

UCH-FC  
Doc-Microb  
G 163  
C. 2



**Caracterización del complejo binario [SdiA/AHL] en la  
transcripción del operón ftsQAZ.  
¿Una relación entre quorum sensing y división celular?**

Tesis entregada a la Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
Para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología**

Por

**María José Gallardo Nelson**

Director de Tesis:

**Dr. Octavio Monasterio O.**

Junio de 2011

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

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

**María José Gallardo Nelson**

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

**Director de Tesis:**

**Dr. Octavio Monasterio**

**Co-Director de Tesis:**

**Dr. Nicolas Guiliani**

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Victor Cifuentes**

**Dr. Oscar León**

**Dr. Omar Orellana**



*[Handwritten signatures in blue ink, each followed by a dotted line for a name. The signatures are: 1. A large, flowing signature. 2. A signature with a large loop. 3. A signature with a large loop. 4. A signature with a large loop. 5. A signature with a large loop.]*

*A mi madre, mis abuelos y tENCHITA...*

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas.”

**Albert Einstein**

## Biografía



Mi nombre es María José Gallardo pero todos me conocen como Coté. Nací un cálido 7 de febrero de 1983 en San Miguel y me crié con el incondicional amor de mi madre y mis abuelos. Desde pequeña fui bastante inquieta y porfiada, siempre preguntando el porque de las cosas. Estudié la educación básica en el colegio Compañía de María Seminario y terminé la educación media en el colegio San Marcos. Siempre supe que quería dedicarme a la investigación y a la docencia y el año 2001 entré a estudiar bioquímica en la Universidad de Chile. Realicé mi tesis de pregrado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde me enamoré tanto de la Facultad como del tema de comunicación bacteriana. Por este motivo decidí realizar el doctorado en Microbiología. Además de dedicar estos últimos 4 años de mi vida a la investigación, también me dediqué a la docencia ya que considero que es parte fundamental de la carrera de un investigador y también participé en el CIPC (Centro de Investigadores de Postgrado de Ciencias). Ahora emprendo camino a Concepción a realizar el Postdoctorado y continuar mi carrera científica.

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis abuelos, Olga y Armando, que ya no están conmigo pero que me acompañan y me cuidan desde el cielo. También quiero agradecer infinitamente a mi mamá, Lillian, quien es la persona más importante en mi vida, es mi amiga y compañera. A toda mi familia mis tíos, tías y primos. A mi nana, comadre y amiga, Mariela. Quiero agradecer especialmente a mi Tía Tenchy que me acompañó en mi titulación de bioquímica y en todos los momentos importantes de mi vida.

Quiero agradecer a mi tutor de tesis el Dr. Octavio Monasterio que me recibió en su laboratorio, dirigió mi tesis y me dio todo su apoyo y sabiduría para seguir en el camino de la ciencia. Al Dr. Nicolas Guliani y la Dra. Rosalba Lagos por su aporte en la discusión a lo largo del desarrollo de la tesis. Al Dr. Carlos Bustamante y al Dr. Peter Prevelige por recibirme en sus respectivos laboratorios en USA.

A los integrantes de la comisión evaluadora, Dr. Victor Cifuentes, Dr. Oscar León y Dr. Omar Orellana por su disposición y por su valioso aporte en el desarrollo de este trabajo de tesis.

A Eric Monroe por su ayuda en los experimentos de intercambio isotópico. A Bibiana Onoa por su ayuda en los experimentos de microscopía de fuerza atómica. A Yerco Escalona por su ayuda en el "docking" molecular.

Agradecer a las fuentes de financiamiento de esta tesis, beca CONICYT de doctorado año 2007-2011, becas de término de tesis de la Fundación María Ghilardi Venegas, beca MECESUP de pasantía años 2009 y 2010 y beca apoyo tesis CONICYT años 2009 y 2010.

Muchas gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio Alexis, Felipe M, Pouchucq, Jose Pablo, pEDU, Pablo, Gonzalo, Felipe H, Lucho, Carola, Dani, Matucito y Don Pedro.

Al comité organizador Bea, Maca, Cherie, Roselyn y Marisol que hicieron de el laboratorio mi segundo hogar y que no hubo momento que no estuviéramos muertas de la risa, copuchando o organizando un evento.

A mis amiguis Sergiño, Gi, Vero, Undu, Vale, Ceci, Pame, Caro Garri, Wilson, Mati, Kathy, Platas, Pilar, Alex, Sebita, Nacho, Emilita y Sop.

En especial a la chiqui mi "wife" que me ayudo con mis figuritas de la tesis a pesar de la distancia.

A toda la gente que conocí durante el desarrollo de la tesis tanto en Chile como en USA, a mis compañeros del CIPC y a mis nuevos colegas en Concepción, especialmente Juan Pablo Staforelli por su apoyo en esta última etapa.

Simplemente...GRACIAS!!!!!!!!!!!!

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. QUORUM SENSING (QS) MEDIADO POR <i>N</i>-ACIL HOMOSERINA LACTONA (AHL) O AUTOINDUCTOR DEL TIPO 1 (AI-1)</b>	<b>4</b>
1.1.1. SINTASAS DE AHL Y FAMILIA DE PROTEÍNAS I	4
1.1.2. ESTRUCTURA, TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN DE AHLs	6
1.1.3. REGULADOR TRANSCRIPCIONAL Y FAMILIA DE PROTEÍNAS R	8
<b>1.2. REGULADORES TRANSCRIPCIONALES HUÉRFANOS</b>	<b>11</b>
<b>1.3. DIVISIÓN CELULAR EN <i>E. COLI</i> Y QS.</b>	<b>12</b>
<b>1.4. SDIA</b>	<b>15</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>3.1. REACTIVOS</b>	<b>21</b>
<b>3.2. MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>22</b>
3.2.1. MEDIO LB	22
3.2.2. PLACAS DE AGAR-LB	22
3.2.3. MEDIO MÍNIMO M9	22
3.2.4. MEDIO M9 SUPLEMENTADO	22
3.2.5. CEPAS Y PLASMIDIOS	22
3.2.6. PARTIDORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS DE HEBRA DOBLE	23
<b>3.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>25</b>
3.1.1. GENERACIÓN DE FUSIONES TRADUCCIONALES	25
3.1.2. ENSAYO MILLER	26
<b>3.2. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA</b>	<b>27</b>
3.2.1. SOBRE-EXPRESIÓN DE SDIA	27
3.2.2. PURIFICACIÓN DE SDIA	27
3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE SDIA	28
3.2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	29
3.2.5. WESTERN BLOT	29
<b>3.3. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS</b>	<b>30</b>
3.3.1. FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE SDIA	30
3.3.2. APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA	30
3.3.3. ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	30
3.3.4. DICROÍSMO CIRCULAR DE SDIA	31
3.3.5. DICROÍSMO CIRCULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS	31
<b>3.4. INTERCAMBIO ISOTÓPICO</b>	<b>31</b>
<b>3.5. ESPECTROMETRÍA DE MASA</b>	<b>33</b>
<b>3.6. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)</b>	<b>33</b>

3.6.1. MODO DE CONTACTO	33
3.6.2. MODO DE NO CONTACTO	33
3.6.3. MODO DE CONTACTO INTERMITENTE	34
3.6.4. ADQUISICIÓN DE IMAGENES	34
3.6.5. ANÁLISIS DE IMÁGENES	35
<b>3.7. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA (AUC)</b>	<b>35</b>
<b>3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS</b>	<b>36</b>
3.8.1. MODELAMIENTO SDIA	36
3.8.2. "DOCKING" MOLECULAR	36
<b>3.9. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)</b>	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<hr/>	
<b>4.1. SOBRE-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN SDIA</b>	<b>38</b>
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN DE SDIA</b>	<b>41</b>
4.2.1. FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE SDIA	41
4.2.2. DICROISMO CIRCULAR Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE SDIA	42
4.2.3. ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE SDIA	44
4.2.4. VALIDACIÓN DEL MODELO BIOINFORMÁTICO MEDIANTE INTERCAMBIO ISOTÓPICO ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	47
<b>4.3. EFECTO DE AHL SOBRE LA ESTRUCTURA DE SDIA</b>	<b>52</b>
4.3.1. EFECTO DE AHLS SOBRE LA SOLUBILIDAD DE SDIA "IN VIVO"	52
4.3.2. "DOCKING" MOLECULAR DE SDIA CON AHLS	53
4.3.3. APAGAMIENTO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA SDIA CON AHL	55
4.3.4. DICROISMO CIRCULAR DE SDIA EN PRESENCIA DE AHL	58
4.3.5. ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA (AUC) DE SDIA EN PRESENCIA DE AHL	59
4.3.6. INTERCAMBIO ISOTÓPICO	61
<b>4.4. UNIÓN DE SDIA A LA REGIÓN PROMOTORA P2 DEL OPERÓN <i>ftsQAZ</i></b>	<b>67</b>
4.4.1. UNIÓN DE SDIA AL DNA DETERMINADO POR DICROÍSMO CIRCULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS	67
4.4.2. UNIÓN DE SDIA AL DNA DETERMINADA POR ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA	69
<b>4.5. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)</b>	<b>73</b>
4.5.1. VISUALIZACIÓN DEL COMPLEJO SDIA- <i>ftsQAZP1P2</i>	75
<b>4.6. CARACTERIZACIÓN IN VIVO DEL EFECTO DEL COMPLEJO BINARIO [SDIA/AHL] SOBRE LA DIVISIÓN CELULAR EN <i>E. COLI</i>.</b>	<b>79</b>
4.6.1. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE AHL	79
4.6.2. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN TRADUCCIONAL DEL PROMOTOR DEL OPERÓN <i>ftsQAZ</i> CON EL GEN $\beta$ -GALACTOSIDASA ( <i>LACZ</i> )	81
4.6.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA (ENSAYO DE MILLER)	84
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<hr/>	
<b>5.1. ACIL-HOMOSERINA LACTONA (AHL) INDUCE LA DIMERIZACIÓN Y UN CAMBIO CONFORMACIONAL DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE QUORUM SENSING SDIA</b>	<b>91</b>
<b>5.2. UNIÓN DE SDIA A LA REGIÓN PROMOTORA <i>ftsQP2</i> DEL OPERÓN <i>ftsQAZ</i> Y POSIBLE EFECTO DE LAS AHLS EN LA TRANSCRIPCIÓN.</b>	<b>98</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<hr/>	
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>105</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Partidores utilizados en este trabajo para las reacciones de PCR y secuenciación	23
<b>Tabla 2.</b>	Partidores utilizados en este trabajo para las reacciones de PCR	24
<b>Tabla 3.</b>	DNA de hebra doble utilizados en los experimentos de difracción circular y de anisotropía de fluorescencia	24
<b>Tabla 4.</b>	Valores del porcentaje de estructura secundaria de SdiA	44

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Se muestran los 2 posibles mecanismos para la unión de AHL al dímero o monómero de SdiA en su unión a DNA	19
<b>Esquema 2.</b>	Cepas que contienen la fusión traduccional <i>ftsQAZP1P2</i> .	83
<b>Esquema 3.</b>	Protocolo del ensayo de Miller para la distintas cepas que contienen la fusión <i>ftsQAZP1P2</i>	85
<b>Esquema 4.</b>	Mecanismo mediado por AHL.	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Vía de regulación de la bioluminiscencia mediante el sistema de QS LuxI/R en <i>V. fischeri</i> .	3
<b>Figura 2.</b>	AHLs producidas por diferentes bacterias Gram-negativas y su respectiva sintasa de AHL.	6
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de transcripción de los reguladores transcripcionales de QS.	9
<b>Figura 4.</b>	Complejo ternario de TraR, de <i>A. tumefaciens</i> .	10
<b>Figura 5.</b>	Región promotora del operón <i>ftsQAZ</i> .	16
<b>Figura 6.</b>	Sobre-expresión e identificación SdiA.	39
<b>Figura 7.</b>	Purificación SdiA.	40
<b>Figura 8.</b>	Fluorescencia Intrínseca de SdiA	42
<b>Figura 9.</b>	Entrecruzamiento químico de SdiA con glutaraldehído	45
<b>Figura 10.</b>	Velocidad de sedimentación de SdiA.	47
<b>Figura 11.</b>	Tipos de hidrógenos en una proteína.	49
<b>Figura 12.</b>	Intercambio isotópico acoplado a espectrometría de masas.	51
<b>Figura 13.</b>	Efecto AHLs sobre la solubilidad de SdiA <i>in vivo</i>	52
<b>Figura 14.</b>	“Docking” molecular de SdiA con diferentes AHLs.	55
<b>Figura 15.</b>	Apagamiento de fluorescencia de SdiA.	57

<b>Figura 16.</b> Dicroísmo circular de SdiA en el UV lejano	59
<b>Figura 17.</b> Velocidad de sedimentación de SdiA en presencia de AHL	61
<b>Figura 18.</b> Efecto de AHL sobre el intercambio isotópico (H/D) acoplado a espectrometría de masa de la proteína SdiA.	62
<b>Figura 19.</b> Cinética de intercambio de hidrógenos del dominio de unión a AHL de SdiA en presencia y ausencia de AHL.	64
<b>Figura 20.</b> Cinética de intercambio de hidrógenos del dominio de unión a DNA de SdiA en presencia y ausencia de AHL.	65
<b>Figura 21.</b> Cinética de intercambio de hidrógenos de SdiA en presencia y ausencia de AHL.	66
<b>Figura 22.</b> Espectro de dicroísmo circular de los fragmentos <i>ftsQP1</i> y <i>ftsQP2</i> .	68
<b>Figura 23.</b> Espectro de dicroísmo circular de los fragmentos <i>ftsQP1</i> y <i>ftsQP2</i> con SdiA y AHL .	69
<b>Figura 24.</b> Esquema de la unión entre SdiA y un fragmento de DNA que contiene la secuencia promotora <i>ftsQP2</i> y sus correspondientes anisotropías.	71
<b>Figura 25.</b> Anisotropía de fluorescencia de la secuencia <i>ftsQP2</i> y <i>ftsQP1</i> unida a la sonda 5-FAM en función de la concentración de SdiA.	72
<b>Figura 26.</b> Fundamento de la técnica de microscopía de fuerza atómica.	74

<b>Figura 27.</b> Visualización del complejo SdiA/ <i>ftsQP2</i> mediante microscopía de fuerza atómica.	76
<b>Figura 28.</b> Determinación de la altura del complejo SdiA/ <i>ftsQP2</i>	77
<b>Figura 29.</b> Visualización del complejo SdiA/ <i>ftsQP2</i> mediante microscopía de fuerza atómica.	78
<b>Figura 30.</b> Curvas de crecimiento de la cepa K12 silvestre y K12 <i>sdiA</i> <sup>-</sup> (JW1801).	80
<b>Figura 31.</b> Construcción de la fusión traduccional <i>ftsQAZP1P2-lacZ</i> .	81
<b>Figura 32.</b> Clones positivos correspondientes a la fusión traduccional <i>ftsQAZP1P2-lacZ</i> .	82
<b>Figura 33.</b> Curvas de crecimiento de las 6 cepas que contienen la fusión traduccional <i>ftsQAZP1P2</i> .	84
<b>Figura 34.</b> Actividad β-galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante <i>sdiA</i> <sup>-</sup> .	86
<b>Figura 35.</b> Actividad β-galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante <i>sdiA</i> <sup>-</sup> complementadas con pCA24N (control) o con <i>psdiA</i> .	87
<b>Figura 36.</b> Actividad β-galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante <i>sdiA</i> <sup>-</sup> complementadas con pCA24N (control) o con <i>psdiA</i> e inducida con IPTG.	88
<b>Figura 37.</b> Efecto de AHL en la conformación de SdiA.	97
<b>Figura 38</b> Mecanismo de transcripción de reguladores transcripcionales	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>3-oxo-C10-AHL</b>	<i>N</i> -3-oxo-decanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C12-AHL</b>	<i>N</i> -3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C6-AHL</b>	<i>N</i> -3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona
<b>3-oxo-C8-AHL</b>	<i>N</i> -3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona
<b>Acyl-PTA</b>	Proteína transportadora de acilos acilada
<b>AHL</b>	<i>N</i> -acil homoserina lactona
<b>AI</b>	Autoinductor
<b>C12-AHL</b>	<i>N</i> -dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C6-AHL</b>	<i>N</i> -hexanoil-L-homoserina lactona
<b>C8-AHL</b>	<i>N</i> -octanoil-L-homoserina lactona
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino-tetracético
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hydroxyetil)-1-piperazinetanosulfónico
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>QS</b>	Quorum sensing
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>NMR</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>TRIS</b>	trishidroximetilaminometano
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## RESUMEN

El mecanismo de comunicación en bacterias se conoce como “Quorum Sensing” (QS). Mediante este mecanismo de comunicación celular se regulan procesos fundamentales de la fisiología bacteriana. En la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* se identificó una proteína homóloga a los reguladores transcripcionales de tipo R pero no se encontraron moléculas de acil homoserina lactonas (AHLs) en los cultivos. Este regulador transcripcional, denominado SdiA, se asoció a la transcripción del operón *ftsQAZ*. Este transcrito da origen a las proteínas que forman parte de la maquinaria de división celular. Se postula que existe una relación entre QS y división celular, pero aún no se ha determinado el efecto que poseen las AHLs sobre la transcripción de estos genes y sobre el mecanismo de división celular.

Se investigó el sistema de QS en *E. coli*, específicamente el efecto de la unión de AHL a la proteína SdiA con el objeto de definir el mecanismo de unión del ligando a la proteína y de esta al DNA de modo de explicar el porque no se observan efectos en la división de la bacteria.

Se analizó el efecto de AHLs sobre la solubilidad de la proteína sobre-expresada. Se observó un aumento en la solubilidad de la proteína, pues incrementó la proteína en la fracción soluble. Para explicar como las AHLs influyen en la unión de SdiA a DNA, y determinar si la transcripción es mediada o facilitada por AHLs se caracterizó el efecto de AHL sobre la dimerización de la proteína. La inducción de un cambio conformacional asociado a la unión del

ligando y su posterior dimerización se evaluó midiendo la unión de AHL a la proteína SdiA, a través de apagamiento de fluorescencia. Los resultados muestran una afinidad en el rango nM, indicando que el apagamiento de la fluorescencia es debido a un cambio conformacional inducido por la unión de AHL que está probablemente asociado a la dimerización y a un cambio en el porcentaje de estructura secundaria. Por esta razón se evaluó el efecto de AHL sobre la estructura cuaternaria de la proteína y se determinó que la proteína en ausencia de AHL se encuentra principalmente como monómero y en presencia de AHL se inducen principalmente dímeros. Para identificar las regiones donde ocurre este cambio conformacional inducido por la dimerización en presencia del ligando, se hizo una cinética de intercambio isotópico. Se observó una significativa protección al intercambio tanto en el dominio N-terminal como en el dominio de unión a DNA.

Se observó una alta afinidad de unión, en el rango nM, de la proteína a la secuencia promotora *ftsQP2*, resultado que se confirmó mediante la visualización del complejo proteína-DNA a través de microscopía de fuerza atómica. No hubo efecto de AHL sobre la unión de SdiA al DNA. Para evaluar el efecto del sistema descrito sobre la transcripción del operón *ftsQAZ* se midió su expresión con el gen *lacZ*. Se observó un incremento en la transcripción cuando la proteína se sobre-expresaba en una cepa mutante para SdiA. Los resultados sugieren que la unión de AHL a SdiA induce la dimerización de SdiA, que como dímero activo se une a la región promotora *ftsQP2* en el DNA.



## ABSTRACT

Cell communication mechanism in bacteria is known as “Quorum Sensing” (QS) that depends on a small molecule of acyl-homoserine lactone (acyl-HSL). This mechanism regulates fundamental processes of bacterial physiology. In the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* a protein homologous to type R transcriptional regulators was identified, however acyl-HSL were not found in the cell culture. This transcriptional regulator, called SdiA, was associated to the transcription of *ftsQAZ* operon. This transcript gives origin to the proteins that form part of cell division mechanism in *E. coli*. A relationship between QS and cell division was postulated, but it has not been determined yet the effect that acyl-HSL has on the transcription of these genes and on the cell division mechanism.

Therefore the QS system in *E. coli* was investigated, specifically the effect of the binding of acyl-HSL to protein SdiA, in order to define the ligand binding mechanism and how this protein binds to DNA.

The effect of acyl-HSL on the solubility of the protein was analyzed. An increment of the solubility was observed in the soluble fraction. In order to explain this effect and how acyl-HSL influences the binding of SdiA to DNA the effect of acyl-HSL on protein dimerization was characterized. The results allowed to determine if the transcription was mediated or facilitated by acyl-HSL. The induction of a conformational change associated to the binding of the ligand and its later dimerization was determined measuring acyl-HSL binding to protein

SdiA, using intrinsic fluorescence quenching. These results showed that the affinity was in the nM range, indicating that fluorescence quenching is due to a change led by acyl-HSL binding that it is probably associated to dimerization and a change in the content of secondary structure. For this reason the effect of acyl-HSL on the quaternary structure of the protein was evaluated. The results showed that the protein in absence of acyl-HSL is mainly a monomer and in the presence of acyl-HSL the dimer was induced. To identify the protein regions involved in the conformational changes due to the dimerization induced by ligand binding, isotopic exchange kinetics was used. It was observed a significant protection to exchange in the N-terminal domain and in the DNA binding domain.

It was observed a high affinity binding, in the nM range, of the protein to promoter sequence *ftsQP2*, results that were confirmed by visualization through Atomic force microscopy. There was no effect of the acyl-HSL on the binding of SdiA to DNA. To evaluate the effect of the system described before on the transcription of *ftsQAZ* operon, its expression was measured with *lacZ* gene system. An increment in the transcription was observed when the protein was over-expressed in a SdiA null mutant.

The whole results suggest that the binding of acyl-HSL to SdiA led to the protein dimerization, converting it into the active dimer that is able to bind to *ftsQP2* sequence of DNA.

## 1. Introducción

La comunicación celular en organismos superiores y multicelulares, es imprescindible, pues cada una de las células debe cumplir con sus actividades y así funcionar en conjunto como un todo. Esto exige que las células posean un sistema de generación, transmisión, recepción y respuesta de diversas señales que las comuniquen e interrelacionen funcionalmente entre sí. Este intercambio de información les permite responder y adaptarse a condiciones adversas o favorables del medio en que se encuentran (Keller y Surette, 2006).

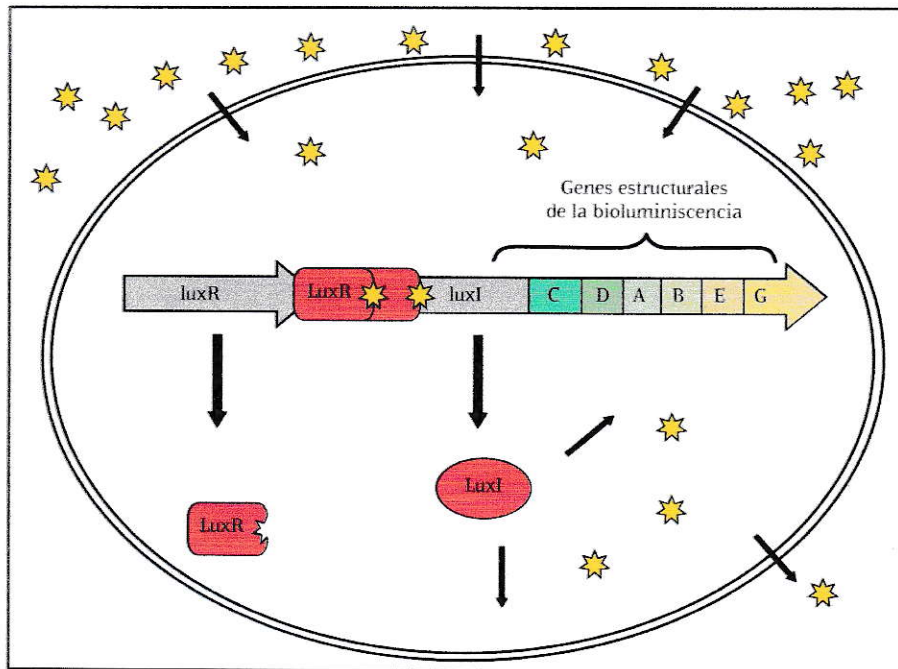
Hasta hace algunas décadas, se pensaba que organismos unicelulares procariontes, como las bacterias, vivían en forma independiente respondiendo sólo a estímulos físicos y químicos de origen ambiental. Hoy, se sabe que las bacterias se comunican entre sí mediante moléculas orgánicas, que actúan de manera similar a como lo hacen las hormonas en organismos superiores. La producción y posterior percepción de estas moléculas permite a las bacterias coordinar su comportamiento para así funcionar como un organismo multicelular (Bassler, 2002; Ng y Bassler, 2009). Este mecanismo de comunicación célula-célula se conoce como “quorum sensing” (QS) y se describió por primera vez en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Nealson y col., 1970). El sistema QS le permite a una sola bacteria obtener información acerca de la densidad celular de su entorno cercano mediante la síntesis de moléculas químicas denominadas autoinductores (AI), cuya concentración extracelular aumenta en

función del incremento en la densidad celular (Waters y Bassler, 2005). Cuando el nivel de AI alcanza una concentración umbral, la bacteria es capaz de censar y responder a dicha señal adaptando su expresión génica. Actualmente han sido descritos en un gran y creciente número de especies bacterianas sistemas de QS en los cuales la molécula AI controla múltiples y diversas funciones, tales como formación de biopelículas, secreción de factores de virulencia, bioluminiscencia, producción de antibióticos, esporulación y competencia (Miller y Bassler, 2001; Ng y Bassler, 2009).

En bacterias Gram-negativas, el sistema LuxI/LuxR de *V. fischeri* (figura 1) es considerado el paradigma en cuanto al control de la expresión génica en los sistemas de QS (Whitehead y col., 2001). Las bacterias Gram-positivas utilizan un mecanismo completamente diferente, el AI corresponde a un oligopéptido modificado que es exportado activamente mediante un transportador del tipo ABC al espacio extracelular y posteriormente es reconocido por un sistema de dos componentes que traduce la información vía una cascada de fosforilaciones (Waters y Bassler, 2005). Existe además, un sistema híbrido que es utilizado tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, en el cual AI, 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD) está involucrado en la comunicación interespecies (Chen y col., 2002).

Existen otras moléculas AI, proteínas reguladoras y diversos componentes moleculares que participan en la comunicación celular, no solo entre especies bacterianas, si no que también entre bacterias y eucariontes (Shiner y col.,

2005; Reading y Sperandio, 2006; Walters y Sperandio, 2006; Atkinson y Williams, 2009).



**Figura 1. Vía de regulación de la bioluminiscencia mediante el sistema de QS LuxI/R en *V. fischeri*.** En la figura se esquematiza el modelo de activación de la bioluminiscencia mediante el sistema de QS LuxI/R. La proteína *LuxI* sintetiza la molécula autoinductora (estrellas amarillas) y ésta difunde a través de la membrana celular. Una vez que alcanza su concentración umbral, biológicamente activa, ingresa nuevamente a la célula y se une al regulador transcripcional *LuxR*. Entonces, esta proteína reguladora, bajo la forma de dímero, se une al operón de la luciferasa y activa su transcripción.

## **1.1. QUORUM SENSING (QS) mediado por *N*-acil homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1 (AI-1)**

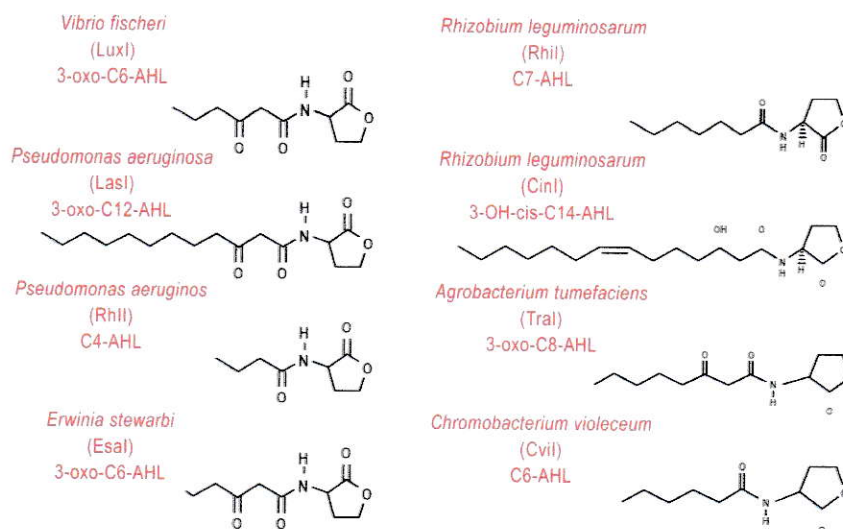
El sistema de QS más estudiado en bacterias Gram-negativas es de tipo 1. En él están involucradas dos familias de proteínas: la familia de proteínas R, compuesta por reguladores transcripcionales cuya actividad depende de AHLs y la familia de proteínas I, compuesta por sintasas de AHLs. Las AHLs son moléculas orgánicas pequeñas que se acumulan en el medio proporcionalmente al aumento de la densidad celular. Cuando se alcanza una concentración umbral de AHLs, éstas se unen a las proteínas R, que regulan la transcripción de genes blanco (Bassler, 2002; Gray y Garey, 2001). Ambas familias de proteínas poseen un origen temprano en la evolución y sus componentes han sido identificados tanto en el cromosoma como en elementos extracromosomicos (Gray y Garey, 2001).

### **1.1.1. Sintetasas de AHL y familia de proteínas I**

Las *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) derivan de 2 moléculas orgánicas, el *S*-adenosil metionina (SAM) y la cadena acilo de la proteína transportadora de acilo (acil-PTA). Ambos sustratos se encuentran normalmente en la célula y participan de la síntesis tanto de aminoácidos como de ácidos grasos (Fuqua y col., 1996; More y col., 1996). Estos sustratos se encuentran disponibles a bajas y altas densidades celulares, siendo sus concentraciones respectivas una limitante de la síntesis de AHLs. Las proteínas de la familia I catalizan la reacción de unión entre el grupo acilo de la acil-PTA y la metionina del SAM. El

mecanismo enzimático propuesto consiste en un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 de la cadena acilo de la acil-PTA por la amina del SAM, formando así el enlace amida. La posterior lactonización produce la molécula de AHL y un producto tóxico, metilthioadenosina (MTA) (Whitehead y col., 2001). En esta familia de proteínas el porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica es solo del 28 al 34%. A pesar de esta baja identidad de secuencia existen 2 regiones altamente conservadas. La primera corresponde al sitio activo de la catálisis situado en el extremo amino-terminal y la segunda, que corresponde al sitio de unión a acil-PTA que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal (Hanzelka y col., 1997).

La expresión heteróloga de proteínas I lleva a la síntesis de la homoserina lactona específica, sugiriendo que la diversidad estructural de las AHLs depende exclusivamente de la especificidad de la proteína I (Figura 2) (Fuqua C., 1999).



**Figura 2. AHLs producidas por diferentes bacterias Gram-negativas y su respectiva sintasa de AHL.** En la figura se presentan las AHLs producidas por 6 bacterias Gram-negativas, su sintasa y su estructura.

### 1.1.2. Estructura, transporte y acumulación de AHLs

Las AHLs son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se acumulan en el medio de crecimiento de un cultivo bacteriano. Debido a esto, son aisladas desde los sobrenadantes de cultivos de bacterias en la fase estacionaria de crecimiento mediante una extracción orgánica. La primera en ser purificada e identificada fue la 3-oxo-C6-AHL producida por *V. fischeri* (Eberhard, 1972; Kaplan y Greenberg, 1985). Como se muestra en la figura 2, la estructura química de las AHLs se puede dividir en dos partes. La primera consiste en un anillo invariable de homoserina lactona que es común para todas



las AHLs. La segunda está conformada por la cadena acilada que es responsable de la diversidad estructural de las AHLs y varía tanto en el largo (4-18 átomos de carbono), la sustitución del carbono 3 y la presencia de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada (Whitehead y col., 2001; Marketon y col., 2002; Gonzalez y Marketon, 2003). De acuerdo al paradigma del QS, las AHLs, debido a su naturaleza anfipática difunden libremente a través de la membrana citoplasmática en favor del gradiente de concentración. Como el modelo de QS inicialmente se definió para la bacteria *V. fischeri* que sintetiza una AHL de cadena corta (3-oxo-C6-AHL) se hizo necesario corroborar e investigar que sucedía con las AHLs con mayor número de carbonos y por lo tanto de mayor grado de hidrofobicidad. Se hicieron experimentos con moléculas autoinducoras marcadas radiactivamente y se comprobó que las AHLs de cadena corta como C4-AHL y 3-oxo-C6-AHL difunden pasivamente por la membrana de la célula igualando las concentraciones luego de un tiempo muy breve (Kaplan y Greenberg, 1985). En cambio, AHLs de cadena larga como 3-oxo-C12-AHL en *P. aeruginosa*, salen a través de bombas de eflujo activo (MexAB-OprM) (Pearson y col., 1999) y entran a la célula por difusión. Por esta razón, la concentración intra y extra celular del AI varía con respecto a la hidrofobicidad de la cadena acilada. Esto implica que entre más larga sea la cadena hidrocarbonada mayores serán la diferencias de concentración de AHLs dentro y fuera de la célula.

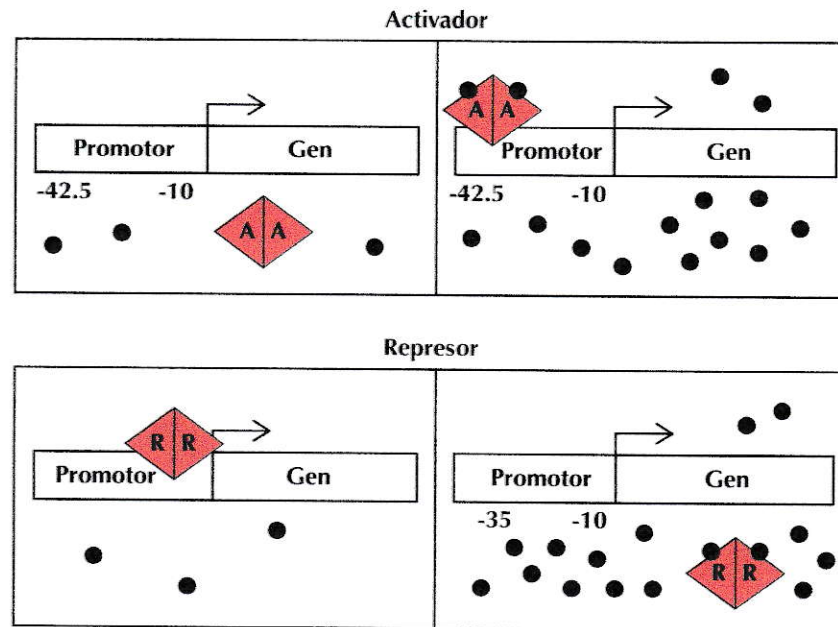
A pesar que los autoinductores difieren en su estructura y propiedades químicas, poseen un rol común que es unirse al regulador transcripcional y mediar la transcripción.

### **1.1.3. Regulador transcripcional y familia de proteínas R**

Los reguladores transcripcionales de la familia R comparten dos regiones estructurales altamente conservadas; **i) el dominio de unión a DNA en el extremo C-terminal del tipo hélice-vuelta-hélice (HVH):** esta formado por un paquete de cuatro  $\alpha$  hélices que forman el dominio de unión y **ii) el dominio de unión a AHL en el N-terminal:** consiste de un sándwich  $\alpha/\beta/\alpha$ . La hoja  $\beta$  central posee 5 hebras antiparalelas que conforman una superficie cóncava a la cual se une la AHL (Whitehead y col., 2001; González y Marketon, 2003). Comparaciones de secuencia de las proteínas R muestran solo un 18%-25% de identidad al considerar la secuencia aminoacídica completa. Sin embargo, la conservación es mucho mayor a nivel de dominios, 9 residuos son idénticos en al menos el 95% de las proteínas R, 6 de estos se encuentran en el dominio N-terminal y 3 en el dominio C-terminal (Patankar y González, 2009).

Las proteínas R pueden unirse a secuencias específicas de DNA denominadas cajas tipo *lux*. Estas cajas corresponden a secuencias invertidas repetidas de 18 a 22 pares de bases (pb) (Fuqua y Winans., 1996; Zhu y Winans, 2001). El mecanismo a través del cual los distintos miembros de la familia R regulan la transcripción de sus genes blanco varía en cada sistema, es

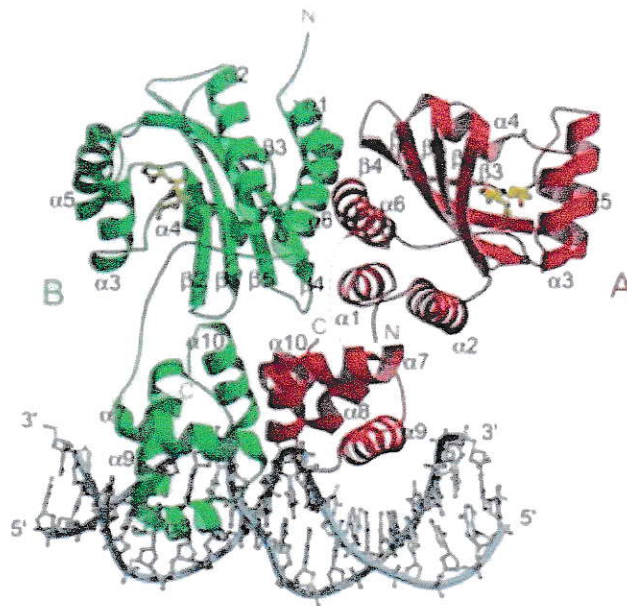
decir, la naturaleza de la interacción proteína-DNA determina si el regulador funciona como un activador o un represor de la transcripción (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismo de transcripción de los reguladores transcripcionales de QS. A; Activador transcripcional, R; Represor transcripcional.**

En la mayoría de los sistemas de QS la proteína R es un activador transcripcional, es decir, que en presencia de su AHL específica es capaz de reconocer y unirse a las cajas tipo *lux* reclutando así a la RNA polimerasa y activando la transcripción. La unión de la molécula de AHL a la proteína R, de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio cholerae* y *P. aeruginosa* permite la dimerización del regulador y la posterior interacción de este dímero

con el DNA (figura 4) (Fuqua y Winans, 1996; Zhu y Winans, 2001; Vannini y col., 2002, Bottomley y col., 2007; De Silva y col., 2007; Nasser y Reverchon, 2007; White y Winans, 2007). También existen reportes de proteínas R que funcionan como represores, pues pueden unirse a la región promotora en ausencia de AHLs y la posterior unión del ligando causa un cambio conformacional que libera al represor del DNA permitiendo así la transcripción, como es el caso de EsaR de *E. stewartii* o ExpR<sub>Ecc</sub> de *Erwinia carotovora* (Andersson y col., 2000; Watson y col., 2002).



**Figura 4. Complejo ternario de TraR, de *A. tumefaciens*.** La proteína se encuentra unida en forma de dímero a la secuencia palindrómica de DNA denominada *caja tra*, A y B corresponden a cada monómero (A y B) de la proteína unida a una molécula de 3-oxo-C8-AHL. Tomado de Vannini y col., 2002.

La especificidad de la señal es atribuida al hecho que las proteínas tipo R requieren la presencia de AHL para su plegamiento (Urbanowski y col., 2004; Zhu y Winans, 2001). En el caso de la bacteria patógena de plantas *A. tumefaciens*, su regulador transcripcional, la proteína TraR, en ausencia de su ligando no se encuentra correctamente plegada y es rápidamente degradada (Zhu y Winans, 2001). Además la cristalización de esta proteína permitió identificar los residuos involucrados en la unión de la AHL. Se determinó que aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos forman un bolsillo de unión a AHL que no permite el contacto con el solvente, favoreciendo una unión muy fuerte entre TraR y 3-oxo-C8-AHL (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002). La misma organización entre ligando y proteína presenta SdiA, un homólogo a TraR en *E. coli* y Las R en *P. aeruginosa*, respectivamente (Yao y col., 2006; Bottomley y col., 2007). Diferente es lo que ocurre en *V. fischeri* donde la unión entre 3-oxo-C6-AHL y LuxR, no es tan fuerte, sugiriendo la existencia de un mecanismo regulatorio intrínseco para la unión de la señal (Urbanowski y col., 2004; Koch y col., 2005).

## **1.2. Reguladores transcripcionales huérfanos**

A medida que el número de genomas de bacterias secuenciados crece, aumenta también el número de homólogos de LuxR. Muchos de estos reguladores no se encuentran asociados a una sintasa de AHL y es por esto que se denominan reguladores huérfanos. Estos reguladores conservan el mismo porcentaje de identidad de secuencia que los otros miembros de la

familia de proteínas R (Patankar y González, 2009). TrIR en *A. tumefaciens* conserva la capacidad de unir AHL pero no se une a DNA, QscR en *P. aeruginosa* es capaz de responder a múltiples AHLs de cadena larga, CarR de las especies *Erwinia* y *Serratia* participa en la producción de antibióticos, BisR en *Rhizobium leguminosarum* participa en la conjugación, entre otros (Patankar y Gonzalez, 2009). Un caso especial de este tipo de reguladores es la proteína SdiA de *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* y *E. coli*, que a diferencia de las otras bacterias antes mencionadas, no poseen otros homólogos a LuxR, ni tampoco la sintasa de AHL. Alineamiento de secuencia de SdiA de ambas bacterias, indica que estas proteínas no se agrupan con los otros homólogos de enterobacterias, si no que se encuentran más cercanos en un árbol filogenético a RhlR de *P. aeruginosa*, lo que sugiere que existió una transferencia horizontal de genes desde *Pseudomonas* a estas bacterias (Gray y Garey, 2001). El rol de SdiA en *S. enterica* se encuentra mejor caracterizado que en *E. coli*, se sabe que regula la transcripción del gen *srgE* que participa en la colonización del huésped, específicamente en la unión de la bacteria a células epiteliales. En *E. coli* no se entiende aún cual es el rol de este regulador en la fisiología bacteriana, algunas aproximaciones muestran que podría estar involucrado en la transcripción de genes de la división celular (Wang y col., 1991).

### **1.3. División celular en *E. coli* y QS.**

Debido a que el QS es un mecanismo que tiene directa relación con el



número de individuos de una población, parece relevante preguntarse si existe alguna relación entre el QS y el proceso de división celular.

Estudios de la división celular en la bacteria *E. coli* sugieren que tal relación entre QS y división celular, al menos en este microorganismo podría existir. Efectivamente, se identificó una proteína que, por un lado, regula la expresión de algunos genes que participan en la división celular y por otro lado, es homóloga a los reguladores transcripcionales del tipo R. Esta proteína se denominó SdiA (Supresor division inhibition) (Wang y col., 1991). No obstante y aunque SdiA haya sido identificada, no existen evidencia que relacione directamente el QS con la división de la célula. Por este motivo indagar a nivel molecular y fisiológico si esta relación QS-división celular existe, resulta muy interesante.

En *E. coli*, la división de la bacteria por fisión binaria simétrica se logra por medio de una invaginación de la membrana citoplásmica, del peptidoglicano y la membrana externa en la mitad longitudinal de la célula madre. En el inicio de este proceso tiene un papel esencial la proteína FtsZ, y más tarde intervienen otras proteínas Fts (Filamentous temperature sensitive), las cuales son proteínas que conforman la maquinaria de división celular funcional denominada *divisoma* (Rothfield y Justice, 1997). La proteína FtsZ es la primera en posicionarse en el lugar de la septación. Ésta genera un anillo, que se fija a la cara interna de la membrana celular por medio de las proteínas ZipA y FtsA (protoanillo), al cual se unen posteriormente y en orden secuencial FtsEX, FtsK, FtsQ, FtsB-FtsL, FtsW, FtsI, FtsN para formar el divisoma, que contrae las

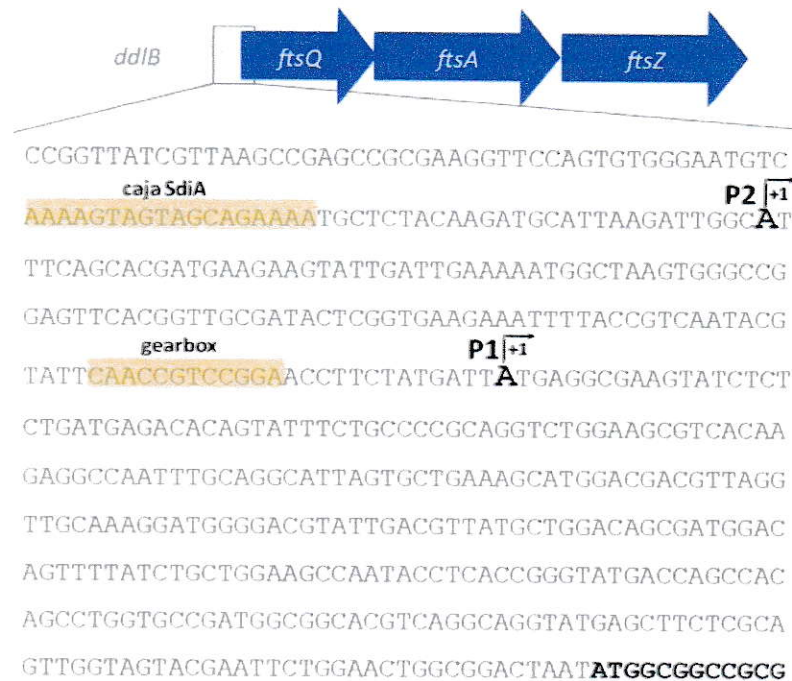
membranas y la pared bacteriana permitiendo la división (Romberg y Levin, 2003). Todas estas proteínas están codificadas por un conjunto de genes que conforma el “cluster” *dcw* (division and cell wall). Dentro de este “cluster”, el operón *ftsQAZ* es el más estudiado. Existen al menos 6 promotores asociados a la transcripción del gen *ftsZ*. De éstos, el promotor *ftsQP2* es responsable de la transcripción del 46% del total de *ftsZ*. Este promotor se transcribe de manera constitutiva y además posee secuencias repetidas invertidas del tipo caja *lux*. Se demostró que a esta secuencia se une la proteína SdiA por lo que se denominó caja *sdiA* (Yamamoto y col., 2001). Como se mencionó anteriormente, los sistemas QS del tipo 1 poseen tres componentes principales; la sintasa de AHL, la AHL y el regulador transcripcional. En *E. coli* solo se identificó la proteína SdiA homóloga a los reguladores transcripcionales de tipo R. El análisis del genoma de esta bacteria reveló que no posee ningún gen que codifica para la sintasa de AHL, lo cual se correlaciona con el hecho que no produce moléculas autoinductoras del tipo AHL.

**Podemos preguntarnos: ¿Por qué el sistema QS en esta bacteria se encuentra incompleto?** Puede ser que *E. coli* responda a AHLs provenientes de otras bacterias de su entorno o simplemente que la proteína SdiA no forme parte del sistema QS del tipo 1 presente en la mayoría de las bacterias Gram-negativas y sea solo un regulador transcripcional que no está asociado al fenómeno de comunicación celular.



#### 1.4. SdiA

Al sobreexpresar la proteína SdiA se induce la formación de mini células, fenotipo también observado cuando se sobreexpresa FtsZ (Ward y Lutkenhaus, 1985). Sin embargo, una bacteria que no expresa la proteína SdiA (mutante nula) no posee defectos visibles en la división celular (no se observa formación de mini-células ni de filamentos) (Wang y col., 1991). El estudio del efecto de la proteína SdiA sobre la transcripción de genes involucrados en el proceso de división celular se ha abordado mediante diferentes metodologías. Se caracterizó mediante experimentos *in vitro* la interacción de SdiA con secuencias específicas de DNA. Estudios de retardo en gel y "footprinting" comprobaron que SdiA recluta a la RNA polimerasa, aumentando la transcripción desde el promotor del operón *ftsQAZ* (Yamamoto y col., 2001). La proteína SdiA interacciona específicamente con el promotor *ftsQP2* y no con *ftsQP1*, que corresponde a una clase distinta de promotores, denominados "gearbox" e independientes de la tasa de crecimiento de la bacteria (Figura 5)



**Figura 5. Región promotora del operón *ftsQAZ*.** Río arriba del inicio de la transcripción del gen *ftsQ* (texto destacado), se encuentran las 2 secuencias promotoras *ftsQP2* (P2) y *ftsQP1* (P1) las cuales poseen secuencias de reconocimiento específicas denominadas caja SdiA y “gearbox”, respectivamente.

Estudios genéticos revelaron que SdiA es capaz de aumentar la transcripción del operón *ftsQAZ* desde el promotor *ftsQP2* entre 5-13 veces (Wang y col., 1991). También se analizó el efecto de las AHLs sobre su transcripción mediante fusiones transcripcionales acopladas a un gen reportero. Se observó que algunas AHLs aumentan la transcripción del operón *ftsQAZ* pero esta inducción no fue significativa (Sitnikov y col., 1996). Otro estudio realizado el mismo año reveló que la transcripción del operón *ftsQAZ* disminuye en presencia de un medio condicionado y no se ve afectada por la adición de

oxo-C6-AHL (Garcia-Lara y col., 1996). Se repitió el experimento para dilucidar el efecto de las AHLs sobre los niveles de transcripción de genes cuya expresión es regulada por SdiA. No se observaron diferencias significativas en la transcripción del operón *ftsQAZ* desde el promotor *ftsQP2* en presencia de AHLs. Solo se observó el efecto de AHLs sobre un gen de virulencia de *Salmonella sp.* indicando que en esta bacteria y para este gen la proteína SdiA actúa como un activador transcripcional (Michael y col., 2001).

Al igual que las otras proteínas reguladoras del QS, SdiA posee dos dominios funcionales. El dominio C-terminal que contiene un sitio predicho HVH involucrado en la unión a DNA y un dominio N-terminal que une AHL. Al sobreexpresar el dominio N-terminal (residuos 1-171), se forman agregados de proteínas insolubles. Mediante dicroísmo circular (CD) y fluorescencia se caracterizaron estos agregados y se determinó que corresponden a estructuras del tipo glóbulo fundido. Al adicionar C8-AHL durante la expresión, una gran proporción del dominio N-terminal de la proteína se expresa en estado soluble (Yao y col., 2006). El mismo efecto tienen otras AHLs (C6-AHL y oxo-C8-AHL) lo que apoya la idea que *E. coli* podría responder a señales de tipo AHLs producidas por varias bacterias diferentes de su entorno.

Para determinar la estructura del complejo proteína-AHL y determinar la especificidad de la proteína por la molécula autoinductora, se resolvió la estructura tridimensional del dominio N-terminal con C8-AHL, mediante resonancia magnética nuclear (NMR) (Yao y col., 2006). Los resultados indican que la AHL se encuentra en un bolsillo hidrofóbico sin contacto con el solvente y

los datos de NMR complementan esta información indicando que casi no existen interacciones entre la proteína y la AHL, a diferencia de lo que ocurre en TraR (Yao y col., 2006). Ambos resultados podrían explicar la capacidad que tiene la proteína SdiA de unir más de un tipo de AHLs, pues no existiría un contacto específico entre la proteína y la molécula orgánica. De hecho, varios autores plantean que la función de SdiA es detectar señales del tipo AHL provenientes de otras especies bacterianas, ya que la bacteria no sintetiza AHLs (Hughes y cols, 2010).

Aunque existen indicios del efecto de AHLs en la transcripción de genes involucrados en la división celular, no hay experimentos hasta la fecha que se hayan dedicado a estudiar la conexión entre el complejo binario AHL/SdiA y algún fenotipo división celular en *E. coli*. Es importante preguntarse ¿Cuál es el efecto específico de las AHLs y el mecanismo de respuesta intracelular del QS en la división celular?

Para responder estas interrogantes, se propuso caracterizar en esta Tesis la dependencia de AHL en la unión de SdiA a DNA, de modo de determinar si la transcripción es mediada o facilitada por AHLs. En el esquema 1 se muestran los 2 posibles caminos de la unión del regulador SdiA a la secuencia *ftsQP2* del operón *ftsQAZ*.



## 2. Hipótesis

“Las AHLs regulan el estado de oligomerización *in vivo* de la proteína SdiA, permitiendo así la unión al promotor *ftsQP2*. Por ende, la comunicación celular mediada por AHLs podría regular la división celular en *E. coli*”

### 2.1. Objetivo general

Determinar, por un lado, el estado de oligomerización de SdiA en solución a distintas concentraciones de proteína y la dependencia de la unión de SdiA a la secuencia promotora *ftsQP2* del operón *ftsQAZ* con diferentes AHLs, y por otro lado si el complejo SdiA/AHL tiene un efecto en la división celular en *E. coli*.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Sobre-expresar, purificar y caracterizar estructuralmente la proteína SdiA de *E. coli*.
- 2) Caracterizar a nivel estructural y funcional el complejo binario [SdiA/AHL]
- 3) Caracterizar *in vivo* el efecto del complejo binario [SdiA/AHL] sobre la división celular en *E. coli*.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Reactivos

Las sales, reactivos líquidos y compuestos orgánicos en general se adquirieron de Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA), de Merck (Darmstadt, Alemania), de Fluka Chemie (Buchs, Suiza), de Winkler (Santiago, Chile), de USBiological (Swampscott, Massachusetts, USA), de AppliChem (Darmstadt, Alemania), de TCL (Santiago, Chile) y de Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA). Las enzimas de restricción, los marcadores de peso molecular de DNA de escala 100 pb y 1kb, y la enzima DNA Ligasa T4 se adquirieron en New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). La enzima polimerasa de DNA *Taq* y los partidores diseñados en este trabajo se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, California, USA) y en Integrated DNA Technologies, IDT, (Coralville, IA, EEUU). La enzima polimerasa de DNA *Pfu* se obtuvo en Stratagene (California, USA). Los desoxirribonucleótidos trifosfato se compraron en Omega Bio-Tek (USA). El cóctel de inhibidores de proteasas fue adquirido de ROCHE Chile Ltda. (Santiago, Chile). Las membranas de nitrocelulosa para ensayos de Western blot y las cubetas para electroporación se adquirieron de BioRad Laboratorios Inc. (Hércules, California, USA). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-histidina se adquirió de Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo secundario, contra ratón, conjugado con peroxidasa se compró en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA).

## **3.2. Medios de cultivo**

### **3.2.1. Medio LB**

Para un litro de medio LB se agregó 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y se ajustó el pH a 7,5 con hidróxido de sodio 10 N. Cuando se necesitó, el medio se suplementó con ampicilina 100 µg/mL, Cloranfenicol 50 µg/mL y/o kanamicina 50 µg/mL.

### **3.2.2. Placas de agar-LB**

Al medio líquido LB se le agregó agar al 1,5%. Cuando se necesitó, el medio se suplementó con ampicilina 100 µg/mL, Cloranfenicol 50 µg/mL y/o kanamicina 50 µg/mL.

### **3.2.3. Medio Mínimo M9**

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

### **3.2.4. Medio M9 suplementado**

El medio M9 se suplementó con  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 g/mL, casaminoácidos 1 mg/mL y glucosa 0,2% p/v.

### **3.2.5. Cepas y plasmidios**

Se utilizó la cepa de cepa de *E. coli* JW 1901 de la colección ASKA(-) para sobre-expresar la proteína SdiA (Kitagawa y col.,2005). También se utilizó la cepa silvestre de *E. coli* K12 MG 1655 y la cepa JW 1801 de la colección KEIO,



que corresponde a una mutante nula para *sdiA* (Kitagawa y col.,2005). Para generar las fusiones traduccionales se utilizó un plásmido derivado de pACYC184, *pmceC'*-*lacZ*.

### 3.2.6. Partidores y oligonucleótidos de hebra doble

En la tabla 1 se describen los partidores utilizados para la construcción de las fusiones traduccionales.

**Tabla 1.** Partidores utilizados para las reacciones de PCR y secuenciación.

Partidor	Secuencia 5'->3'	Descripción
ftsQ-Fus-F	TTTTTTTTTGGCCGGCCCGGTTATCGTTAAGCCG AG	Partidor para amplificar la región promotora de <i>ftsQ</i> , en base a secuencia genómica MG1655 de <i>E. coli</i> . Agrega una cola <i>FseI</i> para su clonamiento en <i>pmceC'</i> - <i>lacZ</i>
ftsQ-Fus-R	TTTTTTTTTCCGGCCGCCCATATTAGTCCGCCAGTTC CAGAATTC	Partidor para amplificar la región promotora de <i>ftsQ</i> , en base a secuencia genómica MG1655 de <i>E. coli</i> . Agrega una cola <i>NotI</i> para su clonamiento en <i>pmceC'</i> - <i>lacZ</i>
lacZ-check-R	CCGCGAGGCGGTTTTCTCC	Partidor para verificar la fusión entre <i>lacZ</i> y un gen de interés. Diseñado en base a <i>lacZ</i> del vector pPelican.
del-P2ftsQ-R	Phos-CCCACACTGGAACCTTCGCG	Partidor para deletar el promotor (P2) +cajaSdiA. Fosforilado.
del-P2ftsQ-F	GGGCCGGAGTTCACGGTTG	Partidor para deletar el promotor (P2) +cajaSdiA
del-P1ftsQ-R	Phos-CAACCGTGA ACTCCGGCCC	Partidor para deletar el promotor(P1) + "gearbox". Fosforilado.
del-P2ftsQ-F	CCGCAGGTCTGGAAGCGTCA	Partidor para deletar el promotor(P1) + "gearbox".
delP2-XhoI-forw	TTTTTTTTTCTCGACGGCCGGAGTTCACGGTTG	Partidor para deletar el promotor (P2), con sitio XhoI
delP2-XhoI-rev	TTTTTTTTTCTCGACCACTGGAACCTTCGCGGCTC	Partidor para deletar el promotor (P2), con sitio XhoI

En la tabla 2 se describen los partidores utilizados para la construcción de los fragmentos de DNA utilizados en los experimentos de AFM.

**Tabla 2.** Partidores utilizados en este trabajo para las reacciones de PCR

Partidor	Secuencia 5'->3'
AFM1F	AAAAGGCCTGAGCGATAAGC
AFM1R	AGGTATTGGCTTCCAGCAGA
AFM2F	TGATGGGCTTGCCTTATACC
AFM2R	GCAAATTGGCCTCTTGTGAC

En la tabla 3 se describen los oligonucleótidos de doble hebra (dsDNA) utilizados en los experimentos de espectroscopia.

**Tabla 3.** DNA de hebra doble utilizados en los experimentos de dicroísmo circular y de anisotropía de fluorescencia

	Secuencia 5'->3'
ftsQ-P1	ATACGTATTCAACCGTCCGGAACCTTCTATGATTATGA TATGCATAAGTTGGCAGGCCTTGAAGATACTAATACT
ftsQ-P2	TGTGGGAATGTCAAAGTAGTAGCAGAAAATGCTCTAC ACACCCTTACAGTTTTTCATCATCGTCTTTTACGAGATG
ftsQ-P1-F	<u>/5-FAM/ATACGTATTCAACCGTCCGGAACCTTCTATGATTATGA</u> TATGCATAAGTTGGCAGGCCTTGAAGATACTAATACT
ftsQ-P2-F	<u>/5-FAM/TGTGGGAATGTCAAAGTAGTAGCAGAAAATGCTCTAC</u> ACACCCTTACAGTTTTTCATCATCGTCTTTTACGAGATG

\*Subrayados se encuentra la caja *sdiA*

### **3.1. Técnicas de biología molecular**

Los procedimientos de biología molecular no detallados, como el aislamiento de ADN genómico y plasmidial, la preparación de células electrocompetentes, transformación mediante electroporación, digestión con enzimas de restricción, PCR se realizaron utilizando métodos estandarizados (Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 1992).

#### **3.1.1. Generación de fusiones traduccionales**

Las fusiones traduccionales entre el gen reportero *lacZ* y la región promotora del operón *ftsQAZ* se generaron por PCR amplificado del DNA genómico de *E. coli* con partidores específicos. Los partidores utilizados (tabla 1) agregaron los sitios de restricción *FseI* y *NotI* al amplificado lo que permitió su posterior ligación al vector previamente digerido con las mismas enzimas. Los productos de PCR se ligaron en el vector *pmceC-lacZ*, se transformaron en la cepa *E. coli* TOP10 F y se seleccionaron las colonias azules en placas de LB con Cm (50 µg/mL) y X-gal (40 µg/mL). Se confirmó la presencia del inserto esperado por PCR de colonia. Se seleccionaron 3 clones y los plasmidios se denominaron pXMAS1, pXMAS2, pXMAS3. Además se amplificó la fusión generada y se clonó en el vector PACYC177 que tiene resistencia a ampicilina. Este plasmidio se denominó pXMASamp. Para la construcción de las fusiones traduccionales de delección se utilizó la metodología de PCR inverso (Sharma y col., 2007). Los detalles de la construcción de las fusiones se detallan en los

resultados. Todos los plasmidios generados en la tesis se secuenciaron en Macrogen (Maryland, USA).

### 3.1.2. Ensayo Miller

Las cepas bacterianas se crecieron toda la noche a 37 °C. Luego se dejaron en hielo durante 20 min y se midió la densidad óptica a 600 nm. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo y se centrifugaron a 7.000 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y los precipitados se congelaron a -80 ° C. Para medir, las muestras se diluyeron 1:2 con amortiguador Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1mM, pH 7,0 y β-mercaptoetanol 50 mM agregado al momento de usar). Las células se permeabilizaron con 20 µL de CHCl<sub>3</sub> y 20 µL de SDS al 0,1% agitando vigorosamente en vórtex durante 15 s. Se incubó a 30 °C durante 5 min y se agregó 0,2 mL del sustrato orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) 4 mg/mL. Al cabo de un tiempo t, la reacción se detuvo agregando 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M. Se centrifugaron las células y se transfirió el sobrenadante a una cubeta para medir la absorbancia a 420 nm (Miller, 1972).

La actividad β-galactosidasa se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Unidades de Miller} = 1000 \times A_{420} / T \times V \times DO_{600}$$

## **3.2. Purificación de la proteína**

### **3.2.1. Sobre-expresión de SdiA**

Para la sobre-expresión de SdiA se tomó una colonia de la cepa de *E. coli* JW 1901 desde una placa de selección y se inoculó en medio LB suplementado con cloranfenicol (50 µg/mL), se creció durante toda la noche con agitación constante a 37°C. Con este cultivo se inocularon 2 litros de medio LB (1/100) suplementado con cloranfenicol a la misma concentración y se creció con agitación constante a 37 °C. Una vez alcanzada una DO<sub>600</sub> aproximada de 0,6, se le adicionó IPTG 1 mM para inducir la sobre-expresión de la proteína y se creció por 2 h con agitación constante a 37 °C. El cultivo se centrifugó a 5.000 x g por 40 minutos y las células se suspendieron en amortiguador TEN a 4 °C (TRIS-HCl 50 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM; NaCl 100 mM). Este procedimiento se repitió dos veces para eliminar el medio LB de las células. Los precipitados celulares se guardaron a -80°C para su posterior uso.

### **3.2.2. Purificación de SdiA**

El precipitado celular inducido proveniente de 2 litros de cultivo se descongeló en hielo y se suspendió mediante agitación con amortiguador A (HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,4); NaCl 0,5 M; Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> 10 mM) suplementado con 2 pastillas de coctel inhibidor de proteasas, en un volumen final de 50 mL. Se sonicó en un vaso precipitado con pulsos de 20 s con una salida de valor 6 (48 watts), con pausas de 1 minuto, para evitar el sobrecalentamiento. El

procedimiento se repitió 5 veces (misonix Sonicator 3000). Luego de sonicar, el lisado se ultracentrifugó (Rotor T-880) a 28000 rpm (92.000 g) por 90 min a 4 °C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se mezcló con 4 mL de la resina quelante de níquel probond (Invitrogen) previamente equilibrada en amortiguador A. Se incubó con agitación durante 30-60 minutos a 4 °C. Se empacó la columna con la resina a 4 °C utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 1mL/min. Se lavó la resina con 3 volúmenes de columna y luego se aplicó un gradiente de imidazol entre 50-500 mM. Se colectaron las fracciones y se hizo una electroforesis de proteína para determinar en que fracciones se encontraba la proteína pura. Se juntaron las fracciones de proteína y se dializó contra el amortiguador de diálisis (HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,4); NaCl 0,5 M; Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> 10 mM, Sacarosa 1M). Para eliminar agregados insolubles se centrifugó a 28.000 g por 30 min.

### **3.2.3. Cuantificación de SdiA**

Se determinó la concentración de SdiA a partir de su valor de absorbancia a 280 nm. El valor del coeficiente de extinción molar de la proteína se calculó de acuerdo a su composición de aminoácidos (Pace y col., 1995). La concentración de proteína también se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce).

### **3.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

Los análisis de SDS-PAGE se hicieron según Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó acrilamida al 12,5 % en el gel separador y 4 % en el concentrador. Las muestras se disolvieron en una solución de carga, se incubaron a 95 °C por 5 min y se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis se hizo a un amperaje constante de 60 mA durante una hora. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar un western blot.

### **3.2.5. Western blot**

La transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se hizo mediante electrotransferencia en amortiguador de transferencia. Para esto se utilizó un voltaje constante de 100 V y un amperaje variable máximo de 400 mA durante 90 minutos a -20 °C. Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas adheridas se bloquearon durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo. Se incubaron con el anticuerpo primario en un volumen de 5 mL de solución de bloqueo, durante 2 horas en agitación a 37 °C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos en agitación con TBS. Se incubó con el anticuerpo secundario en una solución de bloqueo por 1 hora con agitación a 37 °C y se repitieron los 3 lavados con TBS. Se reveló mediante quimioluminiscencia, por lo que se utilizó una preparación de electroquimioluminiscencia casero (25 µL solución 1 de ácido cumárico 90 mM y 50 µL solución 2 de Luminol 250 mM, ambas en DMSO)

más 5  $\mu$ L peróxido de hidrogeno. También se utilizó el método de revelado en la membrana con el reactivo 4-cloro-naftol (4CN).

### **3.3. Técnicas espectroscópicas**

#### **3.3.1. Fluorescencia intrínseca de SdiA**

La proteína se caracterizó mediante espectroscopia de fluorescencia, midiendo la emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano a 350 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50. En cada experimento el espectro se midió 5 veces utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm y una velocidad de barrido de 200 nm/min.

#### **3.3.2. Apagamiento de fluorescencia**

Se determinó la unión de AHL a la proteína SdiA mediante apagamiento de fluorescencia en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50, titulando la proteína con distintas concentraciones de ligando. Se graficó el cambio en la intensidad de fluorescencia versus la concentración de AHLs. Como control se utilizó una solución de triptófano.

#### **3.3.3. Anisotropía de fluorescencia**

Para determinar la constante de unión entre la proteína SdiA y el DNA se utilizaron fragmentos de DNA de 40 bp marcados con la sonda 5-FAM (5-carboxi-fluoresceína). Los fragmentos utilizados corresponden a *ftsQP1* y *ftsQP2* (Tabla 3).



### **3.3.4. Dicroísmo circular de SdiA**

El porcentaje de estructura secundaria se determinó mediante dicroísmo circular (CD) en un espectropolarímetro Jasco 600 y en un Jasco 815 con una celda de 1 mm de paso óptico. Las muestras y el amortiguador se midieron 5 veces utilizando una velocidad de barrido de 20 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y 2 segundos de tiempo de respuesta. Las medidas de CD se tomaron entre 200-260 nm.

### **3.3.5. Dicroísmo circular de ácidos nucleicos**

Para estos experimentos se hizo un barrido en el UV cercano (230-320 nm) que es donde absorbe el DNA. Se determinó la elipticidad a 280 nm del DNA que contiene la secuencia específica ftsQ-P2 a distintas concentraciones de SdiA en ausencia o presencia de AHL. Se utilizó como control la secuencia inespecífica ftsQ-P1 (Tabla3).

## **3.4. Intercambio isotópico**

Los experimentos de intercambio de hidrógeno/deuterio se hicieron con la proteína SdiA diluida 10 veces en el amortiguador deuterado a temperatura ambiente. La proteína se incubó en presencia y ausencia de AHL y se determinó la cinética de intercambio entre 30 segundos y 6 horas. La reacción de intercambio se detuvo con la adición de ácido fórmico al 1% (pH 2,5) e inmediatamente las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se

almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Para cuantificar la incorporación de deuterio en la proteína las muestras se digirieron durante 2 minutos con pepsina ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) en hielo. Las muestras digeridas se separaron mediante una columna C4 (Michrom BioResources, Inc.). Los  $20\text{ }\mu\text{L}$  del “loop” de inyección, la columna C4 y todo el sistema se sumergió en hielo para minimizar el intercambio reverso. Los péptidos digeridos se eluyeron de la columna C4 con un gradiente 5%–95% de acetonitrilo ( $50\text{ mL/min}$ , con 0,1% de ácido fórmico). El análisis de masa se realizó en un equipo (LTQ)-FT ICR (LTQ-FT, Thermo Finnigan, San Jose CA.). El número de deuterios incorporados se calculó determinando el centro de la distribución isotópica. Los péptidos se identificaron mediante una espectrometría de masa en tandem (MS/MS). El nivel de incorporación de deuterio se determinó calculando el centroide de la distribución isotópica para cada péptido utilizando el programa H/D desktop (Pascal y col., 2007). Las gráficas de intercambio se construyeron graficando el número de deuterios incorporados versus el tiempo. Los gráficos se ajustaron a la siguiente ecuación de 3 exponenciales con el programa Sigma- Plot (Systat, San Jose, CA, USA) (Englander and Kallenbach, 1983):

$$D = N - A * \exp(-k_1 t) - B * \exp(-k_2 t) - C * \exp(-k_3 t)$$

Donde D es el número de deuterios incorporados al tiempo t y N es el número total de protones que intercambian en el experimento (se calculó restando el n-terminal y el número de prolinas al largo total del péptidos y multiplicandolo por 90% que es el porcentaje de deuterio en solución). A, B y C corresponden al

número de sitios de intercambio que se observa que intercambian a una velocidad  $k_1$  (rápida,  $>1,0 \text{ min}^{-1}$ ),  $k_2$  (intermedia,  $0,01-1,0 \text{ min}^{-1}$ ), o  $k_3$  (lento,  $<0,01 \text{ min}^{-1}$ ), respectivamente.

### **3.5. Espectrometría de masa**

Ionización “electrospray” acoplado al analizador de masa “time of flight” (ESI-TOF) se hizo en HHMI Mass Spectrometry Laboratory Lab, University of California, Berkeley.

### **3.6. Microscopia de fuerza atómica (AFM)**

#### **3.6.1. Modo de contacto**

En el modo de contacto la punta se mantiene siempre en contacto con la superficie de la muestra. Las principales fuerzas que actúan en este modo de funcionamiento son de tipo repulsivo. El modo de contacto permite obtener imágenes de la superficie de la muestra a resolución atómica, aunque puede dar lugar a la destrucción de la muestra, debido a la fricción que la punta realiza sobre la misma. El rango de fuerzas habitual en este modo de trabajo se sitúa entre  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-6}$  N.

#### **3.6.2. Modo de no contacto**

En el modo de no contacto la palanca oscila sin que la punta llegue a tocar nunca la superficie de la muestra. La imagen es obtenida mediante la medida de las deflexión de la palanca, debida a las variaciones detectadas entre las

fuerzas atractivas y repulsivas ejercidas sobre la misma. La fuerza aplicada sobre la muestra en este caso es de  $1 \times 10^{-12}$  N.

### **3.6.3. Modo de contacto intermitente**

En el modo de contacto intermitente (o modo de "Tapping") la punta entra en contacto con la superficie de la muestra de manera intermitente debido a la oscilación de la palanca. Cuando la punta y la muestra entran en contacto, la fuerza aplicada por la punta resulta en una variación de la frecuencia de resonancia de la palanca y de la amplitud de vibración de la misma. Este efecto produce una reacción del sistema de retroalimentación, que da lugar al movimiento del piezoeléctrico. La resolución obtenida con el modo de contacto intermitente es inferior a la que se obtiene con el modo de contacto, aunque se evita la destrucción de la muestra debido a la importante reducción de las fuerzas de fricción entre la punta y la superficie de la muestra.

### **3.6.4. Adquisición de imágenes**

Para la preparación de la muestra entre 2-10 nM de DNA (los fragmentos se amplificaron por PCR con los partidores especificados en la tabla 2) y 20-100 nM de SdiA se depositaron en la mica ultra limpia (Grade V, Ted Pella, Inc.) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. La mica se lavó con agua nanopura y luego se secó con un flujo perpendicular de  $N_2$ . Las medidas de AFM se hicieron con un Multimode AFM Nanoscope V (Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA) equipado con un escaner tipo E (10 micrones x

10 micrones x 2,5 micrones rango vertical). Las imágenes se obtuvieron en modo “tapping” utilizando un “cantilever” (Nanosensors) con alta frecuencia de resonancia (260-410 kHz) y una constante elástica (k) de 46 N/m. Las imágenes se capturaron con un tamaño de escáner de 1  $\mu\text{m}$ , a una velocidad de 1,9 Hz. La amplitud de la imagen del cantilever se mantuvo con la retroalimentación del circuito. Todas las muestras se midieron a temperatura ambiente y con una humedad relativa del 35%.

### **3.6.5. Análisis de imágenes**

El procesamiento de imágenes y el análisis de datos se hizo utilizando Matlab (The MathWorks, Natick, MA), con el programa ALEX (Rivetti y col., 1996, Rivetti y Codeluppi, 2001).

### **3.7. Ultracentrifugación analítica (AUC)**

Los experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación, se hicieron en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A. La absorbancia de las celdas de la muestra se midieron como función de la posición radial a 280 nm con intervalos de 0,002 cm. Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a una velocidad angular de 40.000 rpm. Las muestras de proteína (380  $\mu\text{L}$ ) se cargaron en celdas de doble sector (double sector Epon charcoal-filled centerpiece). Los experimentos de equilibrio de sedimentación fueron realizados a diferentes velocidades angulares entre 24-48 horas hasta alcanzar las condiciones de equilibrio. Las muestras de

proteína (110  $\mu$ L) se cargaron en celdas de doble sector. Los datos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación se analizaron utilizando el programa SedFit (Schuck, 1998) y HeteroAnalysis (Cole, 2004), respectivamente. Para ambos experimentos se utilizó la proteína SdiA a diferentes concentraciones en ausencia y presencia de AHL.

### **3.8. Análisis bioinformáticos**

#### **3.8.1. Modelamiento SdiA**

La estructura de TraR, de *A. tumefaciens* (1h0m) (Vannini y col., 2002), obtenida del banco de datos de proteínas (PDB), se utilizó como templatado estructural para construir un modelo 3D de la proteína SdiA, con el programa Modeller v6.2 (Sánchez y Sali, 1997). El modelo se evaluó con los programas PROSAIL (Sippl, 1993) y Verify3D ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/)).

#### **3.8.2. “Docking” molecular**

Se utilizó la estructura cristalina del dominio N-terminal de SdiA de *E. coli* (2avx PDB) para hacer el “docking” con los ligandos de AHL (C6-HSL, C8-HSL, oxo-C12-HSL y oxo-C6-HSL). Se usó MGLTools v1.5 en el proceso de configuración de archivos y “autodock” v4.0 para hacer el “docking” (Morris y col., 1998). La Visualización de los resultados del “docking” se hizo mediante AutoDockTools de MGLTools y también mediante LigandScout v2.0 .

### 3.9. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

La proteína SdiA purificada se caracterizó mediante cromatografía analítica de exclusión molecular. Se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex S75 (GE Healthcare) que posee un rango de fraccionamiento de 3-70 kDa para proteínas globulares. La proteína se eluyó mediante FPLC (Fast protein liquid chromatography) con amortiguador A (HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,4); NaCl 0,5 M; Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> 10 mM) a un flujo de 0,5 mL/min. El desarrollo del cromatograma se siguió registrando la absorbancia a 280 nm. Se utilizaron como estándares de masa molecular: vitamina B12, mioglobina y ovoalbúmina. Para calcular el volumen muerto ( $V_0$ ) se utilizó tiroglobulina (670 kDa). El coeficiente de distribución  $K_d$  se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por Irvine (2002):

$$K_d = (V_R - V_0) / (V_C - V_0)$$

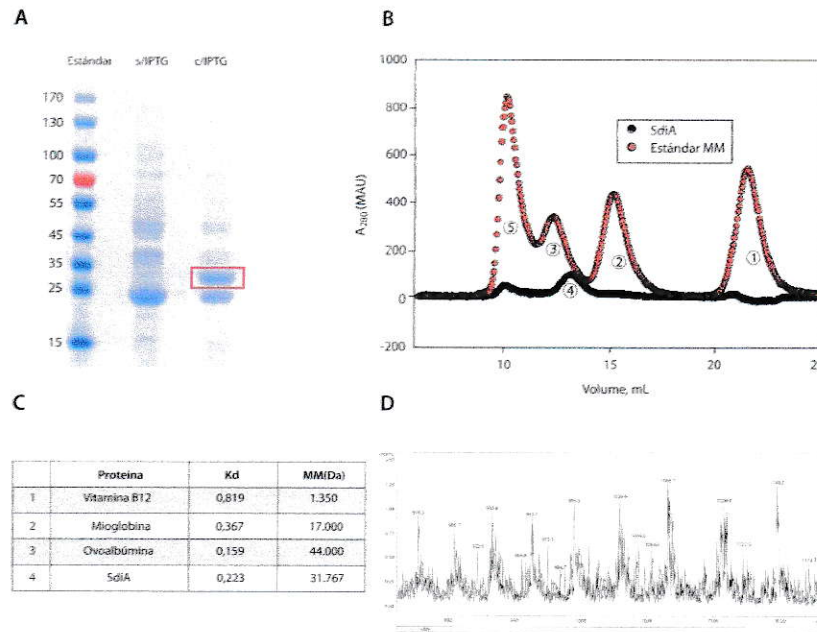
## 4. Resultados

### 4.1. Sobre-expresión y purificación SdiA

Para obtener la proteína SdiA se utilizó la cepa de *E. coli* JW 1901 de la colección ASKA(-). Esta cepa contiene un plasmido derivado del pCA24N donde se clonó el gen *sdiA/uvrX* (Kitagawa y col.,2005). Este gen se encuentra bajo el control del promotor T5, el cual es reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* y cuya expresión es inducida por IPTG.

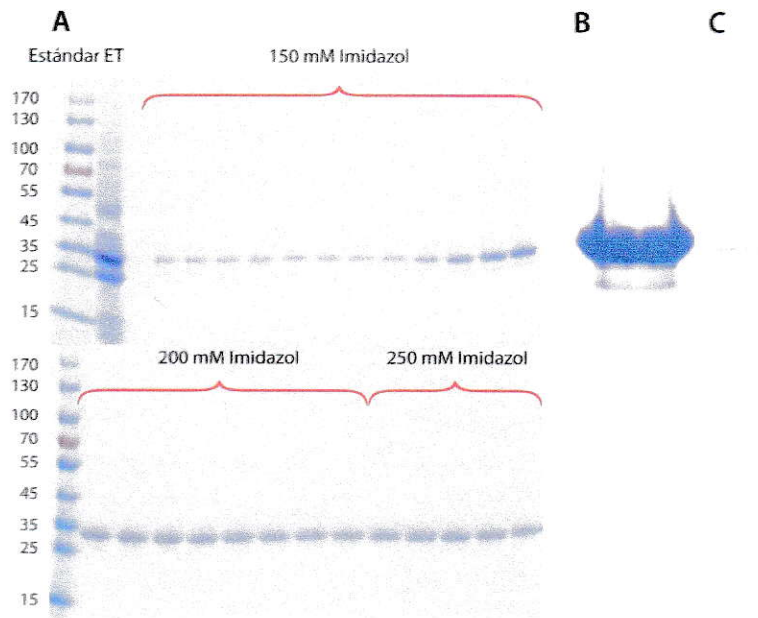
La proteína contiene seis residuos de histidina en el extremo N-terminal y también contiene aminoácidos (aa) extras en los extremos N y C-terminal. La secuencia corresponderá entonces a la de la proteína (indicada en rojo) más los residuos extras (6xHisThrAspProAlaLeuArgAla**SdiA**GlyLeuCysGlyArg). El gen *sdiA* codifica para una proteína de 240 aa (28.116 Da). La masa molecular sumada a los residuos extra que posee el vector de expresión, es de 30.151 Da, que corresponde al tamaño observado en un gel SDS-PAGE (figura 6A) y en una cromatografía de exclusión molecular (figura 6B y 6C). Se analizó además, la proteína mediante espectrometría de masa (ESI-TOF) y la masa obtenida corresponde a 29.842 Da (figura 6D), que son 304 Da menos que el tamaño calculado teóricamente, lo que podría explicarse por la pérdida de dos residuos de histidina durante el proceso de purificación.





**Figura 6. Sobre-expresión e identificación SdiA.** **A)** Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del extracto total de la cepa JW 1901. Se muestran los estándares de masa molecular (MM) de proteína (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas), y los extractos totales sin IPTG y con IPTG. **B)** Cromatografía de exclusión molecular. Se utilizaron como estándares vitamina B12 (1), mioglobina (2) y ovoalbúmina (3). El volumen muerto ( $V_0$ ) se calculó con tiroglobulina (5). La proteína SdiA (4) muestra un máximo de elución a los 13,2 mL. **C)** Cálculo del coeficiente de distribución (Kd) y la masa molecular de SdiA. **D)** Espectro de masa (ESI-TOF).

La proteína se separó del resto de las proteínas de la fracción soluble aprovechando que posee un grupo de histidinas en el extremo N-terminal, mediante una cromatografía de afinidad a níquel (figura 7A).



**Figura 7. Purificación de SdiA.** A) Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las distintas fracciones eluidas con imidazol, durante la purificación de SdiA, desde una columna de afinidad a níquel. Se muestran los estándares de masa molecular de proteína (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas), el extracto total (ET), y las fracciones eluidas con 150, 200 y 250 mM de imidazol. B) Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Se muestra la proteína SdiA purificada después de la diálisis (ver Materiales y Métodos. C) Western blot contra la proteína SdiA purificada.

Se tomaron las fracciones que se muestran en la figura 7A y se concentraron mediante diálisis utilizando un amortiguador con sacarosa. Se obtuvo una concentración de proteína de entre 2-4 mg/mL con una pureza del 95% y la proteína se identificó por western blot con un anticuerpo anti-Histag (figura 7C).

## 4.2. Caracterización de SdiA

Una vez que se tuvo la proteína SdiA purificada se procedió a su caracterización fisicoquímica. Primero se calculó su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de acuerdo a lo descrito en Pace y col., 1995. Se calculó el  $\epsilon$  teórico ( $42.770 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) de acuerdo al número de residuos aromáticos de la proteína y en base a la relación de absorbancias de la proteína nativa y denaturada, se calculó el  $\epsilon$  nativo.

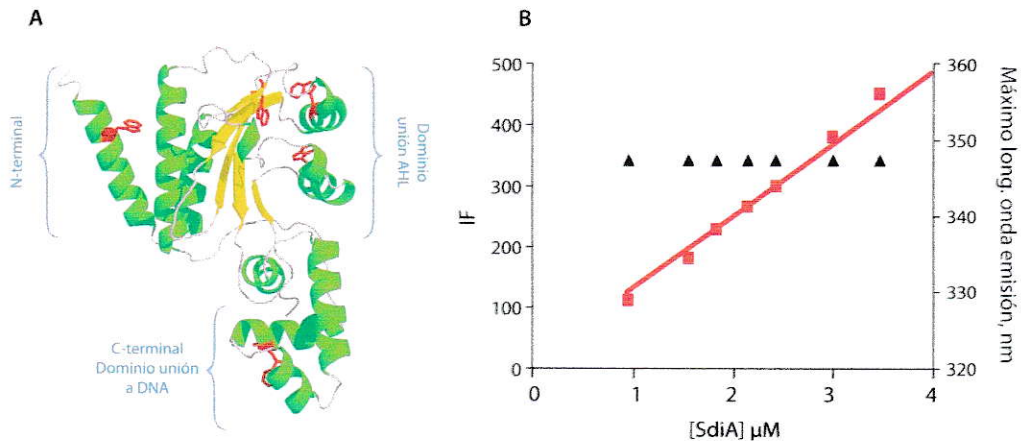
$$\epsilon \text{ nativo} = \epsilon \text{ teórico} * A_{\text{nativa}}/A_{\text{denaturada}}$$

Las  $A_{280}$  debe encontrarse entre 0,2-0,6 para hacer el cálculo. Se obtuvo un valor de  $36.956 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Con este valor se determinó la concentración de la proteína purificada en cada purificación y se comparó con los valores obtenidos por el método de Bradford, encontrándose concordancia entre ambos valores.

### 4.2.1. Fluorescencia intrínseca de SdiA

SdiA posee cinco triptófanos en su estructura, los que se encuentran distribuidos de acuerdo al modelo de estructura construido (ver Materiales y Métodos), como se muestra en la figura 8A. Se muestra en rojo los 5 residuos de triptófano de los cuales 3 se encuentran en el sitio de unión a AHL, 1 en el extremo N-terminal y otro en la hélice de unión a DNA. Los triptófanos de la proteína se excitaron con una longitud de onda de 295 nm de modo de no excitar a los otros aminoácidos aromáticos, específicamente la tirosina. En la figura 8B se observa como incrementa la intensidad de emisión de

fluorescencia (345 nm) a medida que aumenta la concentración de proteína, sin embargo el máximo de longitud de onda de emisión no se ve afectado. Las medidas se hicieron a temperatura controlada de 30 ° C.



**Figura 8. Fluorescencia Intrínseca de SdiA** A) Modelo 3D de SdiA, se muestran destacado en rojo los triptófanos. B) Gráfico de intensidad de fluorescencia intrínseca de SdiA (emisión de triptófano) versus la concentración de proteína. Los cuadrados rojos corresponden al valor de intensidad de fluorescencia (IF). En el eje secundario se muestra el máximo en la intensidad de fluorescencia, triángulos negros.

#### 4.2.2. Dicroísmo circular y determinación de la estructura secundaria de SdiA

Para determinar el porcentaje de estructura secundaria de la proteína se utilizó la técnica de dicroísmo circular. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta lejano (180 a 250 nm) de

la radiación electromagnética. Los espectros en el ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces peptídicos que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. Las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$ , giros y otros tipos estructurales).

Se tomaron espectros de la proteína SdiA en el UV lejano utilizando una cubeta de 1 mm de paso óptico y una concentración de proteína de 0,2-0,4 mg/mL. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. El cálculo de estructura secundaria se hizo con el programa K2D2 (Perez-Iratxeta y Andrade-Navarro, 2008). Para esto se transformaron los valores de elipticidad  $\theta$  a elipticidad molar  $[\theta]$ , corrigiendo por el paso óptico, la concentración de proteína y el peso molecular. Los valores de estructura secundaria se muestran en la tabla 4, donde se comparan los valores calculados experimentalmente que corresponden a la proteína en ausencia de AHL con los del modelo 3D de la proteína, los de la estructura de TraR que se encuentra cristalizada (pdb 1I3I-A) y también los de la estructura del dominio N-terminal de SdiA (pdb 2avx) que se encuentra resuelto por NMR (todos resueltos con el ligando unido a la proteína). Al comparar los valores se observa una disminución del contenido de estructura helicoidal y un aumento de estructura de hoja beta cuando la proteína se encuentra sin el ligando.

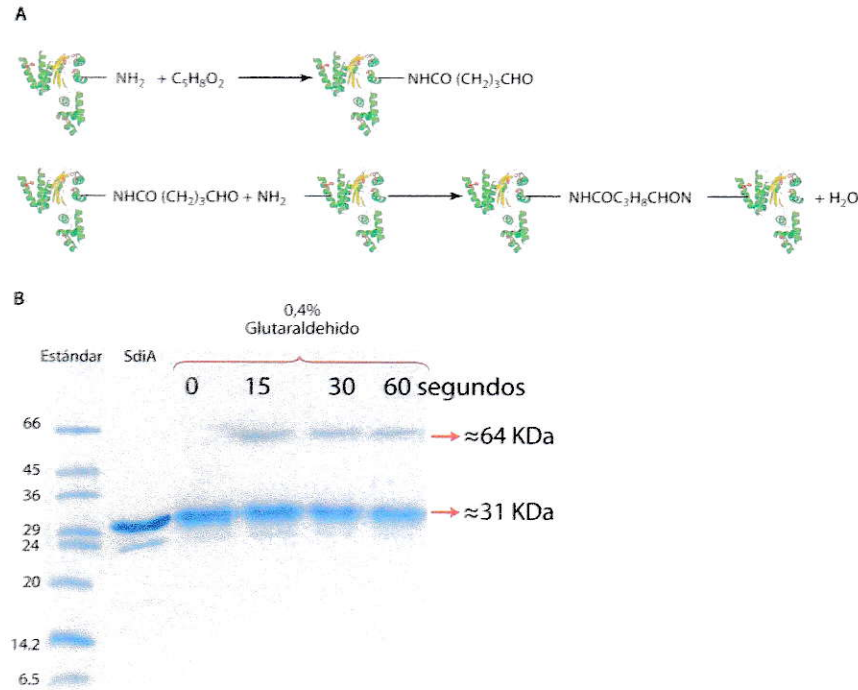
**Tabla 4** Valores del porcentaje de estructura secundaria de SdiA

	con AHL			sin AHL
% estructura secundaria	TraR (1I3I-A)	N-terminal SdiA (2avx)	Modelo SdiA (esta tesis)	Datos experimentales
Hélice alfa	54,8	45,5	54,2	36
Hoja beta	13	19	14	26
Aleatoria	23	39	15,8	38

#### **4.2.3. Estado de oligomerización de SdiA**

Para determinar si la proteína SdiA forma dímeros, ya que está descrito que estos reguladores transcripcionales de QS se unen en forma de dímero al DNA (Fuqua y Winans, 1996; Vannini y col., 2002; Nasser y Reverchon, 2007; White y Winans, 2007), se hizo un entrecruzamiento químico de SdiA con glutaraldehído al 25% (0,2% final) a distintos tiempos. El glutaraldehído es un agente entrecruzante homobifuncional que reacciona con aminas primarias en proteínas (figura 9A). Si dos proteínas interactúan, al agregar glutaraldehído, van a quedar covalentemente unidas. El complejo así formado se puede observar en un gel SDS-PAGE. En la figura 9B se observa una banda aproximadamente en 64 kDa que aparece a los 15 segundos de reacción, que correspondería a un dímero de la proteína. En ausencia de glutaraldehído y a tiempo 0 segundos, sólo se observa la proteína como monómero. Se observa que la fracción de dímero es menor a la de monómero a los diferentes tiempos

de reacción de entrecruzamiento. Esto nos dice que existe una mezcla de ambas especies en solución.



**Figura 9. Entrecruzamiento químico de SdiA con glutaraldehido.**

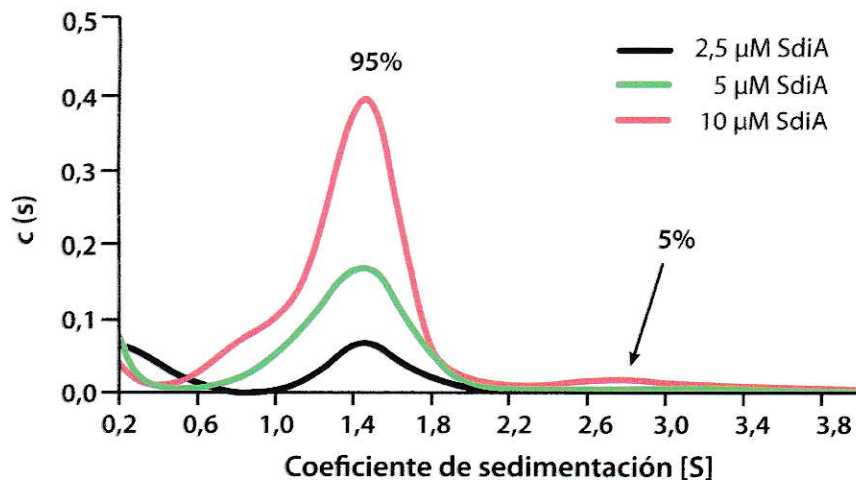
**A)** Esquema de la reacción de entrecruzamiento entre SdiA y el glutaraldehido.

**B)** Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Se muestra el estándar SDS-7 (Sigma) y la proteína SdiA y la reacción de entrecruzamiento a distintos tiempos (0, 15, 30 y 60 segundos).

La técnica de entrecruzamiento químico sólo nos permite detectar la presencia del dímero pero no nos permite cuantificar el equilibrio entre las especies en solución. Por este motivo y para cuantificar el número de especies en solución utilizamos la técnica de ultracentrifugación analítica. Específicamente realizamos un experimento de velocidad de sedimentación, en

el cual las macromoléculas se someten a un campo gravitacional elevado tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. Este es un método hidrodinámico de transporte que permite fraccionar las macromoléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación (que es una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular). Para los experimentos de velocidad de sedimentación se utilizó la proteína SdiA en amortiguador A, previo a cargar las celdas la proteína se centrifugó para eliminar los agregados y se determinó nuevamente su concentración. Las concentraciones de proteína utilizadas fueron 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  y la velocidad fue de 40.000 rpm, el experimento se hizo a 4°C. Para analizar los resultados se utilizó el programa SedFit, en el cual se ajustaron los parámetros de densidad (1,15 g/mL) y viscosidad ( $8,905 \times 10^{-3}$  poise) del amortiguador utilizado y luego los datos se ajustaron a un modelo de distribución continua  $c(s)$  (la distribución  $c(s)$  es una variante de la ecuación de Lamm que utiliza el programa Sedfit). Los resultados del ajuste muestran la probabilidad de distribución versus el coeficiente de sedimentación [S] (figura 10).





**Figura 10. Velocidad de sedimentación SdiA.** Se muestra en la figura la probabilidad de distribución  $c(s)$  versus el coeficiente de sedimentación  $[S]$ . La concentración de SdiA utilizada fue de 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . El experimento se hizo en amortiguador A a 4  $^{\circ}\text{C}$  y a 40.000 rpm durante 4 horas en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A

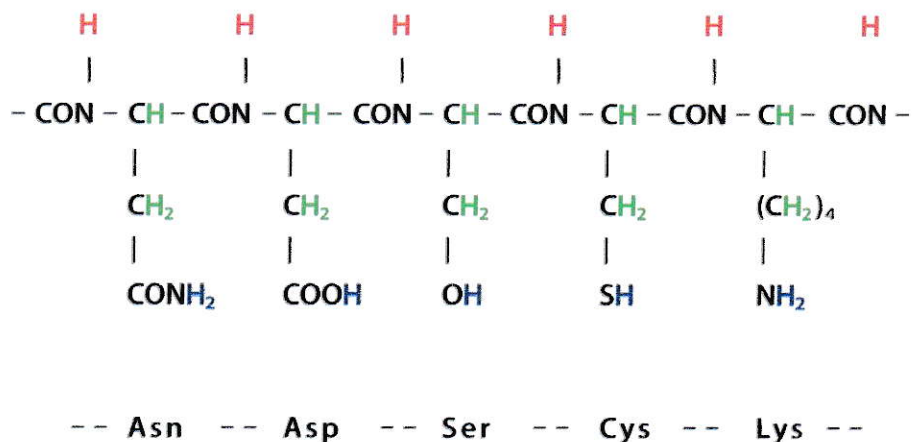
Se observa para todas las concentraciones de proteína una especie con un coeficiente de sedimentación de 1,4 S que correspondería al monómero de la proteína. También aparece una segunda especie en solución a 10  $\mu\text{M}$  de 2,8 S que correspondería al dímero de SdiA. La proporción de dímero a esta concentración correspondería solo a un 5% y la del monómero a un 95%.

#### **4.2.4. Validación del modelo bioinformático mediante intercambio isotópico acoplado a espectrometría de masas**

El intercambio de hidrógeno combinado con espectrometría de masas es una metodología que permite analizar proteínas y aprender sobre su estructura y dinámica. Algunos átomos de hidrógeno en las proteínas se intercambian con

los hidrógenos del solvente que les rodea. Si ahora utilizamos en el solvente un isótopo del hidrógeno, como el deuterio, podemos medir la incorporación de éste a la proteína por un cambio en la masa. Este cambio en la masa de la proteína se puede medir utilizando espectrometría de masa de alta resolución. El intercambio ocurre a velocidades específicas que dependen de la estructura de la proteína y su accesibilidad al solvente. Es por esto que al medir las velocidades de intercambio se pueden sacar conclusiones con respecto a la dinámica y la estructura de las proteínas.

Existen 3 tipos de hidrógenos en las proteínas (figura 11), los hidrógenos unidos covalentemente al carbono que no intercambian, los hidrógenos  $-NH$  del enlace peptídico que intercambian a velocidades muy rápidas y por lo tanto no pueden ser detectados y finalmente los que nos interesan que son los hidrógenos de las amidas que intercambian a velocidades intermedias y que además están involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno en los elementos de estructura secundaria, por lo tanto su intercambio nos dará información sobre la estructura y estabilidad de la proteína.

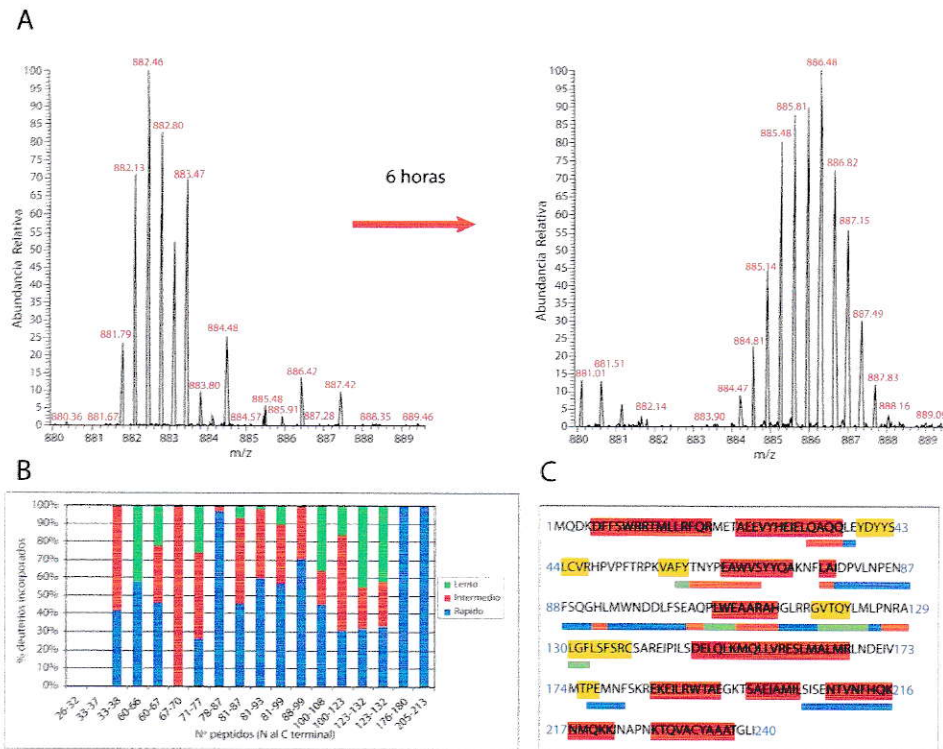


**Figura 11. Tipos de hidrógenos en una proteína.** Se muestra un péptido de 5 aa donde se destaca en verde los hidrógenos unidos covalentemente a los carbonos, en azul los hidrógenos del grupo R y en rojo los hidrógenos del grupo amida.

Para evaluar el modelo bioinformático y determinar si las zonas con cierta estructura eran correctas, se hicieron cinéticas de intercambio de la proteína SdiA (figura 12A). Antes de efectuar el intercambio se secuenció la proteína mediante espectrometría de masa en tandem (MS-MS). Con esto se identificaron péptidos que correspondieron a una cobertura cercana al 80% de la proteína y se asignó un número de péptidos a una señal en el espectro de masa. Para los experimentos de intercambio se utilizó la proteína SdiA a una concentración de 9  $\mu\text{M}$  en amortiguador deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Se alcanzó un porcentaje máximo de deuteración de 75%. La reacción se llevó a cabo a distintos tiempos (15 s, 45 s, 2,5 min, 8 min, 25 min, 75 min y 6 horas) y fue detenida bajando la temperatura y el pH con ácido fórmico al 0,1% final. La incorporación de deuterio en cada tiempo se determinó en un espectrómetro de masa y se graficó el número de deuterios incorporados versus el tiempo.

Cada señal en el espectro de masas corresponde a un péptido identificado en la proteína, como se observa en la figura 12A, donde existe la incorporación de 4 deuterios a las 6 horas de intercambio. En la figura 12B se muestra un resumen de los péptidos identificados mediante intercambio isotópico en la proteína. Con esta gráfica podemos relacionar la información del intercambio con la información de la estructura y así podemos evaluar el modelo bioinformático (figura 12C). Por ejemplo, los péptidos que tienen un mayor porcentaje de intercambio rápido (barras azules) corresponden a zonas de menor estructura y que se encuentran expuestas al solvente (péptidos 78-87, 176-180 y 205-213), el caso contrario se observa en los péptidos que no intercambian o intercambian a velocidades muy bajas (péptidos 26-32, 33-37) que corresponden a zonas estructuradas, principalmente hélices alfa.

Una vez caracterizada la proteína SdiA, analizamos el efecto del ligando sobre su conformación y estado de agregación. Como se mencionó en la introducción la unión de AHL a su bolsillo de unión induciría un cambio conformacional en la proteína que le permite exponer el dominio de unión a DNA. Este cambio conformacional no ha sido identificado a nivel estructural.



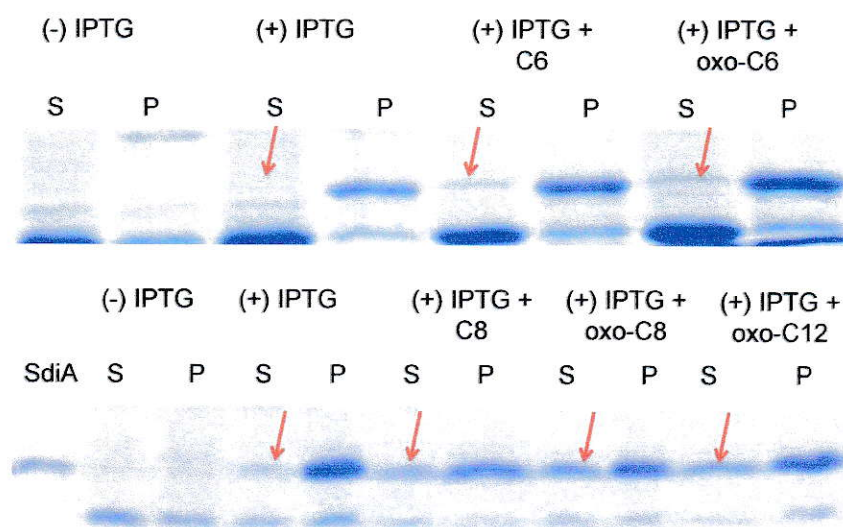
**Figura 12. Intercambio isotópico acoplado a espectrometría de masas.**

**A)** Se muestra un espectro de masas de un péptido de SdiA (aa 100-122) a tiempo cero y a las 6 horas de iniciado el intercambio. Se observa un corrimiento promedio de 4 Da. **B)** Velocidades de intercambio de H/D en las distintas regiones de SdiA. Cada barra representa las contribuciones relativas de los tres componentes rápido (azul), intermedios (rojo) y lento (verde). **C)** Secuencia aminoacídica de la proteína SdiA donde se destaca en rojo las estructuras del tipo hélice alfa predichas en el modelo y en amarillo las estructuras beta. Las barras verdes, rojas y azules corresponden a los hidrogenos en su respectivos péptidos que intercambian lento, intermedio y rápido.

### 4.3. Efecto de AHL sobre la estructura de SdiA

#### 4.3.1. Efecto de AHLs sobre la solubilidad de SdiA *in vivo*

Para evaluar el efecto de las AHLs en la sobreexpresión del regulador transcripcional SdiA se incluyó en el medio de cultivo diferentes moléculas de AHLs de distinto largo de cadena acilada (figura 13). Al momento de inducir la expresión de la proteína con IPTG se adicionó también AHL a una concentración de 400  $\mu$ M. Se rompieron las células mediante sonicación y luego se separó la fracción soluble del precipitado.



**Figura 13. Efecto AHLs sobre la solubilidad de SdiA *in vivo*.** Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Se muestra en el gel la zona donde aparece la banda de proteína. Se señala en flecha roja la fracción soluble. S corresponde a la fracción soluble y P al precipitado después de la ultracentrifugación (ver Materiales y Métodos). SdiA corresponde a la proteína purificada.

Se utilizaron AHLs de distinto largo de cadena (C6-AHL, oxo-C6-AHL, C8-AHL, oxo-C8-AHL y oxo-C12-AHL) y en todos los casos se observó un aumento en la solubilidad de la proteína, pues incrementó la proteína en la fracción soluble en comparación con la inducción (+IPTG) en ausencia de AHL. Este mismo efecto de las AHLs se había observado antes con el dominio N-terminal de SdiA (Yao y col., 2006). El aumento en la solubilidad es similar para las 5 AHLs utilizadas, incluso para la molécula  $\gamma$ -butirolactona que sólo posee el anillo lactona y carece de la cadena acilada que le otorga especificidad al sistema de QS en otras bacterias (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002). Debido a que la especificidad de unión esta dada por el contacto directo que tienen aminoácidos en la proteína con la cadena acilo de las AHLs se evaluó mediante un “docking” molecular la naturaleza de la unión de las distintas AHLs en el bolsillo de unión de SdiA.

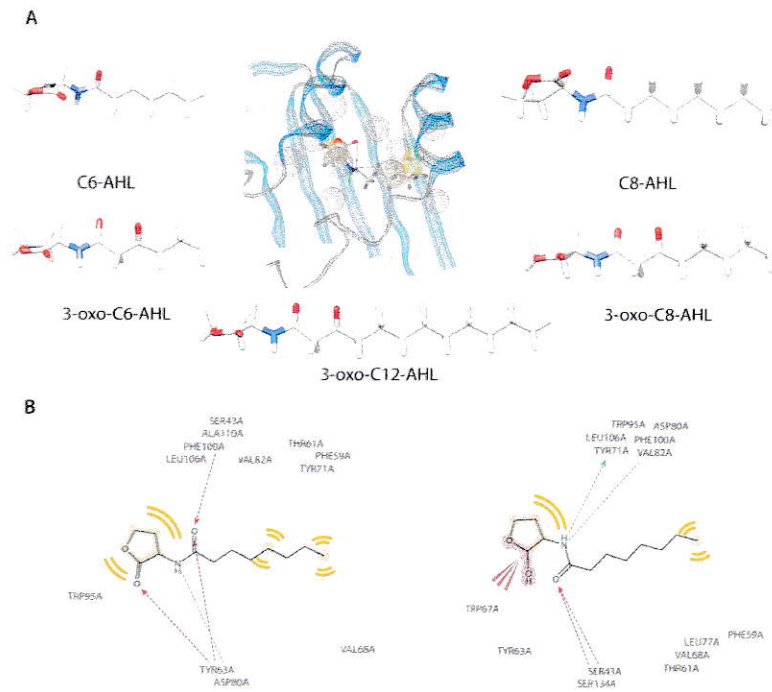
#### **4.3.2. “Docking” molecular de SdiA con AHLs**

Para corroborar estos resultados “*in vivo*” se hizo un “docking” molecular de las distintas AHLs con el dominio amino terminal de la proteína con el objetivo de evaluar como son las interacciones entre los aminoácidos del bolsillo de unión de SdiA y las AHLs que poseen distinto largo de cadena, que fluctúan entre 6 y 12 átomos de carbono, y además tienen o no una sustitución de un grupo cetona en el carbono 3. Se utilizó la estructura NMR de SdiA de *E. coli* (2avx PDB) para realizar el “docking” con las 5 diferentes AHLs. (figura 14A). Las interacciones entre el ligando y el sitio activo se visualizaron con la

herramienta AutoDockTools de MGLTools y también mediante LigandScout v2.0 (figura 14B).

Se observó que los contactos entre la proteína y las moléculas son principalmente en la parte común de la molécula orgánica (anillo lactona) y no en la cadena acilada. Además predominan las interacciones del tipo hidrofóbica sobre las del tipo electrostático como se muestra en la figura 14B. Todas las moléculas utilizadas interactúan favorablemente con la proteína (energías de unión) pero la molécula 3-oxo-C12-AHL que es la de cadena más larga es la que mejor interactúa, luego vienen ambas moléculas de 8 átomos de carbono 3-oxo-C8-AHL y C8-AHL y finalmente 3-oxo-C6-AHL y C6-AHL. Esto indica que a pesar que todas las moléculas son capaces de unirse a SdiA, esta tiene una preferencia por el largo de cadena pero no por la sustitución del carbono 3.



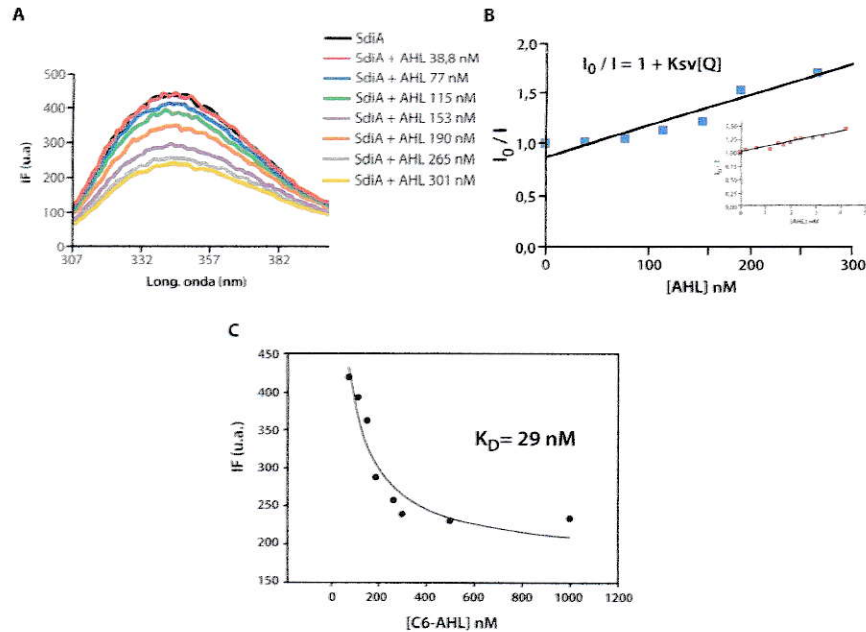


**Figura 14. “Docking” molecular de SdiA con diferentes AHLs. A)** Estructura NMR de SdiA de *E. coli* (2avx PDB) y estructura de las distintas AHLs. **B)** Interacciones entre el sitio activo de la proteína y el ligando determinadas con el programa LigandScout v2.0 (las flechas indican los dadores (flechas rojas) y receptores de electrones (flechas verdes), las interacciones electrostáticas se muestran en rojo y las interacciones hidrofóbicas en amarillo). La estructura del sitio activo se mantuvo rígida y se rotó para mantener el ligando en un mismo plano.

#### 4.3.3. Apagamiento de fluorescencia intrínseca SdiA con AHL

Como se mencionó anteriormente, la proteína SdiA posee 5 triptofanos en su estructura, 3 de estos se encuentran en el dominio de unión a AHL (W67, W95 y W107). Se sabe que la unión de un ligando en sitios específicos de una proteína induce un cambio en la emisión de fluorescencia de los triptófanos si está asociada a un cambio conformacional. Por este motivo se ocupó esta

propiedad para determinar el efecto de las AHLs en la proteína SdiA. Se determinó que la unión de AHL produce apagamiento de la fluorescencia intrínseca y se aprovechó este fenómeno para determinar los parámetros de unión titulando la proteína con distintas concentraciones de AHL (figura 15A). El experimento se realizó a una concentración  $1 \mu\text{M}$  de monómero ( $0,5 \mu\text{M}$  considerando a la proteína como dímero) utilizando diferentes moléculas de AHLs. Se observó en todos los casos una disminución en la fluorescencia incluso con  $\gamma$ -butirolactona. Se observó que el apagamiento de la fluorescencia ocurre a concentraciones nM (gráfico de Stern-Volmer) a diferencia de lo que ocurre si se hace el mismo experimento pero con triptófano en solución como control (inserto figura 15B), en el cual hay apagamiento a concentraciones mM. Estos resultados indican que el apagamiento de la fluorescencia puede ser debido a la cercanía de grupos apagadores de AHL en el sitio activo o a un cambio conformacional en la proteína inducido por la molécula de AHL. Una de las limitaciones de las medidas de titulación de la fluorescencia intrínseca es que no se puede obtener el valor verdadero de la constante de unión, pues no se conocen las concentraciones de ligando libre y ligando unido. Por lo que podemos calcular una constante aparente.



**Figura 15. Apagamiento de fluorescencia de SdiA.** **A)** Intensidad de fluorescencia (IF) en unidades arbitrarias (u.a) de SdiA versus la longitud de onda a distintas concentraciones de C6-AHL. La proteína se utilizó a una concentración de 1,5  $\mu\text{M}$  **B)** Gráfico de Stern-Volmer de SdiA,  $I_0/I$  versus la concentración de AHL. En el inserto se grafica el apagamiento del triptofano en solución en presencia de concentraciones crecientes de AHL. **C)** Titulación de SdiA con C6-AHL. El apagamiento de fluorescencia se calculó para cada concentración de AHL.

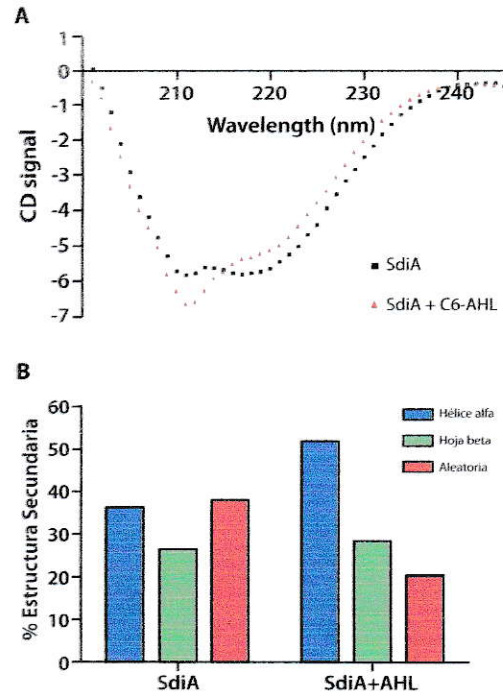
Esta constante no se puede determinar directamente de la ecuación de Stern-Volmer, pues para esto deberíamos asumir la formación de un complejo no fluorescente con los triptófanos en el estado basal entre otras cosas (van de Weert, 2010). Por este motivo se graficó el apagamiento de la fluorescencia versus la concentración de AHL (figura 15C) y se ajustó a una gráfica hiperbólica de decaimiento, se obtuvo una constante de disociación aparente de 29 nM. Además se determinó a partir del punto de equivalencia de la curva de

titulación (0,3  $\mu\text{M}$ ) una razón AHL/dímero de SdiA de 0,6 que resulta ser sub-estequiométrico y podría deberse a la presencia de oligómeros de mayor masa molecular.

#### **4.3.4. Dicroísmo circular de SdiA en presencia de AHL**

Para determinar si las AHLs tenían algún efecto en la estructura secundaria de la proteína, se tomaron espectros en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de C6-AHL. Se observó un cambio en el espectro de dicroísmo (figura 16A). Se determinó el porcentaje de estructura secundaria y se comparó con el obtenido para la proteína SdiA en ausencia de ligando (figura 16B).

Los resultados muestran un aumento de estructura helicoidal y probablemente un cambio de parte de la típica estructura hélice  $\alpha$  a hélice 3/10 (Toniolo y col, 1996), además de la disminución de la estructura al azar (figura 16A).



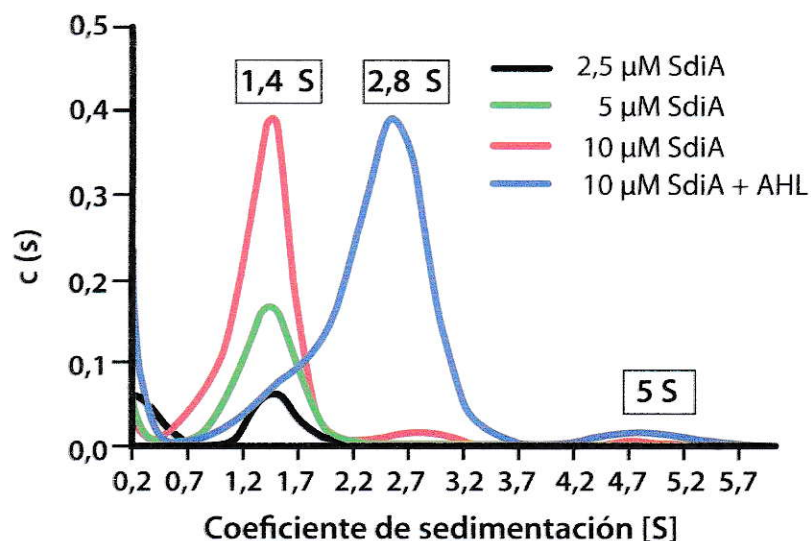
**Figura 16. Dicroísmo circular de SdiA en el UV lejano. A)** Espectro dicroísmo circular de la proteína SdiA en presencia de AHL. La línea punteada negra corresponde a la proteína SdiA y la línea punteada roja corresponde a la proteína + 10  $\mu$ M de C6-AHL. En ambas gráficas se observan los mínimos alrededor de 222 y 208 nm. **B)** Porcentaje de estructura secundaria calculado para ambas condiciones. En azul se muestra las hélices alfa, en verde las hojas beta y en rojo la estructura al azar.

#### 4.3.5. Ultracentrifugación analítica (AUC) de SdiA en presencia de AHL

Para evaluar el efecto de la AHL en el estado de oligomerización de SdiA, se repitieron los experimentos de velocidad de sedimentación ahora en presencia de C6-AHL. El experimento se hizo a una concentración de proteína 10  $\mu$ M, que corresponde a la concentración más alta que se había utilizado en el experimento anterior de velocidad de sedimentación, debido a que con esta

concentración se observó la presencia de una segunda especie en solución (2,8 S) además de la de 1,4 S que se observó en todas las concentraciones (figura 10). Para el experimento se utilizó la proteína SdiA en amortiguador A y previo a cargar las celdas la proteína se centrifugó para eliminar los agregados y se determinó nuevamente su concentración. El ligando (C6-AHL) se utilizó a una concentración saturante (50  $\mu$ M) y como control a otra muestra idéntica de la proteína (sin ligando) se adicionó el mismo volumen del solvente del ligando (metanol y/o DMSO). Para analizar los resultados se utilizó el programa SedFit, en el cual se ajustaron los parámetros de densidad (1,15 g/mL) y viscosidad ( $8,905 \times 10^{-3}$  poise) del amortiguador utilizado y luego los datos se ajustaron a un modelo de distribución continua  $c(s)$  (la distribución  $c(s)$  es una variante de la ecuación de Lamm que utiliza el programa Sedfit). Los resultados del ajuste muestran la probabilidad de distribución versus el coeficiente de sedimentación [S] en presencia y ausencia de AHL (figura 17).

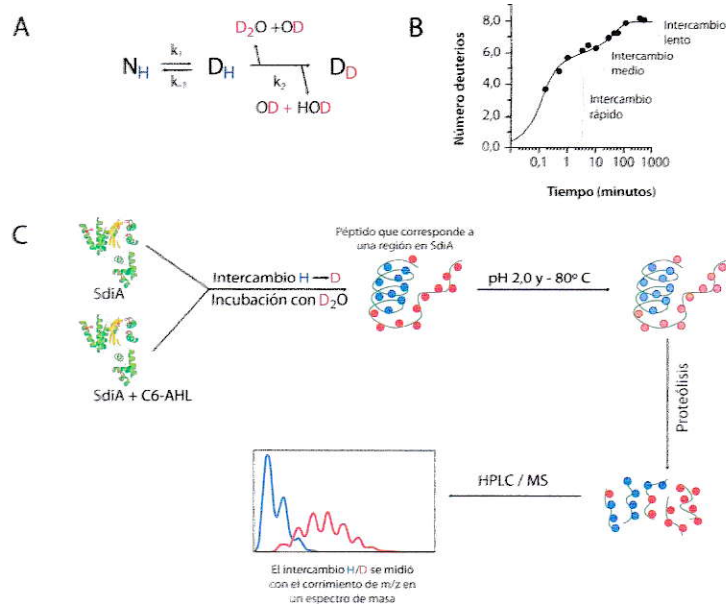
Se observó un incremento en la especie de 2,8 S indicando que se desplaza el equilibrio a la formación del dímero. Además se observa una tercera especie de S cercano a 5 S que podría corresponder a un tetrámero en solución.



**Figura 17. Velocidad de sedimentación de SdiA en presencia de AHL.** Se muestra en la figura la probabilidad de distribución  $c(s)$  versus el coeficiente de sedimentación  $[S]$  en presencia y ausencia de AHL. Se utilizó una concentración de SdiA de  $10 \mu\text{M}$  y del ligando C6-AHL  $50 \mu\text{M}$ . El experimento se realizó en amortiguador A a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y a  $40.000 \text{ rpm}$  durante 4 horas.

#### 4.3.6. Intercambio isotópico

Todos los resultados de los experimentos descritos indican que la unión del ligando en el extremo N-terminal de la proteína induce un cambio conformacional que se observa a nivel de su estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria. Por este motivo se identificó la zona de la proteína donde ocurre este cambio y se utilizó la técnica de intercambio de H/D acoplado a espectrometría de masa que da información de la estructura y dinámica de las proteínas (figura 18A).



**Figura 18. Efecto de AHL sobre el intercambio isotópico (H/D) acoplado a espectrometría de masa de la proteína SdiA. A)** Esquema del mecanismo de intercambio de hidrogenos (H) por deuterios (D) de una proteína. El intercambio dependiera si la proteína se encuentra en su estado nativo (N) o desplegado (D). La constante de intercambio ( $k_2$ ) es función de la constante de apertura ( $k_1$ ) y la constante de cerrado ( $k_{-1}$ ). **B)** Ejemplo del ajuste de la ecuación (ver Materiales y Métodos) a la cinética de intercambio de una proteína. **C)** Diseño experimental del intercambio H/D de la proteína SdiA en ausencia y presencia de C6-AHL. Se muestra el proceso de marcaje, la detención de la reacción, la proteólisis y la detección de los péptidos mediante espectrometría de masa.

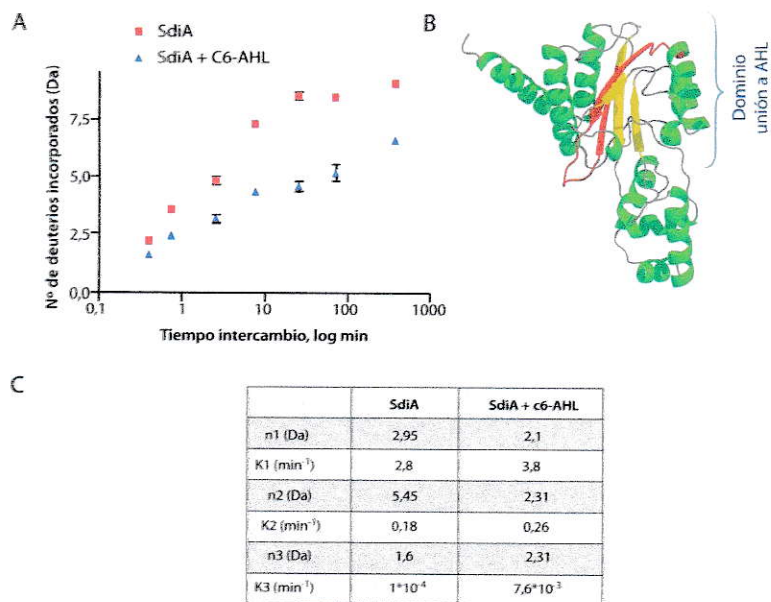
Estos péptidos se identifican mediante una secuenciación previa por espectrometría de masa en tandem (MS-MS). Una vez identificado los péptidos se determinó la cinética de intercambio en la proteína en condiciones nativas (figura 18B).

El experimento se hizo como se muestra en la figura 18C, con la proteína SdiA en ausencia y presencia de C6-AHL en amortiguador A deuterado ( $D_2O$ ) a



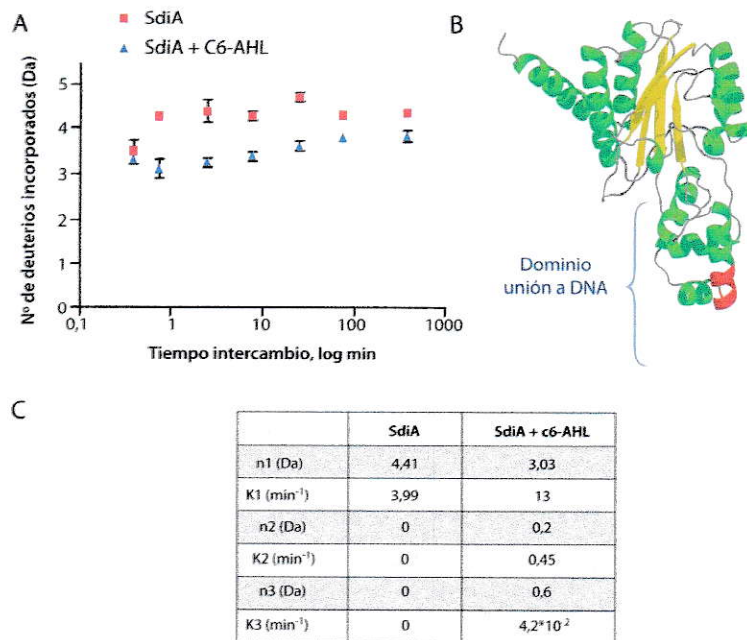
una concentración de 9  $\mu\text{M}$ . El ligando (C6-AHL) se utilizó a una concentración saturante (50  $\mu\text{M}$ ).

La incorporación de deuterio para cada condición y cada tiempo se determinó en un espectrómetro de masa y se graficó el número de deuterios incorporados versus el tiempo. En la figura 19A se muestra la cinética de intercambio de SdiA en ausencia y presencia de AHL. Se observó una significativa protección al intercambio en el dominio N-terminal en presencia del autoinductor específicamente en el bolsillo de unión a AHL. En este bolsillo se encuentra el péptido que corresponde a los aminoácidos 100-122, en el cual existe una protección mayor a la incorporación de deuterios cuando la proteína contiene el ligando unido lo que indica que en esta zona ocurre un cambio conformacional al unirse la AHL (figura 19B). Los datos de este gráfico se ajustaron a un modelo de 3 exponenciales (ver Materiales y Métodos) y se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad de intercambio. Se observaron diferencias entre ambas condiciones, con y sin AHL, en los hidrógenos que intercambian a tasas medias y lentas y no así para los de intercambio rápido. También se observa que el número final de deuterios incorporados es diferente.



**Figura 19. Cinética de intercambio de hidrógenos del dominio de unión a AHL de SdiA en presencia y ausencia de AHL. A)** Gráfico de intercambio del péptido que contiene los aminoácidos del 100 al 122. El experimento se hizo en ausencia y presencia de AHL. **B)** Modelo 3D de SdiA. En rojo se destaca el péptido estudiado que se encuentra en el dominio de unión a AHL. **C)** La gráfica se ajustó al modelo de 3 exponenciales descrito en Materiales y Métodos y con esto se obtuvo la tabla de los valores para el número de deuterios (n) que intercambian a una determinada velocidad (k).

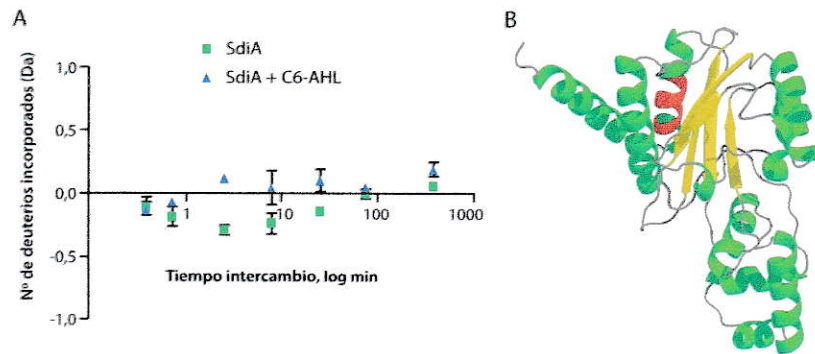
Además se registró una protección en el dominio de unión a DNA de SdiA cuando se adicionó AHL (figura 20), específicamente en el péptido (aminoácidos 205-213) que forma parte de las hélices (H8 y H9) que hacen contacto directo con el DNA.



**Figura 20. Cinética de intercambio de hidrógenos del dominio de unión a DNA de SdiA en presencia y ausencia de AHL. A)** Gráfico de intercambio del péptido que contiene los aminoácidos del 205 al 213. El experimento se hizo en ausencia y presencia de AHL. **B)** Modelo 3D de SdiA. En rojo se destaca el péptido estudiado que se encuentra en el dominio de unión a DNA. **C)** La gráfica se ajustó al modelo de 3 exponenciales descrito en Materiales y Métodos y con esto se obtuvo la tabla de valores para el número de deuterios (n) que intercambian a una determinada velocidad (k).

Los datos de este gráfico al igual que en la figura anterior se ajustaron al modelo de 3 exponenciales y se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad de intercambio (figura 20C). Se observaron diferencias al agregar AHL, y así se observa que SdiA en ausencia de C6-AHL la proteína intercambia de manera rápida en cambio con ligando hay una disminución que indica una protección al intercambio.

También se analizó un péptido en el cual no se encontraron diferencias en el intercambio en ambas condiciones, con y sin AHL (figura 21A). El péptido que contiene los aminoácidos del 26 al 32 de acuerdo al modelo 3D de SdiA corresponde a una hélice alfa que se encuentra protegida del intercambio al solvente (figura 21B).



**Figura 21. Cinética de intercambio de hidrógenos de SdiA en presencia y ausencia de AHL.** A) Gráfico de intercambio del péptido que contiene los aminoácidos del 26 al 32. El experimento se realizó en ausencia y presencia de AHL. B) Modelo 3D de SdiA. En rojo se destaca el péptido analizado.

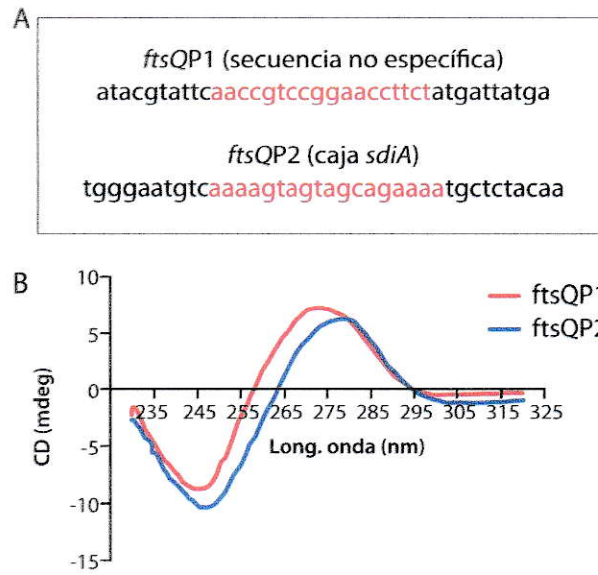
Estos resultados demuestran que la unión de AHL a la proteína SdiA inducen un cambio conformacional en el dominio N-terminal y que también afecta al dominio de unión a DNA. Por este motivo, estudiamos el efecto de las AHL en la unión de la proteína al DNA, específicamente en la región promotora del operón *ftsQAZ* que contiene una secuencia de unión denominada caja *sdiA* que se encuentra río arriba del promotor *ftsQP2*.

#### **4.4. Unión de SdiA a la región promotora P2 del operón *ftsQAZ***

Como se mencionó en la introducción la proteína FtsZ se encuentra regulada a nivel transcripcional por 6 promotores, 2 de los cuales se encuentran río arriba del operón *ftsQAZ*. En esta región se encuentra la secuencia específica de unión a los reguladores transcripcionales de QS. Para analizar el efecto de la AHL en la unión de SdiA a ésta región primero determinamos la constante de unión de SdiA a ésta secuencia específica denominada caja *sdiA* (figura 5) mediante dicroísmo circular y anisotropía de fluorescencia. En ambos casos se utilizó un fragmento de 40 bp que contiene la secuencia *ftsQP2* (tabla 3).

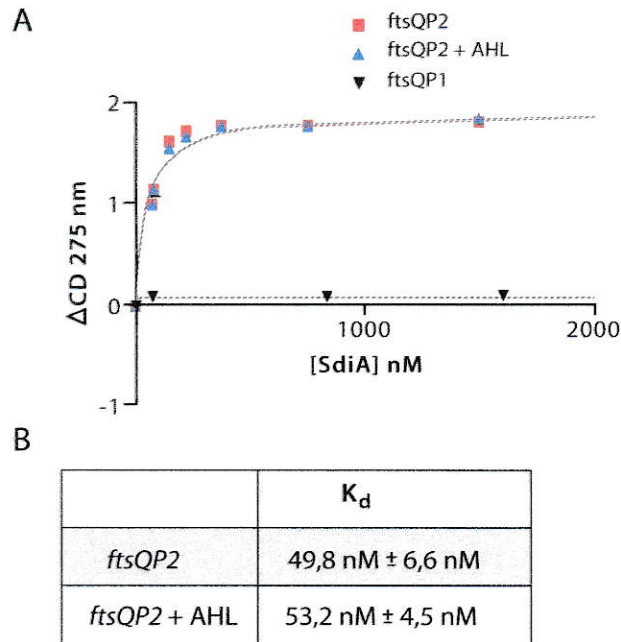
##### **4.4.1. Unión de SdiA al DNA determinado por dicroísmo circular de ácidos nucleicos**

Se determinó la constante de unión de la proteína SdiA al DNA mediante dicroísmo circular de ácidos nucleicos. Se utilizó un fragmento de DNA de doble hebra que contiene la secuencia palindrómica de unión a SdiA (*ftsQP2*) y como control se utilizó un fragmento de 40 bp inespecífico (*ftsQP1*) que también corresponde a una secuencia promotora del operón *ftsQAZ* pero que no contiene la caja *sdiA* (figura 22A). Los ácidos nucleicos absorben en el rango UV cercano (230-320 nm) y en el caso del DNA tipo B tiene un espectro característico con un máximo alrededor de 280 nm. En la figura 22B se observa un máximo de señal alrededor de 275 y 280 nm para los fragmentos *ftsQP1* y *ftsQP2*, respectivamente.



**Figura 22. Espectro de dicroísmo circular de los fragmentos *ftsQP1* y *ftsQP2*.** A) Secuencia de los fragmentos promotores *ftsQP1* y *ftsQP2*. En rojo se destaca la secuencia de unión. B) Espectro de dicroísmo circular de los fragmentos promotores *ftsQP1* y *ftsQP2* donde se observan que los máximos son cercanos a 280 nm que es característico para DNA tipo B.

Los ensayos se hicieron a una concentración de 13,3  $\mu\text{M}$  de DNA y se tomaron los espectros entre 230 y 320 nm para determinar los máximos de absorción. Se graficó el cambio en la señal de dicroísmo circular a 275 nm (máximo) de *ftsQP2* y de *ftsQP1* (control) a distintas concentraciones de SdiA en ausencia y presencia de AHL (figura 23A). Se calculó la constante de disociación para la unión de SdiA a *ftsQP2* (figura 23B) y no se observaron diferencias significativas en el valor de la constante de unión en presencia de AHL.



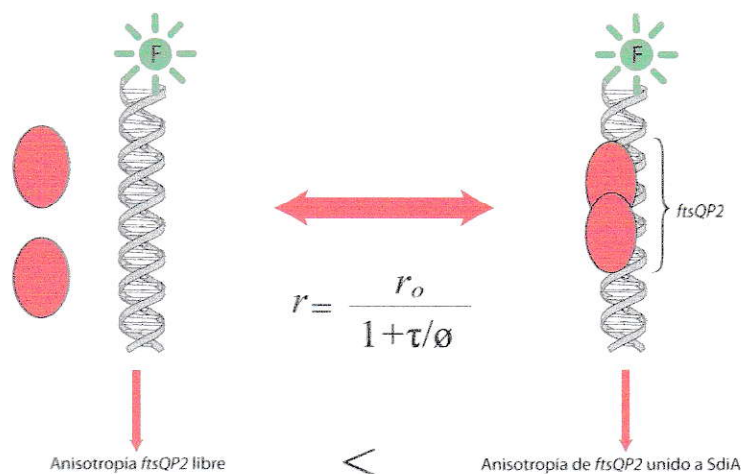
**Figura 23. Espectro de dicroísmo circular de los fragmentos *ftsQP1* y *ftsQP2* con SdiA y AHL . A)** Gráfico del cambio en la intensidad del máximo de señal de dicroísmo circular a distintas concentraciones de SdiA. La concentración de ambos fragmentos de dsDNA fue de 13,3  $\mu$ M. Se utilizó C6-AHL a 50  $\mu$ M. Las curvas se ajustaron a una hiperbola de unión. **B)** Valores de las constantes de disociación ( $K_d$ ) calculadas del ajuste del gráfico de la figura.

#### 4.4.2. Unión de SdiA al DNA determinada por anisotropía de fluorescencia

Para corroborar el resultado anterior se determinó el valor de la constante de unión por anisotropía de fluorescencia. Este método permite medir la formación de un complejo entre 2 moléculas (proteína-proteína o proteína DNA), así al variar uno de ellos se puede calcular la constante de unión para dicha interacción. La técnica se basa en que una molécula fluorescente al ser excitada con luz polarizada emite luz polarizada cuyo plano de emisión

dependerá del tamaño de fluoróforo libre o unido. Las medidas de anisotropía se basan en el movimiento rotacional de esta molécula marcada fluorescentemente en solución y se define entonces como una función de la intensidad paralela y perpendicular y está relacionada con el tiempo de vida ( $\tau$ ) y el tiempo de correlación rotacional ( $\Phi$ ) de un fluoróforo. Esta relación indica que cuando la molécula rota rápidamente el tiempo de correlación rotacional es menor que el tiempo de vida del fluorosforo ( $\Phi \ll \tau$ ) y por lo tanto la anisotropía observada tiende a 0. Si la molécula rota lentamente ( $\Phi \gg \tau$ ) la anisotropía observada tiende al límite de la anisotropía ( $r_0$ ) en ausencia de difusión. El tiempo de correlación rotacional aumenta con el volumen de hidratación de la molécula, con la viscosidad de la solución y con la disminución de la temperatura. Si la difusión rotacional de la molécula disminuye la anisotropía de fluorescencia aumenta. Los cambios en la difusión rotacional se pueden deber a un cambio en la estructura intrínseca de la molécula o a la asociación de esta con otra molécula. La difusión rotacional de un oligonucleótido fluorescente se hace menor unido a una proteína, lo que aumenta el valor de la anisotropía de fluorescencia (figura 24). Las proteínas también pueden ser marcadas, pero en la práctica es mucho más simple marcar el DNA, además el cambio en la anisotropía de fluorescencia de un DNA fluorescente es mayor que el de la sonda unida a una proteína.

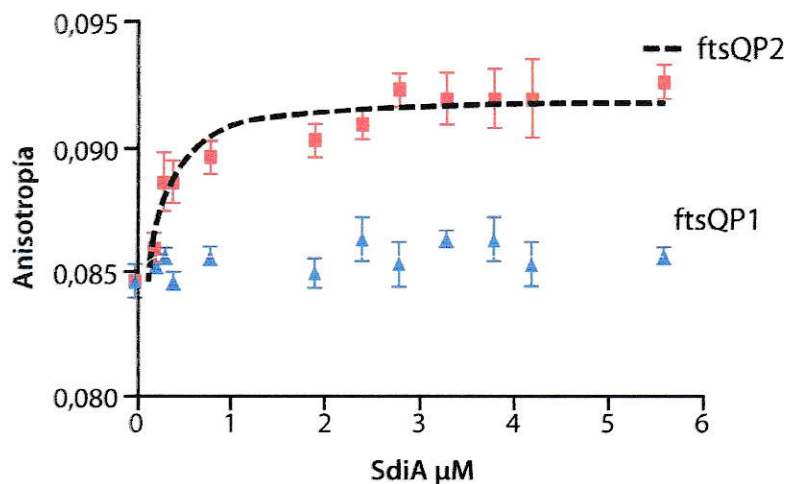




**Figura 24. Esquema de la unión entre SdiA y un fragmento de DNA que contiene la secuencia promotora *ftsQP2* y sus correspondientes anisotropías.** Se utilizó 5-FAM (5-carboxifluoresceína) como fluoróforo, que se destaca en verde unido al extremo 5' del DNA. Cuando SdiA (círculos rojos) se une al DNA fluorescente el valor de anisotropía ( $r$ ) aumenta respecto al de la sonda unida al DNA libre.  $r_0$ , anisotropía medida en ausencia de difusión,  $\tau$ , tiempo de vida y  $\Phi$ , tiempo de correlación rotacional.

Para determinar el cambio en la anisotropía se utilizaron los mismos fragmentos de DNA de 40 bp utilizados en los experimentos de dicróismo pero marcados con 5-carboxifluoresceína en el extremo 5' (tabla 3 y figura 24).

La anisotropía de fluorescencia del DNA (*ftsQP2* y *ftsQP1*) se midió a distintas concentraciones de SdiA (figura 25).



**Figura 25. Anisotropía de fluorescencia de la secuencia *ftsQP2* y *ftsQP1* unida a la sonda 5-FAM en función de la concentración de SdiA.** Se graficó la anisotropía de 5-FAM unido a *ftsQP2* con concentraciones crecientes de SdiA (cuadrados rojos), como control se utilizó el DNA *ftsQP1* (triángulos azules). La línea punteada muestran el ajuste de los valores experimentales a la ecuación de una hipérbola para obtener el valor de la constante de disociación para el DNA *ftsQP2*.

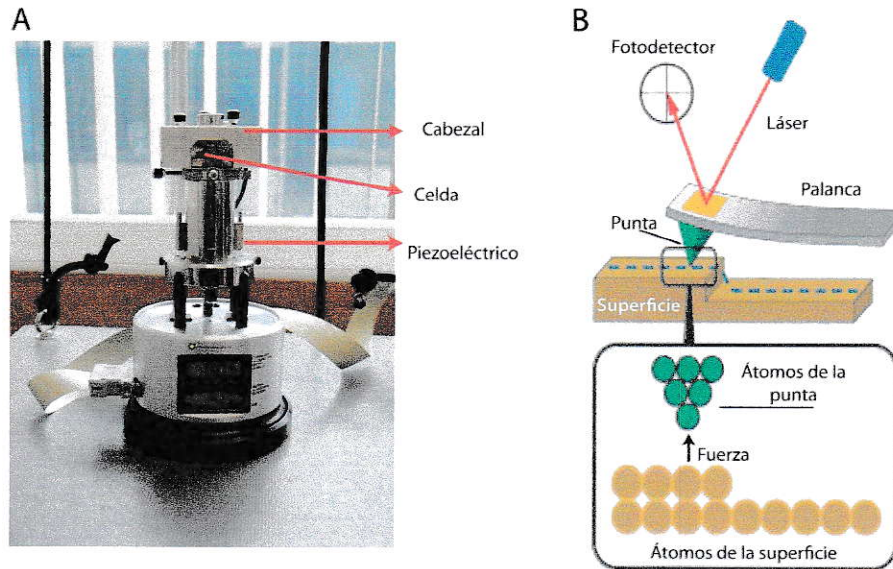
El DNA fluorescente se utilizó a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y para medir anisotropía la longitud de onda de excitación fue de 480 nm. No se utilizó el máximo de excitación de la fluoresceína a 495 nm para evitar la influencia del solapamiento con el espectro de emisión. Se registró la anisotropía en el máximo de emisión de fluorescencia a 520 nm a distintas concentraciones de SdiA.

Del ajuste de los datos del gráfico de la figura 25 se obtuvo el valor de la constante de disociación de SdiA a la secuencia *ftsQP2*, cuyo valor fue de

14,1 nM  $\pm$  3,5 nM. Se repitió el experimento (no se muestra) en presencia de C6-AHL y el valor de la constante fue de 20 nM  $\pm$  5 nM.

#### **4.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La AFM (figura 26A) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanoNewton (nN). Al analizar una muestra, se registra continuamente la altura sobre la superficie con una sonda de punta cristalina de forma piramidal. La sonda va acoplada a una palanca microscópica ("cantilever"), muy sensible al efecto de las fuerzas. La fuerza atómica se puede detectar cuando la punta se aproxima a la superficie de la muestra y se registra la pequeña flexión de la palanca mediante un haz láser reflejado en su parte posterior (figura 26B). Un sistema auxiliar piezoeléctrico desplaza la muestra tridimensionalmente, mientras que la punta recorre ordenadamente la superficie. Durante el barrido, la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie de la muestra, provoca una flexión de la palanca.



**Figura 26. Fundamento de la técnica de microscopía de fuerza atómica.**

**A)** Microscopio de fuerza atómica utilizado en los experimentos (Multimode AFM Nanoscope V, Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA).

**Cabezal:** es el lugar donde se encuentra todo el sistema óptico del microscopio. En el cabezal se encuentra situado el diodo emisor del láser y el fotodiodo detector del mismo. **Celda:** es el soporte donde se encuentra situada la palanca. **Piezoeléctrico:** es un cilindro que se mueve en los ejes x, y, z y mueve la muestra con él. La parte superior del piezoeléctrico se encuentra imantada sirviendo como punto de fijación de la muestra mediante la utilización de un disco metálico conductor.

**B)** Sistema de detección del microscopio de fuerza atómica. **Palanca y punta:** la sonda del AFM es una punta afilada que permite rastrear la superficie de una muestra. La punta se encuentra unida al extremo de una palanca flexible y reflectante, que permite la oscilación de la punta a frecuencias determinadas. **Láser:** es un haz coherente y monocromático de fotones muy focalizado. El láser se focaliza hacia la palanca, reflejándose en su superficie e incidiendo en el detector.

**Fotodetector:** el detector del AFM es un fotodiodo que se encuentra dividido en cuatro cuadrantes. El láser reflejado por la palanca incide en el fotodiodo en un punto concreto, determinado por la diferencia de señal recibida entre los cuadrantes. Las variaciones de posición de la palanca son detectadas al provocar un cambio en el punto de incidencia original del láser.

Esta flexión es registrada por un sensor adecuado y la señal se introduce en un circuito de realimentación. Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión y permite estudiar a nivel de una sola molécula interacciones específicas entre moléculas, como por ejemplo la interacción entre una proteína y el DNA.

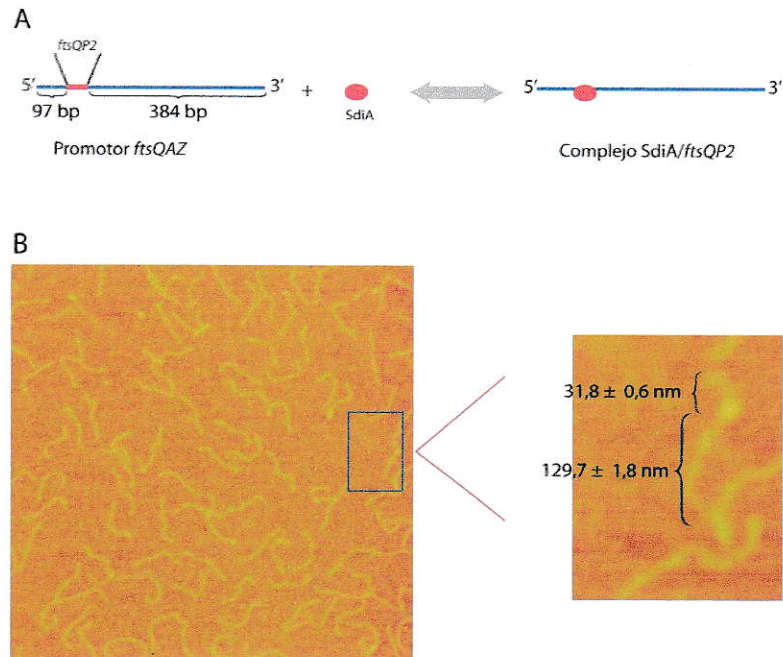
El microscopio de fuerza atómica presenta diferentes modos de funcionamiento dependiendo de la acción que realice la punta sobre la superficie de la muestra (Ver Materiales y Métodos). Para visualizar una muestra biológica se utilizó el modo de contacto intermitente para determinar la formación del complejo proteína-DNA.

#### **4.5.1. Visualización del complejo SdiA-ftsQAZP1P2**

Los valores de la constante de disociación calculados para la unión de SdiA a la secuencia específica en el DNA *ftsQP2* se encuentran en el rango nM. Este valor permite utilizar la técnica de AFM para resolver una sola molécula y por lo tanto podemos utilizar y visualizar una proteína unida a una molécula de DNA.

Para los experimentos de AFM se amplificó la región promotora completa del operón *ftsQAZ* (figura 5) de 550 bp que contiene la secuencia específica de unión a SdiA, *ftsQP2* y también la secuencia promotora *ftsQP1*.

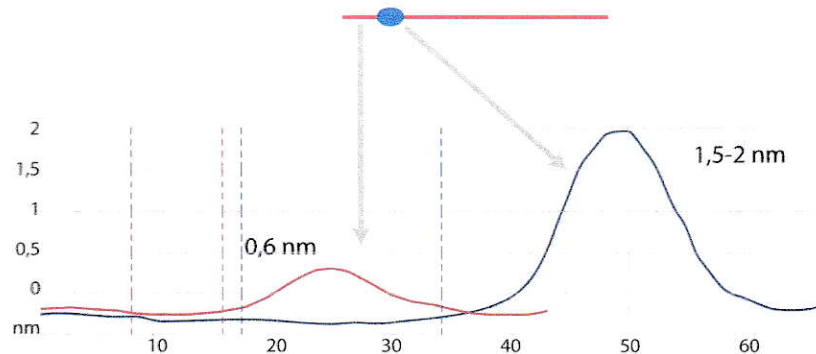
Se muestra en la figura 27A como será la formación del complejo SdiA/*ftsQP2* cuya secuencia de unión se encuentra ubicada a una distancia de 97 bp del extremo 5' y a 384 bp del extremo 3' del DNA.



**Figura 27. Visualización del complejo SdiA/*ftsQP2* mediante microscopía de fuerza atómica. A)** Esquema de la formación del complejo SdiA y la secuencia específica de unión *ftsQP2* (destacada en rojo) situada cercana al extremo 5' de la construcción. **B)** Imagen de microscopía de fuerza atómica en modo de contacto intermitente. La proteína unida al DNA se observa en el extremo superior (que corresponde a la zona roja del promotor *ftsQAZ* que se muestra en A). Se muestran las distancias entre la proteína unida y los extremos 5' y 3'.

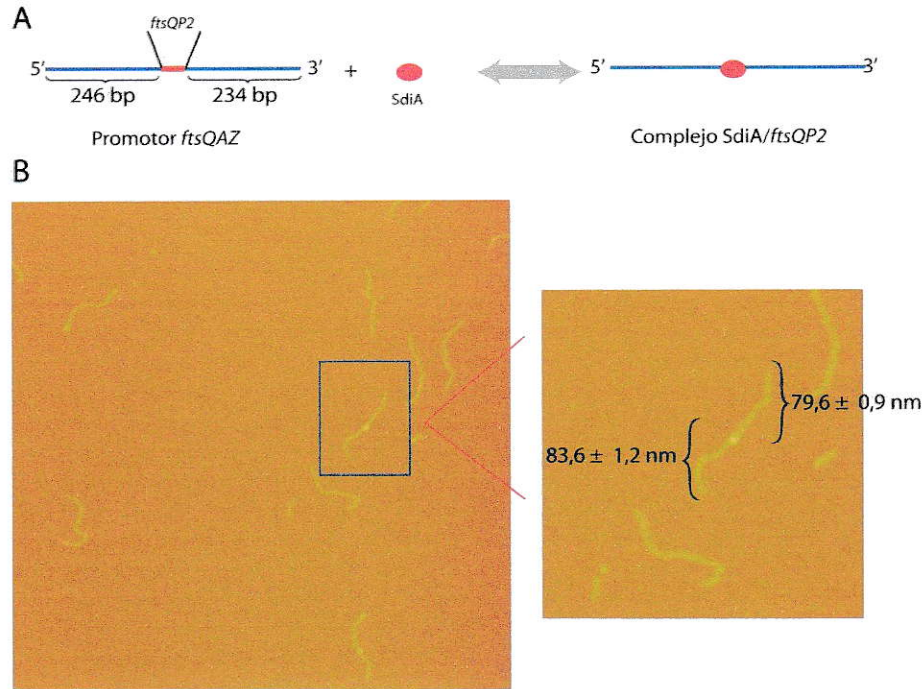
También se determinó la altura tanto del DNA como de la proteína unido al DNA. La altura de la proteína varió entre 1,5-2 nm lo cual es esperado para una proteína de 30 kDa y para el DNA se obtuvo una altura de 0,6 nm (figura 28). Sin embargo, no se logró distinguir si la proteína se encuentra en forma de

monómero o dímero, por el límite de resolución de la técnica debido al diámetro de la punta utilizada y el tamaño de la proteína.



**Figura 28. Determinación de la altura del complejo SdiA/ftsQP2.** En rojo se muestra la altura del DNA y en azul la altura de la proteína.

Para corroborar que la proteína se une específicamente a estas secuencias palindrómicas, se puso la misma secuencia en el centro de la construcción. Como se observa en la figura 29A la secuencia se encuentra equidistante de los extremos. Se calcularon las distancias de la misma manera que en el experimento anterior y se obtuvieron valores de 83 y 79 nm que corresponden a 246 y 234 bp, respectivamente.



**Figura 29. Visualización del complejo SdiA/*ftsQP2* mediante microscopía de fuerza atómica. A)** Esquema de la formación del complejo SdiA y la secuencia específica de unión *ftsQP2* (destacada en rojo) situada en el centro de la construcción. **B)** Imagen de microscopía de fuerza atómica en modo de contacto intermitente. La proteína unida al DNA se observa en el centro (que corresponde a la zona roja del promotor *ftsQAZ* que se muestra en A). Se muestran las distancias entre la proteína unida y los extremos 5' y 3'.

Este resultado confirma la formación del complejo SdiA/*ftsQAZP2* al igual que en la construcción anterior (figura 29B). Podemos decir que la proteína SdiA se une específicamente a la secuencia *ftsQP2* y no a la secuencia *ftsQP1* que se encuentra río abajo de la misma construcción utilizada.



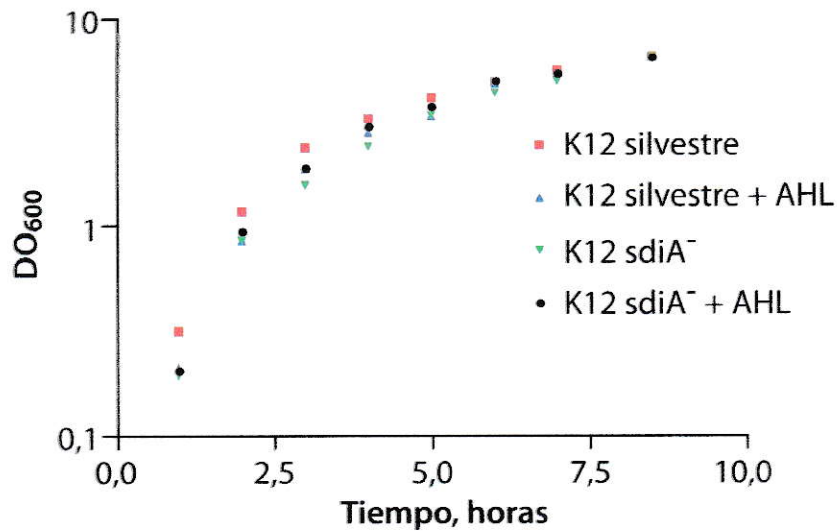
#### **4.6. Caracterización *in vivo* del efecto del complejo binario [SdiA/AHL] sobre la división celular en *E. coli*.**

Una vez caracterizado el efecto de las AHLs en la proteína SdiA y en la unión de ésta al DNA, específicamente la secuencia *ftsQP2* del promotor del operon *ftsQAZ*, *in vitro* quisimos determinar si el mecanismo de QS, es decir la unión de la AHL al regulador transcripcional SdiA, tendría un efecto visible en la división celular.

##### **4.6.1. Curvas de crecimiento en presencia y ausencia de AHL**

Se hicieron curvas de crecimiento de *E. coli* K12 silvestre para determinar si existían diferencias en su división celular en presencia y ausencia de AHL. Además, se utilizó la cepa mutante en *sdiA*<sup>-</sup> (colección KEIO, ver Materiales y Métodos) que carece del regulador transcripcional. Como se observa en la figura 20 no se encontraron diferencias en el crecimiento en ninguna condición y tampoco se encontraron diferencias morfológicas entre ellas (datos no mostrados).



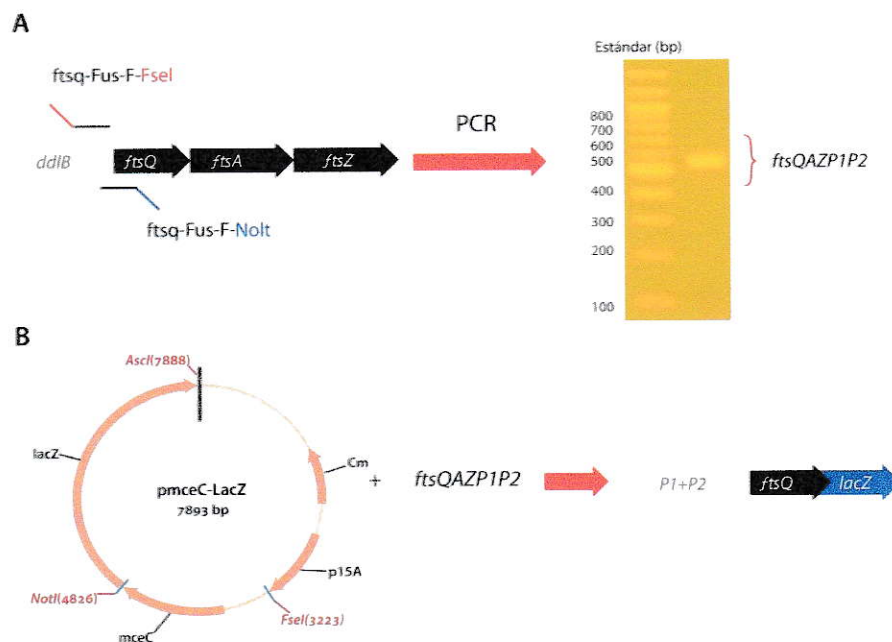


**Figura 30. Curvas de crecimiento de la cepa K12 silvestre y K12 sdiA<sup>-</sup> (JW1801).** Las distintas cepas se crecieron en medio LB y LB-Kan desde una dilución 1/100 de un cultivo en fase estacionaria. La gráfica se muestra en escala semilogarítmica.

Por este motivo para evaluar el efecto de SdiA *in vivo* decidimos utilizar una estrategia experimental diferente. Ésta consistió en la creación de fusiones traduccionales de la región promotora del operón *ftsQAZ* (la misma utilizada en los experimentos de AFM) con el gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). La fusión se hizo con la región promotora completa y sólo hasta el ATG del primer gen del operón, que corresponde al gen *ftsQ*, debido a que este gen codifica para una proteína de membrana.

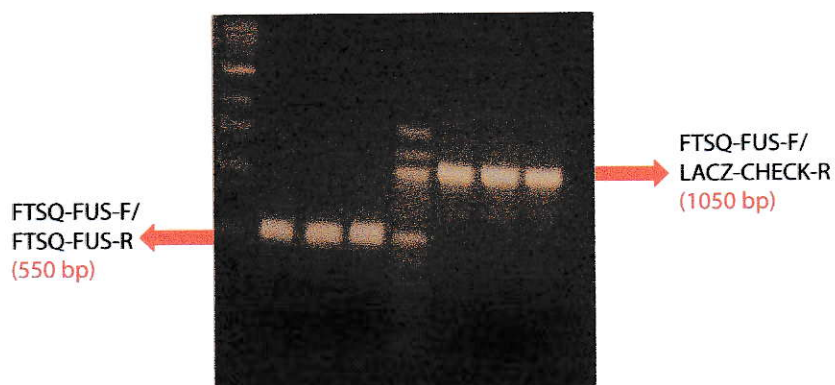
#### 4.6.2. Construcción de la fusión traduccional del promotor del operón *ftsQAZ* con el gen $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*)

La fusión traduccional entre el gen reportero (*lacZ*) y la región promotora del operón *ftsQAZ* (figura 5) se hizo por PCR. En una primera etapa, la región promotora se amplificó por PCR (figura 31A) utilizando partidores que generan nuevos sitios de restricción (Tabla 1 Materiales y Métodos). En la segunda etapa, se utilizaron los sitios *NotI* y *FseI* generados en la secuencia para ligar el fragmento al gen reportero en el plasmidio *pmceC'-lacZ* (figura 31B) y generar la fusión *ftsQAZP1P2-lacZ*.



**Figura 31. Construcción de la fusión traduccional *ftsQAZP1P2-lacZ*. A)** Amplificación mediante PCR de la región promotora de operón *ftsQAZ*. **B)** Ligación del plasmidio *pmceC'-lacZ* con el fragmento generado en A previo a la digestión con las enzimas de restricción *FseI* y *NotI*.

Esta ligación se transformó en células quimiocompetentes TOP10F' y se hizo un PCR de colonia para identificar los clones positivos con partidores específicos para la fusión (tabla 1). Como se muestra en la figura 32 se identificaron 3 clones positivos los cuales se secuenciaron y se denominaron pXMAS.

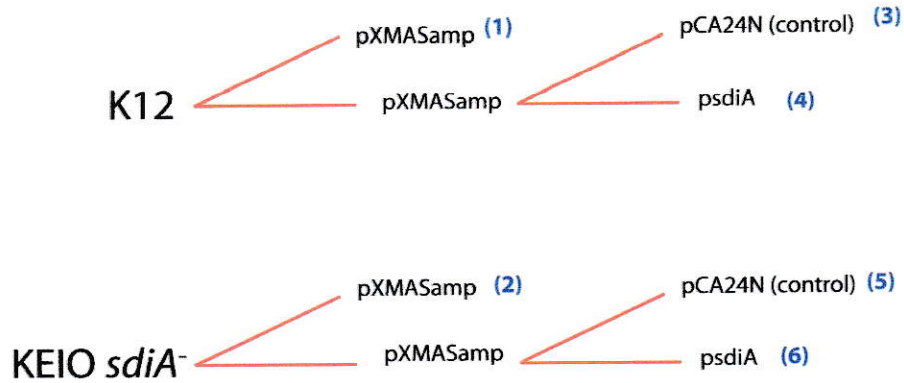


**Figura 32. Separación electroforética de PCR de colonias correspondientes a la amplificación de la fusión traduccional *ftsQAZP1P2-lacZ*.** PCR de colonia donde se muestran los clones positivos amplificados con 2 pares de primers, tanto para el fragmento promotor como con un primer interno del gen *lacZ*.

La fusión generada posee resistencia a cloranfenicol como también la cepa que sobre-expresa la proteína SdiA (colección ASKA). Por este motivo cambiamos la fusión a un plasmidio que posee resistencia a ampicilina (pACYC177) y se generó una nueva fusión denominada pXMASamp.

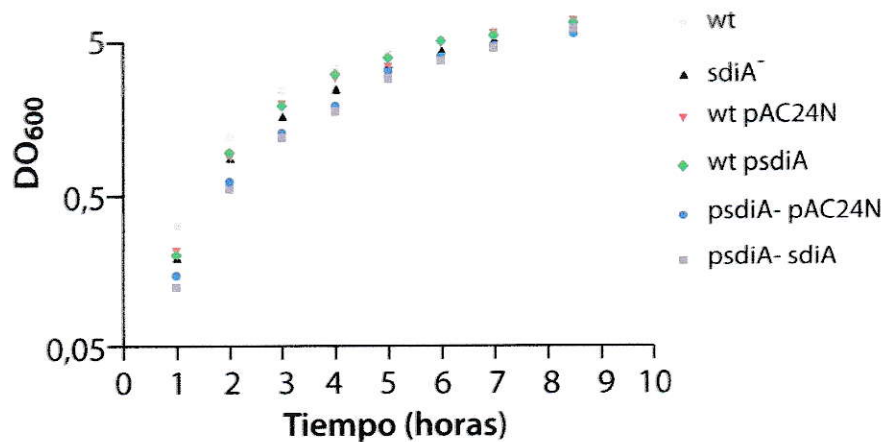
Esta fusión se transformó en la cepa silvestre K12 y en la cepa mutante nula para SdiA (*sdiA*<sup>-</sup>), además se transformaron ambas cepas con el plasmidio

que sobreexpresa la proteína SdiA y su correspondiente plasmido control, pCA24N (esquema 2).



**Esquema 2. Cepas que contienen la fusión traduccional *ftsQAZP1P2*.** Se muestran las 6 cepas generadas en la tesis. 1 y 2 solo tienen el plasmido de fusión, 3 y 5 contienen la fusión y el plasmido control y 4 y 6 contienen la fusión y el plasmido que sobre-expresa la proteína SdiA.

Para evaluar el efecto de la introducción de estos nuevos plásmidos sobre la viabilidad de las bacterias, se hicieron curvas de crecimiento, lo cual también permitió escoger el tiempo en el cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de Miller (figura 33).

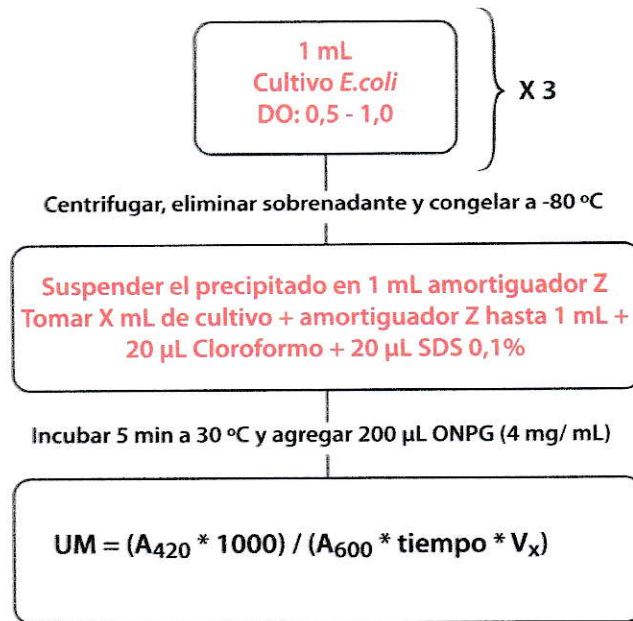


**Figura 33. Curvas de crecimiento de las 6 cepas que contienen la fusión traduccional *ftsQAZP1P2*.** Las distintas cepas se crecieron en medio LB, LB-Kan y LB-Kan-Cm desde una dilución 1/100 de un cultivo en fase estacionaria. La gráfica se muestra en escala semilogarítmica. Wt cepa K12 silvestre.

Se observa en la figura que en fase exponencial la cepa mutante en *sdiA* al sobre-expresar la proteína crece de manera más lenta, pero todas las cepas alcanzan la fase estacionaria en el mismo tiempo.

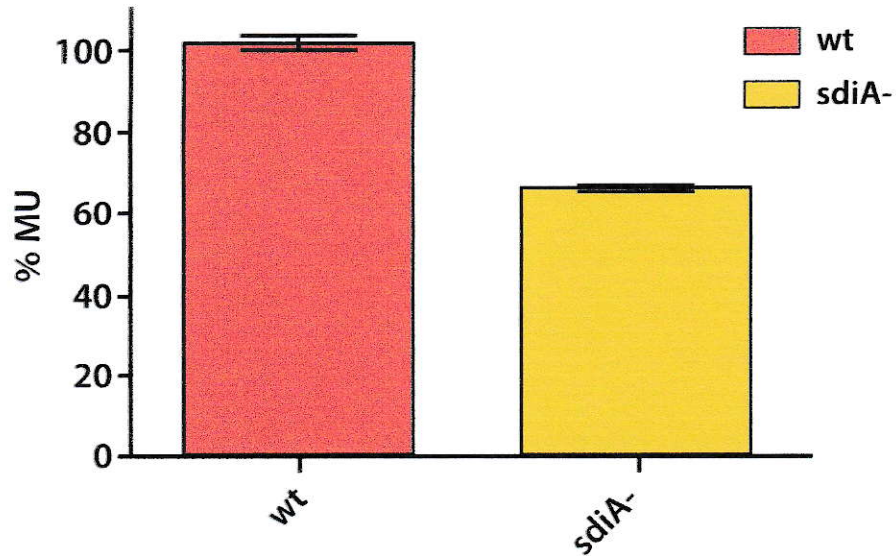
#### 4.6.3. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa (ensayo de Miller)

Para cuantificar la expresión de la fusión en las distintas cepas se utilizó el ensayo de Miller, que permite medir la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto la inducción del promotor en las diferentes condiciones. El ensayo se realizó para todas las cepas que contienen la fusión traduccional *ftsQAZP1P2* como se muestra en el esquema 3.



**Esquema 3. Protocolo del ensayo de Miller para la distintas cepas que contienen la fusión *ftsQAZP1P2*.** Los valores de  $A_{420}$  y  $A_{600}$  se determinaron en un espectrofotómetro.  $V_x$  corresponde al volumen de cultivo utilizado en el ensayo.

Primero se determinó la diferencia entre la expresión de la fusión en la cepa mutante versus la silvestre (figura 34).

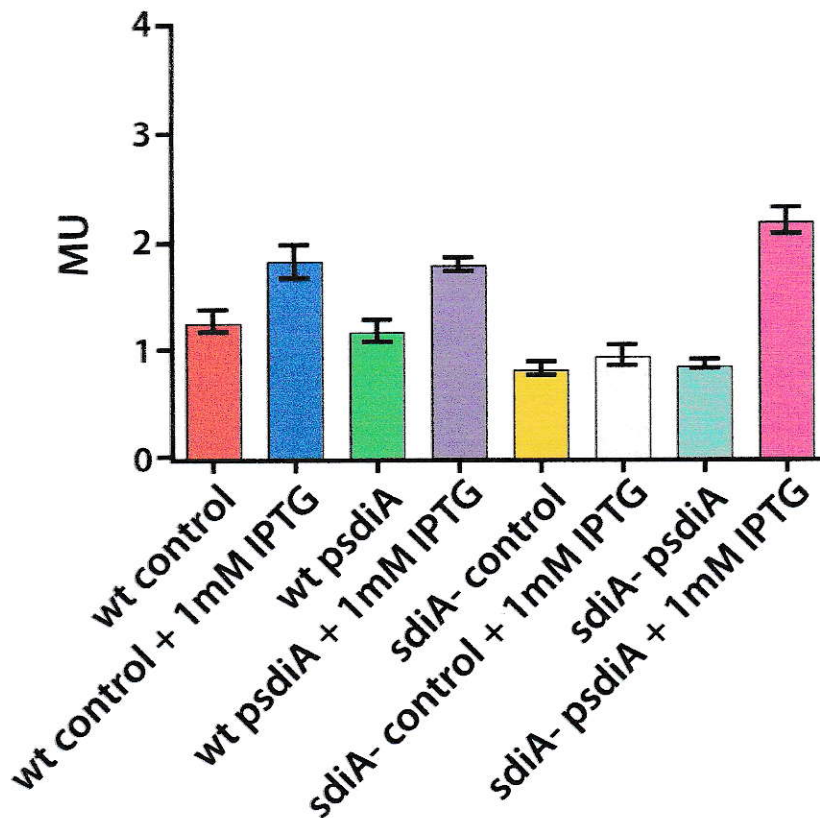


**Figura 34. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante *sdiA*<sup>-</sup>.** Se muestra en el gráfico el porcentaje de unidades de Miller ( % MU) de ambas cepas.

Se observa en la figura 34 una disminución del 40% en la actividad de la fusión cuando la cepa carece del gen que codifica para la proteína SdiA, esto indica que la proteína SdiA es importante para la expresión del operon *ftsQAZ*.

Para reafirmar este resultado repetimos el experimento con las cepas 3, 4, 5 y 6 (esquema 2) que contienen la fusión y además contienen el plasmidio que sobre-expresa la proteína SdiA o su respectivo control (pCA24N) (figura 35).

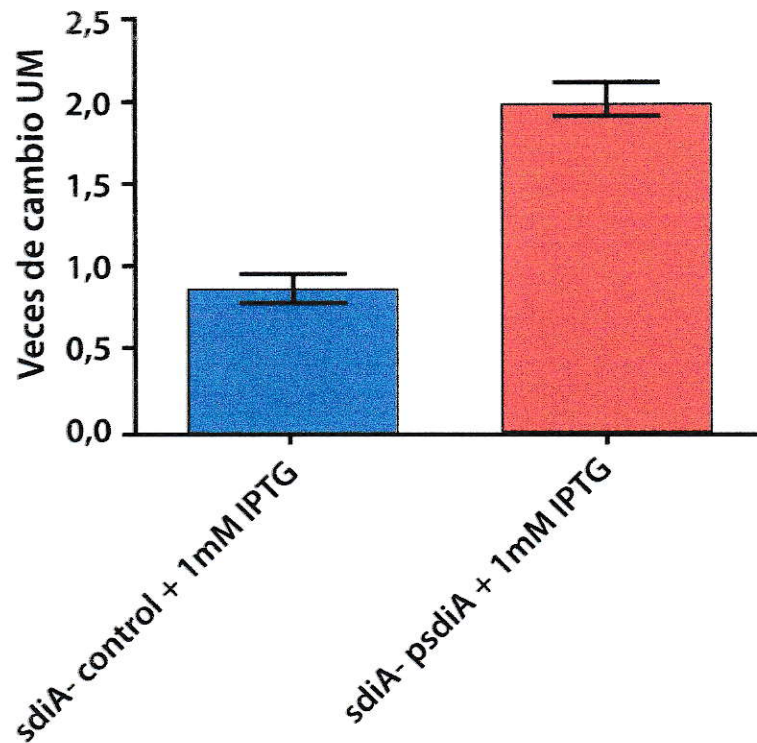




**Figura 35. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante *sdiA*<sup>-</sup> complementadas con pCA24N (control) o con *psdIA*.** Se muestra en el gráfico las unidades de Miller normalizadas para las distintas cepas. Se utilizó IPTG 1 mM para inducir la expresión de la proteína SdiA. wt cepa K12 silvestre.

Se observa que no existen diferencias en la cepa silvestre al inducir la sobre-expresión de SdiA con IPTG, lo contrario ocurre en la cepa mutante (*sdiA*<sup>-</sup>) en la cual hay un aumento significativo al sobre-expresar la proteína SdiA (barra gris comparada con barra fucsia). Para confirmar este resultado repetimos el experimento y obtuvimos el mismo resultado (figura 36). Se aprecia de manera mas clara el cambio en la expresión de la fusión traduccional en presencia de la

proteína SdiA sobre-expresada. La actividad de la fusión aumenta al doble cuando el regulador transcripcional SdiA se encuentra presente en la bacteria lo que indica que este regulador participa en la transcripción del operón *ftsQAZ*.



**Figura 36. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión en la cepa silvestre y la cepa mutante *sdiA*<sup>-</sup> complementadas con pCA24N (control) o con *psdiA* e inducida con IPTG. Se muestra en el gráfico las veces de cambio en las unidades de Miller.**

## 5. Discusión

La proteína SdiA se identificó inicialmente como un regulador de genes involucrados en la división celular (Wang y col., 1991), pues su sobre-expresión en una cepa de *E. coli* con defectos en la división (Ward y Lutkenhaus, 1985) revierte el fenotipo desde células filamentosas a células normales. La proteína actúa como un regulador transcripcional que se une a la secuencia promotora del operón *ftsQAZ*, específicamente al promotor *ftsQP2* que se encuentra 400 pb río arriba del gen *ftsQ*, y aumenta así la concentración celular de las proteínas correspondientes a este operón (Rothfield y Justice, 1997). En un trabajo posterior se identificó esta proteína como homóloga a los reguladores transcripcionales de QS. (Bassler, 2002).

Es interesante preguntarse cuál es la relación entre QS y división celular en *E. coli* por 2 motivos:

- 1) El sistema de QS en esta bacteria se encuentra incompleto, pues la bacteria no produce moléculas Als debido a que carece de la sintasa de AHL. Solo posee el regulador transcripcional, SdiA y las secuencias específicas en el DNA (caja *sdiA*). Por este motivo se ha postulado que este sistema de QS incompleto en *E. coli* podría estar involucrado en la comunicación inter-especies (Yao y col., 2006; Patankar y Gonzalez, 2009).

2) Desde que se identificó este regulador no se ha descrito un fenotipo asociado al efecto de las AHLs y el sistema de QS en la división celular. Una mutante nula *sdiA*<sup>-</sup> no posee defectos aparentes en la división o morfología de la célula (Sitnikov, 1996; Garcia-Lara, 1996). Es importante preguntarse ¿porqué sólo se observan efectos cuando SdiA se sobre-expresa de manera exógena?

Para responder estas interrogantes, se investigó el sistema de QS en *E. Coli*. Específicamente se analizó el efecto de la unión de la acil-homoserina lactona (AHL) a la proteína SdiA con el objeto de definir su influencia en la unión al DNA como la transcripción.

Para explicar cómo AHL influye en la unión SdiA-DNA, y determinar si la transcripción es mediada o facilitada por AHLs, caracterizamos el efecto de AHL sobre la dimerización de la proteína (esquema 1 Introducción). Por un lado, si el mecanismo es mediado por AHL, la dimerización y unión a DNA sólo se producirá en presencia del AI, es decir, si la proteína se encuentra en la célula como monómero, el ligando desplazará el equilibrio a la formación del dímero y sólo éste será capaz de unirse al DNA. Por otro lado, si el mecanismo es facilitado por AHL se observará un aumento en la unión del dímero preformado al DNA. Ambos caminos llevan a la formación de un complejo ternario entre un dímero de proteína, ligando y secuencia palindrómica.

### **5.1. Acil-homoserina lactona (AHL) induce la dimerización y un cambio conformacional del regulador transcripcional de quorum sensing SdiA**

Existen proteínas de la familia de reguladores de QS, como LasR y TraR que no se pliegan de manera correcta en ausencia de AHL y forman agregados insolubles en la bacteria. En algunos casos, la unión del AI al regulador transcripcional permite que éste se vuelva más resistente a la proteólisis (Zhu y Winans, 2001), lo que sugiere que algunos reguladores son inestables *in vivo* en ausencia de AHL (Sappington y col., 2011). Algunos reguladores no requieren AHL para el proceso de plegamiento pero sí para la dimerización como es el caso de MtrR de *Mesorhizobium tianshanense*. También, el represor transcripcional EsaR de *Pantoea stewartii* no requiere AHL para unirse al DNA pero sí para el mecanismo de de-represión (Minogue y col., 2002). Cuando sobre-expresamos la proteína SdiA en *E. coli* se obtuvo una fracción soluble y la mayor parte de la proteína se encontró formando cuerpos de inclusión y no asociada a la membrana, pues estos no se disolvieron con detergente. Para determinar si las AHLs tenían algún efecto sobre la solubilidad de la proteína, crecimos las bacterias en presencia de diferentes moléculas de AHLs de distinto largo de cadena acilada. En todos los casos se observó un aumento en la solubilidad de la proteína, pues incrementó la proteína en la fracción soluble en comparación con la condición control en ausencia de AHL (figura 13). A diferencia de los otros reguladores de QS, SdiA es menos específica, pues responde a más de una AHL independiente del largo de la cadena acilada. Así, se observó que  $\gamma$ -butirolactona, que sólo posee el anillo, de igual manera

aumenta la proporción de proteína soluble en la purificación. Se concluye que a lo menos estas 5 moléculas de AHL utilizadas son importantes para el proceso de solubilidad de SdiA lo mismo que  $\gamma$ -butirolactona. Para complementar estos resultados y determinar si existe alguna preferencia en la unión de las distintas AHLs al sitio de unión de la proteína localizado en el dominio N-terminal, se hizo "docking" molecular. Se observó que los contactos entre la proteína y las moléculas ocurren principalmente en la parte común de la AHL (anillo lactona) y en menor grado en la cadena acilada. Hubo una ligera preferencia por la molécula 3-oxo-C12-AHL que es la de cadena hidrocarbonada más larga, luego ambas moléculas de 8 átomos de carbono 3-oxo-C8-AHL y C8-AHL y finalmente 3-oxo-C6-AHL y C6-AHL. Esto indica que a pesar que todas las moléculas se unen a SdiA, existe preferencia por el largo de cadena pero no por la sustitución del carbono 3. Estos resultados permiten concluir que este regulador transcripcional puede unir más de un tipo de AHL y potencialmente AHLs de otras bacterias. Esto tendría una función amplia en la comunicación interespecie que se mencionó anteriormente, pues respondería al mensaje de diferentes especies productoras.

Como sabemos que la AHL se une a SdiA y favorece la solubilidad de la proteína, se analizó el efecto de la molécula de AHL a nivel estructural. Se sabe que un dímero es más estable que un monómero, sobre todo si existen superficies de contacto hidrófobas expuestas. Por esta razón, si AHL favorece

la dimerización, estaría estabilizando la proteína como dímero activo, que se uniría en esta conformación al DNA para activar la transcripción.

Como se mencionó en la introducción, los reguladores transcripcionales de QS se unen a secuencias palíndromicas específicas en el DNA en forma de dímeros previo a un cambio conformacional inducido por las AHLs. Hasta la fecha no se ha identificado en que zona de la proteína ocurre este cambio conformacional y si es la unión del ligando la que induce el cambio en la proteína o es la dimerización inducida por la unión del ligando la que produce el cambio conformacional. Se sabe que el dímero activo (unido a AHL) se une a DNA para activar la transcripción de genes blanco.

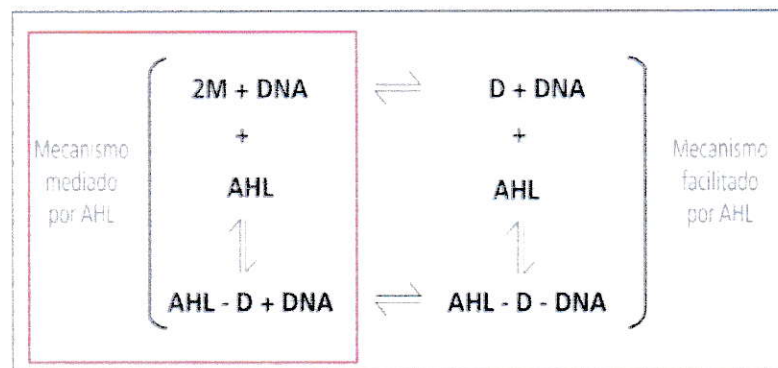
Un cambio conformacional en una proteína requiere de la unión del ligando y un posterior rearreglo estructural. Así, para determinar la afinidad de AHL a la proteína SdiA se utilizó el apagamiento de fluorescencia intrínseca inducido por AHL y se tituló la proteína con distintas concentraciones. Como control se tituló triptófano libre y solo se consiguió apagarlo con concentraciones milimolares. Se obtuvo una constante aparente de disociación de  $29 \pm 2,1$  nM que indica una alta afinidad de AHL con su sitio de unión en el dominio N-terminal. Si comparamos este valor con el valor de  $0,72$   $\mu$ M obtenido para CarR de *E. carotovora* con su AHL específica, 3-oxo-C6-AHL, mediante ITC (calorimetría de titulación isotérmica) o por apagamiento de fluorescencia (Welch y col., 2000, Poulter y col., 2011), se observa que la unión a CarR es al menos un orden de magnitud menor que para SdiA. Por lo tanto, SdiA presenta

una mayor afinidad para las distintas moléculas Als respecto a otros reguladores transcripcionales. Sin embargo, llama la atención la inespecificidad por la cadena alifática a diferencia de lo que ocurre con EsaR donde si hay influencia de la cadena acilada (Minogue y col., 2002).

Estos resultados indican que el apagamiento de la fluorescencia es debido a un cambio en el medio ambiente del triptófano inducido por la unión de AHL y que está probablemente asociado a la dimerización. Para verificar la magnitud de este cambio en la estructura de la proteína, evaluamos qué sucedía con la estructura secundaria en presencia de AHL mediante dicroísmo circular. Se obtuvo un contenido menor de estructura de tipo hélice alfa en ausencia de AHL respecto a otras proteínas R. Se puede postular que este cambio conformacional asociado a un aumento en el contenido de estructura alfa se induciría por la dimerización de la proteína. Por esta razón se evaluó el efecto de AHL sobre la estructura cuaternaria de la proteína y como punto de partida se determinó si la proteína se encontraba como monómero o dímero en ausencia de ligando. Los resultados de velocidad de sedimentación sugieren que la proporción de dímero es extremadamente baja en ausencia de AHL, resultado confirmado por equilibrio de sedimentación al obtener un valor muy bajo para la constante de formación del dímero. Se concluye que la proteína en ausencia de AHL se encuentra principalmente como monómero. En presencia de AHL la fracción de dímero aumenta notoriamente y la constante de dimerización aumenta en 2 ordenes de magnitud (equilibrio de sedimentación). Estos resultados indican que las AHLs inducen la dimerización de SdiA que



está asociada a un cambio conformacional. Ahora la pregunta es, dónde ocurre este cambio conformacional y si el cambio conformacional es inducido por la unión del ligando o por la dimerización de la proteína. Los resultados en su conjunto descartan la vía facilitada para la formación del dímero en presencia de las AHLs (esquema 4) y permiten concluir que las AHLs mediarían en la formación del complejo ternario, pues la proteína se encuentra como monómero y es la AHL la que induciría la formación del dímero activo.

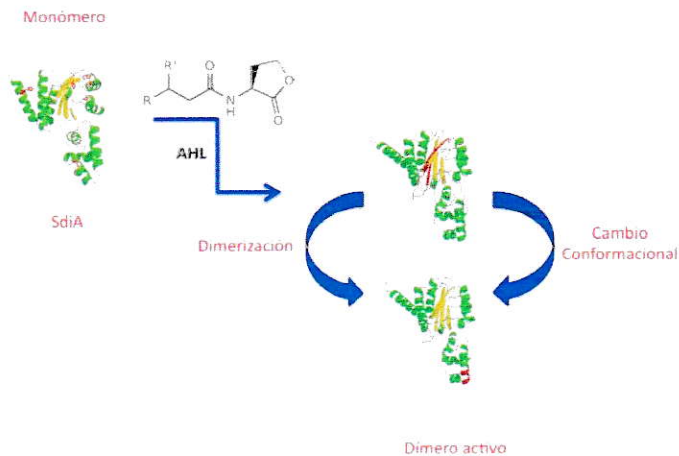


**Esquema 4. Mecanismo mediado por AHL.** Unión de AHL a SdiA en forma de dímero (D) o monómero (M) y su interacción con DNA

Para probar la existencia de un cambio conformacional que lleva a cambios en la posición de residuos expuestos y no expuestos al solvente se realizaron cinéticas de intercambio isotópico (H/D). Los resultados de intercambio de hidrógenos analizados con espectrometría de masa permitieron identificar péptidos en SdiA con diferentes velocidades de intercambio, es decir, en presencia de AHL la incorporación de deuterios a la proteína ocurrió a velocidades menores que en ausencia de ligando. Se observó una significativa

protección al intercambio específicamente en el dominio N-terminal que contiene tanto el sitio de unión a AHL como uno de los dominios de dimerización. Mutantes en 2 residuos del dominio N-terminal (Asp10 y Gly123) de la proteína TraR de *A. tumefaciens* muestran una unión a DNA comparable con la proteína silvestre pero la proteína es incapaz de activar la transcripción (Qin y col. 2004). Se postula que estos y otros residuos (Asp6, Asp10, Gly123 en el dominio N-terminal y Glu-193, Asp196, Val197, Glu198 y Gly199 en el dominio C-terminal) forman parches de dimerización en TraR (Qin y col., 2009) y que también están involucrados en la interacción de esta y otras proteínas de la familia de reguladores con la RNA polimerasa.

Los resultados de esta tesis sugieren que la unión de AHL a SdiA induce la dimerización de la proteína, transformandola en el dímero activo que es capaz de unirse a DNA. Esto debido a que se observó un grado equivalente de protección en el dominio de unión a DNA de SdiA cuando se adicionó AHL. Este hallazgo demuestra que la unión de AHL a la proteína SdiA induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal, que también afecta al dominio de unión a DNA (figura 37).



**Figura 37. Efecto de AHL en la conformación de SdiA.** Se muestra como ocurre un cambio conformacional y la dimerización de SdiA en presencia de AHL. Se forma el dímero activo que puede unirse a DNA.

## **5.2. Unión de SdiA a la región promotora *ftsQP2* del operón *ftsQAZ* y posible efecto de las AHLs en la transcripción.**

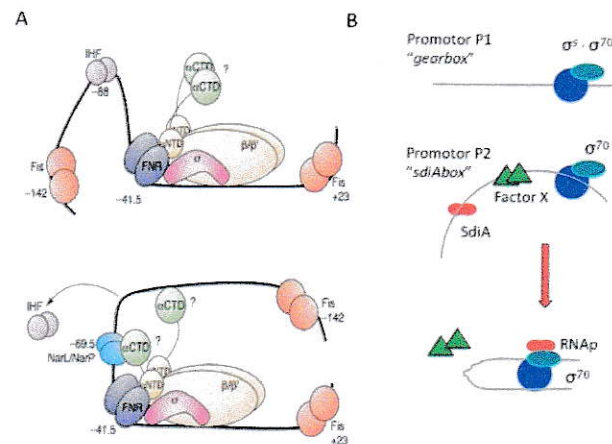
Existen contradicciones en el efecto de las AHLs sobre la transcripción del operón *ftsQAZ*. Mediante fusiones transcripcionales se observó que SdiA aumenta la transcripción desde el promotor *ftsQP2* y no desde *ftsQP1* (Sitnikov y col., 1996). Ambos promotores se encuentran río arriba del gen *ftsQ* pero el promotor *ftsQP1* es un promotor de la familia de los “gearbox” regulado por el factor *rpoS*, que no tiene relación con el mecanismo de QS (figura 38B). También se determinó, en el mismo trabajo, que las AHLs, incluso a concentraciones de hasta 1 mM, no afectan la transcripción. En cambio otros autores reportaron que las AHLs inhiben la transcripción del *ftsQP2* (García-Lara y col., 1996).



Como descartamos el mecanismo facilitado de unión al DNA, sabemos que la proteína se encuentra como monómero y es la AHL la que induce la formación del dímero y éste el que se une en su forma activa al DNA.

Para evaluar ahora el efecto de la AHL en la unión de SdiA a DNA se determinó la constante de unión de la proteína SdiA a la secuencia palindrómica específica *ftsQP2* mediante dicroísmo circular de ácidos nucleicos y anisotropía de fluorescencia. En ambos casos se utilizó un fragmento de 40 bp que contiene la caja *sdiA* (*ftsQP2*). Se utilizó como control un fragmento de 40 bp inespecífico (*ftsQP1*). Como era de esperar, la proteína no se une a esta secuencia inespecífica, pero sí lo hace a la caja *sdiA*. Los valores de la constante de disociación caen en el rango nM en ausencia de AHL indicando que la proteína se une a esta secuencia con alta afinidad. La adición de AHL no incrementó significativamente la constante que da cuenta de la unión de la proteína a su secuencia específica en el DNA (caja *sdiA*). El valor de la constante de disociación del represor EsaR con DNA es de  $3 \times 10^{-8}$  M y esta constante no se afecta por la adición de AHL aún en altas concentraciones, pero sí tiene un efecto *in vivo* en la represión de la transcripción (Minogue y col., 2002). Se sabe que los reguladores transcripcionales se unen a secuencias en la región promotora que se encuentran río arriba del inicio de la transcripción y que no siempre hacen contacto directo con la RNA polimerasa. Para establecer el contacto, existen proteínas reguladoras adicionales que inducen cambios conformacionales en el DNA, como la formación de "loops", que permite el

contacto directo entre el regulador y la RNA polimerasa (Barnard y col., 2004). Se identificó en el sistema de QS de *V. vulnificus* una proteína IHF miembro de la familia de proteínas asociadas a nucleótidos que se une a secuencias específicas del DNA e induce un doblamiento de este hasta en 180° que permite la interacción proteína-proteína (figura 38A).



**Figura 38. Mecanismo de transcripción de reguladores transcripcionales**

**A)** Efecto de proteínas IHF en el doblamiento del DNA para acercar el regulador transcripcional Fis (tomado de Barnard y col., 2004) **B)** Secuencias promotoras *ftsQP1* y *ftsQP2*. La secuencia promotora P2 se encuentra a más de 400 bp río arriba del inicio de la transcripción de *ftsQ*. Modelo de la posible interacción con otra proteína (proteína X) que permite el acercamiento debido a un doblamiento del DNA y así la interacción con la RNA polimerasa.

El valor de la constante de disociación en el rango nM indica una gran afinidad y por ende estabilidad del complejo proteína-DNA. Esta propiedad permitió utilizar la técnica de microscopía de fuerza atómica para visualizar a nivel de una sola molécula el complejo proteína-DNA. Para estos experimentos se utilizó la secuencia promotora completa que contiene ambos promotores y

efectivamente se observó que SdiA sólo se une a la secuencia promotora *ftsQP2*. Si bien podemos observar la proteína unida al DNA no podemos distinguir si la proteína se encuentra unida como monómero o como dímero debido a que la punta utilizada en la microscopía es de 5-10 nm de diámetro y permite distinguir proteínas de un tamaño sobre los 30-40 kDa. Pero si sumamos estos resultados con los de velocidad de sedimentación que indican que la proteína con AHL sería un dímero y pensamos que ocurre en ausencia de AHL podemos explicarlo en términos del equilibrio monómero-dímero. La unión al DNA desviaría el equilibrio hacia la formación del dímero de la misma manera de cómo lo hace la AHL.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se concluye que la proteína se une a una secuencia específica en el DNA, aún en ausencia del autoinductor. El hecho que AHL induzca un cambio conformacional en la proteína tanto en el dominio de unión a AHL como en el dominio de unión a DNA, sugiere que el mecanismo por el cual las AHLs incrementan la transcripción, no se debería a un aumento en la unión del regulador transcripcional al DNA, si no posiblemente a un aumento en la afinidad de la proteína por la RNA polimerasa (figura 38B). Para corroborar si SdiA se une como dímero al DNA y si efectivamente el mecanismo por el cual activa la transcripción es por interacción directa con la RNA polimerasa se proponen experimentos de transcripción *in vitro*.

El efecto de la proteína SdiA como regulador de QS no está claro y no se observan cambios en la morfología de la bacteria. Esto se explica porque en condiciones normales el efecto del regulador es diluido debido a la concentración de las otras proteínas (25 moléculas de FtsQ, 150 de FtsA y 15.000 de FtsZ por célula por ejemplo) y debemos agregar que la expresión cromosomal no muestra efectos aparentes, pues la regulación puede depender también de otros factores. En cambio la sobre-expresión no requiere de los otros factores y así puede influir y activar la transcripción.

Una mutante nula en SdiA no posee defectos aparentes en la división celular (curva de crecimiento y morfología) pero en la cepa mutante la expresión del operón *ftsQAZ* disminuye en un 40%. Al complementar la cepa mutante en SdiA con la sobre-expresión de SdiA en *trans* se aumenta la expresión del operón *ftsQAZ*, indicando que la transcripción de este operón es mediada por la proteína SdiA (Wang, X.D., 1991).

Tanto *E. coli* como *Salmonella* son bacterias que viven en el intestino de organismos superiores y han perdido la capacidad de producir moléculas de comunicación celular como las AHL pero aún son capaces de responder a señales producidas por otras especies. Esto sugiere que el rol de la proteína SdiA es importante para la comunicación interespecie que se produce en el intestino donde ambas enterobacterias viven con otras enterobacterias que si producen AHLs.

## 6. Conclusiones

1. Se logró purificar la proteína SdiA en condiciones nativas y también se aumento la solubilidad de la proteína en presencia de diferentes AHLs.
2. Se caracterizó a nivel estructural la proteína SdiA mediante técnicas espectroscópicas, fluorescencia y dicroísmo circular y además mediante intercambio isóopico se evaluó el modelo bioinformático realizado en la tesis.
3. Se determinó el estado de oligomerización de SdiA en presencia de AHL y se observó que se forman especies de mayor tamaño molecular (dímeros y tetrameros).
4. La AHL al unirse a la proteína SdiA además de favorecer la formación del dímero induce un cambio conformacional de la proteína no solo en el dominio N-terminal, que contiene el bolsillo de union a ligando y la superficie de dimerización, si no que también del extremo C-terminal que contiene el dominio de union a DNA.
5. La AHL favorece la formación del dimero de SdiA y es éste el que se une a la secuencias específicas en el DNA, la secuencia promotora *ftsQP2* que contiene la caja *sdiA*.
6. La AHL no posee efecto en la unión de la proteína al DNA y no se descarta que su efecto sea a nivel de la transcripción.



7. Una mutante nula *sdiA*<sup>-</sup> no posee defectos aparentes en la división celular (curva de crecimiento y morfología) pero si en la transcripción del operón *ftsQAZ*.
8. Al complementar la cepa mutante *sdiA*<sup>-</sup> con la sobre-expresión de SdiA en *trans* se aumenta la expresión del operón *ftsQAZ*, indicando que la transcripción de este operón es mediada por la proteína SdiA y a altas concentraciones la proteína puede formar dímeros en ausencia de AHL.

## 7. Bibliografía

- Andersson, R.A., Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mae, A., Pirhonen, M., Koiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A., y Palva, E.T. (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of expR(Ecc). *Mol Plant Microbe Interact* 13, 384-393.
- Atkinson, S., y Williams, P. (2009). Quorum sensing y social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6, 959-978.
- Ausubel, F.M.B., R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1992). *Current protocols in molecular biology.* , Vol v.1. (New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience.)
- Barnard, A., Wolfe, A., y Busby, S. (2004). Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Current opinion in microbiology* 7, 102-108.
- Bassler, B.L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109, 421-424.
- Bassler, B.L. (2004). Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse. *Harvey Lect* 100, 123-142.
- Bottomley, M.J., Muraglia, E., Bazzo, R., y Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *J Biol Chem* 282, 13592-13600.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Cole, J.L. (2004). Analysis of heterogeneous interactions. *Methods Enzymol* 384, 212-232.
- De Silva, R.S., Kovacicova, G., Lin, W., Taylor, R.K., Skorupski, K., y Kull, F.J. (2007). Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J Bacteriol* 189, 5683-5691.
- Eberhard, A. (1972). Inhibition y activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* 109, 1101-1105.
- Englander, S.W., y Kallenbach, N.R. (1983). Hydrogen exchange y structural dynamics of proteins y nucleic acids. *Q Rev Biophys* 16, 521-655.
- Fuqua, C., y Winans, S.C. (1996). Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* 178, 435-440.
- Fuqua, C., Winans, S.C., y Greenberg, E.P. (1996). Census y consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50, 727-751.
- Fuqua C, E.A. (1999). Signal generation in autoinduction systems: synthesis of acylated homoserine lactones by LuxI-type protein. . Paper presented at: Cell-cell signaling in bacteria (Washington, DC, Dunny GM, Winans SC editor).

- Garcia-Lara, J., Shang, L.H., y Rothfield, L.I. (1996). An extracellular factor regulates expression of *sdiA*, a transcriptional activator of cell division genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 2742-2748.
- Gonzalez, J.E., y Marketon, M.M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing *rhizobia*. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 574-592.
- Gray, K.M., y Garey, J.R. (2001). The evolution of bacterial LuxI y LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147, 2379-2387.
- Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Parsek, M.R., Crone, T.J., y Greenberg, E.P. (1997). Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* 179, 4882-4887.
- Hughes, D.T., Terekhova, D.A., Liou, L., Hovde, C.J., Sahl, J.W., Patankar, A.V., Gonzalez, J.E., Edrington, T.S., Rasko, D.A., and Sperandio, V. (2010). Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9831-9836.
- Hu, D., y Eftink, M.R. (1993). Interaction of indoleacrylic acid with Trp aporepressor from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 305, 588-594.
- Irvine, G.B. (2002). *Molecular Weight Estimation for Native Proteins Using High-Performance Size-Exclusion Chromatography*, 2nd Edition edn.
- Jeong, H.S., Kim, S.M., Lim, M.S., Kim, K.S., y Choi, S.H. (2010). Direct interaction between quorum-sensing regulator SmcR y RNA polymerase is mediated by integration host factor to activate *vvpE* encoding elastase in *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem* 285, 9357-9366.
- Kaplan, H.B., y Greenberg, E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163, 1210-1214.
- Keller, L., y Surette, M.G. (2006). Communication in bacteria: an ecological y evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4, 249-258.
- Kim, Y., Kim, B.S., Park, Y.J., Choi, W.C., Hwang, J., Kang, B.S., Oh, T.K., Choi, S.H., y Kim, M.H. (2010). Crystal structure of SmcR, a quorum-sensing master regulator of *Vibrio vulnificus*, provides insight into its regulation of transcription. *J Biol Chem* 285, 14020-14030.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., y Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* 12, 291-299.
- Koch, B., Liljefors, T., Persson, T., Nielsen, J., Kjelleberg, S., y Givskov, M. (2005). The LuxR receptor: the sites of interaction with quorum-sensing signals y inhibitors. *Microbiology* 151, 3589-3602.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Marketon, M.M., Gronquist, M.R., Eberhard, A., y Gonzalez, J.E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus y the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* 184, 5686-5695.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F., y Ahmer, B.M. (2001). *SdiA* of *Salmonella*

- enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 183, 5733-5742.
- Miller, J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY ).
- Miller, M.B., y Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, 165-199.
- Minogue, T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F., y von Bodman, S.B. (2002). The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol* 44, 1625-1635.
- More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., y Winans, S.C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272, 1655-1658.
- Morris, G.M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. y Olson, A. J. (1998 ). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm y and Empirical Binding Free Energy Function *J Computational Chemistry* 19, 1639-1662.
- Nasser, W., y Reverchon, S. (2007). New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* 387, 381-390.
- Nealson, K.H., Platt, T., y Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis y activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104, 313-322.
- Ng, W.L., y Bassler, B.L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43, 197-222.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., y Gray, T. (1995). How to measure y predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Pascal, B.D., Chalmers, M.J., Busby, S.A., Mader, C.C., Southern, M.R., Tsinoremas, N.F., y Griffin, P.R. (2007). The Deuterator: software for the determination of backbone amide deuterium levels from H/D exchange MS data. *BMC Bioinformatics* 8, 156.
- Patankar, A.V., y Gonzalez, J.E. (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* 33, 739-756.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., y Iglewski, B.H. (1999). Active efflux y diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181, 1203-1210.
- Perez-Iratxeta, C., y Andrade-Navarro, M.A. (2008). K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol* 8, 25.
- Poulter, S., Carlton, T.M., Spring, D.R., y Salmond, G.P. (2011). The *Serratia* LuxR family regulator CarR(39006) activates transcription independently of cognate quorum sensing signals. *Mol Microbiol* 80, 1120-1131.
- Qin, Y., Keenan, C., y Farrand, S.K. (2009). N- y C-terminal regions of the quorum-sensing activator TraR cooperate in interactions with the alpha y sigma-70 components of RNA polymerase. *Mol Microbiol* 74, 330-346.

- Qin, Y., Smyth, A.J., Su, S., y Farrand, S.K. (2004). Dimerization properties of TraM, the antiactivator that modulates TraR-mediated quorum-dependent expression of the Ti plasmid *tra* genes. *Mol Microbiol* 53, 1471-1485.
- Reading, N.C., y Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS microbiology letters* 254, 1-11.
- Rivetti, C., y Codeluppi, S. (2001). Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica. *Ultramicroscopy* 87, 55-66.
- Rivetti, C., Guthold, M., y Bustamante, C. (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J Mol Biol* 264, 919-932.
- Romberg, L., y Levin, P.A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol* 57, 125-154.
- Rothfield, L.I., y Justice, S.S. (1997). Bacterial cell division: the cycle of the ring. *Cell* 88, 581-584.
- Sambrook, J., Maniatis, T., y Frisch, E. F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York, Cold Spring Harbor, USA).
- Sanchez, R., y Sali, A. (1997). Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins Suppl* 1, 50-58.
- Sappington, K.J., Dandekar, A.A., Oinuma, K., y Greenberg, E.P. (2011). Reversible Signal Binding by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Receptor LasR. *MBio* 2.
- Schuck, P. (1998). Sedimentation analysis of noninteracting y self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. *Biophys J* 75, 1503-1512.
- Sharma, C.M., Darfeuille, F., Plantinga, T.H., y Vogel, J. (2007). A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside y upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* 21, 2804-2817.
- Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P., y Williams, S.C. (2005). Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29, 935-947.
- Sippl, M.J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 17, 355-362.
- Sitnikov, D.M., Schineller, J.B., y Baldwin, T.O. (1996). Control of cell division in *Escherichia coli*: regulation of transcription of *ftsQA* involves both *rpoS* y *SdiA*-mediated autoinduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 336-341.
- Claudio Toniolo, Alessandra Polese, Fernando Formaggio, Marco Crisma y Johan Kamphuis. (1996). Circular dichroism spectrum of a peptide 3<sub>10</sub>-helix. *Journal of the American Chemical Society* 118, 2744-2745.
- Urbanowski, M.L., Lostroh, C.P., y Greenberg, E.P. (2004). Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* 186, 631-637.

- van de Weert, M. (2010). Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: common errors. *J Fluoresc* 20, 625-629.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P., y Marco, S.D. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer y target DNA. *Embo J* 21, 4393-4401.
- Walters, M., y Sperandio, V. (2006). Autoinducer 3 y epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection y immunity* 74, 5445-5455.
- Wang, X.D., de Boer, P.A., y Rothfield, L.I. (1991). A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *Embo J* 10, 3363-3372.
- Ward, J.E., Jr., y Lutkenhaus, J. (1985). Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell* 42, 941-949.
- Waters, C.M., y Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.
- Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B., y Churchill, M.E. (2002). Structural basis y specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9, 685-694.
- Welch, M., Todd, D.E., Whitehead, N.A., McGowan, S.J., Bycroft, B.W., y Salmond, G.P. (2000). N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *Embo J* 19, 631-641.
- White, C.E., y Winans, S.C. (2007). The quorum-sensing transcription factor TraR decodes its DNA binding site by direct contacts with DNA bases y by detection of DNA flexibility. *Mol Microbiol* 64, 245-256.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., y Salmond, G.P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.
- Yamamoto, K., Yata, K., Fujita, N., y Ishihama, A. (2001). Novel mode of transcription regulation by SdiA, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. *Mol Microbiol* 41, 1187-1198.
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M.A., Dickerson, T.J., Brogan, A.P., Wright, P.E., y Dyson, H.J. (2006). Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J Mol Biol* 355, 262-273.
- Zhu, J., y Winans, S.C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, y dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1507-1512.