucleotide binding by multienzyme peptide synthetases. *Eur J Biochem* 220, 535-542.
- Pazos, F., Olmea, O., y Valencia, A. (1997). A graphical interface for correlated mutations and other protein structure prediction methods. *Comput Appl Biosci* 13, 319-321.
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., y Lavina, M. (2006). Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1411-1418.
- Pons, A. M., Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorselaer, A., y Cottenceau, G. (2002). Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 229-230.
- Porollo, A., y Meller, J. (2007). Prediction-based fingerprints of protein-protein interactions. *Proteins* 66, 630-645.
- Pugsley, A. P., Moreno, F., y de Lorenzo, V. (1986). Microcin-E492-insensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* 132, 3253-3259.
- Rabsch, W., Ma, L., Wiley, G., Najar, F. Z., Kaserer, W., Schuerch, D. W., Klebba, J. E., Roe, B. A., Laverde Gomez, J. A., Schallmeyer, M., y cols. (2007). FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J Bacteriol* 189, 5658-5674.
- Raffatellu, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S. P., Paixao, T. A., Butler, B. P., Chu, H., Santos, R. L., Berger, T., y cols. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 5, 476-486.
- Ratledge, C. (2007). Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull* 28, S515-523.
- Roche, E. D., y Walsh, C. T. (2003). Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. *Biochemistry* 42, 1334-1344.
- Rusnak, F., Faraci, W. S., y Walsh, C. T. (1989). Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product. *Biochemistry* 28, 6827-6835.
- Rusnak, F., Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G. A., y Walsh, C. T. (1990). Subcloning of the enterobactin biosynthetic gene entB: expression, purification, characterization, and substrate specificity of isochorismatase. *Biochemistry* 29, 1425-1435.
- Sali, A., y Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815.
- Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edn (Cold Spring Harbor, Laboratory Press).

- Scheres, S. H., Nunez-Ramirez, R., Sorzano, C. O., Carazo, J. M., y Marabini, R. (2008). Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc* 3, 977-990.
- Scheres, S. H., Valle, M., y Carazo, J. M. (2005). Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics* 21 Suppl 2, ii243-244.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J. C., y Moras, D. (1998). Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD: archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *Embo J* 17, 5227-5237.
- Schwyn, B., y Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160, 47-56.
- Serpell, L. C., y Smith, J. M. (2000). Direct visualisation of the beta-sheet structure of synthetic Alzheimer's amyloid. *J Mol Biol* 299, 225-231.
- Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A. M., Berg, C., y Walsh, C. T. (1999). Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol* 6, 385-400.
- Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355-362.
- Skaar, E. P. (2009). A precious metal heist. *Cell Host Microbe* 5, 422-424.
- Smith, K. D. (2007). Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1776-1780.
- Sorzano, C. O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H., Carazo, J. M., y Pascual-Montano, A. (2004). XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* 148, 194-204.
- 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.
- Tanovic, A., Samel, S. A., Essen, L. O., y Marahiel, M. A. (2008). Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* 321, 659-663.
- Tello, M. (2006) La especificidad, exportación y procesamiento de la microcina E492 y colicina V dependen del dominio ABC de sus transportadores. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Afonso, 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.
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., y Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol* 6, e100.
- Valdebenito, M., Muller, S. I., y Hantke, K. (2007). Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin). *FEMS Microbiol Lett* 277, 182-187.
- Vassiliadis, G., Peduzzi, J., Zirah, S., Thomas, X., Rebuffat, S., y Destoumieux-Garzon, D. (2007). Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin

- is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3546-3553.
- Vosburg, D. A., y Walsh, C. T. (2005). Natural product biosynthetic assembly lines: prospects and challenges for reprogramming. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 261-284.
- Walsh, C. T. (2002). Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem* 3, 125-134.
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* 303, 1805-1810.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., y Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., y cols. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17020-17024.
- Wilkins, 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.
- Wu, W. S., Hsieh, P. C., Huang, T. M., Chang, Y. F., y Chang, C. F. (2002). Cloning and characterization of an iron regulated locus, *iroA*, in *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*. *DNA Seq* 13, 333-341.
- Zhou, H. X., y Shan, Y. (2001). Prediction of protein interaction sites from sequence profile and residue neighbor list. *Proteins* 44, 336-343.
- Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G., y Hantke, K. (2005). Functions of the siderophore esterases *IroD* and *IroE* in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* 151, 2363-2372.