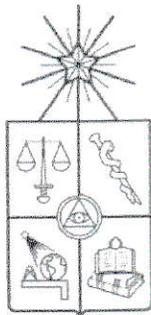


UCH-FC
MAG-Microbiología
L525
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**EL MOTIVO GLICINA-X DEL CARBOXILO TERMINAL ES INDISPENSABLE PARA
LA MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LA MICROCINA E492**

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



Por

MARIO FELIPE HERNÁN LEIVA HIDALGO

Octubre, 2009
Santiago - Chile

Directora de Tesis: Dra. ROSALBA LAGOS MÓNACO
Co-Director de Tesis: Dr. OCTAVIO MONASTERIO OPAZO

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

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

MARIO FELIPE HERNÁN LEIVA HIDALGO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología y Genética, en el examen de Defensa Pública de Tesis rendida el día 21 de Octubre del 2009.

Directora de Tesis:
Dra. Rosalba Lagos



.....

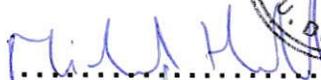
Co-Director de Tesis:
Dr. Octavio Monasterio



.....

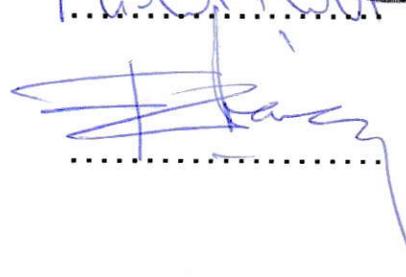
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Michael Handford



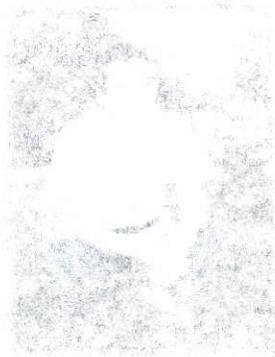
.....

Dr. Francisco Chávez



.....





***Dedico esta tesis a toda mi familia, en especial
a mis queridos padres Isabel y Carlos, por su
apoyo incondicional y por guiarme en los
momentos cuando más lo necesité.***

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres Isabel y Carlos, por su incansable trabajo y su esfuerzo por verme llegar hasta donde estoy.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular. En particular a la Dra. Rosalba Lagos por toda la instrucción entregada en mi formación y por su espíritu crítico y constructivo hacia mi trabajo. También agradezco al Dr. Octavio Monasterio por sus aportes desde una panorámica distinta. A mis compañeros de laboratorio y amigos Gissela Araya y Jorge Flores, con los que siempre pude contar, y no sólo en circunstancias relacionadas al laboratorio. A Gabriela Mercado y a Verónica García por todas las enseñanzas en el plano experimental. A Macarena Collao; a Roselyn Orellana y a Pedro Núñez por su apoyo técnico.

A mis amigos Alexis Álvarez, Carlos Castro, Cristián de Gregorio, Eduardo Poblete, Roberto Rivas y Vicente Valenzuela, por todos los buenos momentos que he vivido junto a ellos y por su apoyo en otros aspectos de mi vida.

A Nicole Guerra, con la que he recorrido muchos caminos y con la que actualmente recorro un sendero muy hermoso. Gracias por iluminar aquellos días oscuros y adversos del pasado.

A mi música, el Techno, por estar siempre ahí cuando lo necesité, sin condiciones, por ayudarme a reflexionar y a salir de los malos momentos.



TABLA DE CONTENIDOS

AUTOBIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bacteriocinas.	1
1.2. Microcina E492.	2
1.2.1. Características generales.	2
1.2.2. Descripción del clúster genético de la MccE492.	3
1.2.3. Sideróforos del tipo catecol y la modificación post-traduccional de la MccE492.	5
1.2.4. Mecanismo de acción de la MccE492.....	8
1.2.5. Estructura modular de la MccE492 y conservación del dominio de captación.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Materiales.	16
2.1.1. Reactivos.....	16
2.1.2. Cepas bacterianas.....	17
2.1.3. Plasmidios y vectores.	17



2.1.4. Partidores.....	17
2.2. Métodos.....	21
2.2.1. Medios de Cultivo.....	21
2.2.2. Técnicas moleculares.....	21
2.2.3. Purificación de la MccE492.....	22
2.2.4. Cuantificación de la MccE492.....	22
2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y marcación de las muestras de la MccE492 mediante fluorescamina.....	22
2.2.6. Western blot.....	23
2.2.6.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.....	23
2.2.6.2. Electroquimioluminiscencia.....	24
2.2.7. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492.....	24
2.2.7.1. Detección de la actividad bactericida.....	24
2.2.7.2. Cuantificación de la actividad bactericida mediante el método de la dilución crítica.....	25
2.2.7.3. Cuantificación de la actividad bactericida sobre esferoplastos.....	25
2.2.7.3.1 Preparación de esferoplastos.....	25
2.2.7.3.2. Ensayo de sensibilidad de los esferoplastos ante la MccE492.....	25
2.2.8. Espectrometría de masas.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1 Obtención de las mutantes en el C-terminal de la MccE492.....	27
3.2 Caracterización de las mutantes en las serinas conservadas del C-terminal de la MccE492 S75A, S75T, S7879A, S7879T, S84A y S84G.....	27
3.2.1 Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes.....	27



3.2.2 Purificación de las microcinas mutantes y determinación del título de actividad antibacteriana.....	30
3.2.3 Análisis de las microcinas mutantes mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	36
3.3. Caracterización de las mutantes en el motivo GS del C-terminal de la MccE492.....	43
3.3.1 Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes G81S, Δ 81-84 y S79G.....	43
3.3.2 Purificación de las microcinas mutantes y determinación de la actividad bactericida.....	43
3.3.3 Análisis de las microcinas mutantes G81S, Δ 81-84 y S79G mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	48
4. DISCUSIÓN.....	52
4.1 Mutaciones en las serinas 100% conservadas del dominio de captación de la MccE492: plasticidad al cambio de la Ser84, aminoácido donde ocurre la modificación post-traducciona.....	52
4.2 Conservación del motivo GX: importancia de la glicina que antecede al aminoácido terminal.....	53
4.3 Modificación post-traducciona de las microcinas mutantes.....	54
4.4 Posibles mecanismos del proceso de modificación post-traducciona de la MccE492.....	57
5. CONCLUSIONES.....	61
6. BIBLIOGRAFÍA.....	63



LISTA DE TABLAS

Tabla 1 . Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	18
Tabla 2. Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo.	19
Tabla 3. Secuencia de los partidores empleados en este trabajo.	20
Tabla 4.- Resumen de las mutantes obtenidas en el dominio de captación de la MccE492.	28
Tabla 5. Título de la actividad bactericida de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas sobre cepas de <i>E. coli</i> mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.....	33
Tabla 6. Masas obtenidas de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados.	40
Tabla 7. Porcentaje de la forma modificada y la no modificada de las mutantes en las serinas 100% conservadas.	42
Tabla 8. Título bactericida de las microcinas mutantes en el motivo GS sobre cepas de <i>E. coli</i> mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.	46
Tabla 9. Actividad bactericida sobre esferoplastos de la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3) de las microcinas mutantes G81S y Δ 81-84.	47
Tabla 10. Masas obtenidas de las microcinas mutantes en el motivo GS analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados.	50
Tabla 11. Resumen de los resultados de actividad bactericida y de modificación post-traducciona l de las mutantes analizadas en esta Tesis.....	51



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la maduración y el procesamiento de la MccE492.	4
Figura 2. La microcina E492 y su modificación post-traduccional.	7
Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de la MccE492.	10
Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del C-terminal de las microcinas M, H47, I47 y E492.	11
Figura 5. Esquema de la posible estructura modular de la MccE492.	12
Figura 6. PCR para obtener los DNAs plasmidiales mutados y alineamiento de las secuencias de éstos.	29
Figura 7. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de las mutantes en las serinas 100% conservadas del C-terminal de la MccE492.	31
Figura 8. SDS-PAGE y Western blot de las preparaciones de las microcinas mutantes.	32
Figura 9. Título de la actividad bactericida de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas sobre cepas de <i>E. coli</i> mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.	35
Figura 10. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas.	37
Figura 11. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de las mutantes en el motivo GS del C-terminal de la MccE492.	44
Figura 12. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en el motivo GS.	49



Figura 13. Esquema de la maduración y el procesamiento de la MccE492:
importancia de la serina-75 y de la glicina que antecede al último aminoácido en
el dominio captación de la MccE492.....60



ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Cassette
AMP	adenosín monofosfato
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
pb	pares de bases
Cit	citrato
Cm	cloranfenicol
CO	grupo carboxilo (C=O)
DHBS 2,3-	2,3-Dihidroxibenzoilserina
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Glc	glucosa
HRP	peroxidasa de rábano
Kan	kanamicina
kb	kilobases
LB	caldo Luria
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo
Mcc	microcina
MccE492	microcina E492
MGE	enteroquelina mono-glucosilada
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por min
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sm	estreptomicina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tet	tetraciclina
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFC	unidad formadora de colonia
β -MeOH	beta mercaptoetanol

RESUMEN

Las bacteriocinas son antibióticos de naturaleza peptídica producidas por un amplio espectro de bacterias Gram positiva y negativa. La microcina E492 (MccE492) es una bacteriocina formadora de poros producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Se encuentra modificada post-traduccionalmente por una molécula del tipo salmoquelina unida covalentemente a la serina-84 por la acción de los productos de los genes de maduración *mceCDIJ*. Esta modificación permite que sea reconocida por la célula blanco a través de los receptores de sideróforos del tipo catecol FepA, Fiu y Cir. Las cepas mutantes en los genes de maduración producen una MccE492 no modificada e inactiva. Alineamientos entre la MccE492 y otras microcinas relacionadas muestran una gran identidad en la región C-terminal, conservándose en un 100% los aminoácidos S75, S78-79 y S84, además del motivo G83-S84. Resultados previos demuestran que la mutación S84T y la remoción del último motivo GS (Δ 83-84), reducen la eficiencia del proceso de modificación post-traducciona l y producen una disminución de la actividad antibacteriana de alrededor de 100 veces con respecto a la MccE492 silvestre. Para determinar la importancia de las demás serinas conservadas en la modificación post-traducciona l y en la actividad antibacteriana de la MccE492, se construyeron cinco mutantes en las que se reemplazó estas serinas por treoninas y alaninas, y además, la mutante S84G. Se evaluó la actividad bactericida sobre una cepa sensible y sobre las cepas mutantes en los receptores FepA, Fiu y Cir. Aunque todas las microcinas mutantes presentaron actividad antibacteriana, las mutantes S75A y S75T redujeron sustancialmente el título bactericida con respecto a la MccE492 silvestre. Todas las mutantes también presentaron la actividad en las cepas mutantes para los receptores, aunque con distintos títulos. Mediante la espectrometría de masas

se detectaron las especies de la MccE492 que corresponden a las formas modificadas post-traduccionalmente. En su conjunto, estos resultados indican que las mutaciones en la Ser75 son las que más afectan la actividad bactericida, lo que se correlaciona con una baja proporción de la forma modificada. Las demás serinas conservadas presentan una mayor plasticidad al cambio, no observándose diferencias significativas en su título bactericida o fracción de microcina modificada con respecto a la MccE492 silvestre.

Por otra parte, para determinar la importancia que tiene el motivo GS del extremo C-terminal sobre la modificación post-traducciona l y la actividad bactericida, se construyeron tres mutantes: una sobre la mutante $\Delta 83-84$, con el cambio G81S; una sin los motivos G81-S82 y G83-S84 ($\Delta 81-84$); y una sobre la mutante $\Delta 81-84$ con la mutación S79G. La mutante S79G presentó la actividad bactericida sobre un césped sensible a la MccE492 silvestre. Las mutantes $\Delta 81-84$ y G81S sólo presentaron la actividad sobre células cuya membrana externa ha sido permeabilizada, indicando que estos residuos son importantes en la translocación al periplasma de la célula blanco. Mediante espectrometría de masas se observó que sólo la mutante S79G se modifica post-traduccionalmente. Por lo tanto, se requiere la presencia de al menos un motivo GS en el C-terminal de la MccE492 para llevar a cabo el proceso de modificación post-traducciona l, necesario para la actividad bactericida. En su conjunto, nuestros resultados indican que el factor crítico en la modificación es la identidad de la glicina que antecede a la serina, por lo cual el motivo esencial es GX donde X puede ser Thr, Ser, Gly, Ala y posiblemente Cys.

ABSTRACT

Bacteriocins are antibiotic peptides produced by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Microcin E492 (MccE492) is a pore-forming bacteriocin produced by *Klebsiella pneumoniae* strain RYC492. MccE492 is post-translationally modified by a salmochelin-type molecule which is covalently linked to serine-84 by the products of *mceCDIJ* maturation genes. This modification allows the recognition at the target cell by catechol-type siderophore receptors FepA, Fiu and Cir. Mutant strains on the maturation genes produce inactive and unmodified MccE492. Alignments between MccE492 and other related microcins show a high identity at the C-termini region, with a 100% identity on residues S75, S78-S79 and S84, and on the G83-S84 motif. Previous results indicate that the S84T mutation and the deletion of the last GS motif (Δ 83-84) reduce the efficiency of the post-translational modification process and produce a decrease of 100-fold in the antibacterial activity with respect to the wild type MccE492. To determine the importance of the other conserved serine residues on the post-translational modification and on the antibacterial activity, five mutants were constructed replacing these serines by either threonines or alanines. The S84G mutation was also constructed. Antibacterial activity was determined using mutant strains on the FepA, Fiu and Cir receptors. All the mutant microcins had antibacterial activity; however the S75A and S75T mutants had a reduced antibacterial activity with regard to wild type MccE492. The mutants showed activity over the receptor mutant strains, although they had different degrees of activity. Analyses through mass spectrometry allowed the detection of modified species of the MccE492 that would correspond to post-translationally modified forms for all mutants. These results indicate that the mutations on Ser75 are the most affected in bacterial activity, which it

correlated with the lowest proportion of the modified form. The other conserved serines showed a high plasticity to the change, with no significant differences on the antibacterial activity and on the modified microcin fraction.

On the other hand, to determine the importance of the GS motif at the C-terminus of MccE492 in the post-translational modification and on the antibacterial activity, three mutants were constructed: $\Delta 83-84$ with the G81S mutation; a mutant without G81-S82 and G83-S84 motifs ($\Delta 81-84$); and the $\Delta 81-84$ mutant with the S79G mutation. The $\Delta 81-84$ and G81S mutants presented activity only over cells with a permeabilised outer membrane (spheroplasts), indicating that these residues are important for the translocation to the periplasm at the target cell. Mass spectrometry analyses showed modified species only for the S79G mutant. Therefore, that the presence of at least one GS motif at the C-terminus of MccE492 is critical to carry out the post-translational modification process, which is necessary for the antibacterial activity. Taken together, our results indicate that the critical factor for modification is the identity of the glycine preceding serine, therefore the essential motif is GX, where X can be Thr, Ser, Gly, Ala and possibly Cys.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacteriocinas.

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

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

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

estabilidad al calor, al pH extremo y a las proteasas (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984). Su agrupación génica habitualmente contiene marcos abiertos de lectura codificantes para el precursor de la microcina, los factores de inmunidad, las proteínas secretoras y en general las enzimas de modificación, dando origen a una variada diversidad de estructuras de las microcinas y de los mecanismos de acción (Duquesne y cols., 2007).

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

1.2. Microcina E492.

1.2.1. Características generales.

La microcina E492 (MccE492) es una bacteriocina formadora de poros (Lagos y cols., 1993) producida naturalmente por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 que presenta actividad bactericida sobre otras cepas Gram negativas tales como *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984).

La MccE492 es un péptido hidrófóbico, con un peso molecular de 7887 Da (forma no modificada) y un pI de 3,8 (Lagos y cols., 1999). Al igual que otras microcinas es resistente al tratamiento con tripsina, a condiciones de pH ácido y a temperaturas sobre los 90° C. Esta microcina puede encontrarse modificada post-traduccionalmente en la serina-84 del extremo carboxilo terminal mediante la unión covalente de una molécula del tipo salmoquelina (Thomas y cols., 2004).

1.2.2. Descripción del clúster genético de la MccE492.

Los determinantes genéticos necesarios para la producción de la MccE492 activa han sido clonados y expresados en *E. coli* obteniéndose una microcina con propiedades idénticas a la producida por *K. pneumoniae* RYC492 (Wilkens y cols., 1997). El gen estructural de la MccE492 (*mceA*) codifica para una pre-proteína de 98 aminoácidos que es procesada al momento de su exportación en su extremo amino terminal produciéndose una proteína madura de 84 aminoácidos (Lagos y cols., 2001; Leiva, 2008). El gen *mceB* codifica para una proteína de 95 aminoácidos que le confiere inmunidad ante su propia actividad bactericida (Lagos y cols., 1999), y se sobrepone con la región que codifica para el péptido líder de la MccE492.

La MccE492 puede encontrarse tanto en una forma activa como una inactiva. Para la producción de la MccE492 con actividad bactericida se requiere de un proceso de maduración en el cual están implicados los productos génicos MceC, MceI y MceJ (Lagos y cols., 2001) (Figura 1). Cepas con mutaciones en los genes de la maduración producen una microcina inactiva (Lagos y cols., 2001) y no modificada (datos no publicados de nuestro laboratorio). MceC es homóloga a una glicosil transferasa que participa en la síntesis del sideróforo salmoquelina, MceD homóloga a una enteroquelina esterasa (*iroD*), MceI a una acil transferasa, en tanto que MceJ no tiene

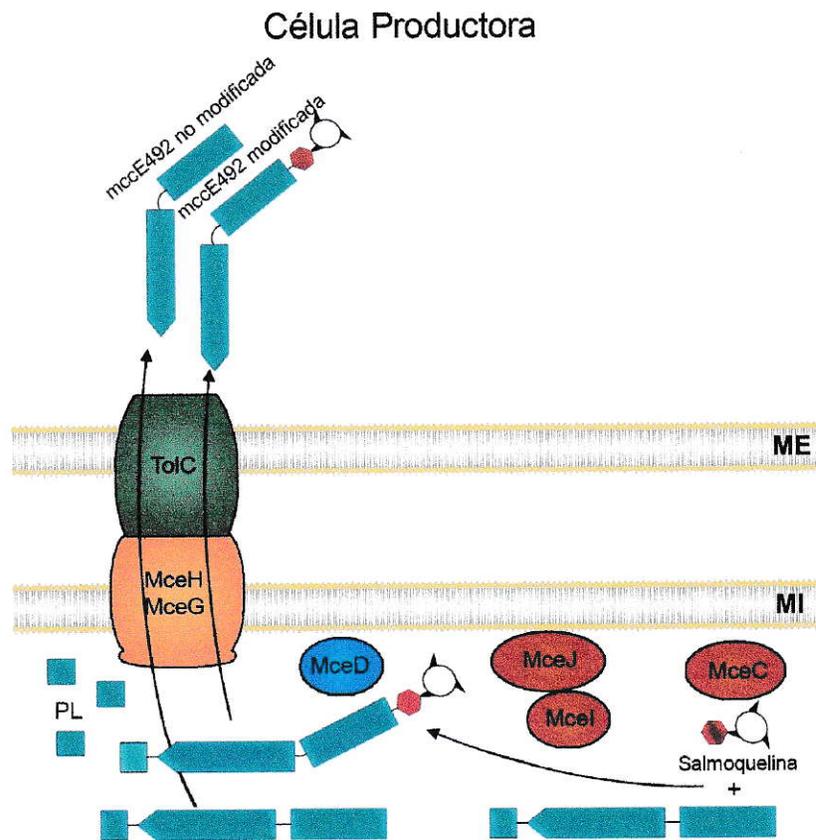


Figura 1. Esquema de la maduración y el procesamiento de la MccE492.

La MccE492 se sintetiza como una pre-proteína, que puede o no sufrir un proceso de modificación post-traduccional en el que participan los productos génicos MceC, MceI, MceJ y MceD. Ambas formas, la modificada y la no modificada, al ser exportadas al medio extracelular son procesadas por MceG, perdiendo el péptido líder (PL). ME: Membrana externa. MI: Membrana interna. Modificado de Lagos y cols., 2009.

homólogo conocido. Recientemente se ha demostrado *in vitro* que estas proteínas son las responsables del proceso de modificación post-traducciona, tanto de la MccE492 silvestre como de un decapeptido sintético con la secuencia de los 10 últimos aminoácidos del carboxilo terminal de la MccE492. En primera instancia ocurriría la glicosilación de la enteroquelina por MceC, para generar la salmoquelina; y posteriormente proseguiría la hidrólisis de la molécula de salmoquelina (por MceD) o la unión covalente de la salmoquelina a la MccE492 (vía MceIJ) (Nolan y cols., 2007).

Los productos de los genes *mceH* y *mceG* están involucrados en la exportación de la MccE492 (Figura 1). MceG tiene una alta identidad con los transportadores ABC del sistema de exportación tipo I (Lagos y cols., 2001), en tanto que MceH corresponde a la proteína accesoria del sistema de exportación.

1.2.3. Sideróforos del tipo catecol y la modificación post-traducciona de la MccE492.

El miembro más prominente dentro de los sideróforos del tipo catecol es la enteroquelina, que fue aislada desde *E. coli* y *S. enterica* (Pollack y Neilands, 1970; O'Brien y Gibson, 1970). Este sideróforo une hierro con una constante de disociación de 10^{-52} M (Crossa y Walsh, 2002). La enteroquelina consiste en un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS), cuya biosíntesis requiere en primera instancia de la vía del chiquimato (síntesis de los aminoácidos aromáticos) para generar el corismato (Bentley, 1990). Posteriormente, a partir del corismato, una serie de reacciones gobernadas por la maquinaria de proteínas codificada en el operón *entABCDEF* producen la enteroquelina (Crossa, 1989; Gehring y cols., 1997; Gehring y cols., 1998). La apo-enteroquelina (forma no unida al hierro) es secretada fuera de la célula para capturar el hierro, siendo ingresada en su forma holo (unida al hierro) principalmente

por el receptor de sideróforos tipo catecol FepA (Pugsley y Reeves, 1977); mientras que sus productos lineales de hidrólisis (DHBS₂ y DHBS) ingresan a la célula a través de FepA, Fiu y Cir (Hantke, 1990). Una vez dentro de la célula la enteroquelina y sus productos son hidrolizados para liberar el hierro unido (O'Brien y cols., 1971).

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

La serina-84 del carboxilo terminal de la MccE492 se encuentra modificada post-traduccionalmente con una molécula de salmoquelina (Figura 2, Thomas y cols., 2004). En dicho trabajo se determinó mediante espectrometría de masas que existen a lo menos 3 especies de mayor tamaño que la MccE492 sin modificar (7887 Da), las que corresponden a microcina modificada con el trímero de DHBS glucosilado (8718 Da);

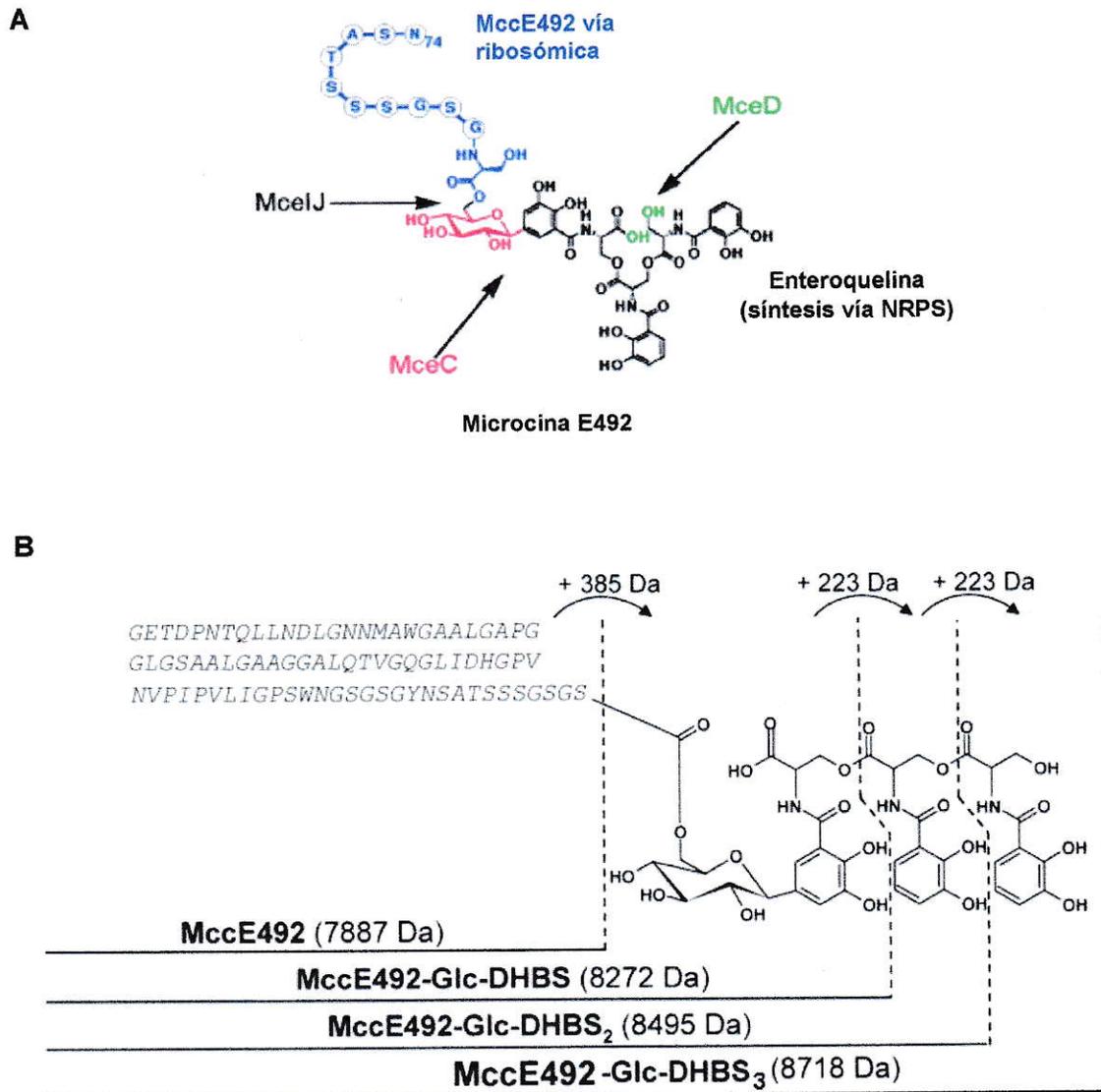


Figura 2. La microcina E492 y su modificación post-traduccional.

A) La MccE492 modificada post-traduccionalmente con una molécula de salmoquelina. Se muestran las enzimas del sistema de la MccE492 que participan en el proceso de modificación post-traduccional. En primer lugar, MceC glicosila una molécula de enteroquelina para generar la salmoquelina monoglicosilada. Posteriormente podría actuar MceD (linealización de la molécula de salmoquelina) o MceJ (unión covalente de la molécula de salmoquelina a la serina-84 de la MccE492). NRPS: Sintetasa de péptidos no ribosómica. Figura adaptada de Nolan y cols. (2007). **B)** La modificación consiste en un trímero de DHBS unido vía un enlace C-glicosídico a una β -D-glucosa la que se une al residuo 84 del péptido no modificado. MccE492 (7887 Da) es el péptido no modificado. Además se muestran los derivados modificados con Glc-DHBS (8272 Da), Glc-DHBS₂ (8495 Da) y Glc-DHBS₃ (8718 Da). Las diferencias de masa entre las diferentes especies se muestran en la parte superior. Figura adaptada de Vassiliadis y cols. (2007).

el dímero de DHBS glucosilado (8495 Da); y con el monómero de DHBS glucosilado (8272 Da). Se postula que dicha modificación post-traducciona favorecería la interacción de la MccE492 con los receptores de sideróforos del tipo catecol FepA, Fiu y Cir de la célula objetivo (Patzner y cols., 2003).

1.2.4. Mecanismo de acción de la MccE492.

El mecanismo de acción de la MccE492 contempla en primera instancia el reconocimiento en la membrana externa de la célula objetivo por los receptores de sideróforos del tipo catecol FepA, Fiu y Cir (Strahsburger y cols., 2005). Tal reconocimiento estaría mediado por la molécula de salmoquelina unida al extremo carboxilo terminal de la MccE492, por lo que se ha planteado que la MccE492 modificada post-traduccionalmente favorece su interacción con los receptores para la posterior internalización a la célula objetivo (Thomas y cols., 2004). Esta estrategia de importación mediada por una molécula beneficiosa, que emula a una que es reconocida por los receptores, se denomina estrategia tipo “caballo de Troya” (Fischbach y cols., 2006). La translocación al periplasma de la célula sensible usa el sistema transductor de energía TonB/ExbBD (Pugsley y cols., 1986), dentro de los cuales TonB interactuaría con la MccE492 (Baeza, 2003; Flores, 2009). La actividad bactericida sería llevada a cabo mediante la despolarización de la membrana interna (de Lorenzo y Pugsley, 1985), producto de la formación de poros, hecho que se infiere por su capacidad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

El complejo proteico de membrana interna ManYZ involucrado en la captación de la manosa, es otro componente esencial para la actividad bactericida de la MccE492 (Bieler y cols., 2006). Sin embargo, no ha sido posible determinar si interactúa y a qué nivel con el sistema TonB/ExbBD y con la MccE492.

En la Figura 3 se muestra un esquema con todos los elementos que se conocen hasta la fecha que están implicados en el mecanismo de acción de la MccE492.

1.2.5. Estructura modular de la MccE492 y conservación del dominio de captación.

La microcina H47 y la colicina V poseen estructuras modulares, con un dominio de captación en el carboxilo terminal y un dominio tóxico localizado en la región N-terminal (Azpiroz y Laviña, 2007). Al fusionar cruzadamente los dominios de las dos microcinas, se demostró que resultan ser intercambiables generando la actividad de una microcina y el reconocimiento de la otra, y viceversa. El módulo de captación de la microcina H47, estaría ubicado en el carboxilo terminal, específicamente en los últimos 10 aminoácidos. Alineamientos de esta región muestran una gran identidad entre las microcinas H47, I47, M y E492 (Figura 4), lo que sugiere que este “dominio” sería reconocido por los receptores de sideróforos de la misma forma para las microcinas H47, I47, M y E492 (Azpiroz y Laviña, 2007), y que es muy probable que esto ocurra gracias a que sus dominios se encuentran modificados post-traduccionamente mediante la unión covalente de una molécula de salmoquelina (Figura 5; Nolan y cols., 2007).

Estudios previos demuestran que las mutantes S84T y Δ 83-84 en el C-terminal de la MccE492 presentan actividad bactericida y son modificadas post-traduccionamente (Leiva, 2008). Esto indica que la serina-84, donde ocurre la modificación post-traducciona, es posible de cambiar por un aminoácido de características similares como la treonina, y que esto no impide su modificación. Por otro lado, el último motivo GS es dispensable para el proceso de modificación post-traducciona y la actividad bactericida, pues este motivo está duplicado (ver Figura 4).

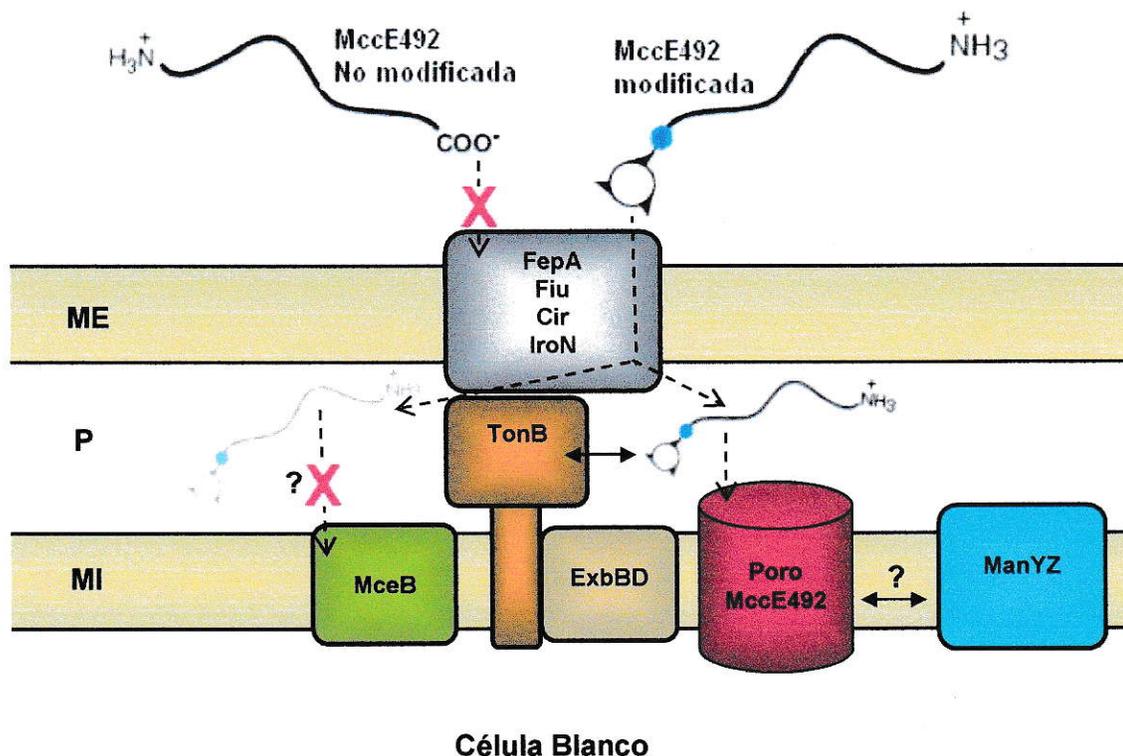


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de la MccE492.

La microcina modificada post-traduccionalmente entraría a la célula mediante la interacción con los receptores de los sideróforos del tipo catecol (FepA, Fiu, Cir e Iron), en tanto que la forma no modificada no podría llevar a cabo tal reconocimiento. La microcina es traslocada hacia el periplasma gracias al complejo TonB/ExbBD, donde TonB probablemente interacciona con los receptores y con la microcina. Posteriormente se produce la despolarización de la membrana interna, producto de la formación de poros. Para llevar a cabo esta acción bactericida se requiere de la presencia del complejo ManYZ, pero se desconoce la manera en que participaría en este proceso. La actividad bactericida de la MccE492 sobre la cepa productora es anulada por la proteína de inmunidad (MceB) mediante un mecanismo aún no dilucidado. ME: Membrana externa, P: Periplasma, MI: Membrana interna.

	75	79	84
MccE492	S	A	T
MccH47	S	A	S
MccI47	S	S	T
MccM	S	A	S

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del C-terminal de las microcinas M, H47, I47 y E492.

En letras rojas y resaltado en amarillo se indican los aminoácidos 100% conservados en las posiciones 75, 78, 79, 83 y 84 de la MccE492.

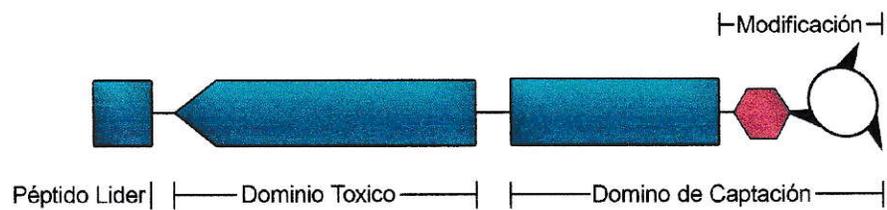


Figura 5. Esquema de la posible estructura modular de la MccE492.

De izquierda a derecha, el péptido líder, el dominio tóxico responsable de actividad bactericida mediante la inserción en la membrana interna de la célula sensible, el dominio de captación que sufre el proceso de modificación post-traducciona y responsable del reconocimiento por los receptores de membrana externa de la célula sensible. Figura adaptada de Lagos y cols. (2009).

Dado que hay una alta conservación en las serinas y el último motivo GS del C-terminal de la MccE492, y sustentado en los resultados con las mutantes S84T y Δ 83-84, en este trabajo se construyeron las mutantes para estudiar la importancia de las serinas 100% conservadas sustituyéndolas por un aminoácido similar, como lo es la treonina, o por un aminoácido más bien neutro, como lo es la alanina. Además, basado en que la remoción del último motivo GS es dispensable se buscó ahondar en el estudio de este motivo, para lo que se construyeron otras tres mutantes: una sobre la mutante Δ 83-84, con el cambio G81S; una sin los motivos G81-S82 y G83-S84 (Δ 81-84); y una sobre la mutante Δ 81-84, en que se realizó el cambio S79G.

Hipótesis:

“Las serinas en las posiciones 75, 78 y 79 del C-terminal de la MccE492, son importantes para la función del dominio de captación a través del proceso de modificación post-traducciona. Sin embargo, podrían ser cambiadas por un aminoácido de naturaleza similar como la treonina, manteniéndose la funcionalidad del dominio de captación y con esto la actividad antibacteriana. Además, sería indispensable la presencia de un motivo GX en el C-terminal, donde X puede ser treonina o serina, y posiblemente alanina o glicina”.

Objetivo General:

1. Determinar si los cambios propuestos en las serinas conservadas y el motivo GS de los últimos 10 aminoácidos del carboxilo terminal de la MccE492, afectan el proceso de modificación post-traducciona y por ende su función como dominio de captación.

Objetivos Específicos:

1. Obtención de una mutante en que se reemplazará la Ser75 por una alanina (S75A) y por una treonina (S75T).
2. Obtención de una mutante en que se sustituirán el par de serinas contiguas en las posiciones 78-79 por un par de alaninas (S7879A) y otra mutante por un par de treoninas (S7879T).
3. Obtención de una mutante sobre la mutante $\Delta 83-84$, con el cambio G81S; obtención de una mutante por delección sobre la mutante $\Delta 83-84$, en que se removerán la Gly81 y la Ser82 ($\Delta 81-84$); construcción de una mutante por reemplazo sobre la mutante $\Delta 81-84$, en que se generará el cambio S79G.

4. Obtención de una mutante en que se reemplazará la Ser84 por glicina (S84G).
5. Caracterización de las mutantes de la MccE492 por espectrometría de masas y determinación de la actividad bactericida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los cartuchos Sep-Pack C-18 se adquirieron en Waters, USA.

La tetraciclina en el Laboratorio Benguerel Ltda., Chile.

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

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

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

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

El reactivo de Bradford, se compró a Gene-X-press.

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

2.1.2. Cepas bacterianas.

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

2.1.3. Plasmidios y vectores.

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

2.1.4. Partidores.

En la Tabla 3 se muestran los partidores y sus secuencias utilizados en esta Tesis.

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

Cepa	Genotipo	Fuente
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> r _B m _B	Novagen
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
H1443	<i>araD</i> (<i>lac</i>) <i>aroB</i> <i>rpsL</i> <i>relA</i> <i>flbB</i> <i>deoC</i> <i>pstF</i> <i>rbsR</i>	Hantke, 1990
H1728	Como H1443, pero <i>fiu::MudXcir</i>	Hantke, 1990
H1875	Como H1443, pero <i>cir::MudXfepA::Tn10</i>	Hantke, 1990
H1876	Como H1728, pero <i>fepA::Tn10</i>	Hantke, 1990
H1877	Como H1443, pero <i>fiu::MudXfepA::Tn10</i>	Hantke, 1990

Tabla 2. Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo.

Plasmidio	Características relevantes	Fuente o referencia
pACYC184	Plasmidio de propósito general Cm ^r Tet ^r	Chang y Cohen, 1978
pJAM434	Derivado de pJ que fue construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de la MccE492 activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
pJAM229	Derivado de pJ que fue Construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , contiene los genes para la producción de la MccE492 activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
np220	pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
pAB	Derivado de pACYC184. Contiene los genes <i>mceBA</i> bajo el mando del promotor natural de la MccE492, clonado en el sitio <i>BamHI</i> . Cm ^r	Colección Laboratorio

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

Partidor	Secuencia (5'→3')*
S75Af	CGGTAGTGGTTATAAC GC CGCAACATCCAGTTCC
S75Ar	GGAACTGGATGTTGCG GC GTTATAACCACTACCG
S75Tf	CGGTAGTGGTTATAAAC CC CGCAACATCCAGTTCCG
S75Tr	CGGAACTGGATGTTGCG G TGTTATAACCACTACCG
S7879Af	GTTATAACAGCGCAACAG CCGC TTCCGGTAGTGGTAG
S7879Ar	CTACCACTACCGGAAG CCGG CTGTTGCGCTGTTATAAC
S7879Tf	GTTATAACAGCGCAACA ACC CTTCCGGTAGTGGTAG
S7879Tr	CTACCACTACCGGAAG GTGG TTGTTGCGCTGTTATAAC
S84Af	CCAGTTCCGGTAGTGGT GCT TAAAGGATCCTCTACG
S84Ar	CGTAGAGGATCCTTTA AGC ACCACTACCGGAACTGG
S84Gf	CCAGTTCCGGTAGTGGT GGT TAAAGGATCCTCTACG
S84Gr	CGTAGAGGATCCTTTA ACC ACCACTACCGGAACTGG
G81Sf	GCGCAACATCCAGTTCC AG TAGTTGATGATAAAGC
G81Sr	GCTTTATCATCAACTAC T GGAAGTGGATGTTGCGC
Δ81-84f	CGCAACATCCAGTTCC TGATGA TGATGATAAAGCATCC
Δ81-84r	GGATGCTTTATCATCA TCATCA GGAAGTGGATGTTGCG
S79Gf	CAGCGCAACATCC G GTTCTGATGATG
S79Gr	CATCATCAGGAAC C GGATGTTGCGCTG

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

2.2. Métodos.

2.2.1. Medios de Cultivo.

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

Medio mínimo M9. Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1 g/L.

M9 suplementado (M9-S). El medio M9 se suplementó con CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 mg/mL, casaminoácidos 1 mg/mL, como fuente de carbono glucosa 0,2% p/v.

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

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

Placas de césped. Sobre placas de agar M9-S se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 150 µL de un cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial (DO₆₀₀ ~0,6-0,7). Las cepas bacterianas que portan los plasmidios recombinantes y/o los transposones con resistencia a los antibióticos, se crecieron en medio líquido o en placas suplementadas con los antibióticos correspondientes, a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, estreptomina 10 µg/mL y el ácido nalidixico a 10 µg /mL. Éstos fueron preparados según lo descrito por Sambrook y cols. (1989).

2.2.2. Técnicas moleculares.

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

La mutagénesis sitio dirigida se realizó mediante la estrategia propuesta en el kit QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis, de Stratagene®, con los partidores diseñados de modo de cambiar los aminoácidos deseados (Tabla 3).

2.2.3. Purificación de la MccE492.

Se crecieron los cultivos a 37° C, 220 rpm por 22 h hasta una DO₆₀₀ de 1,5 en medio mínimo M9-S. 1L de sobrenadante de cultivo se filtró a través de una columna de fase reversa Sep-Pack C-18 (Waters). La columna se lavó con 3 mL de metanol 60% y 3 mL de acetonitrilo 25%. La microcina se eluyó con 3 mL de acetonitrilo 50%.

2.2.4. Cuantificación de la MccE492.

La preparación de microcina en acetonitrilo 50% se cuantificó mediante el método de Bradford. Para esto, se construyó una curva de calibración con la proteína BSA (seroalbúmina de bovino) en el rango de concentración 0-12 µg/mL. Las muestras de microcina se concentraron de manera de evaporar el acetonitrilo. Posteriormente se hizo una dilución de la muestra concentrada de 10 veces en agua. Finalmente se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford a 800 µL de muestra para hacer un volumen final de 1 mL. Se midió la absorbancia de la mezcla a 596 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A. De la ecuación de la curva de calibración se interpoló el valor de la concentración de las muestras de microcina.

2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y marcación de las muestras de la MccE492 mediante fluorescamina.

Los geles se prepararon con tres fases: separadora, espaciadora y concentradora. El gel separador consistió en 16,5% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1% y glicerol al 10%. El gel espaciador

consistió en 10% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5, SDS 0,1%. El gel concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. La solución de corrida para el cátodo fue Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9. Se concentró 300 μ L de la preparación de la MccE492 con el un equipo de Centrivap (Labconco) a 60° C hasta un volumen de aproximadamente 15 μ L, y luego se adicionó 4 μ L de solución borato (0,4 M; pH 9,0), 8 μ L de fluorescamina (3 mg/mL en DMSO) y 7 μ L de amortiguador de carga 4X (glicerol a 40%; Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10%; β -MeOH 20%; azul de bromofenol 0,04% p/v). La mezcla se incubó a 95° C durante 10 min. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (Lagos y cols., 2001).

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

2.2.6. Western blot.

2.2.6.1. Electrotransferencia y exposición a anticuerpos.

Las proteínas del gel de la SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 90 min a 100 V, 500 mA y -20° C empleando amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%) previamente enfriado. La membrana fue bloqueada con leche descremada *Svelty* al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tween 0,1%) durante toda la noche a 4° C. Luego se incubó con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el fragmento C-terminal de

la MccE492 [SGSGYNSATSSSGSGS] (Mercado y cols., 2008) (dilución 1:1.000) durante 1 h, seguido de 3 lavados con amortiguador TBS-Tween. A continuación se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario anticonejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000). La membrana se reveló mediante electroquimioluminiscencia.

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

2.2.6.2. Electroquimioluminiscencia.

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

2.2.7. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la MccE492.

2.2.7.1. Detección de la actividad bactericida.

La detección de la actividad bactericida se realizó sembrando las colonias provenientes de los clones que se deseaban analizar sobre una placa agar-M9-S con un césped sensible de *E. coli* BL21 (DE3) crecido en medio M9-S hasta fase exponencial. Luego de incubar las placas a 37° C durante 14-16 h, la actividad bactericida se visualizó por la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible.

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

Para la cuantificación de la actividad bactericida de la microcina se realizaron diluciones seriadas de las muestras en base 2 en agua nanopura estéril. Se tomaron alícuotas de 3 μ L de cada una de las diluciones y se depositaron sobre placas agar-M9-S con un césped de la cepa de interés, que se formó con 4 mL de agar blando fundido y 150 μ L de un cultivo en medio LB crecido hasta fase exponencial con los antibióticos correspondientes según la cepa. Las placas se incubaron a 37° C durante 14-16 h, y el título de la muestra se expresó como el recíproco de la potencia en base 2 de la última dilución que presentó un halo de inhibición del crecimiento sobre el césped indicador.

2.2.7.3. Cuantificación de la actividad bactericida sobre esferoplastos.

2.2.7.3.1 Preparación de esferoplastos.

Los esferoplastos se prepararon básicamente de acuerdo a lo descrito por Weiss (1976). La cepa *E. coli* BL21 (DE3) creció en 100 mL de medio LB hasta una DO_{600} 0,6. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y se resuspendieron en 10 mL de Tris-HCl 100 mM, 20% p/v de sacarosa, pH 8,0. Mientras se aplicaba agitación constante, se adicionó 1 mL de lisozima (6 mg/ml) y se incubó la mezcla por 15 min a 37° C. Luego, se adicionó lentamente 2 mL de una solución de EDTA 0,1 M pH 8,0 y se incubó por otros 15 min.

2.2.7.3.2. Ensayo de sensibilidad de los esferoplastos ante la MccE492.

Se mezclaron alícuotas de 100 μ L de esferoplastos con 100 μ L de las muestras de microcina a una concentración de 50 μ g/mL (diluida en Tris-HCl 100 mM, 20% p/v

de sacarosa, pH 8,0) y se incubaron por 15 min a 37° C. Se realizaron diluciones seriadas en buffer Tris-HCl 100 mM, 20% p/v de sacarosa, pH 8,0 y 10 μ L (por triplicado) de cada dilución y se sembraron sobre placas agar-LB. Luego de 18 h de incubación a 37° C, el título celular se determinó mediante el conteo de las UFC. El porcentaje de viabilidad de los esferoplastos se estimó al comparar las UFC de los tratamientos con microcina versus las UFC de los esferoplastos tratados con buffer Tris-HCl 100 mM, 20% p/v de sacarosa, pH 8,0 (normalizado como el 100% de viabilidad).

2.2.8. Espectrometría de masas.

Las muestras de microcina purificada se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile).

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

Se prepararon diluciones 1:2 de las muestras con la matriz y se depositaron 2 μ L de cada una de las diluciones en una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 5.000-17.000 Da. Para la obtención de los espectros se trabajó en modo ion positivo y detección lineal. Los espectros finales corresponden a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de 40 disparos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar de las muestras previamente preparadas en placa.

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de las mutantes en el C-terminal de la MccE492.

Para generar las mutantes en el C-terminal de la MccE492, se utilizó la estrategia planteada en el kit QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis, de Stratagene®. Se amplificó el vector pAB mediante PCR con los partidores detallados en la Tabla 3 para obtener productos de PCR de aproximadamente 5 kb (Figura 6A).

Para confirmar los cambios deseados se enviaron a secuenciar los putativos clones mutantes. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura 6B.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de las microcinas mutantes realizadas en esta Tesis.

3.2 Caracterización de las mutantes en las serinas conservadas del C-terminal de la MccE492 S75A, S75T, S7879A, S7879T, S84A y S84G.

3.2.1 Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes.

Para determinar si las mutantes S75A, S75T, S7879A, S7879T, S84A y S84G presentan actividad bactericida, se utilizó como huésped la cepa *E. coli* BL21 (DE3) np220, a la cual se le introdujo mediante transformación los DNAs de las mutantes. La cepa np220 posee todos los determinantes genéticos para la producción de la MccE492 salvo el gen estructural, pues tiene una inserción del transposón Tn5 en el gen *mceA* (Tn5::*mceA*), lo cual la hace una cepa no productora de la MccE492 (Mercado y cols., 2008). Esta cepa puede ser complementada con la construcción pAB, que posee una copia del gen que codifica para la MccE492, y se puede utilizar para probar la actividad de las mutantes en la MccE492.

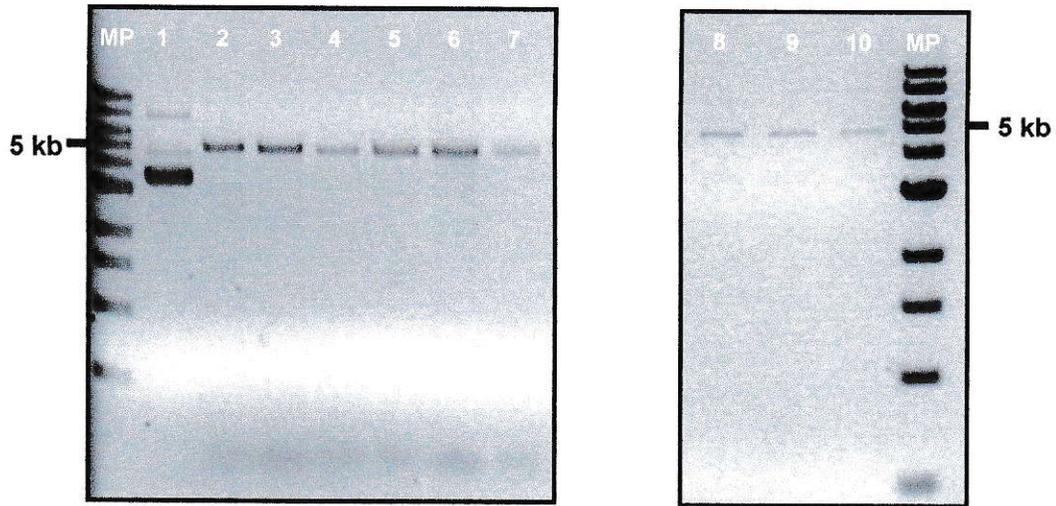
Tabla 4.- Resumen de las mutantes obtenidas en el dominio de captación de la MccE492.

Microcina	Dominio de captación*									
	75			78	79				83	84
Silvestre	S	A	T	S	S	S	G	S	G	S
S75A	A	A	T	S	S	S	G	S	G	S
S75T	T	A	T	S	S	S	G	S	G	S
S7879A	S	A	T	A	A	S	G	S	G	S
S7879T	S	A	T	T	T	S	G	S	G	S
S84A	S	A	T	S	S	S	G	S	G	A
S84T	S	A	T	S	S	S	G	S	G	T
S84G	S	A	T	S	S	S	G	S	G	G

	75			78	79				83	84
Silvestre	S	A	T	S	S	S	G	S	G	S
Δ83-84	S	A	T	S	S	S	G	S	—Δ—	
G81S	S	A	T	S	S	S	S	S	—Δ—	
Δ81-84	S	A	T	S	S	S	—————	Δ	—————	
S79G	S	A	T	S	G	S	—————	Δ	—————	

*En la tabla se muestra el dominio de captación de las mutantes obtenidas en esta Tesis, además de las mutantes S84T y Δ83-84 (Leiva, 2008). En rojo los aminoácidos 100% conservados entre las microcinas H47, I47, M y E492, y en azul los aminoácidos reemplazados en cada mutante. Δ: Delección.

A



B

```

pAB TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
mceA TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGT---
S75T TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
S75A TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
S7879T TTATAAACAGCGCAACAAACCACTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
S7879A TTATAAACAGCGCAACAGCCGCTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
S84A TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
S84G TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCGGTAGTGGTAGTTAA
G81S TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCAGTAGTTGATGATAA
Δ81-84 TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCAGTAGTTGATGATAA
S79G TTATAAACAGCGCAACATCCAGTTCCAGTAGTTGATGATAA
  
```

Figura 6. PCR para obtener los DNAs plasmidiales mutados y alineamiento de las secuencias de éstos.

A) Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v. MP: Marcador de peso molecular 1 kb; Carriles: 1: DNA parental pAB sin amplificar; 2: PCR S75A; 3: PCR S75T; 4: PCR S7879A; 5: PCR S7879T; 6: PCR S84A; 7: PCR S84G; 8: PCR G81S; 9: PCR Δ81-84; 10: PCR S79G. **B)** Se hizo un alineamiento (5'→3') entre la secuencia del gen estructural de la MccE492 silvestre (*mceA*) y las mutantes enviadas a secuenciar, usando la herramienta AlignX del software Vector NTI Advance (Invitrogen®). Además se incorporó la secuencia de la construcción parental pAB. En recuadros naranjos se muestran los cambios generados para cada mutante. Las bases resaltadas en amarillo son 100% idénticas en el alineamiento y las resaltadas en verde son las regiones en las que se introdujeron los cambios. El resto de la secuencia de las mutantes es 100% idéntica a la construcción parental pAB (no mostrado).

La actividad bactericida de las microcinas mutantes se midió mediante la formación de los halos de inhibición del crecimiento sobre un césped de *E. coli* BL21 (DE3), sensible a la MccE492 silvestre (Figura 7). La cepa huésped *E. coli* BL21 (DE3) np220 transformada con el vector pACYC184, no presentó actividad bactericida. La cepa complementada con la construcción parental pAB presentó actividad bactericida, al igual que todas las mutantes ensayadas.

3.2.2 Purificación de las microcinas mutantes y determinación del título de actividad antibacteriana.

Se purificó microcina a partir de los sobrenadantes de los cultivos de la cepa BL21 np220 complementada con las mutantes y con la construcción parental pAB, utilizando el procedimiento descrito en Métodos. Las muestras purificadas se sometieron a electroforesis e inmunoblot (Figura 8). Las microcinas mutantes fueron reconocidas por el anticuerpo empleado al igual que la MccE492 silvestre. En tanto que una preparación a partir del sobrenadante de la cepa BL21 np220 no mostró marcación con el anticuerpo (control negativo). Este ensayo es cualitativo por tanto no se puede inferir si el anticuerpo presenta una especificidad diferencial por las distintas microcinas mutantes.

Para determinar la actividad bactericida de las purificaciones de las microcinas mutantes se empleó la cepa sensible *E. coli* BL21 (DE3). Todas las preparaciones de las mutantes presentaron actividad bactericida sobre esta cepa pero con distintos títulos (Tabla 5). Las mutantes S75A y S75T presentaron la menor actividad bactericida (2 y 4, respectivamente). Las mutantes en las S78-S79 presentaron un título de 8; en tanto que la mutante S84A presentó un título igual al de la MccE492 silvestre purificada

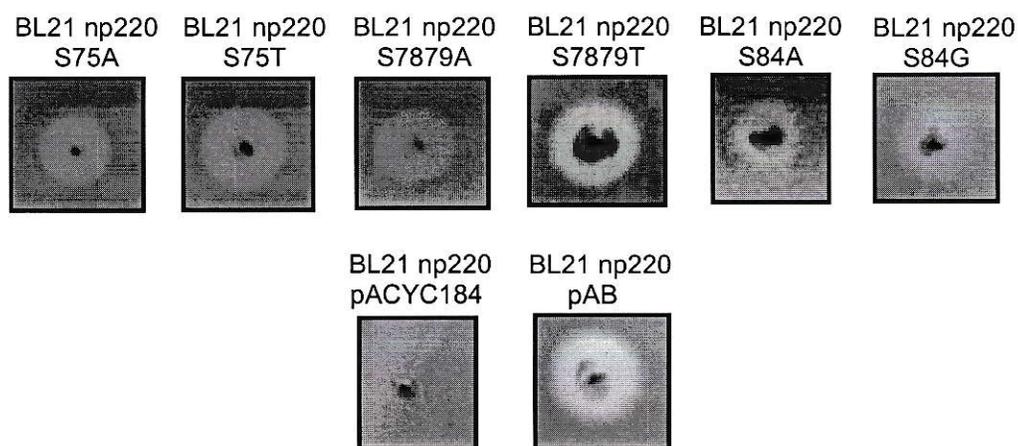
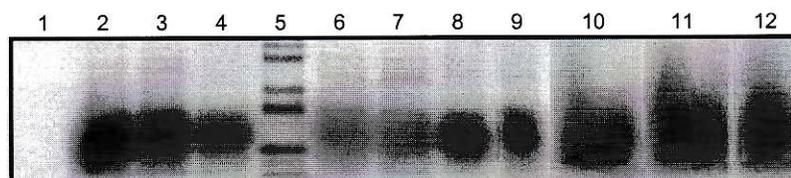


Figura 7. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de las mutantes en las serinas 100% conservadas del C-terminal de la MccE492.

En la figura se ilustran las colonias productoras con las microcinas mutantes, sembradas sobre un césped de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) sensible a la MccE492 silvestre.

A



B



Figura 8. SDS-PAGE y Western blot de las preparaciones de las microcinas mutantes.

A) La purificación, marcaje con fluorescamina y electroforesis de la MccE492 purificada a partir de las diferentes cepas se realizó como se indica en los Métodos. Carriles: 1: np220; 2: S75A; 3: S75T; 4: S7879A; 5: Marcador de peso molecular (16.950, 14.440, 10.600, 8.160, 6.210, 3.480 y 2.510 Da); 6: S7879A; 7: S84A; 8: S84G; 9: S79G; 10: Δ 81-84; 11: G81S; 12: MccE492 silvestre. **B)** Las proteínas separadas en otro experimento de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron mediante electroquimioluminiscencia. WT: MccE492 silvestre purificada a partir de la cepa *E. coli* BL21 np220 pAB

Tabla 5. Título de la actividad bactericida de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas sobre cepas de *E. coli* mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.

Mcc [†]	Césped*					
	BL21	H1443 (FepA ⁺ Fiu ⁺ Cir ⁺)	H1728 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁻)	H1875 (FepA ⁺ Fiu ⁺ Cir ⁻)	H1877 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁺)	H1876 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁻)
S75A	2	8	0	8	2	0
S75T	4	8	0	8	2	0
S7879A	8	16	0	16	4	0
S7879T	8	32	1	16	8	0
S84A	16	16	2	32	8	0
S84G	8	8	1	8	2	0
Silvestre	16	16	1	16	8	0

[†]Las preparaciones de microcina se concentraron mediante Speedvac para evaporar el acetonitrilo y se ajustaron a una concentración de 100 µg/mL, sobre la cual se realizaron diluciones seriadas en base dos. La actividad está expresada como el recíproco de la potencia en base 2 de la última dilución que presentó un halo de inhibición del crecimiento sobre el césped indicador.

*Las células se crecieron en medio LB hasta la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,6-0,7). Posteriormente se formó el césped al incluir 150 µL de cultivo en agar blando fundido. La mezcla se esparció sobre placas con Agar M9-S.

a partir de la cepa BL21 np220 pAB (16). Finalmente para la mutante S84G se observó un título de 8.

FepA, Fiu y Cir son tres receptores de los sideróforos tipo catecol que están en la membrana externa, y que son usados por la MccE492 para ingresar a la célula blanco. Cuando se ensaya la MccE492 sobre las cepas dobles mutantes en los receptores crecidas en medio LB, se observa que la MccE492 usa preferente el receptor Fiu, seguido de Cir y finalmente FepA (Strahsburger, 2004). Para determinar si las distintas mutantes de la MccE492 cambian o mantienen la preferencia en el uso de los receptores, se ensayó las muestras purificadas sobre cepas que sólo expresan uno de los tres receptores: FepA, Fiu o Cir (Tabla 5 y Figura 9). En la cepa parental H1443 (FepA⁺Fiu⁺Cir⁺) las mutantes S7879A y S84A presentaron un título de 16, al igual que la MccE492 silvestre. Las mutantes S75T, S75A y S84G presentaron menor actividad bactericida que la MccE492 silvestre (8). Sin embargo, la microcina S7879T presentó mayor actividad bactericida con respecto a la MccE492 silvestre (32 versus 16). Finalmente, la preferencia en el uso de los receptores de las microcinas mutantes es similar a la observada para la microcina silvestre purificada a partir de la cepa BL21 np220 pAB: la cepa que expresa sólo Fiu resultó ser la más sensible, y a un nivel similar al de la cepa silvestre H1443; en tanto que las cepas que expresan sólo Cir o FepA, presentaron una sensibilidad menor. Por lo tanto, la preferencia de uso resultó ser Fiu > Cir > FepA (Tabla 5 y Figura 9).

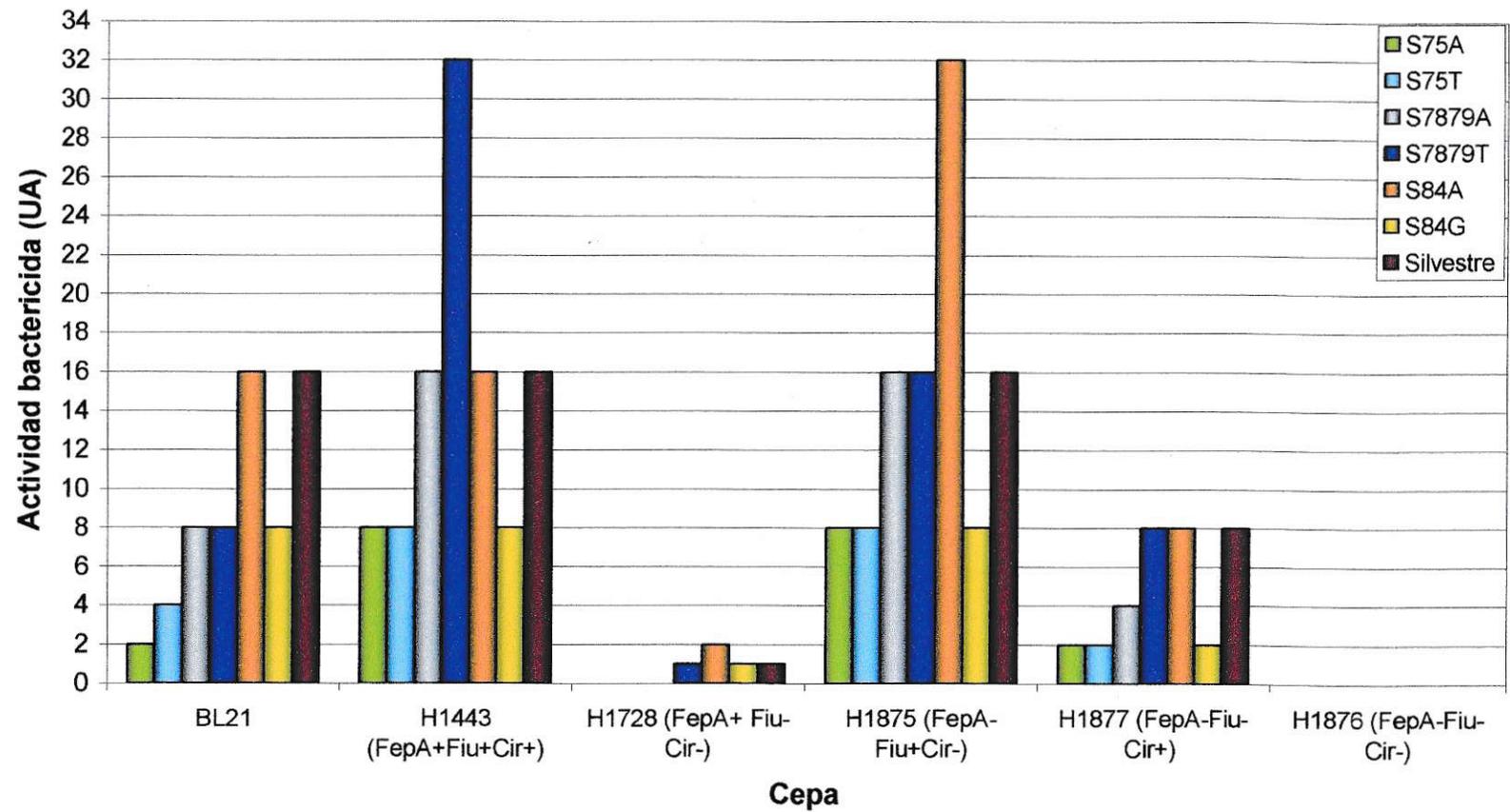


Figura 9. Título de la actividad bactericida de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas sobre cepas de *E. coli* mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.

Representación de los resultados de la Tabla 5 en un gráfico de columna agrupada.

3.2.3 Análisis de las microcinas mutantes mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

La espectrometría de masas es una técnica muy resolutive y sensible, y es de mucha utilidad, ya que permite determinar el peso molecular de las microcinas mutantes purificadas y el de sus formas modificadas post-traduccionalmente si es que las hubiese.

Los espectros obtenidos del MALDI-TOF (Figura 10) muestran que en todas las mutantes hay una señal preponderante correspondiente a la forma no modificada muy ajustada al peso esperado (Tabla 6). Además se observa que todas las mutantes están modificadas post-traduccionalmente, pues se aprecian picos de mayor peso respecto de la forma no modificada. Estas formas corresponderían a especies modificadas con Glc-DHBS y Glc-DHBS₂, ya que al hacer la diferencia con respecto al pico de la forma no modificada, se ajustan bastante bien a las diferencias esperadas con estas modificaciones (Tabla 6). En los espectros de las mutantes S75A y S84G sólo se aprecia el primer pico de modificación, correspondiente a la especie MccE492+Glc-DHBS (m/z 8256 y 8238 respectivamente). Las preparaciones de las otras mutantes en tanto, muestran dos de los tres picos asociados a las especies modificadas con Glc-DHBS y Glc-DHBS₂, con una buena correlación con el peso esperado. Para el caso del espectro de la microcina silvestre (Figura 10), al igual que en las mutantes la forma no modificada es el pico preponderante. Los dos picos de mayor peso corresponderían a las especies MccE492+Glc-DHBS y MccE492+Glc-DHBS₂. Como se esperaba, el control con la preparación del sobrenadante de la cepa np220, no presentó picos en el rango analizado (Figura 10). Por otro lado, no se encontró una explicación plausible para las señales contiguas al pico de la forma no modificada (hombros) presentes en

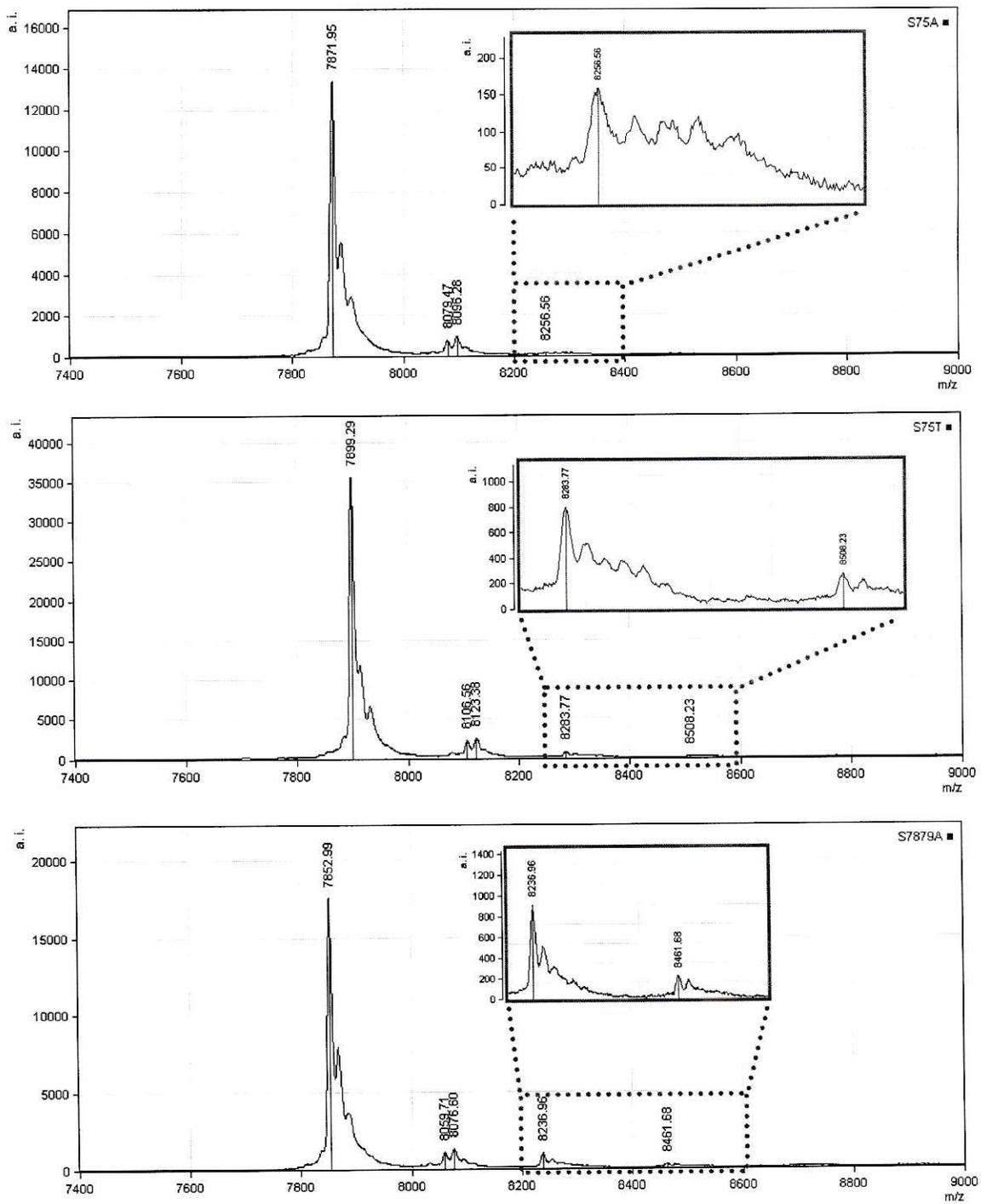
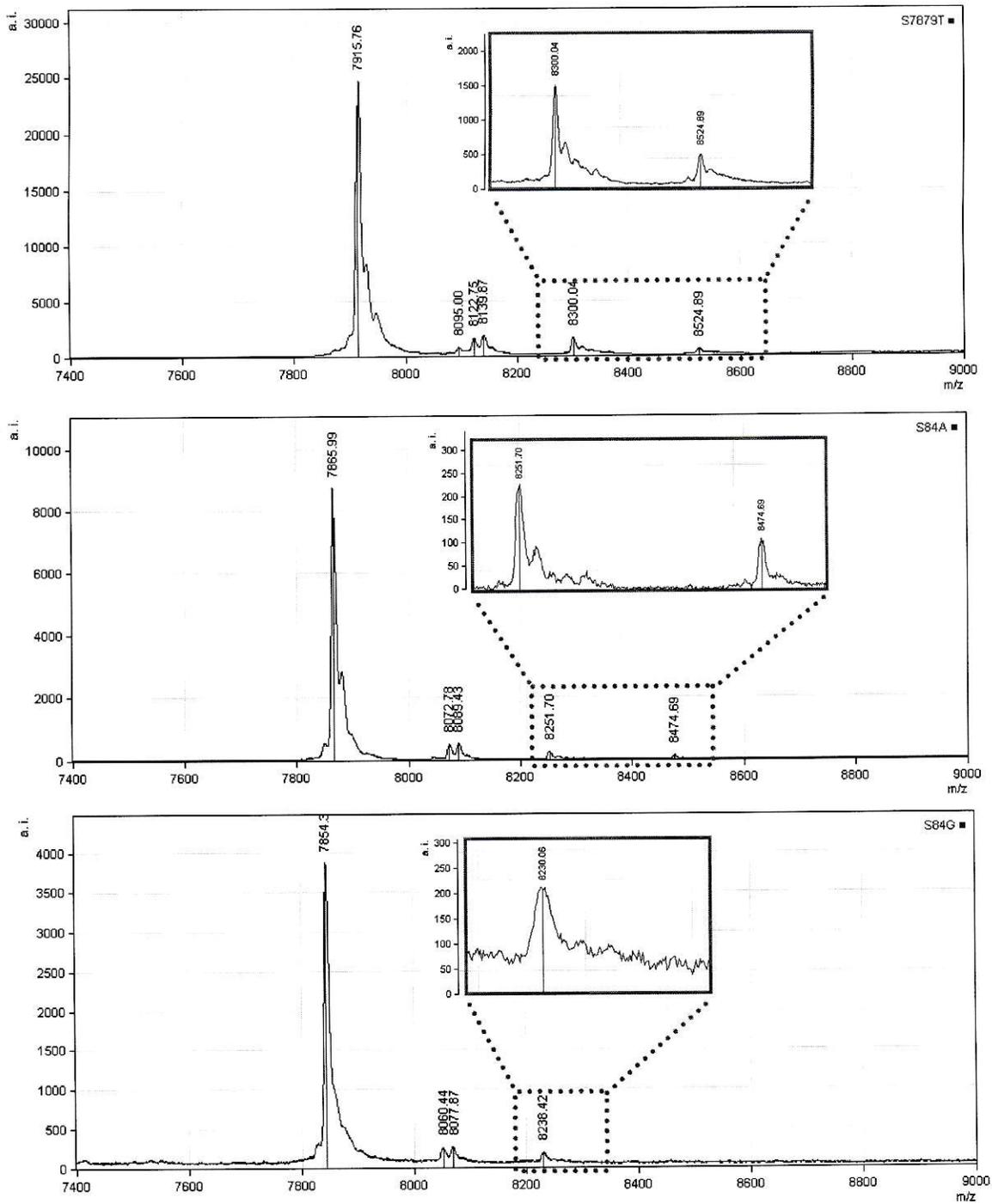


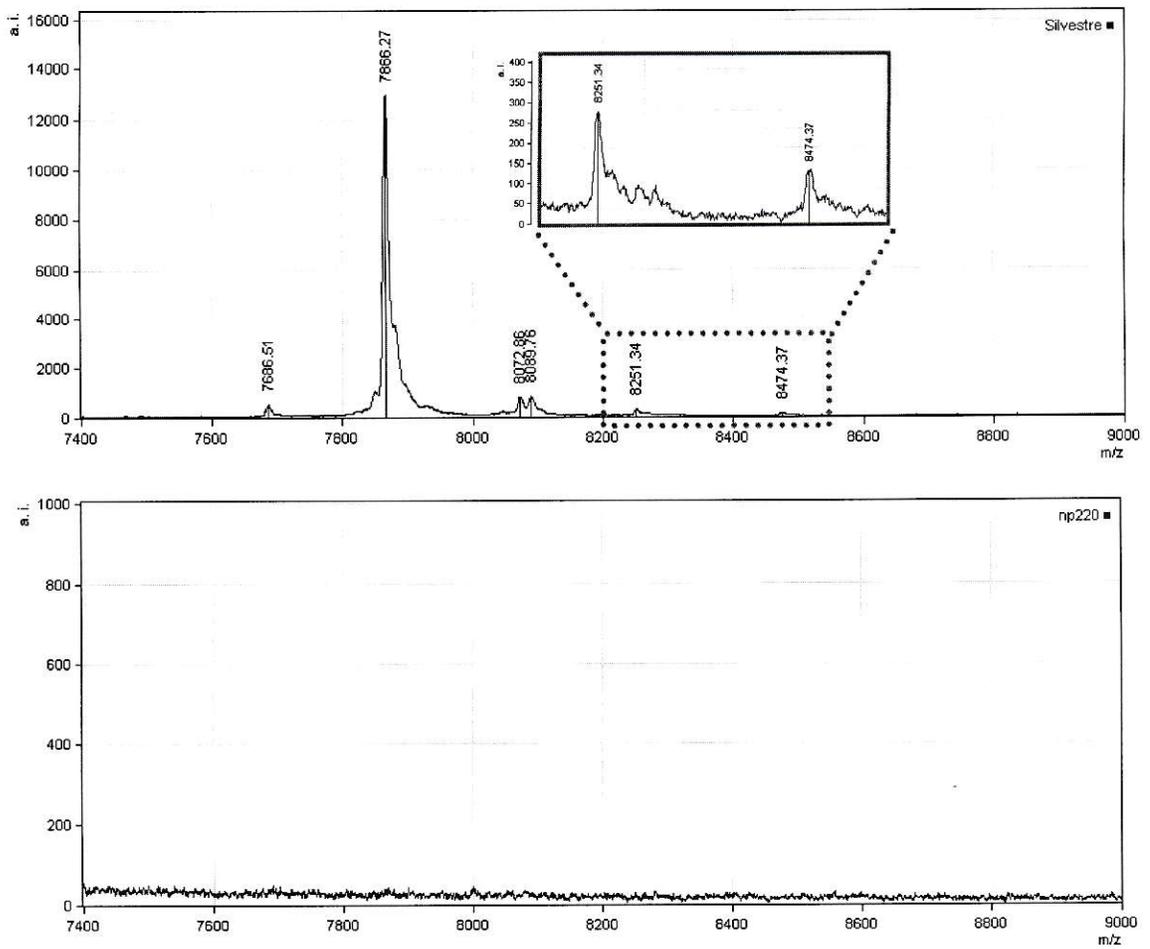
Figura 10. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas.

Se muestran los espectros de las muestras analizadas sobre la matriz ácido sinápico (SA). Continúa en la página siguiente.



Continuación Figura 10. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas.

Se muestran los espectros de las muestras analizadas sobre la matriz ácido sinapínico (SA). Continúa en la página siguiente.



Continuación Figura 10. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas.

Se muestran los espectros de las muestras analizadas sobre la matriz ácido sinapínico (SA).

Tabla 6. Masas obtenidas de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados.

Microcina	MccE492	MccE492+Glc+DHBS	MccE492+Glc+DHBS ₂	MccE492+Glc+DHBS ₃
Silvestre	7866 (7887) ^a -	8251 (8272) ^a 385 (385) ^b	8474 (8495) ^a 223 (223) ^b	-
S75A	7871 (7871) ^a -	8256 (8256) ^a 385 (385) ^b	-	-
S75T	7899 (7901) ^a -	8284 (8286) ^a 385 (385) ^b	8508 (8509) ^a 224 (223) ^b	-
S7879A	7853 (7855) ^a -	8238 (8240) ^a 384 (385) ^b	8462 (8463) ^a 225 (223) ^b	-
S7879T	7915 (7915) ^a -	8300 (8300) ^a 385 (385) ^b	8525 (8523) ^a 225 (223) ^b	-
S84A	7866 (7871) ^a -	8252 (8256) ^a 386 (385) ^b	8475 (8479) ^a 226 (223) ^b	-
S84G	7854 (7857) ^a -	8238 (8242) ^a 384 (385) ^b	-	-

^aLos números en paréntesis corresponden al peso teórico calculado.

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

todos los espectros, pues sus pesos no se ajustan al de un átomo individual consistente con la modificación post-traducciona.

Además de las señales anteriormente descritas, en todos los espectros de las microcinas analizadas se observan un par de picos intermedios de tamaño considerable entre la forma no modificada y la primera especie modificada (MccE492+Glc-DHBS). La diferencia entre el pico de la forma no modificada (MccE492) y el pico intermedio de mayor peso es de aproximadamente 223, lo cual podría corresponder a la unión de una molécula de DHBS (monómero sin glucosa, MccE492+DHBS), y el de menor peso, a esta especie pero con un oxígeno menos.

Una forma de cuantificar las diferentes especies, no modificada y modificada, es medir el área bajo la curva de los picos en los espectros (Tabla 7). Las mutantes en la Ser75 presentaron un porcentaje de modificación mucho menor al de la microcina silvestre. Las demás mutantes presentaron un porcentaje de forma modificada similar al de la microcina silvestre, excepto la mutante S7879T, la cual se encuentra 2,6 veces más modificada que la MccE492 silvestre, lo cual se correlaciona con el aumento en la actividad bactericida (ver Tabla 5).

Tabla 7. Porcentaje de la forma modificada y la no modificada de las mutantes en las serinas 100% conservadas.

Microcina	% No modificada*	% Modificada*
S75A	99,6	0,4
S75T	99,1	0,9
S7879A	97,6	2,4
S7879T	94,5	5,5
S84A	97,6	2,4
S84G	98,2	1,8
Silvestre	97,9	2,1

*Los espectros se procesaron con el programa ImageJ, mediante el cual se determinó el área debajo de los picos de las diferentes formas. En caso de que existiesen picos colindantes, sólo se seleccionó el área de los picos con m/z consistente con los pesos esperados (Tabla 5). Posteriormente se sumaron las áreas de todas las formas, lo que se consideró como el 100%. La forma modificada se calculó como la sumatoria de las áreas de los picos de la microcina modificada con Glc-DHBS y Glc-DHBS₂.

3.3. Caracterización de las mutantes en el motivo GS del C-terminal de la MccE492.

3.3.1 Determinación de la actividad bactericida de las microcinas mutantes G81S, Δ 81-84 y S79G.

Para determinar si las mutantes G81S, Δ 81-84 y S79G poseen actividad bactericida, se complementó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) np220 con las respectivas construcciones de las mutantes (Figura 11).

Las mutantes G81S y Δ 81-84 no presentaron actividad bactericida, al igual que la cepa np220 complementada con el vector pACYC184 (control negativo). La cepa complementada con la mutante S79G en tanto, presentó actividad bactericida al igual que la cepa complementada con la construcción parental, pAB.

3.3.2 Purificación de las microcinas mutantes y determinación de la actividad bactericida.

Se purificó la microcina a partir de los sobrenadantes de los cultivos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) np220 complementada con las mutantes y con la construcción parental pAB, utilizando el procedimiento descrito en Métodos. Las muestras purificadas se sometieron a electroforesis e inmunoblot (Figura 8). Las microcinas mutantes reaccionaron con el anticuerpo empleado al igual que la MccE492 silvestre, en tanto que la preparación a partir del sobrenadante de la cepa BL21 np220 no mostró marcación con el anticuerpo (control negativo). Con respecto a la migración relativa de las bandas, se observa que las microcinas S79G, G81S y Δ 81-84 presentan una mayor movilidad, lo cual es consistente con la disminución en la masa respecto a la MccE492

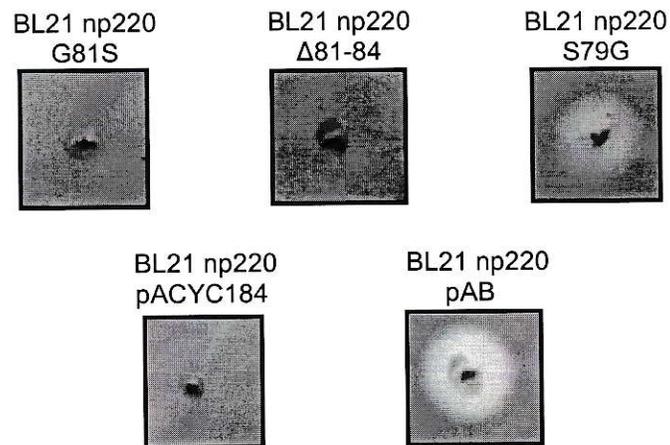


Figura 11. Ensayo de complementación de la actividad bactericida de las mutantes en el motivo GS del C-terminal de la MccE492.

En la figura se ilustran colonias productoras con las microcinas mutantes, sembradas sobre un césped de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) sensible a la MccE492 silvestre.

silvestre.

Para evaluar la actividad bactericida de las purificaciones de las microcinas mutantes se emplearon las cepas mutantes en los receptores de los sideróforos del tipo catecol, la cepa parental (H1443) y la cepa *E. coli* BL21 (DE3) sensible a la MccE492 (Tabla 8). Las mutantes G81S y Δ 81-84 no presentaron actividad bactericida en ninguna dilución y sobre ninguna cepa. La microcina S79G y la microcina silvestre en cambio, fueron activas sobre todas las cepas, excepto sobre la triple mutante en los receptores. La doble mutante Fiu⁻Cir⁻ muestra una sensibilidad reducida a la microcina silvestre e insensibilidad a la microcina S79G. Cabe hacer notar que la mutante S79G presentó menor título bactericida que la MccE492 silvestre en todas las cepas analizadas. La preferencia en el uso de los receptores de la mutante S79G no se vio alterada con respecto al de la MccE492 silvestre.

Para determinar si es que las microcinas mutantes G81S y Δ 81-84 no presentan actividad bactericida debido a que no son reconocidas por los receptores y por ende no son traslocadas al periplasma para ejercer su acción bactericida, se realizaron ensayos de actividad de estas mutantes sobre esferoplastos, es decir, células cuya membrana externa ha sido permeabilizada. Las mutantes G81S y Δ 81-84 presentaron actividad bactericida sobre los esferoplastos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) al igual que la MccE492 silvestre (Tabla 9), lo que indica que el paso limitante para estas mutantes es el reconocimiento por los receptores de los sideróforos tipo catecol en la membrana externa de la célula objetivo.

Tabla 8. Título bactericida de las microcinas mutantes en el motivo GS sobre cepas de *E. coli* mutantes en los receptores de sideróforos tipo catecol.

Mcc [†]	Césped*					
	BL21	H1443 (FepA ⁺ Fiu ⁺ Cir ⁺)	H1728 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁻)	H1875 (FepA ⁺ Fiu ⁺ Cir ⁻)	H1877 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁺)	H1876 (FepA ⁺ Fiu ⁻ Cir ⁻)
Silvestre	16	16	1	16	8	0
G81S	0	0	0	0	0	0
Δ81-84	0	0	0	0	0	0
S79G	4	8	0	8	2	0

[†]Las preparaciones de microcina se concentraron mediante SpeedVac para evaporar el acetonitrilo y se ajustaron a una concentración de 100 µg/mL, sobre la cual se realizaron diluciones seriadas en base dos. La actividad está expresada como el recíproco de la potencia en base 2 de la última dilución que presentó un halo de inhibición del crecimiento sobre el césped indicador.

*Los células se crecieron en medio LB hasta la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,6-0,7). Posteriormente se formó el césped al adicionar 150 µL de cultivo al agar blando fundido. La mezcla se esparció sobre placas con Agar M9-S.

Tabla 9. Actividad bactericida sobre esferoplastos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) de las microcinas mutantes G81S y Δ 81-84.

Tratamiento	UFC/mL	%Viabilidad*
Buffer	$1,5 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^5$	100 \pm 26
H ₂ O	$9,7 \times 10^2 \pm 2,3 \times 10^2$	0,066 \pm 0,016
G81S	$3,4 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^2$	0,230 \pm 0,010
Δ 81-84	$8,7 \times 10^2 \pm 6,1 \times 10^2$	0,059 \pm 0,042
Silvestre	$<1,0 \times 10^2$	$<0,009$

*El % de viabilidad se determinó al comparar las UFC obtenidas en el tratamiento con las microcinas versus las UFC del tratamiento con el Buffer sacarosa, el cual se normalizó como 100% de viabilidad. La microcina purificada se utilizó a una concentración de 50 μ g/mL.

3.3.3 Análisis de las microcinas mutantes G81S, Δ 81-84 y S79G mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Para establecer si es que las microcinas mutantes presentan especies modificadas post-traduccionalmente, se analizaron muestras purificadas mediante espectrometría de masas.

Los espectros obtenidos del MALDI-TOF (Figura 12) muestran la presencia de un pico preponderante que corresponde a la forma no modificada de masa muy similar a la calculada teóricamente (Tabla 10). Tanto la mutante G81S como la Δ 81-84, no presentaron picos de mayor peso que pudiesen corresponder a formas modificadas post-traduccionalmente con moléculas tipo salmoquelina. Para el caso de la mutante S79G, se observa un pico de mayor peso (m/z 7954) a la forma no modificada que correspondería a la especie modificada con Glc-DHBS debido a la buena correlación con el peso calculado teóricamente (Tabla 10). En contraste, no se encontró una explicación coherente para el pico que aparece a 7886. Los controles con microcina silvestre y con la preparación de la cepa BL21 np220 se muestran en la Figura 10. Curiosamente, en los espectros de las microcinas mutantes en el motivo GS se observan especies que son compatibles con microcina modificada con una molécula de DHBS, al igual que en los espectros de las microcinas mutantes en las serinas 100% conservadas.

La Tabla 11 resume los resultados de la modificación post-traducciona l y la actividad bactericida de todas las mutantes analizadas en esta Tesis.

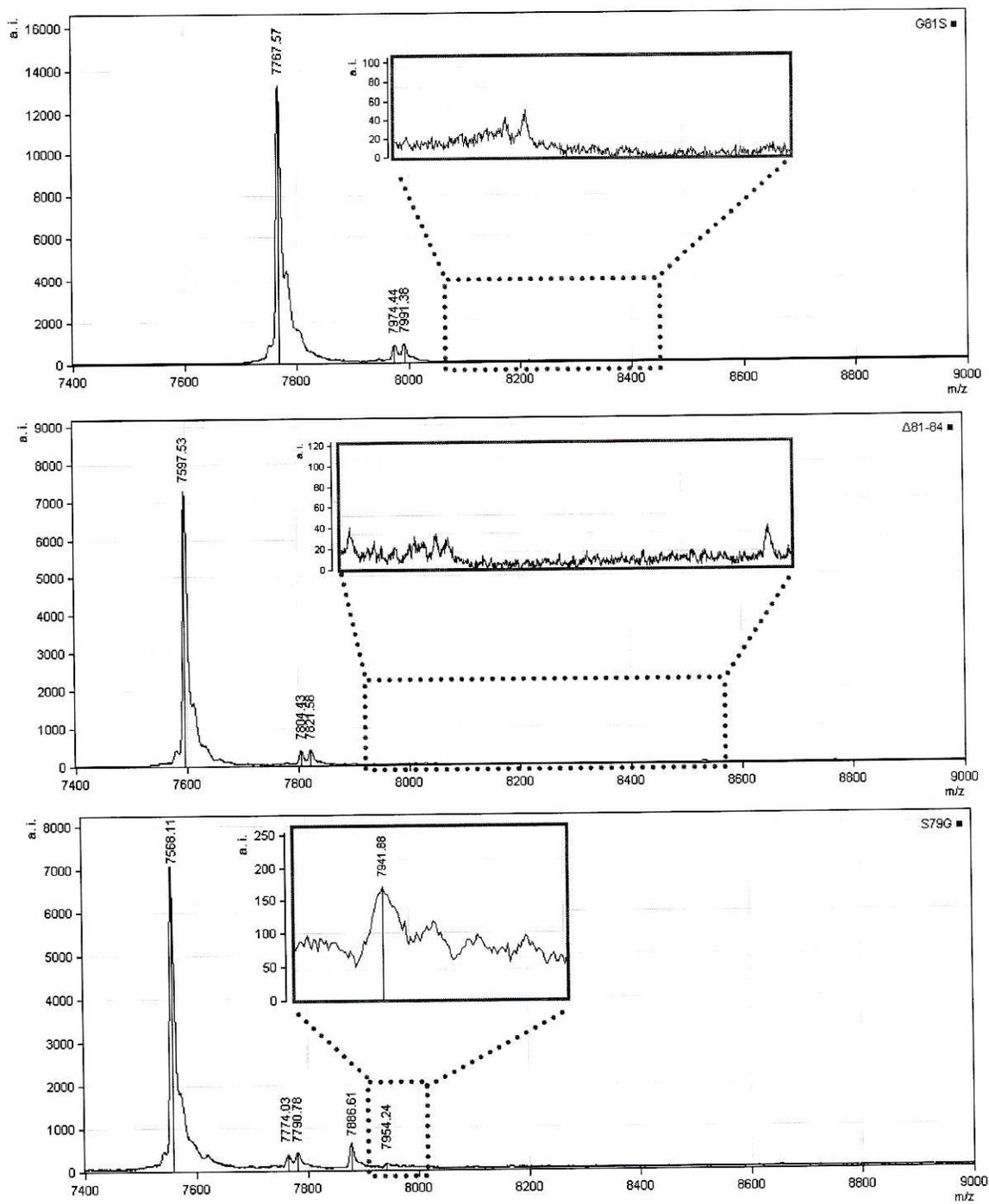


Figura 12. Espectros de masa MALDI-TOF de las microcinas mutantes en el motivo GS.
 Se muestran los espectros de las muestras analizadas sobre la matriz ácido sinapínico (SA).

Tabla 10. Masas obtenidas de las microcinas mutantes en el motivo GS analizadas por MALDI-TOF, su relación m/z y pesos teóricos calculados.

Microcina	MccE492	MccE492+Glc+DHBS	MccE492+Glc+DHBS ₂	MccE492+Glc+DHBS ₃
Silvestre	7866 (7887) ^a -	8251 (8272) ^a 385 (385) ^b	8474 (8495) ^a 223 (223) ^b	-
G81S	7767 (7773) ^a -	-	-	-
Δ81-84	7597 (7599) ^a -	-	-	-
S79G	7568 (7569) ^a -	7954 (7954) ^a 384 (385) ^b	-	-

^aLos números en paréntesis corresponden al peso teórico calculado.

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

Tabla 11. Resumen de los resultados de actividad bactericida y de modificación post-traducciona l de las mutantes analizadas en esta Tesis.

Microcina	Dominio de captación*								Modificación	Actividad		
	75			78	79			83			84	
Silvestre	S	A	T	S	S	S	G	S	G	S	+++	++++
S75A	A	A	T	S	S	S	G	S	G	S	+	+++
S75T	T	A	T	S	S	S	G	S	G	S	+	+++
S7879A	S	A	T	A	A	S	G	S	G	S	+++	++++
S7879T	S	A	T	T	T	S	G	S	G	S	+++++	+++++
S84A	S	A	T	S	S	S	G	S	G	A	+++	++++
S84T	S	A	T	S	S	S	G	S	G	T	++	+++
S84G	S	A	T	S	S	S	G	S	G	G	++	+++

	75			78	79			83	84			
Silvestre	S	A	T	S	S	S	G	S	G	S	+++	++++
Δ83-84	S	A	T	S	S	S	G	S	—Δ—	—	++	+++
G81S	S	A	T	S	S	S	S	S	—Δ—	—	-	-
Δ81-84	S	A	T	S	S	S	—	—	Δ	—	-	-
S79G	S	A	T	S	G	S	—	—	Δ	—	+	+++

*En la tabla se muestra el dominio de captación de las mutantes caracterizadas, además de las mutantes S84T y Δ83-84 (Leiva, 2008). En rojo los aminoácidos 100% conservados entre las microcinas H47, I47, M y E492, y en azul los aminoácidos reemplazados en cada mutante. El número de cruces se asignó en relación a lo observado con la MccE492 silvestre (++++ para la actividad bactericida y +++ para la modificación post-traducciona l). El signo (-) indica ausencia de modificación post-traducciona l o de actividad bactericida. Δ: Delección.

4. DISCUSIÓN

4.1 Mutaciones en las serinas 100% conservadas del dominio de captación de la MccE492: plasticidad al cambio de la Ser84, aminoácido donde ocurre la modificación post-traducciona.

El proceso de modificación post-traducciona es esencial para la actividad de la MccE492. Este proceso consiste en la unión covalente de una molécula del tipo salmoquelina a la Ser84 del C-terminal, reacción catalizada por el complejo MceIJ. La Ser84 es 100% conservada entre la MccE492 y las microcinas M, I47 y H47, las cuales potencialmente también serían modificadas post-traduccionalmente en la serina terminal. A pesar de ser conservada, según lo expuesto en esta Tesis, es posible cambiar la Ser84 por treonina (naturaleza similar, con grupo OH y similar tamaño), alanina (neutra, sin grupo OH, con grupo CH₃ y similar tamaño) o glicina (sin grupo funcional y de menor tamaño), sin abolir el proceso de modificación post-traducciona ni la actividad bactericida. Esto indica que la identidad del último aminoácido no es gravitante en el proceso de modificación post-traducciona ni en la actividad antibacteriana, y que por lo tanto, la cadena lateral hidroxilo de la Ser84 no es esencial en la interacción con el complejo MceIJ. Hasta la fecha no se han reportado mutantes en los dominios de captación de las microcinas H47 e I47. Por otra parte, cuando se intentó clonar el gen estructural de la microcina M se reportó que el único clon encontrado con producción estable de microcina con alta actividad bactericida, poseía una mutación puntual en donde la serina terminal había cambiado por una cisteína (Patzner y cols., 2003). Esto indica que potencialmente la Ser84 de la MccE492 también podría ser cambiada por una cisteína (S84C) sin perder la capacidad de ser modificada post-traduccionalmente ni la actividad bactericida. Este antecedente valida la idea de

que a pesar de ser un aminoácido 100% conservado, la identidad de la Ser84 no es esencial para que ocurra el proceso de modificación post-traducciona, y por tanto, tampoco lo es para la actividad bactericida.

Dentro de las demás mutantes en las serinas conservadas del C-terminal caracterizadas en este trabajo, se encontró que los cambios que disminuyen en mayor grado la modificación post-traducciona y la actividad bactericida son los observados en las mutantes en la Ser75. Según estos resultados, este aminoácido tendría una importancia mucho mayor para la actividad bactericida que las demás serinas conservadas (78-79 y 84), por lo que probablemente, es el más crítico del dominio de captación en la interacción con el complejo MceIJ. Por otro lado, también se observó que el cambio S7879T aumentó la actividad bactericida y el grado de modificación post-traducciona, por lo que posiblemente esta mutación aumenta la afinidad por el complejo de modificación, o lo hace más estable.

4.2 Conservación del motivo GX: importancia de la glicina que antecede al aminoácido terminal.

Además de estudiar la importancia de las serinas conservadas, en este trabajo se analizó la importancia del motivo GS de la MccE492, el cual también es conservado. Al remover el último motivo GS (Δ 83-84) se obtiene una disminución en la actividad bactericida y en el grado de modificación post-traducciona, sin embargo, no hay una pérdida total de éstos (Leiva, 2008). Cuando sobre la mutante Δ 83-84 se realizó el cambio G81S, se obtuvo una pérdida total de la actividad antibacteriana y del proceso de modificación post-traducciona. Esto indica que el motivo GS presente en la mutante Δ 83-84, es esencial para mantener el proceso de modificación post-traducciona, ya

que cuando se alteró la Gly81 al cambiarse por una serina (lo que deja como últimos aminoácidos SS) no se observan especies modificadas post-traduccionalmente y no hay actividad bactericida sobre un césped sensible a la MccE492. Por otra parte, la remoción de los dos motivos GS en la mutante Δ 81-84 (lo que también deja como últimos aminoácidos SS), conlleva a la pérdida total del proceso de modificación post-traducciona l y por ende de la actividad antibacteriana. Finalmente, cuando se introdujo el motivo GS en la mutante Δ 81-84 (mutante S79G), se observan especies modificadas post-traduccionalmente y se recupera una actividad bactericida disminuida respecto de la MccE492 silvestre, por lo que posiblemente el largo del dominio de captación también es un factor a considerar junto con el motivo GS. Estos resultados indican que la presencia de un motivo GS en el C-terminal de la MccE492 es esencial para que ocurra el proceso de modificación post-traducciona l y por ende para la actividad bactericida. Aparentemente, más importante que el motivo GS sería la presencia de la glicina que antecede a la serina, pues, según lo antes expuesto, queda en evidencia que la serina terminal puede ser reemplazada por alanina, treonina o glicina. Esta suposición se apoya además en la observación de que cuando se remueve la Ser84 de la MccE492 (lo que deja como últimos aminoácidos SG) se anula completamente la actividad antibacteriana (Bieler y cols., 2006). Por tanto, el motivo esencial es GX donde X puede ser Thr, Ser, Gly, Ala y posiblemente Cys.

4.3 Modificación post-traducciona l de las microcinas mutantes.

Se puede llevar a cabo el proceso de modificación post-traducciona l *in vitro* al purificar las proteínas de maduración MceC, MceD y MceI, y utilizar como sustrato la MccE492 o un decapeptido con los últimos diez aminoácidos del C-terminal de la

MccE492 (C₁₀E492, dominio de captación) (Nolan y cols., 2007). Posteriormente se profundizó en el estudio bioquímico de la unión de la molécula del tipo salmoquelina al C-terminal de la MccE492 mediada por el complejo MceIJ, el que requiere de Mg²⁺ y ATP como cofactores para llevar a cabo la reacción (Nolan y Walsh, 2008). En el citado trabajo se utilizó como sustrato el decapeptido C₁₀E492 y variantes de éste con cambios en la serina terminal, reemplazándola por treonina, alanina o glicina (S10T, S10A o S10G respectivamente). El decapeptido mutante S10A resultó ser susceptible de modificación y con una eficiencia catalítica similar a la de C₁₀E492. En esta Tesis se encontró que el cambio de la última serina por alanina (S84A) posee un grado de modificación similar al de la MccE492 silvestre, lo que es consistente con lo que se obtuvo en los experimentos *in vitro*. El péptido S10T resultó ser sustrato para la modificación *in vitro* pero con una eficiencia catalítica 10 veces menor a la de C₁₀E492. La mutante S84T construida anteriormente presenta modificación post-traducciona, sin embargo, posee un menor grado de modificación que la MccE492 silvestre, lo que se correlaciona con los antecedentes de la modificación *in vitro* de la literatura. Finalmente el decapeptido S10G, no resultó ser sustrato para el complejo MceIJ, pero tampoco demostró ser un inhibidor del proceso de modificación post-traducciona de la MccE492 silvestre. No obstante, en esta Tesis se encontró que la mutante S84G se modifica post-traducciona, por lo que posiblemente existen otros factores en el proceso de modificación post-traducciona *in vivo* que lo hacen más eficiente que en las condiciones experimentales planteadas *in vitro*. Un factor importante es la proteína EntF, la cual se ha descrito que sólo requiere del dominio de adenilación (DomA) para participar en el proceso de modificación post-traducciona *in vivo*, aunque por un mecanismo diferente al conocido para DomA en la síntesis de enteroquelina (Mercado y cols., 2008).

Además de cambiar el último aminoácido del sustrato C₁₀E492, Nolan y Walsh (2008) variaron el largo de la cadena peptídica acortando el C₁₀E492 desde el extremo N-terminal. Con estos experimentos se determinó que la unidad mínima utilizable como sustrato para la modificación es el decapeptido C₁₀E492 con un 80% del producto modificado. Cuando la cadena se acorta hasta generar un heptapeptido (C₇E492), hay una disminución sustancial en la cantidad del producto modificado, el que no sobrepasa el 8% (10 veces menor que C₁₀E492). Estos resultados muestran consistencia con lo encontrado en esta Tesis, en que se determinó que el aminoácido que más contribuye a mantener el grado de modificación post-traducciona es la Ser75. En el C₇E492 la Ser75 se ha removido, lo que afectaría drásticamente la actividad del complejo MceIJ. A diferencia del trabajo de Nolan y Walsh (2008) en esta Tesis se acortó el dominio de captación desde el C-terminal, lo que llevó a demostrar que se puede acortar hasta C₆E492 (mutante S79G), pero se debe conservar la Ser75 hacia el N-terminal y un motivo GS en el C-terminal. Como se mencionó anteriormente, *in vitro* es posible obtener hasta un 80% del producto modificado, niveles mucho mayores al 2% obtenido en los espectros de masa de las preparaciones de MccE492 en esta Tesis (ver Tabla 7). Posiblemente esta diferencia se debe a que *in vitro* se lleva a cabo la reacción en condiciones de exceso de sustrato y de enzima (concentraciones no fisiológicas). Por lo tanto la reacción se mantendrá hasta que se acabe el sustrato o se inactive la enzima; en otras palabras, se fuerza la reacción. Mientras que *in vivo* existen concentraciones menores de enzima y de sustrato, las que además son reguladas a nivel de la expresión génica por lo que varían en las distintas fases del crecimiento bacteriano; en fase exponencial se activa la expresión de los genes de la maduración *mceCIJ* y en fase estacionaria se inactiva su expresión (Corsi y cols, 2002).

En todos los espectros de masas analizados, se observaron dos señales entre la especie no modificada y la modificada con una molécula de Glc-DHBS, los cuales no se apreciaron en los análisis en los que se describió la modificación post-traducciona inicialmente (Thomas y cols., 2004). Estas señales también se observaron anteriormente en los espectros de las mutantes S84T y Δ 83-84 (Leiva, 2008). La diferencia de peso del pico de mayor m/z con respecto al de la microcina no modificada es muy cercana a 223, lo que coincide con el peso de una molécula de DHBS. En los experimentos de modificación post-traducciona *in vitro* no se utiliza DHBS como sustrato para el complejo MceIJ (Nolan y cols., 2007), por lo que es posible que la MccE492 silvestre y las mutantes puedan ser modificadas post-traduccionalmente con una molécula de DHBS.

4.4 Posibles mecanismos del proceso de modificación post-traducciona de la MccE492.

El complejo encargado de unir la molécula de salmoquelina a la MccE492 está compuesto por dos proteínas: MceJ, la cual no posee homólogos conocidos, y MceI, con una baja identidad a la acil transferasa HlyC, encargada de activar la toxina hemolisina. HlyC forma un intermediario acil-HlyC, y mediante estudios de mutagénesis, se ha establecido que la His23 es importante para la catálisis. Estudios de Nolan y Walsh (2008) apuntaron a determinar si MceI tenía un mecanismo similar al de HlyC, para lo cual se construyeron mutantes en las 5 histidinas que posee la proteína MceI, reemplazándolas por alaninas. Los resultados mostraron que las 5 mutantes llevaban a cabo el proceso de modificación post-traducciona con eficiencias catalíticas similares al de la proteína silvestre. Esto indicaría que no hay formación de un intermediario covalente acil-His en el proceso de modificación post-traducciona

como ocurre en el mecanismo de HlyC. También se descartó la posible transferencia del acil por medio de esterificación de un residuo Cys tiol, un mecanismo común en algunas acil transferasas, ya que ninguna de las 3 cisteínas de MceI resultaron ser relevantes en el proceso de modificación post-traduccional al ser reemplazadas por alaninas. Por lo tanto, por el momento se ha descartado la formación de un intermediario covalente entre la MccE492 y el complejo MceIJ.

El complejo MceIJ necesita ATP y Mg^{+2} como cofactores para la unión de la salmoquelina al C-terminal de la MccE492, la cual se produce vía un enlace C-glicosídico entre el C-terminal de la Ser84 y la glucosa de la salmoquelina (Nolan y cols., 2007). Posteriormente, se determinó que se requiere de la formación de un intermediario peptidil-CO-AMP que activa el carboxilo de la Ser84 para unirlo a la salmoquelina (Nolan y Walsh, 2008). Otro caso de activación del carboxilo en que existe un intermediario aminoacil-CO-AMP, es el mecanismo descrito para las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs), las cuales unen el carboxilo de los aminoácidos (activados con ATP) al azúcar de las bases nucleotídicas de los tRNAs correspondientes. Dentro de la familia de las aaRSs, se encuentra la clase de sintetasas IIa en la cual están la seril-tRNA sintetasa (SerRS), la AlaRS, ThrRS, HisRS y ProRS (Bilokapic y cols., 2006). En la caracterización estructura-función de la SerRS de una arquea metanogénica, se determinó que además de requerir ATP para su actividad, necesitaba Zn^{+2} , el cual era coordinado por los residuos Cys303, Glu355 y Cys461, los que también estaban implicados en el reconocimiento de la serina, y resultaron ser esenciales para la actividad de la SerRS (Bilokapic y cols., 2006). Resultados no publicados de nuestro laboratorio de mutagénesis al azar sobre el complejo MceIJ, indican que habrían 3 residuos en la proteína MceI fundamentales para conservar la actividad bactericida, por lo tanto, esenciales para llevar a cabo el

proceso de modificación post-traducciona: Cys29 (mutante C29Y), Glu99 (mutante E99K) y Cys110 (mutante C110Y). Coincidentemente, son los mismos aminoácidos esenciales para la SerRS de la arquea mencionada anteriormente, con la cual, además se comparte la formación de un intermediario aminoacil-CO-AMP en la activación del carboxilo de los aminoácidos, y que tampoco se forma un intermediario covalente aminoacil-SerRS. Desde el punto de vista del sustrato (aminoacil) queda en evidencia que la SerRS puede reconocer erróneamente la treonina en vez de la serina (Bilokapic y cols., 2006). Análogamente, el complejo MceIJ es capaz de reconocer a la mutante S84T (sustrato peptidil), pues esta mutante presenta actividad bactericida y muestra especies modificadas post-traduccionalmente. También se ha reportado que otras aaRSs reconocen de forma errónea aminoácidos y los unen a tRNAs que no corresponden (Martinis y cols., 1999). Dado que MceIJ puede reconocer las mutantes S84A, S84T y S84G, queda abierta la posibilidad de que el mecanismo de modificación post-traducciona guarde relación con el mecanismo de alguna de las aaRSs.

En la Figura 13 se muestra un esquema de la maduración y el procesamiento de la MccE492 que incorpora un detalle del dominio de captación y de los aminoácidos más importantes para llevar a cabo el proceso de modificación post-traducciona según los resultados obtenidos en esta Tesis.

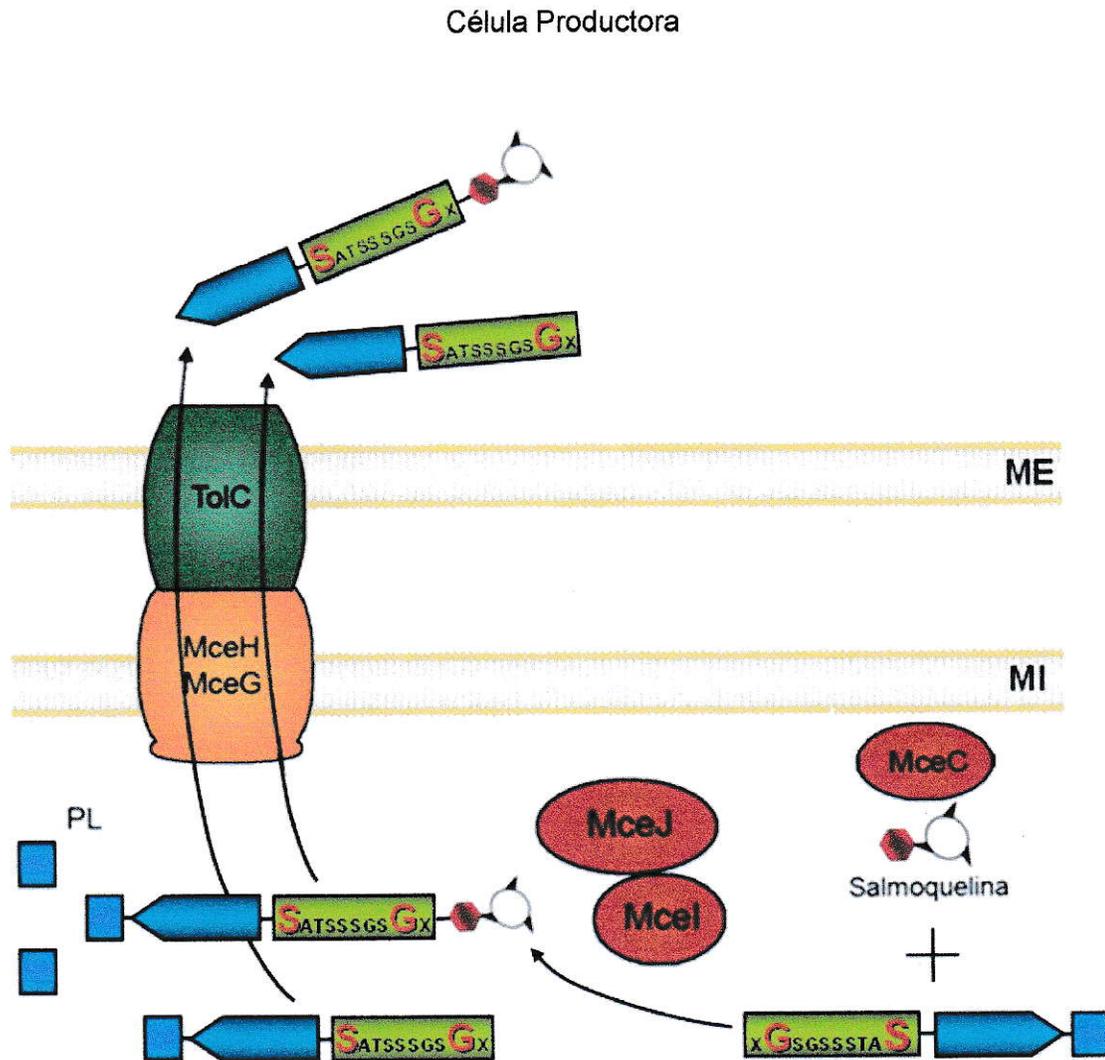


Figura 13. Esquema de la maduración y el procesamiento de la MccE492: importancia de la serina-75 y de la glicina que antecede al último aminoácido en el dominio captación de la MccE492.

La MccE492 se sintetiza como una pre-proteína, que puede o no sufrir un proceso de modificación post-traducciona en el que participan los productos génicos MceC, MceI y MceJ. En este proceso es importante la serina-75 e indispensable la glicina que antecede al último aminoácido, ambas ubicadas en el dominio de captación (en verde claro) de la MccE492 (la letra X puede ser treonina, alanina, glicina, serina y posiblemente cisteína; la Ser75 y la Gly83 se muestran con tamaño de fuente aumentado y en color rojo dada su importancia en el proceso de modificación post-traducciona según los resultados obtenidos en esta Tesis). Posteriormente ambas formas, la modificada y la no modificada, al ser exportadas al medio extracelular son procesadas por MceG, perdiendo el péptido líder (PL, en celeste). ME: Membrana externa. MI: Membrana interna. Modificado de Lagos y cols., 2009.

5. CONCLUSIONES

- Es posible reemplazar las serinas conservadas del C-terminal de la MccE492 por alaninas y treoninas, sin abolir el proceso de modificación post-traducciona l ni anular la actividad bactericida.
- Las mutaciones en la Ser75 del dominio de captación de la MccE492 son las que más afectan la modificación post-traducciona l y la actividad antibacteriana, pues posiblemente este aminoácido es importante en la interacción con el complejo MceIJ, encargado de unir la molécula de salmoquelina a la serina terminal.
- En el proceso de modificación post-traducciona l de la MccE492 es esencial la presencia de un motivo GS en el C-terminal. Nuestros resultados indican que el factor crítico es la identidad de la glicina que antecede a la serina. Por lo cual el motivo esencial es GX donde X puede ser Thr, Ser, Gly, Ala y posiblemente Cys.
- Es posible acortar hasta en 4 aminoácidos el dominio de captación de la MccE492 desde el C-terminal sin anular ni la actividad bactericida ni la modificación post-traducciona l. No obstante, se requiere conservar la Ser75 y un motivo GX en el C-terminal para que ocurra la unión de la salmoquelina, y en consecuencia, obtener la actividad bactericida.
- Las microcinas mutantes expuestas en esta Tesis no cambiaron la preferencia en el uso de los receptores con respecto a la MccE492 silvestre purificada a partir de la

cepa BL21 np220 pAB. Esto indica que los aminoácidos conservados no son importantes a nivel del reconocimiento en la célula objetivo, sino que más bien son importantes para el proceso de modificación post-traducciona. Por lo tanto, es más preciso denominar a este dominio como el dominio de modificación post-traducciona.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, E., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., y Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N. Y.
- Azpiroz, M. y Laviña, M. (2007) Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**:2412-2419.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo príon de la mceE492. Tesis Doctoral, Doctorado en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **23**:117-124.
- Bentley, R. (1990) The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**:307–384.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C. y Belin, D. (2006) Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.*, **188**:7049-7061.
- Bilokapic, S., Maier, T., Ahel, D., Gruic-Sovulj, I., Söll, D., Weygand-Durasevic, I., y Ban, N. (2006) Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO J.*, **25**:2498-2509.
- Braun, V., Patzer, S. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, **84**:365-380.
- 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
- Crossa, J. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **84**:539-544.
- Crossa, J. y Walsh, C. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**:223-249.
- Chang, A. y Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.*, **134**:1141-1156.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, **139**:72-75.

- de Lorenzo, V. y Pugsley, A. (1985) Microcin E492, a low-molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**:666-669.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J. y Rebuffat, S. (2007) Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **24**:708-734.
- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D. y Walsh, C. (2005) In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**:571-576.
- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.*, **2**:132-138.
- Flores, J. (2009) Función del extremo C-terminal de la proteína TonB en la sensibilidad a la microcina E492. Seminario de título. Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Gehring, A., Bradley, K. y Walsh, C. (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., Mori, I. y Walsh, C. (1998) Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE and EntF. *Biochemistry*, **37**:2648-2659.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**:557-580.
- Hantke, K. (1990) Dihydroxybenzoylserine a siderophore for *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**:5-8.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. y Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**:3677-3682.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X. y Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.*, **321**:145-148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E. y Monasterio, O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.*, **181**:212-217.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, C., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C. y Monasterio, O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.*, **42**:229-243.

- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V. y Monasterio, O. (2009) Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**:74-85.
- Leiva, M. (2008) Importancia de la serina-84 y el motivo glicina-83 serina-84 de la microcina E492 en la modificación post-traducciona y en la actividad antibacteriana. Seminario de Título, Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Martinis, S., Plateau, P., Cavarelli, J. y Florentz, C. (1999) Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J.*, **18**:4591-4596
- Mercado, G., Tello, M., Marín, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2008) The production *in vivo* of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.*, **190**:5464- 5471.
- Nolan, E., Fischbach, M., Koglin, A. y Walsh, C. (2007) Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**:14336-14347.
- Nolan, E. y Walsh, C. (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.
- O'Brien, I. y Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **215**:393-402.
- O'Brien, I., Cox, G. y Gibson, F. (1971) Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **237**:537-549.
- Patzer, S., Baquero, M., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology*, **149**:2557-2570.
- Pavlova, O. y Severinov, K. (2006). Posttranslationally modified microcins. *Russian Journal of Genetics*, **42**:1380–1389.
- Pollack, J. y Neilands, J. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**:989-992.
- Pugsley, A. y Reeves, P. (1977) The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**:903-911.
- Pugsley, A., Moreno, F. y de Lorenzo, V. (1986) Microcin E492 insensitive mutants of *E. coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.*, **132**:3253-3259.

Riley, M. y Wertz, J. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**:117-137.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Strahsburger, E. (2004) Estudio de la regulación intracelular y extracelular de la actividad antibiótica de la microcina E492 por enterobactina y sus productos de hidrólisis. Tesis Doctoral, Doctorado en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**:3083-3086.

Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Alfonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J. y Rebuffat, S. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.*, **279**:28233-28242.

Vassiliadis, G., Peduzzi, J., Zirah, S., Thomas, X., Rebuffat, S. y Destoumieux-Garzón, D. (2007) Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**:3546-3553.

Weiss, R. (1976) Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **128**:668-670.

Wilkens, M., Villanueva, J., 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.