

UCh-FC
MAG-B
A 686.
C.1.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



**REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES *mceBA* DEL
SISTEMA PRODUCTOR 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 Yerko Michel Argandoña Vargas

Noviembre 2015

Santiago, Chile

Director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Co-director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo

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

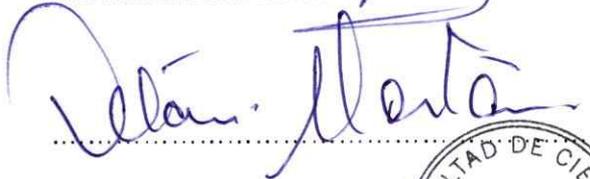
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

YERKO MICHEL ARGANDOÑA VARGAS

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 14 de noviembre de 2015

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco

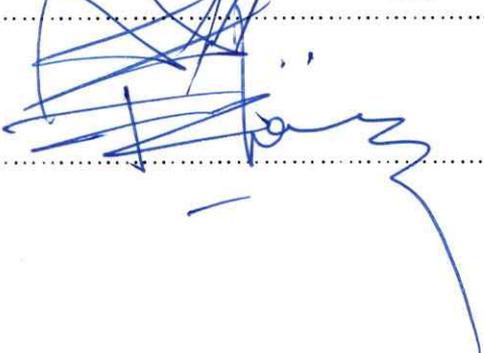

.....


Co-Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio Opazo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza


.....




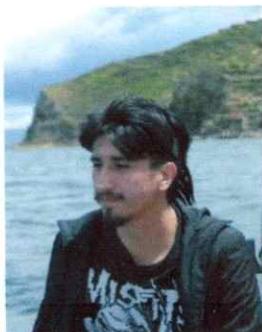
Dr. Francisco Chávez

"Nunca vi a un animal salvaje sentir autocompasión.

Un ave caerá muerta, congelada de la copa de un árbol, sin nunca haber sentido autocompasión"

D.H. Lawrence.

Autobiografía



Como dicen los gringos, fui concebido un día 17 de abril de 1989, siendo ya el tercer y último hijo de una hermosa pareja compuesta por Juan Argandoña Torres, y Rosa Vargas Espindola. Si bien nació en la comuna de ... he pasado toda mi vida en la población La Bandera (26 de enero), comuna de San Ramón, Santiago. En este lugar jugué, crecí, miré y aprendí.

No fue hasta el año 1996 que comenzó mi "vida académica" cuando entré al kínder en el Liceo San Francisco de Asís, en San Ramón. Bueno, en ese lugar mi vida se fue por un tubo, pasando toda mi vida escolar en dicho colegio. Siendo sincero, la pasé muy bien. Pese a que era un alumno destacado, en términos de notas, era arto desordenado, prácticamente todos los años me citaban al apoderado, tenía anotaciones, me expulsaban de la sala de clases, etc. Disfruté mucho esa etapa de mi vida. Actualmente mis amigos más cercanos fueron mis compañeros en ese colegio, por lo tanto el legado escolar, al menos para mí, fue más allá de lo educativo o académico. Fue precisamente en este lugar donde mi inquietud y mi atracción por las ciencias naturales, particularmente por la microbiología, se comenzó a manifestar. Siempre tuve una fascinación por las bacterias, tratando de entender cómo se generaba una enfermedad, una infección, una epidemia. Leía lo que tenía a mi alcance para aclarar mis dudas, pero no tenía mucho material. Eso fue lo que finalmente me motivó a ser microbiólogo. Así que rendí la PSU y las fuerzas mágicas del universo me hicieron entrar a la Universidad de Chile. Entré a la carrera de Licenciatura en Biología impartida por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile el año 2008. La verdad que ahí noté que el colegio no me ayudó mucho en lo académico, encontrándome con un mundo nuevo y difícil en lo académico pero además rico en cultura y cosmovisiones, un aspecto que me ayudó mucho a crecer. A lo largo de la carrera me tropecé un par de veces pero el 2012 terminé la carrera y al año siguiente ingresé al programa de Magister en Ciencias Biológicas de la misma facultad. Lo hice francamente porque si bien tenía las ganas de hacer un doctorado no me sentía lo suficientemente maduro para hacerlo. En este contexto entré a hacer la tesis de magister al laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), en la misma facultad. Y debo decir que fue un antes y un después. En términos de vocación es un lugar donde realmente se puso a prueba este aspecto. Un espacio donde la profesora Rosalba Lagos me dió la valiosa oportunidad de aprender y crecer en términos científicos y por sobre todo, como ser humano.

Este año, y como es de costumbre, me embarqué en un nuevo y duro camino, el Doctorado en Microbiología, ahora en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Solo espero forjar un futuro y contribuir al desarrollo de las nuevas generaciones.

Agradecimientos

Agradezco a todos los que me permitieron llevar a cabo esta tesis: A mis papitos, lindos, preciosos, que me permitieron seguir adelante con todo, quienes fueron mi sostén emocional en todo este proceso, quienes confiaron en mí y quienes me apoyaron cuando lo necesité.

A mis hermanitos lindos preciosos: El Juan (Tonijua, Vikingo, etc) y el Carlos (Carlitos), quienes no solo son mis hermanos, sino que también mis amigos y compañeros y quienes estuvieron a mi lado en todo momento. Bueno además con Carlitos somos "compadres", ya que soy el padrino de su preciosa hija Isidora.

A mis amigos del alma, mis compañeros de vida, mis compadres, no sé qué haría sin ellos: El Pablo y la Romi, el Lucho, el Luli, la Maca, la Vale, el Monolo, el Mauricio, el Pelao'. A mis compañeros de carrera: el Pancho Lucero, el Adrian, el Isaac, el Diego, la Lore, la Susana, la Martuca, la Janina, el Pancho Salinas, el Jhonatan, el JP, el Camilo, la Shantal.

A mis compañeros del BEM: agradezco a la Pauli, quien me acompañó en este camino y con quien estuve hombro con hombro, apoyándonos mutuamente, siempre dispuesta a escuchar y a ayudar. Al Felipe Hurtado (*Stolen*), quien fue un compañero con quien siempre reí y quien siempre estaba dispuesto a conversar, sin hacerse problemas, siempre al lado de una cerveza helada. A mis compañeros mayores, el Andrés quien me ayudó básicamente en todo, siempre dispuesto a dar un consejo, un *tip*, una crítica, pero también siempre dispuesto a compartir un momento para conversar y reír y quien siempre estuvo dispuesto a soportar mi música. Al Pablo (sub-comandante Lobos) con quien fue siempre un agrado conversar, siempre sacando algo nuevo para reflexionar, siempre con la última "chupada del mate" al momento de informar. Un gran hombre quien siempre tuvo la disposición para escuchar y dar consejos. Bueno ya no me queda mucho espacio, pero no quiero dejar de mencionar al Felipe Villanelo y la Andrea Poch quienes siempre confiaron en mí para sus proyectos, les agradeceré eternamente por eso. Al Pouchoucq y al Esteban, quienes siempre me ayudaron a aclarar dudas, y a buscar nuevas soluciones y con quienes siempre se pudo generar una conversación interesante. A la Maca Collao, a mi juicio el pilar del laboratorio y se acabó, fue una compañera que siempre me ayudó cuando lo necesitaba incluso cuando no lo necesitaba. A Don Pedro con quien siempre fue un agrado conversar y la Erika Lang, quien siempre está preocupada de nosotros, cual mamá lo hace con su hijo, a la Nicole Molina quien siempre estuvo dispuesta a compartir y a ayudar...que sería del laboratorio sin ella. También quiero agradecer a mis compañeros más chicos, esas personitas que me enseñaron a enseñar, al Leo Vasquez, al Álvaro Thadani y la Valentina Espinoza, quienes con su paciencia me permitieron hacerlas de profesor y también agradezco a mis otros compañeros más chicos, el Camilo Berrios, la Josefina Marín y la Francisca Hoffman, quienes ya casi están de planta y yo sé que les irá súper, ellos serán la sangre nueva del laboratorio que revitalizará ese espacio.

Agradezco también a los que ya no están presentes, al Sergio Gutiérrez, quien fue mi maestro y mi mentor, al Alexis, al Gonzalo Núñez, a la Daniela Muñoz, al Daniel Maturana, al Eduardo Bignon y su humor diferente, la Daniela Coromer y al Gonzalo Díaz y también su humor diferente.

Y pooooo supuesto no puedo dejar de referirme a los profes, Rosalba Lagos y Octavio Monasterio. Ellos confiaron en mí y me dieron el espacio para desarrollarme como científico y como ser humano, a ser alguien más crítico y también a comprender y a entender lo que sucede a mi alrededor. Me dieron la posibilidad de conocer gente maravillosa. A la profesora Rosalba Lagos le estaré eternamente agradecido, le debo mucho, le agradezco su paciencia para siempre estar dispuesta a enseñar y a ayudar, nunca se hizo problemas para conversar, eso realmente se agradece y habla de una persona que es cercana con la gente con quien trabaja y eso no se encuentra en todos lados.

Índice de contenidos

AUTOBIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. BACTERIOCINAS.....	1
1.2.1. <i>Bacteriocinas de bacterias Gram-negativas</i>	2
1.3. MICROCINA E492.....	3
1.3.1. <i>Organización genética del sistema productor de Microcina E492</i>	4
1.4. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PRODUCCIÓN DE MICROCINAS.....	8
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	11
<i>Objetivos específicos</i>	11
2. MATERIALES Y METODOS.....	12
2.1. MATERIALES.....	12
2.1.1. <i>Reactivos</i>	12
2.1.2. <i>Cepas bacterianas y plásmidos</i>	14
2.2. MÉTODOS.....	21
2.2.1. <i>Medios de cultivo</i>	21
2.2.2. <i>Detección de actividad antimicrobiana</i>	22
2.2.3. <i>Extracción y purificación de ácidos nucleicos</i>	22
2.2.3.1. <i>Extracción de ADN plasmidial (mini preparación)</i>	22
2.2.3.2. <i>Extracción total de ARN</i>	22
2.2.4. <i>Electroforesis de ácidos nucleicos</i>	23
2.2.5. <i>Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de fragmentos de ADN</i>	24
2.2.6. <i>Amplificación de fragmentos de ADN por PCR</i>	24
2.2.6.1. <i>Deleciones por PCR</i>	25
2.2.7. <i>Preparación de células quimiocompetentes</i>	25
2.2.8. <i>Transformación de bacterias por golpe de calor</i>	26
2.2.9. <i>Detección de ARNm por qRT-PCR</i>	26
2.2.9.1. <i>Tratamiento con DNasaI</i>	26
2.2.9.2. <i>Síntesis de ADNc</i>	27
2.2.9.3. <i>Amplificación por PCR en tiempo real</i>	27
2.2.9.3.1. <i>Especificidad de los partidores</i>	28

2.2.9.4. Cuantificación de expresión génica relativa	28
2.2.9.5. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa.....	29
2.2.9.6. Extracción total de proteínas.....	30
2.2.9.7. Inmunoblot	30
3. RESULTADOS	33
3.1. UNIDAD TRANSCRIPCIONAL <i>MCEBA</i>	33
3.2. EFECTO DEL CITRATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA FUSIÓN <i>MCEBA</i> '-' <i>LACZ</i>	39
3.3. BÚSQUEDA DE UN POSIBLE PROMOTOR INTERNO EN LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL <i>MCEBA</i>	42
3.4. FUSIÓN DE <i>LACZ</i> A DISTINTAS REGIONES DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL <i>MCEBA</i>	53
3.5. EFECTO DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS DEL SISTEMA PRODUCTOR DE <i>MCC</i> E492 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>MCEBA</i>	60
3.6. EFECTO DE <i>ORFX</i> SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>MCEBA</i>	63
3.6.1. Efecto del hierro sobre la expresión de la unidad <i>mceBA</i>	69
4. DISCUSIÓN	72

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	15
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo	16
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo	19

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Sistema genético de producción de Microcina E492	5
Figura 2	Unidad transcripcional <i>mceBA</i>	34
Figura 3	Esquema del plásmido pMceBA'-LacZ	35
Figura 4	Actividad β-galactosidasa de la fusión MceBA'-LacZ durante el crecimiento de <i>E. coli</i> BW25113	37
Figura 5	Análisis de la expresión de la fusión MceBA'-LacZ en un hospedero $\Delta rpoS$	38
Figura 6	Efecto del citrato sobre la expresión de MceBA'-LacZ	41
Figura 7	Posibles promotores internos en el gen <i>mceB</i>	43
Figura 8	Evaluación de los posibles promotores P2' y P3' en la fusión ΔP_{B80} '-LacZ	44
Figura 9	Evaluación del posible promotor P1 en la fusión ΔP_{BA} '-LacZ	46
Figura 10	Evaluación de la fusión ΔP_{B2} '-LacZ	47
Figura 11	Esquema de la construcción sintética P1-reportero	49
Figura 12	α-complementación para pReportero y pΔP-Reportero	50
Figura 13	Expresión transcripcional de los genes <i>mceBA</i> en fase exponencial y estacionaria de crecimiento	52
Figura 14	Expresión traduccional de la fusión MceB2'-LacZ	54
Figura 15	Fusión de <i>lacZ</i> a distintas regiones de <i>mceB</i>	56
Figura 16	Fusión de <i>lacZ</i> a distintas regiones de <i>mceA</i>	57
Figura 17	Expresión transcripcional de la fusión MceBA'-LacZ vs MceB'-LacZ	59

Figura 18	Efecto del sistema productor de MccE492 sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ	61
Figura 19	Efecto del sistema pJI sobre la expresión de los genes <i>mceBA</i>	62
Figura 20	Comparación de los sistema productores de Microcina E492 y Microcina H47	64
Figura 21	Efecto de OrfX sobre la fusión MceBA'-LacZ	65
Figura 22	Efecto de OrfX sobre la producción de Microcina E492 activa	67
Figura 23	Efecto de OrfX sobre el sistema productor JAM434	68
Figura 24	Efecto del hierro sobre la expresión de <i>orfX</i>	70
Figura 25	Expresión traduccional de de fusiones de <i>lacZ</i> a distintas regiones de la unidad transcripcional <i>mceBA</i> .	80
Figura 26	Regulación de la expresión de los genes <i>mceBA</i>	

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
Amp	Ampicilina
BCIP	5-bromo-4-cloro-indoilfosfato
cDNA	ADN complementario
Cm	Cloranfenicol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Mcc	Microcina
NBT	Nitroazul de tetrazolio
ONPG	Orto-nitrofenol-β-D-galactopiranosido
pb	Pares de bases
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativo
Rpm	Revoluciones por minuto
RBS	Sitio de unión al ribosoma
qRT-PCR	qPCR acoplado a transcripción reversa
Str	Estreptomina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador Tris Salino
TEMED	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tet	Tetraciclina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido

RESUMEN

La microcina E492 es una bacteriocina de baja masa molecular producida por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. La producción de bacteriocinas es un fenómeno que es determinante en el equilibrio de las poblaciones de microorganismos. Para el caso de la producción de microcina E492 activa, los puntos asociados a su regulación son variados dado el complejo sistema genético que lo conforma. En esta tesis se decidió caracterizar los puntos de regulación que existen asociados a la síntesis de microcina E492 estudiando la regulación de la expresión de los genes *mceBA*, codificantes para la proteína de inmunidad y de microcina E492, respectivamente. Ambos genes conforman una sola unidad transcripcional, cuyo promotor está río arriba de *mceB*. Utilizando una fusión de la unidad *mceBA* con *lacZ* (*MceBA*'-*LacZ*) se pudo establecer que la expresión aumenta de dos a tres veces en fase estacionaria de crecimiento. Este aumento en fase estacionaria responde a un promotor interno en el gen *mceB*, el cual aumenta la transcripción de *mceA* en fase estacionaria, determinado por qRT-PCR, lo cual lleva a un aumento en los niveles de MccE492 en esta misma fase. Por otro lado, la expresión transcripcional y traduccional de *mceB* es constitutiva.

Fusiones traduccionales de *lacZ* a distintas regiones de la unidad *mceBA* y análisis transcripcionales permitieron plantear un modelo donde la estabilidad del ARNm de esta unidad transcripcional dependería de la eficiencia o acoplamiento traduccional de ambos ORFs. Una fusión de *lacZ* al primer codón de *mceB* generó valores de expresión traduccional similares a los de las fusiones de *lacZ* a distintas regiones internas de *mceA*. Sin embargo, fusiones de *lacZ* a los codones 21, 86 y 95 de *mceB* generaron valores de expresión traduccional notablemente menores a los de la fusión de *lacZ* al primer codón de *mceB*. La disminución traduccional observada se corresponde con una disminución en

los niveles de ARNm. Al parecer si *mceA* no es traducido la estabilidad del ARNm de la unidad *mceBA* disminuye.

Se estudio el efecto de los productos genicos del sistema productor de MccE492 sobre la expresión de los genes *mceBA* y se estableció mediante ensayos de Miller e inmunoblot que el producto codificado en el gen *orfX*, tiene un efecto represor sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ. Este efecto se corresponde con una menor producción de MccE492 activa, lo cual se estableció al observar una disminución del tamaño de halos inhibición de crecimiento de una cepa productora de MccE492 activa transformada con un plásmido portador del gen *orfX*. Adicionalmente se observo que el hierro es determinante en la expresión de *orfX*. Es así que proponemos que la expresión de *mceBA* está determinada por hierro a través del efecto que este tiene sobre *orfX*.

En su conjunto estos resultados ponen de manifiesto la complejidad asociada a la regulación de la expresión génica de la unidad transcripcional *mceBA*, donde existen elementos en *cis*, como promotores internos que generan patrones de regulación diferencial para la producción de MccE492, estructuras internas en *mceBA* que generan un grado de regulación post-transcripcional a nivel de la estabilidad del ARNm que sería dependiente de la traducción de ambos ORFs y regulación en *trans* por algunos de los mismos componentes del sistema productor de MccE492, como es OrfX.

ABSTRACT

Microcin E492 is a low molecular mass bacteriocin produced by *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Bacteriocin production is a determinant phenomenon in the dynamics of microorganism populations. Production of active microcin E492 requires several control points because of the complexity of its genetic system. The regulation of gene expression of *mceBA* genes, encoding to immunity protein and MccE492 respectively, was characterized. Both genes conform a transcriptional unit. Using translational fusions of *lacZ* to *mceBA* it was observed that the expression of these genes increased about two or three times in stationary phase. This increase was due to an internal promoter in the *mceB* gene that allowed the increase of *mceA* transcription in stationary phase, assessed by qRT-PCR experiments. The rise in mRNA level for *mceA* gene generated the increment of MccE492 production in this phase, meanwhile the mRNA and protein level for *mceB* gene were constitutive in exponential and stationary phase.

lacZ fusions to different regions of *mceBA* unit and transcriptional analysis allowed to establish a model in which the mRNA stability of this unit rely of translational coupling of both ORFs. *lacZ* fusion to the first codon of *mceB* gene generated similar gene expression values than these fusions to internal regions of *mceA* gene. However, *lacZ* fusions to codons 21, 86 and 95 of *mceB* gene decreased the translational expression compared to *lacZ* fusion to first codon of *mceB*. This variation was also seen at a transcriptional level. It seems that the absence of *mceA* translation diminishes mRNA stability of the *mceBA* unit.

We characterized the effect on the expression of *mceBA* of the gene products of microcin E492 system. We established that the product encoded by *orfX* gene is a repressor of *mceBA* gene expression, consequently decreasing the production of active MccE492. *orfX* expression is affected negatively by iron concentration, and in turn, if iron decreases *orfX* expression increases affecting *mceBA* gene expression

Altogether our results show the complexity of the gene expression regulation of *mceBA* genes. There are *cis* elements, like internal promoters that allow a differential regulation of MccE492 production, compared to the immunity production, internal structures in *mceBA* that regulate the mRNA stability, dependent on translation of both ORFs, and *trans* elements like OrfX from the microcin E492 genetic system.

1. INTRODUCCIÓN

1.2. Bacteriocinas

Los microorganismos producen y secretan al ambiente una gran variedad de moléculas antibióticas las que permiten la mantención de un equilibrio poblacional entre diversas especies de éstos. Dentro de estas moléculas se encuentran una gran variedad de sub-productos del metabolismo, como el peróxido de hidrógeno, amonio o el ácido láctico, enzimas bacteriolíticas tipo lisozimas, antibióticos no ribosomales y las bacteriocinas. Estas últimas conforman un grupo de péptidos o proteínas sintetizados ribosomalmente con actividad bactericida sobre un acotado espectro de bacterias, específicamente, sobre bacterias relacionadas filogenéticamente a la bacteria productora, la cual es inmune a la bacteriocina que produce [1]. Este hecho las distingue de otros antibióticos de naturaleza no-ribosomal, como los aminoglucósidos (i.e. kanamicina, gentamicina) o las tetraciclinas, ambos producidos por Actinobacterias del género *Streptomyces* los cuales tienen efecto sobre un amplio espectro de bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas.

Estudios han mostrado que las bacteriocinas o péptidos tipo bacteriocinas serían bastante ubicuas entre los microorganismos, encontrándose en los principales linajes de Bacteria, Archaea (arqueocinas) y Eukaria (Eukariocinas). Respecto a esto se ha llegado a plantear que el 99% de las bacterias produciría al menos una bacteriocina [2,3], de tal manera que el efecto de estos péptidos antibióticos sobre la dinámica de las poblaciones y las comunidades bacterianas es de considerable interés desde un punto de vista biológico.

1.2.1. Bacteriocinas de bacterias Gram-negativas

La mayor parte de las bacteriocinas descritas en bacterias Gram-negativas son de la familia de las *Enterobacteriaceae*, principalmente de *Escherichia coli*. De hecho, sobre 30 tipos de bacteriocinas se han descrito solo en *E. coli* [4]. Dentro de estas bacteriocinas se distinguen dos tipos principales, las colicinas y las microcinas. Las colicinas por un lado son polipéptidos de gran tamaño molecular (25-80 kDa) producidos por *E. coli* y que se encuentran codificados en plásmidos colicinogénicos de la cepa productora. En dichos plásmidos además se encuentran genes que codifican para proteínas que otorgan inmunidad específica a dicha colicina y genes que codifican para proteínas asociadas a la lisis de la bacteria, fenómeno que permite la liberación de la colicina al medio extracelular. La regulación de la expresión de los genes codificantes para colicinas se ha visto que esta principalmente dado por el sistema de respuesta SOS de *E. coli*, inducido por daño al ADN y mediado por RecA y el represor transcripcional LexA [5]. Por otro lado las microcinas son bacteriocinas de baja masa molecular (menor a 10 kDa), las cuales pueden estar codificadas tanto en un plásmido como en el cromosoma de la bacteria hospedera, son hidrofóbicas, resistente a la acción de proteasas, estables al calor y a pHs extremos, características que comparten con algunas de las bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico (Gram-positivas) [6,7]. Dentro de sus determinantes genéticos también existen genes codificantes para proteínas de inmunidad específica para cada microcina y además para sistemas de exportación tipo ABC totalmente dedicados a este tipo de bacteriocina. Además algunas microcinas están sujetas a modificación post-traducciona, donde los genes codificantes para dicho proceso están en los mismos sistemas genéticos codificantes para la microcina.

Dentro de los mecanismos de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas encontramos una amplia gama, desde actividad nucleasa de ADN, ARNr y ARNt hasta actividad formadora de poros en la membrana citoplasmática. Otros blancos de estas bacteriocinas son el peptidoglicano, como es el caso de la colicina M que posee actividad muramidasa, o la DNA girasa que es inhibida por la microcina B17 [7].

Escherichia coli no es la única bacteria Gram-negativa productora de bacteriocinas, otros ejemplos se han descrito también en *Yersinia pestis* (pesticinas), *Enterobacter cloacae* (cloacinas), *Serratia marcescens* (marscecinas), *Klebsiella pneumoniae* (klebicinas), *Photobacterium luminescens* (lumisinas), *Pseudomonas* sp. (pyiocinas) y *Vibrio* sp. (vibriocinas), las cuales presentan una gran similitud a las colicinas por lo que se les ha llamado bacteriocinas tipo colicinas [5,7]. Sin embargo en algunas cepas de *K. pneumoniae* también se ha descrito la producción de microcinas, particularmente de una denominada microcina E492 [8].

1.3. Microcina E492

La microcina E492 (MccE492) es un polipéptido antibiótico con actividad formadora de poros producido por *Klebsiella pneumoniae* RYC492 [8-11]. Se ha mostrado experimentalmente que este polipéptido tiene efecto bactericida sobre otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, particularmente del género *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* [9]. La forma activa de la MccE492 se encuentra modificada por la adición post-traducciona de un sideróforo catecólico en el extremo carboxilo terminal de la proteína, particularmente de una molécula tipo-salmoquelina [12]. Esta molécula es un trímero cíclico de dihidroxibenzoilserina (DHBS), conocida como enteroquelina, a la cual se le ha añadido una molécula de glucosa a partir de UDP-glucosa [13]. La MccE492 al ser reconocida por receptores de sideróforos catecólicos en

la célula blanco atraviesa la membrana externa hasta alcanzar la membrana citoplasmática, donde ejerce su actividad formadora de poros.

1.3.1. Organización genética del sistema productor de Microcina E492

Los genes asociados a la producción, inmunidad, exportación y modificación post-traduccionales de MccE492 se encuentran en un fragmento de 13741 pb en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 (accesion number: AF063590, Fig.1), fragmento que además estaría formando parte de una isla genómica de sobre 20 kb en el mismo cromosoma. Estos determinantes genéticos han sido clonados y expresados en *E. coli*, presentando las mismas características fisiológicas que en *K. pneumoniae* RYC492 [14,15].

A los genes del sistema productor de microcina E492 se les ha denominado *mce*, por microcina E, mas una letra. Los genes *mceBA* conforman una unidad transcripcional de aproximadamente 600 pb, siendo el gen *mceB* codificante para la proteína de inmunidad de 95 aminoácidos y el gen *mceA* codificante para la microcina E492 de 99 aminoácidos, con una masa molecular de 9.56 kDa, en su forma no modificada y no procesada [15,17]. Ambos genes están solapados por 14 nucleótidos, vale decir el sitio de unión al ribosoma y el primer ATG del gen *mceA* está interno en el extremo 3' de *mceB*. Los genes *mceC* y *mceD* presentan homología con el locus *iroA* de *Salmonella entérica* y *E. coli* uropatogénica, asociados a la síntesis y transporte de salmoquelina en estas bacterias. Por un lado *mceC* codifica para una glicosil transferasa, homóloga a *iroB* de *S. entérica*, la cual transfiere glucosa desde UDP-glucosa a una molécula de enteroquelina y *mceD* codifica para una esterasa de salmoquelina férrica, homóloga a *iroD* de la misma bacteria, la cual lineariza el trímero de DHBS glicosilado [17]. El gen *mceI* codificaría para una proteína con actividad acetiltransferasa, relacionada a HlyC, del sistema hemolisina de *E. coli* [17]. El gen *mceJ* no muestra homología con ninguna proteína conocida, sin embargo

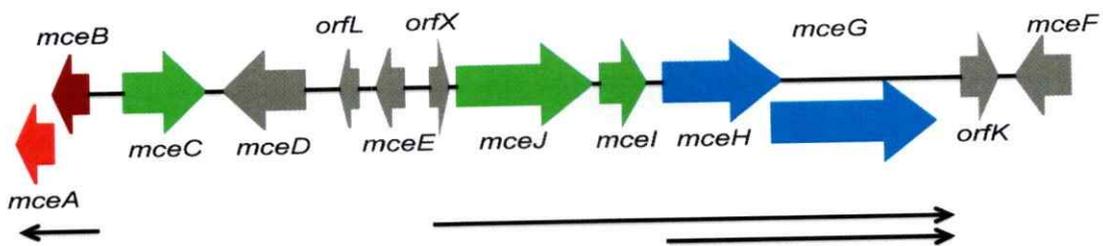


Figura 1. Sistema genético de producción de Microcina E492. Los genes coloreados representan los ORFs con función ya descrita. La dirección de las flechas indica la dirección de la transcripción. Las flechas negras indican las unidades policistrónicas. La estructura de este mapa está basada en análisis de secuencias del cromosoma de *K.pneumoniae* RYC492 [16].

en conjunto con *mceI* codifican para un complejo proteico que une covalentemente el trímero de DHBS C-glicosilado al extremo carboxilo terminal de microcina E492, en el residuo de serina 84. [17,18]. Estos genes además conforman una sola unidad transcripcional. Los genes *mceHG*, los cuales conforman también una unidad transcripcional, codifican para un sistema de secreción tipo I o exportador ABC, donde *mceG* codificaría para una proteína de unión a ATP, mientras que *mceH* codificaría para la proteína accesoria y que en conjunto con TolC, permiten la exportación dedicada al medio extracelular de la microcina E492, tanto la forma modificada como la no modificada [17]. Estos genes también conforman parte del mismo transcrito con los genes *mceJI*. En adición el gen *orfX*, ubicado 138 pb río arriba de *mceJI*, también conforma parte de esta unidad. Es así como la transcripción de los genes *orfXmceJIHG* es iniciada desde el mismo promotor, río arriba de *orfX* (Fig. 1) [17,19].

Respecto a la exportación de MccE492, ésta puede ser exportada en su forma modificada como no modificada y como ocurre con los exportadores ABC, el paso del sustrato (MccE492) al medio extracelular está asociado al reconocimiento específico de un péptido señal y a su posterior clivaje, que en este caso corresponde a un motivo de doble glicina en el extremo amino-terminal de la proteína, lo que deja una proteína de 84 aminoácidos [15]. Es así como en el medio extracelular es posible encontrar microcina no modificada en su carboxilo-terminal con una masa de 7,887 kDa o modificada post-traduccionalmente con una masa de 8,7 kDa. Además se han descrito otras formas modificadas de la microcina y que corresponden a los distintos oligómeros de DHBS, tanto monomérica, dimérica como trimérica, todas glicosiladas [12].

En la célula blanco la MccE492 modificada reconoce e interactúa con los receptores de sideróforos catecólicos FepA, Fiu y Cir localizados en la membrana externa, lo que acoplado a un gradiente de protones y a la proteína TonB en el espacio periplasmático

permite el ingreso de MccE492 hasta la membrana citoplasmática [20-21]. Es en este espacio donde la microcina ejerce su actividad formadora de poros, la cual podría estar asociada a la generación de oligómero de MccE492 [22].

Otros genes han sido identificados en el sistema productor de MccE492, pero cuyo efecto en la producción de MccE492 activa no ha sido dilucidado. Este es el caso de los genes *mceE* y *mceF*, sobre los cuales no se ha podido encontrar mutantes que afecten la producción de microcina E492 activa. Se han identificado además una serie de pequeños ORFs con homología a algunos genes encontrados en los sistemas productores de microcinas cromosomales, H47, I47 y M, que se han denominado *orfL*, *orfK*, *orfS2*, *orfS3* y *orfX* [23]. Respecto a *orfX*, no se le ha encontrado función conocida, sin embargo presenta una fuerte identidad con el gen *mchX* del sistema productor de microcina H47. El gen *mchX* se encuentra 68 pb río arriba de la unidad transcripcional *mchIB*, siendo el gen *mchI* el codificante para la proteína de inmunidad y el gen *mchB* codificante para la proteína estructural de microcina H47. *mchX* tiene un tamaño de 120 pb y codifica para una proteína de 39 aminoácidos. A través del uso de los genes reporteros *phoA* y *lacZ* se demostró que este gen se traduce y que estaría asociado a su propia regulación, aumentando su expresión, y a la regulación de la unidad *mchIB* [24]. Esto último porque los genes *mchX* y *mchIB* formarían parte del mismo operón, produciéndose una autoregulación positiva de *mchX*, lo cual implica también una regulación positiva de los genes río abajo. El gen *orfX* por su parte se encuentra 137 pb río arriba de la unidad transcripcional *mceJI* (Fig. 1), genes que están asociados a la maduración de la microcina E492. *orfX* tiene un tamaño de 108 pb, codificante para una proteína de 35 aminoácidos. Es posible entonces que *orfX* pueda tener un efecto regulador de la expresión de los genes *mceJI*, y se desconoce si pueda tener un efecto regulatorio sobre la unidad transcripcional *mceBA*, la equivalente a *mchIB*.

1.4. Biología molecular de la producción de microcinas

Para el caso de bacteriocinas de bacterias Gram-negativas no son muchos los ejemplos sobre regulación de la expresión génica asociada a la producción de ésta. Para el caso de las colicinas en general se sabe que su producción está fuertemente determinada por la respuesta SOS inducida por daño al ADN, a través del represor LexA y la recombinasa RecA. Sin embargo otras variables ambientales también modulan la expresión de los operones codificantes para colicinas, como estrés inducido en fase estacionaria, represión catabólica, respuesta astringente, anaerobiosis, estrés térmico, presencia de tiamina, etc. [5] Para el caso de las microcinas solo se han descrito algunos ejemplos. La producción de las microcinas B, C y J, todas codificadas en plásmidos de algunas cepas de *E. coli*, son reguladas dependiendo de la fase de crecimiento [25]. En fase exponencial la expresión de los operones codificantes para cada uno de estas microcinas es reprimido mientras que en fase estacionaria es inducido. Respecto a este fenómeno y a la respuesta a otras variables ambientales se han identificado varios factores transcripcionales asociados a su regulación, como Crp, Lrp, Ihf, OmpR, el factor σ^S , H-NS [25-27].

La producción de MccE492 **activa** es dependiente de la fuente de carbono y de la fase de crecimiento. Particularmente se ha mostrado que su producción es máxima cuando las bacterias son crecidas en medio mínimo M9 suplementados con citrato o lactato como fuente de carbono [8,28]. Además, a diferencia de todas las otras microcinas descritas, la MccE492 es producida **en su forma activa** principalmente en fase exponencial de crecimiento [8,14], esto pese a que la unidad transcripcional *mceBA* se expresa durante todo el crecimiento de la célula, como ha sido mostrado de manera cualitativa por RT-PCR [29]. Sin embargo pese a que la transcripción de la unidad *mceBA* es iniciada desde un promotor ubicado río arriba del gen *mceB*, al eliminarlo la expresión de la microcina se

mantienè, como fue mostrado a través del uso de fusiones traducionales con el gen *lacZ*. Esto pone de manifiesto que los puntos de regulación asociados a la producción de MccE492 activa y como esta se relacionan con variables ambientales son de notable complejidad. En el laboratorio recientemente se han realizado estudios caracterizando el rol que tendría el hierro a través del factor transcripcional Fur, en la regulación de la expresión de los genes de la maduración *mceJl* [19], que demuestran como una variable ambiental es determinante en la producción de MccE492 activa. Sin embargo, hay pocos estudios respecto a la regulación en la producción de microcina E492 desde la unidad transcripcional *mceBA*.

Hipótesis

- La expresión de la unidad transcripcional *mceBA* está regulada por la fase de crecimiento.
- Existe un promotor alternativo que se localiza al interior de la unidad transcripcional *mceBA*..
- El producto codificado en *orfX* controla la expresión de la unidad transcripcional y *mceBA*.

Objetivo general

A partir de la información planteada anteriormente el objetivo de esta tesis es llevar a cabo estudios acerca de la regulación en la producción de MccE492, específicamente sobre la expresión de los genes *mceBA*, codificantes para la proteína de inmunidad y MccE492, respectivamente.

Objetivos específicos

- Caracterizar de manera cuantitativa, a través de fusiones traduccionales con genes reporteros, el efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión traduccional de la unidad transcripcional *mceBA*.
- Caracterizar de manera cuantitativa, través qRT-PCR, el efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión transcripcional de los genes *mceB* y *mceA*.
- Establecer puntos de control interno en la unidad transcripcional *mceBA* asociados a la producción de MccE492, particularmente a través de la identificación de promotores internos presentes en dicha unidad.
- Caracterizar el efecto de *orfX* sobre la expresión traduccional de la unidad *mceBA*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

Las enzimas de restricción, los marcadores de peso molecular para ADN en rango 1kb y 100pb y la T4 DNA ligasa fueron adquiridos en New England Biolabs (Ipswich, MA, Estados Unidos)

La *Taq* DNA polimerasa y el anticuerpo anti- β -galactosidasa fueron comprados en Invitrogen (Carlsband, California, Estados Unidos)

La polimerasa *Pfu* ultra II, fue adquirida en Stratagene (California, Estados Unidos). Los desoxirribonucleotidos trifosfato fueron comprados en Omega Bio-Tek (Estados Unidos).

Anticuerpos policlonales anti β -galactosidasa fueron comprados en Invitrogen.

Antcuerpos secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa (HRP) fue comprado en Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a fosfatasa alcalina fue adquirido en Sigma.

EI NBT fue comprador en Sigma-Aldrich

EI BCIP fue comprador en US Biological.

El estándar de peso molecular de proteínas para SDS-PAGE fue adquirido en Thermo-Scientific.

Las membranas de nitrocelulosa VSWP025000 con poro de 0,025 μ m fueron adquiridas en Millipore (Estados Unidos).

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

La agarosa es de Fermelo Biotec (Santiago, Chile).

El cloranfenicol fue comprado en Andrómaco (Santiago, Chile)

La triptona y el extracto de levadura fueron comprados en Mo Bio Laboratories, Inc. (Carlsbad, California, Estados Unidos).

El cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, fosfato de sodio mono y dibásico, fosfato de potasio mono y dibásico, hidróxido de sodio, acetato de sodio, azul de bromofenol, cloroformo, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, glucosa y peróxido de hidrógeno fueron comprados en Merck (Darmstadt, Alemania).

El fenol saturado ácido fue comprado en Winkler.

El TRIzol fue comprado en Ambion (Life Technologies).

El sulfato de magnesio fue comprado en Winkler.

El ONPG fue comprado en Sigma.

El β -mercaptoetanol fue comprado en Merck.

La tiamina, ácido *p*-cumárico, TEMED, 2,2 dipiridil fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

La glicina fue comprada en Omnipur.

El Tris fue comprado en Amresco.

Los reactivos de grado técnico: ácido acético, etanol y metanol se compraron en TCL (Santiago, Chile).



Los casaminoácidos y el agar (Bactoagar) se compraron en Becton (Sparks, Maryland, Estados Unidos).

La Ampicilina, kanamicina, IPTG se compró en US Biological, Swampscott, MA, USA.

El Cloramfenicol fue comprada en Laboratorios Andrómaco S.A.

La Tetraciclina fue comprada en Benguerel.

La Estreptomicina fue comprada en Laboratorios Chile

La bisacrilamida fue comprada en Amresco.

Los reactivos EDTA, Tween 20, glicerina (glicerol) y X-gal fueron comprados en Winkler Ltda. (Santiago, Chile)

El SDS fue comprado en Merck.

Las cubetas para electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc. (Hercules, California, Estados Unidos).

2.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo son listadas en la tabla 1 y 2, respectivamente. La cepa *E. coli* ZK1000 fue gentilmente facilitada por el laboratorio del Dr. Roberto Kolter, Department of Microbiology and Immunology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta trabajo

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
BW25113	<i>lacI^f rrrB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 Δ(araBAD_{AH33}) Δ(rhaBAD_{LD78})</i>	Datsenko y Wanner, 2000.
JW5437	BW25113 Δ <i>rpoS::kan</i>	Colección Keio
ZK1000	<i>rpoS::kn</i>	Roberto Kolter
Top10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mrcBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogene
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) λ⁻</i>	Promega
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3[<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene1 ind1</i> <i>sam7 min5</i>])</i>	Novagen

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pHC79	Cósmido derivado de ColE1. De propósito general (Amp ^R , Tet ^R)	Hohn y Collins, 1980
pACYC184	Plásmido con origen de replicación p15A (Cm ^R , Tet ^R). Propósito general.	Chang y Cohen, 1978
pUC18	Plásmido con origen de replicación p15a (Amp ^r). De propósito general.	
pMceBA'-LacZ	Derivado de pACYC184. Tiene clonada una fusión traduccional entre la serina 84 de <i>mceA</i> y <i>lacZ</i> (Cm ^r)	Gutiérrez, 2012
pMceBA'-LacZ (A)	Derivado de pMceBA'-LacZ. Se reemplazó el gen <i>cat</i> por el gen <i>bla</i> del plásmido pUC18 (Amp ^r)	Este trabajo
pMceBA18'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee una fusión entre Thr 18 de <i>MceA</i> y <i>lacZ</i> (Cm ^r)	Este trabajo
pMceBA3'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee <i>lacZ</i> fusionado al tercer codón de <i>mceA</i> .	Este trabajo
pMceB'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee <i>lacZ</i> fusionado al último codón de <i>mceB</i> .	Este trabajo
pMceB86'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee una fusión entre Thr 86 de <i>MceB</i> y <i>lacZ</i> (Cm ^r).	Este trabajo
pMceB21'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee <i>lacZ</i> fusionado al codón 21 de <i>mceB</i> .	Este trabajo

pMceB2'-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. posee una fusión entre Thr 2 de MceB y <i>lacZ</i> (Cm ^r)	Este trabajo
pΔP _{B80} '-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee una deleción de 218 pb que elimina el promotor de la unidad <i>mceBA</i> y los primeros 36 aminoácidos de MceB (Cm ^r)	Este trabajo
pΔP _{BA} '-LacZ	Derivado de pMceBA'-LacZ. Posee una deleción que abarca solo la región -35 y -10 del promotor de la unidad transcripcional <i>mceBA</i> .	Este trabajo
pΔP _{B2} '-LacZ	Derivado de pΔP _{BA} '-LacZ. Posee fusionado <i>lacZ</i> al segundo codón de <i>mceB</i> .	Este trabajo
pReportero	Construcción sintética que contiene 90 de la región 5' de <i>mceB</i> rio arriba del reportero α - <i>lacZ</i> y río abajo de un terminador de la transcripción de origen ribosomal. Todo clonado en pUC57 entre <i>Xba</i> I y <i>Ava</i> I.	Este trabajo
pJAM229	Derivado de pHc79. Posee clonado un fragmento de 13.7 kb que contiene a los genes que permiten la producción de MccE492 activa.	Wilkins y cols., 1997.
pJAM434	Posee un fragmento interno <i>Xho</i> I (6.8kb) invertido respecto a pJAM229, con el gen <i>orfX</i> trunco.	Wilkins y cols., 1997.
pJI	Derivado de pJAM434. Posee los genes <i>mceA,B,C,D,E</i> y el gen <i>orfX</i> trunco.	Wilkins y cols., 1997.

pMccE492	Derivado de pHc79. Posee todos los genes del sistema productor de MccE492, en la misma orientación que en <i>K. pneumoniae</i> RYC492.	González, 2011
pT5- <i>orfX</i>	Derivado de pUC57. Posee la región sintética T5- <i>orfX</i> clonada en pUC57.	Este trabajo
pOrfX'-LacZ	Fusión que contiene <i>lacZ</i> fusionado al último codón de <i>orfX</i> , clonado en pACY184 (Cm ^R)	Gutierrez S., 201.
pUC57	Plásmido obtenido por digestión con <i>Ascl</i> de pT5- <i>orfX</i> . Vector vacío.	Este trabajo

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo

Partidor	Secuencia (5' → 3')	Observaciones
LacZ-Pelic-F	GCTGACACAATGGCGGCCGCGAACCCGTCGTTT TACAACGTC	<i>NotI</i>
MceA-18-R	CCTAGTCCTGGGGCGGCCGCTGGTCTCTCCTGC ACCAAAAGC	<i>NotI</i>
MceA-3-R	CGTGATGCTAGAGCGGCCGCTTTCTCTCATTCTT AGCTCCATTTATTG	<i>NotI</i>
MceB-Car-R	GCCCTGTTTGATGCGGCCGCTTGTAAGTATCAC TACGTTAATTGCTATTGC	<i>NotI</i>
MceB-Car-R2	GCTGCTGCCGTGCGGCCGCTTCCCACCAGATAC ACTTTTGTTAATGG	<i>NotI</i>
MceB-ATG-R	GACTGTAAGGAAGCGGCCGCTTGTCATAAGTTT TATCCGTTAACTGAAGC	<i>NotI</i>
mceA real Fw	GCAGGAGAGACCGATCCAAATACT	
mceA real Rv	ACAGGGATGGGGACATTTACAGGA	
mceB real Fw	TTTCTTTTCAGTCATGGCGTTCTG	
mceB real Rv	ACCGTAACTTCCCACCAGATACAC	
rrsG real Fw	CTGGTCTTGACATCCACGGAAGTT	
rrsG real Rv	TCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTC	
rpoD real Fw	TGCCGAAGCAGTTTGACTACCT	
rpoD real Rv	TTTCCGACCACGGCTTGTTTCAT	
Del-Pro-F1	GGTCTGGTCGTAAGCTTGCAGAGAACGCGAAAC AAAGTTATTGT	<i>HindIII</i>
Del-Pro-F2	CGTGCTGCGTGAAGCTTATCAATGCGCTTCAGT TAACGG	<i>HindIII</i>

Del-Pro-R **CGGTGGTTACGCAAGCTTCGGCGCTTGATACGA** *HindIII*
 TGTG

P3' GCCTGACACAGGTTACATAAAAGACTG

En negrita se muestra la secuencia reconocida por le enzima de restricci3n correspondiente

2.2. Métodos

2.2.1. Medios de cultivo

Medio mínimo M9 suplementado. Na_2HPO_4 6 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, suplementado con CaCl_2 0.1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, tiamina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, casaminoácidos 0.1% p/v, glucosa 0.2% p/v. En casos particulares se agregó además citrato 0.2% p/v.

Medio LB. Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10g/L y NaOH 3.5 mM final.

Placas LB agar. Medio LB suplementado con 1.5% p/v de Bactoagar.

Placas LB agar X-gal. Placas LB agar fueron suplementadas con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final de X-gal preparado previamente en dimetilformamida.

Agar blando. Medio LB suplementado con 0.7 % p/v de bactoagar.

Placas de césped. Sobre placas LB-agar se agregaron 4 mL de agar blando inoculado con 200 μL de un cultivo de noche de *E. coli* BL21 (DE3).

Antibióticos. Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con los antibióticos correspondiente a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cloramfenicol 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estreptomina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y tetraciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparados según lo descrito por Sambrock y Russel, 2001 [30].

2.2.2. Detección de actividad antimicrobiana

La actividad bactericida fue evidenciada al picar colonias de los clones de interés sobre un césped sensible de *E. coli* BL21(DE3) crecido durante toda la noche (O.N.) en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a 37°C. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C para luego registrar la aparición de halos de inhibición sobre el césped sensible.

2.2.3. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

2.2.3.1. Extracción de ADN plasmidial (mini preparación)

Para la extracción de plásmidos a partir de volúmenes bajos de cultivo (5 mL) se utilizó E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek), según las instrucciones del fabricante.

2.2.3.2. Extracción total de ARN

Diferentes cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido portadores de distintas fusiones de *lacZ* a la unidad transcripcional *mceBA* fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con glucosa, a 220 rpm y 37°C. A la fase de crecimiento indicada se tomaron 30 mL de cultivo y fueron centrifugados a 7000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el precipitado de células fue congelado en un baño de metanol, previamente enfriado a -80°C, y luego guardado a -80°C hasta su uso. Sobre el precipitado se agregaron 3 mL de TRIzol® y un volumen equivalente de ~0.5 mL de perlas de vidrio de 0.1 mm. Los tubos fueron agitados en un vortex durante 6 a 8 minutos para resuspender y romper las células. Luego se agregaron 0.6 mL de cloroformo frío y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla fue repartida en tubos eppendorf y luego se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se retiró la fase acuosa y se transfirió a otro tubo. Sobre este tubo se agregó 1 volumen de isopropanol

frío para precipitar el ARN. El tubo se agitó por inversión hasta homogeneizar la mezcla y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante. Para eliminar las sales y los restos de isopropanol se lavó el precipitado de ARN con 750 µL de etanol 70% frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar a temperatura ambiente hasta que no hubiese rastros de etanol. Se resuspendió el precipitado de ARN en 30 µL de agua libre de RNAsas (Life Technologies™) y finalmente se procedió a medir su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop. La integridad del ARN obtenido fue analizada en un gel de agarosa 1%. La presencia de ARN ribosomales (ARNr) vista como dos bandas definidas (23S y 16S) fue indicador de que no hubo degradación del ARN durante la extracción. Una vez verificado esto, los tubos fueron guardados a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

ARN, ADN plasmidial, productos de PCR y digestiones con enzimas de restricción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal utilizando amortiguador TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2mM). La composición de agarosa varió dependiendo del tamaño del ácido nucleico a analizar, desde 1 a 2% de agarosa disuelta en amortiguador TAE. Para cargar la muestra en el gel se utilizó amortiguador de carga (10mM Tris-HCl, 0.03% azul de bromofenol, 60% glicerol, 60 mM EDTA) en una proporción 1:1 en relación al volumen de ADN. Para poder evidenciar las bandas, el gel, teñido previamente con GelRed™ (Boitium), fue colocado en un transiluminador UV y luego fotografiado.

2.2.5. Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de fragmentos de ADN

Para digerir fragmentos de ADN se utilizaron 10U de enzima para 500 ng de plásmido. El tiempo de digestión fue desde 3 hrs hasta toda la noche a 37°C, dependiendo de la enzima de restricción utilizada.

Para la reacción de ligación de fragmentos de ADN el buffer correspondiente se diluyó 10 veces en un volumen total de 20 µL el cual incluía además 2 µL de T4 DNA ligasa. Para propósitos de clonamiento se utilizaron cantidades equimolares de inserto y de vector (70 fmol), digeridos previamente con la enzima de restricción correspondiente. El tiempo de ligación fue de al menos una hora a temperatura ambiente (~20°C) o incluso durante toda la noche a la misma temperatura. Una vez pasado el tiempo el producto de ligación fue luego transformado sobre distintas cepas quimiocompetentes de *E. coli*.

2.2.6. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

En un volumen total de 50 µL se agregaron 5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50mM, 1 µL de dNTP 10mM, 2,5 µL de partidores 10 µM, 50-100 ng de templado y 0,5 µL (2.5U) de *Taq* DNA polimerasa. Las condiciones óptimas de amplificación fueron las siguientes: 5 minutos a 95°C para denaturar completamente el templado y luego 30 ciclos de 45 segundos a 95°C para denaturar el ADN, 30 segundos a (T_m-5)°C para la hibridación con los partidores y 90 segundos a 72°C para la elongación. Finalmente se incubó durante 5 minutos a 72°C. Para la amplificación de fragmentos de gran tamaño (sobre 4 kb) y para clonamiento se reemplazó la enzima *Taq* por una *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent Technologies), la cual posee una tasa de error 20 veces menor que la *Taq* DNA polimerasa. En 50 µL de reacción se agregaron 5 µL de amortiguador *Pfu* (incluye MgCl₂), 1,25 µL de dNTP, 1 µL de partidore 10 µM, 100 ng de templado y 1 µL de *Pfu* DNA polymerase. El programa estándar fue: 15 minutos a 95°C y

luego 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a (T_m-5)°C y 30 segundos/kb a 72°C. Finalmente se incubó 5 minutos a 72°C.

Para **PCR de colonia** el protocolo es esencialmente el mismo al descrito anteriormente con la diferencia que no hay un templado purificado. Se mezclaron todos los componentes para el PCR en un tubo y luego se suspendió una fracción de colonia bacteriana fresca sobre la solución. Se prosiguió con el programa de PCR antes descrito para la *Taq* polimerasa.

2.2.6.1. Delecciones por PCR

A partir del plásmido pMceBA'-LacZ y pΔP_{BA}'-LacZ se generaron una serie de mutaciones por delección a través de PCR utilizando partidores divergentes. Los partidores utilizados contienen además sitios de restricción para digerir y luego autoligar. El producto de PCR fue purificado desde un gel de agarosa, digerido con las enzimas de restricción correspondientes y finalmente autoligado y transformado en diversas cepas quimiocompetentes de *E. coli*.

2.2.7. Preparación de células quimiocompetentes

A partir de un pre-inóculo de *E. coli* crecido O.N. a 37°C se inocularon 50 mL de medio LB en una dilución 1/100. El cultivo fue crecido hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.5-0.7 y fue colocado en hielo por 5 minutos. El cultivo fue luego centrifugado a 7000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de células fue resuspendido en 15 mL de una solución de CaCl₂-MgCl₂ 20mM-80mM previamente enfriada en hielo. Las células fueron precipitadas nuevamente a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 4 mL de CaCl₂ 0.1M previamente enfriado en hielo. Finalmente se agregaron 70 µL de DMSO, se mezcló y la

solución fue alicuotada en volúmenes de 50 μ L. Los tubos fueron guardados a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.8. Transformación de bacterias por golpe de calor

50 μ L de células quimiocompetentes fueron descongeladas en hielo. Luego sobre estas se agregaron entre 50 y 100 ng de plásmido y se mezcló suavemente. Los tubos se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se aplicó un golpe de calor incubando las células durante 45 segundos a 42°C . Las células fueron luego devueltas al hielo y mantenidas durante 3 minutos. Finalmente se agregaron 500 μ L de medio LB y se dejó incubando en agitación durante una hora a 37°C . Una vez transcurrido ese tiempo se plaquearon entre 100 y 200 μ L de células transformadas en placas LB suplementadas con el antibiótico correspondiente y se dejaron creciendo durante toda la noche a 37°C .

2.2.9. Detección de ARNm por qRT-PCR

2.2.9.1. Tratamiento con DNAsal

Para eliminar cualquier traza de ADN presente en la solución de ARN purificado se trató esta con DNAsal (Life TechnologiesTM) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el tratamiento se utilizaron 8 U de DNAsa I para 10 μ g de ácido nucleico y se dejó incubando durante 1 hora a 37°C . Luego para eliminar la DNAsa I de la solución, se diluyó la solución con 4 volúmenes de agua libre de nucleasas seguido por un volumen de fenol ácido/cloroformo 1:1 y se agitó vigorosamente en un vortex. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C . La fase acuosa se retiró y se colocó en otro tubo. Para precipitar el ARN se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se agitó suavemente. Luego se agregó 1 volumen de isopropanol frío, la mezcla se agitó por inversión y se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego la solución se centrifugó a

14000 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado de ARN se lavó con 750 µL de etanol 70%. La solución se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó a temperatura ambiente hasta que no hubiese rastros de etanol. Finalmente el precipitado fue resuspendido en 30 µL de agua libre de nucleasas, se midió su concentración y se revisó su integridad en un gel de agarosa. Los tubos fueron guardados a -80°C hasta su posterior uso.

2.2.9.2. Síntesis de ADNc

Para la etapa de transcripción reversa se utilizó Superscript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Life Technologies™) con "random primers" (componentes del kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de transcripción reversa se utilizaron 1,5 µg de ARN y se dejó por 30 minutos a 50°C. La reacción fue detenida a 80°C por 5 minutos y luego los tubos fueron colocados en hielo por 10 minutos. Posteriormente para eliminar cualquier traza de ARN unido a ADNc la solución fue tratada con RNAsa H por 20 minutos a 37°C. El ADNc fue guardado a -20°C hasta su posterior uso. Paralelamente se aplicó el mismo tratamiento a la misma cantidad de ARN pero sin transcriptasa reversa, como control del tratamiento de DNAsa. Si el tratamiento con DNAsa fue efectivo estas muestras sin RT no debiesen amplificar durante la etapa de PCR.

2.2.9.3. Amplificación por PCR en tiempo real

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó el equipo Agilent Mx3000P qPCR system.

La reacción de PCR fue llevada a cabo en tubos de 200 µL con tapa transparente (TCL, Tecnología y Ciencia) utilizando SensiMix™ SYBR Hi-ROX Kit. La mezcla de reacción fue preparada según las indicaciones del fabricante, utilizando 100 ng de ADNc de templado y

50 nM de partidor en 20 μ L de reacción. Los partidores utilizados son mostrados en la tabla 3. El programa de PCR fue el siguiente: 95°C por 10 minutos para la activación de la polimerasa y luego 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos y 72 °C por 15 segundos.

2.2.9.3.1. Especificidad de los partidores

Una vez terminada la reacción de PCR se registra la disminución de fluorescencia respecto a un aumento de temperatura desde los 70 hasta los 94°C. Luego se grafica la variación de fluorescencia respecto a la variación de temperatura como función de la temperatura ($-\Delta F/\Delta T$ v/s T) lo que debiese generar un único pico solo si los partidores generaron un solo amplicón. Este pico tendrá una temperatura determinada principalmente por el largo del amplicón y por el contenido G-C de este. Cualquier inespecificidad de los partidores será evidenciado por la presencia de más un pico en el mismo gráfico con distinta temperatura, sugiriendo la presencia de más de un producto de PCR.

2.2.9.4. Cuantificación de expresión génica relativa

Para cuantificar la expresión génica a nivel transcripcional se utilizó el método planteado por Pfaffl, 2001 [31,32]. El modelo matemático permite calcular una relación de expresión de un gen de interés en una condición experimental (tratada) comparada a una situación control (no tratada), todo relativo a la expresión de un gen de referencia en las mismas condiciones. Se espera que la expresión del gen de referencia sea invariable en estas condiciones. Los parámetros de comparación son el Ct (cycle treshold) para cada condición y la eficiencia del PCR para cada partidor. La ecuación para dicho modelo es la siguiente:

$$\text{Relación} = \frac{E_i \Delta C_{t_i}}{E_r \Delta C_{t_r}}$$

Donde los subíndices *i* y *r* indican gen de interés y de referencia respectivamente,

E = Eficiencia del PCR (0.9 – 1.0) y $\Delta C_t = (C_{t(\text{control})} - C_{t(\text{tratada})})$.

El gen de referencia permite normalizar cualquier variación de expresión observada en el gen de interés, descartando así cualquier error experimental. En todos los casos se utilizaron genes de referencia cuya expresión se observó experimentalmente que era invariable en las condiciones tratadas.

2.2.9.5. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa

El protocolo seguido es similar al descrito por Miller, 1992. Los ensayos de Miller fueron realizados todos en triplicado. En la fase de crecimiento indicada se tomaron entre 0,1 y 0,5 mL de cultivo previamente enfriado en hielo. Estos fueron disueltos en Buffer Z (60mM Na_2HPO_4 , 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 50mM β -mercaptoetanol), hasta completar 1 mL de solución. Sobre ésta se agregaron 20 μL de SDS 0.1% y 20 μL de cloroformo, para permeabilizar las células, mezcla que fue luego agitada por 15 segundos en un vortex y posteriormente equilibrada en un baño termostático a 30°C por 5 minutos. Pasado ese tiempo se agregaron 200 μL de ONPG 4 mg/mL previamente enfriado en hielo y la reacción se detuvo cuando la solución se tornó de color amarilla, agregando 500 μL de Na_2CO_3 1M, registrando el tiempo desde que se agregó el ONPG hasta que la reacción fue detenida.

Luego los tubos fueron centrifugados por 2 minutos a 14000 r.p.m. Se tomó el sobrenadante y se registró la absorbancia a 420 nm (longitud de onda a la cual absorbe el o-nitrofenol) y a 550 nm, para asegurarse que no hay células en el sobrenadante, las

cuales pueden dispersar luz, alterando así la absorbancia a 420 nm. La actividad β -galactosidasa fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (Unidades Miller)} = \frac{A_{420} \times 1000}{A_{600} \times t \times V}$$

Donde A_{420} corresponde a la absorbancia a 420 nm, A_{600} a la absorbancia a 600 nm, t el tiempo que demora la solución en tornarse amarilla (en minutos) y V el volumen de muestra (en mililitros).

2.2.9.6. Extracción total de proteínas

A la DO_{600} indicada se tomo un volumen equivalente al reciproco de la DO , con el fin de tener en cada extracción para cada fase de crecimiento una cantidad similar de células. Este volumen fue centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 100 μ L de buffer de carga (63 mM Tris-HCl, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.0025%, β -mercaptoetanol 5%, pH 6,8). La solución fue calentada a 95°C por 5 minutos y 10 μ L del extracto total fueron cargados en un SDS-PAGE al 10%.

2.2.9.7. Inmunoblot

2.2.9.7.1. Electrotransferencia

Para poder observar específicamente las proteínas de interés se realizó una transferencia tipo Western. Para esto el gel fue lavado con abundante agua destilada una vez terminada la electroforesis. Luego, este junto con la membrana de nitrocelulosa, fueron incubados con amortiguador de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM y 20% metanol) por aproximadamente 5 minutos. El *cassette* de transferencia junto con las esponjas fue incubados en el mismo amortiguador. Sobre la esponja del *cassette* se



colocaron 3 tres capas de papel filtro. Luego sobre éstas capas se colocó la membrana de nitrocelulosa y sobre ésta el gel. Finalmente sobre el gel se colocaron otras tres capas de papel filtro, el cassette fue cerrado y colocado en una cámara de electrotransferencia. La cámara fue llenada con amortiguador de transferencia y se procedió a transferir a 300 V y 400 mA (corriente constante) por 90 minutos a -20°C.

2.2.9.7.2. Desarrollo inmunológico

Una vez terminada la transferencia la membrana fue incubada toda la noche en leche descremada al 5% en TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5) a 4°C. Al día siguiente la membrana fue lavada tres veces por 10 minutos con TBS-Tween e incubada por una hora con anticuerpo primario (anti- β -galactosidasa) diluido 1000 veces en leche 5% (10mL). Luego la membrana fue lavada tres veces por 10 minutos con TBS-Tween e incubada por una hora con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa o fosfatasa alcalina, diluido 5000 veces en leche 5%. Finalmente la membrana fue lavada tres veces con TBS-Tween antes de revelarla. Para poder detectar la proteína GroEL (control de carga) la membrana fue lavada toda la noche con TBS-Tween. La membrana fue incubada por una hora con anticuerpo anti-GroEL diluido 10000 veces en leche 5%. Luego se incubó con anticuerpo el secundario como se describió anteriormente.

2.2.9.7.3. Revelado por quimioluminiscencia

Para evidenciar la presencia de la proteína de interés la membrana fue incubada en una solución que contenía 10 mL de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, 50 μ L de luminol 250mM (en DMSO), 25 μ L de ácido *p*-cumárico 90 mM (en DMSO) y entre 3-5 μ L de peróxido de hidrógeno, para iniciar la reacción de quimioluminiscencia. La membrana fue expuesta ante un film autorradiográfico entre 5 y 60 segundos dependiendo de la cantidad de proteína existente en la muestra inicial.

2.2.9.7.4. Revelado por fosfatasa alcalina

Para evidenciar la presencia de la proteína GroEL como control de carga la membrana fue incubada con 10 mL de buffer FAL (Tris 100mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) por 5 minutos. Luego la membrana fue incubada con otros 10 mL de FAL que contenían 66 µL de NBT 1.5% (en dimetilformamida 75%) y 33 µL de BCIP 1% (en dimetilformamida 100%). Se esperó hasta que aparecieran bandas color violeta y la reacción se detuvo con agua destilada.

3. RESULTADOS

3.1. Unidad transcripcional *mceBA*

Los genes *mceBA* conforman una sola unidad transcripcional de 572 pb pero que se solapan estando por 14 nucleótidos y cuyo promotor se encuentra río arriba del gen *mceB* (Fig. 2). Ambos genes están solapados, no están en el mismo marco de lectura para la traducción.

El gen *mceB* posee un tamaño de 287 pb que codifica para la proteína de inmunidad de 10.94 kDa y el gen *mceA* posee un tamaño de 299 pb y codifica para la microcina E492 de 9.56 kDa en su forma no procesada.

Mediante experimentos de RT-PCR se determinó que ambos genes conforman una unidad transcripcional y que esta unidad se expresa tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento [29], sin embargo no existen datos cuantitativos respecto a su expresión transcripcional y traduccional.

Para estudiar de manera cuantitativa la expresión de los genes *mceBA* se utilizó el gen reportero *lacZ*. Se generó una fusión traduccional entre el codón número 84 del gen *mceA* y el reportero *lacZ*, obtenido desde pPelican. A dicha fusión se le denominó MceBA'-*LacZ* (Fig. 3). Ésta fue clonada en el plásmido pACYC184, generando el plásmido pMceBA'-*LacZ*. Este plásmido fue transformado sobre distintas cepas de *Escherichia coli* y se realizaron ensayos de β -galactosidasa según los descrito por Miller (1992) para poder cuantificar la variación de la expresión traduccional de los genes *mceBA* en distintas condiciones.

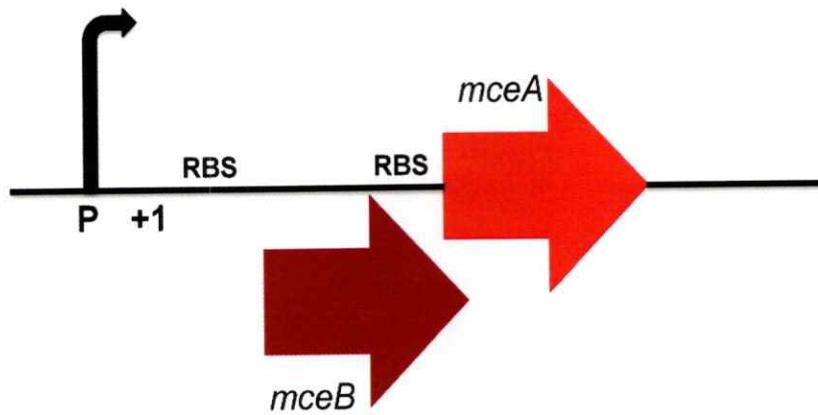


Figura 2. Unidad transcripcional *mceBA*. P indica el promotor de la unidad transcripcional *mceBA*, +1 indica el sitio de inicio de la transcripción (STS) para dicha unidad y RBS indica el sitio de unión al ribosoma para cada ORF.

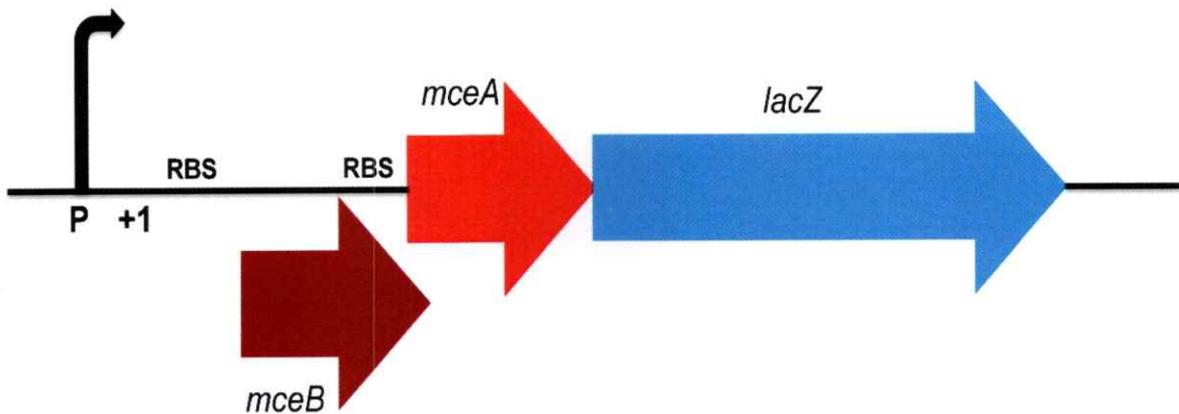


Figura 3. Esquema de la fusión traduccional MceBA'-LacZ. El gen reportero *lacZ* está fusionado traduccionalmente al codón 84 de *mceA*. Como consecuencia de esto, la traducción de *lacZ* depende del RBS y ATG de *mceA*.

Para tener un panorama general se evaluó como varía la expresión de la fusión MceBA'-LacZ durante 24 horas de crecimiento. Para ello la cepa *E. coli* BW25113 portadora del plásmido pMceBA'-LacZ fue crecida en medio mínimo M9 suplementado con glucosa 0.2% como fuente de carbono a 37°C y se tomaron muestras a distintos tiempos para realizar los ensayos β -galactosidasa (Fig. 4)

Se observa que durante las primeras 5 horas de crecimiento (fase exponencial) no existe una variación importante en la actividad β -galactosidasa, sin embargo pasado este tiempo comienza a aumentar significativamente la expresión de la fusión MceBA'-LacZ, hasta alcanzar en fase estacionaria un valor de entre dos a tres veces los valores obtenidos en fase exponencial (después de 10 horas de crecimiento). Al parecer existiría, por lo menos a nivel traduccional, una inducción o un aumento en la expresión de la fusión MceBA'-LacZ hacia fase estacionaria. Dado este aumento en fase estacionaria de crecimiento se estudió el efecto que podría tener el factor sigma de fase estacionaria (σ^S) sobre la expresión de los genes *mceBA*. Para ello se utilizó una cepa mutante $\Delta rpoS$, denominada *E. coli* JW5432, obtenida desde la colección Keio. Esta cepa fue transformada con el plásmido pMceBA'-LacZ y se realizaron ensayos β -galactosidasa a distintos tiempos durante su crecimiento (Fig. 5).

Como puede observarse no existe una importante variación sobre la actividad observada en la cepa mutante $\Delta rpoS$ (JW5432) respecto de la cepa parental (BW25113). Solo para algunos tiempos se encontraron diferencias estadísticamente significativas, las cuales no son mayor a 1.5 veces.

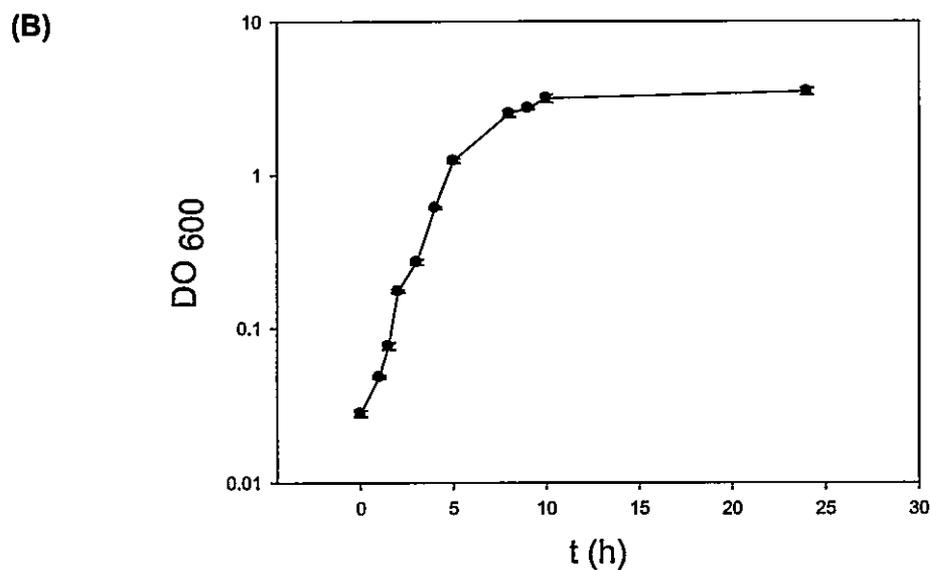
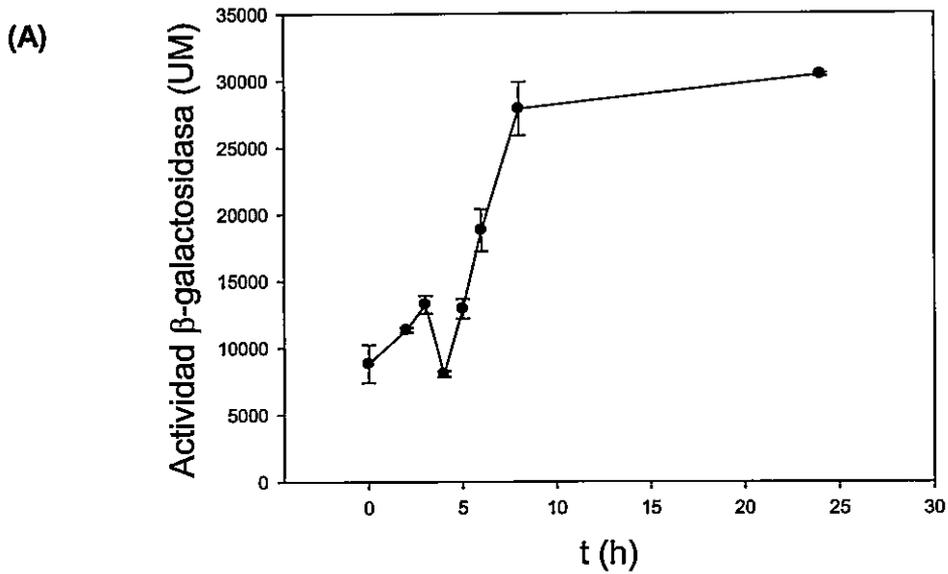


Figura 4. Actividad β -galactosidasa de la fusión MceBA'-LacZ durante el crecimiento de *E. coli* BW25113. En (A) se muestra la variación de la actividad β -galactosidasa en Unidades Miller (UM) durante 24 hrs de crecimiento y en (B) la correspondiente curva de crecimiento. Densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) expresada en escala logarítmica. Cada punto corresponde a 3 muestras independientes.

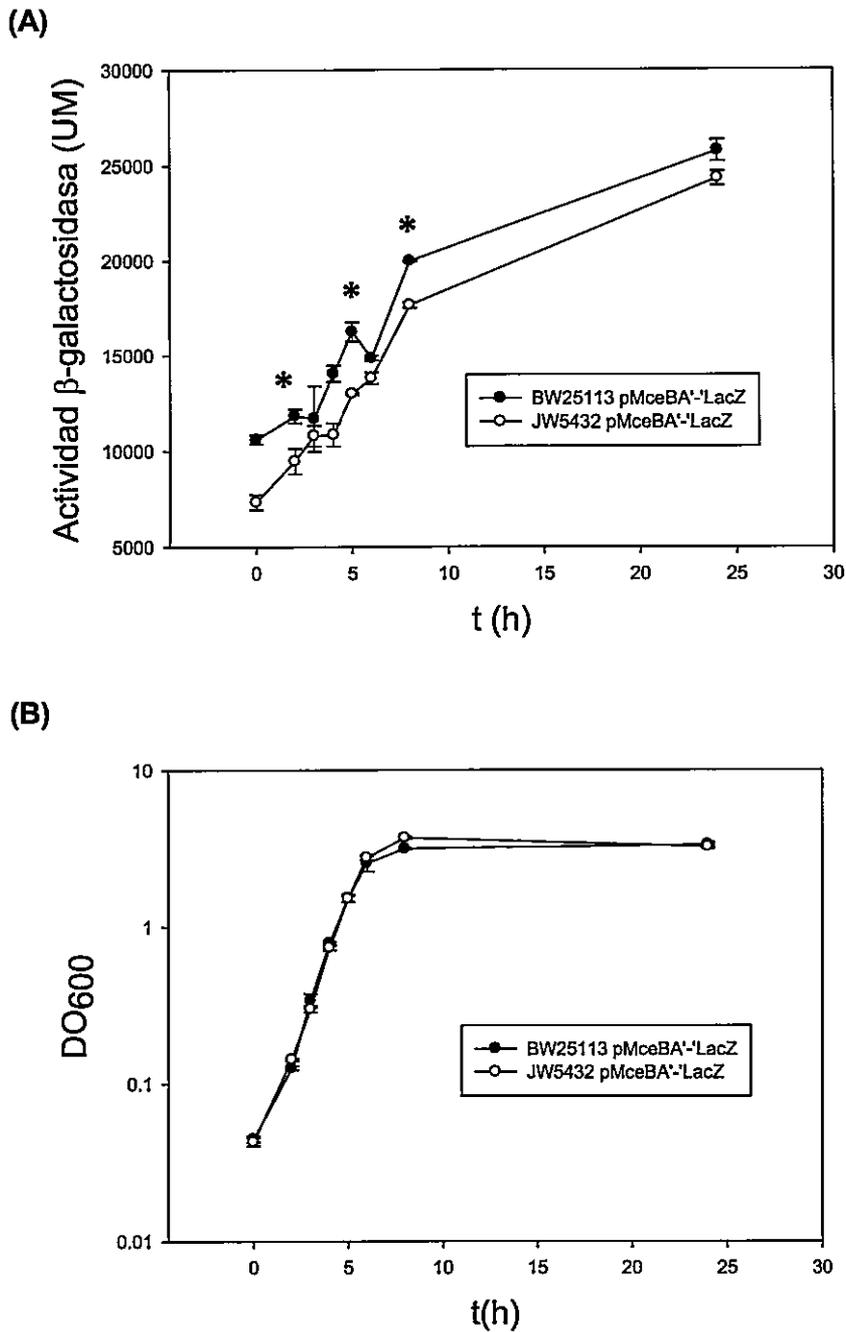


Figura 5. Análisis de la expresión de la fusión MceBA-LacZ en un hospedero $\Delta rpoS$. Los círculos negros muestran la variación en la actividad β -galactosidasa de la cepa BW25113 ($rpoS^+$) y los círculos blancos sobre la cepa *E. coli* JW5432 ($\Delta rpoS$). En (B) se muestra la curva de crecimiento para cada cepa. DO_{600} expresada en escala logarítmica. Cada punto corresponde a tres muestras independientes. * $p < 0.05$.

En la figura 4B se muestra que tampoco existe mayor efecto en la cinética de crecimiento de la cepa $\Delta rpoS$. Al hacer este mismo experimento sobre otra cepa mutante del mismo gen, pero esta vez generada por transposición (*E. coli* ZK1000, R. Kolter), se observa el mismo efecto (dato no mostrado), mostrando que no hay efecto del fondo genético del hospedero sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ.

Estos resultados indican que el factor σ^S no estaría asociado al aumento en la expresión de los genes *mceBA* en fase estacionaria.

Una posible explicación es que este aumento en fase estacionaria esté relacionado a la variación en la concentración de algún nutriente en el medio, como la fuente de carbono, de nitrógeno o algún micronutriente, como hierro, magnesio, etc, y que esta variación tenga un efecto sobre la actividad de algún regulador de la expresión génica.

3.2. Efecto del citrato sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ

Antecedentes previos muestran que la producción de microcina E492 activa está modulada por la fuente de carbono presente en el medio [8, 28]. Particularmente se ha demostrado que la condición óptima para la producción de MccE492 activa es creciendo *K. pneumoniae* RYC492 en medio mínimo M9 suplementado con citrato. El mismo efecto se observa en cepas de *E. coli* recombinantes portadoras del sistema productor de MccE492. Estos estudios fueron hechos titulando la actividad de MccE492 producida y no se cuantificó la expresión génica a nivel trascricional y traduccional [8,28].

Por esta razón se evaluó el efecto que podría tener el citrato sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ. Para ello se creció un cultivo de *E. coli* BW25113 pMceBA'-LacZ en medio M9 suplementado con glucosa 0.2% y citrato 0.2%. Paralelamente se creció el mismo cultivo en medio M9 suplementado solo con glucosa como fuente de carbono (Fig.

6). Y se tomaron muestras en fase exponencial (Exp.) temprana, tardía y estacionaria de crecimiento.

Se observa que la expresión de la fusión MceBA'-'LacZ es similar en ambas condiciones de crecimiento, con y sin citrato, aunque levemente incrementada (1,2 veces en fase estacionaria) en presencia de citrato en el medio. Este resultado muestra que a nivel de la expresión traduccional no existiría un efecto importante sobre la producción de MccE492 en presencia de citrato. Es decir el citrato no tendría un efecto sobre la síntesis de MccE492, pero es probable que el efecto observado en términos de producción de microcina E492 activa sobre células crecidas en medio suplementado con citrato pueda estar asociado a la regulación de la expresión/producción de otros genes del sistema productor de MccE492 como pueden ser los genes de la maduración. Esta posibilidad no será revisada en esta tesis. Cabe recordar que los puntos de regulación pueden ser variados ya que la producción de microcina E492 activa involucra síntesis, modificación post-traduccional y exportación.

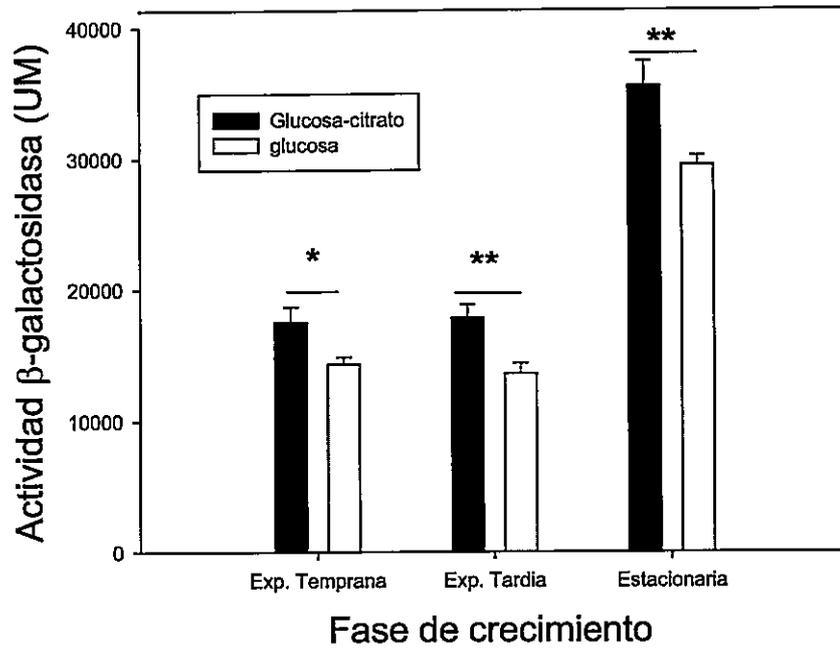


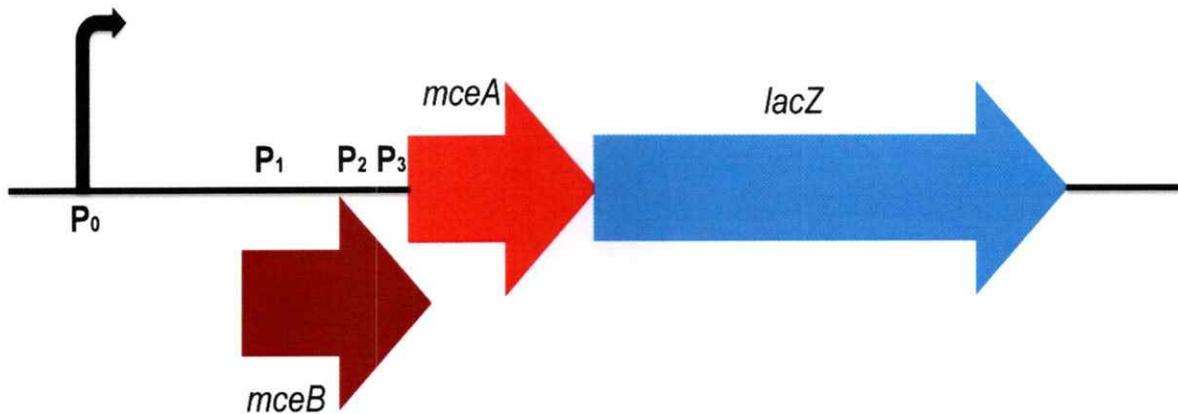
Figura 6. Efecto del citrato sobre la expresión de la fusión MceBA'-LacZ. Se tomaron muestras en tres fases de crecimiento distintas. Exponencial temprana (DO_{600} 0.5), exponencial tardía (DO_{600} 1), estacionaria (24 hrs de crecimiento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3. Búsqueda de un posible promotor interno en la unidad transcripcional *mceBA*

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito experimentalmente por RT-PCR que los genes *mceBA* conforman una unidad transcripcional, cuyo promotor, determinado a partir de experimentos de *Primer Extension*, se encuentra río arriba de *mceB*. Sin embargo al analizar la secuencia del gen *mceB* utilizando el servidor Virtual Footprint se encuentran al menos tres posibles promotores tipo σ^{70} de la ARN polimerasa (Fig. 7). Esto podría sugerir la presencia de un promotor interno en el gen *mceB* que está controlando diferencialmente la transcripción del gen *mceA*. Uno de los promotores se encontraría en los primeros 80 pares de bases de *mceB* y los otros dos en los últimos 100 pb de *mceB*.

Para demostrar experimentalmente la funcionalidad de estos posibles promotores se realizaron una serie de deleciones a partir de la fusión *MceBA*'-'*LacZ* utilizando PCR con partidores divergentes, direccionados en contra de la región a eliminar. La primera deleción generada abarca el promotor de la unidad *mceBA* (P_0) y los primeros 80 pb de *mceB*. A esta nueva fusión se le denominó ΔP_{B80} '-'*LacZ* (Fig. 8). Como se puede observar existe una disminución de más de 100 veces en la actividad β -galactosidasa obtenida en la fusión ΔP_{B80} '-'*LacZ*. Además, en el inmunoblot revelado por quimioluminiscencia, no se logró registrar la presencia de β -galactosidasa.

Este resultado indica que al menos en la región río abajo de los primeros 80 pb de *mceB* no habría región alguna que permita el inicio de la transcripción.



-10 (1): TAAATT
 -10 (2): TTTATT
 -10 (3): TACAAT

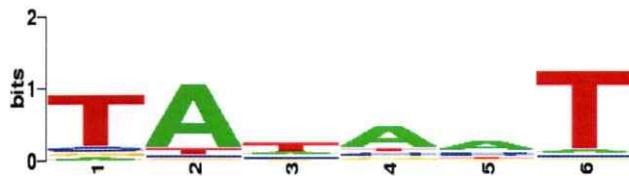


Figura 7. Posibles promotores interno en el gen *mceB*. Los promotores encontrados por Virtual Footprint corresponden solo a la secuencia -10 reconocida por la subunidad σ^{70} de la ARN polimerasa, ya que esta región sería la más conservada en los promotores reconocidos por este factor sigma. Bajo el esquema se muestran estas posibles secuencias -10 para los tres posibles promotores, P₁, P₂ y P₃, internos en *mceB*. P₀ corresponde al promotor de la unidad transcripcional *mceBA*. Se muestra la secuencia -10 obtenida a partir de la matriz de peso desde el servidor Virtual Footprint.

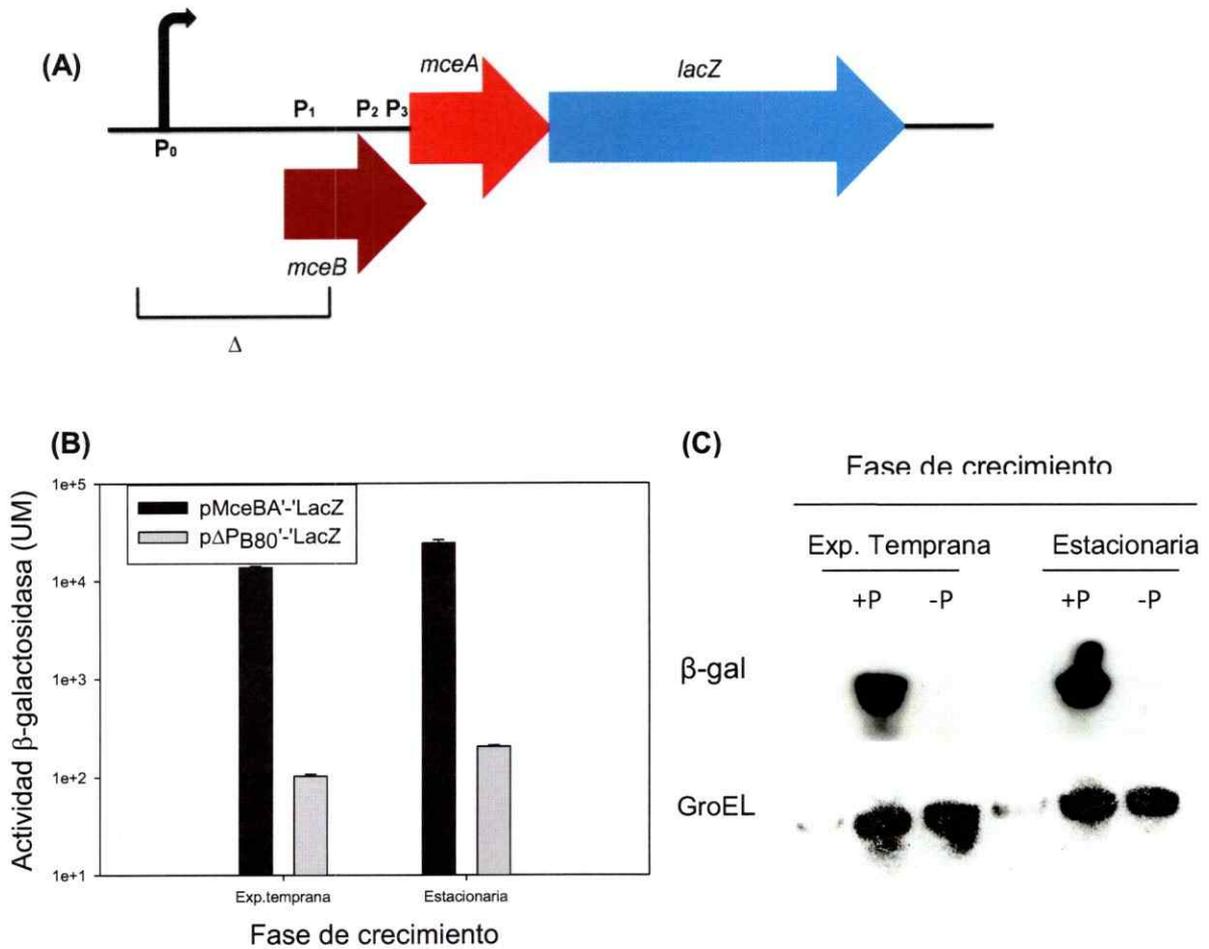


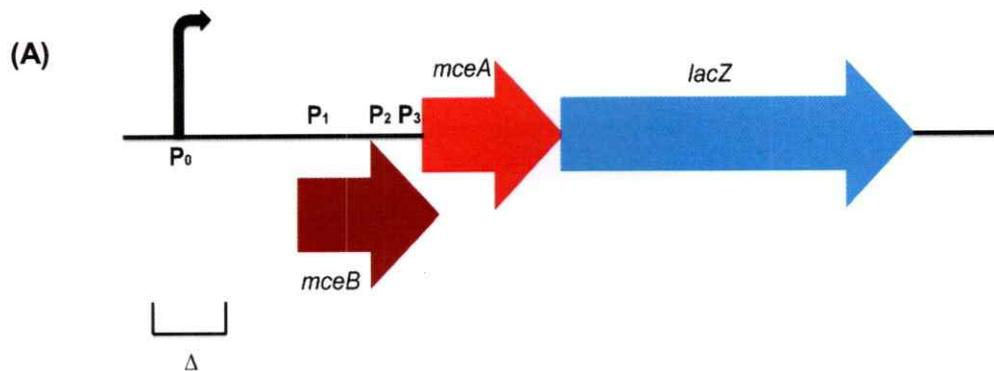
Figura 8. Evaluación de los posibles promotores P2' y P3' en la fusión $\Delta P_{B80}'-lacZ$. En (A) se muestra la región eliminada por PCR divergente (corchete) para generar la fusión $\Delta P_{B80}'-lacZ$. En (B) el ensayo de Miller expresado en escala semi-logarítmica. En (C) se muestra el inmunoblot con anticuerpos anti- β -galactosidasa y anticuerpos anti-GroEL como control interno del inmunoblot.

Sin embargo, si se elimina solo la región promotora de la unidad *mceBA* (P_0) y se dejan el gen *mceB* completo, los niveles de expresión son comparables al de la fusión MceBA'-LacZ (Fig. 9).

Para asegurarnos que el resultado anterior (Fig. 9) es debido a un promotor interno en *mceB* y no a algún posible promotor río arriba del promotor P_0 , se genero una nueva fusión a partir de $\Delta P_{BA}'$ -LacZ, en la cual *lacZ* es fusionado traduccionalmente al primer codón de *mceB* (Fig. 10A). Esta fusión elimina toda la unidad *mceBA*, dejando solo el primer codon de *mceB*. A esta nueva fusión se le denominó $\Delta P_{B2}'$ -LacZ. Si el efecto mostrado en la figura 9 es debido a un promotor interno en *mceB*, en la fusión $\Delta P_{B2}'$ -LacZ no debiese haber expresión, ya que no contiene el gen *mceB*. Por el contrario si el efecto visto en la figura 9 es dado por un promotor río arriba de P_0 , en la fusión $\Delta P_{B2}'$ -LacZ debiese haber expresión.

Con esta última fusión se observa una pérdida absoluta en la expresión traduccional, lo cual descarta que río arriba del promotor de la unidad *mceBA* (P_0) exista otro promotor, y además sugiere fuertemente que en los primeros 80 pb de la región codificante de *mceB* existe un promotor, ya que al eliminar tanto esta región como el promotor P_0 la expresión traduccional cae drásticamente. Sin embargo al eliminar solo el promotor P_0 la expresión es comparable a la de la fusión MceBA'-LacZ.

Para comprobar que la región interna en los primeros 80 pb de *mceB* contiene un promotor, independiente y suficiente para el inicio de la transcripción, se diseñó una construcción sintética desde la cual dicha región de 80 pb fue aislada y clonada río arriba del reportero α -*lacZ* (Fig. 11), contenido en el plásmido pUC57. A este plásmido se le denominó pReportero.



(B)

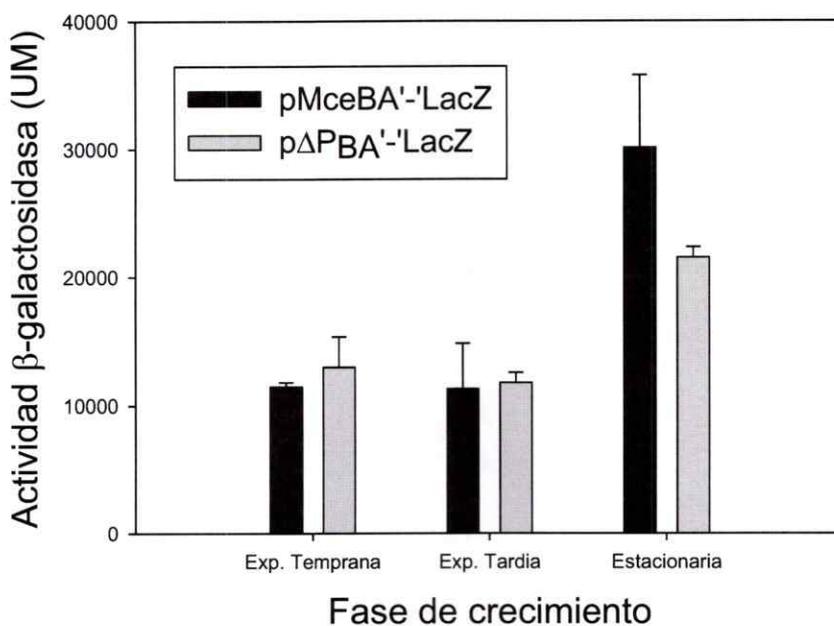
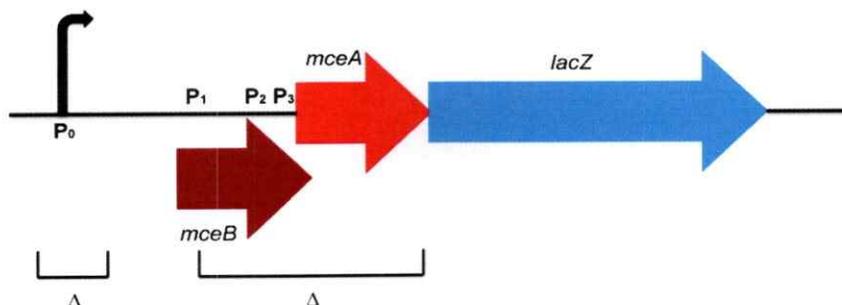
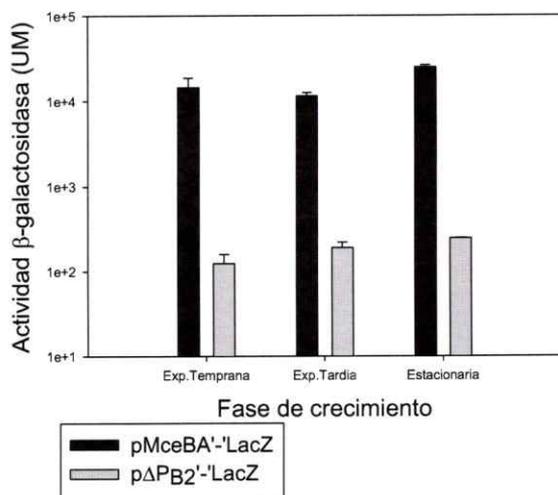


Figura 9. Evaluación del posible promotor P1 en la fusión $\Delta P_{BA}'$ -LacZ. En (A) se muestra el esquema de la región eliminada. A esta nueva fusión se le denominó $\Delta P_{BA}'$ -LacZ. Esta fusión conserva el STS de la unidad *mceBA* y el RBS de *mceB*. En (B) el ensayo de Miller correspondiente. A través de análisis de *t*-student no se encontraron diferencias significativas entre la fusión *MceBA'*-LacZ y $\Delta P_{BA}'$ -LacZ en las tres fases de crecimientos estudiadas ($p > 0.1$).

(A)



(B)



(C)

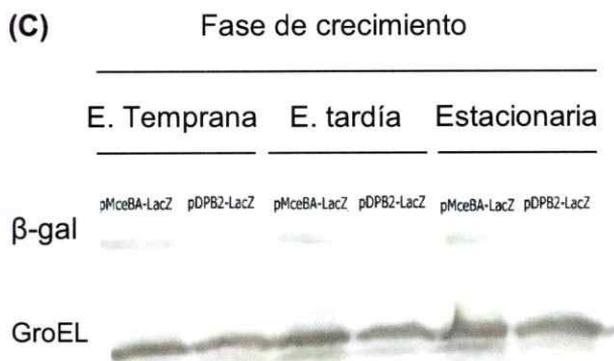


Figura 10. Evaluación de la fusión $\Delta P_{B2}'$ -LacZ. En (A) se muestra un esquema de las regiones eliminadas (corchetes) para generar la fusión $\Delta P_{B2}'$ -LacZ. Esta nueva fusión no contiene el promotor P_0 y solo deja el RBS y el primer ATG de *mceB* fusionado traduccionalmente a *lacZ*. En (B) se muestra el ensayo de Miller correspondiente. En (C) se muestra el inmunoblot correspondiente.

Este plásmido fue usado luego para transformar *E. coli* DH5 α , cepa que posee el genotipo *lacZ* Δ M15, el cual contiene y expresa la porción ω -*lacZ*, para la α -complementación. Si la región de 80 pb permite el inicio de la transcripción, la porción α -*lacZ* se expresará y en un hospedero *lacZ* Δ M15 se observara actividad β -galactosidasa, mediante la aparición de colonias azules en una placa LB suplementada con X-gal como sustrato (Fig. 12). Como se observa además en la figura 11, la región de 80 pb está flanqueada por dos sitios *Bam*HI, esto con el propósito de realizar un control vacío para la posible región promotora. La digestión con *Bam*HI, autoligación y transformación de *E. coli* DH5 α con el resultante plásmido debiese dar colonias blancas sobre una placa LB suplementada con X-gal (Fig. 12). A esta segundo plásmido se le denominó p Δ P-Reportero.

La construcción pReportero en *E. coli* DH5 α generó solo colonias azules en placas LB X-gal. Por el contrario, al transformar p Δ P-Reportero en la misma cepa se observa solo la aparición de colonias blancas (Fig. 12). Estos resultados muestran que en los primeros 80 pb de *mceB* existe una región promotora (P_1) y que de manera independiente permite el inicio de la transcripción de cualquier región que este río abajo. En el caso particular de la unidad *mceBA*, involucraría una expresión/transcripción diferencial del gen *mceA*.

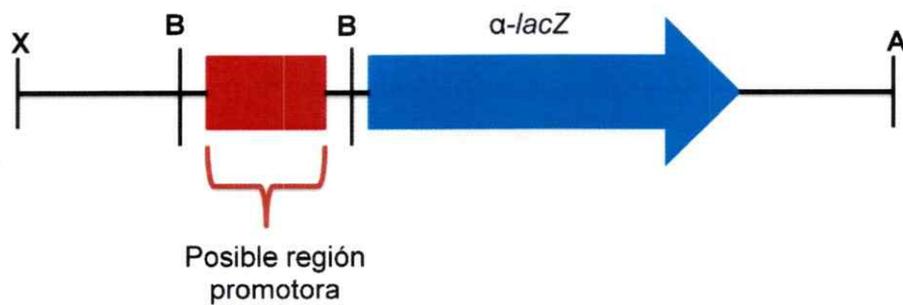


Figura 11. Esquema de la construcción sintética P1-reportero. La posible región promotora fue flanqueada con dos sitios *Bam*HI para poder eliminarla y realizar un control vacío. La construcción posee además un terminador ribosomal localizado río arriba del posible promotor, para asegurar que la expresión de α -*lacZ* está dada exclusivamente por esta región de 80 pb y no por alguna secuencia que se encuentre en el vector pUC57. Este fragmento fue clonado entre los sitios *Xba*I y *Ava*I de pUC57, para dar origen al plásmido pReportero. Abreviaciones: X: *Xba*I, A: *Ava*I, B: *Bam*HI.

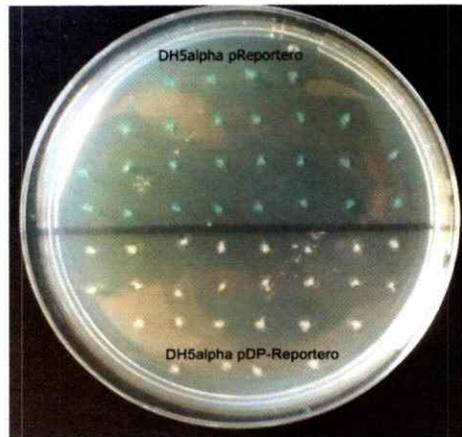


Figura 12. α -complementación para pReportero y p Δ P-Reportero. *E. coli* DH5 α fue transformado con pReportero o con p Δ P-Reportero y 26 colonias de cada una fueron picadas sobre una placa LB suplementadas con X-gal.

Dada la existencia de este segundo promotor interno en *mceB*, surge la pregunta si este promotor genera el mismo patrón de transcripción que el promotor P₀. Para responder aquello se realizaron análisis de los niveles de ARNm a través de qRT-PCR, comparando los niveles de transcritos de fase estacionaria respecto a fase exponencial de crecimiento. Para la etapa de qPCR se utilizaron partidores que amplifican el gen *mceB* y el gen *mceA* por separado y se compararon sus patrones de expresión se compararon en fase exponencial (DO₅₀₀ 0.7) y estacionaria de crecimiento (24 hrs) (Fig. 13).

La expresión transcripcional del gen *mceB* no varía significativamente en fase estacionaria respecto a fase exponencial, sin embargo los niveles de ARNm del gen *mceA* muestran un aumento promedio de 11.5 veces hacia fase estacionaria respecto de la fase exponencial. Estos resultados sugieren que además de existir un promotor interno en el gen *mceB*, éste responde diferencialmente, al menos en la fase de crecimiento, lo que se traduce en un patrón diferencial de expresión traduccional del gen *mceA*, generando mayor cantidad de MccE492 en dicha fase.

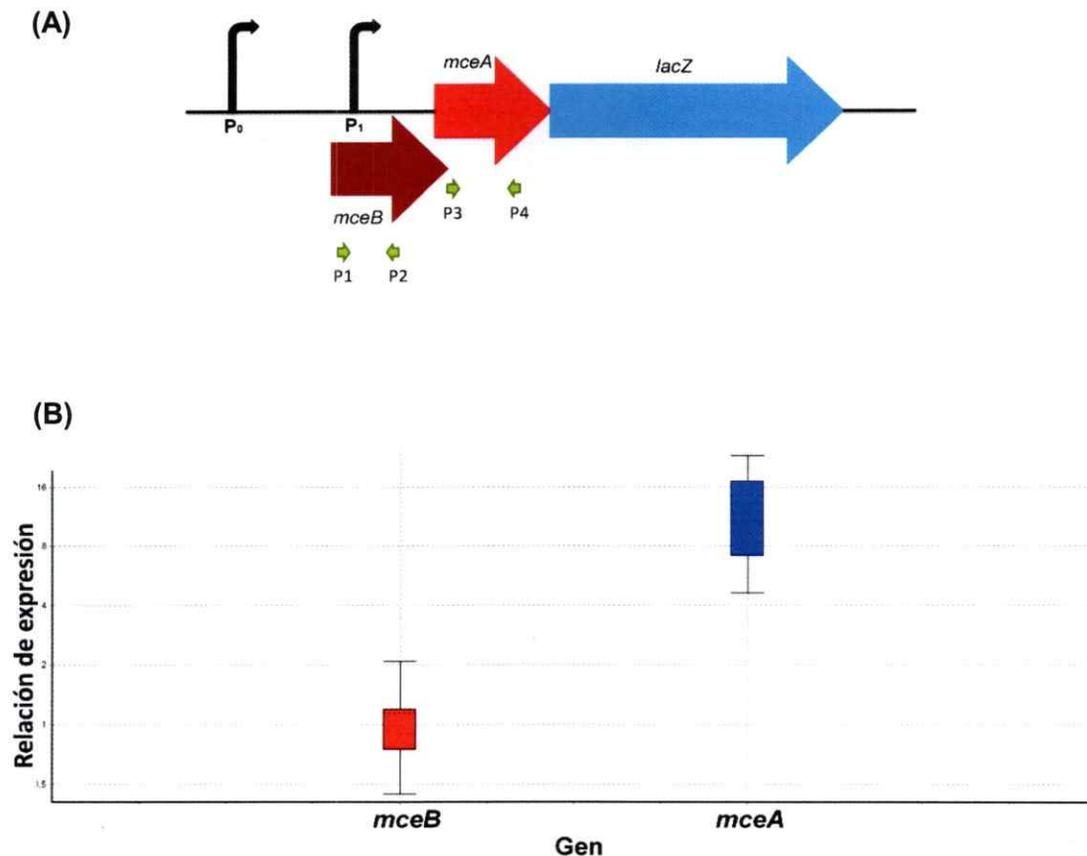


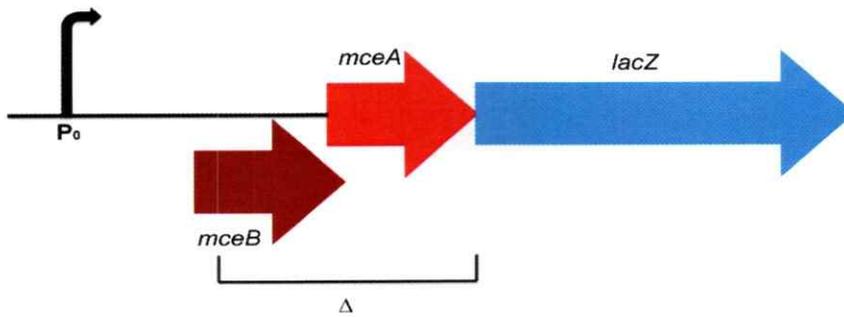
Figura 13. Expresión transcripcional de los genes *mceBA* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Se extrajo ARN total desde *E. coli* BW25113 pMceBA'-LacZ crecida en medio LB, en fase exponencial (DO₆₀₀ 0.7) y estacionaria de crecimiento (DO₆₀₀ 2.7). En (A) se muestra un esquema de la región amplificada para cada reacción de qPCR, en la cual p1 y p2 amplifican el gen *mceB* y p3 y p4 amplifican el gen *mceA*. El templado utilizado fue el plásmido pMceBA'-LacZ. P1 indica la región promotora en los primeros 80 pb de *mceB*. En (B) se grafica la variación en los niveles de ARNm de *mceB* y *mceA* en fase estacionaria respecto a fase exponencial de crecimiento, todo normalizado por un control interno. En este caso fue *rpoD*, el cual se demostró experimentalmente que su expresión no varía en las condiciones tratadas (para mas detalles ver la sección Materiales y Métodos). Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos independientes. Significancia estadística dada por valores de p -value < 0.05. p (*mceA*) = 0.938, p (*mceB*) = 0.034. El gráfico fue generado utilizando el software REST[®] 2009 [32].

3.4. Fusión de *lacZ* a distintas regiones de la unidad transcripcional *mceBA*

Como se mostró anteriormente existe un promotor interno (P_1) en *mceB* el cual comanda diferencialmente la expresión del gen *mceA*, y que responde a la fase de crecimiento, a diferencia del promotor de la unidad *mceBA* (P_0). A partir de esto, se decidió evaluar que ocurre a nivel traduccional con la expresión comandada por el promotor P_0 . Para ello, se fusionó *lacZ* al primer codón de *mceB*, dejando solo el promotor P_0 , el RBS de *mceB* y su primer ATG. A esta fusión se le llamo MceB2'-*LacZ* (Fig. 14).

En fase exponencial, la fusión MceB2'-*LacZ* presento valores comparables a los de la fusión MceBA'-*LacZ*, con una leve variación. Esta diferencia puede estar relacionada a que en la fusión MceBA'-*LacZ* la traducción de *lacZ* está dada por el RBS de *mceA*, mientras que en la fusión MceB2'-*LacZ* la traducción está dada por el RBS de *mceB*. Puesto que ambos sitios de unión al ribosoma son distintos, se podrían generar patrones de expresión traduccional distintos. Sin embargo existe una diferencia importante en fase estacionaria. En la fusión MceB2'-*LacZ* no se observa un aumento significativo de la expresión en esta fase, a diferencia de la fusión MceBA'-*LacZ* donde el aumento es al menos de dos veces. Este resultado es consistente con los análisis transcripcionales mostrados en la figura 17, donde se puede ver que los niveles de ARNm de *mceB* no aumentan significativamente en fase estacionaria a diferencia de *mceA*. La variación observada al comparar la fusión MceBA'-*LacZ* con MceB2'-*LacZ* se debería a dos efectos: el efecto dado por dos RBS distintos y por la presencia del promotor interno en *mceB*, el cual responde a la fase de crecimiento.

(A)



(B)

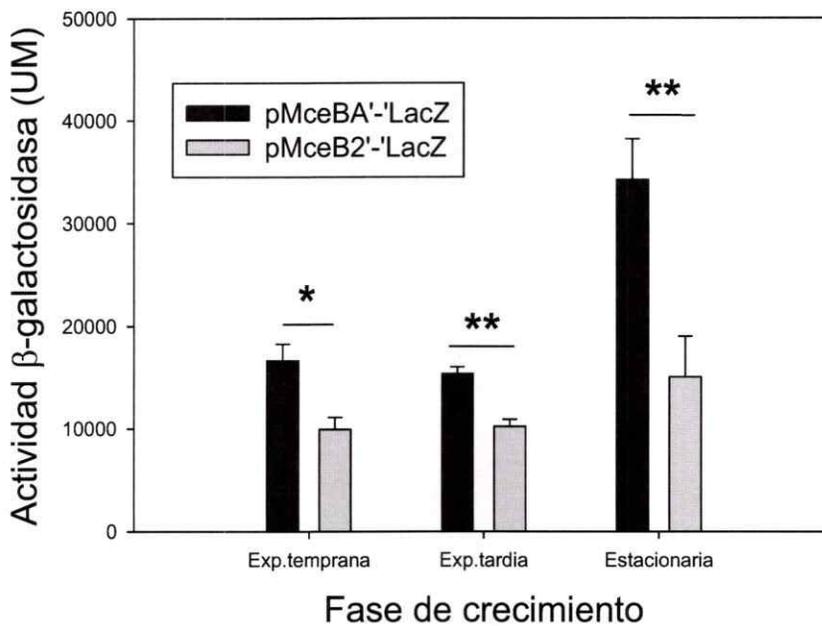


Figura 14. Expresión traduccional de la fusión MceB2'-LacZ. En (A) se muestra la región eliminada por PCR divergente (corchete) para generar la fusión MceB2'-LacZ. La nueva construcción posee *lacZ* fusionado al primer codón de *mceB*, la cual conserva el RBS de *mceB* y el promotor de la unidad *mceBA* (P_0). En (B) el ensayo de Miller correspondiente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se decidió evaluar si existe un efecto en la expresión de la fusión de *lacZ* a distintas regiones internas de *mceB*. Para ello se comparo el patrón de expresión traduccional de la fusión MceB2'-*LacZ* con dos fusiones internas en *mceB*, como la fusión MceB21'-*LacZ* y MceB'-*LacZ*, las cuales poseen *lacZ* fusionado al codón 21 y 95 de *mceB*, respectivamente. En ambos casos se observa una disminución importante en la expresión (Fig. 15) de entre 5 y 10 veces, respecto de la fusión MceB2'-*LacZ*, a lo largo de todo el crecimiento. Este efecto es observado tanto en ensayos de Miller como en inmunoblot. El mismo efecto es observado al fusionar *lacZ* al codón 86 de *mceB* (resultado no mostrado).

Para complementar este estudio, se fusionó *lacZ* al gen *mceA*, de tal manera que su expresión traduccional ahora dependa del RBS y el ATG de dicho gen (Fig. 16). Al fusionar *lacZ* al codón 3 y 18 de *mceA* la expresión traduccional aumenta en fase estacionaria y en una magnitud similar a la fusión MceBA'-*LacZ*.

Este resultado es interesante, puesto que el codón 3 de *mceA* esta exactamente en la misma región del codón 95 de *mceB* (fusión MceB'-*LacZ*), teniendo en consideración que ambos genes conforman una unidad bicistrónica. Se observa una disminución en la expresión traduccional en las fusiones traduccionales que están en el mismo marco de lectura con *mceB* o que depende del RBS y ATG de este gen, pero al hacer fusiones en la misma región de la unidad transcripcional pero cuya traducción depende del RBS de *mceA*, la expresión traduccional aumenta. Estos resultados sugieren un grado de regulación post-transcripcional o traduccional asociado a la expresión de los genes *mceBA*.

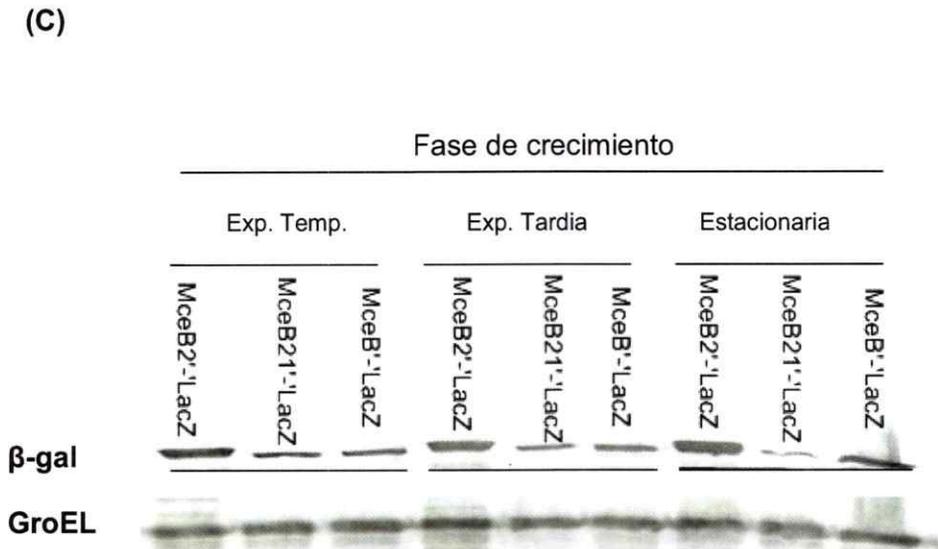
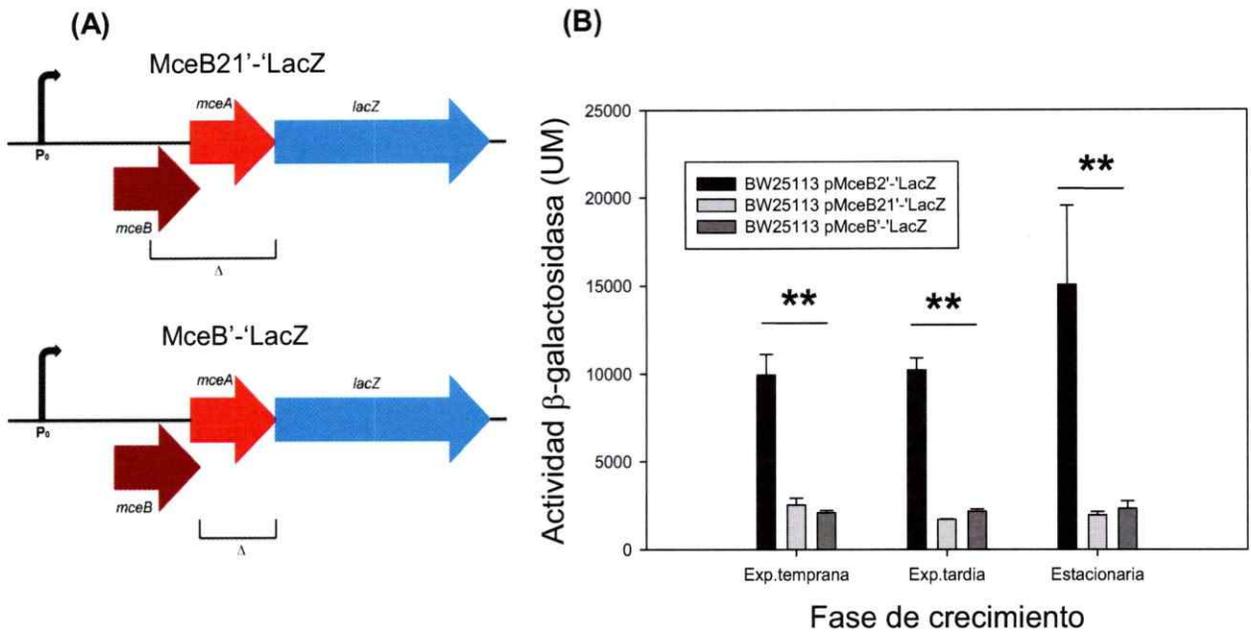


Figura 15. Fusión de *lacZ* a distintas regiones de *mceB*. (A) Regiones eliminadas (corchete) para fusionar *lacZ* al codón 21 y 95 de *mceB*. (B) Comparación de la expresión traduccional de las fusiones MceB2'-LacZ, MceB21'-LacZ y MceB'-LacZ. ** $p < 0.01$, comparando la fusión MceB2'-LacZ con MceB21'-LacZ y MceB'-LacZ, para las tres fases de crecimiento estudiadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las fusiones MceB21'-LacZ y MceB'-LacZ, en las tres fases de crecimiento estudiadas ($p > 0.1$) (C) Inmunoblot correspondiente a cada ensayo de Miller utilizando anticuerpos anti β -galactosidasa y anti GroEL como control interno.

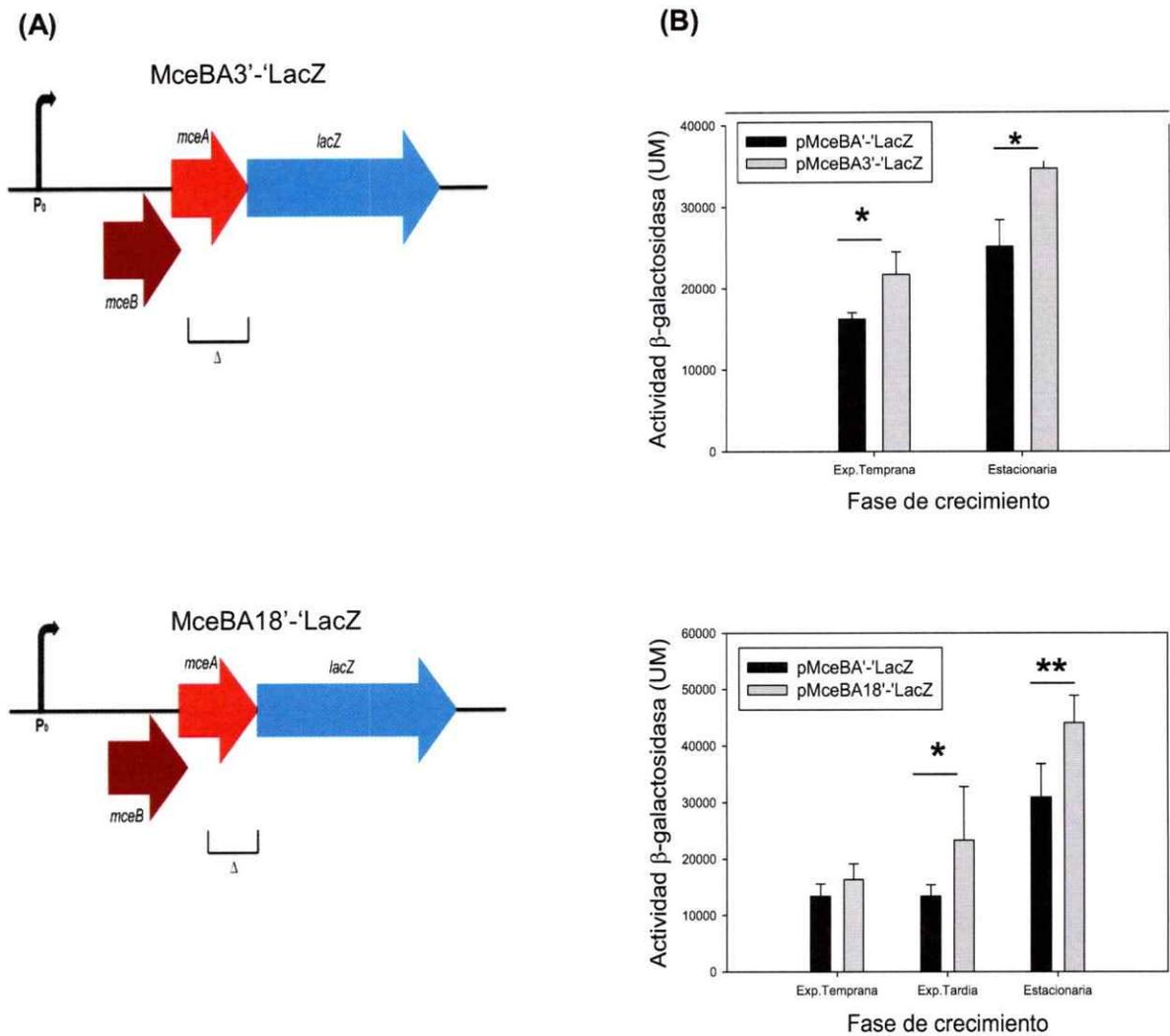


Figura 16. Fusión de *lacZ* a distintas regiones de *mceA*. (A) Esquemas de las regiones eliminadas (corchetes) para fusionar *lacZ* a los codones 3 y 18 de *mceA*. La fusión MceBA3'-LacZ es similar a la fusión MceB'-LacZ, ya que en ambos casos *lacZ* esta fusionado a la misma región del ARNm, pero en la primera la traducción de *lacZ* depende del RBS de *mceA*, mientras que en la segunda depende del RBS de *mceB*. (B) Comparación de la expresión traduccional de las fusiones MceBA'-LacZ, MceBA3'-LacZ y MceBA18'-LacZ. * $p < 0.0$, ** $p < 0.01$.

Para estudiar si la disminución en los niveles de proteína observado en las fusiones de *lacZ* a *mceB* están asociadas a una disminución en los niveles de ARNm, se hicieron análisis de qRT-PCR utilizando partidores para el gen *mceB* y se compararon los niveles de transcritos del plásmido pMceBA'-*LacZ* y pMceB'-*LacZ* en fase estacionaria (Fig. 17). Se observa una disminución significativa de 3 veces en la cepa portadora del plásmido pMceB'-*LacZ* respecto a la fusión MceBA'-*LacZ*. Este fenómeno se repite al utilizar una fusión de *lacZ* al codón 86 de *mceB* (dato no mostrado).

Estos resultados sugieren una disminución en la estabilidad del ARNm de la unidad *mceBA* cuando no se inicia la traducción de *mceA*,

Estos resultados permiten plantear una hipótesis en que la estabilidad del ARNm de la unidad *mceBA* depende de la traducción de *mceA* o de *mceB*, vale decir, la degradación del ARNm de esta unidad estaría dependiendo del acoplamiento traduccional existente entre *mceB* y *mceA*.

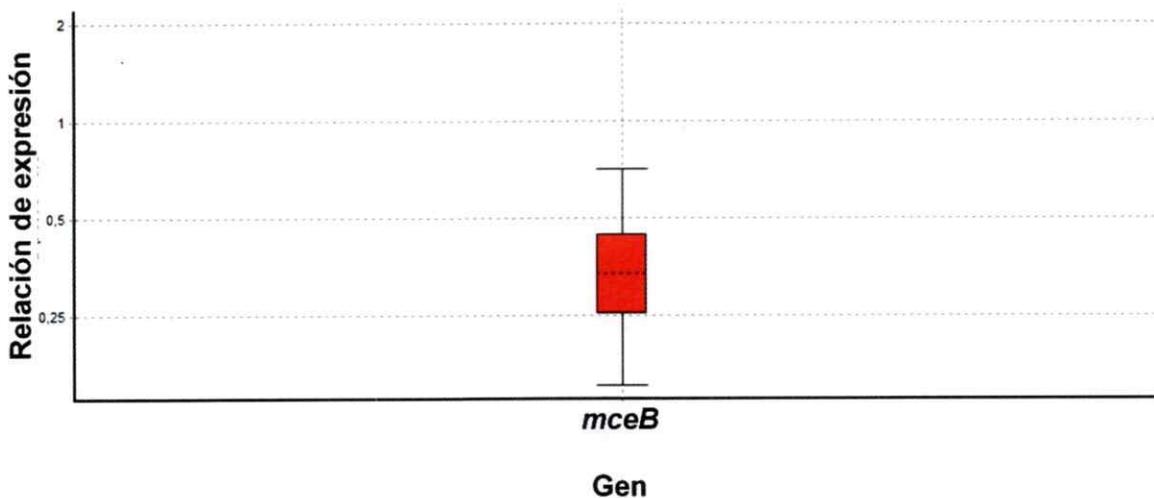


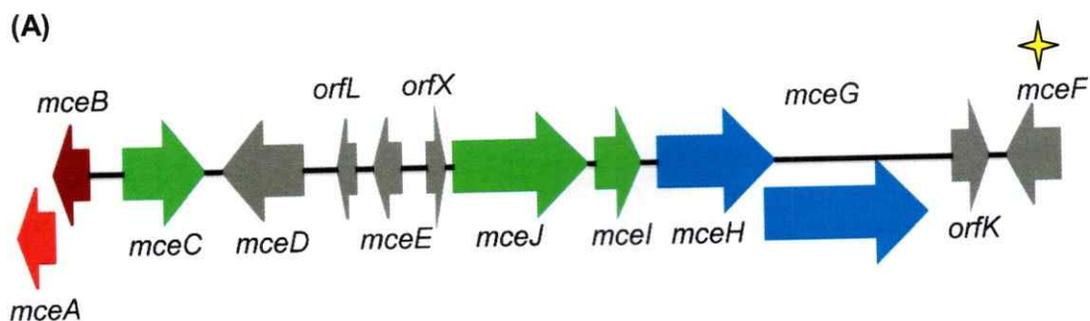
Figura 17. Expresión transcripcional de la fusion MceBA'-LacZ vs MceB'-LacZ. Las células portadoras de los plásmidos pMceBA'-LacZ y pMceB'-LacZ fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio M9 suplementado con glucosa desde donde se extrajo ARN total. Para el qPCR se utilizaron partidores que amplifican solo el gen *mceB*, utilizando las fusiones MceBA'-LacZ y MceB'-LacZ como templado. Se grafican los niveles de transcritos de la fusion MceBA'-LacZ comprada con la fusion MceB'-LacZ, todo normalizado por la expresión del gen *rrsG*.en ambas muestras (para mas detalles ver sección Materiales y Métodos). La desviación estándar corresponde a tres replicas independientes para cada fusion. $p = 10^{-4}$. El grafico fue generado utilizando el software REST® 2009 [32].



3.5. Efecto de los productos génicos del sistema productor de MccE492 sobre la expresión de los genes *mceBA*

Estudios anteriores mostraron que el fenotipo de inmunidad otorgado por el producto del gen *mceB* podría tener un grado de regulación por otros componentes del sistema productor de MccE492 [33]. Sin embargo no existe un estudio que muestre en qué punto radica esta regulación. Por ello se estudió el efecto que podría tener la presencia de los demás genes del sistema productor de microcina E492 sobre la expresión de los genes *mceBA*. Para ello se co-transformó la cepa BW25113.pMceBA'-LacZ con distintos plásmidos recombinantes portadores de distintas versiones y regiones del sistema productor de microcina E492.

El primer plásmido que se probó fue pJAM229 el cual contiene todos los genes del sistema productor de microcina E492, clonados en el cósmido pH79 (Fig. 18), con excepción de *mceF*, que tiene una deleción de la región amino terminal. Como control vacío se co-transformó la cepa BW25113 pMceBA'-LacZ con el cósmido pH79. Se observa una notable disminución de al menos 10 veces en la expresión traduccional de los genes *mceBA* en la cepa co-transformada con el plásmido pJAM229 respecto del vector vacío. Para acotar cuales podrían ser el o los genes que regulan la expresión de los genes *mceBA* se utilizó el plásmido pJI, que contiene solo parte del sistema productor (Fig. 18). El plásmido pJI posee solo los genes *mceA,B,C,D,E* y el gen *orfX* trunco, clonados en el cósmido pH79. Se observa que no existe mayor variación en la expresión de los genes *mceBA* en presencia del plásmido pJI, sugiriendo que al menos los genes que se encuentran clonados en este plásmido no estarían asociados a la regulación de la expresión de los genes *mceBA*, y que por lo tanto el efecto observado con el plásmido pJAM229 está asociado a la presencia de alguno de los genes que no están clonados en pJI.



(B)

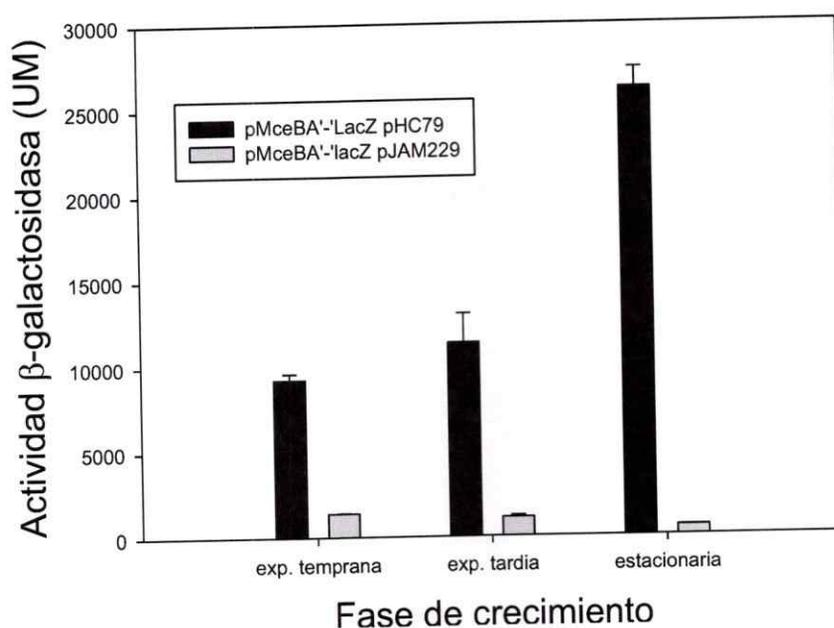
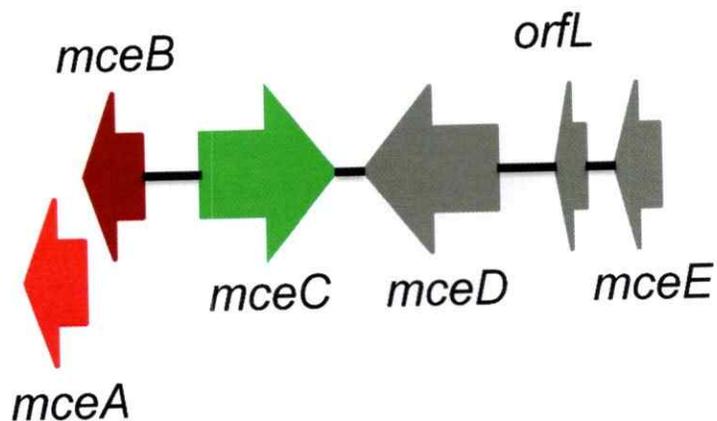


Figura 18. Efecto del sistema productor de MccE492 sobre la expresión de la fusión MceBA-LacZ. (A) Sistema JAM229. Este contiene todos los genes del sistema productor de MccE492 tal y como en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 pero con una delección del gen *mceF* en la región amino-terminal (estrella). (B) Se co-transformó la cepa *E. coli* BW25113 con los plásmidos pMceBA'-LacZ y pJAM229 y se realizaron ensayos β -galactosidasa a distintas fases de crecimiento. Como control vacío se utilizó el cósmido pHC79, vector donde fue clonado el sistema productor de microcina E492.

(A)



(B)

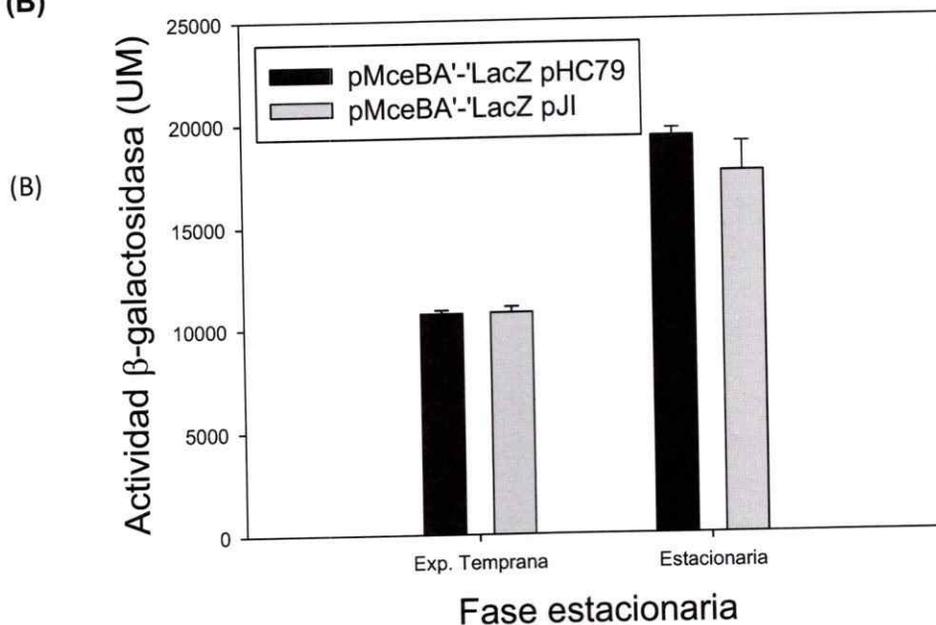


Figura 19. Efecto del sistema JI sobre la expresión de los genes *mceBA*. (A) Esquema del sistema clonado en pJI. Este posee solo los genes *mceABCDE* del sistema productor de MccE492. Este plásmido confiere inmunidad a MccE492 pero no produce microcina activa. (B) Se co-transformó la cepa *E. coli* BW25113 con los plásmidos pMceBA'-LacZ y pJI y se realizaron ensayos β -galactosidasa en distintas fases de crecimiento.

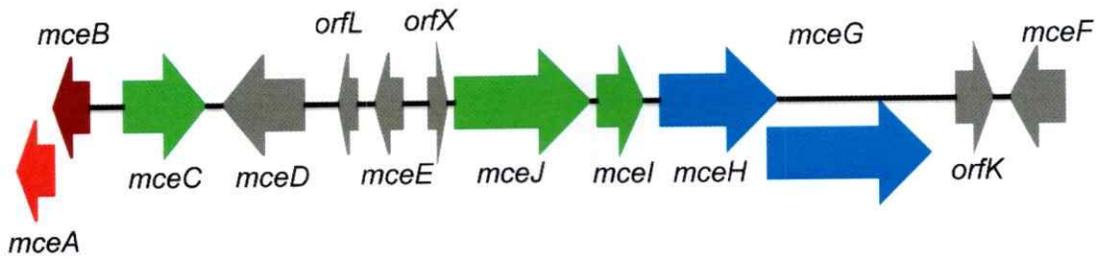
3.6. Efecto de OrfX sobre la expresión de los genes *mceBA*

Los resultados anteriores muestran que alguno de los componentes del sistema productor de MccE492 tiene un efecto negativo sobre la expresión traduccional de la fusión MceBA'-LacZ, y que estos reguladores no están en los genes presentes en el sistema pJI. Dentro de las microcinas de origen cromosomal, el sistema genético de producción de la microcina H47, producida por *E. coli* H47, presenta un alto grado de similitud con el sistema productor de microcina E492 (Fig. 20). Tanto su organización transcripcional como su distribución genética son muy similares [34]. En relación a esto, el gen *orfX*, ubicado río arriba de los genes *mceJI*, presenta un alto grado de identidad con el gen *mchX* del sistema productor de microcina H47. Este último está ubicado río arriba de la unidad transcripcional *mchIB*, equivalentes a la unidad *mceBA* del sistema productor de microcina E492. Estudios previos demuestran que el producto codificado en *mchX* regula la expresión de los genes *mchIB*, y que además se autoregula [24]. Esto nos lleva a pensar que el producto codificado en *orfX* podría tener un rol regulatorio sobre la expresión génica, en este caso de los genes *mceBA*.

Para explorar esta posibilidad se utilizó el plásmido pUC57 el cual contiene clonado el gen *orfX* río abajo del promotor T5, inducible por IPTG y río arriba de un terminador de la transcripción del fago T7, todo clonado en pUC57 (Fig. 21). Esta construcción se llamo pT5-*orfX* y se utilizó para co-transformar *E. coli* BW25113.pMceBA'-LacZ. Se realizaron ensayos β -galactosidasa e inmunoblot en presencia y ausencia de IPTG.

En la figura 21 se observa que hay una disminución de dos a tres veces en la actividad β -galactosidasa cuando el medio es suplementado con 1mM de IPTG. Esta disminución se condice con una disminución en los niveles de proteínas lo cual se observa utilizando anticuerpos anti- β -galactosidasa.

Sistema productor de microcina E492



Sistema productor de microcina H47

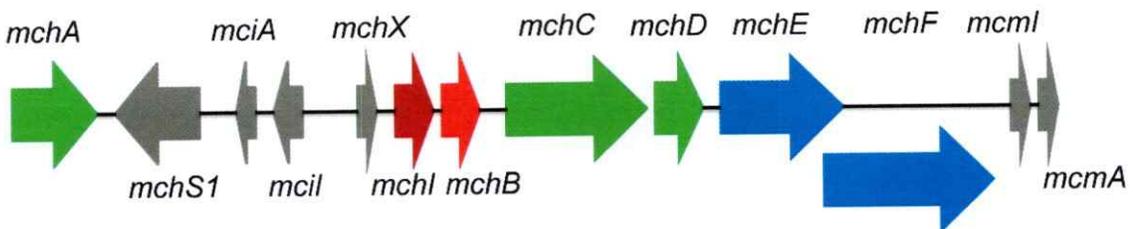


Figura 20. Comparación de los sistema productores de Microcina E492 y Microcina H47. Los colores indican el homólogo funcional para cada gen de ambos sistemas. En gris los genes cuya función no ha sido establecida.

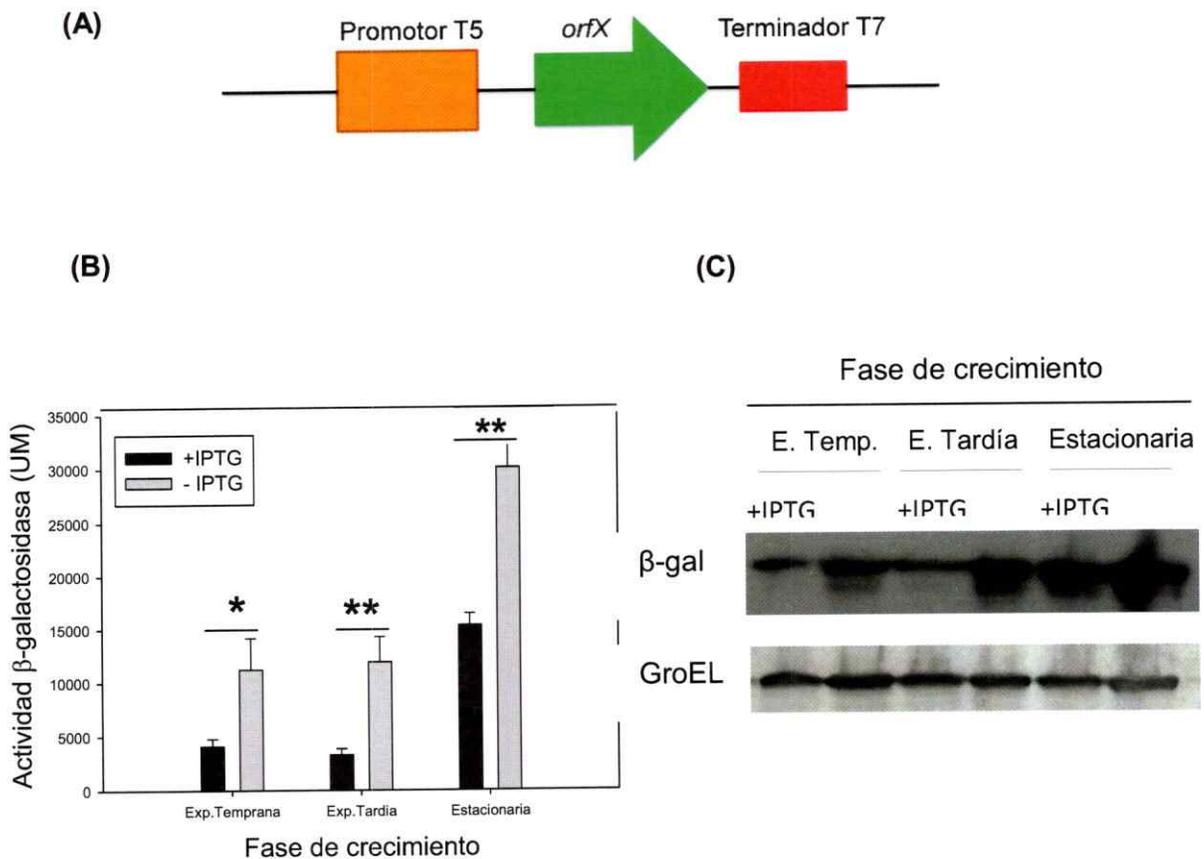


Figura 21. Efecto de *orfX* sobre la fusión MceBA'-LacZ. En (A) se muestra un esquema de la construcción sintética T5-*orfX*. (B) Efecto de la construcción T5-*orfX* sobre la fusión MceBA'-LacZ. La barra gris muestra la cepa *E. coli* BW25113 pMceBA'-LacZ pT5-*orfX* crecida en presencia de 1mM de IPTG y la barra negra sin IPTG. En (C) un inmunoblot en las mismas condiciones. Como control interno del inmunoblot se utilizo GroEL. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Si el producto codificado en *orfX* tiene un efecto negativo sobre la producción de microcina E492, se espera que esta disminución en la producción lleve también a una disminución en la actividad bactericida.

Para comprobar esta hipótesis, se co-transformaron las células portadoras del plásmido pMccE492 con el plásmido pT5-*orfX*-33AM. El primer plásmido contiene todo los genes asociados a la producción de MccE492 activa, tal como se encuentran en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492, mientras que el segundo contiene el fragmento T5-*orfX* clonado en el plásmido p33AM, un plásmido derivado de p15A, que es compatible con los plásmido portadores del sistema productor de microcina E492 activa, los cuales son derivados de ColE1. Colonias de esta cepa y de otras en las que se reemplazó el plásmido pT5-*orfX*-33AM por p33AM, como control vacío, fueron picadas sobre un césped sensible de *E. coli* BL21(DE3) crecido en una placa LB suplementada con 2 mM de IPTG. Se midió el halo de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible utilizando el software ImageJ y se graficaron los resultados como porcentaje de área respecto al control vacío (Fig. 22). Aunque se aprecia una disminución en el área del halo de inhibición en la cepa que sobre expresa *orfX*, esta no es significativa. Se realizó el mismo experimento, pero utilizando el plásmido pJAM434 como sistema productor de MccE492. En este sistema se observa un efecto más marcado que el observado con el sistema pMccE492, con una disminución a un 37.5% respecto al control vacío (Fig. 23). El sistema JAM434 contiene todos los genes asociados a la producción de MccE492 activa sin embargo un fragmento de 6.8 kb, que contiene a los genes *mceJIHGF* y parte de *orfX*, se encuentra invertido respecto al sistema clonado en pMccE492 (Fig. 23). Como consecuencia de esto, se genera un promotor débil que disminuye la expresión de los genes de la maduración (*mceJI*) y deja a *orfX* trunco.

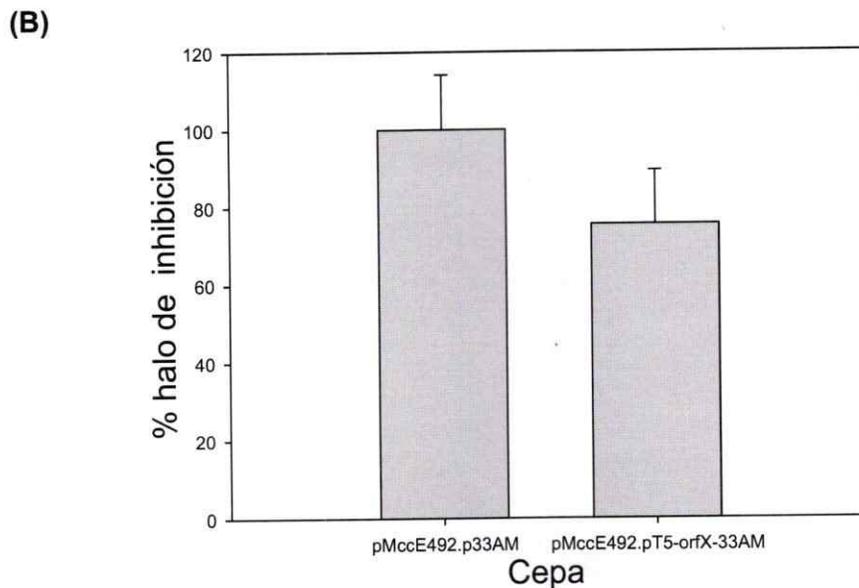
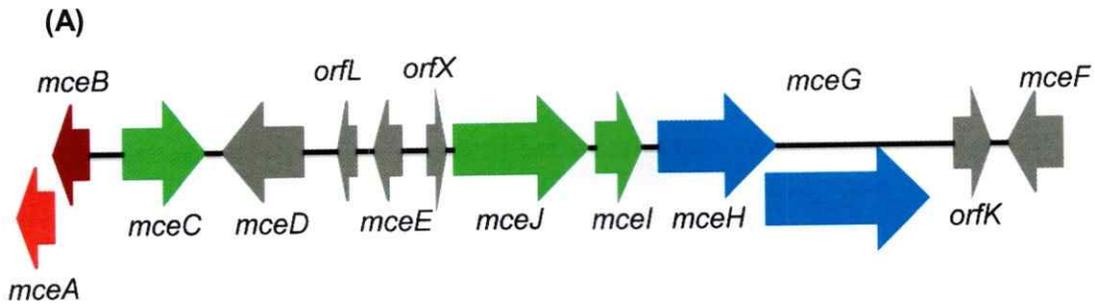


Figura 22. Efecto de OrfX sobre la producción de Microcina E492 activa. (A) sistema clonado en pMccE492. Éste se encuentra tal como en el cromosoma de *K. pneumoniae* RYC492 con el gen *mceF* restaurado respecto a JAM229 (ver Fig. 1). (B) Se picaron 55 colonias sobre un césped sensible de *E. coli* BL21(DE3), luego utilizando el software ImageJ se midieron los halos de inhibición generados. $p > 0.1$.

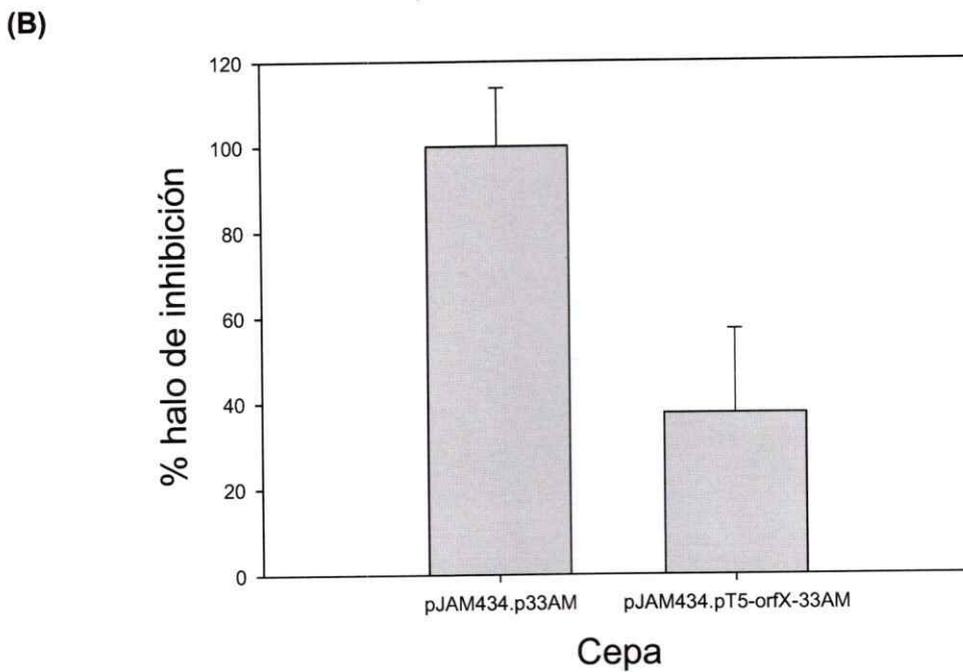
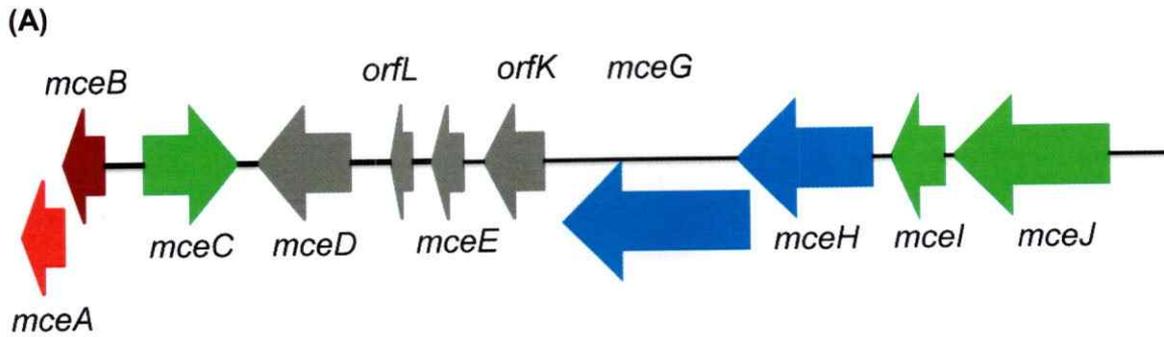


Figura 23. Efecto de OrfX sobre el sistema productor JAM434. En (A) se muestra un esquema del sistema JAM434. En éste un fragmento *XhoI* (6.8kb) está invertido respecto a los clonados en pMccE492. Esto deja a los genes *mceJIHG* y *orfK* invertidos y a *orfX* truncos. (B) Se picaron 55 colonias de *E. coli* BW25113 pJAM434 pT5-orfX-33AM y *E. coli* BW25113 pJAM434 p33AM sobre un césped BL21(DE3). $p < 0.05$.

El efecto final es que la producción de MccE492 activa disminuye, posiblemente por una disminución en la expresión de los genes de la maduración y de la exportación.

Al co-trasformar con el plásmido pT5-*orfX*-33AM una cepa portadora del sistema JAM434 se complementa el efecto generado por *orfX* sobre la expresión de los genes *mceBA*, ya que este sistema no contiene a la versión activa de *orfX*. Este contrasta con el caso del sistema clonado en pMccE492, donde este efecto no es observado posiblemente porque este sistema ya expresa *orfX* de manera activa, de manera que su efecto regulatorio sobre *mceBA* está "titulado". Es por ello que en el caso de pJAM434 se observa esta disminución significativa en el área del halo de inhibición, pues la expresión de *orfX* provendría solo desde pT5-*orfX*-33AM.

3.6.1. Efecto del hierro sobre la expresión de la unidad *mceBA*

Trabajos previos en el laboratorio establecieron que *orfX* conforma una sola unidad transcripcional con los genes de la maduración *mceJI*, encontrándose río arriba de éstos (Fig. 1) y con el promotor río arriba de *orfX*. se demostró que la expresión de los genes de la maduración *mceJI* es afectada por los niveles de hierro en el medio a través del factor transcripcional Fur. Los experimentos se realizaron utilizando fusiones traduccionales de *lacZ* al primer codón de *mceJ*, en cepas mutantes Δfur y en presencia o ausencia de hierro en el medio [19]. Si el hierro tiene un efecto sobre la expresión de los genes *mceJI* también la debería tener sobre la expresión de *orfX*, ya que ambos conforman una sola unidad transcripcional. Para comprobar esta suposición se crecieron células portadoras de la fusión traduccional pOrfX'-*LacZ*, la cual contiene *lacZ* fusionado al primer ATG de *orfX*, en presencia y ausencia del quelante de hierro dipiridil (Fig. 24).

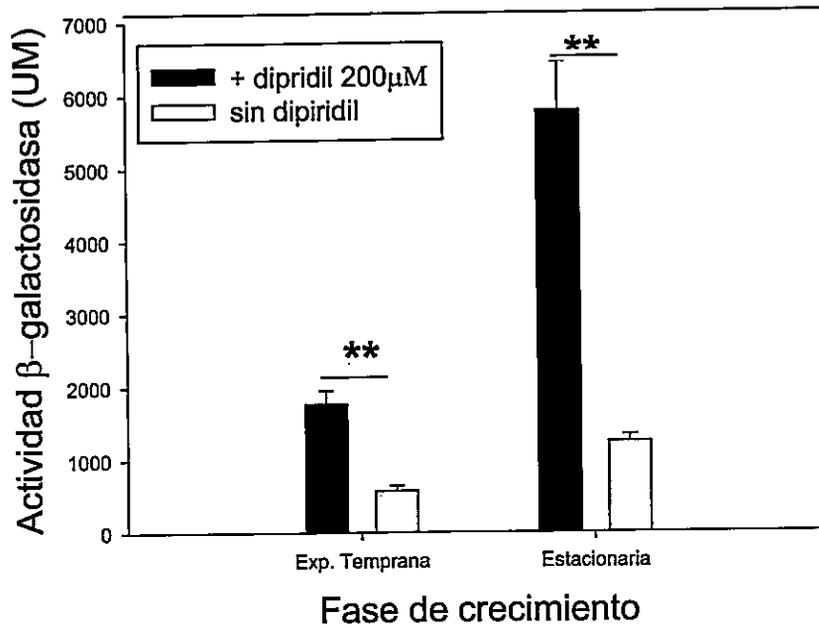


Figura 24. Efecto de la carencia de hierro sobre la expresión de *orfX*. Cepas de *E. coli* Top10 portadoras de la fusión OrfX'-LacZ, la cual contiene *lacZ* fusionado al último codón de *orfX*, fueron crecidas en presencia o ausencia del quelante de hierro 2,2 dipiridil (200 μM). ** $p < 0.01$.

Se observa un importante aumento en la expresión traduccional de esta fusión, lo que indica que el hierro, a través de Fur, reprime la expresión de *orfX* al igual como ocurre en la fusión MceJ1'-LacZ. Este último resultado es interesante ya que hace pensar sobre la existencia de un circuito regulatorio que involucre al hierro y la expresión de los genes *mceBA* a través de OrfX.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la regulación de la producción de microcina E492 y su proteína de inmunidad, específicamente a nivel de la regulación de la expresión de los genes *mceBA*. Unos de los aspectos a estudiar fue el efecto del citrato en la producción de microcina E492 y el comportamiento en distintas fases de crecimiento, examinando la expresión de los genes *mceBA*. Tanto para *K. pneumoniae* RYC492 como para cepas de *E. coli* portadoras de los sistemas productores de MccE492 la producción de MccE492 activa aumenta por la presencia de citrato en el medio de cultivo y también durante fase exponencial [8,28]. En este trabajo mostramos que pese a que la presencia del citrato es determinante en la producción de MccE492 activa, este no afecta significativamente la expresión de los genes *mceBA* (Fig. 6). *K. pneumoniae* utiliza el citrato como fuente de carbono, pues posee codificado en su cromosoma, al igual que en *Salmonella enterica* y en la mayoría de las enterobacterias descritas, los genes asociados al transporte de citrato. Sin embargo en el caso particular de *E. coli* esto no es así. Solo algunas cepas recombinantes o portadoras de plásmidos que contienen los genes para el transporte del citrato pueden metabolizarlo [35,36]. Es decir, el efecto dado por el citrato no estaría asociado a su metabolismo como fuente de carbono ya que las cepas de *E. coli* que utilizamos en el laboratorio no crecen utilizando solo citrato como fuente de carbono. Un fenómeno que sin embargo es ubicuo en enterobacterias es el transporte de citrato-férrico [35,37]. En este caso el citrato forma un complejo con el ion Fe^{3+} y a través de una cascada de señalización mediada por las proteínas FecABCDE permite el ingreso de hierro al citoplasma de la bacteria, pero no de citrato. Una de estas proteínas, FecI, es considerado como un factor sigma alternativo, cuya producción esta mediada por los niveles de hierro en la célula y el cual al unirse a la RNA polimerasa permite la transcripción de los genes asociados al transporte de hierro desde el extracelular hasta el citoplasma. De esta manera, este sistema podría ser una alternativa que medie la

producción de microcina E492, a través de la regulación de la expresión de algunos de los genes del sistema productor de MccE492.

Respecto a la dependencia de la fase de crecimiento, a través del uso de fusiones traduccionales con *lacZ*, demostramos que la producción de microcina E492 aumenta en fase estacionaria de crecimiento. Dicho aumento no guarda relación con el factor sigma de fase estacionaria (σ^S), como se demostró al estudiar la fusión MceBA'-*LacZ* en un hospedero $\Delta rpoS$ (Fig. 5). Este aumento de expresión en fase estacionaria se demostró que responde a un segundo promotor (P_1) interno en *mceB*, que le otorgaría a *mceA* un patrón de expresión diferencial respecto de *mceB*, pese a que ambos conforman una sola unidad transcripcional (Fig. 2). Los experimentos con las fusiones MceBA'-*LacZ* y $\Delta P_{BA}'$ -*LacZ* (esquema resumen, Fig. 26) demostraron que este promotor es interno en *mceB*, y que responde a fase estacionaria. Por otra parte, con la fusión MceB2'-*LacZ*, cuya transcripción está dirigida solamente por el promotor de la unidad *mceBA* (P_0), no se observó el aumento en fase estacionaria (Fig. 26). Este efecto es corroborado por un análisis transcripcional a través de qRT-PCR (Fig. 13). De esta manera se muestra como el gen *mceB* se expresa constitutivamente tanto a nivel transcripcional como traduccional, en ambas fases de crecimiento, mientras que la expresión transcripcional de *mceA* responde a la fase de crecimiento aumentado en fase estacionaria lo que se traduce en mayor cantidad de proteína MccE492 en esta fase. Las consecuencias fisiológicas de este aumento en fase estacionaria son aún desconocidas pero podrían estar asociadas a la agregación de la MccE492, la cual se ha mostrado que forma fibras amiloides principalmente en fase estacionaria. Esta agregación contribuye importantemente a la pérdida de actividad bactericida en esta fase, ya que se ha demostrado que estas fibras no tienen actividad bactericida [38]. En forma análoga se ha descrito que la formación de fibras curli, un tipo de fibra amiloide asociadas a adhesión celular y la generación de

biopelículas en *E. coli*, ocurre en fase estacionaria. La generación de biopelículas es una consecuencia de la pérdida de motilidad celular. Esta pérdida está dada por la generación de cascadas regulatorias que responden a señales ambientales, en la cual participan reguladores de la expresión de los componentes del flagelo (operon *flhDC*), (p)ppGpp, el factor σ^S , acumulación del mensajero c-di-GMP, y reguladores de la producción de los componentes de las fibras curli (genes *csgBAC*). En general durante la entrada a fase estacionaria existe inhibición en la producción de los componentes del flagelo y una inducción en la producción de los componentes de las fibras curli, mediado en gran parte por el factor σ^S [39,40]. El efecto final como respuesta al estrés fisiológico propio de fase estacionaria es la disminución en la producción de flagelo, por tanto en la motilidad, y en el aumento en la producción de fibras curli y por tanto en la adhesión celular lo que lleva finalmente a la agregación celular. Es posible entonces que el aumento en la producción de MccE492, como fibra amiloide, contribuya o esté relacionado a la agregación celular en *K. pneumoniae* RYC492 en fase estacionaria.

Otro fenómeno interesante se observa al fusionar *lacZ* a distintas regiones de la unidad transcripcional *mceBA* (esquema resumen, Fig. 26). Al fusionar el reportero a los codones 21 y 95 de *mceB* la expresión traduccional cae de 5 a 10 veces durante todo el crecimiento respecto de la fusión MceB2'-LacZ. Sin embargo, al fusionar *lacZ* a los codones 3, 18 y 84 de *mceA* la expresión traduccional se recupera respecto a MceBA'-LacZ. Al comparar los niveles de ARNm de *mceB* de la fusión MceB'-LacZ respecto a la fusión MceBA'-LacZ, estos caen 5 veces. Este resultado transcripcional es importante pues la proteína de la inmunidad MceB es una proteína integral de membrana [41]. Este hecho puede ser determinante en los niveles de actividad β -galactosidasa obtenidos, pues el hecho de que la quimera MceB'-LacZ se dirija a la membrana puede afectar la tetramerización de la enzima y por lo tanto la actividad de esta [42]. También puede

ocurrir que al eliminar ciertas regiones de la proteína de inmunidad, como en las fusiones MceB21'-LacZ y MceB'-LacZ, la quimera pueda ser más proclive a degradación proteolítica, lo que explicaría los bajos niveles de proteínas observados en los inmunoblots (Fig. 15C). Sin embargo, la disminución significativa de los niveles de ARNm en estas fusiones, hace pensar en otras posibilidades (Fig. 17). Un modelo para explicar este fenómeno es que la estabilidad del ARNm de la unidad transcripcional *mceBA* dependa del acoplamiento traduccional de ambos genes, la cual se perdió en la ausencia de traducción de *mceA*. Esto permitiría que la célula produzca menos proteína de inmunidad cuando por ejemplo no se traduce o no produce microcina E492. En cambio, cuando se está produciendo MccE492 activamente la producción de proteína de inmunidad aumenta. El acoplamiento traduccional en operones es un fenómeno característico en bacteria lo cual permite mantener una relación constante entre las proteínas producidas desde el mismo operón, todo en el contexto de una señal ambiental y la generación de un fenotipo particular [43].

Respecto al sistema productor de MccE492 se demostró que existen componentes en este que regulan negativamente la expresión de la unidad *mceBA*. Particularmente mostramos el rol regulatorio del gen *orfX* sobre la expresión de los genes *mceBA*. Se demostró que el producto codificado en *orfX* tiene un efecto represor en la expresión de la fusión MceBA'-LacZ, lo que se traduce en una disminución en la producción de MccE492 activa (Fig. 21-23). En esta tesis y en otros trabajos se estableció que la expresión de los genes de la maduración *mceJI* y *orfX* está regulada por la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo [19]. Esto genera un circuito regulatorio donde el hierro a través del represor Fur reprime la expresión de *orfX* y de los genes *mceJI*, lo que genera una mayor expresión y producción de MccE492 cuando hay disponibilidad de hierro, como es en la fase exponencial.

Dado que el efecto de OrfX sobre la producción de MccE492 se evaluó solo a nivel traduccional, tanto con ensayos β -galactosidasa, inmunoblots como el efecto *in vivo* en cepas portadoras del sistema productor de MccE492, no es posible saber en qué punto de la regulación de la expresión génica actúa. No sabemos si actúa sobre la transcripción o traducción, o en algún paso intermedio entre ambos procesos. Al hacer análisis de dominios de unión a ADN no se encontraron ninguno de los típicos dominios, como cierres de leucina, a pesar que OrfX contiene leucinas en las posiciones 7, 14, 21 y 28. Si es que OrfX se une el ADN, es posible que lo haga en forma de oligómero, ya sea con subunidades de la misma proteína o de otras proteínas, pues OrfX tiene una baja masa molecular (3.81 kDa), además no es posible afirmar que el efecto visto con los sistemas productores de MccE492 sobre la expresión traduccional de la fusión MceBA'-LacZ (Fig. 18, 19) este dado únicamente por el producto codificado en el gen *orfX*. Esta propuesta se sustenta en que la disminución en la expresión traduccional de la fusión MceBA'-LacZ en presencia de todo el sistema productor de MccE492 es de almenos de 10 veces, en tanto cuando se sobreexpresa *orfX* la disminución es solo entre dos a tres veces. Estos resultados sugiere que podrían existir otros componentes del mismo sistema productor de MccE492 que independientemente o en conjunto con OrfX afecten la producción de MccE492.

En su conjunto los resultados nos permiten plantear un modelo sobre la regulación en la expresión de los genes *mceBA* por OrfX (Fig.27), El efecto de OrfX sobre la expresión de los genes *mceBA* ocurre probablemente sobre el promotor P₀, ubicado río arriba de la unidad *mceBA*, ya que si bien es cierto al inducir la expresión de *orfX* la expresión de la fusión traduccional MceBA'-LacZ disminuye, tanto en fase exponencial como estacionaria, aún existe un aumento en fase estacionaria en estas condiciones. Puesto que el aumento en esta fase estaría dado por el promotor interno en dicha unidad (P₁), es

posible entonces que OrfX actúe a nivel del promotor P_0 disminuyendo los niveles de mRNA de dicha unidad, mientras el promotor P_1 sigue respondiendo a fase estacionaria. Este efecto de OrfX sería mayor en ausencia de hierro o en un medio pobre para este elemento, ya que la expresión de *orfX*, medida a nivel traduccional, es aumentada en ausencia de hierro. Por lo tanto es esperable que al disminuir la cantidad de hierro en el medio, la cantidad de MccE492 producida también disminuya en conjunto con la proteína de inmunidad, debido al efecto que OrfX tiene sobre el promotor P_0 . Es probable que al disminuir los niveles de hierro en el medio el efecto general en la bacteria sea "priorizar" la síntesis de los sistemas de captación de hierro, como los del sistema Ent, asociado a la producción de enteroquelina, más que la producción de MccE492 activa u otros elementos que no serían esenciales en dichas condiciones, Por otro lado el promotor P_1 pareciera no responder a los niveles de hierro. Dicho promotor interno podría responder a factores transcripcionales que a su vez responden a cambios en las condiciones del medio, como pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes, oxidación, etc. Este fenómeno es reminiscente al del de *rpoS*, codificante para el factor σ^S , cuya expresión aumenta en fase estacionaria. Este gen conforma una unidad transcripcional con el gen *nlpD*, el cual está ubicado río arriba de *rpoS* [44]. Interno en *nlpD* existe un promotor que es el que permite el aumento en la expresión de *rpoS* en fase estacionaria, mientras que el promotor de la unidad transcripcional, el cual está río arriba de *nlpD*, mantiene constante la transcripción. Dicho promotor interno (P_{rpoS}) responde a factores transcripcionales tales como Fis, el cual reprime la transcripción de *rpoS* en fase exponencial. Por otro lado el sistema de dos componentes BarA/UvrY activa la transcripción de *rpoS* en fase estacionaria, actuando sobre este promotor [44,45]. Respecto de tener promotores en tándem frente a la unidad *mceBA*, es plausible pensar que al bajar la transcripción desde el promotor P_0 , por ejemplo por acción de OrfX, existe una menor grado de "interferencia

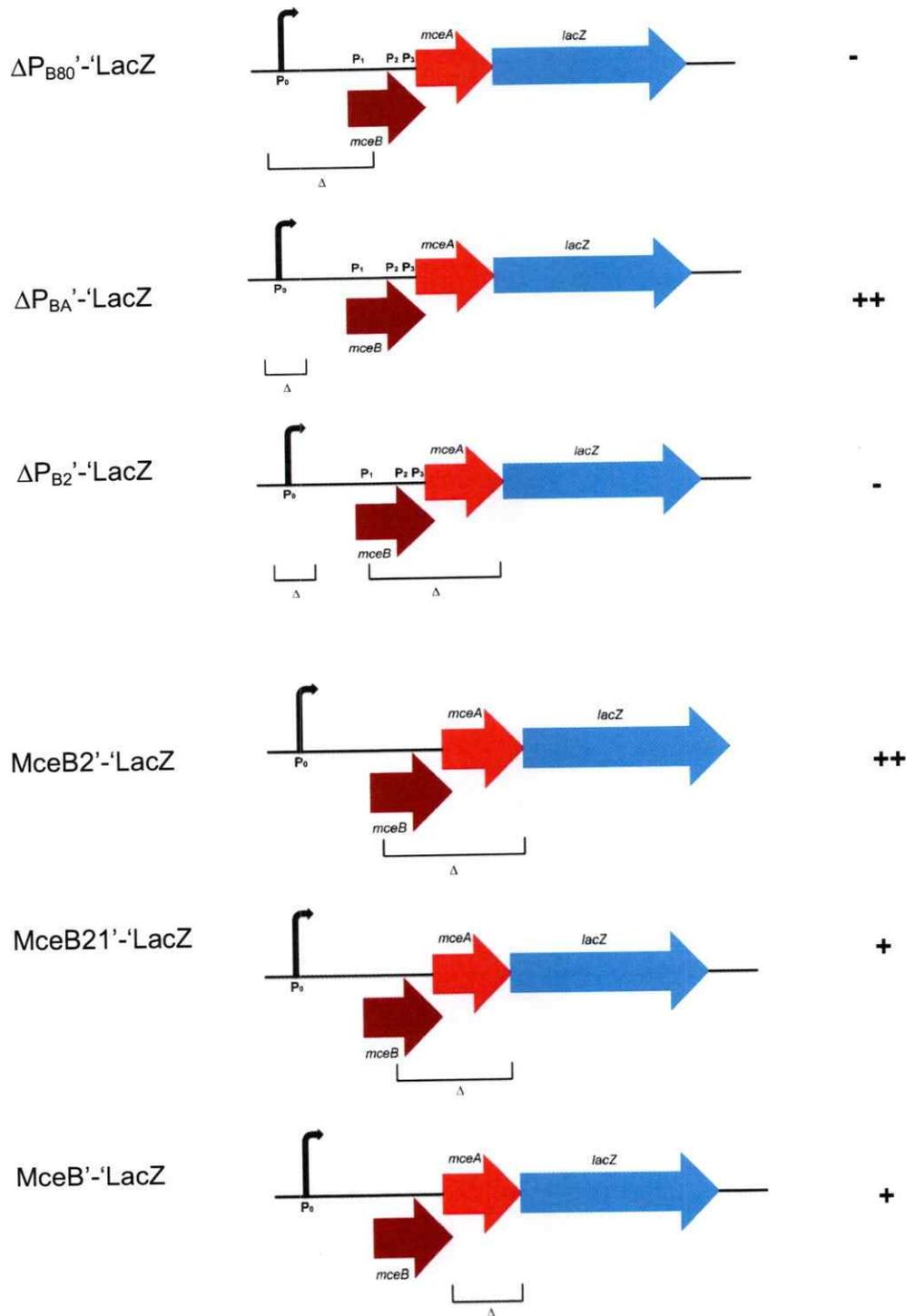
transcripcional" entre las RNA polimerasas, es decir al haber menos RNA polimerasas transcribiendo desde P_0 existe menor interferencia con la unión de RNA polimerasa a P_1 . El fenómeno de interferencia transcripcional ha sido ampliamente descrito en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [46,47], en donde un promotor ubicado río abajo de otro, presenta una baja tasa de unión de la RNA polimerasa, dado por el constante flujo de esta enzima desde el promotor río arriba. Al haber una disminución en la actividad transcripcional del promotor río arriba se permite la unión de la RNA polimerasa al segundo promotor, activando la transcripción desde este promotor [47].

Es complejo establecer el papel biológico que juega el aumento de Mcc492 en fase estacionaria. Como se planteó anteriormente, es posible que el aumento en la producción de MccE492, asociado a la producción de fibras amiloides, puede tener un efecto en la formación de bio-películas en fase estacionaria, como ocurre con las fibras curli de *E. coli*, las cuales también conforman fibras amiloides en esta fase. Es probable además que la agregación amiloide de la MccE492 disminuya el efecto deletéreo que puede tener el aumento en la producción de ésta en fase estacionaria sin un aumento en la proteína de inmunidad. Respecto a esto en el laboratorio se ha mostrado que la MccE492 agrega formando fibras amiloides en el citoplasma. Entonces es posible que al aumentar la producción de MccE492 esta agregue en el citoplasma, lo que disminuya su actividad bactericida y de esa manera no tenga un efecto tóxico sobre la célula productora, pese a que los niveles de proteína de inmunidad no aumentan en esta fase. Este fenómeno da cuenta de la disminución de la actividad bactericida en fase estacionaria, explicado por la agregación amiloide, como una consecuencia de un aumento en la concentración de MccE492 no modificada en esta fase.

Fusión

Esquema

Grado de expresión



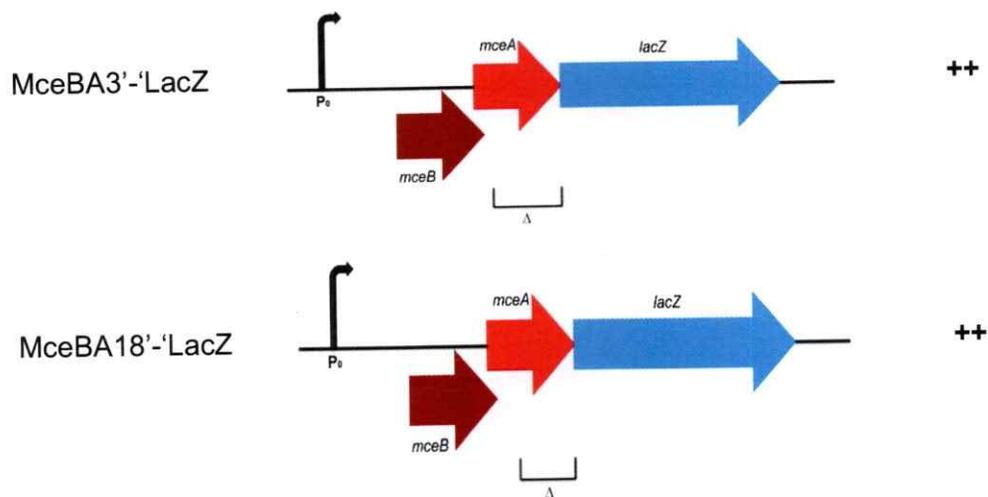


Figura 25. Efecto de distintas fusiones de *lacZ* a distintas regiones de la unidad *mceBA*. Grado de expresión traduccional mostrado como actividad β -galactosidasa en Unidades Miller (UM): - (100-200UM), + (1000-2000UM), ++ (>10000UM). Los corchetes delimitan las regiones eliminadas para generar las distintas fusiones.

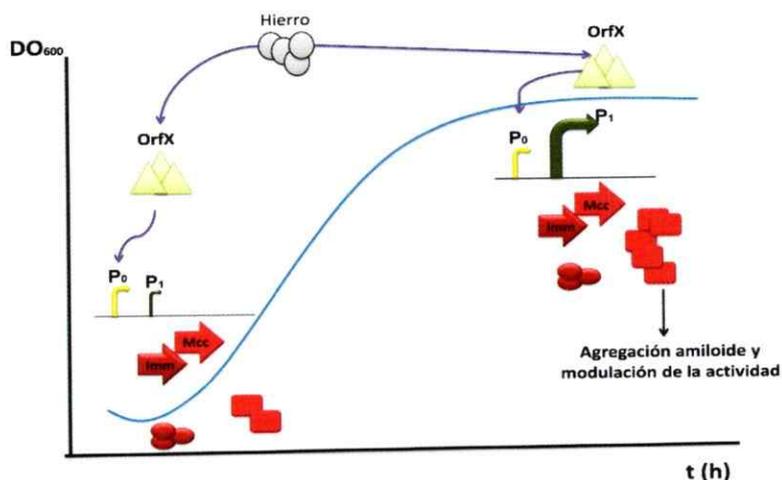


Figura 26. Regulación de la expresión de los genes *mceBA*. El promotor de la unidad transcripcional *mceBA* (P_0) mantiene niveles constantes de la proteína de inmunidad MceB y de MccE492 a lo largo del crecimiento de la bacteria productora. Es este promotor el que respondería a OrfX, siendo reprimido por la acción de éste y cuyo efecto es la disminución en los niveles de proteína de inmunidad y MccE492. Probablemente este efecto es modulado por la disponibilidad de hierro en el medio, el cual contribuye a la producción de proteína de inmunidad y MccE492. Por otro lado el promotor interno localizado en *mceB* (P_1) responde a cambios en las condiciones del medio permitiendo el aumento en los niveles de MccE492 en fase estacionaria de crecimiento. Este aumento en la concentración de MccE492 intracelular en fase estacionaria permitiría la formación de agregados amiloides intracelulares los cuales contribuyen a la disminución en la actividad bactericida de la MccE492, lo que compensaría la baja producción de proteína de inmunidad en esta fase.



5. Conclusiones

- El aumento en la producción de MccE492 activa en medio suplementado con citrato no guarda relación con un aumento en la producción de MccE492 desde la unidad transcripcional *mceBA*.
- En los primeros 90 pb de *mceB* se localiza un segundo promotor (P₁) el cual dirige diferencialmente la transcripción del gen *mceA* en fase estacionaria.
- La estabilidad del ARNm de la unidad *mceBA* transcripcional podría ser dependiente del acoplamiento traduccional de ambos ORFs.
- OrfX tiene un efecto modulador negativo sobre la producción de MccE492, y este efecto estaría sujeto a regulación por los niveles de hierro en el medio de cultivo.

6. Literatura citada

- 1- Tagg JR., Dajani AS., Wannamaker LW (1976) **Bacteriocins of Gram positive bacteria**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 722-756.
- 2- Klaenhammer Todd R. (1988) **Bacteriocins of acid lactic bacteria**. *Biochimie* 70, 337-349.
- 3- Raloff J. (1998) **Staging germ warfare in foods. Science harnesses bacteria to fend off food poisoning and spoilage**. *Science News* 153, 89-90.
- 4- Riley M.A., Chavan M.A. (2006) **Bacteriocin: ecology and evolution**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 5- Cascales E., Buchanan S., Duche D., Kleanthous C., Loubes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. (2007) **Colicin biology**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 158-229.
- 6- Duquesne S., Desteoumieux-Garzon D., Peduzzi J., Rebuffat S. (2006) **Microcins, gene-encoded antibacterial peptide from enterobacteria**. *The Royal Society of Chemistry* 24, 708-734.
- 7- Abriouel H., Belguesmla Y., Ben Omar N., Brand A., Brogden K., Chauleau M. cols. (2011) **Prokaryotic antimicrobial peptides**. From genes to applications. Eds. Drider D., Rebuffat S.
- 8- de Lorenzo V. **Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae***. *Archives of Microbiology* 139:72-75.

- 9- de Lorenzo V., Martinez JL., Asensio C. (1984) **Microcin-mediated interaction between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains.** Journal of General Microbiology 130: 391-400.
- 10- de Lorenzo V., Pugsley A. (1985) **Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 27: 666-669.
- 11- Lagos R., Wilkens M., Vergara C., Cecchi X., Monasterio O. (1993) **Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes.** FEBS 321: 145-148.
- 12- Thomas X. Destoumieux-Garzon D., Peduzzi J., Afonso C., Blond A., Birlirakis N., Goulard C., Dubost L., Thai R., Tabet JC., Rebuffat S. (2004) **Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity.** Journal of Biological Chemistry 279: 8233-28242.
- 13- Hantke K., Nicholson G., Rabsch W., Winkelmann G. (2003) **Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli*, are recognized by the outer membrane Iron.** Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 3677-3682.
- 14- Wilkens M., Villanueva JE., Cofre J., Chnaiderman J., Lagos R. (1997) **Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*.** Journal of Bacteriology 179: 4789-4794.

- 15- Lagos R., Villanueva JE., Monasterio O. (1999) **Identification and Properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein.** Journal of Bacteriology 181: 212-217.
- 16- Marcoleta A., Gutiérrez-Cortez S., Maturana D., Monasterio O., Lagos R. (2013) **Whole-genome sequence of the microcin E492-producing strain *Klebsiella pneumoniae* RYC492.** Genome Announcements. 1(3)L e00178-13. Doi: 10.1128/genomeA.00178-13
- 17- 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.** Molecular Microbiology 42: 229-243.
- 18- Nolan E., Fischbach MA., Koglin A., Walsh CT. (2007) **Biosynthetic tailoring of Microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate.** Journal of the American Chemical Society. 129: 14336-14347.
- 19- Gutiérrez S. (2012) **Regulación de la expresión de los genes de la maduración del sistema productor de Microcina E492.** Tesis de Doctorado en Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 20- 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.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 3083-3086.

- 21- Destoumieux-Garzon D., Thomas X., Santamaria M., Goulard C., Barthélémy M., Boscher B., Bessin Y., Molle G., Mons AM., Letellier L., Peduzzi J., Rebuffat S. (2003) **Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 49: 1031-1041.
- 22- Arranz R., Mercado G., Martin-Benito J., Giraldo R., Monasterio O., Lagos R., Valpuesta JM.. (2012) **Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors.** *Journal of Structural Biology* 178: 54-60.
- 23- Lagos R., Tello M., Mercado G., García V., Monasterio O. (2009) **Antibacterial and antitumorigenic properties of Microcin E492, a pore-forming bacteriocin.** *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10:74-85.
- 24- Rodriguez E., Laviña M. (1998) **Genetic analysis of Microcin H47 immunity.** *Canadian Journal of Microbiology* 44: 692-697.
- 25- Moreno F., Gonzales-Pastor JE., Baquero MR., Bravo D. (2002) **The regulation of microcin B, C and J operons.** *Biochimie* 84: 521-529.
- 26- Fomenko D., Veselovskii A., Khmel I. (2001) **Regulation of microcin C51 operon expression: the role of global regulators of transcription.** *Research in Microbiology* 152: 469-479.
- 27- Chiuchiolo M., Delgado MA., Farias RN., Salomón RA. (2001) **Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic Microcin J25.** *Journal of Bacteriology* 183: 1755-1764.

- 28- Orellana C., Lagos R. (1996) **The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist.** FEMS Microbiology Letters 136: 297-303.
- 29- Corsini G., Baeza M., Monasterio O., Lagos R. (2002) **The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492.** Biochimie 84: 539-544.
- 30- Sambrook J., Russell D. W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 31- Pfaffl Michael. 2001. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acid Research 29: 2002-2007.
- 32- Pfaffl M., Horgan G., Dempfle L. 2002. **Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression result in real-time PCR.** Nucleic Acid Research 30: 1-10.
- 33- Corsini G. (2005) **Regulación de la expresión de la microcina E492 y su inmunidad.** Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 34- Poey M., Azpiroz MF., Laviña M. (2006) **Comparative analysis of chromosome-encoded microcins.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 1411-1418.
- 35- Stiefel A., Mahren S., Ochs M., Schindler PT., Enz S., Braun V. (2001) **Control of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: mutations in region 2.1 of the FecI extracytoplasmatic-function sigma factor suppress mutations in the FecR transmembrane regulatory protein.** Journal of Bacteriology 183: 162-170.

- 36- Martinus Pos K., Dimroth P., Bott M. (1998) **The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplast.** Journal of Bacteriology 180: 4160-4165.
- 37- Welz D., Braun V. (1998) **Ferric citrate transport of *Escherichia coli*: functional regions of the FecR transmembrane regulatory protein.** Journal of Bacteriology 180: 2387-2394.
- 38- Bieler A., Estrada L., Lagos R., Baeza M., Castilla., Soto C. (2005) **Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein.** Journal of Biological Chemistry 280: 26880-26885.
- 39- Pesavento C., Becker G., Sommerfeldt N., Possling A., Tschowri N., Mehlis A., Hengge R. (2008) **Inverse regulatory coordination of motility and Curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*.** Genes and Development 22: 2434-2446.
- 40- Pesavento C., Hengge R. (2009) **Bacterial nucleotide-based second messengers.** Current Opinion in Microbiology 12: 170-176.
- 41- Gonzales B. (2010) **Determinación de la topología de MceB, una proteína integral de membrana que confiere inmunidad a la Microcina E492.** Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 42- Silhavy T., Beckwith J. (1985) **Uses of *lac* fusions for the study of biological problems.** Microbiological Reviews 49: 398-418.

- 43- Løvdok L., Bentele K., Vladimirov N., [Müller A.](#), [Pop FS.](#), [Lebiedz D.](#), [Kollmann M.](#), [Sourjik V.](#) (2009) **Role of translational coupling in robustness of bacterial chemotaxis pathway.** PLoS Biology 7: 1-11.
- 44- Lane R., Hengge-Aronis R. (1994) **The *nlpD* is located in a operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a new lipoprotein with a potential function in cell wall formation.** Molecular Microbiology 13: 733-743.
- 45- Battesti A., Majdalani N., Gottesman S. (2011) **The RpoS-Mediated general stress response in *Escherichia coli*.** Annual Reviews of Microbiology 65: 189-213.
- 46- Shearwin K., Callen B., Egan B. (2005) **Transcriptional interference-a crash course.** Trends in Genetic 21: 339-346.
- 47- Martens J., Laprade U., Winston F. (2004) **Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* *SER3* gene.** Nature 429: 871-875.