

UCH = FC
MAG - B
M553
C.1

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA
MICROCINA E492 POR LOS GENES DE MADURACIÓN.

Seminario de Título
entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



Facultad de Ciencias

por

MARÍA GABRIELA MERCADO GUERRA

2007

Directora Seminario de Título: Dra. ROSALBA LAGOS M.

UCH-FC
Biotecnología
M 553
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA MICROCINA E492 POR LOS GENES DE MADURACIÓN”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARÍA GABRIELA MERCADO GUERRA.

ROSALBA LAGOS MONACO
Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector



Santiago de Chile, Enero de 2007

A Lautaro y Anita.



5



“Pequeña historia tendiente a ilustrar lo precario de la estabilidad dentro de la cual creemos existir, ósea que las leyes podrían ceder terreno a las excepciones, azares o improbabilidades y ahí te quiero ver”

Julio Cortazar

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer primero que todo a la Dra. Rosalba Lagos y al Dr. Octavio Monasterio, por haberme recibido generosamente en su laboratorio y por confiar en mí y en mi trabajo. Especialmente a la Dra. Lagos, por dirigir de manera comprensiva y amorosa todos mis intentos, y a Gino Corsini por guiar paternalmente mis primeros pasos en el laboratorio.

A Mario Tello y Leonardo Sepúlveda, por sus críticas siempre constructivas, sus inteligentes ideas, su ayuda desinteresada, sabios consejos y apasionadas conversaciones, por el gran aporte que le han significado a mi trabajo y desarrollo personal.

A Roselyn Orellana, por su invaluable ayuda y todo su cariño. Y a toda la gente que trabaja en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular (BEM), por los agradables momentos de sano esparcimiento.

De manera más personal deseo agradecer a toda mi familia, a todos los que siempre han estado ahí y a todos los que ya no están; son sin lugar a dudas lo más importante para mí, parte de todo lo que soy y lo que hago.

A mis amados padres Lautaro y Anita por haberme traído a este mundo llenos de esperanza y alegría. Y a Javierito que ha sido mi amigo y compañero toda su vida.

Y finalmente, pero en absoluto menos importante, quiero agradecer a todos mis amigos, a los que me acompañan y alegran día a día y a los que añoro en la distancia.





INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS	vi
INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bacteriocinas	1
1.2. Microcina E492	2
1.2.1. La producción de mceE492 está relacionada con el metabolismo del hierro	4
1.3. Metabolismo del hierro	6
1.3.1. Transporte de hierro en enterobacterias	7
1.3.1.1. Sideróforos de tipo catecol	8
1.3.1.1.1. Enteroquelina	8
1.3.1.1.2. Salmoquelinas	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Materiales	13
2.1.1. Reactivos	13
2.1.2. Cepas bacterianas	14
2.1.3. Plasmidios y vectores	14
2.1.4. Oligonucleótidos	18
2.2. Métodos	18
2.2.1. Medios de cultivo	18
2.2.2. Técnicas Moleculares	20
2.2.3. Producción de fusiones traduccionales entre genes del sistema de la mceE492 y la proteína LacZ	20
2.2.3.1. Transformación de la cepa portadora de los fagos Mu helper y defectuoso	22
2.2.3.2. Producción del lisado de fago MudII1681	22
2.2.3.3. Infección y selección de células con inserción	22

2.2.3.4. Mapeo y secuenciación de las fusiones traduccionales	23
2.2.3.5. Detección de la actividad β -galactosidasa de las fusiones traduccionales en medios con y sin DTPA	23
2.2.4. Purificación de mceE492	25
2.2.4.1. Purificación de mceE492	25
2.2.4.2. Purificación de la mceE492 por cromatografía líquida de alta resolución	25
2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la mceE492	26
2.2.5.1. Marcación de la mceE492 con fluorescamina	26
2.2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	26
2.2.6. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la mceE492	27
2.2.6.1. Detección de la actividad bactericida	27
2.2.6.2. Cuantificación de actividad bactericida o determinación del título	27
2.2.6.3. Tratamiento de sobrenadantes para la determinación o cuantificación de la actividad bactericida	28
2.2.6.3.1. Tratamiento con cloroformo	28
2.2.6.3.2. Tratamiento por filtración	28
2.2.6.3.3. Tratamiento por calentamiento	28
2.2.7. Reemplazo de sobrenadantes	28
2.2.8. Transcomplementaciones	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Estudio de la expresión traduccional	30
3.1.1. Construcción de fusiones traduccionales	31
3.1.2. Expresión traduccional de la mceE492 y de la proteína de la inmunidad	32
3.1.3. Expresión traduccional de las proteínas MceG y MceH implicadas en la exportación de la mceE492 a partir de células crecidas en medio con y sin DTPA	36



3.1.4.	Expresión traduccional de las proteínas MceC, MceI y MceJ implicadas en la maduración de la mceE492	39
3.2.	Relación entre las vías de síntesis de sideróforos de tipo catecol y la producción de mceE492 activa	44
3.2.1.	Expresión en <i>Salmonella enterica</i> de plasmidios mutantes en genes del sistema de producción de mceE492	45
3.2.2.	Análisis cromatográfico y electroforético de la mceE492 producida en <i>Salmonella enterica</i>	47
3.2.3.	Transcomplementación por <i>Salmonella enterica</i> de una mutante en <i>mceC</i> expresada en <i>E. coli</i>	47
3.2.4.	Clonamiento del gen <i>iroB</i> de <i>S. enterica</i> y complementación con <i>mceC</i>	50
3.2.5.	Transcomplementación de un plasmidio mutante en <i>mceC</i> con salmoquelinas MGE y DGE	53
3.2.6.	Transcomplementación de cepas mutantes en los receptores de catecolatos FepA, Cir y Fiu	55
3.2.7.	Expresión de la mceE492 en cepas mutantes en la vía de producción de enteroquelina	60
3.3.	Efecto de la dilución del cultivo de las células productoras de mceE492 sobre la actividad bactericida	64
3.3.1.	Diferentes tratamientos para eliminar células del sobrenadante de cultivos productores de mceE492 no afectan la actividad bactericida	64
3.3.2.	Efecto de la dilución en la actividad bactericida en cultivos de cepas productoras de mceE492	65
3.3.3.	Variación en el título de la actividad bactericida producido por el intercambio de sobrenadantes de cepas productoras de mceE492	68
4.	DISCUSIÓN	71
4.1.	Expresión traduccional de los genes del sistema productor de la mceE492 y la disponibilidad de hierro en el medio	71
4.2.	La mceE492 y su proceso de maduración	73
4.3.	Relación entre la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol y la producción de mceE492 activa	74

4.4.	Regulación de la actividad de la mccE492 por la producción de un inhibidor en fase estacionaria	76
4.5.	Modelo para la producción de mccE492	78
5.	CONCLUSIONES	81
6.	REFERENCIAS	82



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.	15
Tabla 2.	Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo.	16
Tabla 3.	Secuencia de los partidores empleados en esta tesis.	19
Tabla 4.	Fusiones traduccionales obtenidas entre el fago mini Mud11681 y los genes del sistema productor de la mceE492.	33
Tabla 5.	Título de la actividad bactericida de la mceE492 a partir de sobrenadantes con diferentes tratamientos.	66
Tabla 6.	Efecto de la dilución del inóculo de la cepa productora sobre la actividad bactericida de la mceE492.	67
Tabla 7.	Variación en el título producido por el cambio del sobrenadante en una cepa sobre productora de mceE492.	69





INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del sistema productor de mceE492.	3
Figura 2.	Esquema de la síntesis de enteroquelina y sus derivados mono y diglucosilados.	9
Figura 3.	Estructura de enteroquelina y derivados glucosilados.	11
Figura 4.	Representación esquemática del fago transposón MudII1681 (A) y de una fusión con el gen X (B).	21
Figura 5.	Curvas de crecimiento y expresión traduccional de la proteína de fusión MceA-LacZ.	34
Figura 6.	Curvas de crecimiento y expresión traduccional de la proteína de fusión MceB-LacZ.	35
Figura 7.	Expresión traduccional de la proteína MceG-LacZ.	37
Figura 8.	Expresión traduccional de la proteína MceH-LacZ.	38
Figura 9.	Expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ.	40
Figura 10.	Expresión traduccional de la proteína MceI-LacZ.	41
Figura 11.	Actividad β -galactosidasa en colonias de la cepa <i>E. coli</i> pop3001.6 pMUG22.	43
Figura 12.	Expresión en <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enterica</i> de plasmidios mutantes en genes del sistema productor de mceE492.	46
Figura 13.	Perfiles de elución de microcina proveniente de diferentes cepas purificada por HPLC.	48
Figura 14.	SDS-PAGE de preparaciones de mceE492 purificadas por HPLC.	49
Figura 15.	Transcomplementación de un plasmidio mutante en <i>mceC</i> expresado en <i>E. coli</i> con el cultivo y sobrenadante de <i>S. enterica</i>	51
Figura 16.	Esquema de la estrategia de clonamiento del gen <i>iroB</i> .	52
Figura 17.	Complementación y trascomplementación de la mutante en <i>mceC</i> con <i>iroB</i> .	54
Figura 18.	Espectros de absorción y emisión de salmoquelinas.	56
Figura 19.	Transcomplementación con salmoquelinas MGE y DGE.	57
Figura 20.	Ensayo de transcomplementación entre <i>S. enterica</i> LT2 y <i>E. coli</i> H1873, un triple mutante para los receptores de catecolatos.	59
Figura 21.	Esquema resumido de la síntesis de enterobactina.	61

Figura 22.	Transcomplementación de cepas de <i>E. coli</i> defectuosas en la vía de síntesis de enteroquelina.	63
Figura 23.	Esquemas de la organización genética de los sistemas productores de <i>mccE492</i> , microcina M y microcina H47 en diferentes cepas bacterianas.	77
Figura 24.	Modelo para la producción de <i>mccE492</i> activa.	80



ABREVIATURAS

A	absorbancia
Amp	ampicilina
APS	persulfato de amonio
bp	pares de bases
Cit	citrato
Cm	cloranfenicol
DGE	enteroquelina di-glucosilada
DHB	2,3-Dihidroxibenzoico
DHBS	2,3-Dihidroxibenzoilserina
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DTPA	ácido dietilenotriaminopentaacético
Glc	glucosa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosido
Kan	kanamicina
Kb	kilobases
LB	caldo Luria
MccE492	microcina E492
MGE	enteroquelina mono-glucosilada
ONPG	o-nitrofenil- β -galactósido
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sm	estreptomina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamino
Tet	tetraciclina
TFA	ácido trifluoroacético
Tricina	N-tris-(hidroximetil)-metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultra violeta
β -MeOH	beta mercaptoetanol
λ	longitud de onda

RESUMEN

Las bacteriocinas son antibióticos de naturaleza peptídica producidas por una gran variedad de bacterias Gram negativas y positivas, cuyo espectro de acción está restringido a cepas relacionadas con la productora. La microcina E492 (mccE492), es una bacteriocina producida por *Klebsiella pneumoniae* RCY492, que produce poros en la membrana interna de células sensibles y para su internalización a través de la membrana externa utiliza los receptores de sideróforos tipo catecol Cir Fiu y FepA. Para la producción de microcina activa se requiere de un sistema de exportación de tipo ABC y de los genes de maduración *mceCIJ*. Estudios previos demostraron que la transcripción de los genes de la maduración disminuye en fase estacionaria de crecimiento, y que mutantes en cualquiera de estos genes producen mccE492 en forma inactiva. En esta tesis se estudió la traducción de los genes del sistema productor de mccE492, mediante fusiones traduccionales entre estos genes y el gen reportero *lacZ*, utilizando el fago transposón MudII1681. Se determinó que la traducción del gen estructural y de la inmunidad no variaba durante el crecimiento bacteriano, en tanto que la traducción de los genes de exportación y maduración eran mayores en fase exponencial de crecimiento. Se determinó que el aumento en los niveles de traducción de estos genes en fase exponencial depende de la presencia de hierro, situación que sugiere una relación entre la actividad de esta bacteriocina y el metabolismo del hierro.

Por otra parte, se encontró que al expresar en *S. enterica* el sistema de producción de la mccE492 con una mutación en el gen de la maduración *mceC* se produce mccE492 activa, y que esta microcina presenta las mismas características cromatográficas y electroforéticas que la producida en *E. coli*. Mediante el clonamiento

del gen *iroB* de *S. enterica* en *E. coli* se determinó que este gen puede reemplazar la función de *mceC*. El gen *iroB* codifica para una glucosil transferasa implicada en la síntesis de salmoquelina, un derivado glucosilado de la enteroquelina. Para comprobar que la síntesis de salmoquelina es necesaria para la producción de microcina activa se agregó a mutantes en *mceC* salmoquelina exógena proveniente de sobrenadantes de *S. enterica* o de *E. coli* transformada con el gen *iroB*, así como también con salmoquelinas purificadas correspondientes a enteroquelina monoglucosilada (MGE) y diglucosilada (DGE). La adición de salmoquelina exógena a mutantes en *mceC* produjo microcina activa. Esta transcomplementación es dependiente de los receptores de catecolatos FepA, Fiu y Cir, pues mutantes en estos genes y *mceC* no transcomplementan con salmoquelina exógena. Además se determinó que las enzimas EntC, EntD y EntF, que participan en la vía de síntesis de enteroquelina son indispensables para la producción de mceE492 activa. Mutantes en EntC y EntD producen mceE492 activa si se adiciona en el medio de cultivo el producto de la reacción que catalizan, pero esto no ocurre en mutantes en EntF. Este resultado sugiere que la actividad de EntF estaría relacionada con la producción de mceE492 en un paso distinto de la sola producción de enteroquelina.

ABSTRACT

Bacteriocins are antibiotic peptides produced by a great variety of Gram negative and positive bacteria, whose action is restricted to strains related to the producer. Microcin E492 (*mccE492*) is a pore-forming bacteriocin produced by *Klebsiella pneumoniae* RCY492, that uses for its internalization the outer membrane catecholate siderophore receptors Cir, Fiu and FepA. The production of active microcin requires genes encoding for an ABC exporter system and for maturation (*mceCIJ*). Previous studies demonstrated that the transcription of the maturation genes diminished in stationary phase of growth and that mutants in anyone of these genes produced inactive *mccE492*. In this thesis we studied the translation of the genes present in the *mccE492* system. The transposing phage MudII1681 was used to generate translation fusions between this genes and the reporter gene *lacZ*. Through this methodology was possible to determine that the translation of the structural and immunity genes do not vary during the bacterial growth, in contrast to the translation of the export and maturation genes that are higher in the exponential phase of growth. The higher translation levels found in the exponential phase of growth depended on the presence of iron, which suggests a relationship between the activity of this bacteriocin and the iron metabolism.

On the other hand, we found that when the microcina system with a mutation in the maturation gene *mceC* was expressed in *S. enterica* active *mccE492* with the same electroforetic and chromatographic characteristics was produced. Cloning of *iroB* gene of *S. enterica* in *E. coli* replaced the function of *mceC*. *IroB* encodes for a glucosyl transferase involved in the synthesis of salmochelin, a glucosylated derivative of

enterochelin. In order to verify weather the synthesis of salmochelin is necessary for the production of active microcin, exogenous salmochelin present on supernatants of *S. enterica*, or *E. coli* transformed with the gene *iroB*, or purified salmochelins corresponding to mono-glucosyl enterochelin (MGE) and di-glucosyl enterochelin (DGE) were added to mutants in *mceC*. The addition of exogenous salmochelin to *mceC* mutants produced active microcin, and the transcomplementation depended on the catecholates receptors FepA, Fiu and Cir. Mutant in these receptors and *mceC* were unable to be transcomplemented with exogenous salmochelin. In addition it was determined that the enzymes EntC, EntD and EntF, involved in enterochelin synthesis are necessary for the production of active *mccE492*. Mutants in EntC and EntD could be complemented by the addition of the product of the reactions in the culture media, but no transcomplementation was observed in EntF mutants. This result suggests that the activity of this enzyme would be related to the production of *mccE492* in a step different of enterochelin production.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacteriocinas.

Los microorganismos producen una gran variedad de mecanismos de defensa, entre los que se cuentan los clásicos antibióticos de amplio espectro, productos metabólicos como el ácido láctico de lactobacilos, agentes líticos como lisozimas, además de numerosos tipos de exotoxinas y bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002).

Las bacteriocinas son agentes de naturaleza peptídica con actividad bactericida, cuyo espectro de acción se reduce solo a bacterias de la misma especie o de especies relacionadas a la cepa productora (Riley y Wertz, 2002). Los modos de acción bactericida de las bacteriocinas son muy variados. Por ejemplo, hay algunas que poseen actividades enzimáticas como endodesoxiribonucleasa, endoribonucleasa, otras que son inhibidoras de la síntesis de proteínas, de la DNA girasa o de la RNA polimerasa, y finalmente se encuentran las formadoras de poros, que actúan sobre la membrana plasmática de la célula sensible disipando el potencial de membrana.

Las bacteriocinas producidas por enterobacterias gram negativas han sido diferenciadas en dos grupos, las colicinas y las microcinas. Las colicinas presentan tamaños que varían entre los 25-70 KDa, están codificadas en plasmidios aislados en su mayoría de cepas de *E. coli*, y su expresión es regulada por el sistema SOS (Lazdunski, 1988; Pugsley, 1984). Las microcinas por otra parte, poseen pesos moleculares menores a 10 KDa, no son reguladas por el sistema SOS, sino que por sistemas propios de maduración y exportación. El sistema de exportación de estas microcinas permite la viabilidad de las células productoras (Baquero y Moreno, 1984; Kolter y Moreno, 1992; Braun y col, 2002), a diferencia de las colicinas que se liberan

por lisis celular. Estas microcinas además son resistentes a algunas proteasas, condiciones extremas de pH, altas temperaturas y son solubles en metanol (de Lorenzo, 1984; Baquero y Moreno, 1984).

1.2. Microcina E492.

La microcina E492 (mccE492) fue aislada de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* RCY492 (de Lorenzo, 1984). Este péptido hidrofóbico, presenta un pl de 3,8 y un peso molecular de 7886 Da (Lagos y cols., 1999) y es activo contra cepas de *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Erwinia* (de Lorenzo, 1984).

La mccE492 tiene dos particularidades que la distinguen de las demás microcinas descritas hasta ahora: una de ellas es que es producida por la cepa de *Klebsiella pneumoniae* RCY492, mientras que la mayoría son producidas por diferentes cepas de *E. coli*. La otra particularidad es que la mccE492 se produce en forma activa solo en la fase exponencial de crecimiento, en tanto que las demás son producidas en la fase estacionaria (de Lorenzo y cols., 1984).

El mecanismo de acción de esta microcina consiste en la despolarización de la membrana de las células sensibles (de Lorenzo y Pugsley, 1985), la que sería producida por la formación de canales iónicos. Este mecanismo se dedujo de experimentos *in vitro* que demostraron que la mccE492 es capaz de producir estos canales en bicapas lipídicas (Lagos y cols., 1993).

Los determinantes genéticos para la producción de mccE492 están codificados en un segmento de 13 Kb del cromosoma de *K. pneumoniae* RCY492 (figura 1), el cual fue clonado y expresado en *E. coli*. La mccE492 producida en *E. coli* presentó las mismas características bioquímicas y electrofisiológicas que la original producida desde *K. pneumoniae* (Wilkins y cols., 1997).

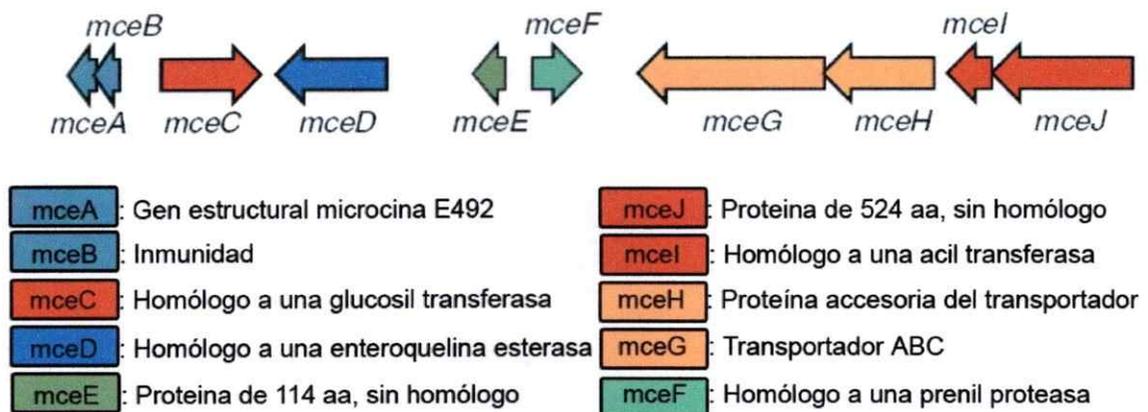


Figura 1: Esquema del sistema productor de mceE492. Se muestra con flechas la dirección de la transcripción de 10 marcos abiertos de lectura dentro del fragmento de 12559 bp, con la conformación que presentan en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* y en el plasmido pJAM229. También se indican sus funciones u homologías. En rojo se encuentran aquellos implicados en el proceso de maduración y en naranja aquellos implicados en la exportación. El gen estructural de la microcina y su inmunidad están en tonos celestes. Los genes en verde aún no tienen una función definitiva asignada. aa: aminoácidos.

En este fragmento de 13 Kb se han podido identificar mediante mutagénesis al azar con el transposón Tn5 los determinantes necesarios para la producción de *mccE492* activa (Lagos y cols., 2001). El análisis de la secuencia del DNA muestra un mínimo de 10 marcos abiertos de lectura, los cuales se esquematizan en la figura 1. Entre estos genes se encuentran algunos que al ser inactivados por mutagénesis producen microcina inactiva, a estos genes se les llamó genes de maduración (Lagos y cols., 2001). Estudios de la regulación transcripcional de estos genes revelaron que *mceIJ* no se transcriben en fase estacionaria de crecimiento, y que *mceC* disminuye su transcripción en esta fase (Corsini y cols., 2002). Este antecedente se agrega a la descripción que la *mccE492* forma fibras tipo amiloides en fase estacionaria de crecimiento y que esta forma de la microcina carece de actividad bactericida (Bieler y cols., 2005). Ambas observaciones podrían dar cuenta de la pérdida de actividad en fase estacionaria de crecimiento, sin embargo aun no se ha logrado establecer con claridad como estos dos mecanismos de inactivación se encuentran relacionados.

1.2.1. La producción de *mccE492* está relacionada con el metabolismo del hierro.

La presencia de los genes de maduración llevaron a pensar que la *mccE492* podría sufrir algún tipo de modificación post-traducciona, sin embargo el análisis por espectroscopia de masa de muestras de *mccE492* activa, no mostraron modificaciones post-traduccionales en el esqueleto polipeptídico del antibiótico (Lagos y cols., 2001; Pons y cols., 2002; Destomieux-Garzon y cols., 2003). La única diferencia que se logró identificar entre la microcina activa y aquellas producidas por mutantes en los genes de maduración fue su contenido de estructura secundaria y estado de oligomerización, determinantes en el reconocimiento de la *mccE492* a nivel de receptor, pues ambas

formas son activas sobre esferoplastos (Baeza, 2003). Esta última propiedad se encontró también en la microcina inactiva producida por cepas de *E. coli* mutantes en el sistema productor de enteroquelina (Strahsburger, 2005). Sin embargo el año 2004 Thomas y cols. describieron que bajo ciertas condiciones de cultivos una fracción de la *mccE492* se encuentra modificada de manera covalente en la serina 84 del carboxilo terminal por una molécula tipo enteroquelina glucosilada (salmoquelina), con un peso molecular de 8717 Da. La *mccE492* es secretada al medio extracelular por un transportador de tipo ABC, constituido por las proteínas MceG, MceH y la proteína de membrana externa TolC, la misma que en *E. coli* ha sido implicada en la secreción de la enteroquelina (Castillo, 2003; Bleuel y cols., 2005).

Entre los genes del sistema productor de *mccE492* (figura 1) encontramos al gene de maduración *mceC*, que presenta un 76% de identidad y un 85% con la glicosil transferasa IroB y *mceD* que presenta un 54% de identidad y un 67% de similitud con la enteroquelina esterasa IroD, ambas codificadas en el locus *iroA* del sistema productor de salmoquelina de *S. enterica*.

La *mccE492* está de alguna manera regulada por hierro, pues su actividad bactericida se ve disminuida cuando la cepa productora se crece en carencia de hierro (Orellana y Lagos, 1996). Por otro lado, el análisis de la secuencia de los promotores de los genes del sistema de producción de la *mccE492* indicó la presencia de putativas cajas Fur en los genes *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceH* y *mceI*, lo cual convertía a estos genes en buenos candidatos para una regulación Fur dependiente. Sin embargo sólo las cajas presentes en los promotores de los genes *mceE* y *mceF* resultaron ser funcionales *in vivo* (Corsini, 2005). La *mccE492* no solo se encuentra relacionada al metabolismo de la enteroquelina en su etapa de producción y exportación, sino también a nivel del reconocimiento por la célula sensible. Así, los receptores de la

mccE492 (FepA, Fiu y Cir) son los receptores de la enteroquelina férrica y sus productos de hidrólisis (Patzner y cols., 2003; Strahsburger y cols., 2005) los cuales utiliza para la translocación al periplasma de la célula sensible y desde allí usa el sistema transductor de energía TonB/ExbBD (Pugsley y cols., 1986). La enteroquelina y sus productos de hidrólisis se comportan como inhibidores competitivos de la mccE492 (Orellana y Lagos, 1996; Strahsburger y cols., 2005). Por otra parte, es mediante una interacción con la región N-terminal de TonB que la proteína de inmunidad (MceB) de la mccE492 ejerce su acción neutralizadora sobre la mccE492 (Baeza, 2003).

1.3. Metabolismo del hierro.

El abastecimiento de hierro es un problema para todos los organismos vivos debido a que el ión ferroso, que es la forma soluble, genera radicales hidroxilos tóxicos en presencia de oxígeno, y la forma oxidada o férrica se encuentra usualmente insoluble. Para solucionar este problema y llevar hierro dentro de las células, los organismos han desarrollado numerosos mecanismos de solubilización del hierro. En mamíferos, aves, peces y anfibios una proteína altamente conservada llamada transferrina es la encargada de transportar hierro extracelular hacia el interior de la célula, uniendo el hierro extracelular con una constante de afinidad de 10^{20} M (Barasch y Mori, 2004). Esta proteína del suero mantiene las concentraciones de iones férrico libre en aproximadamente 10^{-18} M, por lo que los microorganismos patógenos deben competir contra esta limitación para obtener hierro del suero o de los tejidos del huésped (Raymond y cols., 2003). Así, tanto hongos como bacterias secretan y luego recuperan un gran arsenal de moléculas ávidas de hierro, denominados sideróforos (Neilands, 1995). Un considerable número de los sideróforos descritos contienen

grupos catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos como dadores de oxígeno, los que contribuyen a la gran afinidad que estas moléculas presentan por el ión férrico (Bister y cols., 2004). Estas moléculas, que corresponden a poderosos y selectivos quelantes de hierro, son producidos y secretados en respuesta a la carencia de hierro, proceso que es regulado en muchas bacterias por la proteína reguladora Fur (ferric uptake regulation) u homólogas de ésta.

1.3.1. Transporte de hierro en enterobacterias.

En *E. coli* existen varios sistemas para la captación de hierro. Entre los sideróforos utilizados están los de tipo catecol como la enteroquelina, los de tipo hidroxamato como la aerobactina, o también la internalización de hierro puede ocurrir mediante el citrato (Crossa, 1989).

Cada uno de estos sistemas necesita de receptores específicos de membrana externa y varias otras proteínas de la membrana citoplasmática para su transporte tanto hacia el exterior, como hacia el interior de la célula. Hasta ahora se han encontrado cerca de 90 genes de *E. coli* que se encuentran regulados por Fur, de los cuales cerca de 60 corresponden a genes que codifican las vías de biosíntesis y transporte de sideróforos (Hantke, 2001). Bajo condiciones ricas en hierro, Fur se une al ión ferroso y adquiere una conformación que le permite unirse al DNA en secuencias específicas denominadas cajas Fur, inhibiendo la transcripción de aquellos genes y operones que son reprimidos por hierro (Griggs y Konisky, 1989; Baichoo y Helmann, 2002). Por el contrario, cuando este ión es escaso, el equilibrio se desplaza hacia la liberación del hierro desde el complejo con Fur, y por tanto la polimerasa tiene libre el acceso a los promotores, para expresar los genes de la biosíntesis y transporte de

sideróforos y otras funciones relacionadas con el metabolismo del hierro (Escolar y cols., 1999; Hantke, 2001).

1.3.1.1. Sideróforos de tipo catecol.

1.3.1.1.1. Enteroquelina.

El miembro más prominente dentro de los sideróforos de tipo catecol es la enteroquelina, también llamada enterobactina, que fue aislada desde *E. coli* y *S. enterica* (Pollack y Neilands, 1970; O'Brien y Gibson, 1970). Este sideróforo une hierro con una constante de afinidad extraordinariamente alta de 10^{49} M (Loomis y Raymond, 1991). La enteroquelina consiste en un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS), cuya biosíntesis puede ser dividida en dos fases. En la primera, el corismato, precursor de aminoácidos aromáticos, es convertido a isocorismato y luego a 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato y luego a 2,3-dihidroxibenzoico (DHB), reacciones que son catalizadas por las enzimas EntC, EntB y EntA (Crossa, 1989; Gehring y cols., 1997). La segunda etapa consiste en la síntesis de una molécula de enteroquelina a partir de tres moléculas de DHB y L-serina, y esta catalizada por un complejo multienzimático asociado a membrana, compuesto por los productos de los genes *entB*, *entD*, *entE* y *entF* (figura 2). Una vez sintetizada la apoenteroquelina (libre de hierro) es exportada hacia el medio extracelular por un mecanismo de dos pasos en el que participan el facilitador EntS y la proteína de membrana externa TolC (Bleuel y cols., 2005). Para su recaptación en la forma férrica la enteroquelina utiliza principalmente el receptor FepA (Pugsley y Reeves, 1977) y es translocada hacia el periplasma en un proceso dependiente de TonB-ExbB-ExbD (Higgs y cols., 2002), para luego ingresar al citoplasma por el sistema importador de membrana interna FepCDG (Ozenberger y cols., 1987).

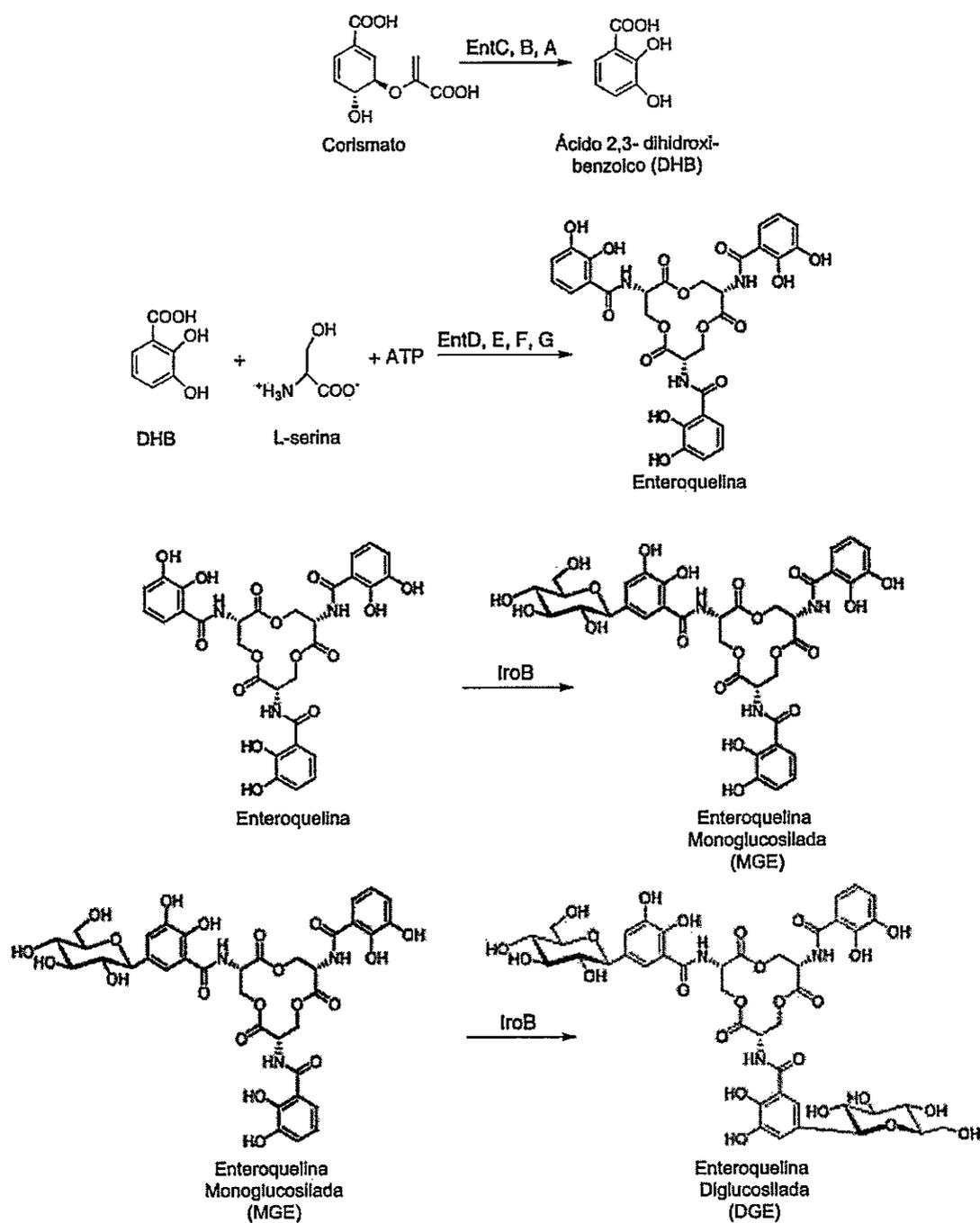


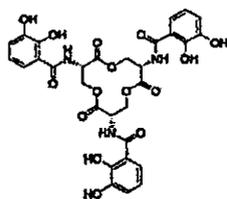
Figura 2. Esquema de la síntesis de enteroquelina y sus derivados mono y diglucosilados.

Una vez dentro de la célula es hidrolizada por la enteroquelina esterasa (Fes), liberando el hierro que es reducido inmediatamente a la forma ferrosa (O'Brien y cols., 1971). Los productos de hidrólisis de la enteroquelina son utilizados nuevamente en la importación de hierro mediada por FepA, Cir y Fiu que son receptores de membrana externa para catecolatos (Hantke, 1990).

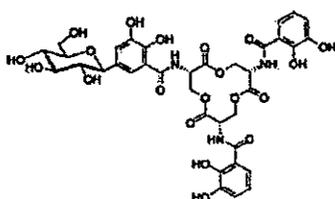
La enteroquelina es capaz de unirse a una proteína del suero llamada lipocalina 2, evento que es fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune innata del huésped contra infecciones bacterianas (Goetz y cols., 2002; Flo y cols., 2004).

1.3.1.1.2. Salmoquelinas.

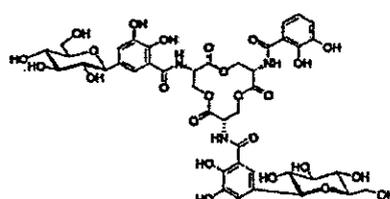
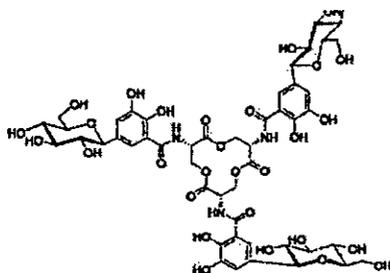
Recientemente en *S. enterica* se ha descrito que la presencia del locus *iroA*, conformado por dos operones convergentes *iroN* e *iroBCDE*, permite la glicosilación de los bloques de DHBS que constituyen la enteroquelina. Estas moléculas llamadas genéricamente salmoquelinas, son sideróforos de tipo catecol más hidrofílicos (Hantke y cols., 2003). Un resumen con las estructuras de la enteroquelina y todos sus derivados glicosilados (salmoquelinas) que han sido identificadas se muestran en la figura 3. En el año 2004 Fichbach y cols. demostraron que estas reacciones de glicosilación son catalizadas por IroB (figura 2) utilizando como sustrato la enteroquelina y UDP-glucosa como dador del grupo glicosil, formando así enteroquelina monoglicosilada (MGE), enteroquelina diglicosilada (DGE), en reacciones sucesivas. La proteína IroN, homóloga a FepA, es el receptor para la salmoquelina férrica y al igual que FepA y Cir es capaz de reconocer otros sideróforos (Hantke y cols., 2003; Rabsch y cols., 2003). IroC es una proteína de transmembrana encargada de la exportación de los apo sideróforos (Baumler y cols., 1996). IroD e IroE son estrasas (Lin y cols., 2005; Zhu y cols., 2005).



Enterocyclina



Enterocyclina Monoglucosilada (MGE)

Enterocyclina Diglucosilada (DGE)
(Salmoquelinina S4)

Enterocyclina Triglucosilada (TGE)

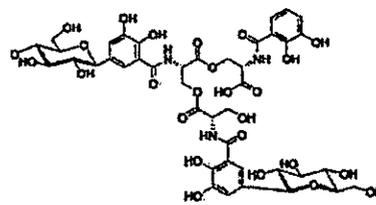
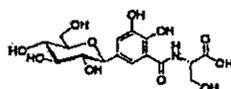
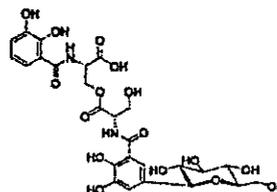
Diglucosil-(DHB-Ser)₃
(Salmoquelinina S2)Monoglucosil-DHB-Ser
(Salmoquelinina SX)Monoglucosil-(DHB-Ser)₂
(Salmoquelinina S1)

Figura 3. Estructura de enterocyclina y derivados glucosilados. Adaptado de Fischbach y cols. (2004).

El operón *iroBCDE* ha sido identificado también en islas de patogenicidad de cepas uropatógenicas y enterohemorrágicas de *E. coli* y además en un plasmidio de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* y de *Shigella dysenteriae*.

Se ha propuesto que la glucosilación de la enteroquelina la haría menos hidrofóbica, previniendo así que los sideróforos fuesen secuestrados por la albúmina del suero u otras proteínas del huésped y por la lipocalina, aumentando la virulencia de las cepas que producen salmoquelinas (Fischbach y cols., 2004; Valdebenito y cols., 2005, Fischbach y cols., 2006).

En esta Tesis se abordará el estudio de la regulación de la expresión traduccional de los genes del sistema productor de *mccE492*, y la relación de su actividad bactericida con el metabolismo del hierro en enterobacterias, específicamente desde una perspectiva genética con las vías de síntesis de sideróforos de tipo catecol.

Objetivos específicos:

- Estudiar la expresión traduccional de los genes del sistema productor de *mccE492*.
- Mediante el uso de mutantes realizar una caracterización funcional de proteínas implicadas en las vías de síntesis de sideróforos de tipo catecol y su efecto en la actividad de la *mccE492*.
- Explorar la posibilidad de la producción de un inhibidor de la actividad bactericida de algunas cepas productoras de *mccE492* como JAM434 en fase estacionaria de crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES.

2.1.1. Reactivos.

Las enzimas de restricción y T4 DNA ligasa se compraron en New England BioLabs Inc., UK.

Las enzimas *Taq* DNA polimerasa y *Pfu* polimerasa se compraron en Fermentas Inc., Hanover, M.D., USA.

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

Las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para remover las sales de los ácidos nucleicos pre-electroporación y filtros low binding con poros de 2 μ M se obtuvieron en Millipore, USA.

La acrilamida, persulfato de amonio, TEMED y cubetas de electroporación se compraron en BioRad Laboratories Inc., Hercules, C.A., USA.

El azul de bromofenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, TCA, DTPA, cloruro de calcio y carbonato ácido de sodio se compraron en Merck, Darmstadt, Alemania.

El cloruro de sodio, agar, cloruro de magnesio hexahidratado, tricloruro de hierro III, tris, glicina, glicerol, EDTA, fenol, fosfato ácido de sodio, β -MeOH, citrato de sodio, agarosa, acetato de amonio, marcadores de peso molecular para fragmentos de DNA, λ *HindIII*, escala 1Kb y escala 100 bp, se compraron en Winkler, Santiago, Chile.

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

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

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

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

Los cartuchos Sep-Pack C8 y C18 se adquirieron en Waters, USA.

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

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

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

2.1.2. Cepas Bacterianas.

En la Tabla 1 se detallan las cepas utilizadas en este estudio. La cepa de *E. coli* H1443 y la mutante triple para los receptores FepA, Cir y Fiu, además de las cepas H1885 y H5311, fueron donadas gentilmente por el laboratorio del Dr. Klaus Hantke, Universität of Tübingen, Tübingen, Alemania.

2.1.3. Plasmidios y vectores.

En la Tabla 2 se detallan los plasmidios y vectores utilizados en esta tesis.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
VCS257	DP50 <i>sup</i> F[<i>supE44</i> , <i>supF58 hsd53</i> (<i>r_B m_B</i>) <i>dapD8 lacY1 glnV44</i> , Δ (<i>gal-uvrB</i>)47 <i>tyrT58 gyrA29</i> <i>tonA53</i> Δ (<i>thyA57</i>)]	Stratagene
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	F' <i>ompT r_B m_B</i>	Novagen
POII1681	F' <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ (<i>proAB-argF-lacI</i> POZYA) XIII <i>rpsL</i> Mu dII1681 (Km ^r) <i>ara:(Mu cts) 3</i> <i>araD⁻ leu⁺ lac⁺ pro⁺</i>	Castilho y cols., 1984
MC4100	F', <i>araD139</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>rpsL</i> , <i>relA</i> , <i>thiA</i> , Mot ⁻	Casadaban, 1976
pop3001.6	MC4100 MuCts	Moreno
H1443	<i>araD139 (lac)aroB rspL relA flbB deoC</i> <i>pstF rbsR</i>	Hantke, 1990
H1876	como H1443, pero <i>cir::MudX fepA::Tn10</i> <i>fiu::MudX</i>	Hantke, 1990
H1885	<i>araD 139D(argF lac) U169 rpsL150</i> <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i> Δ <i>entDF</i>	Hantke, Tübingen
H5311	<i>araD 139D(argF lac) U169 rpsL150</i> <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i> <i>entC</i>	Hantke, Tübingen
H1941	<i>araD 139D(argF lac) U169 rpsL150</i> <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i> <i>fur</i>	Hantke, 1987
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>		
LT2	Prototrofica	Dr. Stanley Malloy

Tabla 2. Plasmidios y vectores utilizados en este trabajo.

Plasmidio	Características relevantes	Fuente o referencia
pHC79	Cosmidio de propósito general. Amp ^r Tet ^r	Hohn y Collins, 1980
pACYC184	Plasmidio de propósito general. Cm ^r Tet ^r	Chang y Cohen, 1978
pJAM229	Construido en el cosmidio pHC79 empleando el DNA cromosómico de <i>K. pneumoniae</i> RYC492 digerido con <i>Sau3A</i> , contiene los genes para la producción de <i>mccE492</i> activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
pJAM434	Derivado de pJAM229, posee un fragmento interno <i>XhoI</i> invertido con respecto a pJAM229. Es un pobre productor de <i>mccE492</i> activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
pJEM15	Derivado de pJAM229, posee la duplicación de un fragmento interno de 2,5 Kb <i>SalI</i> . Es un sobreproductor de <i>mccE492</i> activa. Amp ^r	Wilkens y cols., 1997
pBSC47	Derivado de pBluescriptSK. Lleva un fragmento <i>ClaI</i> de 3 Kb de pJAM434. Contiene los genes <i>mceABC</i> . Amp ^r	Lagos y cols., 1999
p157	Derivado de pT7-7, que contiene el gen <i>mceB</i> en un fragmento <i>EcoRI</i> de 0,3 Kb obtenido desde pBSC47. Amp ^r	Lagos y cols., 2001
p527	pJAM434 <i>mceD</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
np220	pJAM434 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
np108	pJAM434 <i>mceG</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
np133	pJAM434 <i>mceC</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
np205	pJAM434 <i>mceI</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
np221	pJAM434 <i>mceJ</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Lagos y cols., 2001
npB11	pJEM15 <i>mceA</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
npB4	pJEM15 <i>mceC</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio
npF2	pJEM15 <i>mceI</i> ::Tn5. Amp ^r Kan ^r	Colección Laboratorio

Tabla 2. Continuación.

Plasmidio	Características relevantes	Fuente o referencia
pMAH34	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>Bam</i> HI un fragmento amplificado por PCR que contiene los genes <i>mceB</i> y <i>mceA</i> con un tag de His en el extremo 3'. Cm ^r	Corsini, 2005
pT7-I	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>Eco</i> RV el gen <i>mceI</i> bajo el promotor de T7. Cm ^r	Colección Laboratorio
pT7-C	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>Eco</i> RV el gen <i>mceC</i> bajo el promotor de T7. Cm ^r	Colección Laboratorio
plroB	Derivado de pACYC184, contiene en su sitio <i>Eco</i> RV el gen <i>iroB</i> de <i>S. enterica</i> , bajo el promotor de T7. Cm ^r	Este trabajo
pMUME132	pMAH34 <i>mceA</i> ::MudII1681. Amp ^r Cm ^r	Este trabajo
pMUME12	pMAH34 <i>mceB</i> ::MudII1681. Amp ^r Cm ^r	Este trabajo
pMUG21	pJAM434 <i>mceC</i> ::MudII1681. Amp ^r Kan ^r	Este trabajo
pMUG133	pJAM434 <i>mceG</i> ::MudII1681. Amp ^r Kan ^r	Este trabajo
pMUG131	pJAM434 <i>mceH</i> ::MudII1681. Amp ^r Kan ^r	Este trabajo
pMUG43	pJAM434 <i>mceI</i> ::MudII1681. Amp ^r Kan ^r	Este trabajo
pMUG33	pJAM434 <i>mceJ</i> ::MudII1681. Amp ^r Kan ^r	Este trabajo

2.1.4. Oligonucleótidos.

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

2.2 MÉTODOS.

2.2.1. Medios de Cultivo.

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

Medio mínimo M9. Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1 g/L, suplementado con CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄*7H₂O 2 mM, citrato de sodio 0,2% p/v, tiamina 1 g/mL, casaminoácidos 1 mg/mL y glucosa 0,2% p/v.

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

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

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

Placas de césped. Sobre placas de agar se esparcieron 4 mL de agar blando fundido en el que se incluyó 150 µL de un cultivo de *E. coli* sensible a la mccE492 crecido hasta fase estacionaria.

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

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en esta tesis.

Partidor	Secuencia (5'→3')
RL1	CGG ATA AAA CAT ATG ACA TTA CTT TCA TTT GG
RL2	AAA GCA AGA ATT CAG TCC TTT TGA CTA ATT TC
C1	ATT TTC ATA TGC GTA TTC TCT TTA TTG GCC CT
C2	TTT CAG CAA GCT TAT ACA ATT ATT GCC AGA TG
D1	CTA CAA CAT ATG CCA TTT ATG AGG AAT CAT CC
D2	CAT TAC TCT GCA GTA TCT GCT CAC GAT TAC A
E1	TGA TGG GAG ACT CAT ATG AAT GGC AAC AAA
E2	GGC AGA AAG ATA CTG CTT TTT TGT TAT AGG
F1	CTT CTT GCC CAT ATG TTA TTC ATC CTC GAA
F2	TCC AGA GCG AAG CTT ATT ATG GAC TAT TGA
G1	AGG GCC GAC ATA TGA GTA ACG GGA ATG T
G2	TCC TCC AAG CTT CAC TAA AAC CTC CTT AC
H1	AGA AAA CAG ACA TAT GAA ATG GCG GGG A
H2	CGC ATA TCA AGC TGA TTT ATC ATT CGT CTG
I1	TAA GGC ATA TGA CAA TGA TGT CGC ATA TAC
I2	GGT ACA TAT CGA TTC CGG TAT TCA AAG TTC
J1	TCA GCA TAT GGT AAC GGA GAA ATA CAG T
J2	TTG TCA GGA TCC TTA TAT TTT ACA CCG CAA
Z1	CCA TTC AGG CTG CGC AAC TGT
IRO	GAG AGG ATT TCA TAT GCG TAT TCT GTT TG
IroBR	CTC CTT ATC GGG ATC CGA TGA GAT ATG GCG ACA CAC
T7pro	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

2.2.2. Técnicas Moleculares.

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

2.2.3. Producción de fusiones traduccionales entre genes del sistema de la *mccE492* y la proteína *LacZ*.

Para la producción de fusiones traduccionales entre los genes del sistema de la *mccE492* y la proteína *LacZ* se utilizó el bacteriófago mini-MudII1681 (Castilho y cols, 1984). Este fago defectuoso posee una mutación en el gen C que codifica para el represor de la transposición, porta el gen de resistencia a kanamicina proveniente del transposón Tn5 y también el operón lactosa sin las señales de inicio de la transcripción, traducción y sin los primeros codones del gen *lacZ* (figura 4). Cuando este fago está en una cepa hospedera que porta el bacteriófago helper Mu Cfs (represor termosensible que se inactiva a 42°C) se producen eventos de transposición al azar a alta frecuencia cuando se desreprime el sistema a 42°C. Cuando el fago se inserta en un gen en la orientación adecuada y en el marco de lectura correcto, se producen fusiones traduccionales entre este gen blanco y el gen reportero *lacZ*, quedando la expresión de este último bajo el control de las señales de transcripción y traducción del gen donde se inserto *lacZ*.

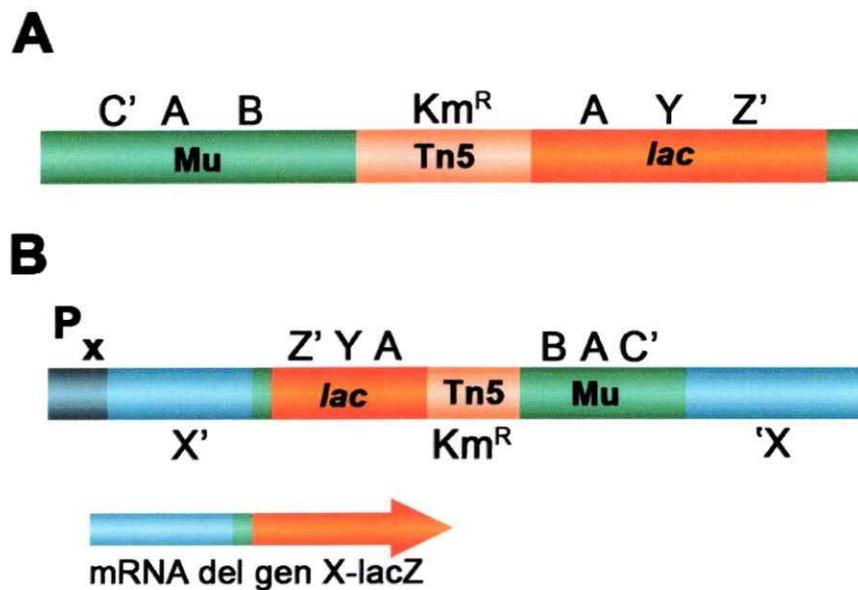


Figura 4. Representación esquemática del fago transposon MudII1681 (A) y de una fusión con el gen X (B). P_x corresponde al promotor del gen hipotético X, donde se inserto el fago mini MudII1681. Las comillas sobre los genes representan mutaciones.

2.2.3.1. Transformación de la cepa portadora de los fagos Mu helper y defectuoso.

Para obtener fusiones con los genes del sistema de la *mccE492*, se transformó mediante electroporación la cepa *E. coli* POII1681, que es portadora de los fagos Mu Cts (helper) y MudII1681 (defectivo) con el plasmidio pJAM434, el que contiene todos los genes del sistema productor de la *mccE492*, o con el pMAH34, que sólo codifica para la proteína estructural y de inmunidad de la *mccE492*.

2.2.3.2. Producción del lisado de fago MudII1681.

La cepa portadora *E. coli* POII1681, que ya ha sido transformada con el plasmidio correspondiente (ej. pJAM434), se incubó en medio LB durante toda la noche a 30°C. En un matraz de 50 mL con 10mL de medio LB se inocularon 200 µL del cultivo creciendo durante la noche, éste se incubó a 30°C con agitación media (150 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 0,2 (10^8 cel/mL). Luego se traspasó a un baño a 42-44°C, sin agitación durante 30 min, después de los cuales el cultivo se incubó a 37°C con agitación fuerte (250 rpm) durante 1,5 h. En este punto se añadieron 100 µL de $CHCl_3$ y se continuó la incubación por otros 10 min. El cultivo ya lisado se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C, para eliminar los restos celulares. Se colectó cuidadosamente el sobrenadante que contiene una suspensión del fago MudII1681-plasmidio, se adicionó unas gotas de $CHCl_3$ y se almacenó a 4°C.

2.2.3.3. Infección y selección de células con inserción.

La cepa receptora pop3001.6 se creció hasta el inicio de la fase estacionaria en medio líquido LB. Se mezclaron 100 µL de este cultivo con otros 100 µL del lisado de fago MudII1681-plasmidio sin diluir, añadiendo luego 5 µL de $MgSO_4$ 0,1 M y 4 µL de

CaCl₂ 50 mM. Esta mezcla se incubó a 30°C sin agitación durante 30 min, después de los cuales se les agregó 800 µL de medio LB fresco y se incubó a 30°C con agitación durante 2 h, plaqueándose después alícuotas en medio selectivo suplementado con X-gal, las que se incubaron a 30°C por 12 h.

2.2.3.4. Mapeo y secuenciación de las fusiones traduccionales.

Las colonias obtenidas en las etapas anteriores se analizaron para identificar el lugar de la inserción. Para esto se realizó la extracción del DNA plasmidial, el que luego fue sometido a análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, para identificar el fragmento de DNA donde se produjo la inserción. Para identificar específicamente el gen en el cual ocurrió la inserción se utilizó PCR, empleando un partidor antisentido que hibrida con el gen *lacZ* del fago transposón y partidores sentido que son complementarios a la región 5' de los genes del sistema productor de *mccE492*. Finalmente algunos clones representativos se secuenciaron, para posteriormente trabajar con ellos.

2.2.3.5. Detección de la actividad β-galactosidasa de las fusiones traduccionales en medios con y sin DTPA.

La determinación cuantitativa de la expresión de las proteínas fusionadas, resultante de la inserción del gen *lacZ* en alguno de los genes del sistema productor de la *mccE492* se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Miller (1992), que se basa en la hidrólisis del compuesto incoloro ONPG (o-nitrofenol-β-galactósido) llevada a cabo por la enzima β-galactosidasa. La hidrólisis da como uno de los productos el o-nitrofenol, compuesto de color amarillo, cuya concentración en una solución es posible determinar midiendo la absorbancia de la muestra a 420 nm. Esta

concentración es proporcional a la cantidad de enzima presente en la reacción, siempre que el sustrato no se encuentre en condiciones limitantes.

Las cepas portadoras de fusiones a las cuales se les deseaba cuantificar la expresión traduccional durante las etapas de crecimiento bacteriano, se incubaron en medio M9 durante toda la noche. Luego se hicieron diluciones 1/20 en el mismo medio de cultivo, con una concentración final de DTPA de 5 μ M para el caso de los medios pobres en hierro. Se prosiguió con la incubación a 30°C, tomando alícuotas a distintos tiempos (usualmente 1mL, cada una hora, durante 10 a 12 h). 500 μ L de las alícuotas se destinaron a la medición de la DO a 600 nm, para la construcción de las curvas de crecimiento de los cultivos y los 500 μ L restantes se mezclaron en tubos de reacción con 500 μ L de amortiguador Z (16,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 5,5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g de KCl; 0,246 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 2,7 mL de β -MeOH; llevados a un volumen final de 200 mL con agua nano pura). Se añadieron 20 μ L de CHCl_3 y 20 μ L de SDS 0,1% y se agitaron en vortex por 10 s. Las mezclas se incubaron a 28°C por 5 min y a continuación se agregaron 0,2 mL de sustrato (ONPG 4 mg/mL) para iniciar la reacción. Se incubó hasta la aparición de color amarillo y luego se detuvo la reacción con 0,5 mL de Na_2CO_3 1M. Se registró el tiempo transcurrido desde la adición del sustrato hasta la adición del Na_2CO_3 . Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 420 y 550 nm, donde se utilizó como blanco: 1mL de amortiguador Z, 0,2 mL de ONPG y 0,5 mL de Na_2CO_3 .

La actividad β -galactosidasa se expresó en unidades arbitrarias Miller, las que se determinaron como actividad específica utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{(\text{DO}_{420} - 1,75 * \text{DO}_{550}) * 1000}{\text{DO}_{600} * V * t}$$

Donde: DO_{600} representa la densidad óptica del cultivo a 600 nm, V el volumen de cultivo utilizado en la reacción, t el tiempo transcurrido en la reacción y DO_{420} y DO_{550} la absorbancia de la mezcla a 420 y 550 nm respectivamente, para corregir la actividad por la cantidad de células empleadas.

2.2.4. Purificación de mceE492.

La purificación de la mceE492, tanto en su forma activa como inactiva, se realizó creciendo las cepas productoras en medio M9, para luego seguir uno o más de los protocolos que se describen a continuación.

2.2.4.1. Purificación de mceE492.

Medio litro de medio de cultivo se inoculó con 5-500 μ L de un cultivo crecido toda la noche y se incubó a 37°C a una agitación constante de 220 rpm durante 20 h y posteriormente se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante, sometido a una presión negativa, se pasó por una columna de extracción en fase sólida Sep Pack C8 (Waters), activada previamente con 5 mL de acetonitrilo 40%-TFA 0,1% y 5 mL de agua nano pura-TFA 0,1%, se lavó con 5 mL de acetonitrilo 30%-TFA 0,1% y la microcina se eluyó con 5 mL de acetonitrilo 40%-TFA 0,1%.

2.2.4.2. Purificación de la mceE492 por cromatografía líquida de alta resolución.

3 mL de la microcina purificada, según el método anterior (2.2.4.2), fueron evaporados al vacío a 60°C hasta la sequedad (Labconco Centrivap Console) y posteriormente se suspendieron en 100 μ L de acetonitrilo 39%-TFA 0,1%. Dos muestras iguales así obtenidas se juntaron para hacer un volumen final de 200 μ L.

Estos se inyectaron en un sistema de columna C18 en fase reversa. La purificación mediante HPLC (Beckman System Gold) se llevó a cabo isocráticamente con acetonitrilo 39% - TFA 0,1%, a un flujo de 0,5 mL/min durante 30 min. Se colectaron las fracciones cada 0,5 min siguiendo la absorbancia a 215 nm.

2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la mceE492.

2.2.5.1. Marcación de la mceE492 con fluorescamina.

Se empleó el método para la marcación de péptidos descrito por Rangland y cols. (1974). Para ello se concentraron por evaporación al vacío a 60 °C (Labconco Centrivap Console) 300 µL de un eluido de la columna de extracción en fase sólida (Sep Pack C8) hasta un volumen de 10 µL, en el caso de muestras purificadas por HPLC se tomaron 10 µL sin diluir. Cuando se trataba de muestras eluidas en acetonitrilo-TFA, se les agregó una gota de NaOH para neutralizar el TFA. Se le agregó 4 µL de solución borato (0,4 M pH 9), 8 µL de fluorescamina (una 'punta de espátula' disuelta en 1 mL de DMSO) y 7 µL de amortiguador de carga 4X (glicerol a 40%; Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10 %; β-MeOH 20%; azul de bromofenol 0,04% (p/v)). La mezcla se calentó a baño maría por 3 min y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Las bandas de proteína se visualizaron en un transiluminador UV e inmediatamente se fotografió el gel.

2.2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

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

concentrador contenía 3% de acrilamida (3% de entrecruzamiento), Tris-HCl 1 M pH 8,5; SDS 0,1%. A cada una de estas soluciones se les agregó 0,033% de APS y 2,2 mM de TEMED. Para estos geles la solución de corrida para el cátodo fué Tris-HCl 0,1M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% y para el ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9.

2.2.6. Detección y cuantificación de la actividad bactericida de la mceE492.

2.2.6.1. Detección de la actividad bactericida.

La detección de la actividad bactericida se realizó depositando sobre una placa de césped (2.2.1.) una alícuota de 3 μ L proveniente de las muestras que se deseaban analizar. Luego de incubar las placas a 37°C durante 12-14 h, la actividad bactericida se visualizó como la aparición de halos de inhibición de crecimiento sobre el césped de la cepa sensible.

2.2.6.2. Cuantificación de actividad bactericida o determinación del título.

Para la cuantificación de la actividad bactericida de la mceE492 se realizaron diluciones seriadas en agua nanopura estéril de las muestras, pudiendo ser estas diluciones en base 2 o en base 10. Se tomaron alícuotas de 3 μ L de cada tubo de la dilución seriada y se pusieron sobre placas de césped sensible. Se incubó a 37°C durante 12-14 h, y el título de la muestra se determinó como la dilución del último tubo cuya alícuota es capaz de producir un halo de inhibición de crecimiento en la placa de césped sensible.

2.2.6.3. Tratamiento de sobrenadantes para la determinación o cuantificación de la actividad bactericida.

También se determinó y cuantificó la actividad bactericida de la mceE492 desde los sobrenadantes de cultivos de cepas productoras. Para esto se trataron los sobrenadantes con diferentes métodos para la eliminación de las células viables que interfirieran con la determinación.

2.2.6.3.1. Tratamiento con cloroformo.

El cultivo a ensayar se centrifugó por 10 min a 7000 rpm, se tomaron 600 μ L del sobrenadante y se agregaron 30 μ L de cloroformo, se agitó con vortex por 10 s y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se utilizó la fase superior para la detección de la actividad bactericida o la determinación del título.

2.2.6.3.2. Tratamiento por filtración.

De manera alternativa se filtraron los cultivos a ensayar, con filtros de baja afinidad (low bindig) Millipore con un tamaño de poro de 0,2 μ m.

2.2.6.3.3. Tratamiento por calentamiento.

Otro método que se utilizó fue centrifugar 10 min a 7000 rpm los cultivos, y el sobrenadante se calentó a 95°C durante 15 min, previo a ser utilizado para ensayar la actividad bactericida.

2.2.7. Reemplazo de sobrenadantes.

A partir de cultivos crecidos durante toda la noche en 4 mL de medio M9 suplementado con glucosa y citrato, se inocularon matraces con 500 mL del mismo

medio, con diluciones desde 1:10 hasta 1:100 000 de los cultivos correspondientes. Se dejaron incubando por 20 h a 37°C y 220 rpm. Se tomaron 50 mL de cada cultivo y se centrifugaron durante 10 min a 7000 rpm. Se separó el precipitado de células del sobrenadante, y el sobrenadante fue esterilizado mediante filtros low binding (Millipore). Se procedió a poner sobre el precipitado de células el sobrenadante de otro cultivo o medio fresco, según fuese el caso. Una vez realizados los intercambios, se resuspendieron las células y los tubos se dejaron incubar en las mismas condiciones de crecimiento durante 4 h, luego de las cuales se determinó el título de la actividad bactericida en los sobrenadantes.

2.2.8. Transcomplementaciones.

Se co-cultivaron sobre placas de césped sensible cultivos de cepas no productoras o productoras de mceE492 inactiva, así como también los sobrenadantes tratados de éstas, poniendo una gota (3 μ L) sobre otra de las muestras a ensayar. También se utilizaron sobre las cepas productoras de microcina inactiva compuestos de tipo catecolatos purificados, directamente sobre la alícuota de cultivo o suministrados como suplemento del medio de cultivo. Luego de incubar las placas a 37°C durante 12-14 h, se evaluó como cepas transcomplementables a aquellas que en co-cultivo o suplementadas eran capaces de producir halos de inhibición de crecimiento sobre el césped sensible.

3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN TRADUCCIONAL.

La *mccE492*, a diferencia de la mayoría de las microcinas descritas en *E. coli*, es producida en forma activa principalmente en la fase exponencial de crecimiento (de Lorenzo y cols., 1984). Estudios a nivel transcripcional revelaron que la proteína estructural de la *mccE492* y la proteína de inmunidad están organizadas en un operón bicistrónico que se transcribe tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. De las otras 6 unidades transcripcionales que conforman el sistema productor de *mccE492*, solo la formada por los genes de maduración *mceIJ* disminuye la transcripción en fase estacionaria de crecimiento (Corsini, 2005). Es posible aislar microcina desde cultivos de una cepa productora de *mccE492* en fase estacionaria, sin embargo ésta es inactiva, al igual que la purificada desde la mutantes en los genes de maduración *mceCIJ* en cualquier etapa de crecimiento (Lagos y cols., 2001).

La actividad de la *mccE492* es afectada por la presencia de hierro en el medio de cultivo utilizado para crecer la cepa productora. En un medio con hierro se obtiene mayor actividad bactericida y en un medio con DTPA (fuerte quelante de hierro) la actividad disminuye sin disminuir la cantidad de proteína producida (Orellana y Lagos, 1996).

Con los antecedentes anteriores se decidió estudiar la regulación de la actividad de la *mccE492*, mediante el análisis la expresión traduccional de los genes implicados en la producción de *mccE492* activa en diferentes etapas del crecimiento bacteriano. En algunos casos se utilizó medios con DTPA, para evaluar si la carencia de hierro tiene un efecto directo sobre la expresión de alguno de los genes estudiados.

3.1.1. Construcción de fusiones traduccionales.

Para estudiar la expresión traduccional de los genes involucrados en la producción de *mccE492* se realizaron fusiones al azar con el gen reportero *lacZ* empleando el fago transposón mini MudII1681 (Castilho y cols., 1984). Este fago porta en su genoma el gen de resistencia a kanamicina de Tn5 y el operón lactosa sin sus señales de inicio de la transcripción, ni traducción y sin los primeros codones del gen *lacZ*. Cuando este fago transposón se inserta en un gen, para que se produzca una proteína de fusión con actividad β -galactosidasa es necesario que esta inserción ocurra en el mismo sentido de transcripción del gen blanco y en la fase apropiada del marco de lectura para su correcta traducción (figura 4). La técnica descrita por Castillo y cols. (1984) consiste en la utilización de una cepa de *E. coli* POII1681 que porta en su cromosoma los fagos MudII1681 (defectivo) y Mu Cts (helper), que en este caso fue transformada con los plásmidos pJAM434 o pMAH34. Estas cepas se crecieron a una temperatura permisiva (30°C) para luego inducir una alta tasa de transposición del fago MudII1681 hacia el plásmido a 42°C. Con los lisados de estas cepas se infectó una cepa receptora pop3001.6 (*recA*⁻). La selección de los plásmidos portadores de una inserción se llevó a cabo creciendo las cepas infectadas en placas suplementadas con los antibióticos correspondientes y X-gal. Las colonias azules obtenidas (que llevan una fusión) fueron crecidas en el mismo medio varias veces para asegurar la estabilidad de la inserción y posteriormente fueron almacenadas a -80°C. Se obtuvieron un total de 289 muductantes en el plásmido pJAM434 y 35 para pMAH34. Para localizar el lugar de la inserción del fago en las diferentes muductantes se aisló DNA plasmidial y se mapeó el segmento de DNA en el cual se encontraba el fago mini MudII1681 con la enzima de restricción *EcoRI*, que posee un patrón conocido de corte en los plásmidos empleados y ningún sitio de corte dentro del genoma del fago.

Posteriormente se empleó la técnica de PCR para identificar el gen en el cual de había producido la inserción, utilizando partidores específicos para la región 3' de cada uno de los genes del sistema productor de *mccE492* y un partidador antisentido que hibrida con el gen *lacZ* del fago. De esta manera se lograron obtener e identificar fusiones del fago mini MudII1681 en los genes *mceA*, *mceB*, *mceC*, *mceG*, *mceH*, *mceI* y *mecJ*, que se detallan en la tabla 4. De estas se escogieron algunas representativas y se secuenciaron.

3.1.2. Expresión traduccional de la *mccE492* y de la proteína de la inmunidad.

Para el estudio de la expresión traduccional de la proteína estructural de la *mccE492* se utilizó la construcción pMUME132, en la cual la fusión con la β -galactosidasa se produjo en el aminoácido 73 de la proteína MceA. En el caso de la proteína de inmunidad se utilizó la construcción pMUME12, en la cual la fusión ocurrió en el aminoácido 57 de MceB. En las figuras 5 y 6, se observa que las cinéticas de crecimiento para las cepas *E. coli* pop3001.6 pMUME132 y *E. coli* pop3001.6 pMUME12 son muy similares, llegando ambas a fase estacionaria de crecimiento aproximadamente a los 400 min después de la inoculación.

Los perfiles de actividad β -galactosidasa en ambas fusiones presentan la misma forma, aumentando durante la primera parte de la fase exponencial de crecimiento hasta llegar a su máximo, decayendo luego para mantenerse en niveles bajos durante la fase estacionaria. Sin embargo los niveles de actividad, expresada en unidades Miller, que alcanza cada fusión son levemente diferentes, a pesar de provenir ambas del mismo RNA mensajero.

Tabla 4. Fusiones traduccionales obtenidas entre el fago mini MudII1681 y los genes del sistema productor de la mceE492.

Gen	Plasmidio	Proteína de Fusión	Aminoácido de inserción	Nombre construcción
<i>mceA</i>	pMAH34	MecA-LacZ	73	pMUME132 ^a
<i>mceB</i>	pMAH34	MecB-LacZ	57	pMUME12 ^a
<i>mceC</i>	pJAM434	MecC-LacZ	26	pMUG21 ^a
<i>mceG</i>	pJAM434	MecG-LacZ	411	pMUG13 pMUG14 pMUG24 pMUG41 pMUG128 pMUG133 ^a pMUG195
<i>mceH</i>	pJAM434	MecH-LacZ	393	pMUG12 pMUG131 ^a
<i>mceI</i>	pJAM434	MecI-LacZ	108	pMUG43 ^a pMUG132
<i>mceJ</i>	pJAM434	MecJ-LacZ	301	pMUG22

(^a) corresponden a las construcciones utilizadas en las curvas de crecimiento y actividad β -galactosidasa que se muestran en esta tesis.

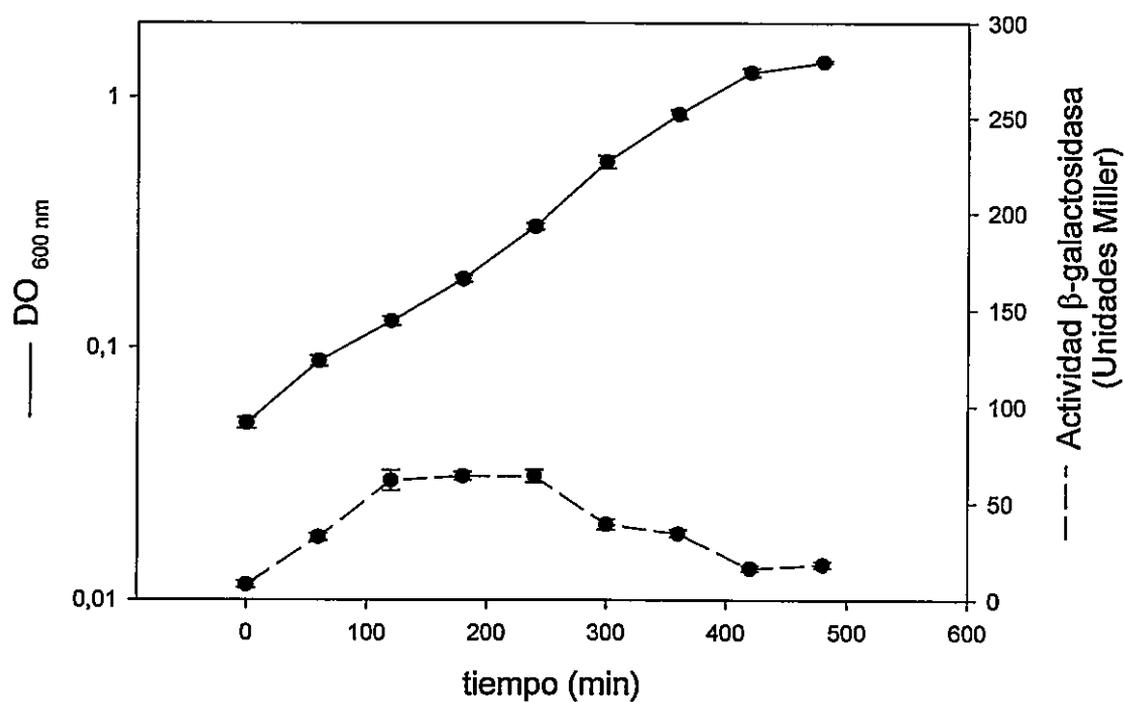


Figura 5. Curvas de crecimiento y expresión traduccional de la proteína de fusión MceA-LacZ. La línea continua representa la curva de crecimiento de la cepa *E. coli* pop3001.6 pMUME132 en medio M9 suplementado con Glc y Cit. La línea discontinua corresponde a la curva de actividad β-galactosidasa de la proteína de fusión MceA-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

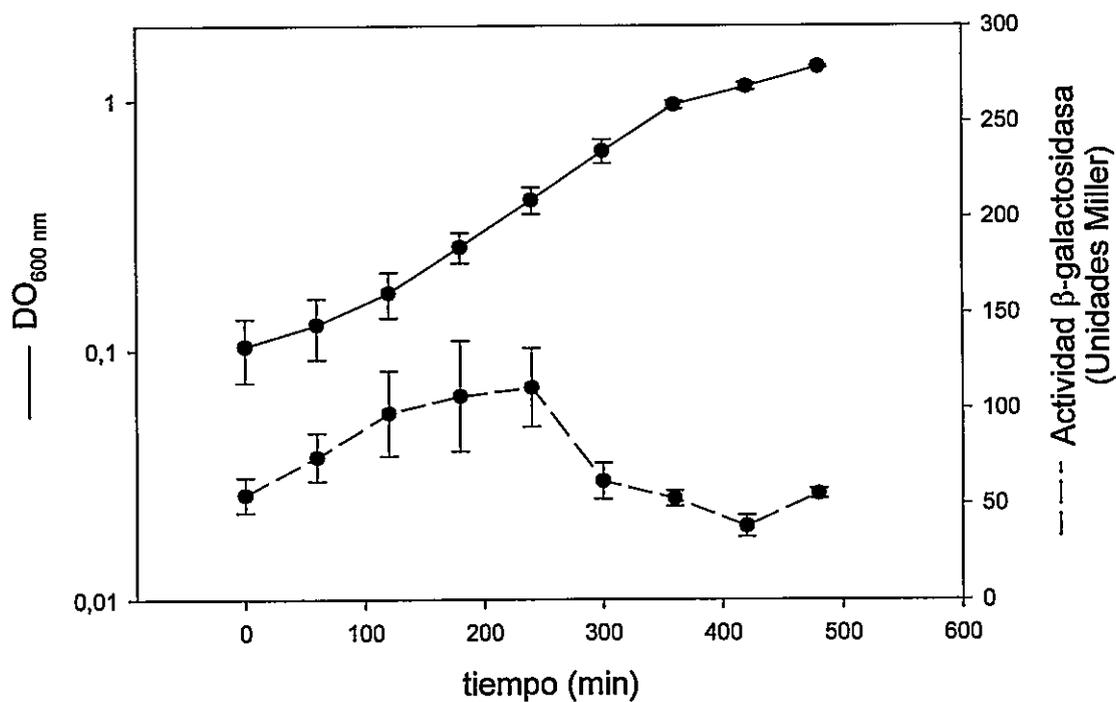


Figura 6. Curvas de crecimiento y expresión traduccional de la proteína de fusión MceB-LacZ. La línea continua representa la curva de crecimiento de la cepa *E. coli* pop3001.6 pMUME12 en medio M9 suplementado con Glc y Cit. La línea discontinua corresponde a la curva de actividad β-galactosidasa de la proteína de fusión MceB-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

En el caso de MceA-LacZ los niveles de actividad β -galactosidasa fluctúan entre 15 y 50 unidades Miller, en tanto que para MceB-LacZ los valores van desde 40 a 100 unidades Miller.

3.1.3. Expresión traduccional de las proteínas MceG y MceH implicadas en la exportación de la mceE492 a partir de células crecidas en medio con y sin DTPA.

Para estudiar la expresión traduccional de la proteína correspondiente al exportador de tipo ABC (MceG), se utilizó la construcción pMUG133. La cepa de *E. coli* pop3001.6 pMUG133 crecida en medio con 5 μ M DTPA presentó niveles de crecimiento más bajos que en el medio con hierro (figura 7). Para comparar la actividad β -galactosidasa en ambas construcciones los valores están corregidos número de células. La proteína de fusión MceG-LacZ presentó una muy baja expresión durante la primera fase del crecimiento bacteriano, con valores cercanos a la unidad, tanto en medio sin DTPA, como con 5 μ M DTPA. En el minuto 300 ambas curvas se separan, produciéndose un discreto aumento de la actividad β -galactosidasa en el medio con hierro, alcanzando su máximo a los 480 min con una actividad de 5,3 unidades Miller, para luego ir disminuyendo hasta a los valores basales de expresión cercanos a la unidad (660 min), los cuales se mantienen en la fase exponencial tardía.

Para el estudio de la proteína accesoria MceH del exportador ABC, se utilizó la construcción pMUG131. La proteína de fusión MceH-LacZ (figura 8), presentó un perfil de actividad β -galactosidasa muy similar en medio sin DTPA y con 5 μ M DTPA, hasta el minuto 470, donde ambas curvas se separan. La curva de actividad en el medio con 5 μ M DTPA se mantiene relativamente constante en todas las etapas del crecimiento bacteriano, con valores cercanos a las 20 unidades Miller. La curva obtenida en el medio sin DTPA se produce un aumento de la actividad β -galactosidasa, llegando a un

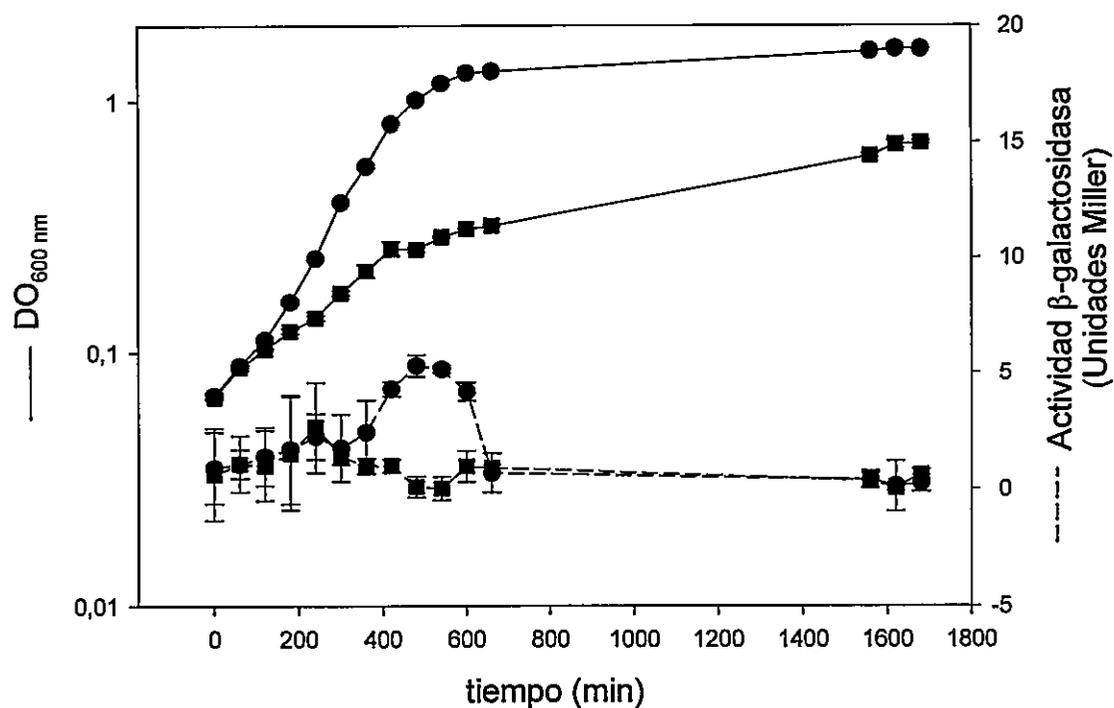


Figura 7. Expresión traduccional de la proteína MceG-LacZ. La cepa de *E. coli* pop3001.6 pMUG133 fue crecida en medio M9 Glc Cit sin DTPA (●) o con 5 μM DTPA (■). Las líneas continuas representan las curvas de crecimiento de esta cepa y las líneas discontinuas la actividad β -galactosidasa de la proteína de fusión MceG-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

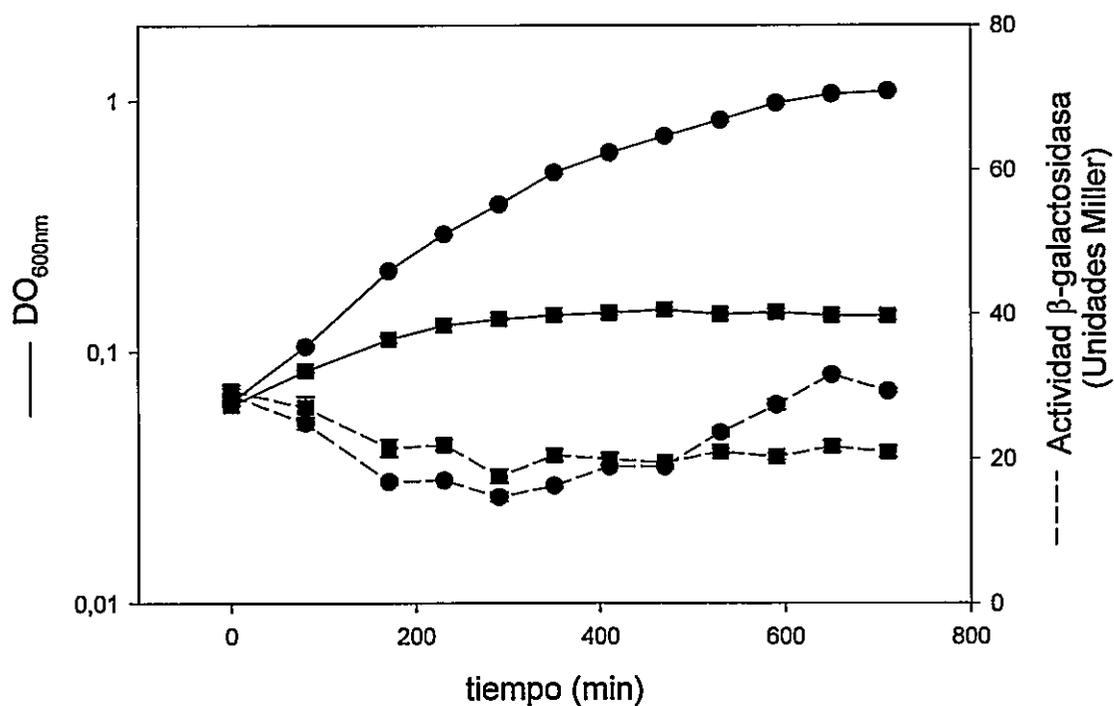


Figura 8. Expresión traduccional de la proteína MceH-LacZ. La cepa de *E. coli* pop3001.6 pMUG131 fue crecida en medio M9 Glc Cit sin DTPA (●) o 5 μM DTPA (■). Las líneas continuas representan las curvas de crecimiento de esta cepa y las líneas discontinuas la actividad β-galactosidasa de la proteína de fusión MceH-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

máximo de 32 unidades Miller al minuto 650, y la diferencia entre los dos alcanza las 10 unidades Miller.

3.1.4. Expresión traduccional de las proteínas MceC, MceI y MceJ implicadas en la maduración de la *mccE492*.

Para el estudio de la expresión traduccional del gen *mceC*, se utilizó la construcción pMUG21, en la cual la fusión se produjo en el aminoácido 26 de la proteína MceC. La actividad β -galactosidasa que presentó la proteína de fusión MceC-LacZ (figura 9), fue relativamente constante a lo largo del crecimiento bacteriano. La actividad que presentan células crecidas en medios pobres en hierro (5 y 12 μ M DTPA) fue en promedio 160 unidades Miller, en tanto que en medio con hierro se observó un aumento de la actividad β -galactosidasa en la fase exponencial de crecimiento que alcanzó un máximo a los 360 minutos con 191 unidades Miller. Hubo una diferencia de aproximadamente 115 unidades Miller con respecto a las condiciones pobres en hierro.

Para el estudio de la proteína MceI, se utilizó la construcción pMUG43, en la cual la fusión se produjo en el aminoácido 108. El perfil de actividad para esta fusión (figura 10) presentó un marcado pico de actividad β -galactosidasa durante la fase exponencial de crecimiento, para luego disminuir nuevamente en la fase estacionaria. Este aumento en la actividad, alcanzó un máximo cercano a las 50 unidades Miller y no se observó cuando la cepa *E. coli* pop3001.6 pMUG43 se creció en medio pobre en hierro (5 μ M DTPA), donde el aumento de la expresión en fase exponencial alcanzó solo las 19 unidades Miller, valor cercano a los niveles basales de expresión de esta fusión

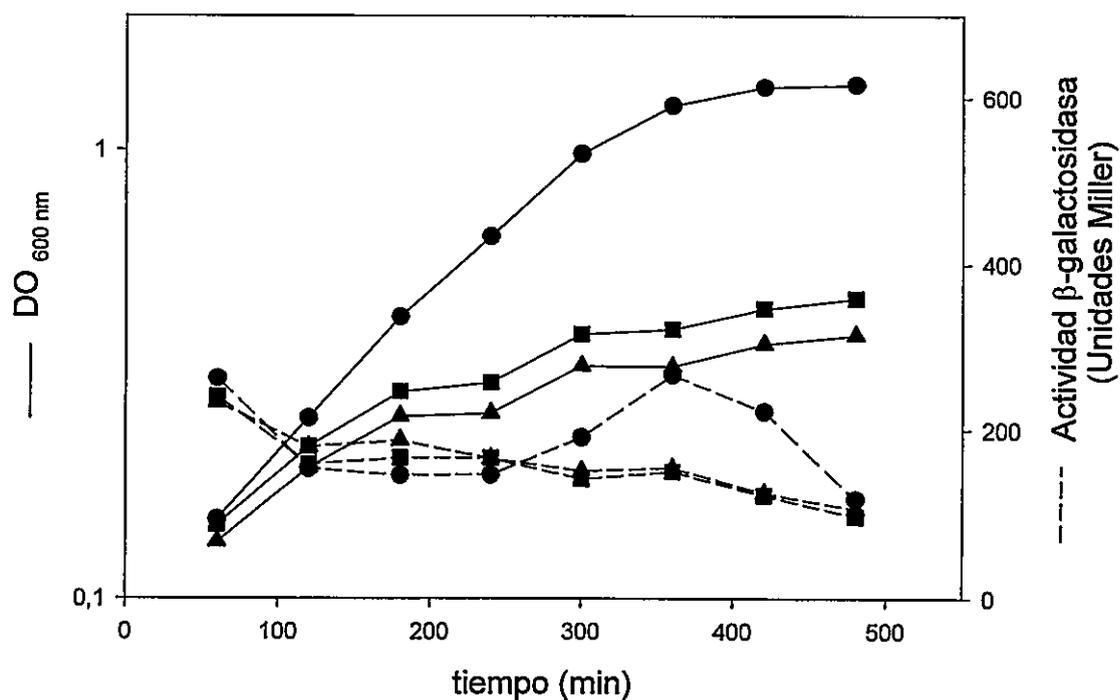


Figura 9. Expresión traduccional de la proteína MceC-LacZ. La cepa de *E. coli* pop3001.6 pMUG21 fue crecida en medio M9 Glc y Cit sin DTPA (●) o 5 μM DTPA (■) o 12 μM DTPA (▲). Las líneas continuas representan las curvas de crecimiento de esta cepa y las líneas discontinuas la actividad β-galactosidasa de la proteína de fusión MceC-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

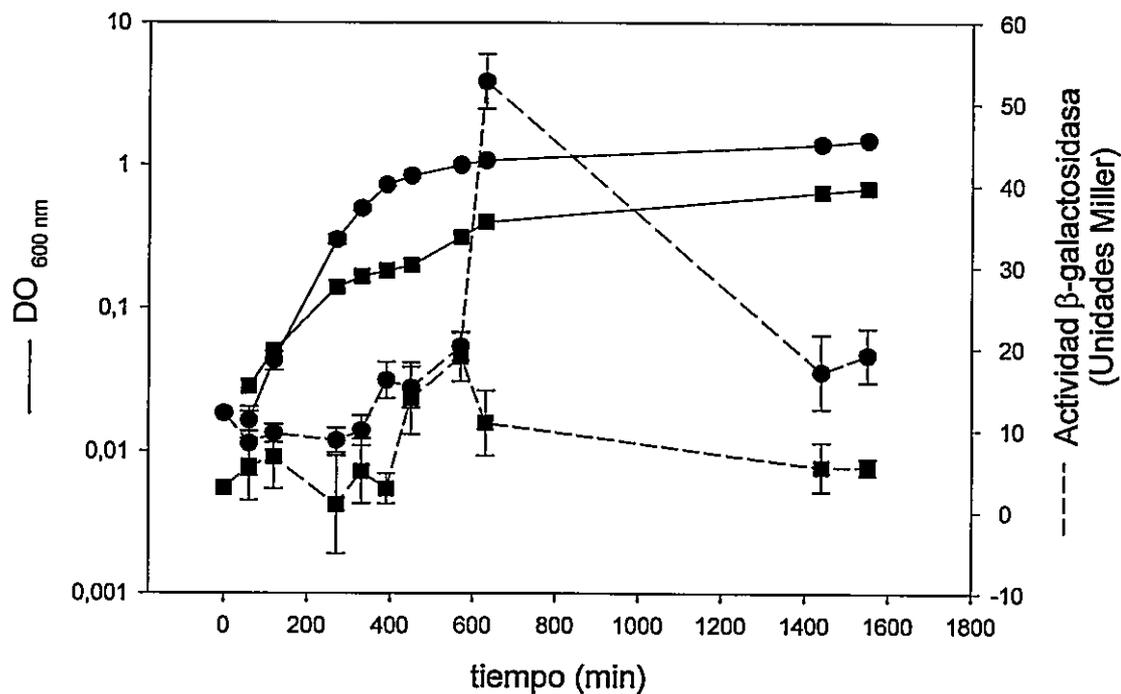


Figura 10. Expresión traduccional de la proteína MceL-LacZ. La cepa de *E. coli* pop3001.6 pMUG43 fue crecida en medio M9 Glc Cit sin DTPA (●) o 5 μM DTPA (■). Las líneas continuas representan las curvas de crecimiento de esta cepa y las líneas discontinuas la actividad β-galactosidasa de la proteína de fusión MceC-LacZ. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres determinaciones.

Se logró obtener e identificar solo una construcción para una fusión MceJ-LacZ (tabla 4). A pesar de haber obtenido una inserción del fago MudII1681 en el gen *mceJ* (pMUG22) y de que la cepa que expresa esta fusión presenta una curva de crecimiento normal, no fue posible medir la actividad β -galactosidasa de esta fusión con el método descrito por Miller (1992) ya que los valores de actividad obtenidos fueron muy bajos. En la figura 11 se observa en una placa de medio M9 suplementado con X-gal las colonias de *E. coli* pop3001.6 pMUG22 crecidas durante 48 h a 30°C (temperatura restrictiva para la transposición).

Las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas MceC, G, H, I del sistema productor de la *mccE492* en medio con hierro y medio pobre en hierro, sugiere una regulación del sistema por este metal. Sin embargo, este efecto no se encuentra relacionado al regulador Fur y cajas Fur (Corsini, 2005), lo cual lleva a pensar que esta regulación se está produciendo de manera indirecta sobre la expresión de estas proteínas o por un mecanismo diferente al controlado por el represor Fur.

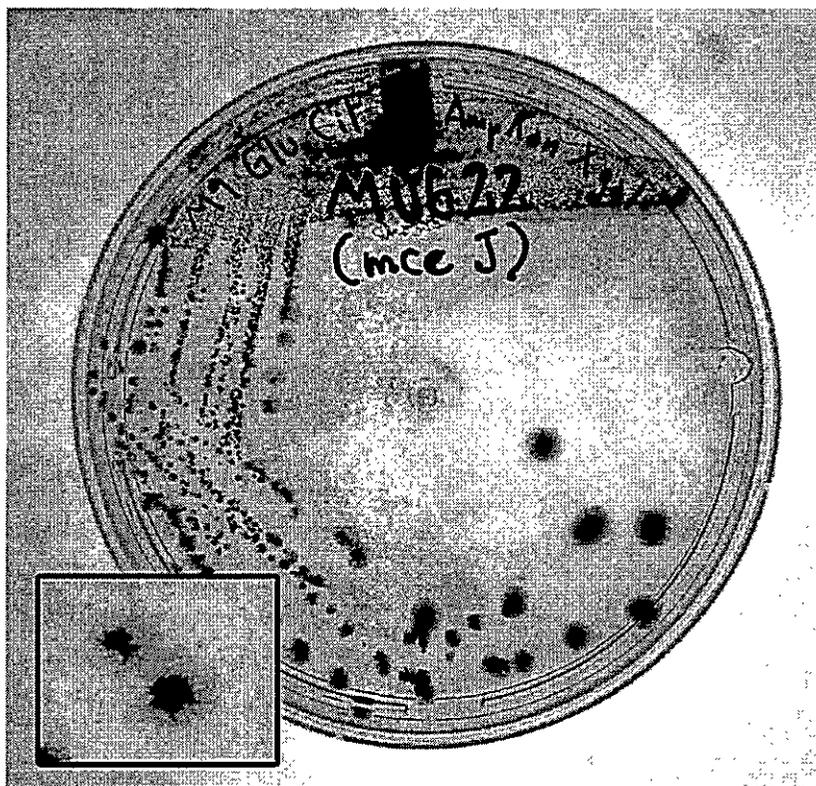


Figura 11. Actividad β -galactosidasa en colonias de la cepa *E. coli* pop3001.6 pMUG22. La cepa *E. coli* pop3001.6 pMUG22 fue sembrada en placas de M9 suplementadas con Amp, Kan y X-gal, y se incubó durante 48 h a 30°C. La imagen corresponde a la fotografía en blanco y negro de una placa. El recuadro muestra el aumento de dos colonias presentes en la placa.

3.2. RELACIÓN ENTRE LAS VÍAS DE SÍNTESIS DE SIDERÓFOROS DE TIPO CATECOL Y LA PRODUCCIÓN DE MCC492 ACTIVA.

La relación entre el metabolismo del hierro en enterobacterias y el sistema productor de *mccE492* se ha encontrado en varios niveles. Uno de ellos es la regulación de la expresión génica por hierro, pues si bien sólo los genes *mceEF* poseen cajas reguladoras Fur funcionales (Corsini, 2005), la expresión de otros genes del sistema productor de *mccE492*, como se ha visto en esta Tesis, también están modulados por los niveles de hierro presentes en el medio de cultivo.

A nivel de la producción de *mccE492* activa se ha encontrado que *mceC*, uno de los genes de la maduración, es homólogo a la glucosil transferasa *IroB* responsable de la glucosilación de moléculas de enterobactina en la vía de síntesis de salmoquelinas. Como se mencionó en la introducción, en determinadas condiciones de crecimiento una fracción de la *mccE492* se encuentra modificada por una molécula de tipo salmoquelina (Thomas y cols., 2004). Esta bacteriocina utiliza para su exportación a través de la membrana externa la proteína *TolC*, que también es utilizada por las moléculas de enteroquelina para el mismo proceso (Bleuel y cols., 2005) y en la internalización a las células blanco los receptores de membrana externa para sideróforos de tipo catecol *FepA*, *Fiu* y *Cir* (Patzner y cols., 2003; Strahsburger, 2005).

Tomando en cuenta estos antecedentes se decidió explorar la relación que existe entre el sistema de producción de la *mccE492* y las vías de síntesis de sideróforos de tipo catecol, prestando especial atención en la etapa de producción de *mccE492* activa.

3.2.1. Expresión en *Salmonella enterica* de plasmidios mutantes en genes del sistema de producción de mceE492.

Las salmoquelinas son sideróforos de tipo catecol que corresponden a moléculas de enteroquelina glucosiladas (figura 3). Estas reacciones de glicosilación son catalizadas por la enzima IroB (Fischbach y cols., 2004) codificada en el locus *iroA* presente en *S. enterica* y algunas cepas patógenas de *E. coli* (Hantke y cols., 2003). Para establecer si las proteínas homólogas IroB y MceC poseían la misma función se transformó la cepa de *S. enterica* LT2, que posee en gen *iroB*, con el plasmidio np133 (ver tabla 2) mutante en *mceC*. Se usaron como controles otros plasmidios mutantes en diferentes genes del sistema productor de mceE492. La figura 12 muestra que solo el plasmidio mutante en *mceC* es capaz de producir actividad bactericida cuando es expresado en *S. enterica*. En cambio los plasmidios mutantes en los genes de maduración *mceI* (np205) y *mceJ* (np221), que producen mceE492 inactiva en *E. coli*, no son capaces de producir actividad bactericida cuando se expresan en *S. enterica*. Este fenotipo productor de mceE492 inactiva logró revertirse en *S. enterica* cuando la construcción con la mutante en *mceI* se complementó con un plasmidio compatible que contiene el gen *mceI* bajo el promotor de T7 (pT7-I, tabla 2).

La figura 12 muestra que no se obtiene actividad bactericida con un plasmidio mutante en la proteína estructural de la mceE492 (np220) en ninguna de las cepas bacterianas empleadas. La construcción con el plasmidio mutante en *mceD* (p527), gen homólogo a una enteroquelina esterasa, que presenta actividad cuando se expresa en *E. coli*, también lo hace en la cepa de *S. enterica*. Se usó como control positivo el plasmidio pJAM434, que es el plasmidio parental del cual provienen todos los mutantes utilizados. Estos resultados sugieren fuertemente que IroB de *S. enterica* es capaz de suplir la carencia de MceC.

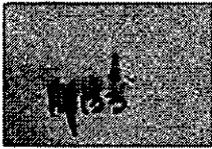
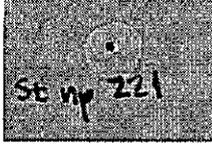
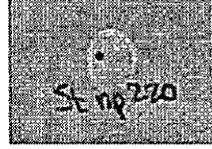
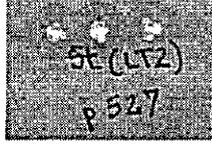
Plasmidio	Gen Mutado	Fenotipo en:	
		<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
pJAM434	—		
np133	<i>mceC</i>		
np205	<i>mceI</i>		
np221	<i>mceJ</i>		
np220	<i>mceA</i>		
p527	<i>mceD</i>		

Figura 12. Expresión en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* de plasmidios mutantes en genes del sistema productor de *mceE492*. La cepa de *S. enterica* LT2 se transformó con los plasmidios que se indican. Las transformantes fueron crecidas en medio líquido y alícuotas de 3 μ L de cada cultivo fueron depositadas sobre placas de un césped sensible. Se muestran también las cepas de *E. coli* portando los diferentes plasmidios.

3.2.2. Análisis cromatográfico y electroforético de la mceE492 producida en *Salmonella enterica*.

Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) para analizar la microcina producida por *S. enterica* y compararla con la producida por *E. coli*. Se purificó mceE492 a partir de sobrenadantes de las cepas de *E. coli* VCS257 pJAM229, *S. enterica* LT2 pJAM229 y *S. enterica* LT2 np133. La microcina purificada se concentró e inyectó en un sistema de columna C18 en fase reversa y se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la figura 13. Se tomaron las fracciones provenientes de los minutos 11 a 13,5, se concentraron, se marcaron con fluorescamina y se sometieron a una electroforesis en SDS-PAGE (figura 14). Se observa que tanto los perfiles de elución en HPLC como la migración electroforética de las tres preparaciones de microcina son similares, incluso la proveniente del plasmidio mutante en *mceC* expresada en *S. enterica*.

3.2.3. Transcomplementación por *Salmonella enterica* de una mutante en *mceC* expresada en *E. coli*.

Se analizó si la cepa LT2 de *S. enterica* tenía la capacidad de transcomplementar la carencia de MceC de una cepa de *E. coli* que expresa un plasmidio mutante en *mceC*. Se transformó la cepa de *S. enterica* LT2 con el plasmidio p157, que porta sólo el gen de la inmunidad del sistema de producción de la mceE492 de modo de poder co-cultivarla con una cepa productora de mceE492.

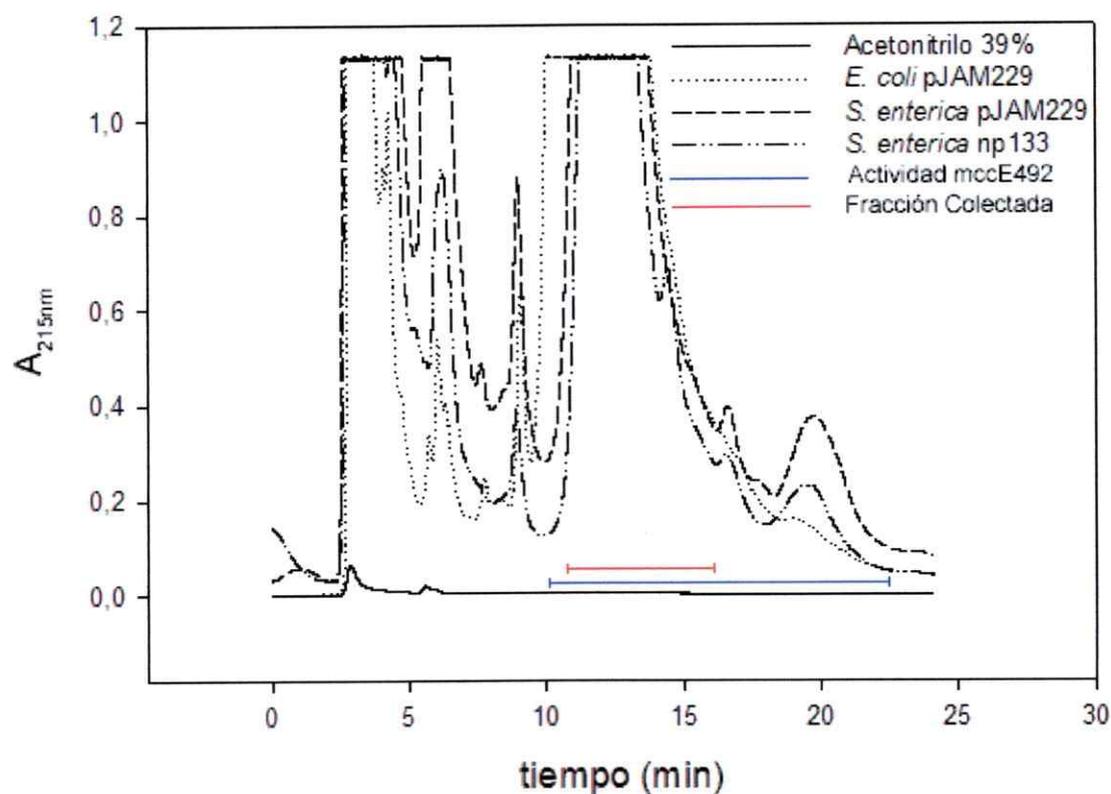


Figura 13. Perfiles de elusión de microcina proveniente de diferentes cepas purificada por HPLC. Se inyectaron 200 μ L, de una preparación concentrada de microcina, en un sistema de columna C18 en fase reversa. La purificación mediante HPLC (Beckman System Gold) se llevó a cabo isocráticamente con acetonitrilo 39% - TFA 0,1%, a un flujo de 0,5 mL/min durante 30 min. Se colectaron las fracciones cada 0,5 min, siguiendo la absorbancia a 215 nm. En la figura se indica la fuente de las preparaciones utilizadas. Con línea azul se indica el rango de fracciones que presentaron actividad bactericida y con línea roja las fracciones con mayor actividad que luego fueron colectadas para el SDS-PAGE.

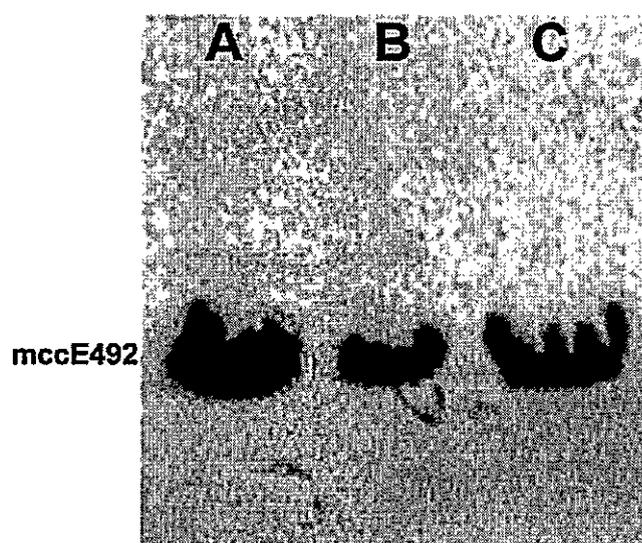


Figura 14. SDS-PAGE de preparaciones de mceE492 purificadas por HPLC. Se tomaron las fracciones desde el minuto 11 al 13,5 que se muestra en el cromatograma de la figura 13 destacadas por una línea roja, se concentraron, se marcaron con fluorescamina, para luego ser sometidas a una electroforesis en SDS-PAGE. (A) MccE492 de *E. coli* VCS257 pJAM229. (B) MccE492 de *S. enterica* LT2 pJAM229. (C) MccE492 de *S. enterica* LT2 np133.

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α que expresa el plasmidio npB4, derivado de pJEM15 con la mutación *mceC::Tn5*. Se observó que cuando estas dos cepas se ponen a crecer simultáneamente sobre un césped sensible producen un halo de inhibición de crecimiento cuando están en contacto directo (figura 15 A). La producción del halo de inhibición de crecimiento también se observó cuando el precipitado de células de *E. coli* DH5 α npB4 se crece en presencia del sobrenadante estéril de la cepa de *S. enterica* LT2 (figura 15 B). Sin embargo este efecto no se observó cuando se incubaron las células precipitadas de *S. enterica* LT2 p157 con el sobrenadante de *E. coli* DH5 α npB4. Tampoco se observó actividad bactericida con una mezcla de microcina inactiva purificada desde *E. coli* DH5 α npB4 y el sobrenadante estéril de *S. enterica* LT2, previamente calentadas durante 5 min a 95°C antes de ser depositada sobre el césped sensible.

Este resultado indica que existe(n) molécula(s) en el sobrenadante de *S. enterica* LT2, que es (son) capaz (es) de transcomplementar la carencia de MceC en *E. coli*, pero que es necesaria la presencia intracelular de estas molécula(s) en la célula productora de mceC para ejercer su función y dar como resultado la producción de actividad bactericida.

3.2.4. Clonamiento del gen *iroB* de *S. enterica* y complementación con *mceC*.

Para esclarecer el papel de *IroB* en la producción de microcina activa en una cepa de *S. enterica* LT2 que lleva el plasmidio mutante en MceC, se clonó por PCR el gen *iroB* a partir del DNA geonómico de *S. enterica* LT2. Para ello se utilizó el plasmidio pACYC184, compatible con el del sistema productor de mceC y sus mutantes por transposición, y se usó el promotor Φ 10 de T7 para la expresión (figura 16).

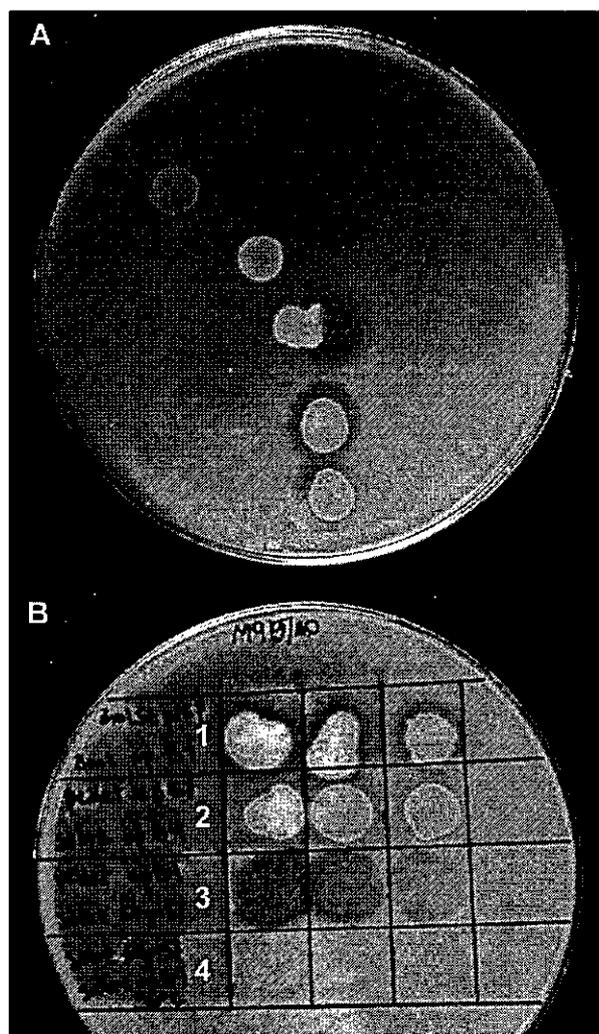


Figura 15. Transcomplementación de un plasmidio mutante en *mceC* expresado en *E. coli* con el cultivo y sobrenadante de *S. enterica*. (A) Alícuotas de 3 μ L de cultivos de toda la noche de *S. enterica* LT2 p157 y *E. coli* DH5 α npB4 fueron depositadas sobre un césped sensible, acercándolas hasta ponerlas una sobre la otra. (B) Sobre una placa de césped sensible se pusieron por triplicado alícuotas de 3 μ L de: 1. Gota sobre gota, de cultivo de *S. enterica* LT2 p157 y *E. coli* DH5 α npB4. 2. Mezclas de células precipitadas de *S. enterica* LT2 p157 con sobrenadante estéril de *E. coli* DH5 α npB4. 3. Mezclas de células precipitadas de *E. coli* DH5 α npB4 con sobrenadante estéril de *S. enterica* LT2 p157. 4. Mezcla de *mccE492* purificada de *E. coli* DH5 α npB4 con sobrenadante estéril de *S. enterica* LT2 p157 calentada durante 5 min a 95°C.

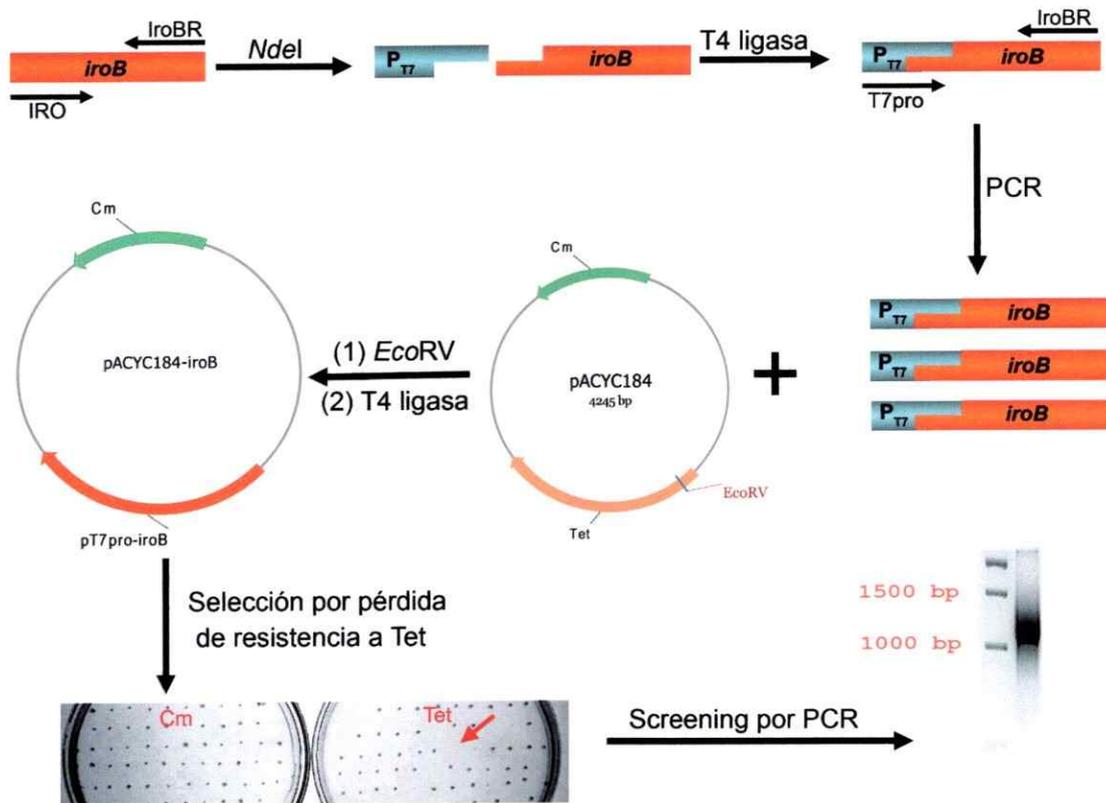


Figura 16. Esquema de la estrategia de clonamiento del gen *iroB*. El gen *iroB* fue amplificado con los partidores IRO e IroBR desde el genoma de *S. enterica* LT2. Este amplificado luego fue digerido con la enzima *Nde*I y ligado al promotor Φ 10 del fago T7. Se sometió la ligación a una nueva ronda de PCR y se ligo contiguo en el sitio *Eco*RV del vector pACYC184. Con estas construcciones se transformó *E. coli* DH5 α y se seleccionaron las transformantes por la pérdida de resistencia a Tet. Finalmente se realizó una búsqueda por PCR utilizando los partidores T7pro e IroBR.

IroB complementó al plasmidio defectuoso en *mceC* (np133) cuando se usa como cepa huésped *E. coli* (figura 17 A), lo cual indica que es IroB el producto génico responsable de la transcomplementación en *S. enterica* y que IroB y MceC poseen la misma actividad.

También se transcomplementó una cepa de *E.coli* mutante en MceC con el cultivo y el sobrenadante de una cepa *E. coli* que expresa IroB. Al igual que lo observado anteriormente cuando se usa el sobrenadante estéril de la cepa mutante en MceC sobre un cultivo de la que expresa IroB no hay actividad bactericida. La unidireccionalidad de estas transcomplementaciones indica nuevamente que es necesaria la presencia intracelular de él o los productos de IroB para que ocurra la complementación en el sistema de producción de *mccE492* activa.

3.2.5. Transcomplementación de un plasmidio mutante en *mceC* con salmoquelinas MGE y DGE.

Como se mencionó anteriormente, IroB es una glucosil transferasa encargada de la producción de un grupo de moléculas llamadas genéricamente salmoquelinas (figura 3), que corresponden básicamente a enteroquelina mono, di o triglucosilada (Fischbach y cols., 2004).

En el laboratorio se disponía de dos formas de salmoquelina, enterobactina monoglucosilada (MGE) y enterobactina diglucosilada (DGE), que fueron donadas gentilmente por Michael Fischbach del laboratorio del Dr. C. Walsh (Harvard Medical School). Estos compuestos fueron disueltos en DMSO a una concentración final de 1mM y almacenados a -20°C para su uso. Su identidad fue comprobada mediante espectros de absorción y emisión de fluorescencia, característico de los catecoles (O'Brien y Gibson, 1970).

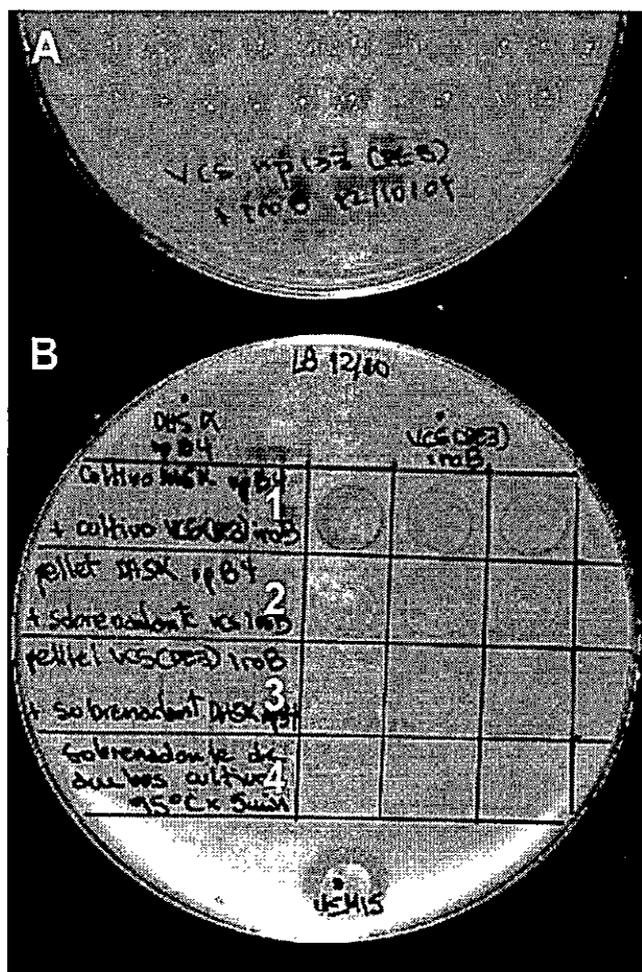


Figura 17. Complementación y trascomplementación de la mutante en *mceC* con *iroB*. (A) *E. coli* VCS257(DE3)np133 produjo halos de inhibición de crecimiento sobre un césped sensible cuando se transformó con el gen *iroB* clonado en un vector compatible. (B) Sobre una placa de césped sensible se depositaron por triplicado alícuotas de 3 μ L de: 1. Gota sobre gota, de cultivo de *E. coli* DH5 α npB4 y *E. coli* VCS257 (DE3) pIroB. 2. Mezclas de precipitado de células de *E. coli* DH5 α npB4 con el sobrenadante estéril de *E. coli* VCS257 (DE3) pIroB. 3. Mezclas del precipitado de células de *E. coli* VCS257 (DE3) pIroB con sobrenadante estéril de *E. coli* DH5 α npB4. 4. Mezcla de sobrenadante estéril de *E. coli* DH5 α npB4 con sobrenadante estéril de *E. coli* VCS257 (DE3) pIroB calentados durante 5 min a 95°C.

En la figura 18 A se muestra el espectro de excitación de las salmoquelinas con dos picos que presentan máximos a 243 y 316 nm. Al excitar las muestras a estas longitudes de onda se obtiene el patrón característico de emisión (figura 18 B), con máximos a 388 y 412 nm.

En la figura 19 A, se muestra que las salmoquelinas purificadas fueron capaces de transcomplementar la cepa de *E. coli* con el plasmidio npB4 (*mceC::Tn5*), no así la que lleva el plasmidio npF2 (*mceI::Tn5*). Se observa un halo de inhibición de crecimiento más grande al utilizar la salmoquelina DGE que es la que corresponde a la forma diglucosilada.

También se probó si las salmoquelinas purificadas actuaban como un cofactor de las microcinas inactivas producidas por mutantes en los genes de maduración. Para ello se mezclaron en proporción equimolar las salmoquelinas MGE y DGE con microcinas purificadas desde los sobrenadantes de *E. coli* DH5 α npB4 y *E. coli* DH5 α npF2 y algunas de las mezclas se calentaron a 95°C durante 5 min. Alícuotas de estas mezclas fueron depositadas sobre una placa de césped sensible y después de incubar a 37°C durante 12 h se observó que ninguna de las mezclas de *mccE492* inactiva más las salmoquelinas (MGE y DGE) presentó actividad bactericida (figura 19 B). Se concluyó que las moléculas de salmoquelina no son capaces de actuar como cofactores en la producción de *mccE492* activa.

3.2.6. Transcomplementación de cepas mutantes en los receptores de catecolatos FepA, Cir y Fiu.

Los experimentos anteriores indicaban que las salmoquelinas deben ingresar a la célula productora de *mccE492* para complementar la carencia de *MceC*.

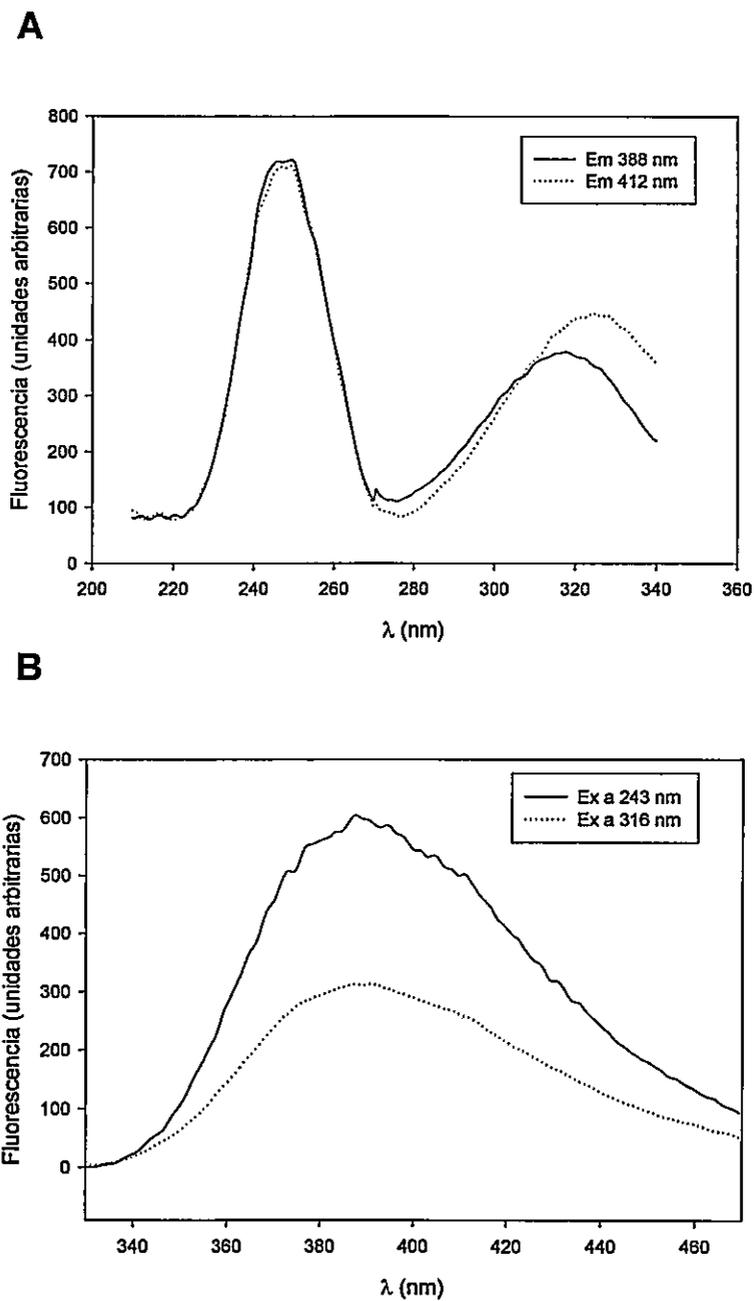
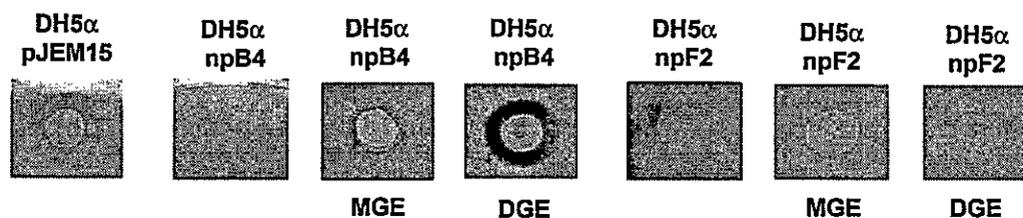


Figura 18. Espectros de absorción y emisión de salmoquelinas. (A) Espectros de excitación de la salmoquelina $1 \mu\text{M}$ medidos a dos longitudes de onda de emisión (388 nm y 412 nm). **(B)** Espectros de emisión de salmoquelina $1 \mu\text{M}$ medidos a dos longitudes de onda de excitación (243 nm y 316 nm). Se utilizó una hendidura de 5,0 tanto en los espectros de emisión como en los de absorción.

A



B

Cepa	Plasmidio	Actividad	+ MGE	+ DGE	95°C + MGE	95°C + DGE
<i>E. coli</i> DH5α	npB4	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> DH5α	npF2	-	-	-	-	-

Figura 19. Transcomplementación con salmoquelinas MGE y DGE. (A) Sobre una placa con un césped sensible se depositaron 3 μ L de cultivos líquidos de *E. coli* DH5 α transformada con los plasmidios pJEM15 (sobreproductor de mceE492), npB4 (derivado de pJEM15 *mceC*::Tn5) y npF2 (derivado de pJEM15 *mceI*::Tn5). Sobre ellos se pusieron alícuotas de 3 μ L de MGE o DGE 1 mM, según se indica. **(B)** Se purificó mceE492 inactiva desde *E. coli* DH5 α npB4 y *E. coli* DH5 α npF2, se mezclaron en cantidades equimolares con salmoquelinas MGE o DGE y se depositaron alícuotas sobre un césped sensible. Se indica las mezclas que previamente se calentaron a 95°C durante 5 min. Se registró la presencia de halos de inhibición de crecimiento.

Los receptores para sideróforos de tipo catecol y sus productos de hidrólisis, FepA, Cir y Fiu están implicados en la importación de estas moléculas de salmoquelina en *E. coli*, por tanto la utilización de mutantes en estos receptores permite establecer inequívocamente la acción intracelular de estas moléculas de salmoquelina en la producción de mceE492 activa.

Para ello, la cepa de *E. coli* H1876 (Fiu::Mudx, Cir::MudX, FepA::Tn5) se transformó con los plasmidios pJEM15 y npB4, comprobándose que cuando esta cepa expresa el plasmidio pJEM15 (sobre productor de mceE492) produce mceE492 activa y en el caso de npB4 (derivado de pJEM15 pero mceC::Tn5) produce una forma inactiva. Cuando se intentó transcomplementar la cepa *E. coli* H1876 npB4, defectuosa en FepA, Fiu y Cir, con un cultivo de *S. enterica* no se obtuvieron halos de inhibición de crecimiento sobre un césped sensible (figura 20 A), a diferencia de lo observado con una cepa silvestre para los receptores.

No se observó transcomplementación entre la cepa mutante en los receptores (*E. coli* H1876 npB4) y las cepas que sobreexpresan las glucosil transferasas MceC o IroB (*E. coli* VCS257 (DE3) más pT7-C o plroB), ni aún en presencia de IPTG (figura 20 B). tampoco se logró la transcomplementación cuando se utilizó las salmoquelinas purificadas (figura 20 C).

Estos resultados comprueban inequívocamente que la salmoquelina debe localizarse intracelularmente para participar en el proceso de producción de mceE492 activa y confirman que la cepa productora estaría utilizando para la internalización de estas moléculas uno o más de los receptores para catecolatos FepA, Cir y Fiu.

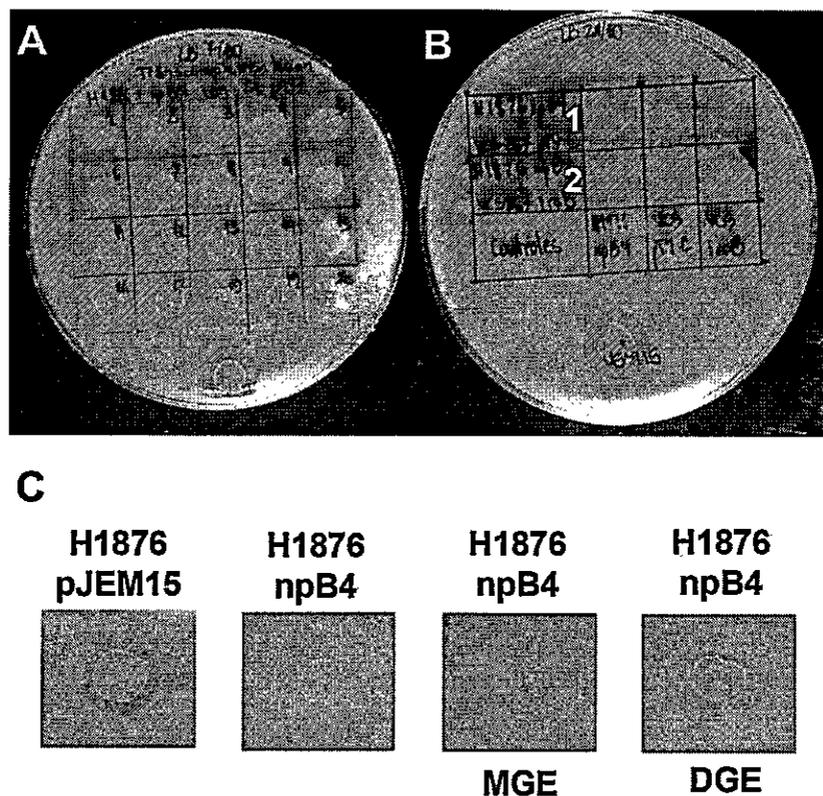


Figura 20. Ensayo de transcomplementación entre *S. enterica* LT2 y *E. coli* H1873, un triple mutante para los receptores de catecolatos. Sobre un césped sensible se depositaron gota sobre gota de: (A) cultivos de *E. coli* H1876 (*FepA*⁻, *Cir*⁻, *Fiu*⁻) npB4 (*mceC*::Tn5) y *S. enterica* p157 (inmune). (B) cultivos de *E. coli* H1876 npB4 y 1. *E. coli* VCS257 (DE3) pT7-C y 2. *E. coli* VCS257 (DE3) proB. Las placas utilizadas fueron suplementadas con IPTG. (C) 3 μ L de salmoquelinas MGE y DGE 1 mM con las cepas indicadas en la figura.

3.2.7. Expresión de la *mccE492* en cepas mutantes en la vía de producción de enteroquelina.

La enteroquelina es el sideróforo de tipo catecol más importante en enterobacterias. Está formado por un trímero cíclico de DHBS (2,3-hidroxi benzoilserina) y en su síntesis participan un grupo de enzimas codificadas por los genes *ent* (figura 21). En una de las primeras etapas de la síntesis de esta molécula actúa la enzima EntC, que cataliza junto con EntA y EntB una reacción en tres etapas que produce 2,3-dihidroxi benzoico a partir de corismato (Crosa, 1989). Un complejo multienzimático asociado a membrana, conformado por EntEFB sintetiza las subunidades de DHBS, para luego ciclar tres de estas subunidades dando como producto una molécula de enteroquelina (Hantash y Earhart, 2000; Crosa y Walsh 2002). La figura 21 muestra un esquema simplificado de estas reacciones.

Estudios anteriores demostraron que en condiciones de carencia de hierro (en la cual los genes *ent* se encuentran desreprimidos) se produce *mccE492* con menor actividad bactericida (Orellana y Lagos, 1996), y que tanto la enteroquelina como sus productos de hidrólisis son inhibidores competitivos de la actividad bactericida pues esta microcina utiliza los mismos receptores de membrana externa que los catecolatos para ingresar a las células (Strahsburger y cols., 2005). Otro antecedente importante es la observación que cepas de *E. coli* con mutaciones en algunos de los genes que participan en la síntesis de la enterobactina, como *entC* y *entDF*, no son capaces de producir *mccE492* activa (Strahsburger, 2005).

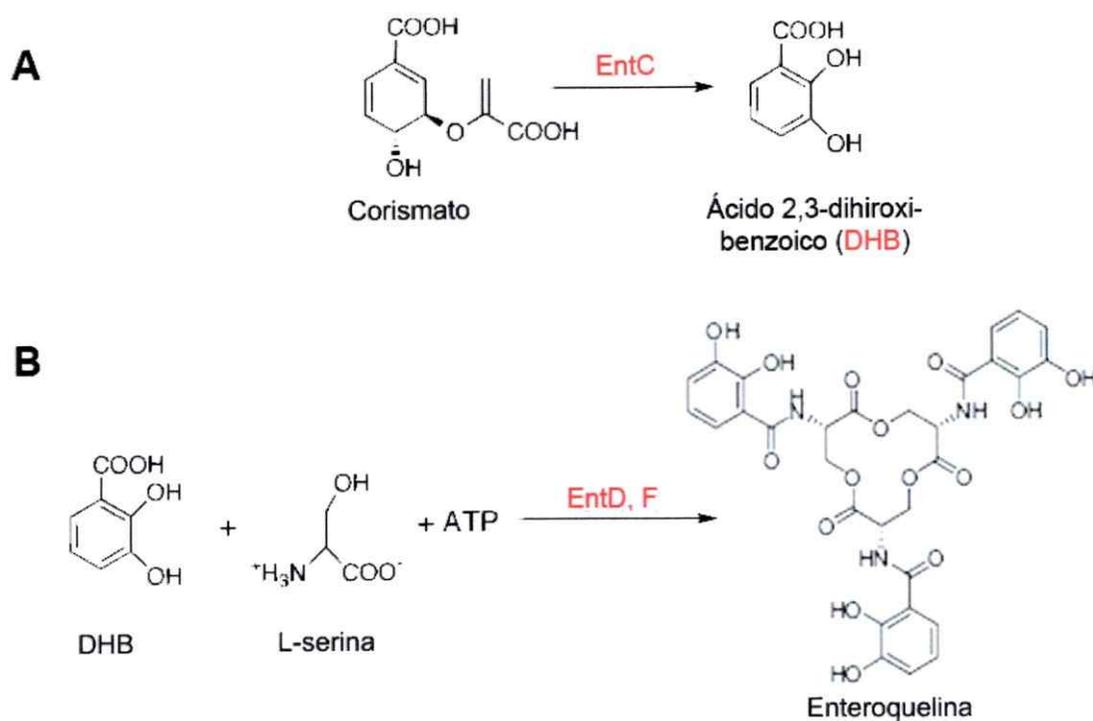


Figura 21. Esquema resumido de la síntesis de enteroquelina. (A) En el citoplasma un grupo de enzimas, entre ellas EntC, producen el ácido 2,3-dihidroxi-benzoico (DHB) a partir del corismato. **(B)** Dentro de un complejo asociado a membrana un grupo de enzimas que incluyen EntD y EntF, llevan a cabo la síntesis no ribosomal dependiente de ATP que asocia las moléculas de DHB con serina hasta formar un trímero cíclico de 2,3-dihidroxi-benzoilserina (DHBS), denominado enteroquelina. Adaptado de Gehring y cols., (1997).

Para establecer el papel que juegan estas enzimas en la producción de *mccE492* se realizaron ensayos de transcomplementación utilizando cepas mutantes de *E. coli* en la vía de síntesis de enteroquelina, adicionando los productos de las reacciones de esta vía, de modo de comprobar si de esta forma se logra la producción de *mccE492* activa. Se utilizaron las cepas de *E. coli* H5311 (*entC*) y H1885 (*entDF*) transformadas con el plasmidio pJEM15 (sobreproductor de *mccE492*) y también la cepa *E. coli* H1941 (*Fur*), sobreproductora de enteroquelina. En una primera etapa, se ensayaron las cepas productoras de *mccE492* inactiva, *E. coli* H5311 (*entC*) pJEM15 y H1885 (*entDF*) pJEM15 (figura 22 A), suplementando el medio de cultivo con DHB. No se observó producción de *mccE492* cuando se utilizó la cepa H1885 pJEM15, ya que la acción de las enzimas EntD y EntF son posteriores a la síntesis del DHB, a diferencia de lo que se observó al utilizar la mutante H5311 pJEM15, ya que la acción de EntC es anterior a la síntesis de DHB (figura 22 B).

Posteriormente se mezclaron las cepas *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15 y *E. coli* H1941 (*Fur*), sobreproductora de enteroquelina. En este caso no hubo producción de microcina activa. Estos resultados comprueban que enzimas de la vía de síntesis de enteroquelina EntCDF son esenciales para la actividad bactericida de la *mccE492* y además que es posible que las enzimas EntD, EntF o ambas estén participando de una forma diferente de la producción de enteroquelina en la producción de *mccE492* activa, ya que no fue posible transcomplementar una mutante en esas enzimas con el producto de las reacciones que catalizan: enteroquelina.

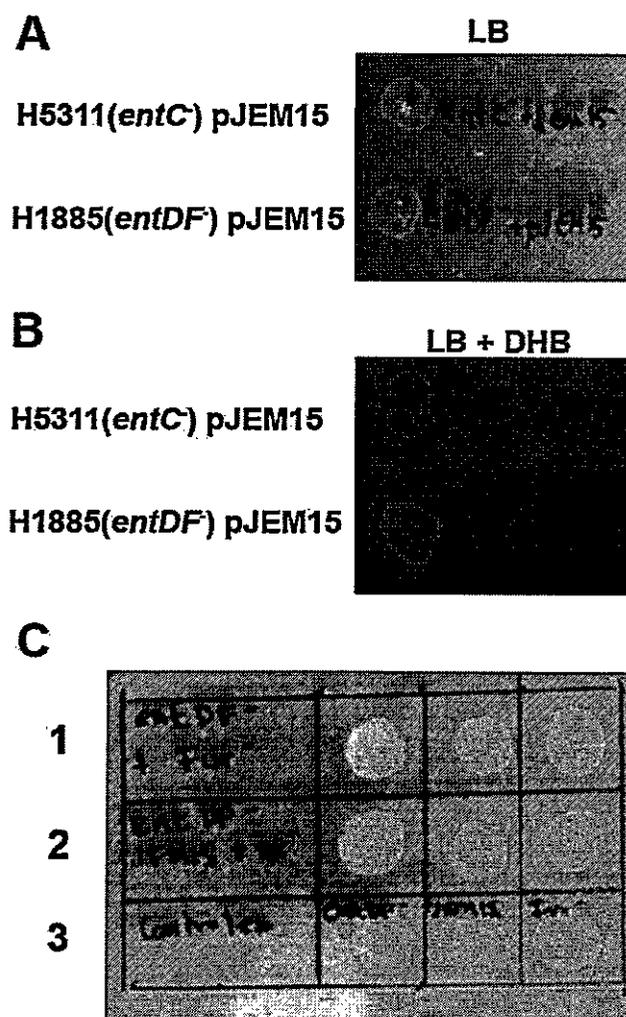


Figura 22. Transcomplementación de cepas de *E. coli* defectuosas en la vía de síntesis de enteroquelina. (A) Sobre una placa con césped sensible en medio LB, se depositaron alícuotas de cultivos crecidos toda la noche de las cepas de *E. coli* H5311 (*entC*) y H1885 (*entDF*) transformadas con el plasmidio pJEM15 (sobreproductor de *mccE492*). **(B)** Sobre una placa de césped sensible en medio LB suplementado con 10 µg/mL de DHB, se pusieron alícuotas de cultivos crecidos toda la noche de las cepas de *E. coli* H5311 (*entC*) y H1885 (*entDF*) transformadas con el plasmidio pJEM15. **(C)** Sobre una placa de césped sensible se pusieron a crecer: 1. gota sobre gota cultivos de *E. coli* H1885 (*entDF*) y *E. coli* H1941 (*Fur*), sobreproductora de enteroquelina. 2. gota sobre gota cultivos de *E. coli* H1885 (*entDF*) pJEM15 y *E. coli* H1941 (*Fur*). 3. alícuotas de cada cultivo a modo de control.

3.3. EFECTO DE LA DILUCIÓN DEL CULTIVO DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE MCC492 SOBRE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA.

En nuestro laboratorio se ha observado que cuando se usa una dilución muy grande para crecer un cultivo desde el cual se desea purificar mce492, ésta se produce con una actividad mayor a la obtenida cuando se utiliza una dilución menor del inóculo inicial. Se exploró la posibilidad de que el efecto de la dilución se deba a alguna molécula reguladora de la actividad bactericida presente en el sobrenadante de la cepa productora y entre las posibles actividades de esta probable molécula se analizaron las siguientes: un activador estimulado por la dilución; un inhibidor presente en el cultivo; o un cambio en la conformación y/o estado de agregación de la propia microcina. Esta última posibilidad se desprende de resultados del laboratorio que indican que la formación de fibras de amiloide por parte de la mce492 conlleva a una pérdida en su actividad bactericida en fase estacionaria (Bieler y cols., 2005).

3.3.1. Diferentes tratamientos para eliminar células del sobrenadante de cultivos productores de mce492 no afectan la actividad bactericida.

La actividad bactericida de la mce492 puede ser determinada y cuantificada a partir del sobrenadante de una cepa productora de mce492 activa. Para que esta determinación no se vea alterada por el crecimiento de la cepa productora y se pueda medir solo la microcina producida y exportada al medio extracelular al momento de la determinación, se deben eliminar las células viables del sobrenadante con un tratamiento que no afecte el título de actividad bactericida obtenido. Para evaluar si con diferentes tratamientos se presentaban variaciones en la determinación del título bactericida desde un mismo sobrenadante, se crecieron cultivos de *E. coli* VCS257 pJEM15 (sobreproductora de mce492) y *E. coli* VCS257 pJAM434 (pobre productora

de *mccE492*), se colectaron los sobrenadantes por centrifugación durante 10 min a 7000 rpm y se procesaron de las siguientes formas: filtración en filtros "low binding" de un tamaño de poro de 2 μ M; incubación durante 15 min a 95°C; o tratamiento con gotas de cloroformo. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes ya tratados y se les realizaron diluciones seriadas para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por mL. Se encontró que después de estos tratamientos ninguno de los sobrenadantes presentaba UFC en una placa de medio caldo Luria sin antibióticos. Adicionalmente se cuantificó la actividad bactericida de estos sobrenadantes, y como se observa en la tabla 5, no se encontraron diferencias significativas en el título de la actividad bactericida de los sobrenadantes sometidos a los diferentes tratamientos. Se concluyó que cualquiera de ellos puede ser utilizado para la determinación del título de la actividad bactericida.

3.3.2. Efecto de la dilución en la actividad bactericida en cultivos de cepas productoras de *mccE492*.

Como se mencionó anteriormente, se obtiene *mccE492* con una mayor actividad bactericida cuando se utilizan inóculos muy diluidos en los cultivos desde los cuales se purifica esta bacteriocina. Se cuantificó el efecto sobre la actividad bactericida de la *mccE492* el uso de diferentes diluciones en el inóculo inicial. Se utilizaron inóculos de 1:1000, 1:10 000 y 1:100 000 y después del crecimiento se determinó el título desde los sobrenadantes de *E. coli* VCS257 transformada con el plasmidio pJEM15 (sobreproductor de *mccE492*) o con el plasmidio pJAM434 (pobreproductor de *mccE492*) (tabla 6). Se observó un aumento considerable en la actividad bactericida cuando se utiliza un inóculo extremadamente diluido (1:100 000).

Tabla 5. Título de la actividad bactericida de la *mccE492* a partir de sobrenadantes con diferentes tratamientos.

Tratamiento Sobrenadante	Título Sobrenadantes		
	<i>E. coli</i> VCS257 pJEM15		
	A	B	C
s/t	1/10	1/10	1/100
filtración	1/10	1/10	1/100
95°C x 15 min	1/10	1/10	1/100
Cloroformo	1/10	1/10	1/100

Tratamiento Sobrenadante	<i>E. coli</i> VCS257 pJAM434		
	A	B	C
s/t	s/d	1/4	s/d
filtración	s/d	s/d	-
95°C x 15 min	-	s/d	s/d
Cloroformo	s/d	s/d	s/d

Cultivos crecidos durante la noche de las cepas *E. coli* VCS257 pJEM15 (sobre productora de *mccE492*) o *E. coli* VCS257 pJAM434 (pobre productora de *mccE492*), se centrifugaron durante 10 min a 7000 rpm. El sobrenadante se sometió a los tratamientos que se indican: sin tratamiento (s/t); filtración con filtros de baja afinidad con un tamaño de poro de 0,2 μm ; 15 min a 95°C; cloroformo. Luego de tratados se les determinó el título de actividad bactericida. A, B y C representan experimentos independientes para cada cepa productora. La abreviación s/d, corresponde a sin diluir.

Tabla 6. Efecto de la dilución del inóculo de la cepa productora sobre la actividad bactericida de la mceE492.

Dilución Inóculos	Título Sobrenadantes		
	<i>E. coli</i> VCS257 pJEM15		
	A	B	C
1:1000	s/d	1/64	1/8
1:10.000	1/2	1/64	1/16
1:100.000	1/4	1/4096	1/64

Dilución Inóculos	<i>E. coli</i> VCS257 pJAM434		
	A	B	C
1:1000	s/d	s/d	s/d
1:10.000	s/d	s/d	s/d
1:100.000	1/2	s/d	1/2

Matraces con 500 mL de medio mínimo M9 suplementado con Glc y Cit, fueron inoculados con las diluciones que se indican de las cepas *E. coli* VCS257 pJEM15 (sobre productora de mceE492) o *E. coli* VCS257 pJAM434 (pobre productora de mceE492). Se incubaron a 37°C y una agitación constante de 220 rpm, hasta que alcanzaron una DO_{600nm} de aproximadamente 1. Luego los sobrenadantes se trataron con cloroformo y se titularon para cuantificar la actividad bactericida de estos. A, B y C corresponden a experimentos independientes para cada cepa productora. La abreviación s/d corresponde a sin diluir.

Este resultado desfavorece la posibilidad que el aumento en la actividad bactericida se deba solo a que la menor cantidad de inóculo proveniente de fase estacionaria tenga menos estructuras oligomérica que inducen la agregación de la *mccE492* a una forma inactiva, pues la inducción de la agregación requiere una cierta concentración (Bieler y cols., 2005). También se puede observar que los sobrenadantes de la cepa pobreproductora (*E. coli* VCS257 pJAM434) siempre presentan títulos muy bajos, incluso cuando se utiliza el inóculo más diluido (1:100 000), y no se observa un aumento sustancial en el título. Este resultado permite especular que esta cepa debiera estar produciendo una mayor cantidad de la o las moléculas que poseen la capacidad de inhibir la producción o la actividad de la *mccE492*.

3.3.3. Variación en el título de la actividad bactericida producido por el intercambio de sobrenadantes de cepas productoras de *mccE492*.

Para analizar la hipótesis de que la cepa pobreproductora de *mccE492 E. coli* VCS257 pJAM434 posee en su sobrenadante una mayor concentración de la o las moléculas inhibitorias de la actividad *mccE492* en fase estacionaria, se tomó el sobrenadante de esta cepa y se puso sobre células de la cepa sobreproductora de *mccE492 (E. coli* VCS257 pJEM15), ambos provenientes de cultivos crecidos hasta fase estacionaria a 37°C y 220 rpm. Estas mezclas se incubaron durante 4 h en las mismas condiciones de cultivo y se tituló el sobrenadante de estas mezclas (tabla 7). El cambio del sobrenadante de la cepa sobreproductora por el de la pobreproductora, produce una disminución de hasta tres órdenes de magnitud en el título de la actividad bactericida cuando se la compara con los controles en los cuales

Tabla 7. Variación en el título producido por el cambio del sobrenadante en una cepa sobre productora de mccE492.

Células	Sobrenadante Estéril	Título Sobrenadantes en base 10		
		A	B	C
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	Medio M9 fresco	1/100	1/100	1/100
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	1/100	1/100	1/100
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pJAM434	1/10	1/10	1/10
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pHc79	1/10	1/100	1/100

Células	Sobrenadante Estéril	en base 2		
		D	E	F
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	Medio M9 fresco	1/32	1/64	1/16
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	1/16	1/16	1/64
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pJAM434	s/d	1/8	s/d
<i>E.coli</i> VCS257 pJEM15	<i>E.coli</i> VCS257 pHc79	1/16	1/64	1/16

Las combinaciones indicadas en la tabla se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa de *E.coli* VCS257 transformada con los plasmidios pJEM15 (sobre productor), pJAM434 (pobre productor) y pHc79 (cosmidio del cual derivan pJEM15 y pJAM434). Todos los crecimientos de este experimento se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con Glu y Cit. A, B, C, D, E y F corresponden a 6 experimentos realizados de forma independiente.

se utilizó el sobrenadante la misma cepa sobreproductora o simplemente medio de cultivo fresco (tabla 7).

En estos experimentos se utilizaron los sobrenadantes de la cepa pobreproductora estériles, por lo cual también se puede concluir que las moléculas inhibitorias presentes en estos sobrenadantes en fase estacionaria de crecimiento son suficientes para producir su efecto sobre células sobreproductoras.

4. DISCUSIÓN

4.1. Expresión traduccional de los genes del sistema productor de la *mccE492* y la disponibilidad de hierro en el medio.

Las curvas de actividad β -galactosidasa de las fusiones mapeadas en los genes de inmunidad y estructural de la *mccE492* poseen formas muy similares, sugiriendo que la traducción de estos podría ser un proceso acoplado que permitiría la viabilidad de la célula productora, pues se ha comprobado que la *mccE492* intracelular es tóxica, aun en su forma no modificada (Bieler y cols., 2006). También observamos que el aumento en la expresión de la proteína de fusión para uno de los genes de la maduración, *MceI-LacZ*, se correlaciona con el aumento observado en la expresión de la fusión con el gen del transportador ABC dedicado *MceG*, esto podría deberse a que a medida que se va produciendo una mayor cantidad de *mccE492* activa en fase exponencial de crecimiento, esta se debe exportar hasta el medio extracelular para ejercer su acción bactericida sobre las cepas sensibles, este aumento no se observa de manera tan abrupta en la expresión de las proteínas de fusión con *MceC* (otro gen de maduración) y *MceH* (proteína accesoria del transportador ABC), sin embargo los niveles basales de actividad β -galactosidasa de estas fusiones es mayor en todas las etapas de la curva de crecimiento, de lo cual podemos deducir que tal vez estos no sean el blanco de un mecanismo de regulación. La determinación del perfil de hidropatía de la proteína de maduración *MceJ* revela la presencia de lo que podrían ser dos hélices trans membrana, además se sabe que las enzimas implicadas en la segunda etapa de la síntesis de enteroquelina se encuentran asociadas a la membrana interna de la célula sin ser proteínas de transmembrana, estos dos antecedentes nos

llevan a pensar que si MceJ es una proteína asociada a membrana que participa en el proceso de maduración acoplado a la síntesis de enteroquelina, podríamos explicar el hecho de que su fusión con la β -galactodidasa presente colonias de color azul en placas suplementadas con x-gal, pero que no presente actividad en el ensayo de hidrólisis de ONPG (Miller, 1992), ya que este último posee una etapa de lisis y eliminación de las membranas celulares con cloroformo previo al ensayo enzimático propiamente tal, etapa en la cual podría haber sido eliminada la proteína de fusión MceJ-LacZ.

La expresión de las proteínas implicadas en la maduración y la exportación de la *mccE492* (*MceCGHI*) disminuyen en carencia de hierro a diferencia de lo que ocurre con los genes implicados en las vías de síntesis de enteroquelina, en que la expresión de dichos genes aumenta. Estos fenómenos aparentemente contradictorios podrían tener una explicación fisiológica pues mientras en el medio externo existe la condición de carencia de hierro, la célula aumentará la producción del sideróforo y la baja expresión de los genes de maduración impediría que el sistema de la microcina parasite de esa vía de síntesis para su actividad. Cuando en el medio existe hierro, la microcina es capaz de acoplarse a la vía de síntesis de enteroquelina para producir su forma activa, mientras la célula ocupa otros mecanismos para abastecerse de hierro.

La forma modificada de la *mccE492*, aislada por Thomas y cols. (2004) mostró la capacidad de unir hierro con alta afinidad al igual que la enteroquelina y sus productos de hidrólisis, por lo que no se puede descartar que la microcina modificada actúe también como un sideróforo, aumentando las capacidades competitivas de la cepa portadora del sistema productor de *mccE492*.

4.2. La *mccE492* y su proceso de maduración.

La *mccE492* se produce en forma inactiva en fase estacionaria de crecimiento, lo cual se ha relacionado con el cese de la transcripción de los genes de maduración *mceI* y *mceJ* y una disminución en la expresión de *mceC*. Se ha observado también que mutantes en cualquiera de estos genes solo producen microcina inactiva. Por otra parte, Thomas y cols (2004) describieron que en algunas condiciones de cultivo era posible encontrar a la *mccE492* modificada post-traduccionalmente, con una molécula tipo salmoquelina unida a su extremo C-terminal, y que esta microcina modificada tendría una mayor actividad bactericida que su contraparte no modificada.

En nuestro laboratorio, se han propuesto varias hipótesis para explicar porqué la microcina no modificada posee actividad bactericida a pesar de que las mutantes en los genes de maduración no producen microcina activa. La primera de ellas es que la molécula tipo salmoquelina que está unida covalentemente a la microcina también pueda actuar como un cofactor unido no-covalentemente. Esta posibilidad se descartó pues no se obtuvo actividad bactericida cuando la microcina aislada desde mutantes en los genes de maduración fue incubada junto con distintas formas salmoquelina purificada. Por otra parte no se observó transcomplementación cuando la cepa productora de *mccE492* inactiva presenta mutaciones en los receptores de catecolatos, esenciales para la internalización de las salmoquelinas. Ambos antecedentes sugieren fuertemente la necesidad de una interacción intracelular entre la molécula modificadora y la *mccE492*. Una hipótesis que parece más probable, es que la microcina modificada corresponda solo a una pequeña fracción de la microcina que se produce, y por tal razón no fue detectada con anterioridad. Solo bajo las condiciones de cultivo reportada por Thomas y cols. (2004) sería posible detectar una fracción más significativa de la

forma modificada. La pequeña cantidad de forma modificada sería suficiente para inducir una conformación activa en la fracción de microcina no modificada. Esta última suposición se basa en que la conformación de la microcina activa y la conformación de la microcina inactiva purificada desde mutantes en genes de la maduración poseen un contenido de estructura secundaria diferente (Baeza, 2003). Finalmente una alternativa que aún no se puede descartar es que la microcina pase por una etapa en la que se encuentra modificada, en la que adquiere una conformación activa y que luego esa modificación sea removida.

4.3. Relación entre la vía de síntesis de sideróforos de tipo catecol y la producción de *mccE492* activa.

El sistema de producción de *mccE492* posee genes homólogos a dos genes que se localizan en el locus *iroA* y que son responsables de la producción de salmoquelinas. Uno de ellos es *mceD* homólogo a la enteroquelina esterasa (*IroD*), y el otro es *mceC* homólogo a la enteroquelina glucosil transferasa (*IroB*). Los resultados de esta tesis establecieron que *IroB* es capaz de complementar la función de *MceC*, esencial para la producción de la actividad bactericida, y por tanto poseen actividades equivalentes. La glucosilación dentro de la biosíntesis de compuestos naturales como sideróforos y antibióticos han despertado un gran interés debido a las posibilidades que estas enzimas modificadoras abren el diseño racional de nuevos compuestos, ya que estas modificaciones no solo pueden cambiar la solubilidad de los compuestos, sino que también ampliar o cambiar su espectro de actividad biológica (Walsh y cols., 2003; Lamb y Wright, 2005).

Los microorganismos producen una inmensa cantidad de compuestos, con gran variedad de actividades biológicas, mediante "líneas de producción" biológicas en las

que participan megasintetasas, conocidas como NRPSs (non-ribosomal peptide synthases). La enteroquelina, por ejemplo que es un trómero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS), que se sintetiza a partir de los monómeros de 2,3-dihidroxibenzoico y serina mediante una síntesis peptídica no ribosomal (Crosa y Walsh, 2002). Recientemente se ha revelado una diversidad y plasticidad inesperada en los mecanismos que operan las líneas de ensamblaje de estos productos naturales (Wenzel y Müller, 2005). Estas líneas de ensamblaje además de contar con la sintetasa no ribosomal, que en el caso de la enteroquelina corresponde a EntF (figura 2), también cuentan con otro grupo de enzimas que completan las reacciones y modificaciones que darán como resultado el compuesto final. El hecho que las cepas mutantes en EntDF solo produzcan mceE492 inactiva y que además no sea posible transcomplementar estas mutaciones con una cepa sobreproductora de enteroquelina, lleva a pensar que la producción de mceE492 activa utiliza esta vía de síntesis no ribosomal para una función adicional a la producción de enteroquelina. La necesidad de una interacción intracelular entre las moléculas de salmoquelina y la microcina durante el proceso de maduración, podría ser llevada a cabo por los productos génicos de los genes de maduración, diferentes de MecC para el cual ya hemos definido su función. La proteína MceI es homóloga a una acil transferasa y entre sus aminoácidos 41 y 110 contiene un dominio presente en la proteína HlyA, que participa en la activación de la pretoxina hemolisina por acilación (Trent y cols., 1999). De esta forma MceI podría ser la proteína encargada de catalizar la formación del enlace éster entre la serina 84 de la mceE492 y la molécula de salmoquelina en el proceso de maduración. También se requeriría de una proteína que cumpliera la función de la ACP (de acyl carrier protein), la que podría ser llevada a cabo por uno de los dominios de EntF, para lo cual debería formar un intermediario con la mceE492, y este complejo

constituiría el sustrato reconocido por MceI. Para estas reacciones se requeriría de una interacción directa o a lo menos de la colocalización entre MceI y EntF. Al no poseer información de algún homólogo de MceJ, es difícil asignarle una función dentro del proceso, es por eso que este mecanismo propuesto requiere de más información experimental que lo avale.

Un análisis de la organización genética de los sistemas productores de mceE492, microcina M y microcina H47 en diferentes cepas bacterianas (figura 23), revela la presencia en todos ellos de un operón bicistrónico convergente que contiene a los genes homólogos a una glucosil transferasa y a un esterasa, IroB e IroD además de la presencia de homólogos para MceI y MceJ. El año 2003 el grupo de la Dra. Laviña reportó que la producción de la microcina H47 dependía de la vía de síntesis de enteroquelina (Azpiroz y Laviña, 2003). Estos antecedentes nos hacen pensar que la modificación de microcinas con moléculas del tipo salmoquelina no es un mecanismo exclusivo de la mceE492.

4.4. Regulación de la actividad de la mceE492 por la producción de un inhibidor en fase estacionaria.

Además de todos los factores ya mencionados que regulan la actividad de la mceE492, en esta tesis también se describe la presencia adicional de un inhibidor de la actividad bactericida producido en fase estacionaria. Este factor adicional en la regulación de la actividad que hasta el momento es de naturaleza desconocida, podría

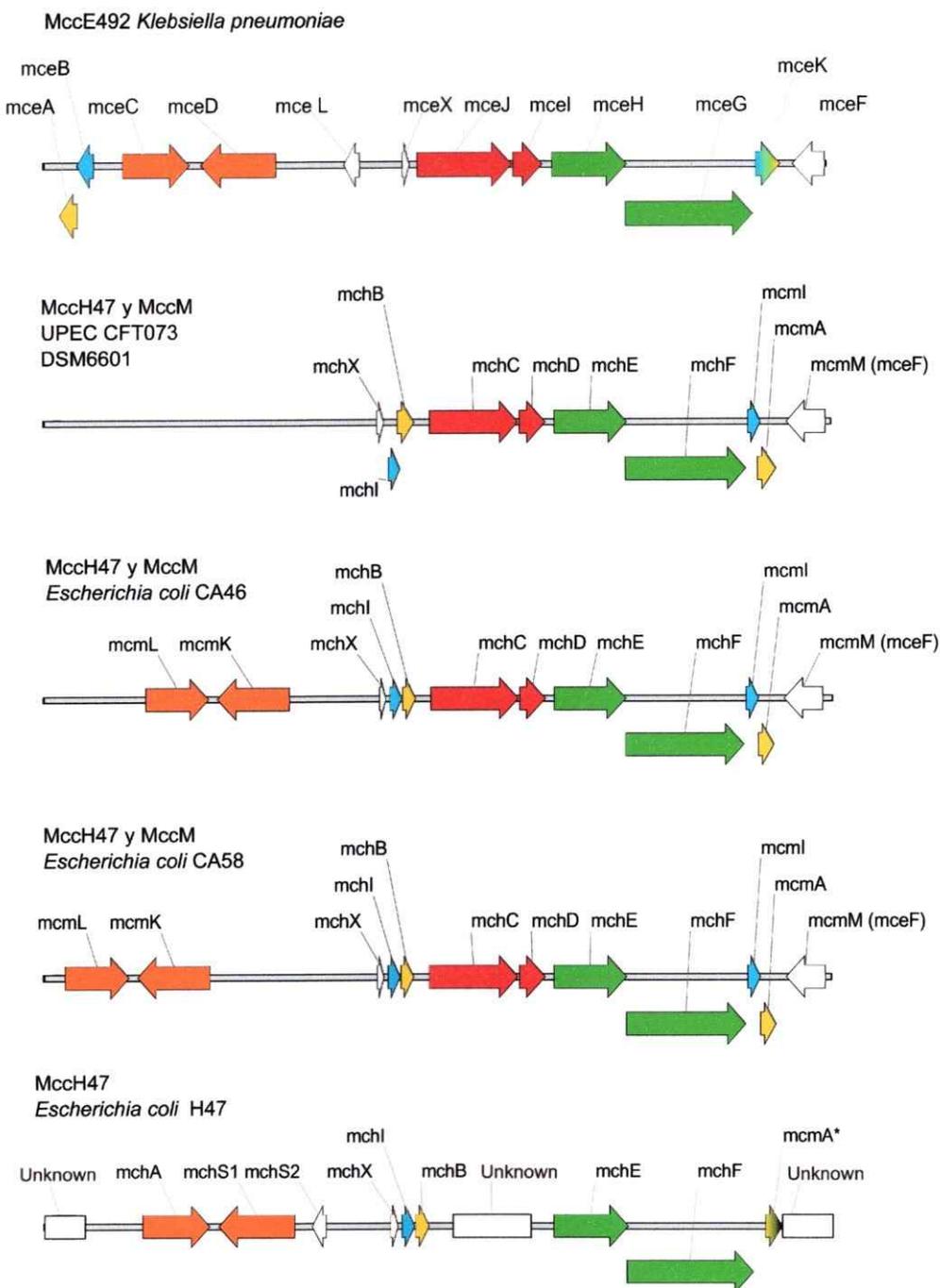


Figura 23. Esquemas de la organización genética de los sistemas productores de mceE492, microcina M y microcina H47 en diferentes cepas bacterianas. En color naranja se destacan los genes homólogos a la glicosil transferasa y esterasa de cada sistema. En rojo se muestran los homólogos a los genes de maduración *mceI* y *mceJ* del sistema productor de mceE492. En verde se muestran los genes que codifican para el transportador dedicado y su proteína accesoria.

corresponder a la misma microcina, en su forma polimerizada, la que promovería el cambio conformacional del resto de la microcina hacia su forma inactiva. El inhibidor también podría ser producto de la actividad de otros genes del sistema productor de la microcina para los cuales aún no se ha determinado una función, pero existen candidatos para una participación en la regulación de la actividad. La cepa sobreproductora (pJEM15) se diferencia de la silvestre por la duplicación de un fragmento que posee los genes *mceF* y *mceK*, genes que también están presentes en otros sistemas de microcinas descritos. En el caso de *mceF*, se ha determinado que posee homología con una prenil proteasa y que su promotor posee una caja Fur funcional (Corsini, 2005), lo que lo convierte en un posible candidato.

Sin embargo serán necesarios más experimentos para conocer la naturaleza del inhibidor y determinar si estos productos génicos del propio sistema de la *mccE492* juegan algún papel en este nivel de regulación.

4.5. Modelo para la producción de *mccE492*.

Los resultados presentados en esta tesis permiten postular el modelo que se muestra en la figura 24. La microcina traducida como una preproteína, puede o no sufrir el proceso de maduración, pero ambas formas son exportadas, previa remoción del péptido líder. El proceso de maduración consistiría en la adición en el C-terminal de una molécula del tipo salmoquelina utilizando el sistema productor de enteroquelina y de una glucosil transferasa (*MceC*), que puede ser sustituida por *IroB*. *EntF* sería necesario para el proceso de formación del enlace covalente entre esta molécula de salmoquelina y la microcina, proceso en el cual también participarían *MceI* y *MceJ*. Finalmente, y previo a su exportación, la salmoquelina unida a la microcina podría ser linealizada por la esterasa homóloga a *IroD*, *MceD*. Una vez exportada la forma

modificada podría inducir la conformación activa en la microcina no modificada, conformación que sería reconocida por los receptores de catecolatos FepA, Cir y Fiu, llegando así hasta la membrana interna, lugar en el cual la mceE492 ejerce su actividad bactericida. Por otra parte la fracción de microcina no modificada que no tiene la conformación activa desembocaría en la formación de fibras de tipo amiloide con la consiguiente pérdida de actividad bactericida.

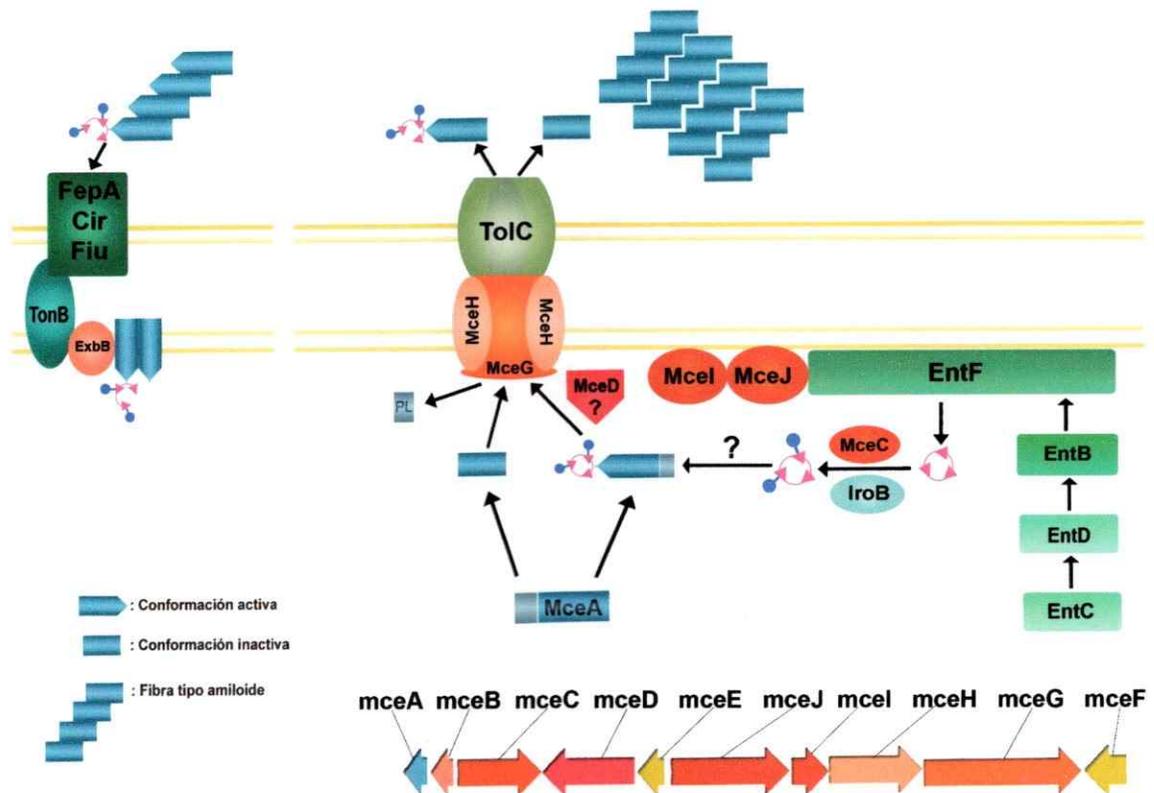


Figura 24. Modelo para la producción de mceE492 activa. La mceE492 se sintetiza como una preproteína, la que puede sufrir o no un proceso de maduración, que consiste en la unión de una molécula tipo salmoquelina al extremo C-terminal. En este proceso participan las proteínas MceC, MceI, MceJ y posiblemente EntF. Luego ambas formas (modificada y no modificada) son exportadas al medio extracelular y concomitantemente ocurre el corte proteolítico que remueve el péptido líder. En la célula blanco interactúa con los receptores FepA, Cir y Fiu de *E. coli*, ingresando a la membrana interna en un proceso dependiente de TonB.

5. CONCLUSIONES

- Los genes *mceCGHI* presentan una mayor expresión traduccional en la fase exponencial del crecimiento bacteriano la cual disminuye en fase estacionaria. Este efecto no se observa cuando la cepa productora crece en un medio carente de hierro.
- La glucosil transferasa IroB es equivalente a MceC y es capaz de complementar su función tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella enterica*.
- La salmoquelina es capaz de complementar una mutación en MceC cuando ingresa a la célula utilizando los receptores de membrana externa para sideróforos de tipo catecol en *Escherichia coli*.
- La producción de *mccE492* activa requiere de enzimas implicadas en la síntesis de enteroquelina.
- La expresión de *mccE492* activa parece estar controlada por la presencia de un inhibidor, de naturaleza desconocida, que se secreta al espacio extracelular.

6. REFERENCIAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1992) Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates, New York, N. Y.
- Azpiroz, M.F. y Lavíña, M. (2003) Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1235-1241.
- Baeza, M. (2003) Mecanismo de inmunidad, de traslocación y de conversión tipo prión de la mceE492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Baichoo, N. y Helmann, J.D. (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**:5826-5832.
- Baquero, F. y Moreno, F. (1984) The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:117-124.
- Barasch, J. y Mori, K. (2004) Iron thioredoxin. *Nature.* **432**:811-813.
- Baumler A.J., Tsolis, R.M., van der Velden, A.W.M., Stojiljkovic, I., Anic S. y Heffron, F. (1996) Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene.* **183**:207-213.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J. y Soto, C. (2005) Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* **280**:26880-26885.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C. y Belin, D. (2006) Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.* **188**:7049-7061.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G.J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkemann, G., Hantke, K. y Süssmuth, R.D. (2004) The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals.* **17**:471-481.
- Bleuel, C., Grobe, C., Taudte, N., Scherer, J., Wessenberg, D., Kraub, G.J., Nies, D.H. y Grass, G. (2005) TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:6701-6707.
- Braun, V., Patzer, S.I. y Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**:365-380.

- Castilho, B.A., Olfson, P. y Casadaban, M.J. (1984) Plasmid insertion mutagenesis and lac gen fusion whit mini-mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* **158**:488-495.
- Castillo, J.A. (2003) Mecanismo de exportación y procesamiento de la mceE492. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.
- Corsini, G. (2005) Regulación de la expresión de la mceE492 y su inmunidad. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2002) The expresion of genes involved in microcin maduration regulates the produccion of active microcin E492. *Biochimie* **84**:539-544.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev.* **84**:539-544.
- Crosa, J.H. y Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzimology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:223-249.
- de Lorenzo, V. (1984) Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**:72-75.
- de Lorenzo, V. y Pugsley, A. P. (1985) Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:666-669.
- de Lorenzo, V., Martínez, J. y Asensio, C. (1984) Microcin-mediated interactions between *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *J. Gen. Microbiol.* **130**:391-400.
- Destoumieux-Garzon, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bassin, Y., Molle, G., Pons A.M., Letellier, L., Peduzzi, J., y Rebuffat, S. (2003) Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:1031-1041.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. y de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**:6223-6229.
- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C.T. (2004) In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 571-576.

- Fischbach, M., Lin, H., Liu, D.R. y Walsh, C.T. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 132-138.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S. y Aderem, A. (2004) Lipocalin2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. *Nature*. **432**:917-921.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A. y Walsh C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*. **36**:8495-8503.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. y Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell*. **10**:1033-1043.
- Griggs, D.W. y Konisky, J. (1989) Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cir* gene: metal-dependent binding of fur protein to the promoters. *J. Bacteriol.* **171**:1048-1054.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hantash, F.M. y Earhart, C.F. (2000) Membrane association of the *Escherichia coli* enterobactin synthase proteins EntB/G, EntE and EntF. *J. Bacteriol.* **182**:1768-1773.
- Hantke, K. (1987) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182**:288-292.
- Hantke, K. (1990) Dihydroxybenzoylserine a siderophore for *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:5-8.
- Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:172-177.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. y Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IronN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 3677-3682.
- Higgs, P.I., Larsen, R.A. y Postle, K. (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol. Microbiol.* **44**:271-281.
- Hohn, B., y Collins, J. (1980) A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*. **11**:291-298.

- Kolter, R., y Moreno, F. (1992) Genetics of ribosomal synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:141-163.
- Lagos, R. Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi y Monasterio, O. (1993) Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett.* **321**:145-148.
- Lagos, R., Villanueva, J.E. y Monasterio O. (1999) Identification and properties of the genes encoding microcin E492 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* **181**:212-217.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, C., Hetz, C., Strasburger, E., Castillo, J.A., Vergara, C. y Monasterio, O. (2001) Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel formed bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**:229-243.
- Lamb, S.S. y Wright, G.D. (2005) Accessorizing natural products: adding to nature's toolbox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 519-520.
- Lazdunki, C.J. (1988) Pore forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie.* **70**:1291-1296.
- Lin, H., Fischbach, M., Liu, D.R. y Walsh, C.T. (2005) In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:11075-11084.
- Loomis, L.D. y Raymond, K.N. (1991) Solution equilibria of enterobactin and metal-enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* **30**:906-911.
- Miller, J. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Press. New York. pp. 71-74.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**:26723-26726.
- O'Brien, I.G. y Gibson, F. (1970) The structure of enterochelin and related 2,3-gihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **215**:393-402.
- O'Brien, I.G., Cox, G.B. y Gibson, F. (1971) Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **237**:537-549.
- Orellana, C. y Lagos, R. (1996) The activity of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae* is regulated by a microcin antagonist. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:297-303.

- Ozenberger, B.A., Nahlik, M.S. y McIntosh, M.A. (1987) Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:3638-3646.
- Patzer, S.I., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F. y Hantke, K. (2003) The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology.* **149**:2557-2570.
- Pollack, J.R. y Neilands, J.B. (1970) Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**:989-992.
- Pons, A.M., Zorn N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorsselaer, A. y Cottenceau, G. (2002) Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**:229-230.
- Pugsley, A.P. (1984) The ins and outs of colicins. Part I: Production and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**:168-175.
- Pugsley, A.P. y Reeves, P. (1977) The role of colicin receptors in the uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**:903-911.
- Pugsley, A.P., Moreno, F., y de Lorenzo, V. (1986) Microcin E492 insensitive mutants of *E. coli* K-12. *Gen. Microbiol.* **132**:3253-3259.
- Rabsch, W., Methner, U., Voigt, W., Tschape, H., Reissbrodt, R. y Williams, P.H. (2003) Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **71**:6953-61
- Rangland, W.L., Pace, J.L. y Kemper, D.L. (1974) Fluorometric scanning of fluorescamine-labelled proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **59**:24-33.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A. y Kim, S.S. (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 3584-3588.
- Reichert, J., Sakaitani, M. y Walsh, C. (1992) Characterization of EntF as a serine-activating enzyme. *Protein Sci.* **1**:549-556.
- Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117-137.
- Roche, E.D. y Walsh, C.T. (2003) Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. *Biochemistry.* **42**:1334-1344.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. y Walsh C.T. (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6**:385-400.
- Strahsburger, E. (2005) Estudio de la regulación intracelular y extracelular de la actividad antibiotica de la mceE492 por enterobactina y sus productos de hidrólisis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O. y Lagos, R. (2005) Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3083-3086.
- Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Alfonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J-C. y Rebuffat S. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translatinally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **279**:28233-28242.
- Trent, M.S., Worsham, L.M.S. y Ernst-Fonberg, L. (1999) HlyC, the internal protein acyltransferase that activates hemolysin toxin: the role of conserved tyrosine and arginine residues in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-direct mutagenesis. *Biochemistry.* **38**:8831-8838.
- Valdebenito, M., Bister, B., Reissbrodt, R., Hantke, K. y Winkelmann, G. (2005) The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**:99-107.
- Walsh, C.T, Freel-Mayers, C.L. y Losey, H.C. (2003) Antibiotic glycosyltransferases: antibiotic maturation and prospects for reprogramming. *J. Med. Chem.* **46**:3425-3436.
- Wenzel, S.C. y Müller, R. (2005) Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: derivations from textbook biosynthetic logia. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**:447-458.
- Wilkens M., Villanueva J.E., 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*. *J. Bacteriol.* **179**:4789-4794.

- Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G. y Hantke, K. (2005) Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmoquechelin utilization. *Microbiology*. **151**:2363-2372.