

UCH-FC
MAG-B
D 542
C. 1



Escuela de Postgrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**“Influencia de factores celulares y proamiloidogénicos
sobre la formación de inclusiones amiloides
intracelulares de la microcina E492”**

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

por

Gonzalo Esteban Díaz Fuenzalida

Enero, 2016

Santiago de Chile

Director de tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Co-Directores de tesis:

Dr. Andrés Marcoleta Caldera

Dr. Octavio Monasterio Opazo





Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

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

Gonzalo Esteban Díaz Fuenzalida

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de Diciembre del 2015.

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos.

Co-director de Tesis:

Dr. Andrés Marcoleta.

Dr. Octavio Monasterio.

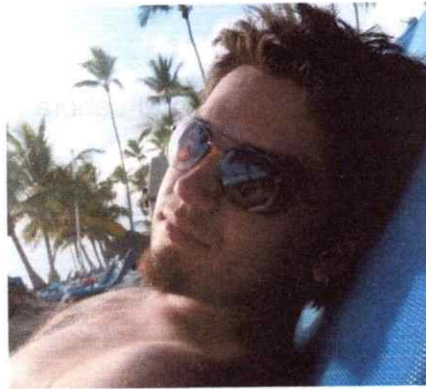
Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Francisco Chávez.

Dr. Claudio Hetz.

FINANCIAMIENTO.

Esta Tesis de Magíster fue realizada en el Laboratorio de Biología Estructural y Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y fue financiada gracias al proyecto FONDECYT 1140430 de la Dra. Rosalba Lagos M.



La curiosidad es lo que me motiva y desde pequeño me gustó saber cómo funcionan las cosas. Las ciencias permiten eso, no sólo aprender, sino que generar conocimiento, siendo la primera persona en responder a las preguntas que tal vez nadie se ha preguntado. Sin embargo, el conocimiento no se obtiene únicamente de del estudio, se obtiene de las nuevas experiencias, de los viajes, de las personas, de las experiencias y de los errores cometidos. Finalizando esta etapa de mi vida comienza un mundo nuevo, repleto de posibilidades de seguir creciendo tanto profesional como personalmente.

Gonzalo Esteban Díaz Fuenzalida

AGRADECIMIENTOS.

- A mis padres, por darme la libertad de elegir mi futuro y por darme las herramientas para alcanzarlo.
- A toda mi familia, por la paciencia, por el cariño y por el apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida.
- A mi amor, por estar a mi lado todo este tiempo, por ser mi compañera de viaje y por la felicidad que me haces sentir.
- A los amigos que quedan y a los que se van, por los buenos momentos, por las conversaciones inteligentes y por las menos inteligentes que me permiten ser quien soy realmente.
- A mis jefes y compañeros de trabajo a lo largo de los años, por guiarme, por el conocimiento compartido y por las críticas constructivas.

RESUMEN.

La microcina E492 (MccE492) es un péptido antibacteriano producido por la cepa *Klebsiella pneumoniae* RYC492, el cual se encuentra codificado dentro de un clúster génico que además codifica productos génicos que permiten su modificación post-traducciona y secreción. Resultados previos indican que la MccE492 forma agregados de naturaleza amiloide en el citoplasma de las células de *E. coli* cuando es expresada en presencia de los genes del clúster de producción, sugiriendo la existencia de factores proamiloidogénicos codificados dentro del clúster. La regulación de los agregados amiloides intracelulares de MccE492 podrían deberse a la acción de la proteína chaperona DnaK, relacionada con la solubilización de inclusiones intracelulares, impidiendo un efecto nocivo para las células acumuladoras. El objetivo de esta tesis fue estudiar la influencia de factores celulares en la formación de los agregados amiloides citoplasmáticos de MccE492, además de evaluar el efecto de estos agregados sobre la viabilidad celular. Mediante estrategias de sobreexpresión de MccE492 en presencia de distintos segmentos del clúster de producción de MccE492, se determinó que la expresión previa de MccE492 estimularía la formación de agregados amiloides intracelulares; mientras que el producto del gen *orfL* actuaría como un potenciador en la agregación al ser coexpresado con MccE492. Por otro lado, utilizando mutantes de MccE492 con distinta tendencia a la agregación, se determinó que los agregados amiloides intracelulares no afectan el metabolismo de las células productoras. Además, a través experimentos de pérdida y ganancia de función de DnaK, se estableció que ésta tiene un rol regulador en la amiloidogénesis intracelular de MccE492.

ABSTRACT.

Microcin E492 (MccE492) is an antibacterial peptide produced by the strain *Klebsiella pneumoniae* RYC492, which is encoded within a genetic cluster that also encodes gene products that allow its post-translational modification and secretion. Previous results indicate that MccE492 forms amyloid-like aggregates in the cytoplasm of *E. coli* cells when it is expressed in the presence of the genes from the production cluster, suggesting the existence of proamyloidogenic factors encoded within the cluster. The regulation of the MccE492 intracellular amyloid aggregates could be due to action of the chaperone protein DnaK, related to the solubilization of intracellular inclusions, preventing a harmful effect for the accumulator cells. The objective of this thesis was to study the influence of cellular factors in the formation of cytoplasmic amyloid aggregates of MccE492, in addition to evaluate the effect of these aggregates on the cellular viability. Through MccE492 overexpression strategies, in the presence of different segments of the MccE492 production cluster, it was determined that previous expression of MccE492 would stimulate the formation of intracellular amyloid aggregates; while the product of the *orfL* gene would act as an enhancer in the aggregation when coexpressed with MccE492. On the other hand, using MccE492 mutants with different aggregation tendency, it was determined that the intracellular amyloid aggregates do not affect the metabolism of the producing cells. In addition, through DnaK function loss and gain experiments, it was established that it has a regulatory role in intracellular MccE492 amyloidogenesis.

INDICE DE CONTENIDOS.

1. INTRODUCCION.	1
1.1. Bacteriocinas.	1
1.2. Microcina E492.	2
1.3. Actividad bactericida de la MccE492.	4
1.4. Sistema productor de MccE492 activa.	4
1.5. Formación de amiloides de MccE492.	8
1.6. Formación de amiloides intracelulares de MccE492.	9
1.7. Factores que afectan la amiloidogénesis de la MccE492.	10
1.8. Efecto de amiloides sobre el metabolismo celular.	11
1.9. Hipótesis.	13
1.10. Objetivos.	13
1.10.1. Objetivo General.	13
1.10.2. Objetivos Específicos.	13
2. MATERIALES Y METODOS.	14
2.1. Reactivos.	14
2.2. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.	14
2.3. Partidores.	14
2.4. Metodologías.	19
2.4.1. Técnicas de biología molecular.	19
2.4.2. Generación de construcciones plasmidiales.	19
2.4.3. Ensayo de inducción.	20
2.4.4. Inhibición de la actividad de DnaK.	20
2.4.5. Citometría de flujo.	20
2.4.5.1. Tinción con tioflavina-S.	20
2.4.5.2. Tinción con CTC.	21
2.4.5.3. Cuantificación de células.	21
2.4.6. Ensayo de actividad bactericida e inmunidad a MccE492.	21
2.4.7. Tiempo generacional.	22
2.4.8. Ensayo de competencia.	22

3. RESULTADOS.	23
3.1. Efecto de factores codificados en el clúster de producción de MccE492 sobre la agregación intracelular de dicha proteína.	23
3.1.1. Efecto de segmentos del clúster productor en la agregación de MccE492.	23
3.1.2. Efecto de la expresión previa del gen <i>mceA</i> en la agregación de MccE492.	33
3.1.3. Efecto del gen <i>orfL</i> en la agregación de MccE492.	39
3.2. Papel de la chaperona DnaK sobre la agregación intracelular de la MccE492.	44
3.2.1. Inhibición de DnaK.	44
3.2.2. Ganancia de función de DnaK.	49
3.3. Efecto de la formación de amiloides intracelulares de MccE492 sobre la viabilidad celular.	54
3.3.1. Efecto de la formación de inclusiones amiloides sobre el tiempo generacional.	54
3.3.2. Efecto de la formación de inclusiones amiloides sobre la actividad metabólica.	57
3.3.3. Evaluación de la posible desventaja metabólica en cultivos mixtos de células acumuladoras de inclusiones de MccE492.	61
4. DISCUSION.	66
4.1. Existen componentes del clúster génico que modulan la amiloidogénesis de la MccE492.	66
4.2. La acumulación de inclusiones amiloides de MccE492 resulta inocua para las células de <i>E. coli</i> que la expresan.	73
5. CONCLUSIONES.	76
6. REFERENCIAS.	77
7. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.	81

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Estructura y acción de la MccE492.	3
Figura 2.	Clúster génico para la producción de MccE492 activa.	5
Figura 3.	Biosíntesis, maduración y exportación de la MccE492 activa.	7
Figura 4.	Plásmidos portadores de diferentes segmentos del clúster de síntesis de MccE492.	24
Figura 5.	Inmunidad de transformantes portadoras de plásmidos con segmentos del clúster de producción de MccE492 activa.	27
Figura 6.	Actividad bactericida de cotransformantes portadoras de plásmidos con segmentos del clúster de producción de MccE492 activa y pETAB.	29
Figura 7.	Formación de amiloides intracelulares en células de <i>E. coli</i> portadoras de segmentos del clúster de producción de MccE492 cotransformadas con pETAB.	32
Figura 8.	Construcción de plásmidos portadores de variantes del gen <i>mceA</i> bajo el control de su promotor natural.	35
Figura 9.	Inmunidad y actividad bactericida de bacterias transformadas con los plásmidos pBA y pBA*.	37
Figura 10.	Efecto de pBA y pBA* sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492.	38
Figura 11.	Efecto de sobreexpresión de <i>orfL</i> sobre la agregación intracelular de la MccE492.	41
Figura 12.	Efecto de inhibición de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492.	46
Figura 13.	Efecto de la inactivación de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares en células que sobreexpresan MccE492 durante 24 horas.	48
Figura 14.	Construcción del plásmido TOPO-DnaK.	50
Figura 15.	Efecto de la sobreexpresión de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492.	52
Figura 16.	Determinación del tiempo generacional de bacterias que expresan mutantes de MccE492 con distinta tendencia a la formación de amiloides.	56
Figura 17.	Población metabólicamente activa de bacterias que expresan mutantes de MccE492.	59
Figura 18.	Efecto de la acumulación por 24 horas de amiloides intracelulares de MccE492 sobre la actividad metabólica de bacterias que los producen.	60
Figura 19.	Ensayo de competencia de bacterias que expresan mutantes de MccE492 con distinta tendencia a la agregación amiloide.	64

INDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

Figura S1.	Aumento en la población de bacterias que acumulan amiloides intracelulares producto de portar segmentos del clúster de producción de MccE492.	81
Figura S2.	Aumento en la población de bacterias que acumulan amiloides intracelulares de MccE492 producto de la expresión previa a la inducción de dicha proteína.	82
Figura S3.	Efecto de la coexpresión de MccE492 y OrfL sobre la formación de amiloides intracelulares.	83
Figura S4.	Efecto de inhibición de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492.	84
Figura S5.	Población metabólicamente activa de bacterias que expresan mutantes de MccE492.	85

INDICE DE TABLAS.

Tabla I.	Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	15
Tabla II.	Plásmidos utilizados en este trabajo.	16
Tabla III.	Partidores utilizados en este trabajo.	18

LISTA DE ABREVIATURAS.

aa:	Aminoácido.
ABC:	ATP binding cassette.
Amp:	Ampicilina.
BTA-1:	2-(4'-metilaminofenil) benzotiazol.
Cm:	Cloranfenicol.
CTC:	Cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio.
DO₆₀₀:	Densidad óptica a 600 nm.
FA:	Formaldehido.
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
Kan:	Kanamicina.
Kb:	Kilobase.
KDa:	Kilodalton.
LB:	Medio Luria Bertani.
MccE492:	Microcina E492.
ORF:	Marco abierto de lectura.
pb:	Pares de bases.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
rpm:	Revoluciones por minuto.
Sp:	Espectinomicina.
Tet	Tetraciclina.
Th-S:	Tioflavina S.
UA:	Unidades arbitrarias.
Zeo:	Zeocina.

1. INTRODUCCION.

1.1. Bacteriocinas.

Los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para la mantención de la homeostasis poblacional tales como los sistemas de defensa y de adaptación al medioambiente, entre los que se destaca la producción de agentes antimicrobianos como las bacteriocinas **(Baquero y Moreno, 1984)**.

Las bacteriocinas corresponden a un variado grupo de proteínas producidas tanto por bacterias Gram positivas como negativas, que tienen la particularidad de presentar una actividad antibacteriana sobre organismos filogenéticamente relacionados al organismo que las secreta **(Riley y Wertz, 2002)**. La variedad de mecanismos de acción de estos péptidos va desde la inhibición de la síntesis de proteínas, de la ADN girasa y de la ARN polimerasa, hasta la formación de poros en la membrana citoplasmática **(Braun y cols, 2002)**. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas se clasifican de acuerdo a su tamaño en dos tipos: las que poseen una masa superior a 10 KDa, conocidas como colicinas, y las que poseen una masa inferior a 10 KDa, denominadas microcinas **(Baquero y Moreno, 1984)**.

Las microcinas son péptidos hidrofóbicos y que presentan una alta estabilidad al calor, a pH extremos y a proteasas, siendo sintetizadas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* **(Asensio y cols, 1976; de Lorenzo y cols, 1984; Baquero y Moreno, 1984)**. Los determinantes genéticos para la síntesis de estos péptidos antimicrobianos suelen encontrarse de manera agrupada, comprendiendo por una parte un gen estructural codificante para el péptido precursor de la microcina y un gen codificante para un factor que otorga inmunidad al efecto de la toxina, además de

genes que codifican proteínas encargadas de la modificación post-traducciona del precursor y exportación de la proteína madura al medio extracelular (**Kolter y Moreno, 1992; Duquesne y cols, 2007**).

1.2. Microcina E492.

La microcina E492 (MccE492) es un péptido hidrofóbico de 7.887 Da, producido y secretado por la cepa *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (**de Lorenzo, 1984; Lagos y cols, 1999**). Esta toxina bacteriana ejerce su acción sobre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Su actividad tóxica radica en la formación de poros en la membrana citoplasmática de la célula blanco, generando una despolarización, lo que conlleva a la muerte celular (**de Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols, 1993**).

La MccE492 es sintetizada como un precursor de 99 aminoácidos, el cual presenta una organización modular en su estructura primaria (**Figura 1A**). En primer lugar, cuenta con un péptido líder correspondiente a 15 aminoácidos que son clivados del extremo N-terminal durante la exportación de la proteína madura. Este péptido cuenta con regiones N-terminal y central que determinan la actividad antibacteriana, además de una región C-terminal que puede ser modificada post-traduccionalmente, mediante la unión covalente de una molécula tipo salmoquelina, un sideróforo catecólico derivado de enterobactina, siendo reconocido por los receptores de sideróforos catecólicos de membrana externa, principalmente FepA y, en menor medida, por Fiu y Cir (**Thomas y cols, 2004; Strahsburger y cols, 2005**).



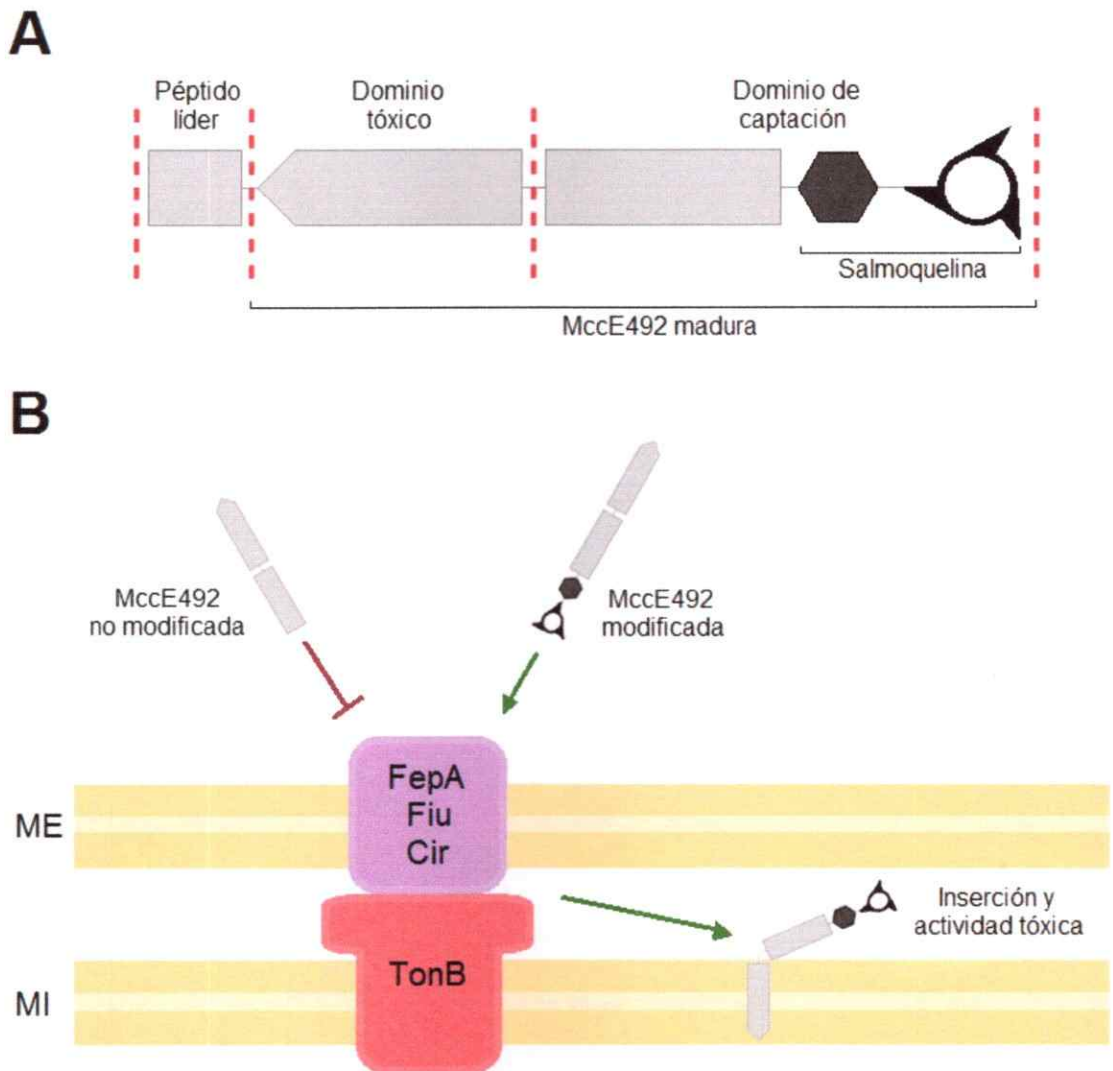


Figura 1. Estructura y acción de la MccE492. (A) Estructura modular de la MccE492. La proteína precursora cuenta con un péptido líder que es clivado en el momento de la exportación. La proteína madura está compuesta por un dominio tóxico, conformado por la región N-terminal y central del péptido, además de un dominio de captación formado por la región C-terminal de la proteína unida a la molécula de salmoquelina. (B) Actividad bactericida de la MccE492. La molécula de salmoquelina del dominio de captación de la MccE492 modificada es reconocida por los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir ubicados en la membrana externa de la célula blanco, posibilitando la translocación de la MccE492 hacia el periplasma, insertándose en la membrana citoplasmática por la acción de TonB, para luego formar un poro que produce la muerte celular. La MccE492 no modificada, al no ser reconocida por los receptores, no es internalizada, por lo que carece de actividad bactericida. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna. (Modificado de Lagos y cols, 2009)

1.3. Actividad bactericida de la MccE492.

La modificación en el extremo C-terminal de la MccE492 es necesaria para la translocación al periplasma. Mediante una estrategia denominada "caballo de Troya", esta toxina es reconocida por los receptores de sideróforos catecólicos de membrana externa, emulando un compuesto necesario para la célula (**Figura 1B**). La MccE492 ingresa al periplasma y ahí interactúa con el complejo transductor de energía TonB-ExbB-ExbD, para insertarse en la membrana de la célula blanco (**Destoumieux-Garzón y cols, 2003; Fishbach y cols, 2006**). La proteína TonB también participa en el transporte de compuestos como sideróforos y vitamina B12 (**Larsen y cols, 2003; Postle y Larsen, 2007**). Una vez en la membrana, la MccE492 produce su efecto tóxico, mediante la formación de poros, lo que se ha determinado mediante experimentos *in vitro* en liposomas (**Bignon, 2015**). Esto se condice con la actividad de la MccE492 de despolarizar la membrana de la célula blanco, lo que conlleva a la muerte celular (**De Lorenzo y Pugsley, 1985; Lagos y cols, 1993; Destoumieux-Garzón y cols, 2003**).

1.4. Sistema productor de MccE492 activa.

La MccE492 junto con las proteínas responsables de su modificación y exportación, se encuentran codificadas en un clúster de genes de alrededor de 13 Kb localizado en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 (**Figura 2**), el cual, a su vez, se encuentra dentro de una isla genómica de 23 Kb (**Marcoleta y cols, 2013a; Gonzalo Núñez, resultados no publicados**). Este clúster génico, compuesto por alrededor de 15 marcos abiertos de lectura, fue clonado en el cosmidio pHc79, para luego ser expresado en *Escherichia coli* (**Wilkins y cols, 1997**). Dentro de éste clúster

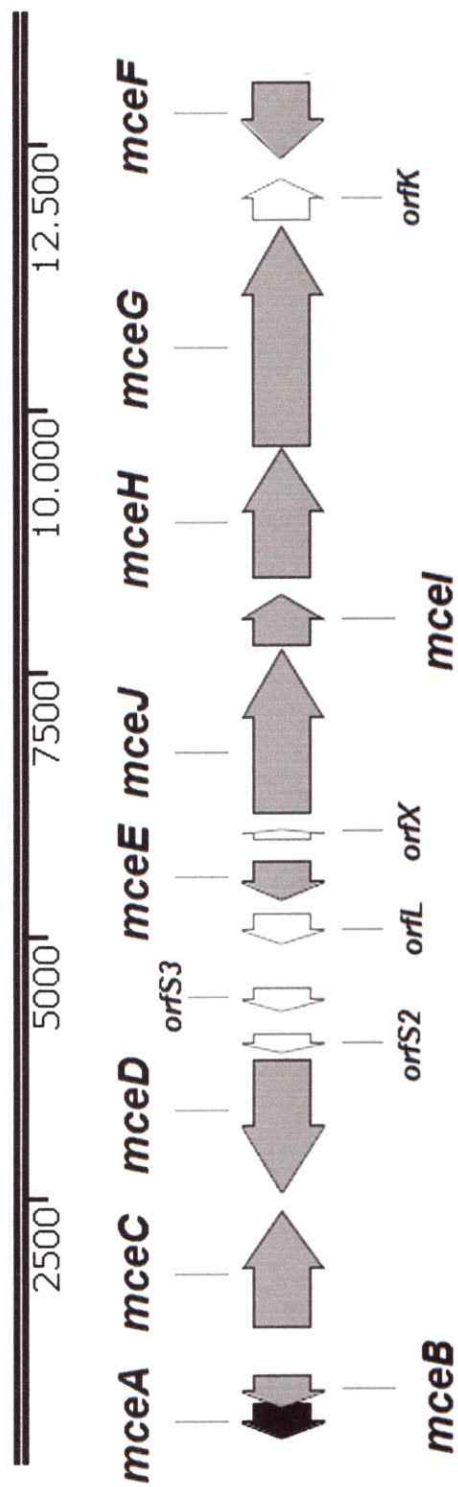


Figura 2. Clúster génico para la producción de *MccE492* activa. Los determinantes genéticos necesarios para la producción de *MccE492* activa se encuentran agrupados en un clúster de 13 Kb localizado en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Las flechas de color gris corresponden a genes descritos, mientras que las flechas de color blanco corresponden a marcos abiertos de lectura no caracterizados. La flecha negra corresponde al gen que codifica para el precursor de la *MccE492*. La dirección de las flechas corresponde a la dirección de transcripción de los genes.

se encuentra el gen *mceA*, que codifica el precursor estructural de la MccE492; y el gen *mceB* que codifica la proteína que otorga inmunidad a la célula productora. Estos genes forman una única unidad transcripcional, donde las últimas 14 bases del gen *mceB* se sobreponen con las primeras 14 bases del gen *mceA* (Lagos y cols, 1999).

Dentro del mismo clúster se encuentran codificadas proteínas responsables de la modificación post-traducciona de la MccE492 (MceC, MceD, MceI y MceJ). MceC es una glicosil transferasa cuya función es sintetizar la salmoquelina mediante la glicosilación del precursor enteroquelina, la cual es un sideróforo sintetizado por el sistema Ent (Figura 3). Por otra parte, MceD es una salmoquelina-esterasa que hidrolizaría la molécula de salmoquelina, aunque su papel sobre la acción de la MccE492 aún se desconoce. MceI y MceJ actúan formando un complejo que cataliza la unión covalente de la molécula de salmoquelina al último residuo (serina) del extremo C-terminal de la MccE492 (Lagos y cols, 2001; Nolan y cols, 2007).

Por otra parte, el gen *mceE* codifica una proteína cuya función aún se desconoce, pero presenta identidad con una proteína del sistema de la microcina H47, denominada MchS4, que estimula la síntesis de enteroquelina (Lagos y cols, 2009). El gen *mceF* codifica una potencial proteasa transmembrana, cuya función aún se desconoce (González, 2011).

Además, dentro del clúster se encuentran codificadas proteínas implicadas en la exportación de la MccE492 (Figura 3) tales como MceG, correspondiente a un transportador tipo ABC que, acompañado con la proteína accesoria MceH y la proteína de membrana externa TolC, exportan la proteína MccE492 al espacio extracelular y cortan el péptido líder de la proteína inmadura (Lagos y cols, 2001).

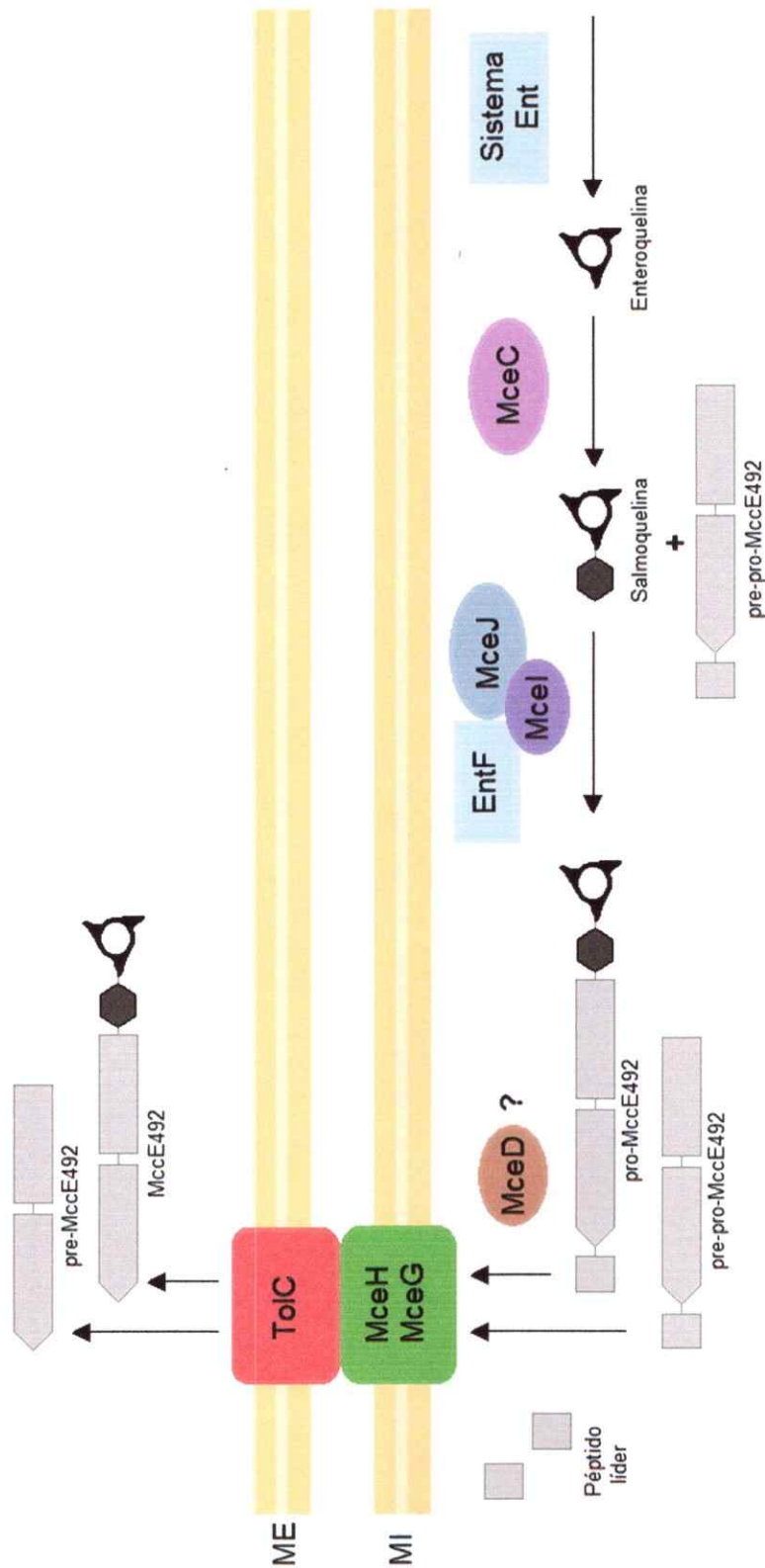


Figura 3. Biosíntesis, maduración y exportación de la MccE492. La MccE492 es sintetizada como un precursor que puede ser modificado post-traduccionalmente mediante la unión covalente de una molécula de salmoquelina en su extremo C-terminal por el complejo MceIJ. Esta molécula tipo salmoquelina es sintetizada por MceC a partir de la glicosilación de enteroquelina producida por el sistema Ent. Tanto la MccE492 modificada como la no modificada poseen un péptido líder que es clivado, siendo concomitantemente exportada al espacio extracelular mediante el sistema MceG-MceH-TolC. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna. **(Modificado de Lagos y cols, 2009)**

Por otra parte, existe una serie de marcos abiertos de lectura sin función conocida, pero que se asemejan a componentes de sistemas productores de bacteriocinas. OrfK presenta identidad a la proteína estructural y de inmunidad de MccM. OrfL tiene similitudes con la microcinas E492, H47 y M, especialmente en el C-terminal, donde se produce la modificación con salmoquelina. Los genes *orfS2* y *orfS3* codificarían proteínas truncas equivalentes a MccI47 y su inmunidad. Finalmente, el gen *orfX* es similar a *mchX*, que codifica una proteína que regularía genes involucrados en la producción de MccH47 (Lagos y cols, 2009).

1.5. Formación de amiloides de MccE492.

El amiloide es un tipo de estructura cuaternaria donde distintas zonas de una proteína interactúan de manera intra e intermolecular, formando hebras β ubicadas perpendicularmente al eje de la fibra, las cuales interactúan entre sí mediante puentes de hidrógeno, originando un motivo estructural llamado cross- β (Chiti y Dobson, 2006; Fowler y cols, 2007). Se ha propuesto que éste corresponde al estado termodinámicamente más estable para una proteína. Entre sus principales características se encuentran la unión específica de sondas como la tioflavina-T y el rojo Congo, además de una alta resistencia a la denaturación y a la proteólisis (Chiti y Dobson, 2006; Toyama y Weissman, 2011).

La MccE492 se produce en forma activa durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano, perdiendo su actividad en la fase estacionaria, a diferencia de otras microcinas (de Lorenzo, 1985). Esta pérdida de actividad se ha asociado con la propensión de la MccE492 de formar fibras amiloides. Tanto experimentos *in vitro* con proteína purificada como en estudios *in vivo* en cultivos de células productoras de

MccE492, han demostrado que esta toxina existe en dos formas en el espacio extracelular, como monómeros u oligómeros solubles que poseen una estructura mayoritariamente desordenada, y como fibras amiloides insolubles que presentan una estructura de hoja β . Estas fibras están compuestas tanto por MccE492 modificada como no modificada, sin embargo, la forma no modificada se incorpora más eficientemente a las fibras. Se ha propuesto que la formación de fibras amiloides podría corresponder a un mecanismo modulador de la toxicidad de la MccE492 (Bieler y cols, 2005; Arranz y cols, 2012; Marcoleta y cols, 2013b).

1.6. Formación de amiloides intracelulares de MccE492.

Estudios recientes han revelado que la formación de amiloides de MccE492 no se restringe al medio extracelular. En efecto, se ha demostrado que células bacterianas que expresan la MccE492 acumulan inclusiones amiloides en el citoplasma (Aguilera, 2015). La formación de agregados amiloides intracelulares ha sido previamente reportada para el caso de la proteína RepA, involucrada en la replicación del plásmido pPS10 en *Pseudomonas*. El dominio WH1 de dicha proteína forma agregados amiloides en el citoplasma de células de *E. coli* que la expresan, en presencia de segmentos de ADN que la inducen, para la proteína silvestre, y en ausencia de éstos para la mutante hiperamiloidogénica WH1-A31V (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004; Fernández-Tresguerres y cols, 2010; Giraldo y cols, 2011).

Para el caso de MccE492, mediante la generación de mutantes del gen estructural de la MccE492, se obtuvieron variantes con distinta propensión a la agregación: la mutante hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$ y las mutantes hiperamiloidogénicas P57A y P59A; demostrándose que el efecto amiloidogénico de

este péptido es dependiente de su secuencia aminoacídica, e identificando residuos clave que modulan este proceso (Aguilera, 2015).

1.7. Factores que afectan la amiloidogénesis de MccE492.

Se ha demostrado mediante citometría de flujo y microscopía confocal, que al sobreexpresar el gen estructural de MccE492 de manera inducible en presencia del plásmido np220, que contiene todos los genes para la producción y exportación de MccE492 activa salvo el gen estructural, se obtiene una mayor proporción de células que acumulan amiloides intracelulares que en ausencia de estos genes. Estos resultados sugieren fuertemente que existiría un factor en particular, codificado en el clúster, responsable de promover la agregación de esta proteína, el cual aún no se ha identificado (Aguilera, 2015).

Con respecto a los factores celulares proamiloidogénicos no codificados en el clúster de MccE492, se desconoce cuáles podrían regular la formación de inclusiones amiloides de esta proteína. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado en el caso de RepA, la chaperona DnaK juega un rol preponderante en la regulación de la formación de inclusiones amiloides de esta proteína (Gasset-Rosa y cols, 2014). DnaK es el equivalente bacteriano de las chaperonas eucariontes de la familia Hsp70 y trabaja junto con GrpE (factor de intercambio de nucleótidos) y DnaJ (equivalente a Hsp40). Las funciones de esta familia de proteínas incluyen el replegado y solubilización de agregados proteicos, así como la estabilización de intermediarios de plegamiento en el ensamblaje de complejos macromoleculares (Mayer y Bukau, 2005). Existe evidencia que DnaK es requerida en etapas tempranas de desagregación y para la reactivación de péptidos desde agregados proteicos amorfos producidos por temperatura

(Weibezahn y cols, 2004; Zietkiewicz y cols, 2006). Por estos antecedentes, se propone que esta chaperona bacteriana también podría tener un rol en la regulación de la formación de amiloides de MccE492.

1.8. Efecto de amiloides sobre el metabolismo celular.

La conversión de una proteína normalmente soluble a agregados amiloides ha cobrado gran importancia en los últimos años en la medicina, debido a que existe una creciente evidencia que sustenta que la aglomeración anómala de proteínas en estructuras amiloides insolubles se asocia a trastornos humanos debilitantes, como lo son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y diabetes tipo II (Chiti y Dobson, 2006). De hecho, a la fecha existen alrededor de 50 trastornos, con diversos síntomas, que se encuentran asociados al mal plegamiento de proteínas y su conversión en agregados, siendo los más comunes las fibras amiloides (Knowles y cols, 2014).

Por otro lado, en bacterias, específicamente para el caso de la proteína amiloidogénica RepA, la presencia de agregados de naturaleza amiloide de manera intracelular en la células productoras genera una proteinopatía que se traduce en una disminución en la velocidad de duplicación celular, que adicionalmente es heredable, debido a que estos agregados pueden ser transmitidos verticalmente (Fernández-Tresguerres y cols, 2010; Giraldo y cols, 2011). En contraste, existen proteínas cuyo rol biológico depende de la formación de fibras amiloides, como es el caso la proteína curli, producida por *Escherichia coli* y *Salmonella*, que forma una matriz extracelular que permite la colonización de superficies de las bacterias productoras; y la proteína TasA, de *Bacillus subtilis*, que forma fibras amiloides que participan en la generación

de biofilms. Esto indica que la amiloidogénesis puede tener un papel funcional, y no necesariamente resulta nociva para las bacterias (Chapman y cols, 2002; Fowler y cols, 2007; Romero y cols, 2010). Es por esta suma de factores que se desconoce si la presencia de agregados de naturaleza amiloide de la proteína MccE492 de manera intracelular afecta de alguna manera el metabolismo de la célula que los acumula, convirtiéndose en un punto importante a estudiar.

1.9. Hipótesis.

Existen factores codificados dentro del clúster de producción de MccE492 que favorecen la formación de amiloides intracelulares de dicha proteína, y factores celulares como la chaperona DnaK que desfavorecen la formación de estas estructuras.

1.10. Objetivos.

1.10.1. Objetivo General:

Estudiar la influencia de factores celulares y codificados en el clúster de producción de MccE492 sobre la formación de amiloides citoplasmáticos de microcina, y cómo estos afectan la viabilidad celular.

1.10.2. Objetivos Específicos:

1. Analizar el efecto proamiloidogénico de factores codificados en el clúster de producción de MccE492 sobre la agregación intracelular de esta proteína.
2. Determinar el rol de la chaperona DnaK sobre la agregación intracelular de la MccE492.
3. Evaluar el efecto de los amiloides intracelulares de MccE492 sobre la viabilidad de las células que los acumulan.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Reactivos.

Se utilizaron reactivos de calidad adecuada para las técnicas de biología molecular realizadas, obtenidos de las empresas y marcas registradas: New England BioLabs Inc, Invitrogen, Winkler Ltda, Omega Bio-Tek, MO BIO Laboratories, Inc, Sigma Chemical Co, Merck Millipore, BioRad Laboratories Inc, Fermelo Biotec, BD Becton, Dickinson and Company, TCL, US Biological, Andrómaco S.A, Benguerel Ltda.

2.2. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* transformadas con diversos plásmidos, los cuales se describen en la **Tabla I** y **Tabla II**, respectivamente.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano fueron el medio Luria-Bertani (LB: triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5% y NaOH 3,5 mM) y medio mínimo suplementado (M9 suplementado: Na₂HPO₄ 0,6%, KH₂PO₄ 0,3%, NaCl 0,05%, NH₄Cl 0,1%, glucosa 0,2%, citrato de sodio 0,2%, casaminoácidos 0,1%, MgSO₄ 1mM, tiamina 1µg/mL, CaCl₂ 0,1 mM. Para el crecimiento en medio sólido se adicionó Agar-agar 1,5% al medio líquido. Se realizó la selección mediante los siguientes antibióticos: ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, espectinomicina 100 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL. Se realizó la inducción de la expresión génica adicionando arabinosa 0,2% y/o IPTG 1mM.

2.3. Partidores.

Los partidores para amplificación de ADN plasmidial utilizados durante este trabajo son detallados a continuación en la **Tabla III**.

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

Cepa de <i>E. coli</i>	Características	Fuente
DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Promega
BL21 (DE3) AI	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>araB::T7RNAP</i> <i>tetA</i>	Invitrogen

Tabla II. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente o Referencia
p33AM	Derivado de pACYC184. Contiene el gen <i>lacI^q</i> , lo que permite regular genes asociados al sistema pET. (Cm ^r)	Colección laboratorio
p33pETAB	Derivado de p33AM. Contiene el sistema pETAB (<i>mceA</i> silvestre). También contiene el gen <i>lacI^q</i> .(Cm ^r)	Aguilera, 2015
p33pETAB Δ54-63	Derivado de p33pETAB. Contiene el sistema pETAB con una mutación por delección en <i>mceA</i> , codificando una MccE492 hipoamiloidogénica que carece de los residuos 54-63. (Cm ^r)	Aguilera, 2015
p33pETAB P57A	Derivado de p33pETAB. Contiene el sistema pETAB con una mutación puntual en <i>mceA</i> , codificando una MccE492 hiperamiloidogénica con una sustitución de la prolina 57 por una alanina (Cm ^r)	Aguilera, 2015
p33pETAB P59A	Derivado de p33pETAB. Contiene el sistema pETAB con una mutación puntual en <i>mceA</i> , codificando una MccE492 hiperamiloidogénica con una sustitución de la prolina 59 por una alanina (Cm ^r)	Aguilera, 2015
pHC79	Cosmidio de propósito general. (Amp ^r , Tet ^r)	Hohn y Collins, 1980
pJI	Derivado de pJAM434. Contiene una delección con <i>BsfVI</i> de 6,8 Kb. Contiene los genes <i>mceABCDE</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
pJRSI	Derivado de pJAM229. Contiene una delección en el gen <i>mceF</i> y <i>mceG</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
npB4	pJEM15 <i>mceC::Tn5</i> . Inserción en el aa 60. pJEM15 es derivado de pJAM229, posee doble copia de <i>mceF</i> . (Amp ^r , Kan ^r)	Colección laboratorio
pJIE291	Derivado de pJAM434. Formado por la religación de 3 fragmentos <i>EcoRI</i> . Contiene los genes <i>mceCDE</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
pA40	Derivado de pJAM229, proviene de la religación de un fragmento de 16 Kb digerido con <i>EcoRI</i> , posee los genes <i>mceF</i> y parte del gen <i>mceG</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
pJIC4	Derivado de pJAM434. Contiene los genes <i>mceDE</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
pJAM434	Derivado de pJAM229. Posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido respecto a pJAM229. Produce microcina activa. (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
pJAM229	Plásmido que tiene los genes para la producción de microcina activa. Construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosomal de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> . (Amp ^r)	Wilkins y cols, 1997
np220	Derivado de pJAM434. Posee una inserción del transposón Tn5 en el gen estructural de la MccE492. (Amp ^r , Kan ^r)	Lagos y cols, 2001
pMccE492	Derivado de pJRS1. Lleva en el sitio <i>SalI</i> un fragmento de 1640 pb que corresponde a los 5 últimos aminoácidos de <i>mceG</i> , y a los genes <i>orfK</i> y <i>mceF</i> . Contiene todos los genes del clúster de la microcina y produce microcina activa. (Amp ^r)	González, 2011

Tabla II. (Continuación)

Plásmido	Características	Fuente o Referencia
pBAML	Derivado de pACYC184. Contiene los genes <i>mceBA</i> bajo el promotor natural de la MccE492. (Cm ^r)	Colección laboratorio
pBA	Derivado de pH79. Contiene un fragmento correspondiente a los genes <i>mceBA</i> proveniente de pBAML. (Amp ^r)	Este trabajo
pBA*	Derivado de pH79. Contiene un fragmento correspondiente a los genes <i>mceB</i> y <i>mceA</i> trunco proveniente de np220. (Amp ^r)	Este trabajo
pBB535	Derivado de pZA4. Contiene los genes <i>dnaK</i> y <i>dnaJ</i> bajo el control del promotor P _{A1/lacO-1} . Contiene el gen <i>lac^q</i> . (Sp ^r)	Tomoyasu y cols, 2001
PCR Blunt II-TOPO	Plásmido de ligación. Presenta la enzima topoisomerasa I del virus <i>Vaccinia</i> unida covalentemente al extremo 3' de cada hebra de ADN, interrumpiendo el gen LacZα-ccdB. (Zeo ^r , Kan ^r)	Invitrogen
TOPO DnaK	Derivado de PCR Blunt II-TOPO. Contiene un fragmento correspondiente al gen <i>dnaK</i> con el promotor P _{A1/lacO-1} inducible por IPTG, proveniente de pBB535. (Zeo ^r , Kan ^r)	Este trabajo
pUC57*	Equivalente a pUC57. Contiene un fragmento no traducible. (Amp ^r)	Aguilera, 2015
pUC57 pETAB	Derivado de pUC57. Contiene el sistema pETAB con los genes <i>mceA</i> y <i>mceB</i> bajo el control del promotor T7 con sitio operador <i>lac</i> . (Amp ^r)	Aguilera, 2015
pBAD33	Derivado de pBAD18 con origen de replicación p15A de pACYC184. Presenta el promotor P _{BAD} inducible por arabinosa. (Cm ^r)	Guzmán y cols, 1995
pBAD33 <i>orfL</i>	Derivado de pBAD33. Contiene un fragmento que contiene al gen <i>orfL</i> comandado por el promotor P _{BAD} . (Cm ^r)	Núñez, 2012

Tabla III. Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amp (pb)	Función
p33AM FW1	ATGCTTCCGGCTCGTATGTT	56,8	1112	Secuenciación de p33pETAB. Utilizados en ensayo de competencia.
p33AM RV1	GCTCTTGATCCGGCAAACAA	56,0		
DnaK FW	CCCGGGCGATGGTGTCAACGTAATGC	65,3	2145	Amplificación del gen <i>dnaK</i> de pBB535.
DnaK RV	CCCGGGAGAGGAAATCCCCTTCG	65,2		

Tm: Temperatura de melting; *Amp*: Amplicón.

2.4. Metodologías.

2.4.1. Técnicas de biología molecular.

Las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo, tales como digestiones con enzimas de restricción, ligación de fragmentos de ADN, preparación y transformación de células electrocompetentes, y PCR, se realizaron mediante protocolos estandarizados (**Sambrook y cols, 1989**). La extracción del ADN plasmidial se realizó mediante el Kit Plasmid DNA Mini I (**Omega Bio-Tek**). La purificación de las bandas del ADN desde geles de agarosa se realizó mediante el Kit UltraClean 15 DNA Purification (**MO BIO Laboratories, Inc**).

2.4.2. Generación de construcciones plasmidiales.

Para la construcción de los plásmidos que portan el gen de inmunidad y estructural de la microcina E492 comandados por su promotor natural, se digirió los plásmidos pBAML y np220 utilizando la enzima de restricción *Bam*HI. Esta digestión liberó los fragmentos que contienen los genes *mceB* y *mceA* para pBAML, mientras que para el caso de np220 se obtuvo un fragmento que contiene el gen *mceB* y el gen *mceA* interrumpido por el transposón Tn5. Estos fragmentos fueron ligados con el plásmido pH79 previamente linealizado mediante la digestión con *Bam*HI.

El plásmido TOPO-DnaK fue construido a partir de la amplificación por PCR del gen *dnaK* y el promotor $P_{A1/lacO-1}$, utilizando como templado el plásmido pBB535 con los partidores indicados en la **Sección 2.3**. El fragmento obtenido fue clonado en el plásmido pCR Blunt II-TOPO utilizando el Kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (**Invitrogen**).

2.4.3. Ensayo de inducción.

Se inocularon 15 mL de LB más el respectivo antibiótico, con una dilución 1:20 de cultivo de noche de las cepas a estudiar. Se crecieron a 37°C y 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,6. Se colectaron 5 mL en 2 tubos Falcon de 15 mL, uno de los cuales fue inducido agregando arabinosa 0,2% e IPTG 1mM final. Se dejó creciendo con agitación a 37°C durante 5,5 h. Se midió la DO₆₀₀ y se colectó una alícuota para protocolos de fijación y tinción para citometría de flujo.

2.4.4. Inhibición de la actividad de DnaK.

Para inhibir la actividad de DnaK se inocularon 20 mL de LB más el respectivo antibiótico, con una dilución 1:20 de cultivo de noche de las cepas a estudiar. Se crecieron a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5-0,6. Se colectaron 5 mL en 4 tubos Falcon de 15 mL, dos de los cuales fueron inducidos agregando arabinosa 0,2% e IPTG 1mM. A una de las muestras inducidas y a otra sin inductor se les agregó miricetina 15 µg/mL. Se dejó creciendo con agitación a 37°C durante 5,5 h. Se midió la DO₆₀₀ y se colectó una alícuota para ser analizada mediante citometría de flujo.

2.4.5. Citometría de flujo.

2.4.5.1. Tinción con tioflavina-S.

Se colectaron 500 µL de cultivo y se centrifugó a 1.100 g por 4 min. El precipitado bacteriano se lavó 2 veces con 500 µL de buffer PBS y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en 250 µL de tioflavina-S (Th-S) 0,05% en etanol 12,5%. Luego de la incubación con Th-S se lavaron las células 3 veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en PBS para luego ser analizadas mediante citometría de flujo.

2.4.5.2. Tinción con CTC.

Se determinó la actividad metabólica de las cepas acumuladoras de amiloides mediante la tinción vital CTC que forma parte del Kit BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality (Invitrogen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

2.4.5.3. Cuantificación de células.

La detección y análisis de las células teñidas se realizó utilizando un citómetro de flujo BD FACSCanto™ II. Se realizó un *gating* de las células por señales de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). Se analizaron 10.000 células por muestra. Para la determinación de la cantidad de células positivas a la tinción, en todas las mediciones se fijó el límite superior de fluorescencia considerada como negativa utilizando una muestra sin inducir, a excepción de los experimentos con *orfL* donde se utilizó una muestra transformada con ambos plásmidos vacíos. La detección de fluorescencia de Th-S fue realizada excitando con una longitud de onda de 405 nm y detectando la emisión a 510/50 nm. La detección de fluorescencia de CTC fue realizada excitando con una longitud de onda de 450 nm y detectando la emisión a 630 nm. Los análisis estadísticos se basaron en el software Prism 6 (GraphPad) con un t-test pareado de dos colas ($p < 0,05$).

2.4.6. Ensayo de actividad bactericida e inmunidad a MccE492.

Para la determinación de la actividad bactericida de las distintas cepas productoras de MccE492, se generó un césped bacteriano mezclando 300 μ L de un cultivo líquido en fase exponencial de una cepa de *E. coli* sensible a MccE492 con 3 mL de medio LB Agar-agar 0,7% fundido y se vertió sobre una placa de LB sólido con el antibiótico correspondiente, arabinosa 0,2% e IPTG 1mM. Se picaron colonias de las

cepas productoras sobre estas placas y se incubaron a 37°C durante 4 h. Se determinó la presencia de halos de inhibición de crecimiento. Para la determinación de la inmunidad a MccE492, se generó un césped de la cepa a analizar de la manera señalada anteriormente. Se picaron sobre la placa colonias de la cepa BL21AI pMccE492. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 h y se determinó la ausencia de halos de inhibición.

2.4.7. Tiempo generacional.

Para la determinación del tiempo generacional, las cepas a analizar fueron crecidas en medio M9 suplementado e inducidas desde tiempo cero con arabinosa 0,2% e IPTG 1mM. Se incubaron a 37°C con agitación (150 rpm) y se midió la DO₆₀₀ en función del tiempo. Los resultados fueron analizados utilizando en software Prism 6 (**GraphPad**) de modo de calcular el tiempo generacional de cada cepa.

2.4.8. Ensayo de competencia.

Para evaluar el posible efecto nocivo sobre el metabolismo celular que causaría la acumulación de inclusiones amiloides, se transformó cepas de *E. coli* con el plásmido p33pETAB que expresa la MccE492 silvestre o variantes de la misma. Se utilizaron cultivos de noche de dos de las cepas a estudiar en cada ensayo para inocular (1:2000) en 20 mL de medio LB con arabinosa 0,2% e IPTG 1mM. El cultivo mixto fue crecido durante 16 h a 37°C con agitación. Posteriormente, se realizó una purificación de ADN plasmidial y se secuenció la región correspondiente a *mceA* utilizando los partidores indicados en la **Sección 2.3**.

3. RESULTADOS.

3.1. Efecto de factores codificados en el clúster de producción de MccE492 sobre la agregación intracelular de dicha proteína.

3.1.1. Efecto de segmentos del clúster productor en la agregación de MccE492.

Como fue mencionado anteriormente, al inducir la síntesis de MccE492 en presencia del plásmido np220, se genera un aumento en la formación de agregados amiloides intracelulares de MccE492, evidenciado por el aumento en la población celular positiva a la sonda Th-S, analizada mediante citometría de flujo. Este fenómeno también fue evaluado con la sonda BTA-1, que tiñe los agregados en el citoplasma de las células productoras, visualizados por microscopía confocal (Aguilera, 2015). Debido a que np220 contiene todos los genes para la producción y exportación de MccE492 activa a excepción del gen estructural, se propuso la búsqueda de algún factor codificado en el clúster génico que genere un efecto sobre la formación de amiloides intracelulares de esta proteína.

Para analizar el efecto que presentan los distintos componentes del clúster de producción de microcina, se utilizaron 10 plásmidos previamente construidos en el laboratorio en base al cosmidio pHc79, que cuentan con distintos segmentos provenientes de este clúster y comprenden distintos genes involucrados en la síntesis de MccE492. Los plásmidos que portan los segmentos del clúster se encuentran esquematizados en la **Figura 4**. pMccE492 presenta la totalidad de los genes del clúster requeridos para la producción de MccE492 activa. pJAM229 presenta todos los genes con la excepción de un segmento digerido por *Sall* del gen *mceF*. pJAM434 posee una inversión de un fragmento flanqueado por *BsfVI* que comprende los genes

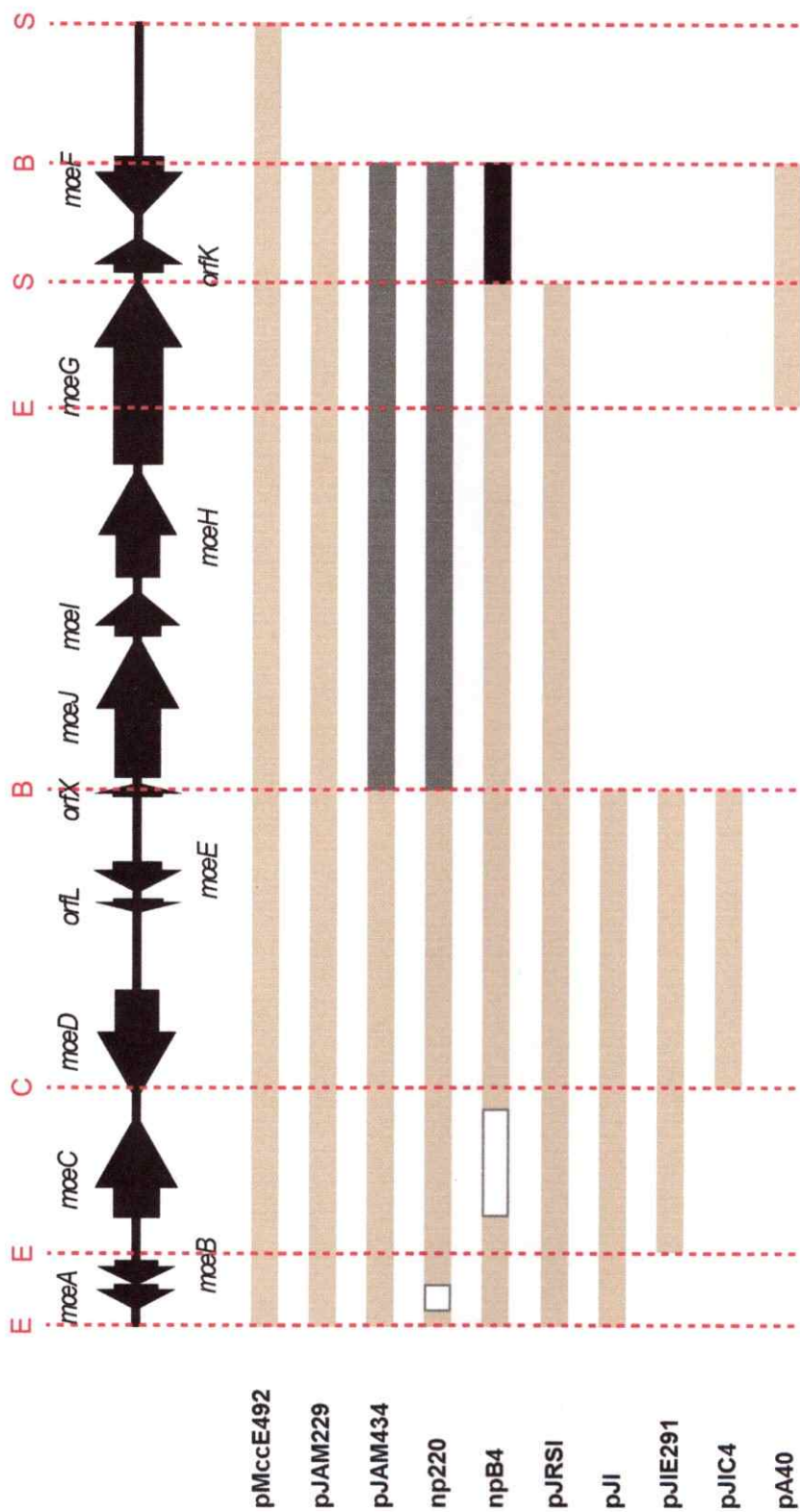


Figura 4. Plásmidos portadores de diferentes segmentos del clúster de síntesis de MccE492. Los plásmidos fueron contruidos ligando fragmentos de ADN genómico de *K. pneumoniae* RYC492 cortados con distintas enzimas de restricción (Wilkins y cols, 1997). Las flechas negras indican la ubicación de los distintos genes del clúster. Los segmentos del clúster presentes en cada plásmido se indican con líneas de color gris. Los rectángulos blancos gris oscuro presentes en pJAM434 y np220 corresponden a inversiones del segmento de ADN señalado. Los rectángulos blancos en np220 y npB4 indican interrupciones de los genes ahí ubicados mediante el transposón Tn5. El rectángulo negro en npB4 indica una triplicación del segmento marcado. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción con líneas punteadas de color rojo. E: EcoRI, C: ClaI, B: BstVI, S: Sall.

mceJ, *mceI*, *mceH*, *mceG*, *orfK*, *orfX* y *mceF*. En esta configuración, estos dos últimos genes se encuentran interrumpidos, lo que genera una disminución en la producción de MccE492 activa (Wilkens y cols, 1997). El plásmido np220 fue construido a partir de pJAM434 y presenta esta misma inversión además de una interrupción en el gen estructural de la microcina *mceA* por el transposón Tn5. El plásmido npB4 fue construido a partir del plásmido pJEM15 que posee una triple copia del gen *mceF* y es sobreproductor de microcina activa. npB4 posee además una interrupción del gen *mceC* por el transposón Tn5 y, por ende, no produce microcina activa. El plásmido pJRSI fue construido a partir de pJAM229 y presenta una delección en el C-terminal de *mceG*, además de todo *orfK* y *mceF*. El plásmido pJI fue construido a partir de pJAM434 y posee una delección de los genes *orfX*, *mceJ*, *mceI*, *mceH*, *mceG*, *orfK* y *mceF*. Los plásmidos pJIE291 y pJIC4 también son derivados de pJAM434. El primero posee los genes *mceC*, *mceD*, *orfL* y *mceE*, mientras que el segundo únicamente *mceD*, *orfL* y *mceE*. Finalmente, pA40 fue construido a partir de pJAM229 y presenta un segmento que comprende los genes *orfK* y *mceF*, además de un segmento no funcional del gen *mceG*.

Para corroborar que los distintos plásmidos se comporten de acuerdo a lo esperado según los genes que portan, en primera instancia se determinó la expresión de la inmunidad a MccE492 de las cepas bacterianas transformadas con dichos plásmidos. Para esto se realizó un ensayo que consiste en la generación de un césped bacteriano correspondiente a cada una de las cepas portadoras de los diferentes plásmidos con los distintos segmentos del clúster de producción de microcina activa. Cada césped fue generado inoculando un cultivo líquido en LB-Agar blando fundido. Éste fue luego esparcido sobre una placa de LB sólido con el antibiótico

correspondiente. Posteriormente, se picaron colonias de la cepa transformada con pMccE492 sobre la placa, las cuales fueron crecidas a 37°C durante 4h y luego analizadas. La cepa portadora de pMccE492 produce y exporta microcina activa de manera constitutiva y, por ende, existe MccE492 en el medio que rodea al lugar de la placa donde esta cepa fue picada. Al ser picada sobre un césped bacteriano, las células presentes en éste se encuentran en contacto con la MccE492. De encontrarse en presencia de un césped proveniente de una cepa sensible a la acción de MccE492, esta toxina genera muerte celular, produciéndose un halo de inhibición de crecimiento. Por el contrario, si la colonia portadora de pMccE492 es picada sobre un césped inmune a la acción de MccE492, es decir, producto de una transformación con un plásmido portador del gen de la inmunidad *mceB*, no existe un halo de inhibición. Para el caso de las cepas portadoras de los plásmidos analizados en este trabajo, los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 5**. De acuerdo a lo esperado, la cepa transformada con pMccE492 es inmune a la MccE492, por poseer todos los genes del clúster. Por otro lado, se puede apreciar que la cepa transformada con el plásmido sin inserto (pHC79) presenta sensibilidad a MccE492, evidenciado por la aparición del halo de inhibición. Este plásmido fue utilizado como control negativo pues no posee ninguno de los genes del clúster. Las cepas pJAM229, pJAM434, np220, npB4, pJRSI y pJI no presentan halo de inhibición en la placa en presencia de la cepa pMccE492. Este resultado se condice con lo esperado pues, como se puede ver en la **Figura 4**, todos estos plásmidos poseen el gen *mceB*. Por su parte, las cepas pJIE291, pJIC4 y pA40 son sensibles a la toxina en el medio, evidenciándose por la presencia de marcados halos de inhibición en el césped. En la **Figura 4** se puede observar que todos estos plásmidos carecen del segmento que contiene al gen *mceB*, por lo que es consistente con la falta de inmunidad.

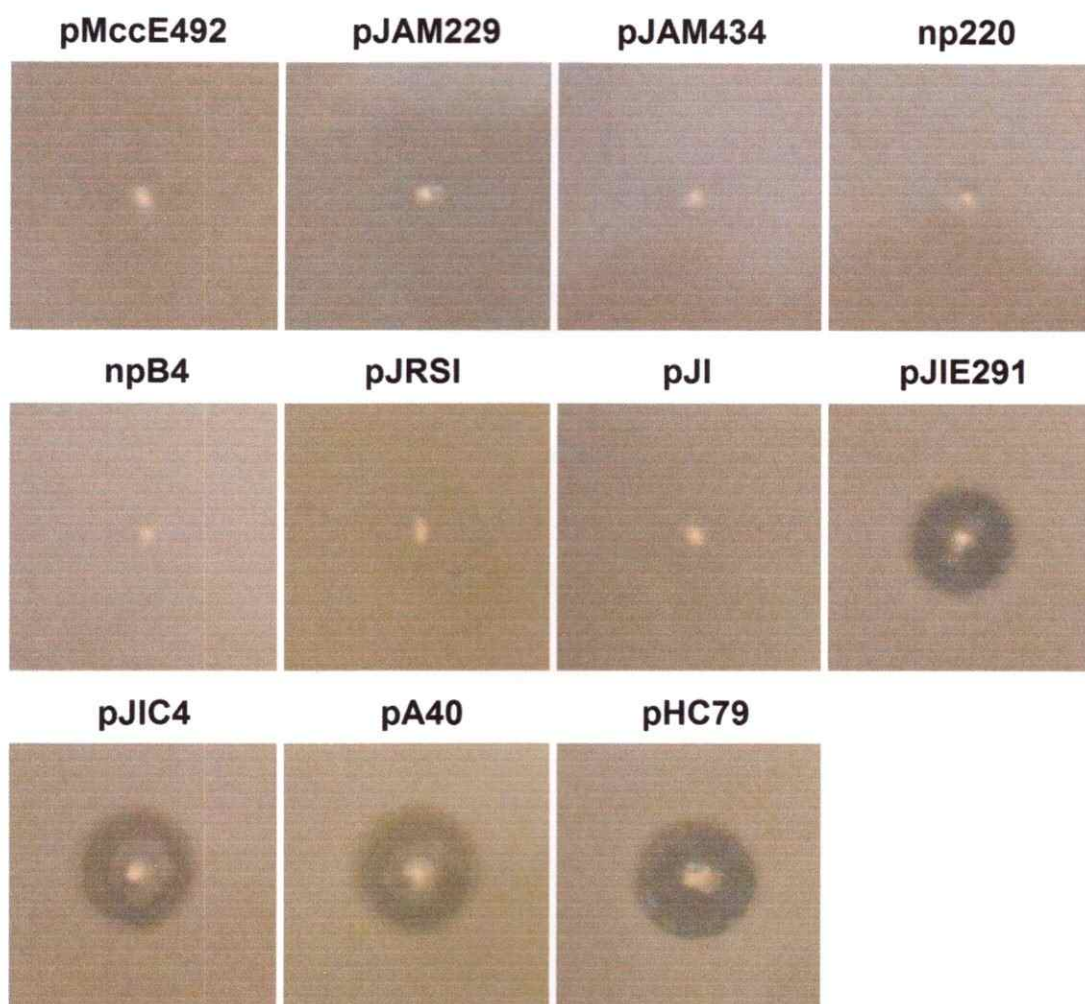


Figura 5. Inmunidad de transformantes portadoras de plásmidos con segmentos del clúster de producción de MccE492 activa. Se realizó un césped de las bacterias portadoras de los distintos plásmidos con segmentos del clúster y, sobre éste, se picaron colonias de bacterias transformadas con pMccE492, que posee el clúster completo de síntesis de MccE492 proveniente de *K. pneumoniae* RYC492 y, por lo tanto, produce y exporta MccE492 activa de manera constitutiva. Se utilizó la transformante pMccE492 como control positivo y la transformante con el plásmido pHC79 vacío fue utilizada como control negativo. De existir sensibilidad a la actividad bactericida de la MccE492 exportada se presentan halos de inhibición de crecimiento en el césped sensible. Si las transformantes portan el gen *mceB*, no se genera inhibición del crecimiento.

Para evaluar el efecto que tienen los genes del clúster sobre la agregación intracelular de la MccE492, se utilizó un plásmido denominado pETAB. Este plásmido posee los genes de la inmunidad *mceB* y estructural de la microcina *mceA* comandados por un promotor inducible. Resultados previos indican que al inducir la expresión de la MccE492 desde este plásmido en una cepa de *E. coli* que porta np220 se observa la formación de amiloides intracelulares en cerca de un 40% de las células, mientras que en ausencia de np220, la fracción de células que poseen amiloides es inferior al 5% (Aguilera, 2015). Para identificar qué factor del clúster es responsable de este comportamiento proamiloidogénico, la estrategia utilizada fue transformar las cepas portadoras de distintos segmentos del clúster con el plásmido el pETAB.

Al inducir la expresión de MccE492 en las cepas que portan ambos plásmidos, esta bacteriocina puede ser modificada y exportada por la maquinaria del clúster, dependiendo de qué genes forman parte del segmento clonado. Para corroborar que los distintos plásmidos que portan segmentos del clúster se comportan de acuerdo a lo esperado, en cuanto a producir y exportar MccE492 activa se realizó un ensayo de actividad bactericida. Este ensayo consistió en la generación de un césped bacteriano de una cepa de *E. coli* sensible a MccE492 en una placa con los inductores arabinosa e IPTG. Se picaron colonias de cada una de las cepas cotransformadas. Estas placas fueron crecidas a 37°C durante 4h. La generación de un halo de inhibición en el césped sensible indica que existe producción de microcina activa por parte de la cepa probada, de lo contrario, la cepa en cuestión carece de algún componente para la modificación de la microcina que es producida por la inducción y que se encuentra codificada en el gen *mceA* del plásmido pETAB. Los resultados de este ensayo se encuentran detallados en la **Figura 6**.

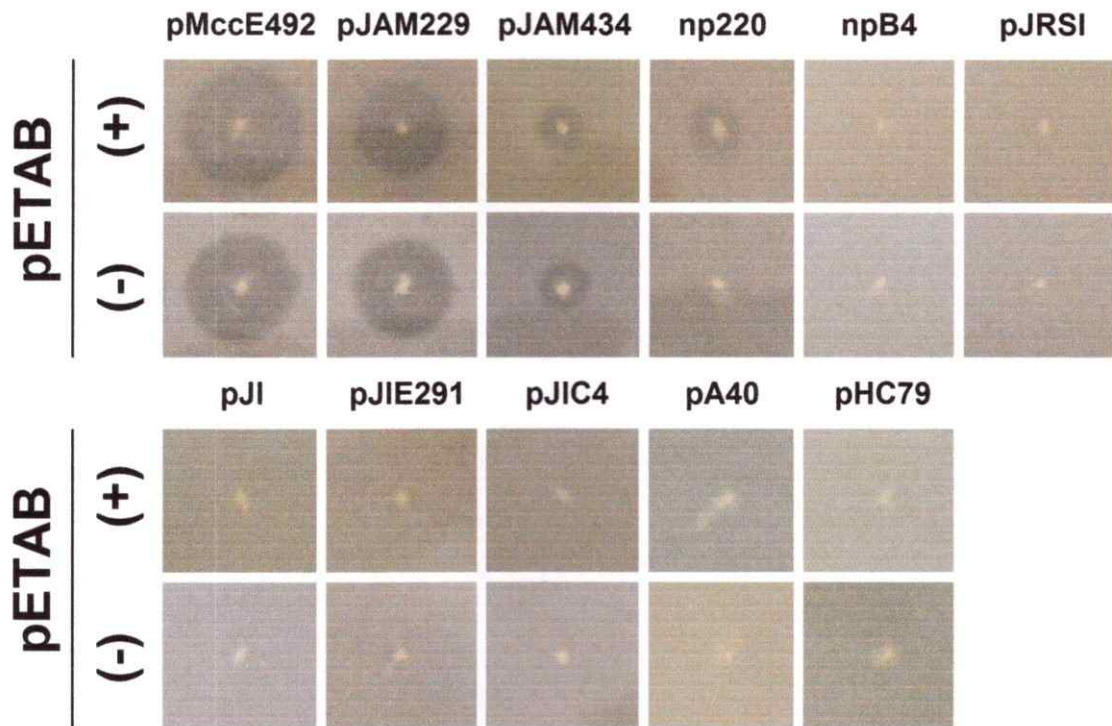


Figura 6. Actividad bactericida de cotransformantes portadoras de plásmidos con segmentos del clúster de producción de MccE492 activa y pETAB. Se creció un césped sensible a la actividad bactericida de MccE492 y se sembró sobre éste las bacterias cotransformadas. Se hizo este ensayo en presencia (+) y ausencia (-) de los inductores arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. Como control positivo se utilizó la cotransformación con pMccE492, que produce MccE492 activa constitutivamente, y como control negativo, la cotransformación con el plásmido vacío pHC79. De existir producción y exportación de MccE492 activa se presentan halos de inhibición de crecimiento en el césped sensible. De lo contrario, no se aprecia la formación de dichos halos.

Se muestran los ensayos realizados en dos condiciones para cada uno de las cepas analizadas: con o sin inducción de la expresión de MccE492 desde pETAB. Las transformantes pMccE492 y pJAM229 exhiben actividad en las dos condiciones analizadas, esto se explica por la producción constitutiva de MccE492 que se debe a la presencia de la totalidad de los genes del clúster en ambos casos. Para el caso de pJAM434 se puede observar halos de inhibición independiente de la expresión de pETAB, ya que el clúster se encuentra íntegro en este plásmido, sin embargo, la inversión en el segmento del clúster esquematizada en la **Figura 4** genera una disminución en la producción de microcina activa, lo que se puede evidenciar por el menor tamaño de los halos de inhibición respecto a pMccE492 y pJAM229. El plásmido np220 únicamente produce halos de inhibición cuando se encuentra cotransformado con pETAB y en la condición inducida. np220 es un derivado de pJAM434, por lo tanto, es esperable que los halos de inhibición sean más pequeños y de un tamaño similar a pJAM434, al encontrarse en presencia de pETAB inducido. npB4 no presenta actividad en ninguna de las condiciones analizadas, ya que este plásmido presenta la interrupción del *mceC*, fenotipo que no es restituido por los genes presentes en pETAB. Los plásmidos pJRSI, pJI, pJIE291, pJIC4 y pA40, al igual que el plásmido sin inserto pHC79, carecen de componentes del clúster además del gen de la proteína estructural, por lo que los transformantes no generan halos de inhibición, a pesar de estar generándose microcina inmadura a partir de pETAB.

Para poder cuantificar la formación de amiloides intracelulares de MccE492 en estas cepas cotransformadas, se utilizó la sonda amiloidofílica tioflavina-S (Th-S), usando una metodología previamente descrita (**Aguilera, 2015**). Las bacterias previamente seleccionadas fueron crecidas en medio LB líquido con los antibióticos

correspondientes y se realizó un ensayo de inducción del sistema pETAB con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM durante 5,5 h y posteriormente se realizó el protocolo de tinción con Th-S. La detección fue realizada mediante citometría de flujo. El porcentaje de población positiva a la sonda Th-S refleja el porcentaje poblacional de células que acumulan inclusiones amiloides intracelulares de MccE492.

En la **Figura 7** se observa que existe una agregación amiloide diferencial dependiente del segmento del clúster productor que se expresa en conjunto con la proteína MccE492 proveniente de pETAB inducido. Los plásmidos pJI, pJAM229, pJAM434, pMccE492, np220 y npB4 inducen la agregación intracelular de microcina, pues su presencia produce una población amiloidogénica mayor al 20%. La presencia del plásmido pA40 produce un aumento, sin embargo, este es menor al producido por el resto de los plásmidos. Por el contrario, pJIC4 y pJIE291 no producen un aumento en la población formadora de amiloides con respecto al plásmido control sin inserto pH79.

El plásmido mínimo que genera un aumento comparable a np220 en la agregación corresponde a pJI, tal como se puede observar además en el histograma de fluorescencia de Th-S (**Figura S1**). Este plásmido cuenta con un fragmento del clúster productor de microcina que comprende los genes *mceA*, *mceB*, *mceC*, *mceD* y *mceE*, además de *orfL* (**Figura 4**). La falta de efecto en presencia del plásmido pJIE291, indica que el gen *mceC* por sí sólo no promueve la amiloidogénesis, ya que este gen se encuentra presente tanto en pJI como en pJIE291. La presencia de los genes *mceD* y *mceE* en pJIE291 y pJIC4, indica que éstos por sí mismos no favorecen la formación de inclusiones amiloides intracelulares de MccE492. La única diferencia entre pJI y pJIE291 radica en la presencia del fragmento que contiene los genes *mceA*

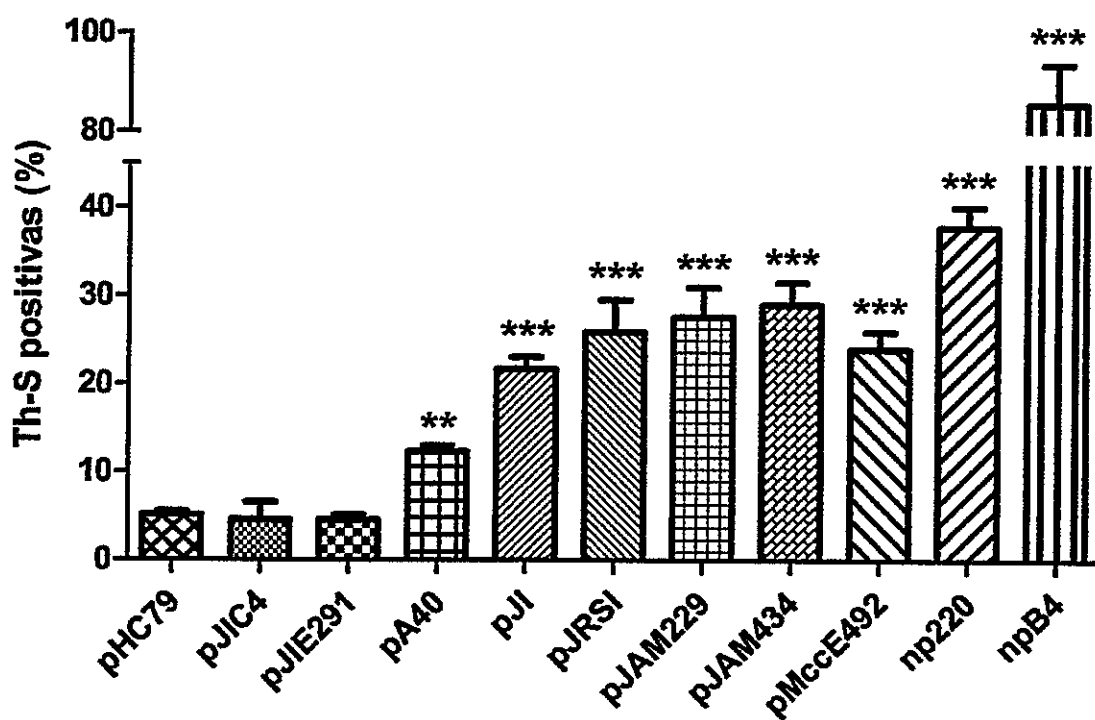


Figura 7. Formación de amiloides intracelulares en células de *E. coli* portadoras de segmentos del clúster de producción de MccE492 cotransformadas con pETAB. Se realizó el ensayo de inducción con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM del plásmido pETAB durante 5,5 h y se tiñeron las células con la sonda Th-S. Se detectó la señal de Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda, que indica la presencia de agregados amiloides, comparando la población amiloidogénica con el valor entregado por el control negativo pHC79. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control negativo. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

y *mceB*, por lo que se podría inferir que la expresión de estos genes podría tener un efecto en la agregación de MccE492. A pesar que el plásmido np220 carece de la producción de microcina por sí mismo por la presencia del transposón Tn5 en el gen *mceA*, al realizar el ensayo de inducción se pudo observar que un gran porcentaje de la población presenta amiloides intracelulares. No se puede descartar que este efecto se deba a la proteína MccE492 trunca que se genera por la interrupción de *mceA*.

Los resultados de coexpresión en conjunto no permiten identificar un factor distinto a la MccE492 que promueva su agregación. Se ha determinado *in vitro* que la formación de fibras amiloides de MccE492 puede ser nucleada con intermediarios de agregación compuestos por la misma microcina, favoreciendo así la formación de fibras amiloides (Bieler y cols, 2005; Marcoleta y cols, 2013b). Se propone por lo tanto, que la expresión del gen *mceA* previa a la inducción del sistema pETAB podría permitir que existan núcleos preformados al momento de la inducción, que promuevan la amiloidogénesis de MccE492.

3.1.2. Efecto de la expresión previa del gen *mceA* en la agregación de MccE492.

Para el análisis del efecto que genera la expresión previa del gen *mceA* sobre la agregación de MccE492, se diseñaron y construyeron dos plásmidos, utilizando como base el plásmido pHc79. El gen *mceA*, al igual que su proteína de inmunidad, fueron obtenidos a partir de pBAML que presenta ambos genes comandados por su promotor natural, de igual manera que en el clúster productor de microcina. Además de esto, se construyó un plásmido similar, pero obteniendo los genes *mceBA* a partir de np220, con el fin de expresar la proteína trunca producto de la interrupción del gen *mceA* con el transposón Tn5.

En la **Figura 8** se muestra el diseño, además de la construcción de los plásmidos que portan las dos variantes del gen *mceA* utilizados para este ensayo. La construcción se realizó cortando pHC79 con la enzima de restricción *Bam*HI, generando un fragmento lineal correspondiente a la totalidad del plásmido de 6524 pb (**Figura 8A**). Al digerir pBAML que presenta dos sitios de corte para la enzima *Bam*HI se obtienen dos fragmentos: uno de 4245 pb, correspondiente al esqueleto del plásmido; y uno de 1661 pb, que corresponde al fragmento que comprende los genes *mceA* y *mceB* con su promotor (**Figura 8B**). np220 no se encuentra completamente secuenciado pero dentro de la región secuenciada se predice que, al digerir con *Bam*HI, se genera una serie de fragmentos, dentro de los cuales existe uno de 4284 pb que contiene el gen *mceB* y el *mceA* interrumpido por el transposón Tn5 (**Figura 8C**).

A partir de esta digestión se realizó la purificación de las bandas correspondientes al fragmento que contiene el gen *mceA* y *mceB* para el caso de pBAML y np220, o el plásmido lineal pHC79. El plásmido pHC79 fue desfosforilado con fosfatasa alcalina para evitar la religación y se ligó con los fragmentos correspondientes de pBAML y np220. El plásmido resultante que porta los genes provenientes de pBAML se denominó pBA, mientras se nombró pBA* al producido a partir de np220. Al realizar una nueva digestión con la enzima *Bam*HI se puede ver la liberación de los fragmentos en cada uno de los plásmidos, además del esqueleto de pHC79 (**Figura 8D**).

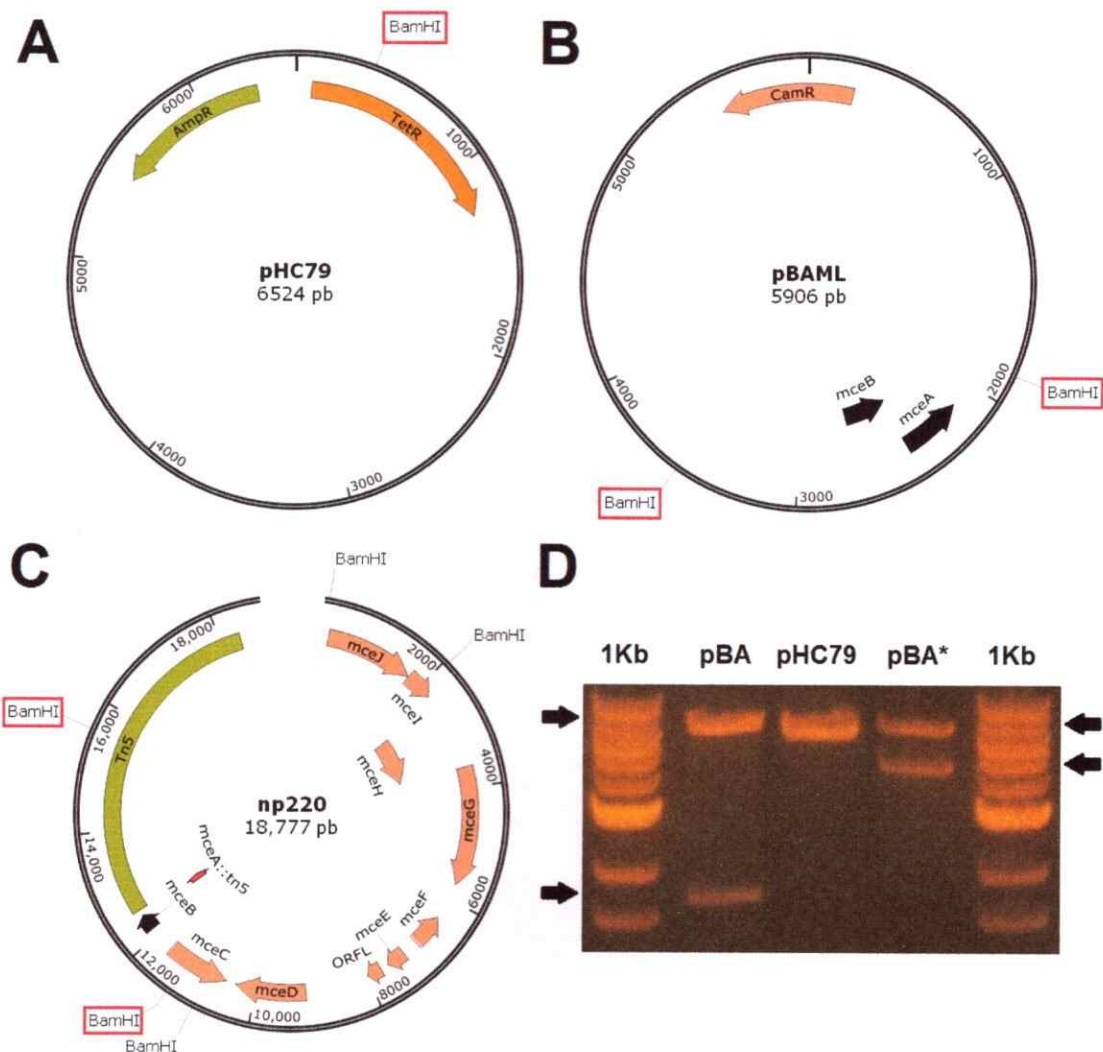


Figura 8. Construcción de plásmidos portadores de variantes del gen *mceA* bajo el control de su promotor natural. Se construyeron plásmidos que portan los genes *mceA* provenientes de pBAML, que presenta el marco completo de *mceA*, y de np220 donde el gen *mceA* se encuentra interrumpido por el transposón Tn5. La construcción se llevó a cabo mediante corte con la enzima de restricción *Bam*HI y ligación con pHC79. Se muestran los sitios de corte para esta enzima en cada uno de los plásmidos utilizados, enmarcando en un rectángulo rojo los importantes para este trabajo. **(A)** Diagrama del plásmido pHC79 utilizado como esqueleto con el sitio único de corte para *Bam*HI. **(B)** Diagrama de pBAML que, al ser cortado con *Bam*HI, libera un fragmento de 1661 pb que contiene los genes *mceA* y *mceB* con su promotor natural. **(C)** Región secuenciada de np220 que, al ser digerida con *Bam*HI, libera un fragmento de 4284 pb que contiene el gen *mceB* y el gen *mceA* interrumpido por el transposón Tn5. **(D)** Digestión con *Bam*HI de plásmidos resultantes de la ligación. Las bandas superiores corresponden al tamaño de pHC79 linealizado. pBA, construido a partir de pBAML, libera el fragmento correspondiente a 1661 pb; mientras que pBA*, construido a partir de np220, libera un fragmento de 4284 pb.

Una vez generados, estos plásmidos fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21AI. La integridad de los plásmidos transformados fue comprobada mediante un ensayo de inmunidad, para determinar si comprendían los genes *mceA* y *mceB*. En este ensayo se picaron colonias de *E. coli* transformadas con pMccE492 sobre un césped de las transformantes portadoras de los plásmidos construidos. En la **Figura 9A** se muestra que los plásmidos pBA y pBA* poseen inmunidad a la MccE492, lo que se evidencia por la falta de un halo de inhibición en el césped, a diferencia de lo que ocurre para el control negativo pHC79. A continuación, estas cepas fueron cotransformadas con el sistema pETAB para expresar controladamente la microcina. A estas cepas se les realizó un ensayo de actividad para determinar si éstas eran capaces de producir microcina activa. Se picaron colonias sobre un césped sensible a la toxina bacteriana. En la **Figura 9B** se puede ver que, al igual que el plásmido vacío pHC79, pBA y pBA* carecen de la cualidad de producir y exportar microcina activa, lo cual se condice con el ensayo de actividad de sistemas productores (**Figura 6**), donde se ve que si falta algún componente esencial del clúster de microcina no se generan halos de inhibición al inducir el sistema pETAB.

A continuación se procedió a cuantificar la formación de agregados amiloides intracelulares. Se realizó la inducción del sistema pETAB con el mismo protocolo utilizado anteriormente y se tiñeron con Th-S. La población positiva fue cuantificada por citometría de flujo. La **Figura 10** muestra el resultado del ensayo de inducción, donde se observa respecto al control negativo, un aumento significativo en la población amiloidogénica al realizar la inducción de pETAB en presencia de pBA que contiene el gen *mceA* proveniente de pBAML.

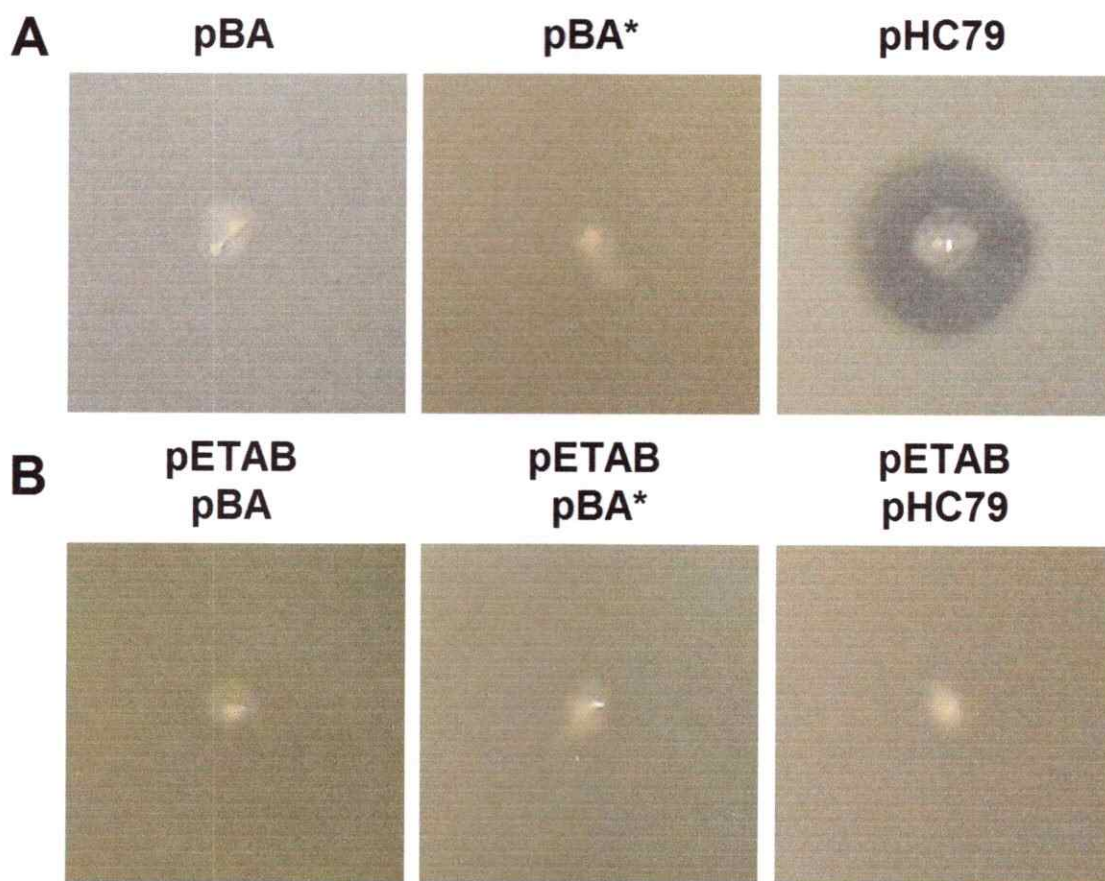


Figura 9. Inmunidad y actividad bactericida de bacterias transformadas con los plásmidos pBA y pBA*. Las transformantes de los plásmidos pBA y pBA*, portadoras de las dos variantes del gen *mceA* fueron sometidas a ensayos para determinar la sensibilidad a MccE492 y la producción y exportación de MccE492 modificada. **(A)** Ensayo de inmunidad de bacterias transformadas con los plásmidos pBA. Se realizó un césped de las bacterias portadoras de pBA o pBA* y, sobre éste, se picaron colonias de bacterias transformadas con pMccE492, que posee el clúster completo de síntesis de MccE492 de *K. pneumoniae* RYC492 y, produciendo constitutivamente MccE492 activa. Se utilizó la transformante con el plásmido vacío pHC79 como control negativo. **(B)** Ensayo de actividad bactericida de bacterias transformadas con pBA. Las bacterias fueron cotransformadas con el sistema pETAB que presenta los genes *mceA* y *mceB* bajo el control de un promotor inducible. Se creció un césped sensible a la actividad bactericida de MccE492 y se picaron sobre éste las bacterias cotransformadas con los plásmidos pBA o pBA*, y pETAB. El ensayo fue realizado en presencia de arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. Como control negativo se utilizó la cotransformación con el plásmido vacío pHC79.

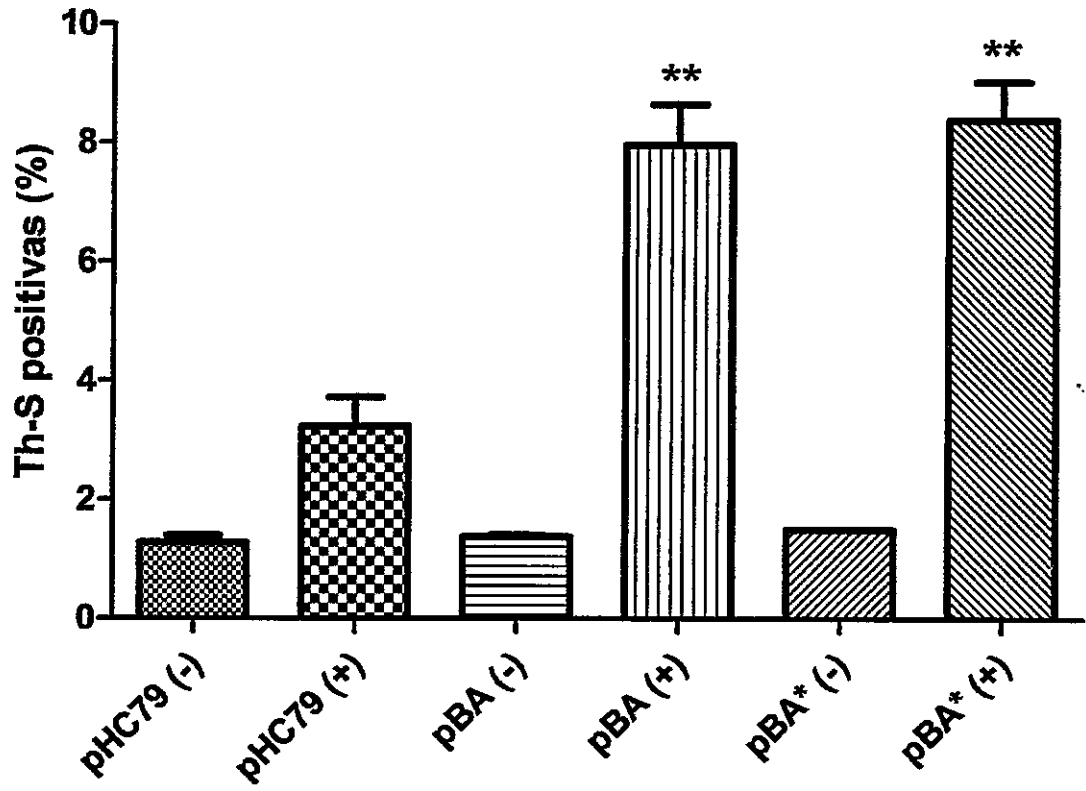


Figura 10. Efecto de pBA y pBA* sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492. Se realizó el ensayo de inducción de pETAB durante 5,5 h y se tiñeron las células con la sonda Th-S. Se detectó la señal de Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda que indica la presencia de agregados amiloides, comparando la población amiloidogénica con el valor entregado por el control negativo pHC79. Se muestran las muestras en ausencia (-) y presencia (+) de los inductores arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. Los asteriscos indican diferencias significativas al control negativo. **: $p < 0,01$.

Se observó además que pETAB en presencia de pBA*, con el gen *mceA* interrumpido de np220 tiene el mismo efecto que con pBA. Este resultado indica que la presencia de MccE492 previa a la inducción favorece la formación de agregados intracelulares de naturaleza amiloide producida por el sistema pETAB, y que la expresión de la microcina trunca, también posee un efecto proamiloidogénico. Sin embargo, tanto en este gráfico como en el histograma de fluorescencia (**Figura S2**) se puede apreciar que el efecto de estos genes es muy discreto y no alcanza el nivel generado por pMccE492, donde se encuentra *mceA* en el clúster completo de producción de MccE492, o por el plásmido np220, donde se encuentra la variante interrumpida de *mceA* con el resto del clúster (**Figura 7**). Es por esto que se postula que debe existir otro factor presente en el conjunto de genes del clúster, además de la microcina, que favorece la agregación de esta proteína, el cual por la complejidad del sistema, no pudo ser identificado en los ensayos anteriormente descritos.

3.1.3. Efecto del gen *orfL* en la agregación de MccE492.

Debido a que la expresión previa del gen *mceA* no da cuenta completamente del efecto de la agregación intracelular de la MccE492 observado originalmente con np220, y ante la imposibilidad de identificación de otros factores dentro del clúster génico que favorezcan la amiloidogénesis de dicha proteína, se decidió evaluar un factor codificado en el clúster que presenta características que lo convierten en un posible factor proamiloidogénico, la proteína OrfL. Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio indican que el gen *orfL* codifica una microcina bacteriana previamente no descrita, y que es modificada post-traduccionalmente y secretada al medio extracelular por los mismos factores encargados de la producción de MccE492 activa. Un análisis bioinformático reveló que OrfL presenta una secuencia aminoacídica

muy propensa a la formación de amiloides. Adicionalmente se ha demostrado que OrfL forma amiloides *in vitro* (Felipe Hurtado y Pablo Lobos, resultados no publicados). Por estas razones se hipotetizó que el producto génico de *orfL* podría ser, por sí mismo, un potenciador de la agregación de MccE492, a pesar de no verse un efecto claro de este gen en el experimento de inducción de MccE492 en presencia de plásmidos con distintos segmentos del clúster génico.

Se diseñó un experimento con una variante del plásmido pBAD33 que posee el gen *orfL*, proveniente del clúster de producción de MccE492, comandado por un promotor inducible. Se realizó una cotransformación con pUC57-pETAB, que porta el gen *mceA*, también bajo un promotor inducible pET, pero clonado en pUC57, con el fin de inducir la expresión en conjunto de ambos genes usando plásmidos compatibles. En conjunto se cotransformó utilizando los plásmidos control pBAD33 y pUC57, respectivamente, para detectar el efecto de cada uno de los genes por separado.

Para cuantificar la formación de amiloides intracelulares, las bacterias previamente seleccionadas fueron crecidas en medio LB y se realizó un ensayo de inducción del gen *orfL* y *mceA* con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM, durante 2 h y 5,5 h, para posteriormente realizar la tinción con Th-S. El porcentaje poblacional que exhibe una señal positiva de fluorescencia fue cuantificado mediante citometría de flujo.

En el gráfico de la **Figura 11** se muestran las veces de aumento en la población que presenta amiloides intracelulares producto de las inducciones realizadas a 2 h y 5,5 h para las transformantes pBAD33+pUC57, pBAD33+pUC57-pETAB, pBAD33-*orfL*+pUC57 y pBAD33+pUC57-pETAB, la cuales fueron relativizadas al control negativo con los plásmidos vacíos pBAD33 y pUC57.

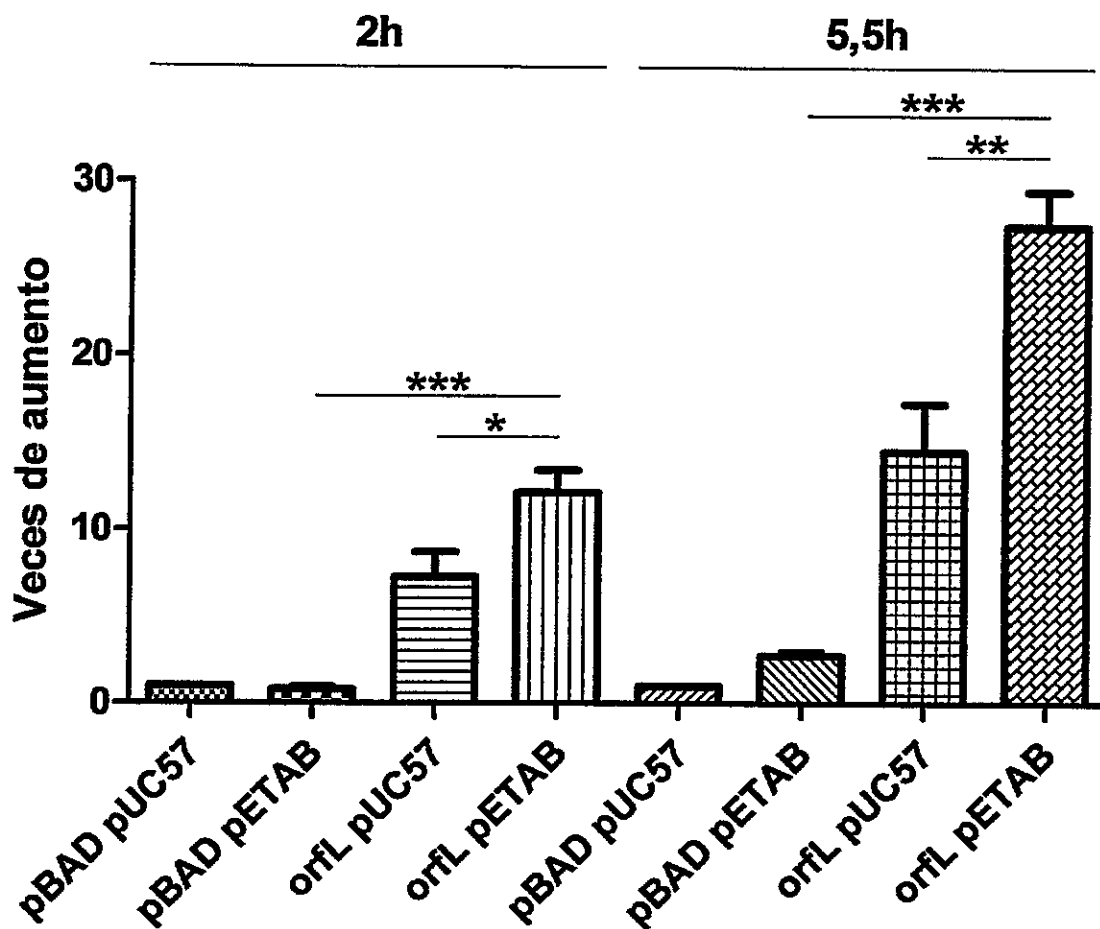


Figura 11. Efecto de sobreexpresión de *orfL* sobre la agregación intracelular de la MccE492. Se realizó el ensayo de inducción con pUC57-pETAB y pBAD33-*orfL* durante 2 h y 5,5 h con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. Posteriormente se tiñeron las células con la sonda Th-S. Se cuantificó la proporción de células positivas para Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica las veces de aumento de las muestras positivas a la sonda, es decir, que presentan agregados amiloides, normalizadas por la población que posee amiloides intracelulares obtenida para el control negativo, correspondiente a la cotransformación con los plásmidos vacíos pBAD33 y pUC57 para cada uno de los tiempos. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre las muestras ubicadas en ambos extremos de la línea sobre las barras correspondientes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Se observa que las muestras inducidas por 2 h que producen únicamente MccE492 (pBAD pETAB) no presentan un aumento en la población amiloidogénica, indicando que la presencia de microcina no posee un efecto amiloidogénico detectable con este tiempo de inducción. Por el contrario, en las muestras que acumulan el producto génico de *orfL* (*orfL* pUC57) se puede observar un aumento en la población amiloidogénica superior a 7 veces, corroborando la predicción bioinformática que indica que este péptido por sí mismo presenta la cualidad de agregar formando amiloides. Al inducir la síntesis de ambos péptidos en conjunto (*orfL* pETAB) se puede ver que el aumento en la amiloidogénesis alcanza valores superiores a 12 veces con respecto al control negativo, y que este aumento presenta una diferencia significativa con respecto a las muestras en las que se inducen los genes por separado. Analizando las muestras inducidas durante 5,5 h se puede observar que este comportamiento no sólo se mantiene en el tiempo, si no que éste se va acentuando. En este tiempo de inducción, la expresión de MccE492 por sí sola (pBAD pETAB) genera un aumento de casi 3 veces con respecto al control negativo. Por su parte, la inducción del gen *orfL* (*orfL* pUC57) genera un aumento cercano a 15 veces. Se puede apreciar que la expresión conjunta los genes *orfL* y *mceA* (*orfL* pETAB) genera un aumento en la población acumuladora de amiloides superior a 27 veces, el cual es significativamente superior al efecto producido por la expresión de cada gen por separado. Además, se observa que tanto para las 2 h como las 5,5 h de inducción, la expresión conjunta de los genes *mceA* y *orfL* genera un aumento que es superior a la suma de los efectos por separado de cada proteína. Al momento de analizar los histogramas de fluorescencia de Th-S (**Figura S3**) se observa que la expresión de OrfL genera poblaciones con distinto nivel de agregación y que al coexpresar esta proteína con MccE492 se puede apreciar el aumento en estas poblaciones tanto en número como en magnitud, sugiriendo que el

efecto potenciador de la agregación podría deberse a un aumento en la acumulación de agregados de OrfL producidos por la presencia de MccE492 o a la formación de agregados amiloides compuestos de ambas proteínas. Se puede concluir que existe un efecto cooperativo en la formación de amiloides intracelulares en presencia de ambos productos génicos.

A pesar de que se identificó a la MccE492 y a OrfL como factores que favorecen la agregación amiloide de esta proteína, no se puede descartar la participación de otros factores no detectados en este trabajo. Adicionalmente, no sólo los componentes del clúster génico podrían ser factores importantes en la formación y regulación de los amiloides de MccE492, sino que también podrían existir factores inherentes del organismo bacteriano.

3.2. Papel de la chaperona DnaK sobre la agregación intracelular de la MccE492.

3.2.1. Inhibición de DnaK.

Existe abundante evidencia que indica que DnaK juega un rol importante en la modulación de las inclusiones amiloides intracelulares. En el caso particular del dominio WH1 de RepA, la chaperona DnaK está relacionada con la modulación de la toxicidad de los agregados formados por esta proteína, remodelándolos desde una conformación globular hacia agregados con forma de "cometa" que producen un menor nivel de toxicidad para las células acumuladoras (Gasset-Rosa y cols, 2014).

Con el fin de determinar si este factor celular intrínseco es responsable de la regulación de la formación de amiloides intracelulares específicamente para la MccE492, se realizaron experimentos utilizando la cepa JGT20 (Thomas y Baneyx, 1998), que presenta una mutación en el gen *dnaK*, codificando una variante DnaK termosensible, para evaluar el efecto de la ausencia de DnaK en condiciones de formación de amiloides intracelulares. Sin embargo, la poca reproducibilidad de los resultados obtenidos, posiblemente por la sensibilidad de la cepa a la expresión de proteínas, obligó a la búsqueda de una nueva aproximación (Resultados no mostrados). Para ello, se realizó un experimento en el que se inhibió la acción de DnaK mediante el inhibidor miricetina, que se une a esta chaperona, impidiendo la unión a la proteína DnaJ, inhibiendo su acción (Chang y cols, 2011). Una estrategia similar fue utilizada previamente para detectar la influencia de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares e *in vitro* de la proteína RepA de *Pseudomonas* (Gasset-Rosa y cols, 2014). De esta manera fue posible evaluar el efecto de la ausencia de actividad de esta chaperona sobre la agregación de la MccE492.

Para la expresión de MccE492 se utilizó pETAB, además de variantes de éste que contienen mutantes del gen *mceA* que codifican versiones de MccE492 con distinta tendencia a la agregación amiloide. Los plásmidos utilizados fueron: p33AM, utilizado como control negativo; WT, correspondiente a pETAB con la versión silvestre del gen *mceA*; $\Delta 54-63$, que codifica una MccE492 con una mutación por delección que disminuye su nivel de formación de amiloides; y finalmente P57A y P59A, que poseen mutaciones puntuales que aumentan la tendencia a la amiloidogénesis de la MccE492. Se transformó la cepa *E. coli* BL21AI con los derivados del sistema pETAB, y se hizo un ensayo de inducción con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. En este ensayo se midieron cuatro condiciones: una sin inductores (-), una sin inductores en presencia de miricetina (M-), una condición inducida (+) y una condición inducida en presencia de miricetina (M). Luego de la inducción, se colectaron muestras y se realizó tinción con Th-S para cuantificar la población que presenta amiloides intracelulares, esperando que la deficiencia de actividad de DnaK generara una variación significativa en los niveles de inclusiones amiloides.

En la **Figura 12** se muestran las variantes de MccE492 en las distintas condiciones analizadas. Debido a que el plásmido p33AM no produce microcina, las células que lo portan resultaron negativas para la tinción en todas las condiciones (**Resultados no mostrados**). Se observa que en la condición sin inducción, ya sea con o sin miricetina no se ve un efecto en la proporción de células positivas a Th-S para ninguna de las variedades de MccE492 analizadas. Esto se condice con la carencia de transcrito del gen *mceA* al no encontrarse en presencia de inductor. La condición con miricetina pero sin inductor de la expresión de MccE492 indica que la ausencia de DnaK activa en las cepas analizadas, por sí sola, no genera aumento en la

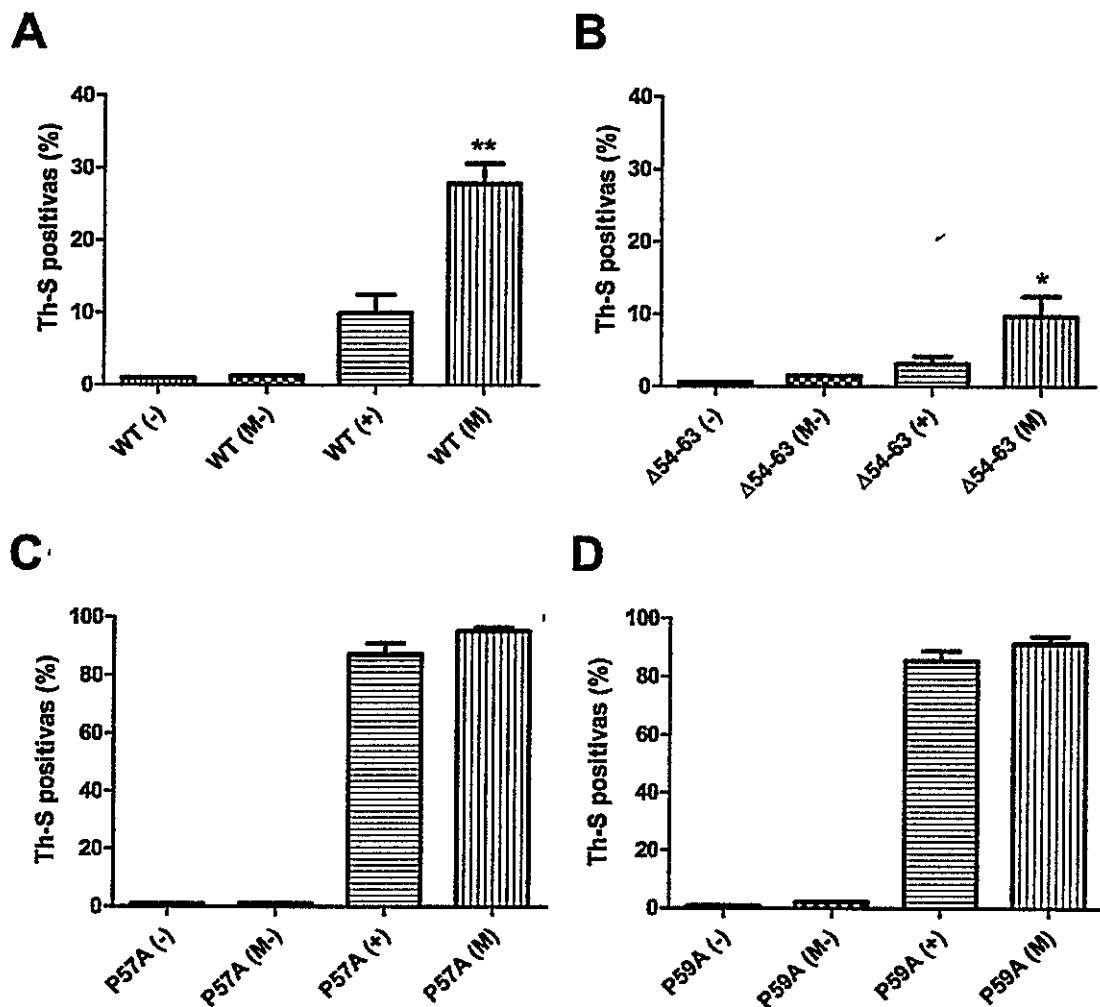


Figura 12. Efecto de inhibición de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492. Se realizó el ensayo de inducción de los derivados de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA* durante 5,5 h con inductores arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM en presencia o ausencia de miricetina, un inhibidor de DnaK. Se tiñeron las células con la sonda Th-S y se detectó la señal de Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda, que indica la presencia de agregados amiloides. Se observan las muestras: sin inducción (-), con miricetina sin inducción (M-), con inducción (+), y con miricetina e inducción (M). (A) Gráfico de efecto sobre bacterias transformadas con pETAB con el gen *mceA* silvestre WT. (B) Gráfico de efecto sobre bacterias transformadas con el derivado pETAB con el gen *mceA* mutante que produce MccE492 hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$. (C) Gráfico de efecto sobre bacterias transformadas con el derivado pETAB con el gen *mceA* mutante que produce MccE492 hiperamiloidogénica P57A. (D) Gráfico de efecto sobre bacterias transformadas con el derivado pETAB con el gen *mceA* mutante que produce MccE492 hiperamiloidogénica P59A. Los asteriscos indican las diferencias significativas de la muestra inducida en presencia de miricetina (M), con respecto a la muestra inducida en ausencia de miricetina (+). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

formación de amiloides intracelulares. Para el caso de la MccE492 silvestre (**Figura 12A**) se observa que se alcanza un nivel de células positivas inferior al 10% (+), sin embargo, al realizar la inducción en presencia de miricetina (M) existe un aumento en la población que forma amiloides intracelulares, alcanzándose un nivel cercano al 30%. Para el caso de la MccE492 mutante hipoamiloidogénica ($\Delta 54-63$), se puede apreciar que al ser inducida (+) la población amiloidogénica asciende a alrededor de un 3%, mientras que en la inducción con miricetina (M) se genera un aumento, aproximándose la población amiloidogénica a un 10% (**Figura 12B**). Por otra parte, ambas mutantes hiperamiloidogénicas (P57A y P59A) alcanzan un nivel de células positivas a la tinción, en la condición inducida (+), superior al 85% (**Figura 12C-D**). Al realizarse esta inducción en presencia del inhibidor (M) se alcanza niveles alrededor del 95 y 91%, respectivamente. A pesar de que este aumento no presenta una diferencia significativa, se puede apreciar una clara tendencia al aumento, viéndose enmascarado el efecto de la ausencia de actividad de DnaK por la gran propensión a la agregación de estas mutantes de MccE492. Al analizar los histogramas de fluorescencia de Th-S de las bacterias que acumulan inclusiones de las variantes hiperamiloidogénicas de MccE492 (**Figura S4**) se observa un desplazamiento de alrededor de un 40% en la fluorescencia promedio al adicionar miricetina en ambas variantes. Esto sugiere que en presencia de dicho compuesto las células acumularían una mayor cantidad de inclusiones, al estar en ausencia de una DnaK funcional.

Se evaluó la agregación intracelular de MccE492 en células que han sido inducidas por un tiempo prolongado (24 h) para determinar si los niveles alcanzados en ausencia de una DnaK funcional son comparables con los resultados obtenidos en el experimento al inducir la síntesis de MccE492 durante 5,5 h (**Figura 13**).

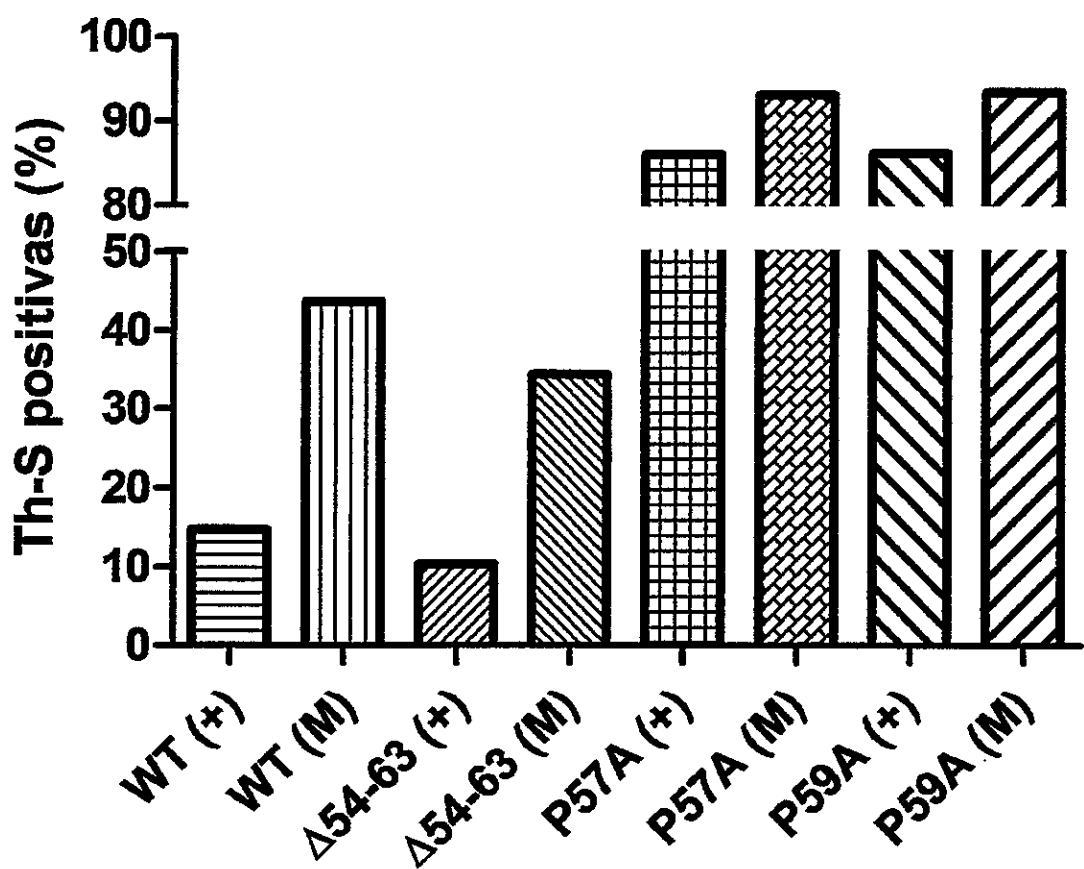


Figura 13. Efecto de la inactivación de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares en células que sobreexpresan MccE492 durante 24 horas. Se realizó el ensayo de inducción de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA* durante 24 h con inductores arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM en presencia o ausencia del inhibidor miricetina. Se tiñeron las células y se cuantificó la señal positiva a Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda, que indica la presencia de agregados amiloides. Se observan las muestras: con inducción (+), y con miricetina e inducción (M).

Se observa que al aumentar el tiempo de inducción, tanto la proteína silvestre como la mutante hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$ muestran un aumento en la proporción celular que presentan amiloides intracelulares con respecto a las mediciones a 5,5 h, ya sea en presencia (15 y 10% respectivamente) o en ausencia de miricetina (44 y 34 % respectivamente). No obstante, la proporción fue significativamente mayor en presencia de este inhibidor, lo que indica que la formación de amiloides en el tiempo aumenta, y que el efecto producido por la ausencia de DnaK activa produce mayor agregación.

Estos resultados comprueban que la chaperona DnaK tiene un efecto regulador sobre la formación de agregados de naturaleza amiloide de la proteína MccE492. Para corroborar estas observaciones, se evaluó la sobreexpresión de DnaK, con el fin de determinar si la presencia de una mayor cantidad de la chaperona disminuye el nivel de población amiloidogénica en las bacterias productoras de las variedades de MccE492 estudiadas.

3.2.2. Ganancia de función de DnaK.

Con el fin de determinar si el aumento en los niveles de la chaperona DnaK tiene algún efecto en la formación de amiloides intracelulares de MccE492 se realizó un experimento de sobreexpresión de DnaK, concomitantemente con la expresión del gen *mceA*. Para este experimento se utilizó el gen *dnaK* de *E. coli* comandado por el promotor $P_{A1/lacO-1}$ (inducible por IPTG), el cual fue amplificado por PCR a partir del plásmido pBB535. El amplicón obtenido fue luego ligado con el plásmido pCR Blunt II-TOPO, permitiendo que el plásmido de expresión de DnaK (TOPO-DnaK) fuese compatible con los plásmidos utilizados en los pasos posteriores (**Figura 14**).

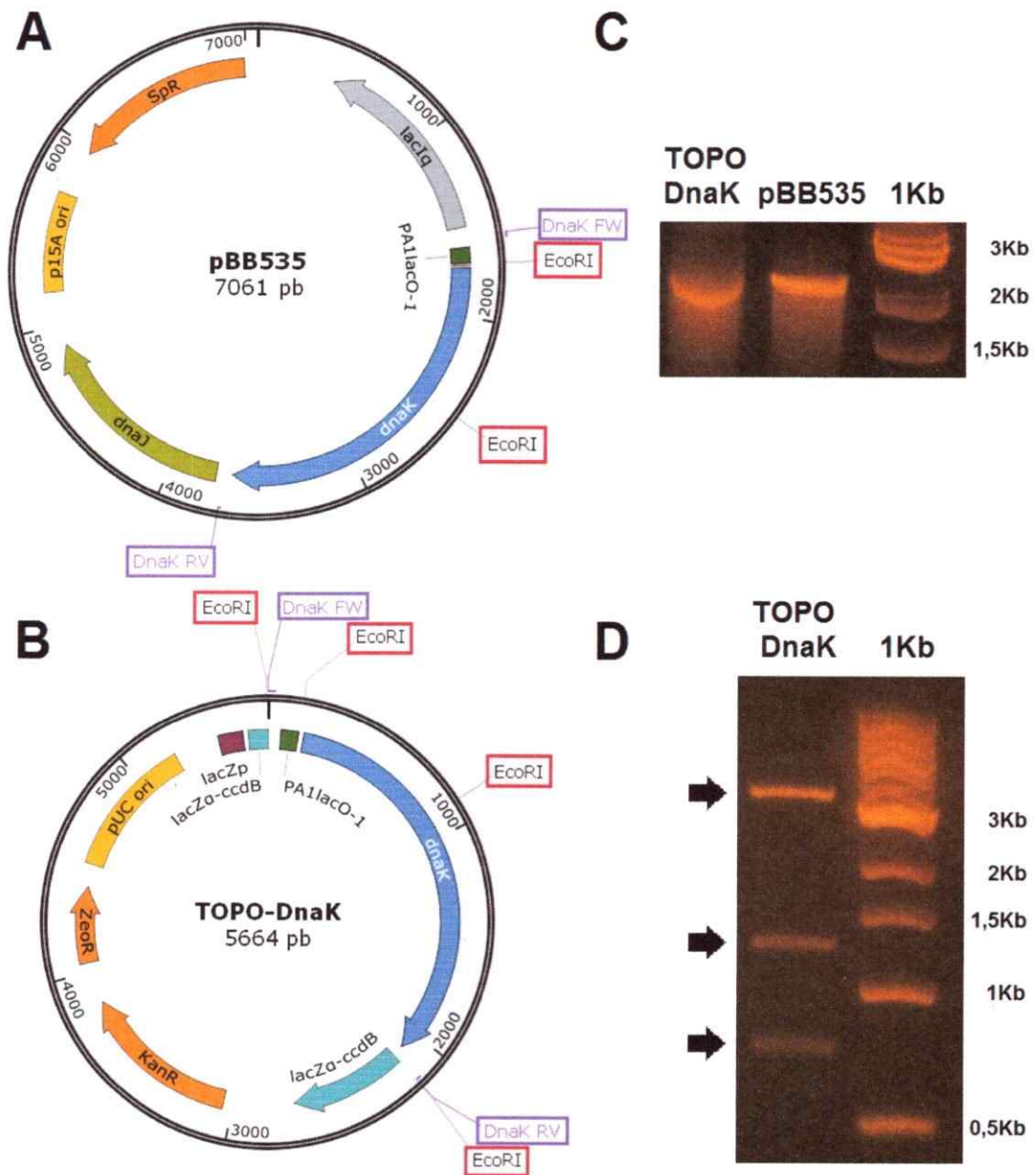


Figura 14. Construcción del plásmido TOPO-DnaK. Se construyó el plásmido que porta el gen *dnaK* proveniente de pBB535 con el promotor $P_{A1/lacO-1}$ inducible por IPTG. La construcción se llevó a cabo mediante amplificación por PCR del fragmento que contiene el promotor y el gen *dnaK*, y una posterior ligación en pCR Blunt II-TOPO. **(A)** Diagrama de pBB535, utilizado como templado. Se enmarcan en violeta los sitios de unión a los partidores utilizado y en rojo los sitios de corte de la enzima de restricción *EcoRI* utilizada para la comprobación. **(B)** Diagrama de la construcción final TOPO-DnaK. Se enmarcan en rojo los sitios de corte para *EcoRI* utilizados para la comprobación del plásmido final. **(C)** Amplificación por PCR del fragmento $P_{A1/lacO-1}$ -*dnaK*. Se observa la banda esperada para pBB535 al igual que para la construcción TOPO-DnaK. **(D)** Digestión con *EcoRI* del plásmido resultante de la ligación. Las flechas negras indican las bandas del tamaño esperado para la construcción.

Se muestra el diseño y la construcción del plásmido TOPO-DnaK. La construcción de plásmido se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 2145 pb que comprende el promotor y el marco abierto de lectura del gen *dnaK* proveniente de pBB535 (**Figura 14A**). Luego de ser amplificado, el fragmento fue ligado en pCR Blunt II-TOPO, el cual posee un origen de replicación Col E1 (**Figura 14B**). Para corroborar el correcto clonamiento del amplicón en este plásmido, el plásmido resultante TOPO-DnaK fue usado como templado para una reacción de PCR con los mismos partidores utilizados previamente, comprobando que se obtiene una banda de 2145 pb, al igual que en pBB535 (**Figura 14C**). Además, TOPO-DnaK fue cortado con la enzima de restricción *EcoRI* (**Figura 14D**). Las bandas resultantes coinciden con los tamaños esperados de 3501, 1255, 752 y 156 pb (la banda más pequeña no se aprecia en el gel).

Se transformaron células de *E. coli* BL21AI con el plásmido TOPO-DnaK y con el plásmido vacío. Posteriormente, estas bacterias fueron cotransformadas con los derivados de pETAB para expresar controladamente la MccE492. Los plásmidos utilizados para este ensayo fueron: p33AM, utilizado como control negativo; WT, correspondiente a pETAB con la variante silvestre del gen *mceA*; y P59A, que posee una mutación puntual en el gen *mceA* que produce una variante hiperamiloidogénica de la proteína codificada MccE492. Se realizó un ensayo de inducción del sistema pETAB y del gen *dnaK*, para evaluar si la sobreexpresión de DnaK genera variación significativa en los niveles de inclusiones amiloides.

En la **Figura 15** se observa que la población de células positivas a Th-S es menor en las bacterias que expresan las variantes de MccE492 en presencia de la sobreexpresión de esta chaperona (DnaK (+)), respecto a las bacterias acumuladoras

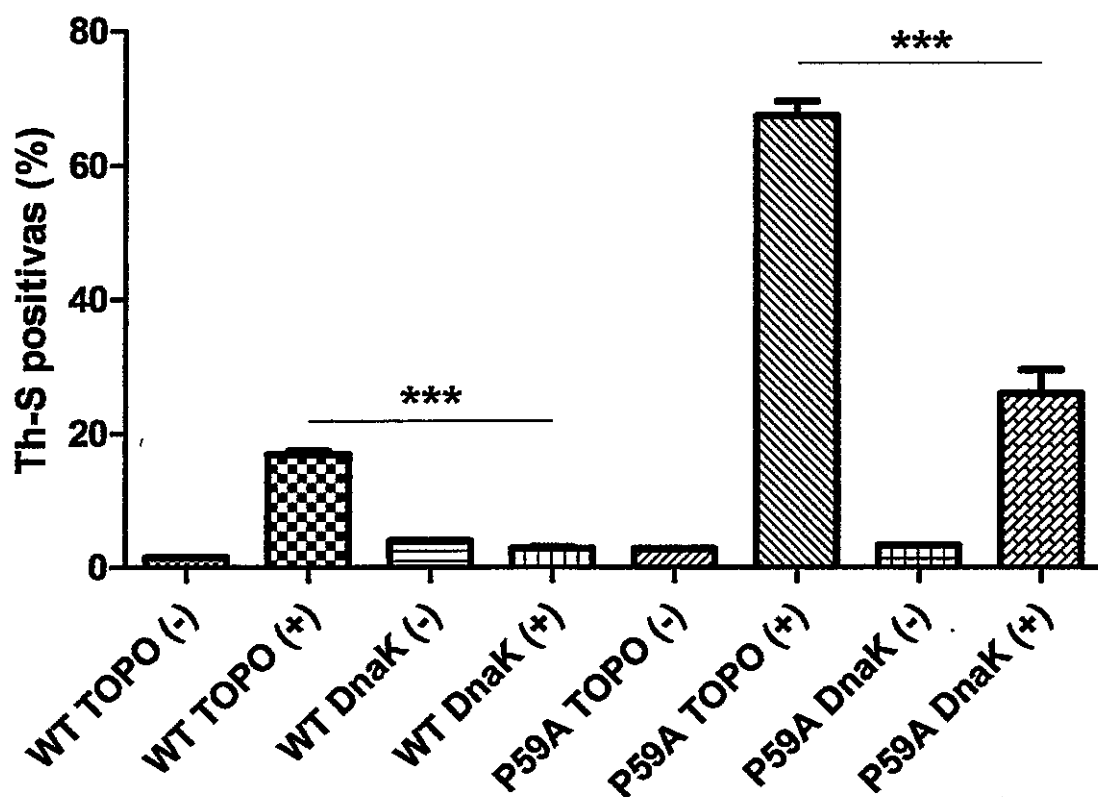


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492. Se realizó el ensayo de inducción con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM de pETAB durante 5,5 h y se tiñeron las células con la sonda Th-S. Se cuantificó la proporción de células positivas para Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda, que indica la presencia de agregados amiloides. TOPO: pCR Blunt II-TOPO; DnaK: TOPO-DnaK. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre las muestras en ambos extremos de la línea sobre las barras correspondientes. ***: $p < 0,001$.

de las variantes de MccE492 en presencia del plásmido vacío (TOPO (+)). Tanto para las bacterias que acumulan la variante silvestre de la proteína MccE492 (WT), como para las que acumulan la mutante hiperamiloidogénica (P59A), existe una diferencia significativa en la cantidad de células que presentan amiloides intracelulares, al expresarlas en conjunto con la chaperona DnaK. Este resultado indica que la sobreexpresión de DnaK desfavorece la formación de agregados amiloides de MccE492, lo que sugiere que esta chaperona tendría un rol regulador sobre la ocurrencia de este fenómeno. Sin embargo, todavía hay que analizar el efecto que estos agregados podrían tener sobre el metabolismo y la viabilidad celular.

3.3. Efecto de la formación de amiloides intracelulares de MccE492 sobre la viabilidad celular.

3.3.1. Efecto de la formación de inclusiones amiloides sobre el tiempo generacional.

Como fue mencionado anteriormente, en general la formación de amiloides intracelulares correspondería a un fenómeno tóxico para la célula que los acumula. Particularmente para la proteína amiloidogénica bacteriana RepA, la presencia de estos agregados genera una proteinopatía que se traduce en una disminución en la tasa de reproducción, transmisible a las células hijas (Fernández-Tresguerres y cols, 2010; Giraldo y cols, 2011). Debido a que esta proteína presenta características similares a la proteína MccE492 en cuanto a su agregación, se evaluó si producían el mismo efecto tóxico.

Para esto, la estrategia elegida fue la determinación del tiempo generacional de bacterias que expresan variantes de MccE492 con distinta tendencia a la agregación, esperando que la variación en el tiempo generacional de estas cepas se encuentre relacionada a la propensión de acumular amiloides intracelulares.

Se transformó la cepa *E. coli* BL21AI con pETAB o derivados que expresan variantes hipo o hiperamiloidogénicas de la MccE492 y se llevó a cabo el ensayo, realizando un cultivo de noche de las bacterias portadoras, diluyendo el inóculo (1:100) en un matraz con 20 mL de medio M9 suplementado. Se indujo la expresión de la MccE492 (silvestre y mutantes) desde tiempo cero con arabinosa 0,2% e IPTG 1mM. Se incubó a 37°C con agitación (150 rpm) y se midió la DO₆₀₀ cada 1 h. Los valores obtenidos de este ensayo fueron analizados, calculando el tiempo generacional

utilizando los valores de densidad óptica obtenidos en la fase exponencial de crecimiento.

La curva de crecimiento de las bacterias transformadas con el plásmido vacío p33AM, que no produce MccE492 (**Figura 16A**), es similar a la variante que expresa la microcina silvestre WT (**Figura 16B**), a la variante hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$ (**Figura 16C**), y a las mutantes hiperamiloidogénicas P57A (**Figura 16D**) y P59A (**Figura 16E**). El tiempo generacional calculado en la parte exponencial del crecimiento de los cultivos es similar para todos los casos, con un valor cercano a una hora (**Figura 16F**). Se observa que no existe diferencia significativa cuando esta bacteria sintetiza MccE492, sin importar si esta proteína se encuentra formando un nivel bajo de agregados amiloides, como es el caso de WT y $\Delta 54-63$, o si se sintetiza una variante hiperamiloidogénica de ésta, como se observa para P57A y P59A. Este resultado indica que la acumulación de amiloides intracelulares de MccE492 no produce un efecto detectable sobre la tasa de crecimiento de las cepas analizadas. Sin embargo, a pesar de no existir diferencias en este aspecto, no se puede descartar la existencia de otros parámetros que puedan verse afectados por la acumulación de microcina en forma de amiloides.

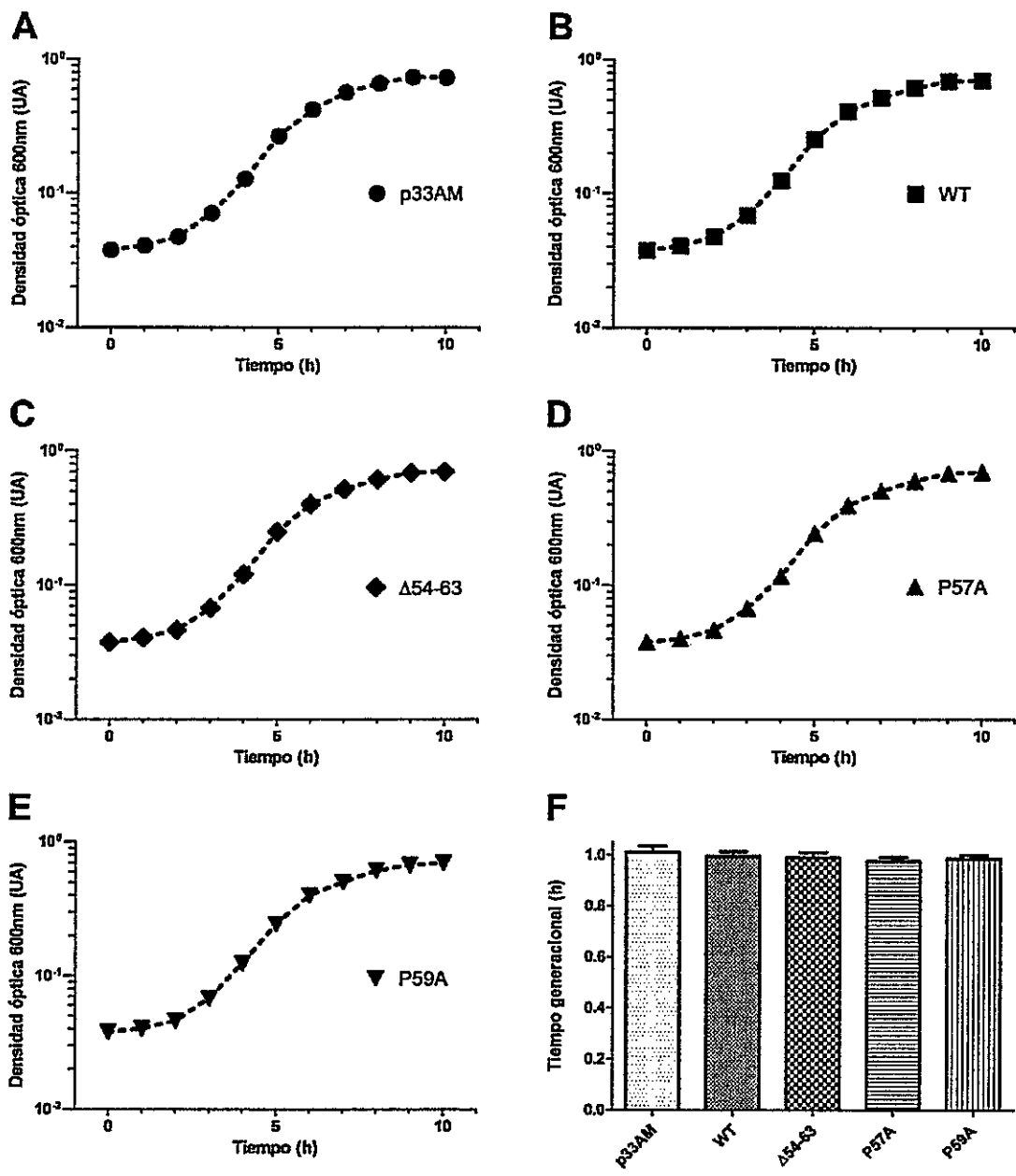


Figura 16. Determinación del tiempo generacional de bacterias que expresan mutantes de MccE492 con distinta tendencia a la formación de amiloides. Las bacterias fueron crecidas en medio M9 suplementado y se midió la densidad óptica a 600 nm a intervalos de 1 h. (A) Curva de crecimiento de bacterias transformadas con el plásmido vacío p33AM. (B) Curva de crecimiento de bacterias transformadas con pETAB con el gen *mceA* silvestre (WT). (C) Curva de crecimiento de bacterias transformadas con pETAB con el gen *mceA* mutante que produce una proteína hipoamiloidogénica ($\Delta 54-63$). (D) Curva de crecimiento de bacterias transformadas con pETAB con el gen *mceA* mutante que produce una proteína hiperamiloidogénica (P57A). (E) Curva de crecimiento de bacterias transformadas con pETAB con el gen *mceA* mutante que produce una proteína hiperamiloidogénica (P59A). (F) Tiempo generacional de cada una de las transformantes, calculado desde la pendiente del crecimiento exponencial.

3.3.2. Efecto de la formación de inclusiones amiloides sobre la actividad metabólica.

La cuantificación de la actividad metabólica se realizó mediante la tinción vital cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC), que forma parte del Kit CTC BacLight™ RedoxSensor™ CTC Vitality. Brevemente, luego de adicionado este compuesto, las células activas que están respirando utilizando la cadena transportadora de electrones, incorporan el CTC y reducen el tetrazolio presente en esta molécula produciendo formazán, un compuesto insoluble fluorescente de coloración rojiza. Las células que no están respirando o con una tasa de respiración disminuida, reducen menos CTC, produciendo menor fluorescencia.

Para este experimento se transformó la cepa *E. coli* BL21AI con derivados del sistema pETAB. Adicionalmente se evaluó el efecto en el metabolismo que causa la expresión de las distintas mutantes de MccE492 en presencia de np220, debido a que ha sido demostrado previamente que la presencia de np220 genera un aumento en la formación de amiloides intracelulares de la MccE492 (Aguilera, 2015).

Se realizó un ensayo de inducción durante 5,5 h, de manera similar a lo descrito en los experimentos anteriores. Luego de la inducción, se colectaron muestras de las distintas condiciones, las que fueron posteriormente teñidas con CTC. La fluorescencia del compuesto reducido fue analizada mediante citometría de flujo. Para este experimento se utilizó un control negativo de actividad metabólica que consistió en células tratadas con formaldehído (FA 4%) previo a su tinción con CTC, volviéndolas metabólicamente inviables.

En la **Figura 17** se observa que la población activa de la muestra tratada con formaldehído es considerablemente inferior a todas las otras, lo cual se condice con la carencia de reducción del compuesto CTC por parte de estas células inactivas. Por otra parte, las muestras WT, $\Delta 54-63$, P57A y P59A no presentan diferencias en el porcentaje de las células que se encuentran metabólicamente activas, alcanzando todas éstas, niveles cercanos al 95% luego de la inducción. Estas células, al ser inducidas en presencia de np220, que produce un efecto proamiloidogénico, no presentan una variación en la proporción de células activas, con valores iguales a las inducciones sin np220. Adicionalmente, los histogramas de las muestras analizadas se son indistinguibles indicando que, además de presentar el mismo porcentaje de células metabólicamente activas, todas las células presentan un nivel de actividad comparable (**Figura S5**). Este resultado indica que no existe un efecto evidente de la acumulación de agregados de naturaleza amiloide de MccE492 sobre la actividad metabólica de las células que los acumulan, incluso al sobreexpresar las mutantes hiperamiloidogénicas.

Para determinar si una acumulación de amiloides más prolongada puede tener un efecto sobre el metabolismo, se procedió a repetir el experimento anterior aumentando el tiempo de inducción a 24 h. Luego se realizó la tinción con CTC para determinar la población metabólicamente activa. Adicionalmente, en el mismo ensayo de inducción, se realizó una tinción con la sonda amiloidofílica Th-S para determinar la proporción de células que forman agregados amiloides intracelulares en las distintas mutantes de MccE492 a un tiempo mayor, tanto en ausencia como en presencia de np220, y así poder relacionar la acumulación de MccE492 directamente con el efecto en la actividad metabólica que generan estos agregados (**Figura 18**).

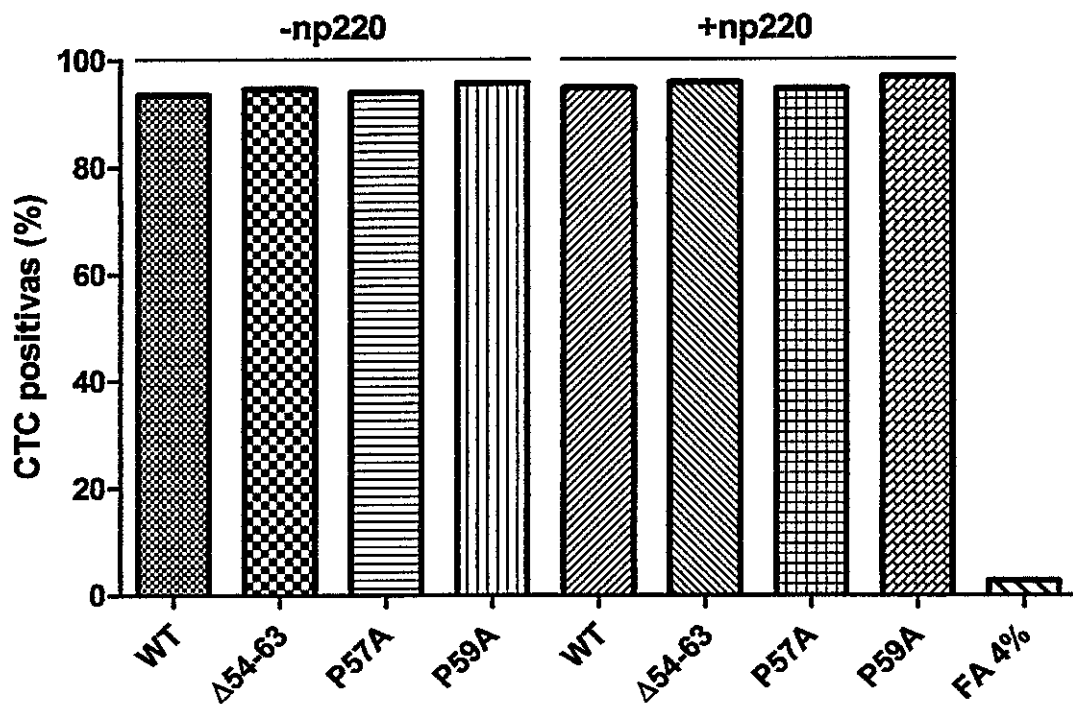


Figura 17. Población metabólicamente activa de bacterias que expresan mutantes de *MccE492*. Bacterias portadoras de derivados de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA*, en ausencia y presencia de np220, fueron inducidas durante 5,5 h. Las células se tiñeron con CTC y se cuantificó las células positivas para la sonda mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la reducción de CTC, que indica las células metabólicamente activas. El control negativo se realizó incubando bacterias con formaldehído 4% (FA 4%).

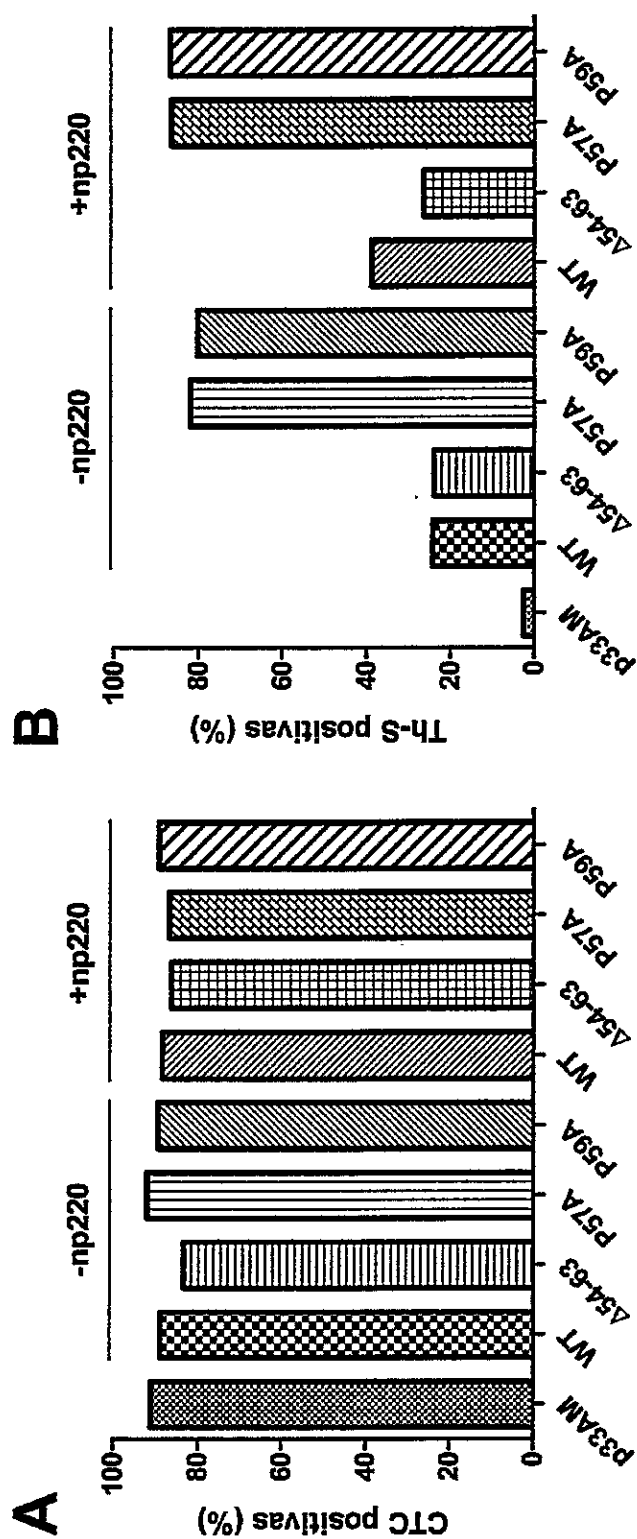


Figura 18. Efecto de la acumulación por 24 horas de amiloides intracelulares de MccE492 sobre la actividad metabólica de bacterias que los producen. Las bacterias portadoras de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA*, en ausencia y presencia de np220, fueron inducidas durante 24 h con arabinosa 0,2% e IPTG 1 mM. **(A)** Población metabólicamente activa a las 24 h de bacterias que expresan mutantes de MccE492. Las células se tiñeron con CTC y se cuantificó la proporción de células positivas para la sonda mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la reducción de CTC, que indica las células metabólicamente activas comparadas con el control negativo p33AM. **(B)** Proporción celular que acumula amiloides intracelulares de mutantes de MccE492 tras 24 h de inducción. Las células se tiñeron con la sonda Th-S y se detectó la señal de Th-S mediante citometría de flujo. Se grafica el porcentaje de la población positiva a la sonda, que indica la presencia de agregados amiloides, comparando la población amiloidegénica con el valor entregado por el control negativo p33AM.

Se observó una leve disminución en la población metabólicamente activa de todas las muestras, siendo esta actividad, sin embargo, superior al 80% en todos los casos. Este leve efecto puede ser atribuible al tiempo de inducción de 24 h y no se condice con la presencia de agregados amiloides, ya que este nivel de población metabólicamente activa también es alcanzado por las bacterias transformadas con el plásmido vacío p33AM que no produce MccE492. Todas las muestras presentan un nivel similar de actividad metabólica, sin importar si estas se encuentran en presencia o no de np220, sin encontrarse diferencias en las mutantes con distintos niveles de agregación (**Figura 18A**). Por otro lado, en la **Figura 18B** se observa la cuantificación de la población amiloidogénica, después de 24 h de inducción, donde las muestras WT y $\Delta 54-63$ alcanzan valores superiores a 20%, mientras que las muestras P57A y P59A presentan niveles de agregación superiores al 80%, valores que se ven levemente aumentados en presencia de np220. En conjunto, ambos resultados indican que no existe una correlación entre la propensión a la agregación de las mutantes y la actividad metabólica de las células que las producen.

3.3.3. Evaluación de la posible desventaja metabólica en cultivos mixtos de células acumuladoras de inclusiones de MccE492.

Para finalizar el estudio de la influencia de la acumulación de inclusiones amiloides sobre la viabilidad celular, se decidió evaluar la posible desventaja metabólica que representa la acumulación de inclusiones amiloides en una bacteria productora de MccE492, en una población mixta con células que acumulan inclusiones en diferente proporción.

Este ensayo se basa en un crecimiento en un cultivo mixto a partir de dos cepas que expresan distintas versiones de la MccE492, y detectar, mediante la secuenciación del gen *mceA*, si alguna de las cepas es desplazada. Para este ensayo se utilizaron los derivados del sistema pETAB que expresan MccE492 con las siguientes mutaciones: silvestre (WT), hipoamiloidogénica ($\Delta 54-63$), e hiperamiloidogénicas (P57A y P59A), y como cepa receptora, *E. coli* BL21A1.

Se realizó un cultivo de noche de las transformantes para luego inocular dos variantes distintas a analizar en cada ensayo con una dilución final de 1:2000 en medio LB, induciendo la expresión de pETAB desde tiempo cero con arabinosa 0,2% e IPTG 1mM, e incubando durante 16 h con agitación a 37°C. A partir del cultivo resultante, se realizó una extracción ADN plasmidial y se secuenció el gen *mceA* utilizando los partidores indicados en la **Sección 2.3**. Si se observa una única secuencia, significa que una de las cepas desplazó a la otra del cultivo.

Previo al experimento, se realizó un ensayo de calibración en el que se determinó cuál es la proporción en la que pueden distinguirse las distintas variantes mediante secuenciación. Para esto se mezclaron cultivos líquidos crecidos por separado a proporciones de 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 y se realizó la extracción de ADN plasmidial y posterior secuenciación. Esta curva arrojó como resultado que la detección de secuencias diferentes puede realizarse únicamente cuando las bacterias se encuentran en una proporción 1:1. Por el contrario, al aumentar la dilución de uno de las bacterias, no es posible detectar el plásmido que se encuentra en menor proporción. Esto quiere decir que, de detectarse señal de ambas variantes del gen *mceA*, existiría una diferencia menor a 10 veces en la proporción de una cepa con respecto a otra y, por lo

tanto, ninguna desplazaría a la otra, indicando que ambas poseen una eficiencia similar en el crecimiento.

En la **Figura 19** se muestran los cromatogramas obtenidos de la secuenciación del gen *mceA* en el ensayo de competencia para las distintas parejas analizadas y, sobre estos, se puede apreciar la secuencia aminoacídica codificada por los codones del gen estructural de MccE492. La **Figura 19A** muestra el cromatograma de la pareja WT/P57A, en el que se puede observar un doble pico en el primer nucleótido del codón que codifica el aminoácido prolina en el lugar 57, indicado por una flecha roja. Este nucleótido fue mutado en la confección de la mutante P57A de MccE492 donde esta prolina fue remplazada por una alanina. El doble pico de señal da cuenta de la presencia de ambas variantes del gen *mceA*, lo que significa que existe presencia de bacterias portadoras de ambos plásmidos. Lo mismo se puede apreciar en la **Figura 19B** para el caso de WT/P59A, donde se observa un doble pico en el primer nucleótido del codón que codifica el aminoácido 59 de MccE492, correspondiente a la presencia del codón para la prolina presente en la variante silvestre WT de la proteína y del codón que genera la alanina presente en la variedad mutante P59A. Para el ensayo WT/ Δ 54-63, ilustrado en la **Figura 19C**, la detección de ambas variantes del gen es posible gracias a la mutación por delección existente en la mutante MccE492 Δ 54-63, donde los nucleótidos de los codones codificantes desde el 54 al 63 fueron removidos, por ende, existe un desplazamiento en fase del marco de lectura del gen. Por ello, existe una serie de dobles picos en el cromatograma desde la prolina 53 en adelante, resultado que se condice con la suma de las secuencias de los plásmidos WT y Δ 54-63, indicando que ambas variantes de microcina están presentes en el cultivo. El resultado obtenido para el ensayo WT/ Δ 54-63 posee el mismo comportamiento que los

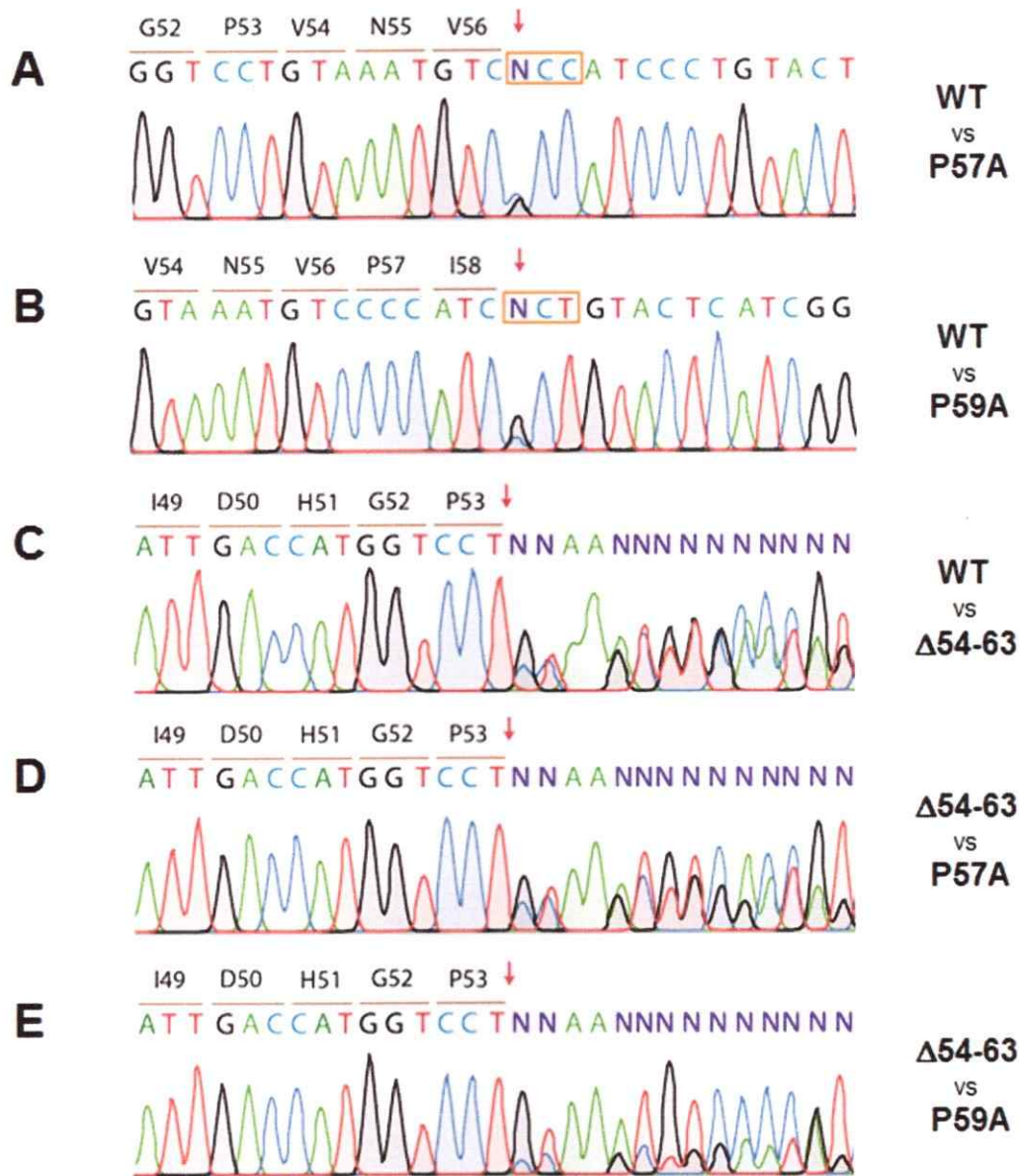


Figura 19. Ensayo de competencia de bacterias que expresan mutantes de MccE492 con distinta tendencia a la agregación amiloide. Secuenciación del gen *mceA* del ADN plasmidial de ensayos de competencias de bacterias portadoras de derivados de pETAB mutantes para el gen *mceA*. Los picos de distintos colores indican la secuencia nucleotídica. La letra N representa a la detección de más de un nucleótido en la posición correspondiente, indicando la presencia de una mezcla de plásmidos. La secuencia aminoacídica, así como la posición de cada aminoácido en la proteína MccE492 se señalan sobre los codones correspondientes. El punto de discordancia de las secuencias se demarca con una flecha de color rojo. **(A)** Cromatograma del ensayo de competencia de bacterias que expresan las variantes de MccE492 WT y P57A. **(B)** Cromatograma del ensayo de competencia de bacterias que expresan MccE492 WT y P59A. **(C)** Cromatograma del ensayo de competencia de bacterias que expresan MccE492 WT y Δ54-63. **(D)** Cromatograma del ensayo de competencia de bacterias que expresan MccE492 Δ54-63 y P57A. **(E)** Cromatograma del ensayo de competencia de bacterias que expresan MccE492 Δ54-63 y P59A.

ensayos $\Delta 54-63/P57A$ (Figura 19D) y $\Delta 54-63/P59A$ (Figura 19E). Los resultados obtenidos indican que ninguna de las células productoras de las mutantes de MccE492 con menor propensión a la agregación (WT y $\Delta 54-63$) presentó una ventaja por sobre las células productoras de las variedades hiperamiloidogénicas (P57A y P59A). Se puede concluir, con este experimento y los experimentos anteriores, que la acumulación de agregados de naturaleza amiloide de MccE492 no tiene un efecto evidente sobre el metabolismo de las células productoras utilizadas en este trabajo.

4. DISCUSION.

4.1. Existen componentes del clúster génico que modulan la amiloidogénesis de la MccE492.

La formación de inclusiones amiloides intracelulares observada en este estudio no parece ser resultado de la mera sobreexpresión de la MccE492 o de otras proteínas con baja solubilidad como serían proteínas de membrana. Lo anterior pues dichas inclusiones son observadas sólo bajo dos circunstancias: al sobreexpresar la MccE492 silvestre en presencia de al menos parte de los componentes codificados en el clúster, o al sobreexpresar mutantes hiperamiloidogénicas de la MccE492. Dicho de otro modo, la mera sobreexpresión de la MccE492 silvestre (o la mutante hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$) no conlleva a la formación de inclusiones amiloides intracelulares. Por otra parte, en todos los experimentos de expresión de MccE492 usando el sistema p33pETAB, se expresa también el gen de inmunidad a partir del mismo promotor. Si bien la proteína de inmunidad es una proteína de membrana, su sobreexpresión en conjunto con la MccE492 silvestre tampoco conlleva a la formación de inclusiones citoplasmáticas. Finalmente, en experimentos preliminares en nuestro laboratorio, se ha detectado la formación de inclusiones amiloides en *K. pneumoniae*, la cual posee sólo una copia de los genes del clúster productor de MccE492, lo que indica que la formación de dichas estructuras es un fenómeno que ocurre en la naturaleza y no se debería a un artefacto generado por la sobreexpresión de esta proteína (**Andrés Marcoleta, resultados no publicados**).

Previamente se demostró que al expresar en *E. coli* el clúster para la producción de MccE492 activa contenido en pMccE492 se forman agregados intracelulares de

esta proteína luego de 48 h, y que estos agregados son detectados por las sondas Th-S y BTA1 como inclusiones citoplasmáticas de distinto tamaño y número por célula. Este efecto no fue observado al expresar únicamente el gen de la inmunidad y el estructural de la MccE492 (Aguilera, 2015). Estos resultados sugieren la existencia de un componente del clúster génico que actúa como un potenciador de la agregación amiloide intracelular de MccE492.

Al analizar los resultados con los plásmidos que contienen distintos segmentos del clúster de producción de MccE492 y, en presencia de un exceso de MccE492 producida por la inducción del sistema pETAB, se observó una clara diferencia entre los plásmidos que no producen o producen poco efecto en la amiloidogénesis, asemejándose al control negativo pHc79, y los que producen un nivel de población positiva a Th-S similar o superior al alcanzado por el plásmido pMccE492 que contiene todos los genes del clúster productor. Sin embargo, no fue posible identificar un factor específico que fuera responsable de la totalidad del efecto.

Un caso destacable es la inducción del sistema pETAB en presencia de pA40, ya que en este ensayo se obtuvo un porcentaje de células positivas a la sonda Th-S que se encuentra en un nivel intermedio entre la carencia de efecto (similar al control negativo pHc79) y un efecto positivo en la amiloidogénesis (similar a pMccE492). La particularidad de este plásmido es la presencia del gen *mceF*, el cual posiblemente codificaría una proteasa transmembrana, cuya función propuesta es clivar la pro-MccE492 o estar implicada en la inmunidad de la célula productora de MccE492 según estudios previos (González, 2011). Si comparamos los segmentos del clúster génico presentes en los plásmidos pJAM229 y pMccE492 (Figura 4) podemos determinar que la diferencia entre estos radica en que el primero presenta el gen *mceF* trunco,

generando una proteína que carece de un segmento N-terminal, teniendo 179 aminoácidos, mientras que el segundo lo presenta de manera íntegra, sintetizando una proteína con 230 aminoácidos, diferencia que tendría un efecto en la disposición de las hélices transmembrana y de su potencial función en las células productoras, y podría suponer una diferencia en la agregación de la MccE492. Sin embargo, al analizar la diferencia existente entre la inducción de sistema pETAB en presencia de pJAM229 o de pMccE492 (**Figura 7**) se puede observar que no existe una diferencia considerable entre la población formadora de amiloides intracelulares de MccE492. Adicionalmente los plásmidos pJI y pJRSI carecen por completo del gen *mceF* y son capaces de inducir la amiloidogénesis de MccE492, indicando que este producto génico no participaría en este proceso.

Al reducir los candidatos, fue posible darse cuenta que pJI es el plásmido mínimo que produciría el efecto potenciador de la amiloidogénesis intracelular de la MccE492, indicando que cualquier factor proamiloidogénico debiese estar codificado en el segmento del clúster génico presente en pJI.

Uno de estos genes candidatos fue previamente descrito y corresponde al producto génico de *mceC*. MceC es una proteína de 370 aminoácidos que actúa como una glicosil-transferasa. Resultados previos señalan que la sobreexpresión de MceC fusionada a una proteína fluorescente, conduce a la formación de cuerpos de inclusión, aunque se desconoce si éstos son de naturaleza amiloide. Además, analizando la secuencia de MceC, se encontró una gran cantidad de regiones predichas como proamiloidogénicas (**Sergio Gutiérrez, resultados no publicados**). No obstante, al realizar la inducción de sistema pETAB en presencia de npB4 se obtiene un porcentaje de células positivas a la sonda Th-S incluso superior al nivel alcanzado por pMccE492.

npB4 presenta una interrupción del gen *mceC* por el transposón Tn5 y, por ende, no produce la proteína MceC. Por consiguiente, la alta proporción de células que presentan amiloides intracelulares en presencia de npB4 indica que este producto génico no sería requerido para el efecto potenciador de la agregación. Al mismo tiempo, las inducciones en presencia de plásmidos que cuentan con un segmento reducido del clúster génico que comprende al gen *mceC*, como lo son pJIC4 y pJIE291, no generan un aumento en la población bacteriana que acumula amiloides de MccE492 con respecto al control negativo pH79, resultado que apoya la carencia de efecto proamiloidogénico de MceC.

Uno de los componentes codificados en este segmento es la propia microcina, por lo que se propuso que el efecto podría explicarse por la expresión previa a la inducción de la MccE492. Tal efecto se observó al realizar la inducción del sistema pETAB en presencia de pBA, que expresa constitutivamente el precursor estructural de la MccE492 (**Figura 10**). Esto indicaría que la presencia del péptido estructural, de manera previa a la inducción del gen *mceA* a partir de pETAB, estaría propiciando la formación de amiloides una vez inducida la expresión de MccE492. Adicionalmente, el bajo porcentaje de células positivas a la sonda Th-S observado en las bacterias no inducidas que portan pBA indica que las inclusiones amiloides detectadas mediante citometría se forman cuando se induce la producción de la proteína MccE492 a partir de pETAB, y no serían estructuras preformadas por proteína sintetizada producto de la expresión de pBA. Estos resultados sugieren que la cantidad de proteína MccE492 expresada a partir de pBA no sería suficiente para formar inclusiones detectables, pero sí para formar pequeños núcleos que aceleran o favorecen la constitución de las inclusiones de MccE492 comúnmente observadas. Este resultado se condice con

experimentos de polimerización *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, donde al agregar semillas constituidas por fibras de MccE492 fragmentadas por sonicación a una muestra de MccE492 soluble, la cinética de polimerización se ve acelerada, apreciándose la formación de amiloides a tiempos significativamente menores que la situación control (Marcoleta y cols, 2013b). Por otro lado, experimentos de microscopía electrónica indican que, en etapas tempranas de la cinética de formación de amiloides de MccE492, existen diversas estructuras que corresponderían a precursores oligoméricos de las fibras maduras (Arranz y cols, 2012). Esto sugiere que, una vez inducida la expresión del gen *mceA* a partir de pETAB, la proteína MccE492 sintetizada transitaría por estas estructuras oligoméricas, hasta llegar a la forma que se acumula en las inclusiones citoplasmáticas. La proteína previamente sintetizada, proveniente de la expresión constitutiva del gen *mceA* producida por pBA, debiese seguir estos mismos pasos para formar una estructura amiloide, por lo que es posible que al momento de inducir el gen *mceA* desde pETAB, ya debiesen existir estas estructuras en el citoplasma producto de la MccE492 constitutiva, las que acelerarían la amiloidogénesis.

Un resultado destacable es el efecto observado por el péptido trunco de MccE492 producido por np220 (Figura 7). El análisis de la secuencia revela que la proteína resultante correspondería a un péptido de 45 aminoácidos formado por los primeros 40 residuos de la MccE492, comprendiendo una posible región proamiloidogénica secundaria entre los residuos 16 y 38. Al realizar la inducción del sistema pETAB en presencia de pBA* que produce la proteína trunca, se observa un efecto que es similar al producido por pBA, que cuenta con el gen *mceA* íntegro (Figura 10). Por consiguiente, es factible que parte del efecto proamiloidogénico de

np220 se deba a la expresión previa del péptido trunco, pudiendo éste formar núcleos que favorezcan la formación de amiloides al igual que el péptido íntegro.

Sin embargo, la expresión de la MccE492 previa a la inducción del sistema pETAB, tanto desde pBA como de pBA* no da cuenta completamente del efecto proamiloidogénico que produce el clúster completo de MccE492, lo que sugiere que se requeriría de otro(s) factor(es) para producir un efecto mayor en la generación de agregados de naturaleza amiloide.

Un candidato como factor proamiloidogénico es OrfL, pero al analizar los ensayos de inducción del sistema pETAB en presencia de pJIC4 y pJIE291 (**Figura 7**) no se observa un aumento en la población positiva a la sonda Th-S. Sin embargo, es posible que la falta de efecto observado en pJIC4 y pJIE291 se deba a la baja expresión de este gen, que pudiese estar regulada por otros factores del clúster ausentes en estos plásmidos, lo que impediría ver un efecto cuantificable sobre la agregación de MccE492. Experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio han determinado que el producto génico de *orfL* actúa como una nueva microcina (**Felipe Hurtado, resultados no publicados**). Este gen se encuentra codificado adyacente a su propio gen de inmunidad denominado *mceM* y, que para su actividad tóxica, requiere de una modificación post-traducciona l y posterior exportación al medio extracelular que es llevada a cabo por los mismos componentes del clúster responsables de la producción de MccE492 activa. Se desconoce si la expresión del gen *orfL* se encuentra regulada, por lo cual se decidió realizar el ensayo de inducción del sistema pETAB con la construcción pBAD33-*orfL*, que permite la sobreexpresión del gen *orfL* sin presentar un efecto nocivo detectable en el tiempo generacional de las células productoras (**Núñez, 2012**). Un hecho notable es la presencia de células positivas a la sonda Th-S cuando

se expresa el gen *orfL* por sí mismo (**Figura 11**), lo que indicaría que su producto génico forma agregados amiloides. Este resultado se condice con el análisis de la secuencia de la proteína OrfL y los estudios *in vitro* (**Pablo Lobos y Felipe Hurtado, resultados no publicados**). OrfL tendría un efecto directo sobre la agregación de MccE492, ya que al inducir la expresión del gen *mceA* y *orfL* en conjunto se genera una agregación amiloide superior a cada uno por separado, indicando que existe un efecto cooperativo producto de una potencial interacción directa entre ambas proteínas, el cual podría estar explicado por una formación de amiloides formados por ambas proteínas. En suma, se determinó que la proteína OrfL estaría actuando como un potenciador de la agregación de la MccE492 y/o viceversa. Este efecto podría dar una explicación a lo observado en experimentos de agregación *in vitro* (**Paulina Aguilera, resultados no publicados**), en los que la MccE492 copurifica con OrfL, las cuales interactuarían acelerando la formación de amiloides con respecto a una situación en la que se utiliza un péptido sintético de MccE492 carente de una "contaminación" con la proteína de OrfL.

Aún falta determinar cuáles son los componentes que regulan la producción de MccE492 en la cepa bacteriana *K. pneumoniae* RYC492. Es posible que en alguna parte de la isla genómica o dentro del genoma bacteriano se encuentren más factores implicados en la regulación de los agregados amiloides, que no son esenciales para la producción o exportación de la MccE492 activa. Esto ayudará a entender el significado biológico de la formación de amiloides intracelulares de MccE492, la que se ha propuesto como un posible mecanismo de inactivación de la toxina en el citoplasma de las células que la expresan.

4.2. La acumulación de inclusiones amiloides de MccE492 resulta inocua para las células de *E. coli* que la expresan.

En general, la tendencia a la formación de amiloides está determinada por la secuencia aminoacídica de cada proteína, existiendo secuencias específicas denominadas regiones proamiloidogénicas, además de residuos localizados en posiciones flanqueantes a estas regiones, que pueden actuar como residuos *gatekeeper*, inhibiendo la formación de hebras β (López de la Paz y Serrano, 2004; Maurer-Stroh y cols, 2010; Beerten y cols, 2012). En particular, para el caso de la MccE492, existe una región entre los aminoácidos 54 y 63 que ha sido descrita como la región proamiloidogénica primaria. Una mutante por delección de esta región (Δ 54-63) produce una disminución en la formación de agregados de naturaleza amiloide. Dentro de esta región se encuentran dos prolinas, ubicadas en las posiciones 57 y 59, que actúan como residuos *gatekeeper*, y al ser sustituidas por alaninas (mutantes P57A y P59A) se observa un aumento de la formación de agregados amiloides con respecto a la MccE492 silvestre (Aguilera, 2015).

Debido a la carga metabólica que le significa a la célula la síntesis y acumulación de estructuras amiloides intracelulares de MccE492, podría esperarse la existencia de un efecto detectable en el metabolismo celular que, además, se correlacionaría con el nivel de agregación amiloide de cada una de las mutantes de MccE492. Sin embargo, usando distintas aproximaciones, se determinó que los amiloides intracelulares de MccE492 no afectan el metabolismo de las células acumuladoras. Estas células acumulan inclusiones de MccE492 sin sufrir una alteración en su tiempo generacional (Figura 16) o en su actividad metabólica (Figura 17-18) con respecto a la situación control de una célula que no expresa la MccE492 (p33AM). Ninguna de las distintas

variantes de MccE492 sobreexpresadas le confirió características a las células acumuladoras que le significaran una desventaja por sobre las otras, en ensayos de competencia (**Figura 19**). Esto quiere decir que las células son capaces de realizar sus funciones, tanto homeostáticas como de replicación, sin verse afectadas de manera evidente por la presencia de los agregados amiloides intracelulares de MccE492.

Este resultado difiere de otros que indican que la acumulación de cuerpos de inclusión amiloide son tóxicos para células de *E. coli*, como ocurre al sobreexpresar variantes hiperamiloidogénicas de RepA (**Fernández-Tresguerres y cols, 2010**). Este efecto tóxico podría estar relacionado con la ausencia de residuos *gatekeepers* en regiones de la proteína propensas a la agregación amiloide, como ha sido visto para CsgA, (la subunidad mayor de curli) y para $\sigma^{32\beta}$ -GFP (región proamiloidogénica del factor Sigma 32) (**Wang y cols, 2010; Beerten y cols, 2012**). Sin embargo, el resultado obtenido para MccE492 es comparable al caso del producto génico de *orfL*, donde la sobreexpresión de este gen no produce un efecto sobre el tiempo generacional de las células productoras (**Núñez, 2012**). La falta de efecto en el metabolismo pudiese estar relacionada con la modulación de la toxicidad. Tanto la proteína OrfL como MccE492, a diferencia de RepA, tienen una función bactericida, por lo tanto, pudiese ser que la formación de agregados amiloides actúe como una manera de reducir la actividad tóxica que significa la mantención de estas moléculas en estado soluble, favoreciendo la mantención en estructuras amiloides intracelulares inertes.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la formación y mantención de los agregados amiloides intracelulares de MccE492 estaría regulada por la chaperona DnaK. El experimento de inhibición de DnaK (**Figuras 12-13**) indicó que esta chaperona es necesaria para el control de la formación de los agregados

amiloides de MccE492, pues en estas condiciones se generó un aumento en la población bacteriana positiva a la sonda Th-S para las mutantes menos propensas a la agregación (WT y Δ 54-63) que indica un aumento en la población que genera amiloides, mientras se detectó como una tendencia que fue comprobada por un aumento en la fluorescencia promedio para las mutantes hiperamiloidogénicas (P57A y P59A) que generaría aún más agregados intracelulares. Estos resultados son congruentes con lo observado en el experimento de ganancia de función de DnaK (**Figura 14**), pues la sobreexpresión del gen *dnaK* genera una disminución en los agregados amiloides, tanto de la MccE492 silvestre como de la mutante P59A.

Se ha reportado que DnaK se encuentra presente en la superficie de cuerpos de inclusión (**Carrió y Villaverde, 2005**), favoreciendo la estructura nativa de las proteínas dentro de estos agregados (**González-Montalbán y cols, 2006**), además, de ser requerida en la reactivación de agregados amorfos producidos por el aumento de la temperatura (**Weibezahn y cols, 2004; Zietkiewicz y cols, 2006**). En cuanto a agregados de naturaleza amiloide, se ha demostrado que la chaperona DnaK tiene un rol en la regulación de la formación de inclusiones amiloides de la variante amiloidogénica (A31V) del dominio WH1 de la proteína RepA, favoreciendo el cambio conformacional *in vivo* de los agregados amiloides intracelulares de esta proteína, desde una estructura globular altamente tóxica hacia una conformación en forma de "cometa" menos tóxica para las células productoras. Adicionalmente, DnaK inhibe la formación *in vitro* de fibras amiloides de esta proteína (**Gasset-Rosa y cols, 2014**). Por la gran variedad de funciones asociadas a DnaK, aún se desconoce a qué nivel de la agregación amiloide de MccE492 actúa esta chaperona, pudiendo existir más de un punto en la formación amiloides intracelulares en el cual se necesite su regulación.

5. CONCLUSIONES.

1. El producto génico de *orfL*, codificado dentro del clúster de producción de MccE492, forma agregados amiloides intracelulares y aumenta cooperativamente la formación de dichos agregados en presencia de MccE492.
2. La chaperona DnaK desfavorece la formación de amiloides intracelulares de MccE492.
3. Los agregados amiloides intracelulares de MccE492 no tienen un efecto evidente sobre la tasa de crecimiento ni sobre la viabilidad de las bacterias que los acumulan.

6. REFERENCIAS.

- **Aguilera P** (2015) Formación de amiloides intracelulares a partir de Microcina E492 e identificación de residuos que afectan su amiloidogénesis. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Arranz R, Mercado G, Martín-Benito J, Giraldo R, Monasterio O, Lagos R, Valpuesta JM** (2012) Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *J. Struct. Biol.* **178**: 54-60.
- **Asensio C, Perez Diaz JC, Martinez MC, Baquero F** (1976) A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 7-14.
- **Baquero F, Moreno F** (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Letters.* **23**: 117-124.
- **Beerten J, Jonckheere W, Rudyak S, Xu J, Wilkinson H, De Smet F, Schymkowitz J, Rousseau F** (2012) Aggregation gatekeepers modulate protein homeostasis of aggregating sequences and affect bacterial fitness. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**: 357-366.
- **Bieler S, Estrada L, Lagos R, Baeza M, Castilla J, Soto C** (2005) Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 26880-26885.
- **Bignon E** (2015) Relación entre los estados oligoméricos de la microcina E492, su actividad y su agregación amiloide. Tesis de Doctorado en Microbiología. Universidad de Santiago de Chile.
- **Braun V, Patzer S, Hantke K** (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**: 365-380.
- **Carrió MM, Villaverde A** (2005) Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol.* **187**: 3599-3601.
- **Chang L, Miyata Y, Ung PM, Bertelsen EB, McQuade TJ, Carlson HA, Zuiderweg ER, Gestwicku JE** (2011) Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chem Biol.* **18**: 210-21.
- **Chapman M, Robinson L, Pinkner J, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren S** (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* **295**: 851-855.
- **Chiti F, Dobson CM** (2006) Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 333-366.
- **de Lorenzo V** (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**: 72-75.
- **de Lorenzo V** (1985) Factors affecting microcin E492 production. *J. Antibiot.* **36**: 340-345.

- **de Lorenzo V, Pugsley AP (1985)** Microcin E492, a low molecular weight peptide antibiotic which causes depolarization of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **27**: 666-669.
- **Destoumieux-Garzón D, Thomas X, Santamaria M, Goulard C, Barthélémy M, Boscher B, Bessin Y, Molle G, Pons AM, Letellier L, Peduzzi J, Rebuffat S (2003)** Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1031-1041.
- **Espargaró A, Sabate R, Ventura S (2012)** Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect in vivo protein aggregation. *Mol. BioSyst.* **8**: 2839-2844.
- **Fernández-Tresguerres ME, Moreno-Díaz de la Espina S, Gasset-Rosa F, Giraldo R (2010)** A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **77**: 1456-1469.
- **Fischbach M, Lin H, Liu DR, Walsh C (2006)** How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 132-138.
- **Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW (2007)** Functional amyloid: from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 17-224.
- **Gasset-Rosa F, Coquel AS, Moreno-del Álamo M, Serrano AM, Fernández-Tresguerres ME, Moreno-Díaz de la Espina S, Lindner AB, Giraldo R (2014)** Direct assessment in bacteria of prionoid propagation and phenotype selection by Hsp70 chaperone. *Mol. Microbiol.* **91**: 1070-7087.
- **Giraldo R, Fernández-Tresguerres ME (2004)** Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid.* **52**: 69-83.
- **Giraldo R, Moreno-Díaz de la Espina S, Fernández-Tresguerres ME, Gasset-Rosa F (2011)** RepA WH1 prionoid, A synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host. *Prion.* **5**: 60-64.
- **González B (2011)** Efecto de la expresión de los genes *mceD*, *mceF* y *orfK* sobre cepas productoras de microcina E492. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **González-Montalbán N, García-Fruitós E, Ventura S, Arís A, Villaverde A (2006)** The chaperone DnaK controls the fractioning of functional protein between soluble and insoluble cell fractions in inclusion body-forming cells. *Microb Cell Fact.* **5**: 26.
- **Guzmán LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995)** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- **Hohn B, Collins J (1980)** A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene.* **11**: 291-298.
- **Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM (2014)** The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Molec Cell Biol.* **15**: 384-396.

- **Kolter R, Moreno F (1992)** Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 141-163.
- **López de la Paz M, Serrano L (2004)** Sequence determinants of amyloid fibril formation. *PNAS.* **101**: 87-92.
- **Lagos R, Wilkens M, Vergara C, Cecchi X, Monasterio O (1993)** Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**: 145-148.
- **Lagos R, Villanueva JE, Monasterio O (1999)** Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**: 212-217.
- **Lagos R, Baeza M, Corsini G, Hetz C, Strahsburger E, Castillo JA, Vergara C, Monasterio O (2001)** Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**: 229-243.
- **Lagos R, Tello M, Mercado G, García V, Monasterio O (2009)** Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**: 74-85.
- **Larsen R, Letain T, Postle K (2003)** *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 211-218.
- **Marcoleta A, Gutiérrez-Cortez S, Maturana D, Monasterio O, Lagos R (2013a)** Whole-genome sequence of the microcin E492-producing strain *Klebsiella pneumoniae* RYC492. *Genome Announc.* **1**: 1-2.
- **Marcoleta A, Marín M, Mercado G, Valpuesta JM, Monasterio O, Lagos R (2013b)** Microcin E492 amyloid formation is retarded by posttranslational modification. *J. Bacteriol.* **195**: 1-10.
- **Maurer-Stroh S, Debulpaep M, Kuemmerer N, Lopez de la Paz M, Martins IC, Reumers J, Morris KL, Copland A, Serpell L, Serrano L (2010)** Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat. Methods* **7**: 237-245.
- **Mayer MP, Bukau B (2005)** Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* **62**: 670-684.
- **Nolan EM, Fischbach MA, Koglin A, Walsh CT (2007)** Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 14336-14347.
- **Núñez G (2012)** Caracterización del efecto de la sobreexpresión de *orfL* y *orfK*, dos proteínas similares a microcinas. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Postle K, Larsen R (2007)** TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals.* **20**: 453-465.
- **Riley MA, Wertz J (2002)** Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 117-137.

- **Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R** (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *PNAS*. **107**: 2230-2234.
- **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Strahsburger E, Baeza M, Monasterio O, Lagos R** (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3083-3086.
- **Thomas JG, Baneyx F** (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J Bacteriol.* **180**: 5165-5172.
- **Thomas X, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Alfonso C, Blond A, Birlirakis N, Goulard C, Dubost L, Thai R, Tabet J, Rebuffat S** (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**: 28233-28242.
- **Tomoyasu T, Mogk A, Langen H, Goloubinoff P, Bukau B** (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol.* **40**: 397-413.
- **Toyama BH, Weissman JS** (2011) Amyloid structure: Conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem.* **80**: 557-85.
- **Wang X, Zhou Y, Ren JJ, Hammer ND, Chapman MR** (2010) Gatekeeper residues in the major curlin subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *PNAS*. **107**: 163-168.
- **Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B** (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell.* **119**: 653-665.
- **Wilkens M, Villanueva JE, Cofre J, Chnaiderman JS, Lagos R** (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetics determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4789-4794.
- **Zietkiewicz S, Lewandowska A, Stocki P, Liberek K** (2006) Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100-dependent disaggregation. *J Biol Chem.* **281**: 7022-7029.

7. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

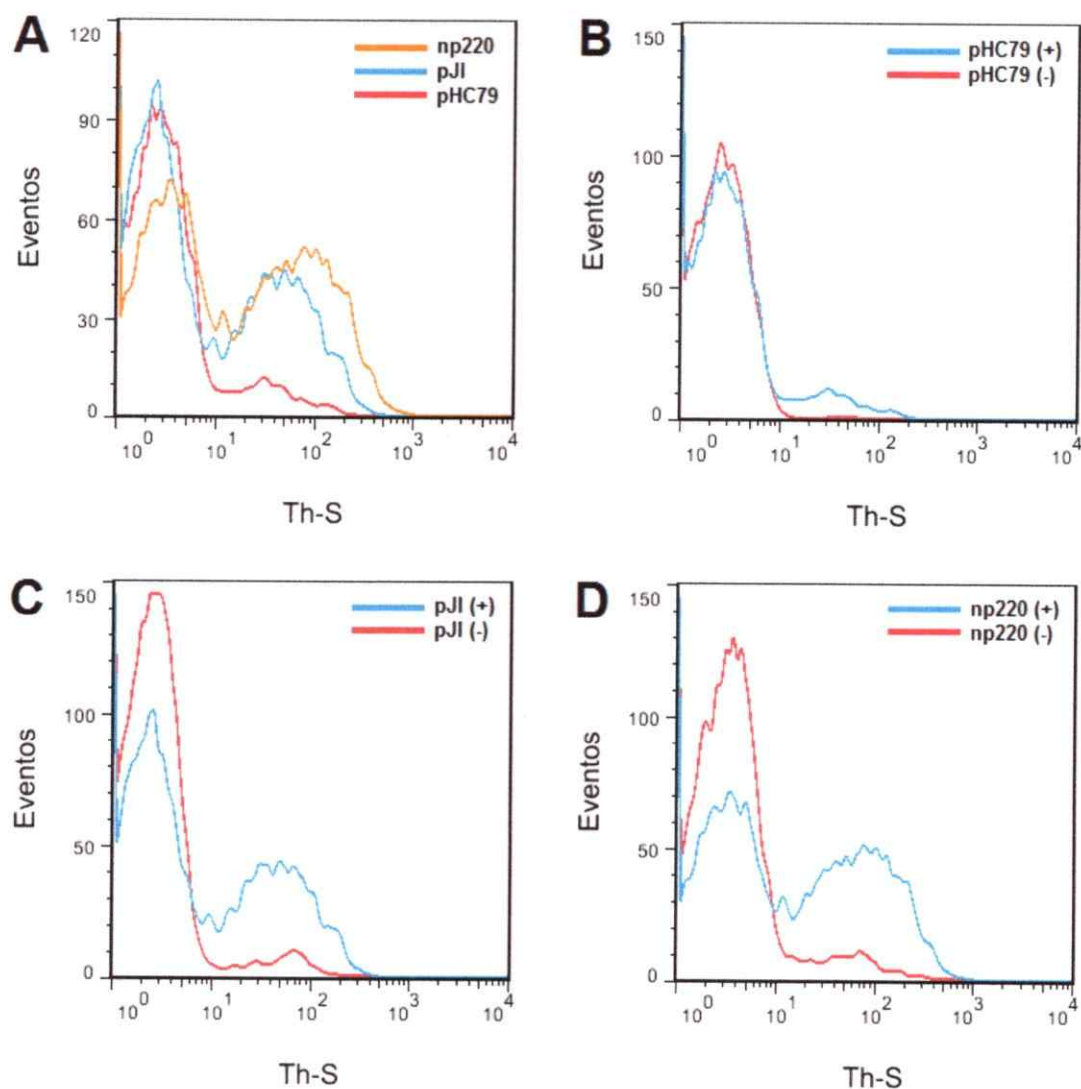


Figura S1. Aumento en la población de bacterias que acumulan amiloides intracelulares producto de portar segmentos del clúster de producción de MccE492. Histogramas de fluorescencia de Th-S detectada por citometría de flujo del ensayo de inducción del plásmido pETAB en bacterias cotransformadas con plásmidos portadores de segmentos del clúster génico. El aumento en la población acumuladora de amiloides intracelulares es detectable por un aumento en el peak de fluorescencia. **(A)** Ensayos realizados en presencia de la totalidad de los genes del clúster (np220 - naranja) y con el plásmido que presenta el menor segmento que genera un efecto proamiloidogénico (pJI - azul) comparado con el control negativo (pHC79 - rojo). **(B, C, D)** Controles que indican el aumento de la población acumuladora de amiloides debido a la inducción del plásmido pETAB (no inducido - rojo; inducido - azul).

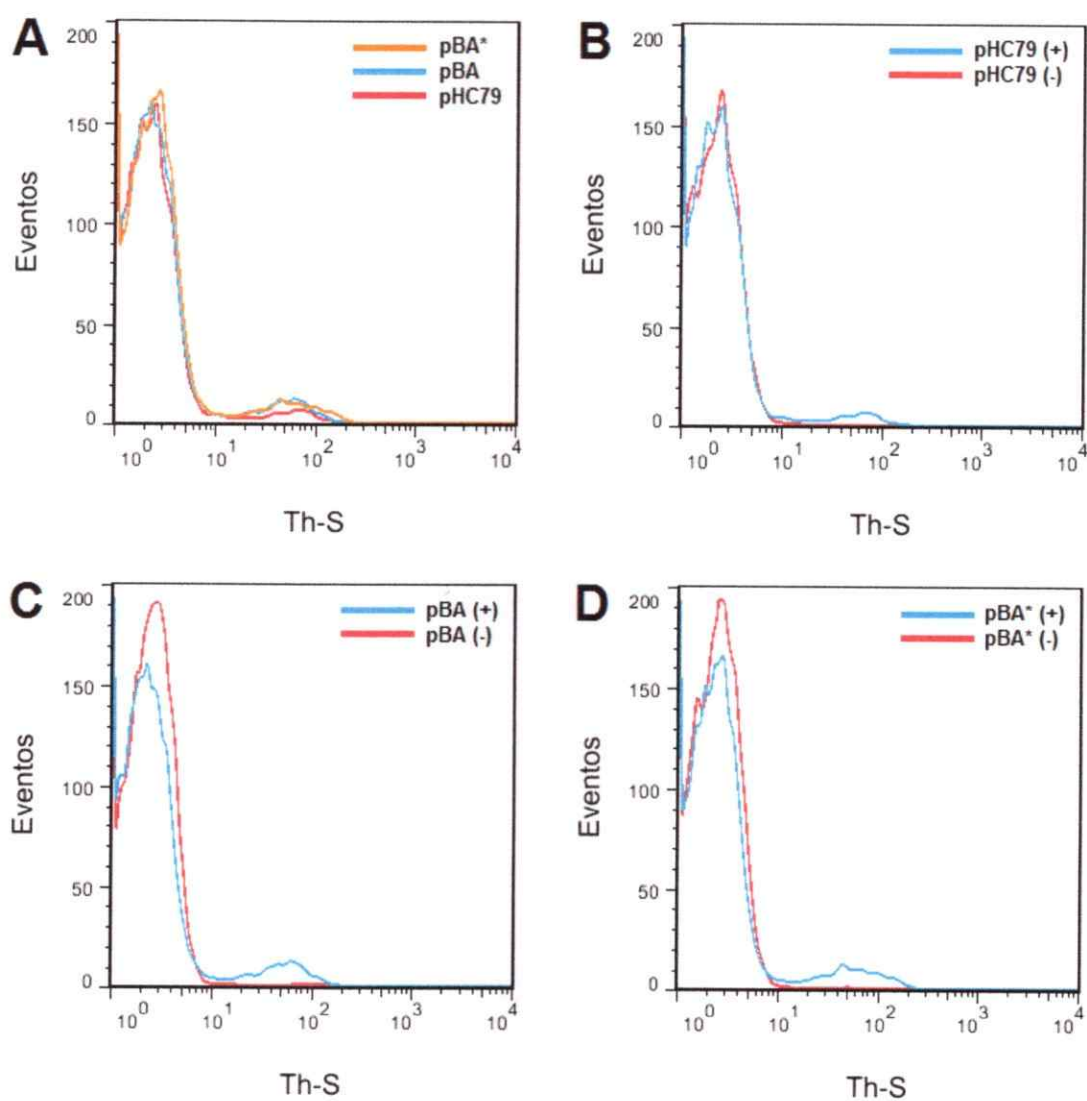


Figura S2. Aumento en la población de bacterias que acumulan amiloides intracelulares de MccE492 producto de la expresión previa a la inducción de dicha proteína. Histogramas de fluorescencia de Th-S detectada por citometría de flujo. (A) Ensayo de inducción del plásmido pETAB en bacterias cotransformadas con plásmidos que expresan de manera constitutiva MccE492 (pBA - azul) o su variante trunca (pBA* - naranja) comparados con el control negativo (pHC79 - rojo). Se grafican los eventos con respecto a la fluorescencia detectada. El aumento en la población acumuladora de amiloides intracelulares es detectable por un aumento en el peak de fluorescencia. (B, C, D) Controles que indican el aumento de la población acumuladora de amiloides debido a la inducción del plásmido pETAB (no inducido - rojo; inducido - azul).

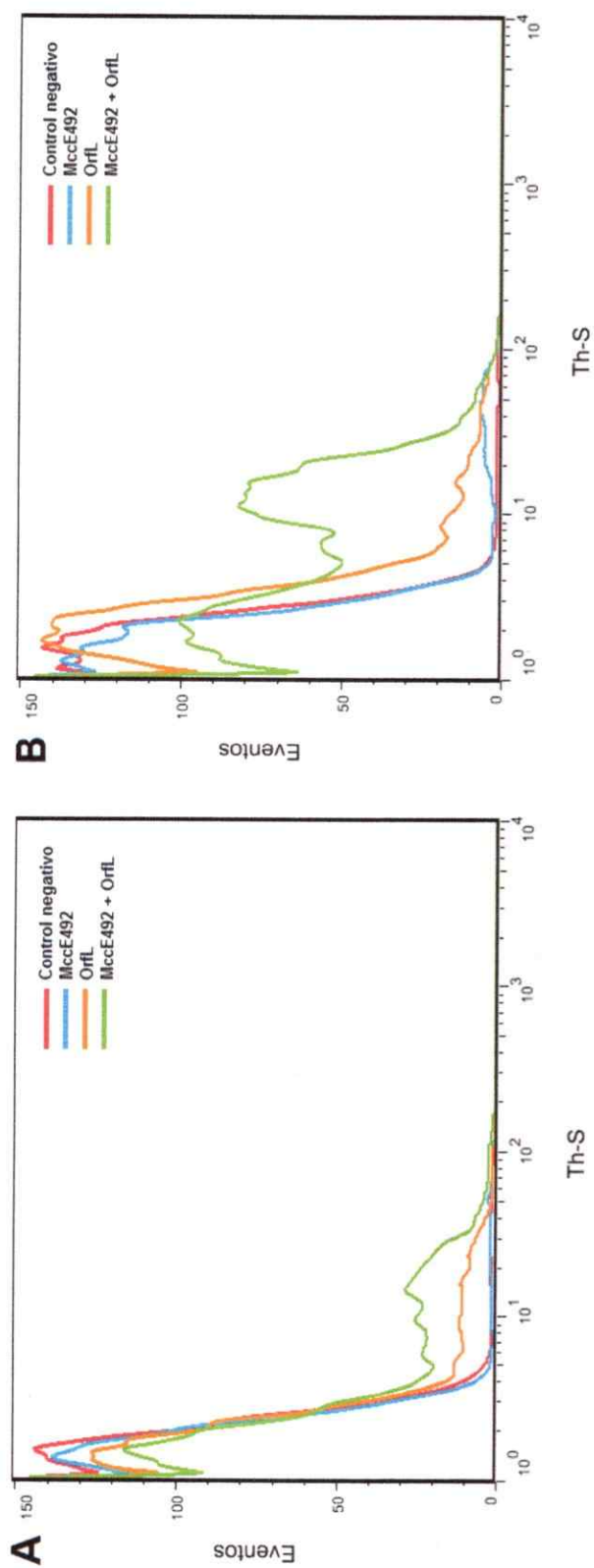


Figura S3. Efecto de la coexpresión de MccE492 y OrfL sobre la formación de amiloides intracelulares. Histogramas de fluorescencia de Th-S detectada por citometría de flujo del ensayo de inducción en bacterias cotransformadas con plásmidos que expresan los genes *mceA* y/o *orfL*. Se grafican los eventos con respecto a la fluorescencia detectada para: el control negativo (pUC57 + pBAD33 – rojo), la muestra que expresa únicamente MccE492 (pUC57pETAB + pBAD33 – azul), la muestra que expresa únicamente OrfL (pUC57 + pBAD33-*orfL* – naranja) y la muestra que expresa MccE492 y OrfL (pUC57pETAB + pBAD33-*orfL* – verde). **(A)** Efecto luego de 2 h de inducción. **(B)** Efecto luego de 5,5 h de inducción. El aumento en la población de bacterias que acumulan amiloides intracelulares es detectable por un aumento en el peak de fluorescencia.

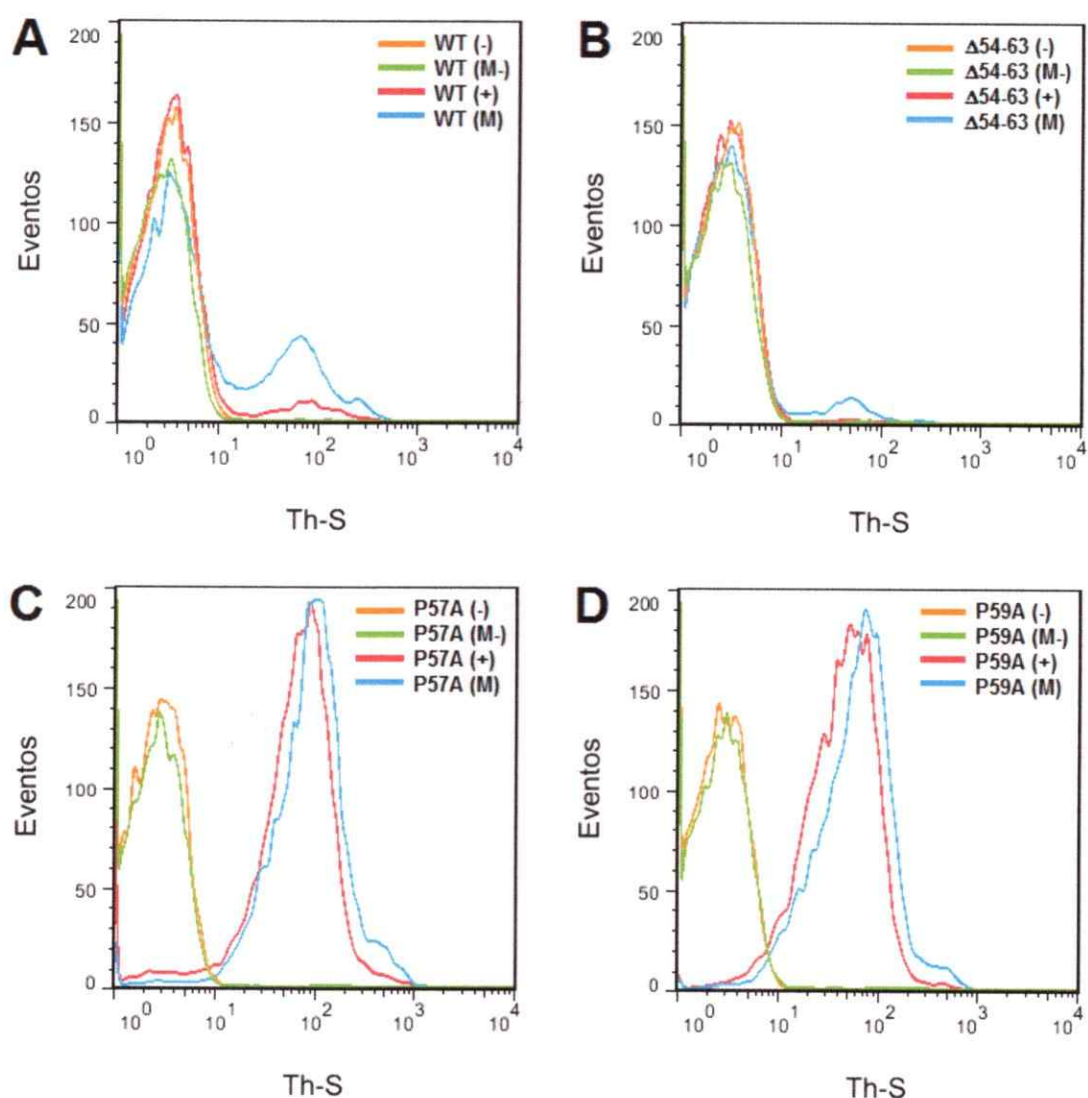


Figura S4. Efecto de inhibición de DnaK sobre la formación de amiloides intracelulares de MccE492. Histogramas de fluorescencia de Th-S detectada por citometría de flujo del ensayo de inducción de los derivados de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA* en presencia o ausencia de miricetina. Se observan las muestras sin inducción ((-) – naranja), con miricetina sin inducción ((M-) – verde), con inducción ((+) - rojo), y con miricetina e inducción ((M) - azul). Se grafican los eventos con respecto a la fluorescencia detectada. **(A)** Efecto sobre bacterias que expresan la proteína silvestre WT. **(B)** Efecto sobre bacterias que expresan la proteína hipoamiloidogénica $\Delta 54-63$. **(C)** Efecto sobre bacterias que expresan la proteína hiperamiloidogénica P57A. **(D)** Efecto sobre bacterias que expresan la proteína hiperamiloidogénica P59A. El aumento en la población acumuladora de amiloides intracelulares es detectable por un aumento en el peak de fluorescencia, mientras que el aumento en cantidad de amiloides intracelulares para la población se observa con un desplazamiento del peak hacia valores de fluorescencia más altos.

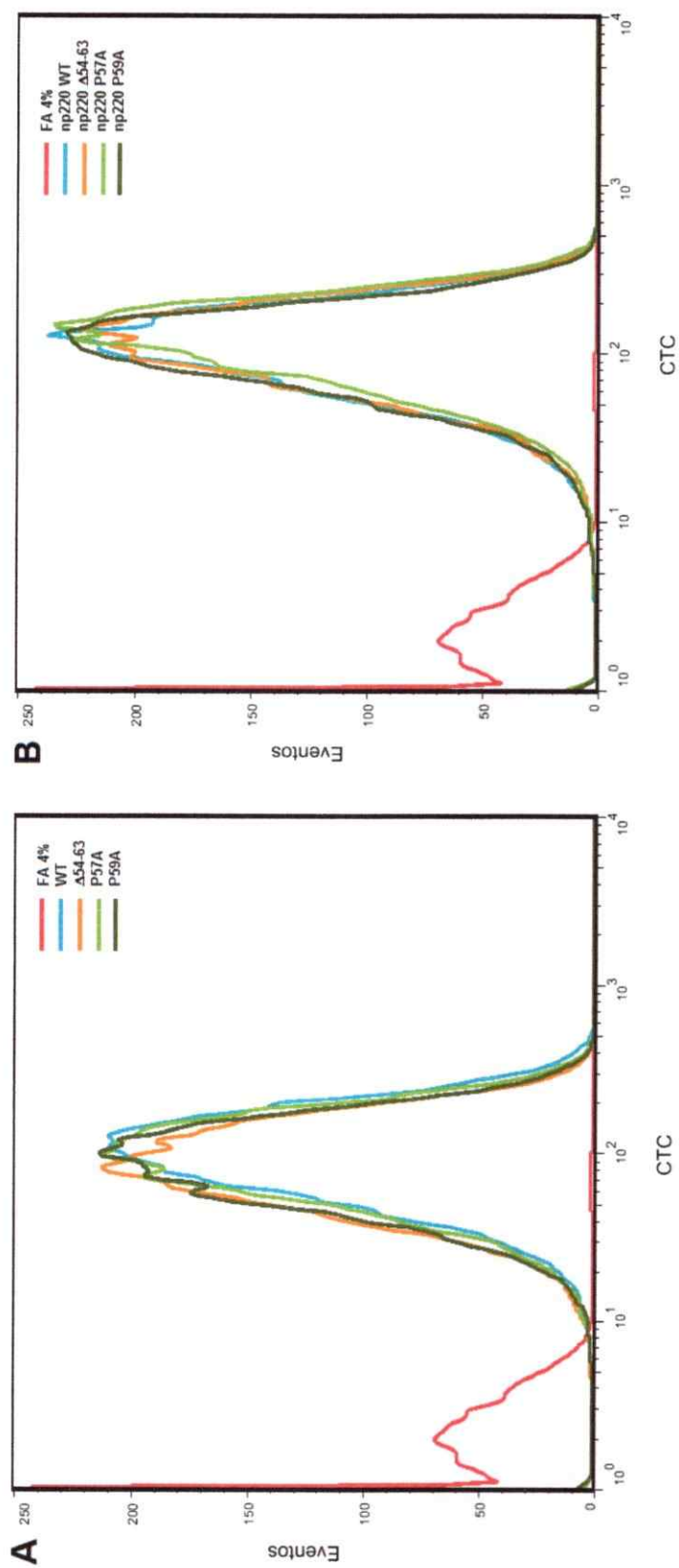


Figura S5. Población metabólicamente activa de bacterias que expresan mutantes de MccE492. Histogramas de fluorescencia de CTC detectada por citometría de flujo del ensayo de inducción de los derivados de pETAB con las distintas mutantes del gen *mceA*. Se grafican los eventos con respecto a la fluorescencia detectada. **(A)** Ensayo de actividad metabólica para las bacterias que acumulan las variantes de MccE492 silvestre (WT – azul), hipoamiloidogénica ($\Delta 54-63$ – naranja) e hiperamiloidogénicas (P57A y P59A – verde claro y oscuro), además de un control negativo de actividad metabólica tratado con formaldehído 4% (FA% – rojo). **(B)** Ensayo de actividad metabólica con las variantes anteriores en presencia del plásmido np220 que cuenta con el resto de los genes del clúster productor de MccE492.